

NEWSLETTER ΕΕΒΕΖΕ

Ελληνική Εταιρεία Βιοϊατρικής Έρευνας & Ζώων Εργαστηρίου

Τεύχος 25, Ιανουάριος 2019



Σε αυτό το τεύχος:

Προμετωπίδα

Επιστημονικά θέματα

Επιστημονικές εκδηλώσεις

Περιοδικά για Ζώα
Εργαστηρίου

Αγαπητοί φίλοι και μέλη της Ε.Ε.Β.Ε.Ζ.Ε.

Ευχόμαστε ολόψυχα το 2019 να είναι ένα έτος γεμάτο υγεία και δημιουργικότητα για εσάς και τις οικογένειές σας.

Το Σάββατο, 02/02/2019 και ώρα 19.00 θα πραγματοποιηθεί στο Εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Ερεύνης «Ν.Σ.Χρηστέας» η ετήσια Γενική Συνέλευση και η κοπή της βασιλόπιτας. Η παρουσία σας θα μας τιμήσει και θα ενισχύσει το Διοικητικό Συμβούλιο στην τέλεση του έργου του.

Την ίδια ημέρα θα προηγηθεί η ημερίδα με τίτλο «Εισαγωγή στην Έρευνα με Χρήση Ζώων Εργαστηρίου», στον ίδιο χώρο. Η ημερίδα διοργανώνεται από την Ε.Ε.Β.Ε.Ζ.Ε. στον ίδιο χώρο, στα πλαίσια των Επιμορφωτικών Σεμιναρίων για την εφαρμογή της Οδηγίας 2010/63/ΕΕ και του Π.Δ. 56/2013.

Για εγγραφές μπορείτε να επισκεφτείτε της ιστοσελίδα της ΕΕΒΕΖΕ στη διεύθυνση: <http://hsblas.gr/intro/>

Εισαγωγή στην Έρευνα με χρήση Ζώων Εργαστηρίου

Παρουσίαση

Ελληνική Εταιρεία Βιοϊατρικής Έρευνας & Ζώων Εργαστηρίου



Επιμορφωτικά σεμινάρια
για την εφαρμογή της Οδηγίας 2010/63/ΕΕ & του ΠΔ 56/2013

Για όσους από τους αναγνώστες ενδιαφέρονται να γίνουν μέλη της ΕΕΒΕΖΕ, η εγγραφή είναι δυνατή μετά τη συμπλήρωση της σχετικής αίτησης που υπάρχει στην ιστοσελίδα της ΕΕΒΕΖΕ, <http://hsblas.gr/>. Είναι απαραίτητη η αποστολή βιογραφικού σημειώματος καθώς και η πρόταση της υποψηφιότητας από δύο μέλη της εταιρείας. Το κόστος εγγραφής είναι 20€ και η ετήσια συνδρομή για το 2018 παραμένει στα 20€.

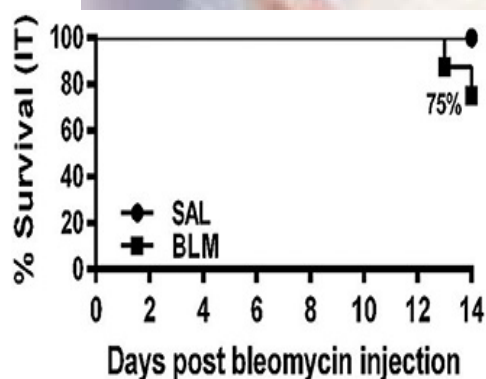
Μελέτη της Ιδιοπαθούς Πνευμονικής Ίνωσης στο εργαστήριο

Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (ΙΠΙ, idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) ή κρυπτογενής ινωδοποιός κυψελίτιδα (Cryptogenic Fibrosing Alveolitis, CFA), είναι η πιο συχνή νόσος της ομάδας των ιδιοπαθών διάμεσων πνευμονιών (50-60%). Πρόκειται για μια χρόνια, μη αναστρέψιμη, προοδευτικά εξελισσόμενη ινωδοποιό διάμεση πνευμονία αγνώστου αιτιολογίας, η οποία παρουσιάζει κοινό ιστολογικό ή/και απεικονιστικό πρότυπο με τη συνήθη διάμεση πνευμονία (UIP-usual interstitial pneumonia). Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση οδηγεί στο θάνατο από αναπνευστική ανεπάρκεια λόγω της προοδευτικής ουλοποίησης του πνεύμονα και αντικατάστασης του φυσιολογικού πνευμονικού παρεγχύματος με ινώδη. Ο μέσος χρόνος επιβίωσης των ασθενών κυμαίνεται μεταξύ 4 και 6 ετών από τη στιγμή της διάγνωσης. Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχει φαρμακευτική θεραπεία που αποδεδειγμένα να βελτιώνει την επιβίωση ή την ποιότητα ζωής των ασθενών με ΙΠΙ, παρά την πληθώρα των μελετών που έχουν γίνει προς αυτή την κατεύθυνση. Προ-κλινικές μελέτες σε ζώα έχουν οδηγήσει στην έγκριση από τον οργανισμό FDA (Food and Drug Administration) δύο φαρμάκων, της πιρφενιδόνης (pirfenidone) και της νιντετανίμπης (nintedanib), τα οποία επιβραδύνουν την εξέλιξη της νόσου αλλά δεν τη θεραπεύουν. Συνεπώς, περαιτέρω μελέτες με κατάλληλα πειραματικά πρότυπα που μιμούνται την

ανθρώπινη ΙΠΙ είναι απαραίτητες για τη διερεύνηση δυνητικά θεραπευτικών θεραπειών.

Τα ζωικά πρότυπα που έχουν αναπτυχθεί για την μελέτη της πνευμονικής ίνωσης, στην πλειονότητα τους περιλαμβάνουν τρωκτικά, στα οποία η πρόκληση βλάβης γίνεται είτε με ακτινοβολία ή με ενστάλαξη ανόργανων μορίων (μπλεομυκίνη, ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη, σκόνη κρυσταλλικού πυριτίου ή αμιάντου). Κοινό χαρακτηριστικό των προτύπων είναι η ανάπτυξη ίνωσης ως επακόλουθο της επαγόμενης φλεγμονώδους αντίδρασης. Επιπροσθέτως, έχουν αναπτυχθεί πρότυπα που βασίζονται σε συγκεκριμένους παθολογικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην πνευμονική ίνωση και περιλαμβάνουν την υπερέκφραση προ-ινωτικών κυτοκινών (TGF-β, IL-1β, TNF-α), τη διαγονιδιακή υπερέκφραση προφλεγμονωδών κυτοκινών (TGF-α, TGF-β και IL-13), την ενδοφλέβια ενστάλαξη ανθρώπινων ινοβλαστών σε ανοσοκατεσταλμένους μύες (μη-παχύσαρκους διαβητικούς (NOD – SCID), είτε τον τραυματισμό κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων τύπου II. Από τα παραπάνω, το πρότυπο της μπλεομυκίνης είναι ευρέως χρησιμοποιούμενο και ίσως το καλύτερα χαρακτηρισμένο πρότυπο πνευμονικής ίνωσης. Παρόλο που δεν αναπαριστά πλήρως όλα τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της ανθρώπινης νόσου, παραμένει ένα γρήγορο, επαναλήψιμο και ως εκ τούτου οικονομικά αποδοτικό πρότυπο για τη μελέτη της παθογένειας της πνευμονικής ίνωσης.

Η μπλεομυκίνη είναι ένα χημειοθεραπευτικό αντιβιοτικό που παράγεται από το βακτήριο *Streptomyces verticillus*, η οποία δρα μέσω της χηλίωσης μεταλλικού ιόντος και της παραγωγής υπεροξειδίου προκαλώντας την καταστροφή του DNA και την παρεμπόδιση του κυτταρικού κύκλου. Χρησιμοποιείται κλινικά ως θεραπεία σε διάφορους καρκίνους με την πνευμονική τοξικότητα να αποτελεί την πιο συχνή παρενέργεια, που εκδηλώνεται ως βήχας, δύσπνοια, πυρετός, κυάνωση και ελάττωση των παραμέτρων αναπνευστικής λειτουργίας. Η επίδραση της μπλεομυκίνης στο πνεύμονα είναι αποτέλεσμα των χαμηλών επιπέδων της υδρολάσης της μπλεομυκίνης, ένζυμο το οποίο είναι υπεύθυνο για την απομάκρυνσή της από τον ιστό. Πράγματι, τα μεταβλητά επίπεδα υδρολάσης της μπλεομυκίνης μεταξύ των C57Bl/6 και BALB/c μυών οδηγεί στην διαφορετική απόκρισή τους στην μπλεομυκίνη, με τα πρώτα να εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία.



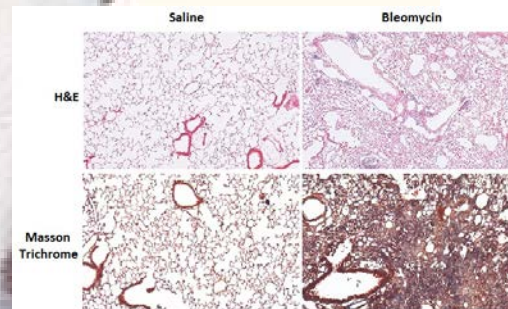
Εικόνα 1: Καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης (3.2U/kg) ή φυσιολογικού ορού (saline). (Πηγή: Barbayianni, I., et al., *Bleomycin Revisited: A Direct Comparison of the Intratracheal Micro-Spraying and the Oropharyngeal Aspiration Routes of Bleomycin Administration in Mice*. *Front Med (Lausanne)*, 2018. 5: p. 269.)

Η μπλεομυκίνη όταν χορηγείται σε μύες, μέσω οροφαρυγγικής ή ενδοτραχειακής ενστάλαξης απευθείας στην αναπνευστική οδό, σε δόση 1-2 mg/kg (περίπου ισοδύναμη προς 0,025-0,05 U/μυ), προκαλεί επιθηλιακή βλάβη και επακόλουθη φλεγμονή. Το στάδιο αυτό χαρακτηρίζεται από τη διήθηση των ουδετερόφιλων, την ενεργοποίηση των μακροφάγων, την αύξηση των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών και παράλληλα την αυξημένη αγγειακή διαρροή, γεγονός που την καθιστά παράλληλα χρήσιμο πρότυπο οξείας πνευμονικής βλάβης. Η φλεγμονή διαρκεί 3-10 ημέρες και προηγείται της ίνωσης η οποία ξεκινάει 2-4 εβδομάδες μετά τη χορήγηση μπλεομυκίνης. Η ινωτική φάση χαρακτηρίζεται από την αύξηση του αριθμού των μυοϊνοβλαστών, την υπερβολική παραγωγή εξωκυττάριας μήτρας (extracellular matrix, ECM) και αυξημένα επίπεδα προ-φλεγμονωδών κυτοκινών όπως ο TGF-β. Εναλλακτικά, μπορεί να γίνουν πολλαπλές χορηγήσεις μπλεομυκίνης, πρότυπο το οποίο μιμείται τα πολλαπλά επεισόδια επιθηλιακού τραυματισμού που πιστεύεται ότι αποτελούν τη βάση της παθογένειας της νόσου. Η βλάβη που προκαλείται με τον τρόπο αυτό προσομοιάζει τα κλασικά χαρακτηριστικά της UIP χωρίς να χαρακτηρίζεται από διήθηση ουδετερόφιλων.

Ανεξάρτητα του πειραματικού προτύπου που χρησιμοποιείται, η εξέλιξη της ίνωσης συνήθως αξιολογείται με βάση μακροσκοπικές παρατηρήσεις και στη συνέχεια με μια σειρά από βιοχημικές και ιστολογικές αναλύσεις. Συγκεκριμένα, η έκθεση στην μπλεομυκίνη έχει ως επακόλουθο την απώλεια βάρους, δείκτης ο οποίος παρατηρείται και καταγράφεται καθ' όλη τη διάρκεια της

πειραματικής διαδικασίας. Μεγάλη απώλεια βάρους (>12%) οδηγεί σε θνησιμότητα, η οποία επίσης πρέπει να καταγράφεται και να αξιολογείται αναλόγως. Η ανάλυση της βιωσιμότητας γίνεται με τις χαρακτηριστικές καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier (Εικόνα 1), παρέχοντας περαιτέρω πληροφορίες για την εξέλιξη της πνευμονικής ίνωσης και το μέγεθος της βλάβης, ενώ αποτελεί χρήσιμο εργαλείο στην αξιολόγηση νέων θεραπειών. Με σκοπό την παθολογοανατομική εξέταση της πνευμονικής ίνωσης εκτός από την χρώση ρουτίνας με αιματοξυλίνη/εωσίνη (H&E) γίνεται τριχρωματική χρώση (Masson trichrome) του πνευμονικού ιστού (Εικόνα 2) όπου οι ίνες κολλαγόνου βάφονται με μπλε χρώμα. Σε συνδυασμό με τη βαθμολόγηση της έκτασης των ινωδών περιοχών με την κλίμακα Ascroft αξιολογείται η βαρύτητα της νόσου. Σημαντικός δείκτης της ίνωσης αποτελεί η συνολική περιεκτικότητα σε κολλαγόνο, το οποίο βρίσκεται είτε στο βρογχοκυψελιδικό υγρό (ως διαλυτό κολλαγόνο) είτε στον πνευμονικό ιστό. Συχνότερα, για τον ποσοτικό προσδιορισμό της εναπόθεσης κολλαγόνου στον πνεύμονα χρησιμοποιείται η ποσοτικοποίηση της υδροξυπρολίνης, ενός αμινοξέος του κολλαγόνου που μπορεί εύκολα να ληφθεί μετά από ομογενοποίηση του πνευμονικού ιστού και όξινη υδρόλυση. Συμπληρωματικά, ο μηχανικός αναπνευστήρας Flexivent (Εικόνα 3) χρησιμοποιείται για την ολοκληρωμένη αξιολόγηση της πνευμονικής λειτουργίας *in vivo*, παρέχοντας δεδομένα που αφορούν είτε ολόκληρο το αναπνευστικό σύστημα (αεραγωγούς, πνεύμονες και θωρακικό τοίχωμα) ή μόνο τους πνεύμονες. Στην περίπτωση της πνευμονικής ίνωσης παρατηρείται

μείωση της στατικής ενδοτικότητας ή διατασιμότητας των πνευμόνων (static compliance, Cst), η οποία αντανακλά την δυσκολία που εμφανίζει ο πνεύμονας να μεταβάλει τον όγκο του λόγω της καταστροφής των κυψελίδων, της εναπόθεσης του κολλαγόνου και της ύπαρξης πνευμονικού οιδήματος. Αντίθετα, παρατηρείται αύξηση της αντίστασης των αεραγωγών (Rn) και της ελαστικότητας του πνευμονικού ιστού (H). Τέλος, η χρήση microCT απεικόνισης, ανάλογη της HRCT (υψηλής ευκρίνειας υπολογιστική τομογραφία θώρακος) στην οποία υποβάλλονται ασθενείς με ΙΠΙ, παρέχει πολυδιάστατη απεικόνιση των ουλών του πνεύμονα *ex vivo*.



Εικόνα 2: Η ιστοπαθολογία του πνεύμονα μετά από χορήγηση μπλεομυκίνης. Αντιπροσωπευτική χρώση με αιματοξυλίνη/εωσίνη (πάνω) και τριχρωματική χρώση Masson (κάτω) του πνευμονικού ιστού στις 14 ημέρες μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης (ενδοτραχειακά, 0,08U/mouse). Αριστερά απεικονίζεται η φυσιολογική δομή του πνευμονικού ιστού (ομάδα ελέγχου, χορήγηση φυσιολογικού ορού/saline).

Στην προσπάθεια ανάπτυξης και σχεδιασμού ζωικών προτύπων για τη μελέτη της πνευμονικής ίνωσης, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη και οι παράγοντες κινδύνου όπως η ηλικία, το

φύλο, οι λοιμώξεις. Παραδείγματος χάριν, η λοίμωξη από τον ιό του έρπητα (γ-Herpes) επιδεινώνει την ίνωση που προκαλείται από μπλεομυκίνη, σε αντίθεση με άλλους μολυσματικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των *Pseudomonas aeruginosa* και H1N1, όπου δεν επηρεάζουν την δράση της. Αντίστοιχα, οι ηλικιωμένοι μύες σύμφωνα με μελέτες είναι πιο ευαίσθητοι στην μπλεομυκίνη σε σχέση με τα νεότερα ζώα, με τα αρσενικά ζώα να επηρεάζονται περισσότερο από τα θηλυκά.



Εικόνα 3: Μηχανικός αναπνευστήρας – Flexivent για την εκτίμηση της αναπνευστικής λειτουργίας. Στον πυρήνα του, το Flexivent είναι ένας ελεγχόμενος υπολογιστής, με εμβολοφόρο αντλία ακριβείας που μπορεί να διασπείρει μηχανικό αερισμό με μια ποικιλία όγκων και πιέσεων για την απόκτηση ακριβών και επαναλήψιμων μετρήσεων της μηχανικής του αναπνευστικού συστήματος.

Η ανάπτυξη πειραματικών προτύπων που θα αναπαριστούν πλήρως την ανθρώπινη ασθένεια πιθανά να μην είναι απόλυτα εφικτή. Ωστόσο, υπάρχει πληθώρα ζωικών προτύπων που μιμούνται συγκεκριμένες πτυχές της νόσου, η επιλογή των οποίων πρέπει να γίνεται προσεκτικά κατά το σχεδιασμό της εκάστοτε μελέτης ώστε να μας δώσουν τις απαντήσεις που ζητάμε.

Βιβλιογραφία

- Scotton, C.J., et al., Ex vivo micro-computed tomography analysis of bleomycin-induced lung fibrosis for preclinical drug evaluation. *Eur Respir J*, 2013. 42(6): p. 1633-45.
- Burger, R.M., J. Peisach, and S.B. Horwitz, Activated bleomycin. A transient complex of drug, iron, and oxygen that degrades DNA. *J Biol Chem*, 1981. 256(22): p. 11636-44.
- Liu, T., F.G. De Los Santos, and S.H. Phan, The Bleomycin Model of Pulmonary Fibrosis. *Methods Mol Biol*, 2017. 1627: p. 27-42.
- Moeller, A., et al., The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int J Biochem Cell Biol*, 2008. 40(3): p. 362-82.
- Tashiro, J., et al., Exploring Animal Models That Resemble Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Front Med (Lausanne)*, 2017. 4: p. 118.
- Barbayanni, I., et al., Bleomycin Revisited: A Direct Comparison of the Intratracheal Micro-Spraying and the Oropharyngeal Aspiration Routes of Bleomycin Administration in Mice. *Front Med (Lausanne)*, 2018. 5: p. 269.
- Mercer, P.F., et al., Translational models of lung disease. *Clin Sci (Lond)*, 2015. 128(4): p. 235-56.

Ιωάννα Νίνου

Βιολόγος, PhD

Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμιγκ»

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ



BRITISH SOCIETY OF TOXICOLOGICAL PATHOLOGY

Ακολουθεί ημερολόγιο επιστημονικών εκδηλώσεων που διοργανώνονται από τη Βρετανική Εταιρεία Τοξικολογικής Παθολογίας:

Continuing Education Symposium: Toxicology & Pathology

26/03/2019-28/03/2019, Cambridge, Ηνωμένο Βασίλειο. Για περισσότερες πληροφορίες επισκεφθείτε την ιστοσελίδα www.bstp.org.uk ή επικοινωνήστε στο:

e-mail: bstpoffice@aol.com.



FONDAZIONE GUIDO BERNARDINI BETTER EDUCATION FOR BETTER SCIENCE

Το Ίδρυμα Fondazione Guido Bernardini διοργανώνει εκπαιδευτικές δραστηριότητες που αφορούν στην επιστήμη των ζώων εργαστηρίου. Ακολουθεί το ημερολόγιο αυτών των δραστηριοτήτων:

Στις 6 με 8 Μαρτίου του 2019 θα πραγματοποιηθεί το σεμινάριο "**Organizing and Operating Activities in a Rodent Animal Facility**" στο Μιλάνο, Ιταλία. Για περισσότερες πληροφορίες περιηγηθείτε στην ιστοσελίδα: <https://www.fondazioneguidobernardini.org/en/programs/course-organizing-and-operating-activities-in-a-rodent-animal-facility.html>.

Στις 28 με 29 Μαρτίου του 2019 θα πραγματοποιηθεί το σεμινάριο "**Intensive course on biostatistics**" στο Μιλάνο, Ιταλία. Για περισσότερες πληροφορίες περιηγηθείτε στην ιστοσελίδα:

<https://www.fondazioneguidobernardini.org/en/programs/course-intensive-course-on-biostatistics.html>.



Στις 30/09-11/10 του 2019 θα πραγματοποιηθεί το πέμπτο αρθρωτό σεμινάριο **LAS EU Functions Course** στο Εργαστήριο Έρευνας Παθήσεων Μυοσκελετικού Συστήματος του Νοσοκομείου ΚΑΤ. Για περισσότερες πληροφορίες περιηγηθείτε στην ιστοσελίδα: <http://hsblas.gr/> ή επικοινωνήστε στο e-mail: lasfunctionscourse@gmail.com.



14th felasa congress 2019

Prague, Czech Republic
June 10-13, 2019

ICLAS General Assembly - June 9-10, 2019

Στις 10-13 Ιουνίου του 2019 θα πραγματοποιηθεί στην Πράγα το **14th FELASA Congress**. Για περισσότερες πληροφορίες περιηγηθείτε στην ιστοσελίδα: <http://www.felasa2019.eu/>

ALN Magazine και ALN World (Δωρεάν εγγραφή) <http://www.alnmag.com>

Lab Animal Europe (Δωρεάν εγγραφή) <http://www.labanimaleurope.eu/>

Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science www.scandlas.org

Comparative Medicine www.aalas.org

Journal of the American Association of Laboratory Animal Science www.aalas.org

Experimental Animals (Journal of the Japanese Association for Laboratory Animal Science)

http://wwwsoc.nii.ac.jp/jalas/english/en_journal.html

Επιμέλεια Σύνταξης:

Βασίλειος Ντάφης

Αναστασία Τσιγκοτζίδου

