

Альтернативные биомодели

Плотников Евгений Владимирович, к.х.н.,

Доцент, Инженерная школа химических и био-медицинских технологий ТПУ

Альтернативные биомодели

Основные альтернативные биомодели:

1. Гидробионты (дафнии),
2. Бактерии и грибы (кишечная палочка, дрожжи),
3. **Культуры клеток человека и животных (нормальные и опухолевые линии) и культуры тканей**

Альтернативные методы для уменьшения использования животных

- ▶ улучшенная система хранения и использования информации, обмен информацией об экспериментах, уже проведенных над животными, во избежание повторения таких процедур;
- ▶ использование физических и химических приемов и прогнозов, основанных на физических и химических свойствах молекул;
- ▶ использование математических и компьютерных моделей биохимических, физиологических, фармакологических, токсикологических и поведенческих систем и процессов;
- ▶ использование *in vitro* - методов, выращивания тканей(в т.ч. человеческих тканей);
- ▶ использование низших организмов с ограниченной чувствительностью;
- ▶ использование позвоночных животных на ранних этапах их развития;
- ▶ эксперименты с участием людей-добровольцев (в некоторых случаях).

Клеточные культуры ин витро

- ▶ Гуманно
- ▶ Экономично
- ▶ Эффективно, одновременно большое количество опытов и повторов
- ▶ Однако, ограниченные возможности экстраполяции
- ▶ Не всегда отражает совокупность процессов и эффектов ин виво

Общая классификация клеточных культур

По способу культивирования:

1. Суспензионные культуры клеток (не прикреплены)
2. Адгезивные культуры клеток (прикрепляются к поверхности)

По происхождению:

- ▶ Эмбриональные
- ▶ Нормальные из взрослых организмов
- ▶ Опухолевые

По структуре и типу пролиферации:

- ▶ Первичные
- ▶ Полуперевиваемые (диплоидные)
- ▶ Перевиваемые (Постоянные)

Основные клеточные линии в лаборатория клеточных культур ТПУ.

- ▶ Jurkat (Т-лимфобластная лейкемия)
- ▶ HeLa (рак шейки матки)
- ▶ SH-SY5Y (нейробластома)
- ▶ 3T3-L1 (фибробласты мыши)
- ▶ PC-3 (рак простаты)
- ▶ THP-1 (моноцитарный лейкоз)
- ▶ U937 (гистиоцитарная лимфома)
- ▶ MCF-7, MDA 231 (рак молочной железы)
- ▶ BT 474, BT 549 (рак молочной железы)

Борьба за запрет тестирования на животных

- ▶ Например в сфере тестирования косметики, с 1998 года запрещено тестирование готовой продукции из сектора косметики в Германии, с 2004 года запрещено тестирование готовой косметической продукции во всей Европе, С 2009 года запрещено так же тестирование ингредиентов косметических средств в Европе
- ▶ Тем не менее ежегодно в лабораториях гибнет 50 тысяч животных!
- ▶ Фармпродукция регулируется другими законами и здесь тесты на животных обязательны! Однако, поиск альтернативных методов и моделей продолжается.

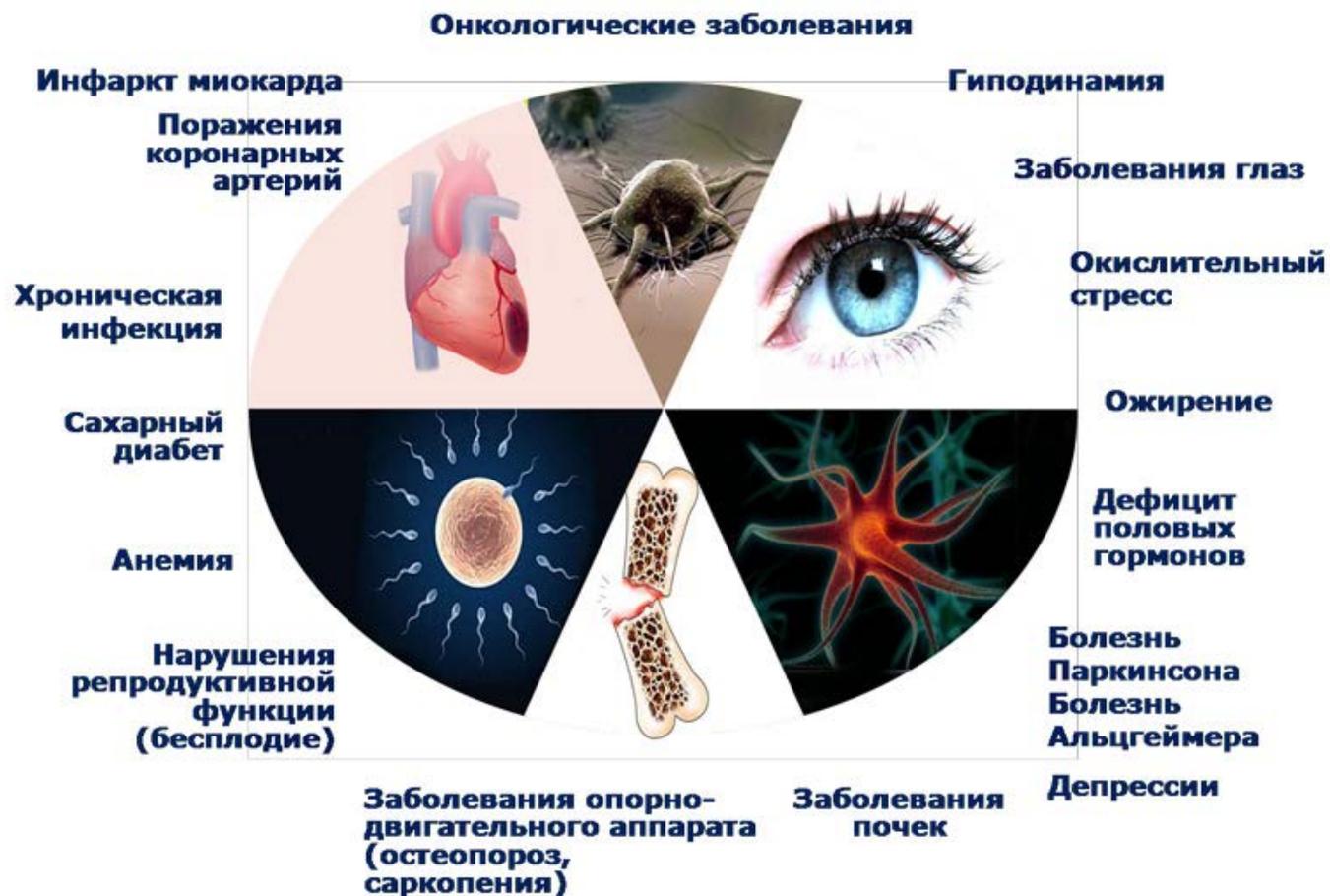
Замена позвоночных животных на беспозвоночных



Использование культуры тканей и микроорганизмов



Клеточные модели заболеваний и патологических состояний



Клеточная модель старения

- ▶ Хронологическое старение дрожжей – уменьшение со временем жизнеспособности дрожжей в культуре в стационарной фазе. Изучается ферментативная активность, скорость деления, активность определенных генов т.п. При этом варьируются внешние факторы (температура, питательные вещества и т.п.). Например, дрожжи культивировали на питательной среде (SDC) и в воде, и средняя продолжительность жизни в воде была больше примерно в два раза (примерно 15 суток против 7, в зависимости от штамма). Это согласовалось с данными о том, что ограничение питания замедляет старение.
- ▶ Исследование механизмов старения на клетках привело к открытию лимита Хейфлика (ограничения клеточного деления) и созданию теломерной теории старения.

Модель окислительного стресса

- ▶ Окислительный стресс играет важную роль в патогенезе многих заболеваний.
- ▶ Индукцию стресса в клетках проводят окислителями (перекисью водорода и т.п.)
- ▶ Оценивают уровень апоптоза, активность ферментов, экспрессию белков, действие антиоксидантов, концентрацию активных форм кислорода в клетках и другие параметры.

Модель ишемии головного мозга ин витро

- ▶ модели создания гипоксии клеток мозга ин витро (модели с депривацией кислорода), модели с депривацией кислорода и одновременного создания других условий (депривация кислорода и глюкозы, депривация кислорода/глюкозы и создание метаболических условий ишемии), а также модели глутаматной эксайтотоксичности и окислительного повреждения.
- ▶ Например, гипоксия путем лишения кислорода — культура нейрональных клеток B50 подвергается 9-часовой гипоксии (сбалансированное содержание N₂, 1 % O₂ и 5 % CO₂), а затем 24-часовой реоксигенации в полной культуральной среде.

Моделирование цитотоксических эффектов

- ▶ Используют различные целевые виды клеточных культур, например, гепатоциты.
- ▶ Исследуемое вещество вносят в среду, если растворимо, или наносят на монослой выросших клеток.
- ▶ Оценивают прямое цитопатическое действие (апоптоз, некроз), не прямое цитотоксическое действие (секреция цитокинов, белков, деление),
- ▶ Осматривают клетки через микроскоп с окраской, оценивают изменение общей морфологии, вакуолизацию, расщепление, лизис клеток и целостность мембран. Итоговую оценку дают в пределах не цитотоксично - значительная цитотоксичность.

Оценка мутагенности ин витро

- ▶ ускоренные скрининговые тесты перед тестированием на животных
- ▶ недорогие тесты на культурах клеток и бактерий
- ▶ В основе данных моделей лежат оценка хромосомных повреждений, генных мутаций или повреждения ДНК.
- ▶ Спектр моделей - от бактерий и дрожжей до культивируемых тканей и клеток млекопитающих.