

Ζωϊκά Πρότυπα Νόσων στην Βιοϊατρική Έρευνα



Μαραζιώτη Αντωνία

Επίκουρη καθηγήτρια Φυσιολογίας
Πανεπιστήμιο Πελοποννήσου



Ζωϊκά Πρότυπα στην Βιοϊατρική Έρευνα

- ✓ Έρευνα: βελτίωση υγείας, διάρκειας και ποιότητας ζωής
- ✓ Τα περισσότερα βιοϊατρικά επιτεύγματα θεμελιώθηκαν ύστερα από έρευνες σε ζώα
- ✓ Τα επιτεύγματα από την πειραματική βιοϊατρική έρευνα εφαρμόζονται για την υγεία του ανθρώπου και των ζώων
- ✓ Η πειραματική βιοϊατρική έρευνα διεξάγεται σήμερα σε **ειδικά ζωικά πρότυπα** ανθρωπίνων νοσημάτων
- ✓ Ταυτόχρονη τήρηση των αρχών των τριών R (**replacement, reduction, refinement**: αντικατάσταση, μείωση και εξευγένιση) της χρήσης ζώων εργαστηρίου



Ζωϊκά Πρότυπα στην Βιοϊατρική Έρευνα

- ✓ Η πρόοδος σε φάρμακα για την πρόληψη και τη θεραπεία νοσημάτων
- ✓ Η ανάπτυξη σε εμβόλια, ορούς και αντιβιοτικά
- ✓ Η εξέλιξη των χειρουργικών τεχνικών και υλικών
- ✓ Η ανάπτυξη διαγνωστικών και θεραπευτικών μεθόδων



επιτυγχάνεται ύστερα από έρευνα της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητάς τους σε ζώα εργαστηρίου πριν την εφαρμογή τους σε ανθρώπους.



Εναλλακτικές λύσεις ζωϊκών προτύπων

Καλλιέργεια κυττάρων και ιστών

- ✓ Μελέτη σε βάθος του φαινομένου
- ✓ Δυνατότητα μεγάλου αριθμού επαναλήψεων
- ✓ Μικρό κόστος
- ✓ Άριστος έλεγχος των συνθηκών της υπό μελέτη διαδικασίας

- ✗ Απουσία οργανισμού
- ✗ Απουσία ενδοσυστημικών και διασυστημικών αλληλεπιδράσεων

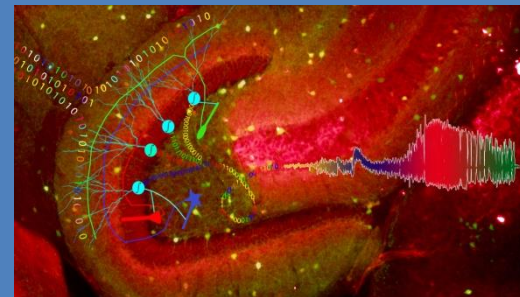
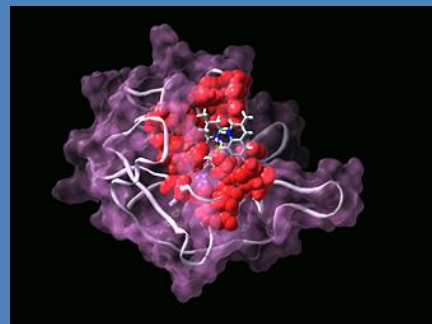




Εναλλακτικές λύσεις ζωϊκών προτύπων

Μοντέλα προσομοίωσης σε πρόγραμμα υπολογιστή

- ✓ Προσομοίωση συγκεκριμένων μοριακών και χημικών δομών και μελέτη των αλληλεπιδράσεών τους
 - ✓ Δυνατότητα τεράστιου αριθμού επαναλήψεων
 - ✓ Μικρό κόστος χρήσης
 - ✓ Δυνατότητα επόπτευσης κάθε σταδίου
 - ✓ Αυξημένες δυνατότητες παρέμβασης
-
- ✗ Περιορίζεται από τον προγραμματισμό
 - ✗ Δεν παρέχει γνώση για το πώς το φυσιολογικό σύστημα λειτουργεί πραγματικά

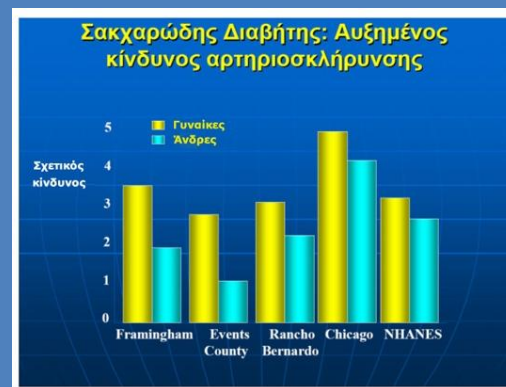




Εναλλακτικές λύσεις ζωϊκών προτύπων

Επιδημιολογικές Μελέτες

- ✓ Αξιοποίηση ήδη υπαρχόντων δεδομένων
- ✓ Μικρό κόστος
- ✓ Οφέλη προηγούμενων μελετών μεγιστοποιούνται



- ✗ Μεγάλο μέρος δεδομένων δεν καταγράφεται ή συγκεντρώνεται
- ✗ Χαμηλή αξιοπιστία δεδομένων
- ✗ Πιθανότητα απόκλισης από το πραγματικό φαινόμενο



Χρήση Ζωϊκών Προτύπων Νόσων του Ανθρώπου

Πλεονεκτήματα

- ✓ Πολλές γενετικές και φυσιολογικές ομοιότητες μεταξύ ζώων και ανθρώπων
- ✓ Είναι ευπαθή στις ίδιες ασθένειες που προσβάλλουν τον άνθρωπο
- ✓ Η σύντομη διάρκεια ζωής των ζώων επιτρέπει να μελετηθούν σε όλη τη ζωή τους
- ✓ Όταν κάνουμε μία παρέμβαση σε ένα ζωικό πρότυπο έχουμε απάντηση από το σύνολο των συστημάτων ενός οργανισμού
- ✓ Ελεγχόμενο περιβάλλον, ελαχιστοποίηση πειραματικών μεταβλητών



Χρήση Ζωϊκών Προτύπων Νόσων του Ανθρώπου

➤ Μερικά από τα πολλά προβλήματα υγείας που εμφανίζονται τόσο τους ανθρώπους όσο και στα ζώα περιλαμβάνουν:

- αλλεργίες
- Αρθρίτιδα
- καρκίνος
- φυματίωση
- άσθμα
- επιληψία
- καρδιοπάθεια
- έλκος
- υπέρταση
- ιλαρά
- γρίπη
- γλαύκωμα
- διαβήτης
- βρογχίτιδα
- κώφωση
- λευχαιμία



Χρήση Ζωϊκών Προτύπων Νόσων του Ανθρώπου

Μειονεκτήματα

- ✗ Ηθικά ζητήματα για τη μεταχείριση και τα δικαιώματα των ζώων
- ✗ Κόστος απόκτησης και συντήρησης εργαστηριακών ζώων
- ✗ Για έναν αριθμό ασθενειών είναι ατυχής η προσπάθεια εξομοίωσης τους με ζωικό πρότυπο γιατί δεν υφίσταται απόλυτη ομολογία



Χρήση Ζωϊκών Προτύπων Νόσων του Ανθρώπου

- ✿ Χρησιμοποιούνται κάθε χρόνο 50-100 εκ. σπονδυλωτά ζώα παγκοσμίως για ερευνητικούς σκοπούς
 - 10-11 εκ. στην Ευρωπαϊκή Ένωση
 - 23-25 εκ. στις Η.Π.Α.
- ✿ Βραβευμένες Έρευνες
 - 70 από τα τελευταία 103 Νόμπελ Ιατρικής βασίστηκαν σε Έρευνες σε Ζωϊκά Πρότυπα
 - 17 από τα τελευταία 19 (2000-2020)



Χρήση Ζωϊκών Προτύπων Νόσων του Ανθρώπου

- Οι **μύες** και οι **επίμυες** αποτελούν πάνω από το 90% του συνολικού αριθμού των ζώων που χρησιμοποιούνται στην βιοϊατρική έρευνα
- Άλλα είδη που χρησιμοποιούνται είναι το **ψάρι ζέβρα** (zebrafish), η **Δροσόφιλα** και οι **νηματώδεις σκώληκες**
- Άλλα είδη ζώων, όπως **κουνέλια**, **βατράχια**, **πουλιά**, **μη ανθρώπινα πρωτεύοντα** και πολλά άλλα αποτελούν το υπόλοιπο 10% των ζώων που χρησιμοποιούνται στην έρευνα





Το Ιδανικό Ζωϊκό Πρότυπο

- ✓ Άμεσα διαθέσιμο
- ✓ Οικονομικό
- ✓ Εύκολο στο χειρισμό
- ✓ Απόδοση επαναλήψιμων αποτελεσμάτων
- ✓ Παροχή επαρκούς βιολογικού υλικού για ανάλυση
- ✓ Γενετική, ανατομική και φυσιολογική ομολογία με άνθρωπο





Επιλογή Κατάλληλου Ζωϊκού Προτύπου



- Μέγεθος ζώου
 - Μικρά ζώα ➡ Εύκολα στο χειρισμό
 - Μεγάλα ζώα ➡ Μεγαλύτερες ποσότητες δείγματος
- Ανατομία
 - Ασπόνδυλα ➡ Αναπτυξιακή και λειτουργική ομολογία
 - Σπονδυλωτά ➡ Ανατομική και φυσιολογική ομολογία
- Τοκετοομάδα ➡ Ομοιογένεια δειγμάτων και μεγαλύτερος αριθμός επαναλήψιμων αποτελεσμάτων
- Διάρκεια ζωής
 - Μικρή διάρκεια ζωής ➡ Ταχύτερη εξέλιξη και μελέτη της νόσου



Επιλογή Κατάλληλου Ζωϊκού Προτύπου

- Γνώση της γενετικής αλληλουχίας ➡ Γενετικές παρεμβάσεις
- Διαθεσιμότητα αντιδραστηρίων για το συγκεκριμένο είδος
↳ Αντισώματα, siRNAs
- Κόστος ➡ Συντήρηση και Αναπαραγωγή





Το ποντίκι ως Ζωϊκό Πρότυπο Νόσων Ανθρώπου

 Παροχή σημαντικών δεδομένων στη μοριακή παθογένεση πολλών νόσων

1. Σημαντική γενετική ομολογία με τον άνθρωπο (~95%)
2. Ποικιλία καθαρών στελεχών
3. Μεγάλη ποικιλία γενετικά τροποποιημένων ποντικών
4. Εύκολη και οικονομική αναπαραγωγή
5. Μεγάλη τοκετομάδα
6. Μεγάλη διαθεσιμότητα αντιδραστηρίων για επεξεργασία δειγμάτων





Χρήση Διαγονιδιακών Ζωϊκών Προτύπων

1. Μελέτη της λειτουργίας ενός γονιδίου
2. Μελέτη των γονιδιακών μεταλλάξεων σε νόσους
3. Δοκιμή θεραπευτικών προσεγγίσεων



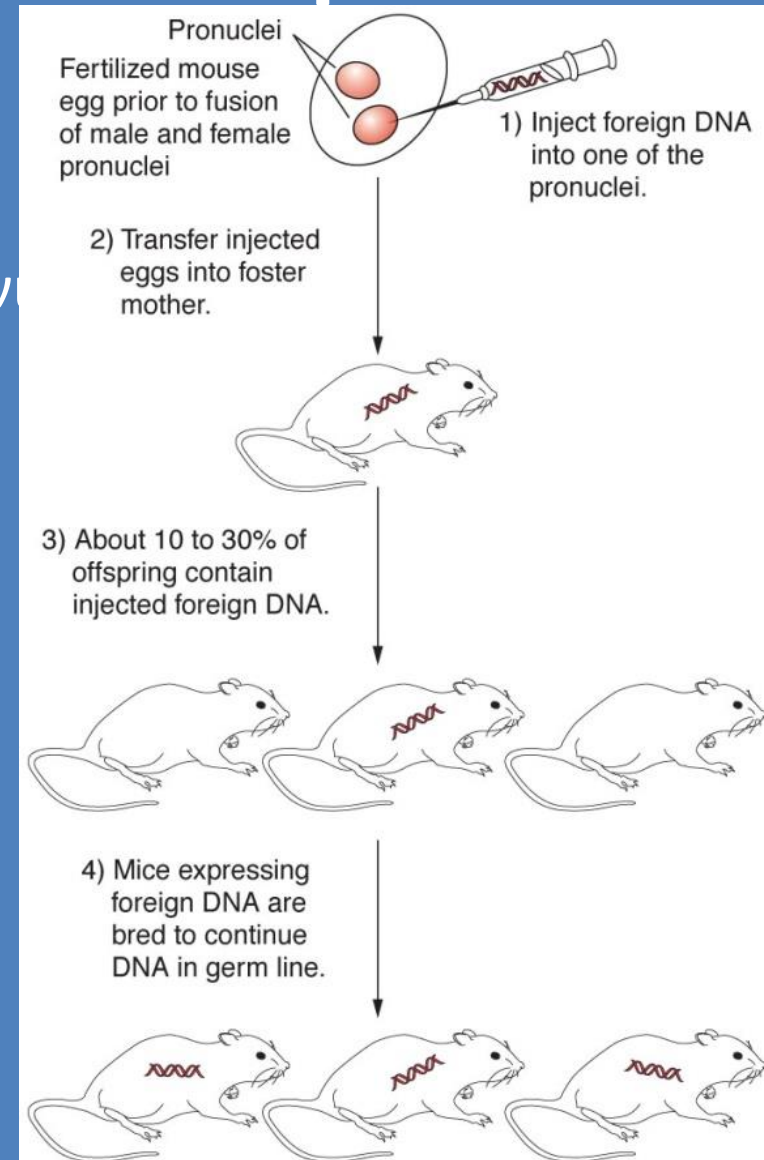


Χρήση Διαγονιδιακών Ζωϊκών Προτύπων

➤ Διαγονιδιακά ζώα

Εισαγωγή ξένων ή μεταλλαγμένων γονίων

- ➡ Μικροένεση γενετικού υλικού σε προπυρήνα γονιμοποιημένου ωαρίου
- ➡ Ιικοί φορείς για την μεταφορά των επιθυμητών γονιδίων στα έμβρυα πριν την εμφύτευση





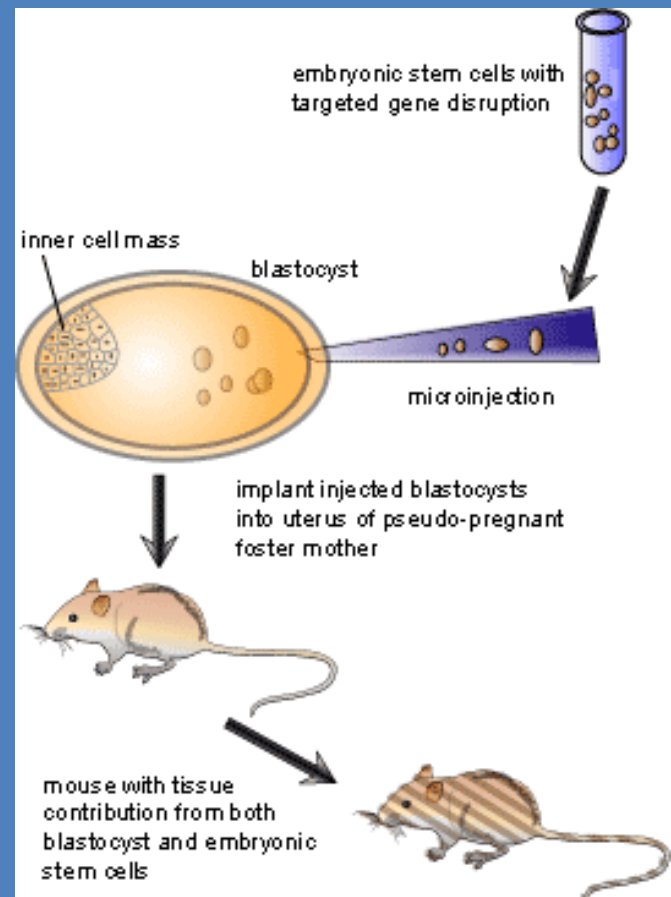
Χρήση Διαγονιδιακών Ζωϊκών Προτύπων

➤ Knock-out ζώα

Αντικατάσταση του φυσιολογικού γονιδίου με μεταλλαγμένο ή απενεργοποίηση τμήματος ή όλου του γονιδίου

➤ Knock-in ζώα

Ενσωμάτωση στο γονιδίωμα του ζώου ενός εξωγενούς γονιδίου αναφοράς (reporter gene, GFP, luciferase)



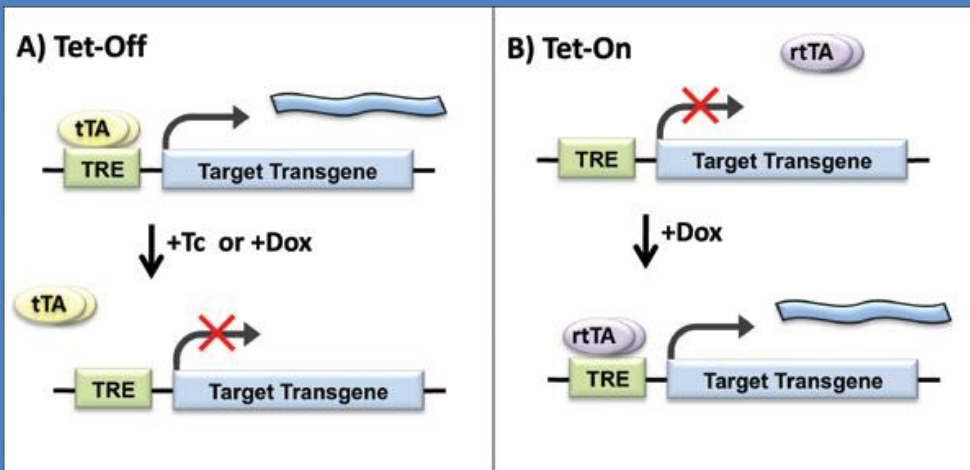


Χρήση Διαγονιδιακών Ζωϊκών Προτύπων

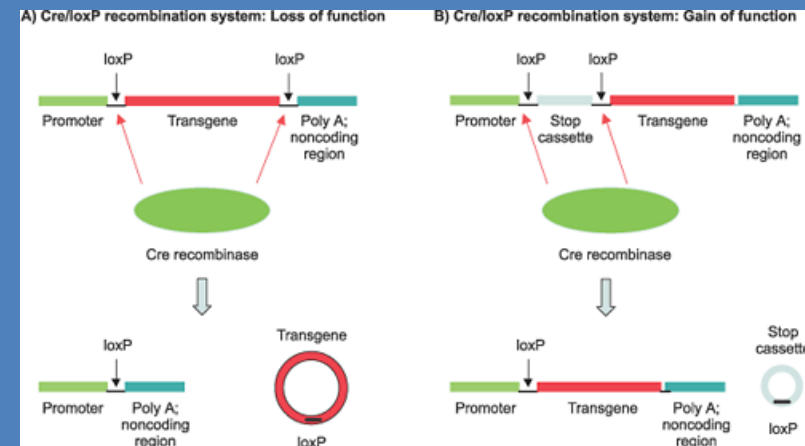
➤ Υπό προϋποθέσεις knock-in και knock-out ζωϊκά πρότυπα

Ιστοειδική και Χρονικά συγκεκριμένη έκφραση ή αποσιώπηση ενός γονιδίου

Σύστημα Tet-off / Tet-on



Σύστημα Cre-LoxP





Χρήση Διαγονιδιακών Ζωϊκών Προτύπων

Leptin Knock-out rat

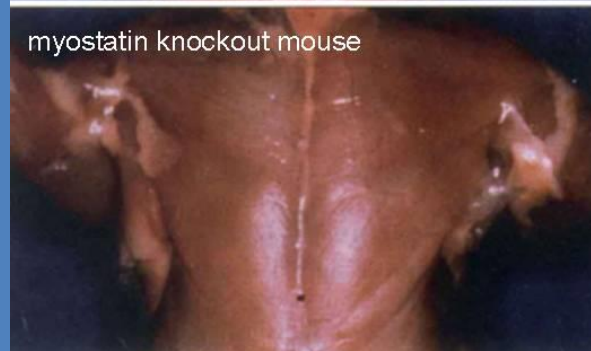


Myostatin Knock-out mice

normal mouse



myostatin knockout mouse





Χρήση Διαγονιδιακών Ζωϊκών Προτύπων

Mitf Knock-in mice



Hairless Knock-in mice





Ζωϊκά Πρότυπα Καρκίνου

- ❖ Ζωϊκά πρότυπα όπου ο καρκίνος δημιουργείται αυθόρμητα
- ❖ Ζωϊκά πρότυπα των οποίων τα γονίδια έχουν τροποποιηθεί έτσι ώστε να αναπτύσσουν όγκους, ίδιου τύπου και με παρόμοιες ιδιότητες όπως οι όγκοι που τα τροποποιημένα γονίδια προκαλούν στον άνθρωπο
- ❖ Ζωϊκά πρότυπα που αναπτύσσουν όγκους μετά από έκθεσή τους σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως χημικά ή ραδιενέργεια



Ζωϊκά Πρότυπα Καρκίνου

Μοντέλα Μεταμόσχευσης (ιστός, κύτταρα)

➡ Μοντέλα εισαγωγής Ιδιομοσχεύματος

- Ανοσοεπαρκής δέκτης
- Δέκτης και μόσχευμα έχουν το ίδιο γενετικό υπόβαθρο

➡ Μοντέλα εισαγωγής Ξενομοσχεύματος

- Ανοσοανεπαρκής δέκτης
- Δέκτης= ποντίκι, μόσχευμα = ανθρώπινο



Ζωϊκά Πρότυπα Καρκίνου

Ανοσοκατεσταλμένα Ζώα – Ξενιστές

- Αθυμικά (Nude) Ποντίκια (ασθενή ανοσολογική απόκριση Τ-κυττάρων)
- Ποντίκια ελλειπή σε NKs
- SCID ποντίκια – Προχωρημένη συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια
- Ανοσοκαταστολή με ακτινοβολήση ή χρήση φαρμάκων



Προνομιούχες ανοσολογικά περιοχές για εμφύτευση

- Κερατοειδής ματιού
- Χorioαλλαντοϊκή μεμβράνη εμβρύου όρνιθας
- Εσωτερικό μέρος στο μάγουλο των χάμστερ

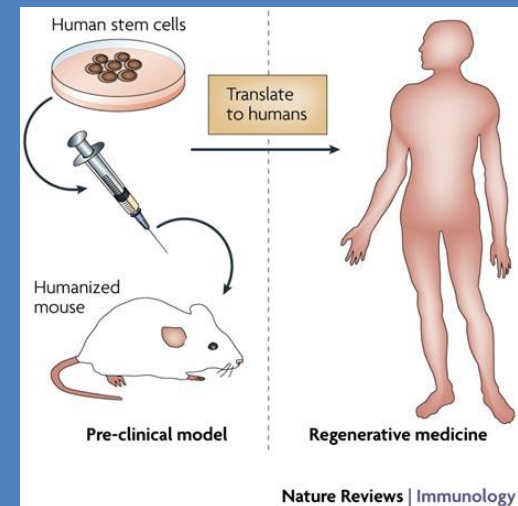


Ζωϊκά Πρότυπα Καρκίνου

Διαγονιδιακά Ανθρωποποιημένα Ποντίκια

- Ποντίκια που φέρουν λειτουργικά ανθρώπινα γονίδια, κύτταρα, ιστούς ή/και όργανα
- Ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια που φέρουν μετάλλαξη στο IL-2 υποδοχέα (*IL2ry^{null} mice*)

- AIDS
- HUMAN CANCER
- TRANSPLANTATION

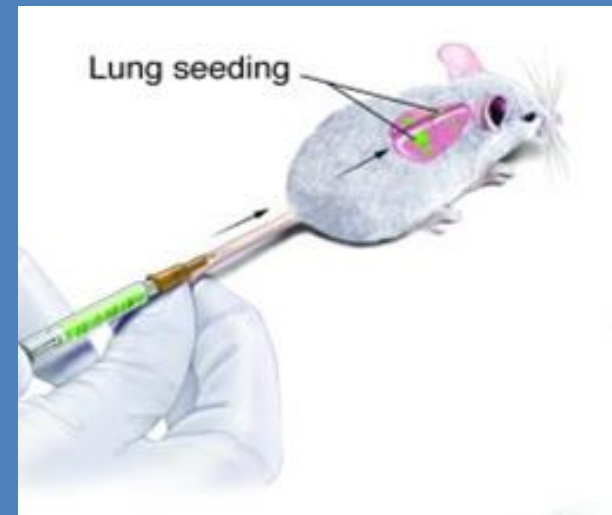




Ζωϊκά Πρότυπα Καρκίνου

Τοποθεσία Εμφύτευσης Μοσχεύματος

- Ορθοτοπική (orthotopic model)
- Υποδόρια (flank tumor growth model)
- Ενδοπεριτοναϊκά (metastasis model)
- Ενδοφλέβια (tail vein metastasis model)



Παραδείγματα Ζωϊκών Προτύπων Νόσων του Ανθρώπου



Ζωϊκά Πρότυπα Καρκίνου του Πνεύμονα

☀ Ζωϊκό πρότυπο χημικά επαγόμενου καρκίνου του πνεύμονα

➤ Επαναλαμβανόμενες ενδοπεριτοναϊκές εγχύσεις μεταλλαξιγόνων

- ☑ Ουρεθάνη
- ☑ Μεθυλ-χωλανθρένιο
- ☑ Βουτυλιωμένο υδροξύλ-τολουένιο



☀ Γενετικό ζωϊκό πρότυπο καρκίνου του πνεύμονα

➤ Ενεργοποίηση μεταλλαγμένου ογκογονιδίου Kras στο πνεύμονα

LSL-Kras^{G12D} ποντίκια

➤ Γενετική Επαγωγή με ενδοτραχειακή χορήγηση αδενοϊού Cre



Ζωϊκά Πρότυπα Κακοήθους Υπεζωκοτικής Συλλογής (ΚΥΣ)

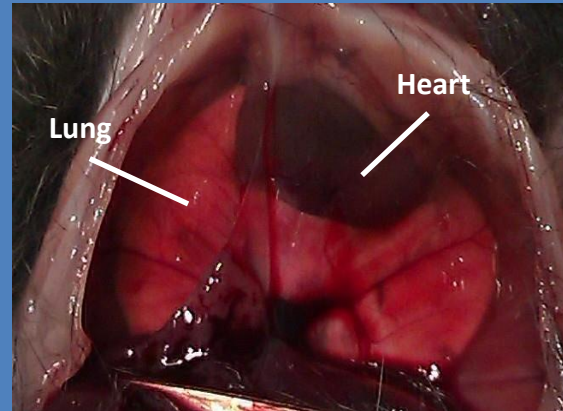
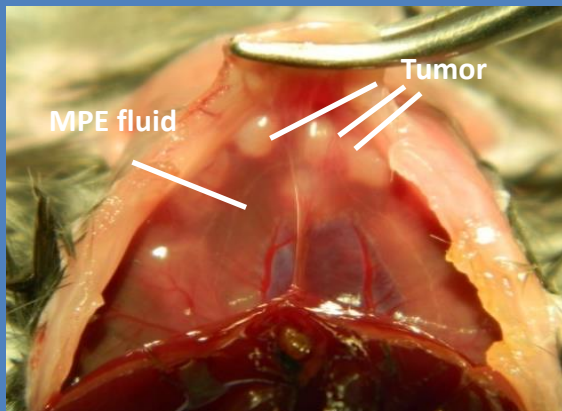
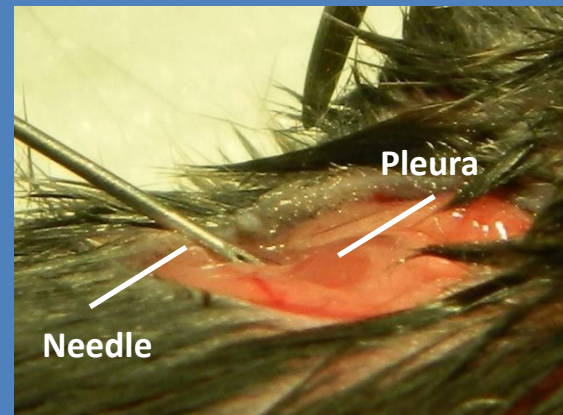
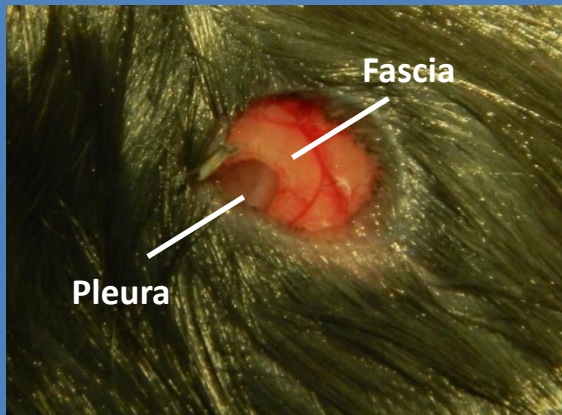
- Ορθοτοπική εμφύτευση ανθρώπινων αδενοκαρκινωμάτων ιστών ή κυττάρων στην υπεζωκοτική κοιλότητα ανοσοανεπαρκών ποντικών
- Ορθοτοπική έγχυση καρκινικών κυττάρων στην υπεζωκοτική κοιλότητα ανοσοεπαρκών ποντικών

Γενετικό ζωϊκό πρότυπο ΚΥΣ

- *LSL-Kras*^{G12D};p53 deficient ποντίκια → κακοήθες μεσοθηλίωμα με ΚΥΣ



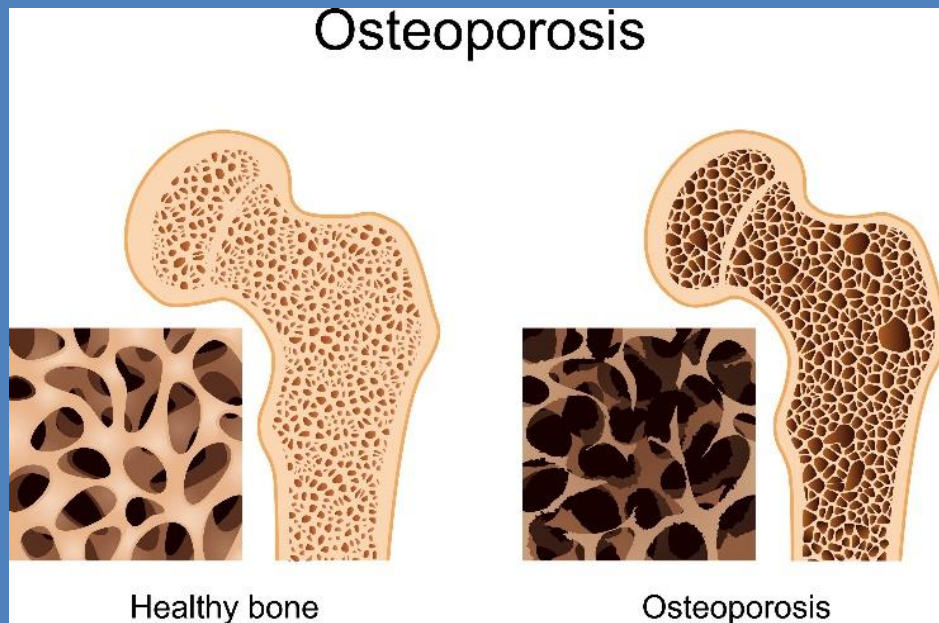
Ζωϊκά Πρότυπα Κακοήθους Υπεζωκοτικής Συλλογής (ΚΥΣ)





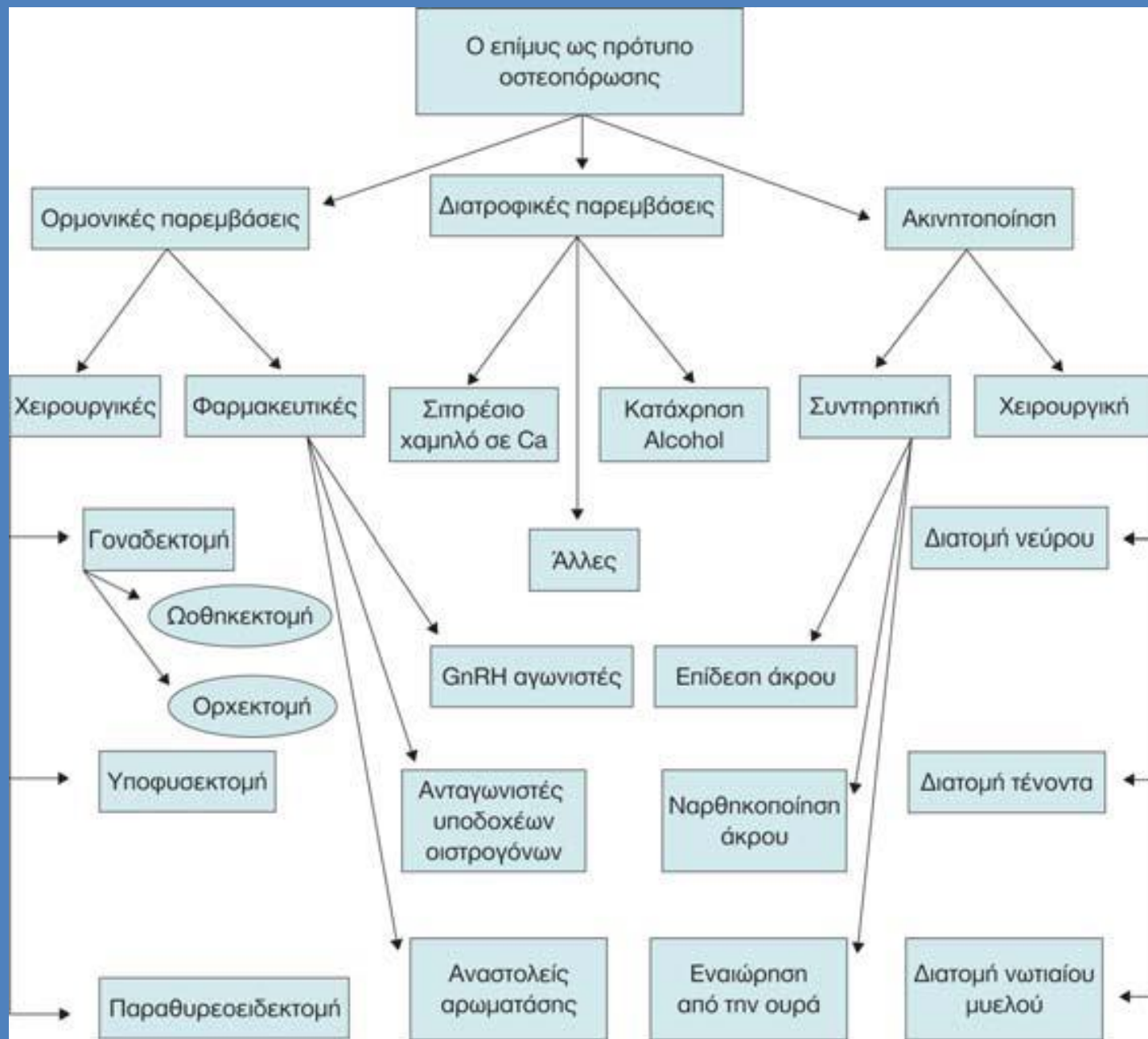
Ζωϊκά Πρότυπα Οστεοπόρωσης

- ποντίκια με ομόζυγη έλλειψη οστεοπροτεγερίνης (osteoprotegerin knockout)
- Ένα αυθόρμητο πρότυπο οστεοπόρωσης είναι το **ποντίκι με την επιταχυνόμενη γήρανση** (senescence accelerated mouse inbred strain SAM/P6)





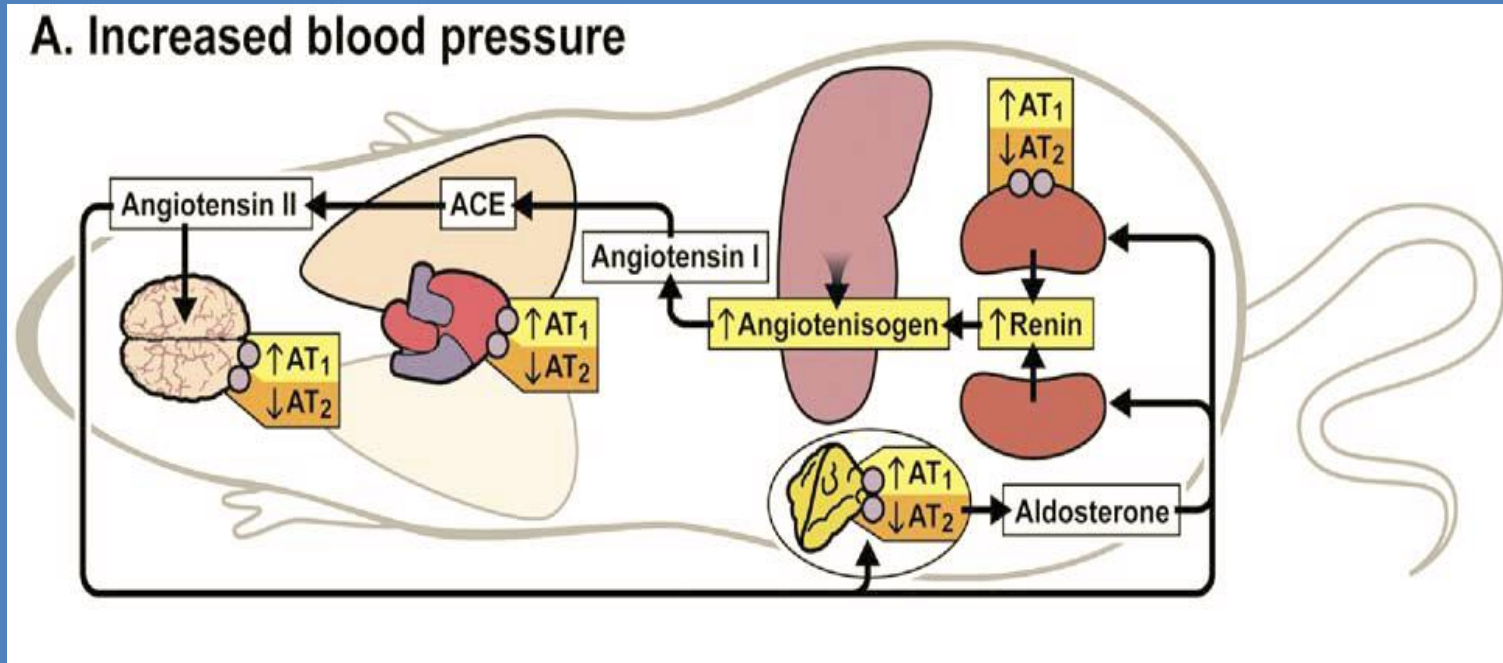
Ζωϊκά Πρότυπα Οστεοπόρωσης





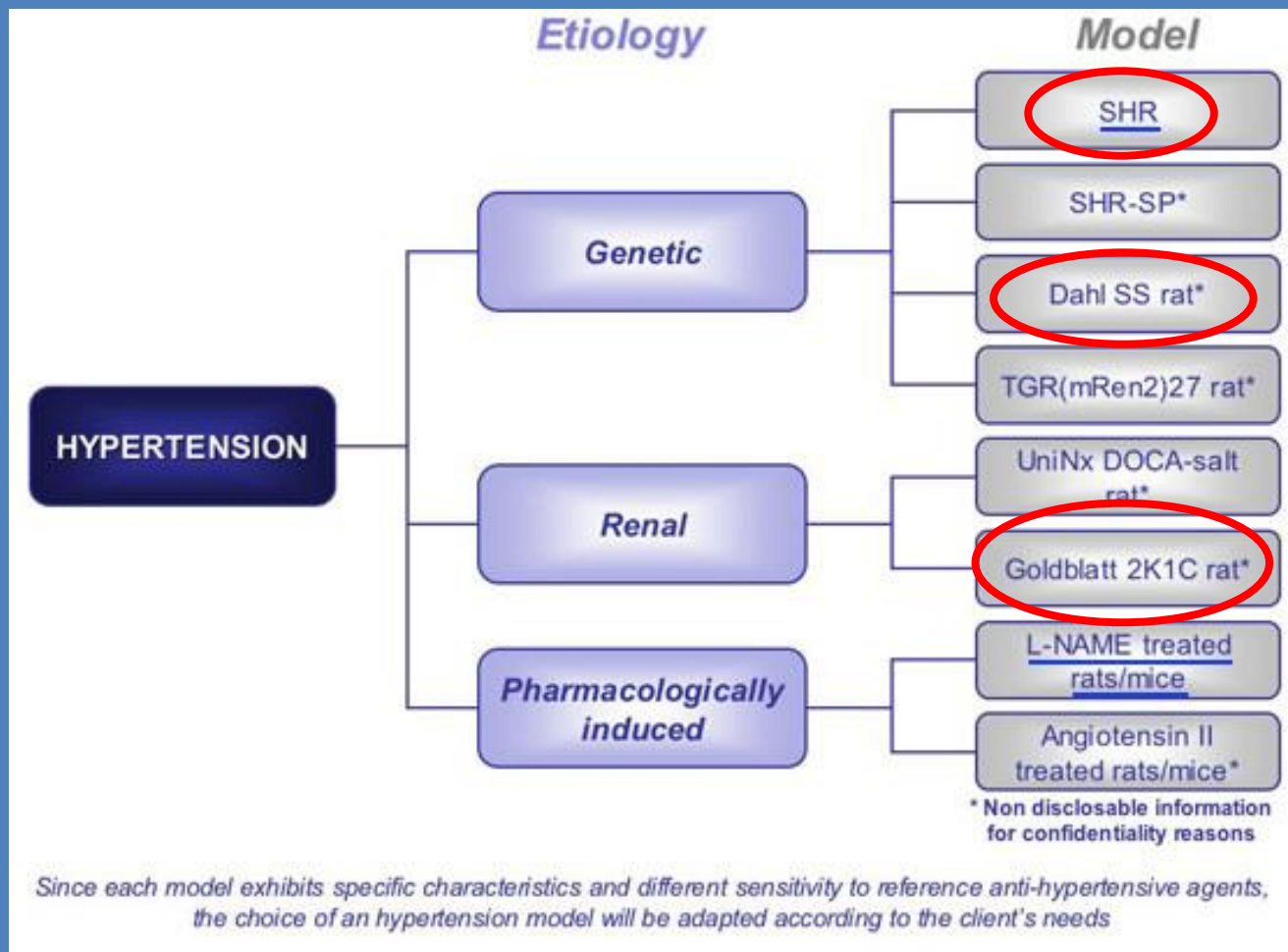
Ζωϊκά Πρότυπα Καρδιαγγειακών Νόσων

A. Increased blood pressure





Ζωϊκά Πρότυπα Καρδιαγγειακών Νόσων

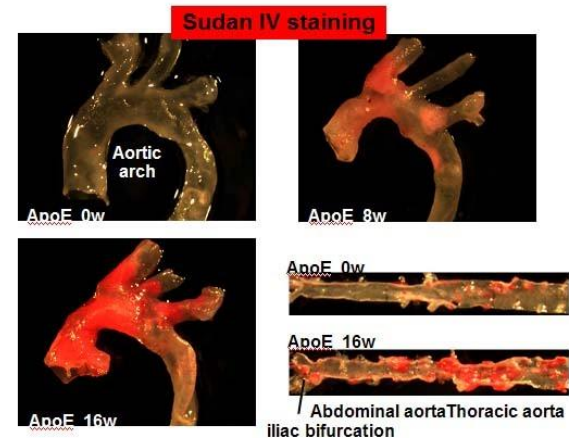




Ζωϊκά Πρότυπα Καρδιαγγειακών Νόσων

- ApoE/ ποντίκια
- LDLR/ ποντίκια
- ❖ db/db ποντίκια
- ❖ ob/ob ποντίκια

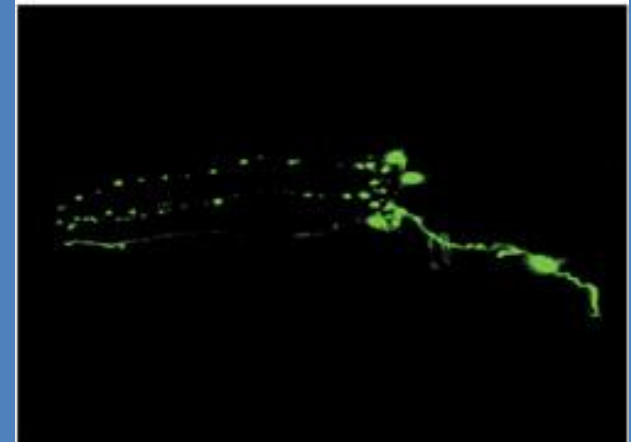
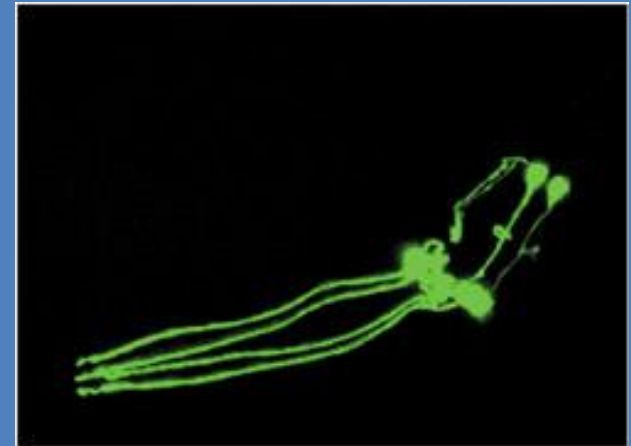
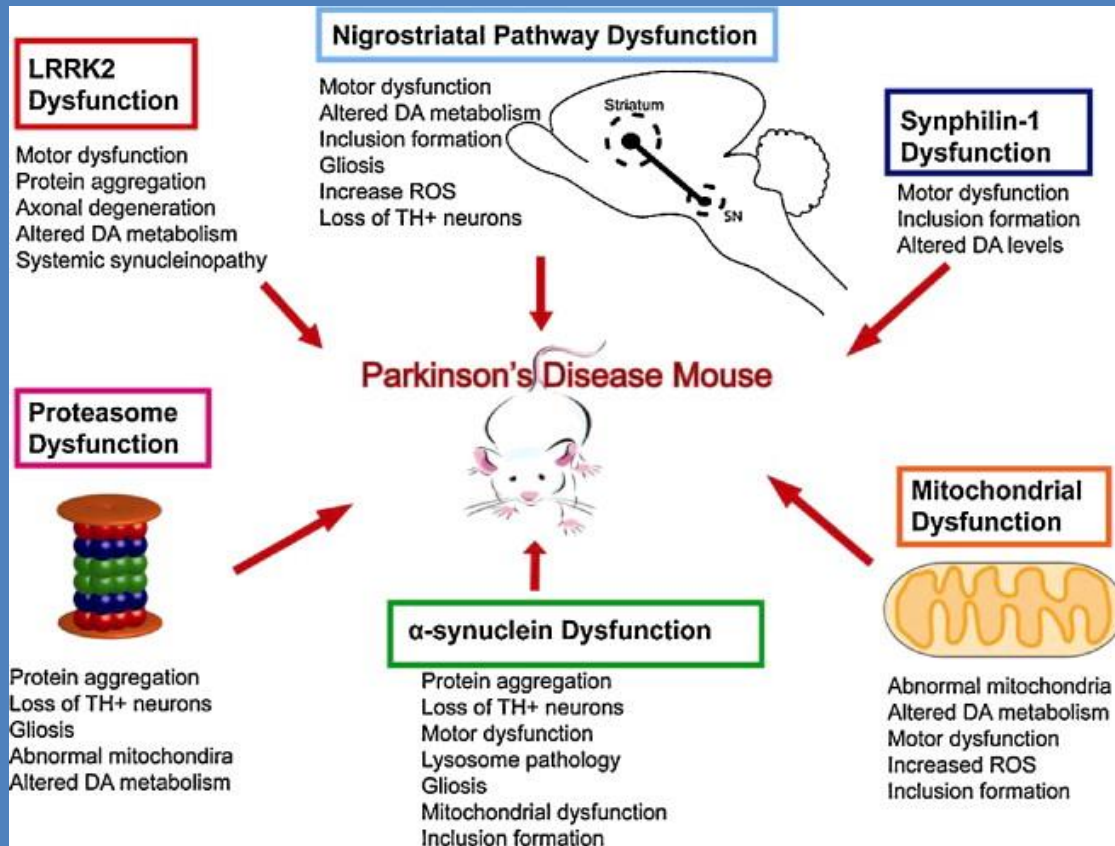
Lipid Deposition on Aorta in ApoE ^{-/-} mice Fed with High Cholesterol Diet





Ζωϊκά Πρότυπα Νευροεκφυλιστικών Νόσων

Νόσος Parkinson





Ζωϊκά Πρότυπα Νευροεκφυλιστικών Νόσων

Νόσος Parkinson

Στερεοταξικές εγχύσεις **6-OHDA** στη μελαινораβδωτή οδό εγκεφάλου ΠΟΝΤΙΚΩΝ



Ποντίκι weaver αποτελεί ένα εξαιρετικό πειραματικό μοντέλο για τη διαλεύκανση των μηχανισμών που ευθύνονται για την προοδευτική εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων, η οποία λαμβάνει χώρα ενδογενώς και προοδευτικά.



Ζωϊκά Πρότυπα Νευροεκφυλιστικών Νόσων

Νόσος Alzheimer

PDAPP^{+/-} ποντίκια

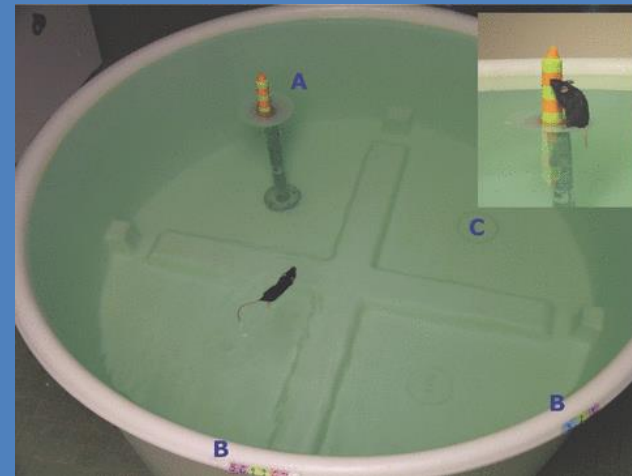
APP/PS1 διαγονιδιακά ποντίκια





Ζωϊκά Πρότυπα Άγχους και Κατάθλιψης

- Πρότυπο αποχωρισμού-μητρικής αποστέρησης
- Πρότυπο μαθημένης ανυπαρξίας βοήθειας
- Χρόνιο Ήπιο Στρες





Χρήση Ζωϊκών Προτύπων Νόσων του Ανθρώπου

- ✓ Αύξηση της γνώσης του βιολογικού υποστρώματος των διαφόρων Νόσων
- ✓ Βελτίωση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας νέων Θεραπευτικών προσεγγίσεων
- ✓ Δημιουργία δεικτών προδιάθεσης σε Νόσους
- ✓ Ανάπτυξη εξελιγμένων μεθόδων Απεικόνισης





***“If we look carefully enough we will eventually
find an ideal animal model for every disease”***

Leader (1969)
Federation of American Societies for Experimental Biology



Περισσότερες πληροφορίες

- eMICE Website:
 - <http://emice.nci.nih.gov>
- Jax (including MTB)
 - <http://www.informatics.jax.org>
- Rat Genome Database (RGD)
 - <http://rgd.mcw.edu/>
- The Zebrafish Model Organism Database (ZFIN)
 - <http://zfin.org>
- caMOD
 - <http://cancermodels.nci.nih.gov>
- NCI's Comparative Oncology Program (Dogs)
 - <https://ccrod.cancer.gov>