

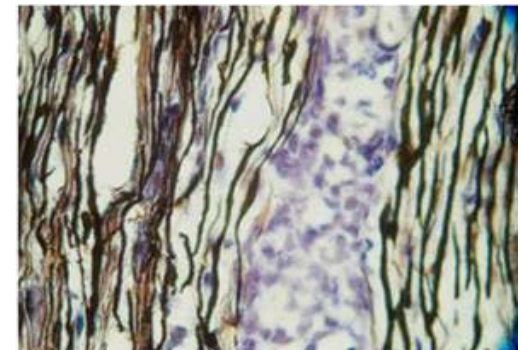
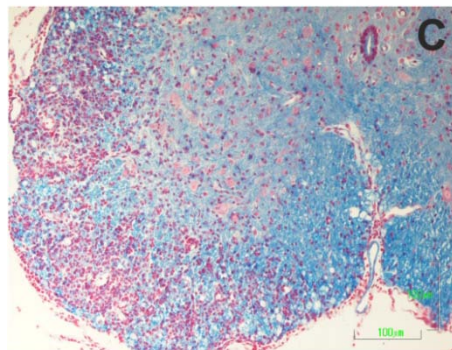
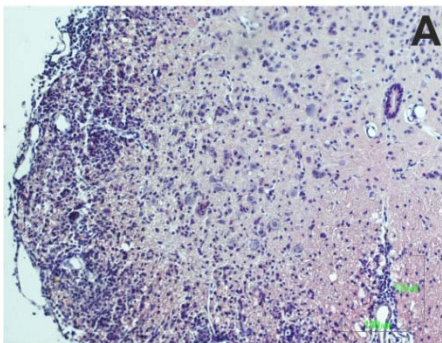
Ευζωία ζώων εργαστηρίου με Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα



Ρόζα Λαγουδάκη
Βιολόγος MSc, PhD
ΕΔΙΠ Ιατρικής Σχολής ΑΠΘ
Εργαστήριο Πειραματικής Νευρολογίας και Νευροανοσολογίας
Β' Νευρολογική Κλινική ΑΧΕΠΑ

Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα (ΠΑΕ)

- Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο πειραματικό μοντέλο της απομυελινωτικής νόσου Σκλήρυνση κατά πλάκας (ΣκΠ).
- Πολλαπλές διεργασίες κατά τις οποίες η αλληλεπίδραση μεταξύ του ανοσοποιητικού και του νευρικού συστήματος οδηγεί στα κύρια παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά της ΣκΠ, δηλαδή την παρουσία της φλεγμονής, την απομυελίνωση και την αξονική απώλεια.



Επαγωγή χρόνια ΠΑΕ σε C57Bl/6J μύες

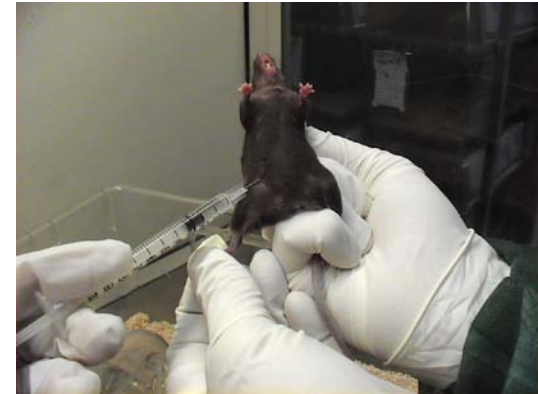
Υποδότη έγχυση Αντιγόνου της MOG (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein)

- Φέρει υψηλά αντιγονικούς επιτόπους B και T κυττάρων
- Διαθέτει έναν μεγάλο εξωκυττάριο επίτοπο στον οποίο έχουν εύκολη πρόσβαση οι διαβιβαστές της φλεγμονής, με συνέπεια να πραγματοποιείται εύκολη σύνδεση των αντισωμάτων
- Ενεργοποίηση χυμικής ανοσίας μέσω αντισώματων κατά των συστατικών της μυελίνης.



Για την επιτυχή επαγωγή του μοντέλου το αντιγόνο απαιτείται να είναι διαλυμένο σε ανοσοενισχυτικό

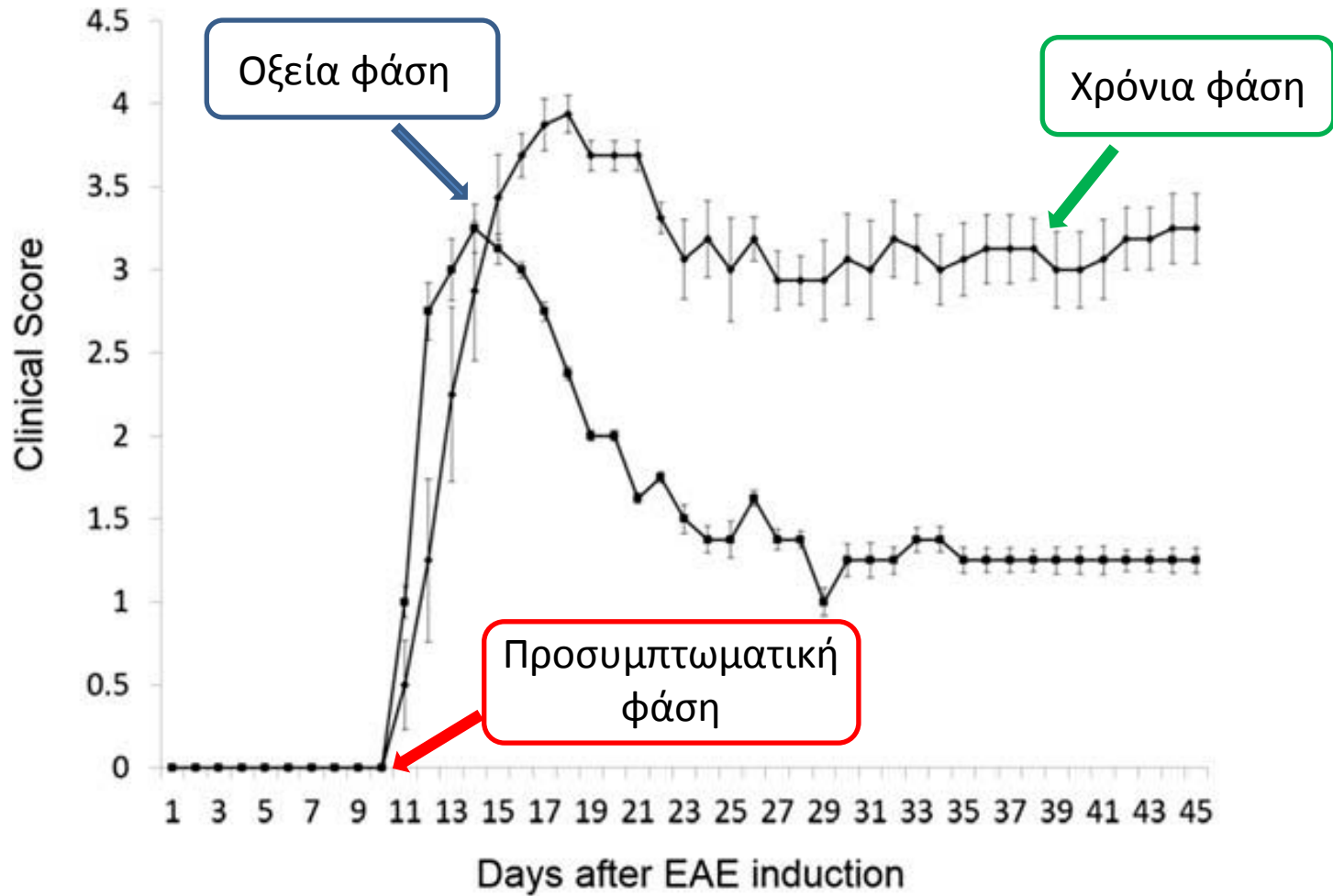
- Ενίσχυση των ανοσολογικών αντιδράσεων ειδικών έναντι του αντιγόνου και χρησιμοποιούνται στην ΠΑΕ για την ενεργοποίηση της φυσικής ανοσίας που υποστηρίζουν την ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων.
- Πλήρες ανοσοενισχυτικό Freund -Complete Freund's adjuvant, γαλάκτωμα συμπληρωμένο με αδρανοποιημένο Mycobacterium tuberculosis H37Ra.



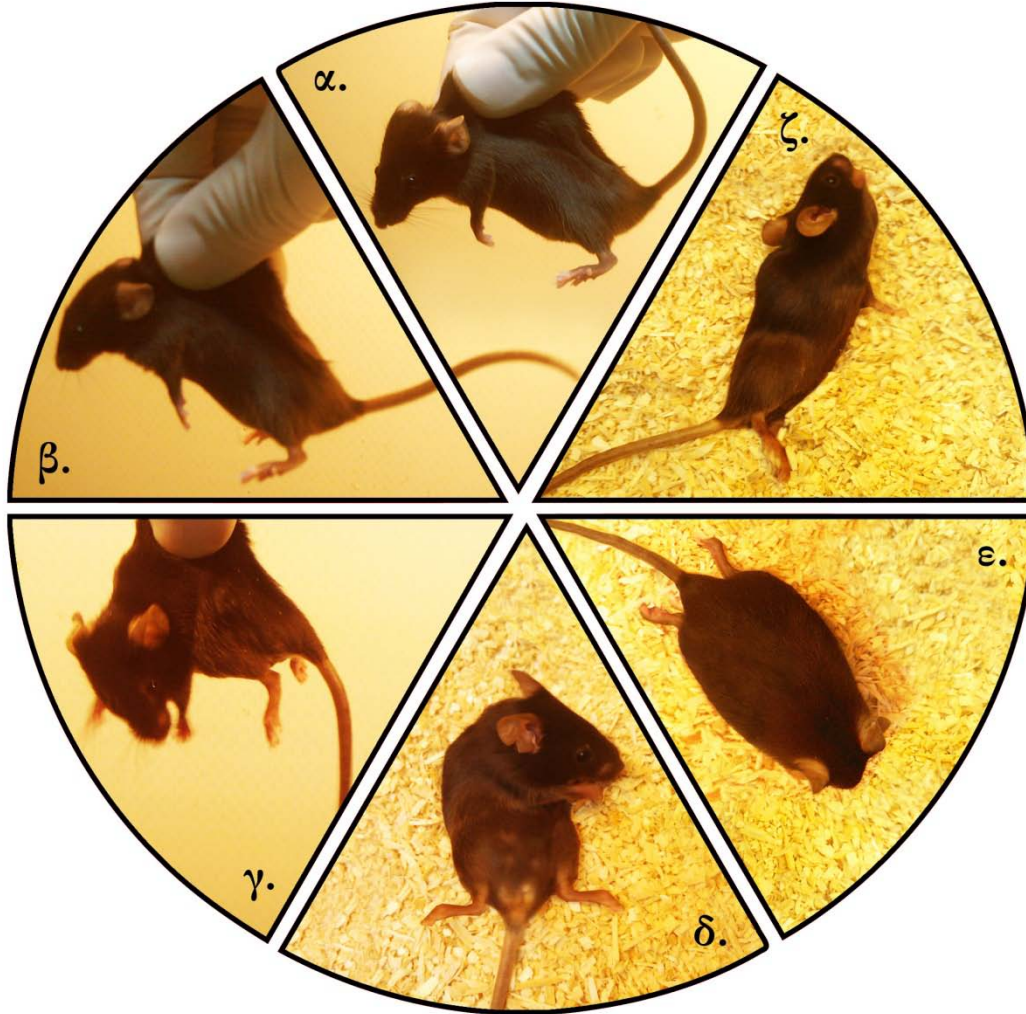
Διαταραχή του αιματοεγκεφαλικού φραγμού με τη χρήση της τοξίνης Bordetella pertussis (PTX)

- προκαλεί αυξημένη διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού
- αναστολή των G-πρωτεϊνών και σηματοδότηση μέσω TLR4 υποδοχέων.

Κλινικές φάσεις ΠΑΕ



Κλινική Αξιολόγηση ΠΑΕ



0: Κανένα κλινικό σημείο. (α)

1: Έναρξη κλινικής σημειολογίας. Κατά την συγκράτηση του ζώου από τη ράχη, η ουρά βρίσκεται σε οριζόντιο επίπεδο με το σώμα μετά από άσκηση πίεσης στον αυχένα. (β)

2: Χαλαρή παράλυση της ουράς από τη βάση της και έλλειψη κινητικότητάς της. (γ)

3: Αδυναμία του ζώου να επανέλθει σε όρθια θέση στα 4 άκρα, όταν τοποθετείται με τη ράχη σε επίπεδη επιφάνεια. (δ)

4. Παράλυση των 2 οπισθίων άκρων. (ε)

5: Παράλυση ενός ή και των δύο προσθίων άκρων. (ζ)

6: Θάνατος του ζώου.

Σωματική κατάσταση πειραματόζωου (BCS - Body condition score) :5 στάδια (1-5) όπου '3' είναι ένα κλινικά φυσιολογικό ζώο με συνηθισμένο για την ηλικία του βάρος σώματος, '1' είναι εξαιρετικά αδύνατο ζώο και '5' ένα παχύσαρκο ζώο.

Καταγραφή

- Καταγραφή έξω από κάθε κλουβί το πειραματικό μοντέλο, η ημερομηνία επαγωγής καθώς και το όνομα του υπεύθυνου ερευνητή με τα στοιχεία επικοινωνίας του.
- Ο υπεύθυνος και ο κτηνίατρος της εγκατάστασης πειραματισμού πρέπει να ενημερωθούν για τη φιλοξενία καθώς και για τη διάρκεια που απαιτείται για την ολοκλήρωση του πειράματος.
- Τα κλουβιά φιλοξενίας των πειραματόζωνων πρέπει να διαμορφωθούν κατάλληλα ώστε να εξασφαλιστεί η μέγιστη άνεσή τους, καθόλη την εξέλιξη της νόσου.
- Η καθημερινή παρακολούθηση, η κλινική αξιολόγηση, η βαθμολόγηση της σωματικής κατάστασης, τα σωματικά βάρη των πειραματόζωνων, η υποστηρικτική φροντίδα και οι τυχόν απαιτούμενες θεραπείες πρέπει να καταγράφονται.
- Κατά τη διάρκεια του πειράματος πρέπει να συμπληρωθεί η "Κάρτα Ειδικών Απαιτήσεων" του κλουβιού όπου θα αναφέρονται οι ιδιαίτερες ανάγκες των πειραματόζωνων.
 - Ανάγκη για βοήθεια στη σίτιση
 - Ανάγκη για πιο μαλακή στρωμή η οποία μπορεί να μειώσει το τραύμα του δέρματος ως αποτέλεσμα της παράλυσης.
 - Απαγόρευση της χρήσης υλικών για τη δημιουργία φωλιάς καθότι τα υλικά αυτά είναι ικανά να παγιδεύσουν ή απλώς να δυσκολέψουν τα αδύναμα άκρα των ζώων.

Κατά την εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων

- Τα άρρωστα ζώα πρέπει να χωριστούν σε ένα άλλο κλουβί, έτσι ώστε να μην τραυματίζονται από τα ζώα χωρίς κανένα κλινικό σύμπτωμα. Τα άρρωστα ζώα μπορούν να στεγάζονται με όμοιας κλινικής εικόνας ζώα είτε μεμονωμένα. Παρόλα αυτά, η κοινωνική στέγαση θα πρέπει να θεωρείται η προεπιλεγμένη κατάσταση μέχρι την εμφάνιση των κλινικών σημείων.
- Η χρήση μπουκαλιών νερού με μακρύ στόμιο πρέπει να ζητηθεί από τον υπεύθυνο της εγκατάστασης προς διευκόλυνση της πρόσβασης των ζώων στο νερό.
- Όπου κριθεί αναγκαίο πρέπει να προστεθεί υπόστρωμα γέλης για συμπλήρωμα νερού στο πάτωμα του κλουβιού με συχνή ανανέωση του.
- Κρίνεται αναγκαία η τοποθέτηση τροφής πάνω στη στρωμνή του κλουβιού για την εύκολη πρόσβαση των πειραματόζωων στην τροφή.

Όταν παρατηρηθεί παράλυση οπίσθιων άκρων (ΠΑΕ 4)

- Το προσωπικό θα διεξάγει απαλές μαλάξεις στην ουροδόχο κύστη κάθε μέρα για να βοηθηθεί η ούρηση.
- Τα ζώα πρέπει να ελέγχονται για δερματίτιδα, αυτοτραυματισμούς, αρθρίτιδα (ως ανεπιθύμητη παρενέργεια του ανοσοενισχυτικού) και να ενημερώνεται ο υπεύθυνος κτηνίατρος εάν παρατηρηθούν κάποιες από αυτές ή άλλες κλινικές ανωμαλίες.
- Επιπλέον εάν το BCS του πειραματόζωου είναι 2 ή λιγότερο, ή αν το ζώο έχει χάσει πάνω από το 10% του αρχικού βάρους του το προσωπικό πρέπει να εμπλουτίσει την τροφή του πειραματόζωου σε πρωτεΐνες και να χορηγεί ενδοπεριτοναϊκώς 1 ml φυσιολογικού ορού καθημερινά.

Ευθανασία

Απαραίτητη για τη μείωση της ταλαιπωρίας του πειραματόζωου σε συγκεκριμένες συνθήκες.

- Όταν ένα ζώο γίνεται τετραπληγικό (ΠΑΕ Σκορ 5)
- Όταν έχει χάσει το 20% του σωματικού του βάρους
- Όταν έχει BCS 1
- Όταν είναι ετοιμοθάνατα και έχουν δυσχέρεια στην αναπνοή.
- Εάν ο υπεύθυνος κτηνίατρος αποφασίσει την ευθανασία για ανθρωπιστικούς λόγους

Η συνθήκη των 3 R στο μοντέλο της ΠΑΕ :
Βελτίωση (Refine) — Μείωση (Reduce) —
Αντικατάσταση (Replace)

Δυνατότητα βελτίωσης της χρήσης ζώων εργαστηρίου

Κατά την επαγωγή της νόσου

- **Βελτίωση του χειρισμού των πειραματόζων** με κατάλληλη εκπαίδευση των χειριστών για να μειωθεί το άγχος και η δυσφορία των ζώων.
- **Διαλογή αντιγόνων και ανοσοενισχυτικών** ώστε να είναι ελάχιστα ερεθιστικές, να επιλέγεται ένα σημείο ένεσης που θα προκαλέσει ελάχιστο πόνο και αγωνία χρησιμοποιώντας αιχμηρές βελόνες με τη στενότερη δυνατή διάμετρο σε άσηπτες συνθήκες. Η έγχυση μικρότερων όγκων, χρησιμοποιώντας πολλαπλές περιοχές αν χρησιμοποιηθεί η υποδόρια οδός πρέπει να εξεταστεί, για να περιοριστεί η πιθανή αντίδραση στο σημείο της ένεσης, προκαλώντας ερεθισμό ή ενόχληση.

Κατά την εμφάνιση κλινικών σημείων

- Επισταμένη παρακολούθηση για κλινικά σημεία, τη μέτρηση του σωματικού βάρους και τη βαθμολόγηση της σωματικής κατάστασης των πειραματόζωνων.
- Η λειτουργία του ουροποιητικού συστήματος πρέπει να παρακολουθείται και να παρέχεται συνεχή πρόσβαση σε νερό και τροφή καθώς και ενδοπεριτοναϊκά συμπληρώματα όπου αυτό κριθεί αναγκαίο.
- Τέλος, πρέπει να μειωθούν όλοι οι στρεσογόνοι παράγοντες από το χώρο φύλαξης των πειραματόζωνων. Αναγκαία είναι η μείωση των επιπέδων θορύβου καθώς και να χρησιμοποιηθούν κουβέρτες θέρμανσης για τη διατήρηση της θερμοκρασίας.

Διάρκεια μελέτης

- Προσοχή πρέπει να δοθεί, για κάθε μελέτη ξεχωριστά, σε ποιά φάση της εξέλιξης της νόσου είναι αναγκαία η θυσία των ζώων προκειμένου να επιτευχθούν οι στόχοι της μελέτης. Για παράδειγμα, μπορεί να είναι δυνατόν να σταματήσει η μελέτη κατά την έναρξη εμφάνισης κλινικών σημείων. Με τον τρόπο αυτό θα μειωθεί η ταλαιπωρία εμποδίζοντας την πιθανότητα τα ζώα να βιώσουν τα πιο σοβαρά συμπτώματα της ΠΑΕ.
- Μερικά επιστημονικά ερωτήματα μπορεί να απαιτούν τα ζώα να βιώσουν ολόκληρο τον κύκλο της νόσου και αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα ένα σημαντικό επίπεδο ταλαιπωρίας για αυτά. Σε τέτοιες περιπτώσεις η μελέτη θα πρέπει να έχει ένα υψηλό επιστημονικό όφελος και πρέπει να διασφαλιστεί ότι όλες οι διαδικασίες πραγματοποιούνται προσεγμένα για να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος επανάληψης του πειράματος.

**Δυνατότητα αντικατάστασης και μείωσης της
χρήσης ζώων εργαστηρίου**

Νέες εναλλακτικές τεχνικές και πειραματικά μοντέλα

In vitro αναλύσεις για τη διερεύνηση του ανοσοποιητικού συστήματος, τη λειτουργία αιματοεγκεφαλικού φραγμού, της νευροεκφύλισης, και της μυελίνωσης



Φίλτρο διαλογής πιθανών θεραπειών πριν από την εκτέλεση μελετών in vivo, και άρα να μειωθεί η χρήση των πειραματόζων.

Νέα μοντέλα ΠΑΕ με μεγαλύτερη συσχέτιση με την ασθένεια στον άνθρωπο διαγονιδιακών ζώων που εκφράζουν τον T υποδοχέα κυττάρων της μυελίνης (TCR)



Ένα μόριο μπορεί πρώτα να χρησιμοποιηθεί σε πειράματα ανοσοποίησης μικρότερης βαρύτητας και οι επιπτώσεις του μορίου αξιολογούνται με ex vivo ανάλυση των TCR διαγονιδιακών T κυττάρων.

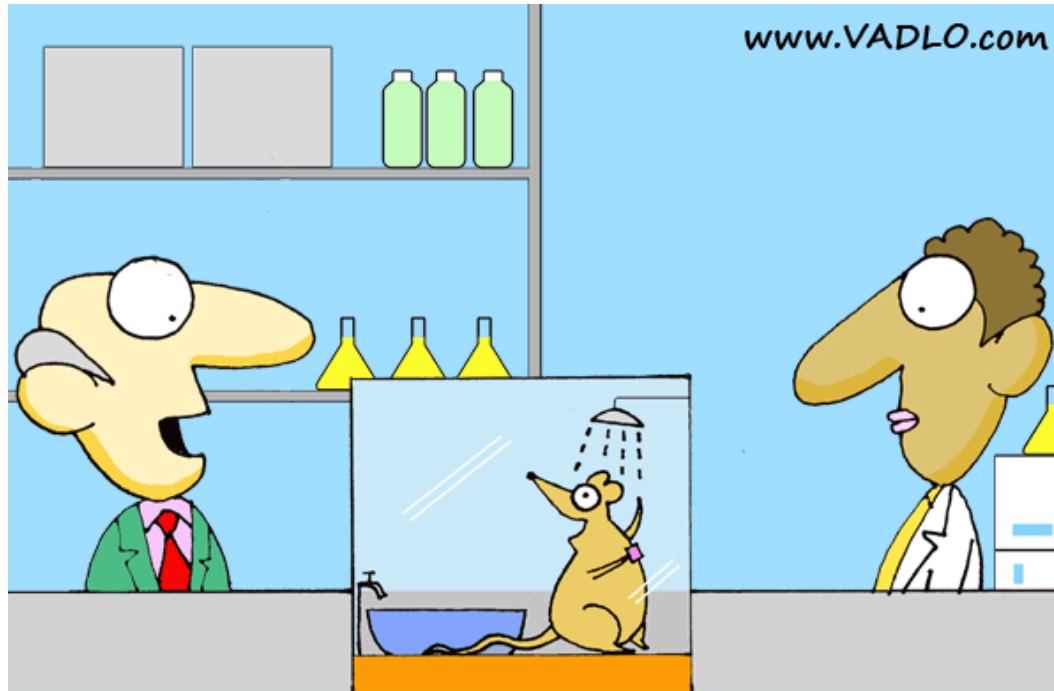
Εξέλιξη τεχνικών απεικόνισης

- Μικροσκοπία δύο φωτονίων που επιτρέπει την in vivo μελέτη της κίνησης των κυττάρων του ανοσοποιητικού, στα πλαίσια φλεγμονής πριν από την ανάπτυξη κλινικών σημείων της νόσου.
- Μαγνητική Τομογραφία (MRI) με σκιαγραφικό μέσο επιτρέπει τη χρονική και τη χωρική ποσοτικοποίηση των μεταβολών της νόσου.



Βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων με λιγότερες μελέτες ΠΑΕ και άρα μείωση του αριθμού των πειραματόζωων. Ακόμα και αν δεν είναι δυνατή η μείωση του αριθμού των πειραματόζωων που θα χρησιμοποιηθεί, το αποτέλεσμα να οδηγεί στην ανάπτυξη φαρμακευτικών σκευασμάτων υψηλότερης αξίας.

**Η ευζωία των πειραματόζων αποτελεί ανάγκη
για τη διεξαγωγή επιτυχημένης πειραματικής
έρευνας που δεν οδηγεί σε αμφιλεγόμενα
αποτελέσματα.**



“My NIH grant had some money left over from last year.”

Ευχαριστώ πολύ για την προσοχή σας!