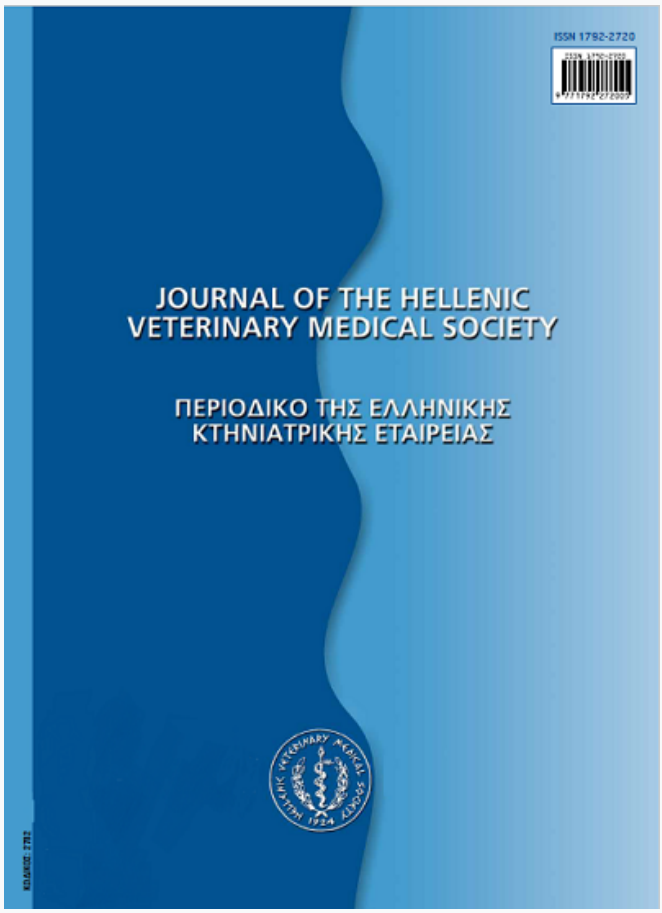
ePublishing

ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΤΕΚΜΗΡΙΩΣΗΣ
NATIONAL DOCUMENTATION CENTRE

Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας

Τόμ. 60, Αρ. 3 (2009)



Οι μύες με βαριά συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια (Severe Combined ImmunoDeficient mice) στη βιοϊατρική έρευνα

A. S. TSINGOTJIDOU (Α.Σ. ΤΣΙΓΚΟΤΖΙΔΟΥ)

doi: 10.12681/jhvms.14937

Βιβλιογραφική αναφορά:

TSINGOTJIDOU (Α.Σ. ΤΣΙΓΚΟΤΖΙΔΟΥ) A. S. (2017). Οι μύες με βαριά συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια (Severe Combined ImmunoDeficient mice) στη βιοϊατρική έρευνα. *Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας*, *60*(3), 266–273. https://doi.org/10.12681/jhvms.14937

https://epublishing.ekt.gr | **e-Εκδότης:** EKT | **Πρόσβαση:** 17/02/2026 00:56:43

JOURNAL OF THE HELLENIC VETERINARY MEDICAL SOCIETY 2009, 60(3): 266-273
ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 2009, 60(3): 266-273

Special article
Ειδικό άρθρο

Severe Combined ImmunoDeficient (SCID) mice in biomedical research

A.S. Tsingotjidou, DVM, PhD

Lab. of Anatomy and Histology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaloniki

Οι μύες με βαριά συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια (Severe Combined ImmunoDeficient mice) στη βιοϊατρική έρευνα.

Α. Σ. Τσιγκοτζίδου, Λέκτορας Κτηνιατρικής, DVM, PhD

Εργαστήριο Ανατομικής και Ιστολογίας, Κτηνιατρική Σχολή, Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη

ABSTRACT. Mice have been used in cancer research since the last decade of the 19th century. In 1921 inbred strains, that were predisposed to developing tumors, were bred and became available to cancer researchers. The *nude* mouse, a hairless mutant discovered in 1962, is immunodeficient, and thus does not reject tumor transplantations from other species. It lacks a thymus, which is essential for the production of T-cells, lymphocytes that are essential for cellular immunity. In 1983 mice with severe combined immune deficiency ($Prkdc^{scid}$, commonly referred to as scid) were discovered. *Scid* mice are even more immunodeficient than nude mice. Tumors from other species are transplanted into scid mice easier. In 1988 two groups of researchers almost simultaneously succeeded in transplanting elements of the human immune system into scid mice. They had used totally different approaches in creating their human-mouse chimeras. This chimera, named the hu-PBL- *scid*, was also able to produce human tetanus antibodies when injected with tetanus toxin, further demonstrating that its immune system was functioning as though it was naturally human. Severe Combined ImmunoDeficient (*scid*) mice are homozygous for the mutant autosomal recessive gene "scid", which is located at the centromeric end of chromosome 16. Since these mice lack mature, functional lymphocytes, they are highly susceptible to lethal opportunistic infections. For this reason, they should be maintained in a pathogen free environment. Some *scid* mice, by an unexplained mechanism, eventually develop minute levels of B cells and a rudimentary antibody response and are commonly referred to as "leaky". Different genetic manipulations are used to overcome this obstacle. The transfer of the *scid* mutation onto the Non-Obese Diabetic (NOD), BEIGE (*beige* mutation results in cytotoxic T cell and macrophage defects as well as selective impairment of NK cell functions) and other strains has led to better engraftment of transferred human cells. Lately, mice with targeted mutations have been engineered, including animals with disruption of the recombination activating gene-1 (*Rag-1*) or (*Rag-2*), β2 microglobulin (*B2m*) and perforin (*PRF1*) genes. Any possible combination of the above mentioned mutants has led to the development of humanized mouse models providing more straightforward assay systems for the study of the human hematolymphoid system. Our personal experience on the use of *scid* mice in biomedical research relates to the development of animal models to investigate cancer metastasis in human bone.

Keywords: immunodeficient mice, animal models, human bone implantation

Correspondence: A.S. Tsingotjidou
Lab. of Anatomy and Histology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaloniki,
541 24 Thessaloniki, Greece
Tel.: +30 2310 999941, Fax: +30 2310 999882, e-mail: astsing@vet.auth.gr

Αλληλογραφία: Α. Σ. Τσιγκοτζίδου
Εργαστήριο Ανατομικής και Ιστολογίας, Κτηνιατρική Σχολή, 54 124 Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη
Τηλ.: 2310 999941, Fax: 2310 999882, e-mail: astsing@vet.auth.gr

Submission date: 03.08.2009
Approval date: 13.10.2009

Ημερομηνία υποβολής: 03.08.2009
Ημερομηνία εγκρίσεως: 13.10.2009

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Από την τελευταία δεκαετία του 19ου αιώνα οι μύες χρησιμοποιούνταν στη βιοϊατρική έρευνα. Το 1921 δημιουργήθηκαν με ενδογαμία (inbreeding) υποείδη με δυνατότητα να αναπτύσσουν όγκους και έγιναν διαθέσιμα στους ερευνητές του καρκίνου. Το 1929 δημιουργήθηκε η εταιρεία Jackson Laboratory (Ban Harbor, Maine, USA), που πρώτη ξεκίνησε τη δημιουργία στελεχών μυών. Μεταξύ αυτών, οι αθυμικοί μύες (nude mice: *Foxn1*^{nu}) θεωρήθηκαν μια σημαντική επανάσταση για την έρευνα του καρκίνου, επειδή επέτρεπαν την ανάπτυξη όγκων μετά από χορήγηση ανθρώπινων νεοπλασματικών κυττάρων στον οργανισμό τους. Οι αθυμικοί μύες, οι οποίοι δημιουργήθηκαν το 1962 μετά από μία αυτόματη μετάλλαξη, δεν έχουν καθόλου θύμο αδένα που είναι απαραίτητος για την παραγωγή των Τ λεμφοκυττάρων του ανοσιακού συστήματος. Σε αυτούς τους μύες έγινε το 1969 η πρώτη επιτυχής μεταμόσχευση ανθρώπινου εντερικού αδενοκαρκινώματος. Το 1983 ανακαλύφθηκαν οι μύες με βαριά συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια (ΒΣΑ): ομοζυγωτοί για την *Prkdc*^{scid}, που καλούνται συνήθως *scid*. Εκτός από την έλλειψη Τ λεμφοκυττάρων, αυτοί οι μύες δεν είναι ικανοί να παράγουν και Β λεμφοκύτταρα. Όγκοι προερχόμενοι από άλλα είδη αναπτύσσονται ακόμα πιο εύκολα σε αυτά τα ζωικά πρότυπα. Το 1988 δύο διαφορετικές ομάδες ερευνητών σχεδόν ταυτόχρονα μεταμόσχευσαν με επιτυχία στοιχεία του ανθρώπινου ανοσιακού συστήματος στους *scid* μύες. Αυτοί οι χιμαιρικοί μύες ονομάστηκαν hu-PBL- *scid* και ήταν ικανοί να παράγουν αντισώματα για τον τέτανο του ανθρώπου όταν εγχύονταν με τοξίνη του τετάνου, αποδεικνύοντας ακόμη περισσότερο πως το ανοσιακό τους σύστημα λειτουργούσε όπως το ανθρώπινο. Εξαιτίας της ανοσοανεπάρκειάς τους, οι μύες με ΒΣΑ στεγάζονται σε ειδικούς χώρους που είναι απαλλαγμένοι από παθογόνους μικροοργανισμούς. Μερικοί μύες με ΒΣΑ, εξαιτίας κάποιου άγνωστου μηχανισμού, αναπτύσσουν πολύ ελάχιστα επίπεδα Β λεμφοκυττάρων, καθώς και μία υποτυπώδη παραγωγή αντισωμάτων, και η κατάσταση αυτή ονομάζεται "διαρροή". Για να ξεπεραστεί το πρόβλημα της "διαρροής" έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι γενετικοί χειρισμοί. Η μεταφορά του μεταλλαγμένου γονιδίου *scid* σε ζώα με υπόστρωμα ειδικό για την έρευνα του διαβήτη (μη παχύσαρκοι διαβητικοί μύες με ΒΣΑ, NOD-SCID mice) σε μύες BEIGE (η μετάλλαξη *beige* έχει ως αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων και μακροφάγων, καθώς και την υπολειτουργία των λειτουργιών των κυττάρων–μεσολαβητών) έχουν οδηγήσει σε μεγαλύτερης διάρκειας διατήρηση των μεταφερόμενων ανθρώπινων κυττάρων. Τελευταία, έχουν δημιουργηθεί μύες με στοχευμένη μετάλλαξη και ειδικότερα με αδρανοποίηση των γονιδίων που ενεργοποιούν τον ανασυνδυασμό (recombination activating gene-1; *Rag-1, Rag-2*) των γονιδίων της μικροσφαιρίνης β2 (*B2m*) και των γονιδίων περφορίνης (*PRF1*). Η προσωπική μας εμπειρία με αυτά τα ζωικά πρότυπα αφορά στην ανάπτυξη και εξέλιξη νόσων μετά από εμφύτευση ανθρώπινου οστού με νεοπλασματικά λεμφοκύτταρα, καθώς και στον έλεγχο του τροπισμού των καρκινικών κυττάρων στο ανθρώπινο οστό.

Λέξεις ευρετηρίασης: μύες με ανοσοανεπάρκεια, πειραματικά ζωικά πρότυπα, εμφύτευση ανθρώπινου οστού

Η εργασία αυτή παρουσιάστηκε στο 2ο Πανελλήνιο Σεμινάριο Πειραματικής Βιοϊατρικής Έρευνας, Νοσοκομείο ΚΑΤ, 20-22 Νοεμβρίου 2008.

Οι μύες στη βιοϊατρική έρευνα

Η βιοϊατρική έρευνα χρησιμοποιεί τους μύες από τα τέλη του 19ου αιώνα (από το 1894 για την έρευνα του καρκίνου). Ανήκουν στην ίδια οικογένεια (Muridae) με τους ανεπιθύμητους μύες που μπορεί να βρεθούν στα σπίτια μας, αλλά και με τους επιθυμητούς μύες που εκτρέφουμε στα σπίτια μας ως κατοικίδια ζώα. Η εντυπωσιακή πολυμορφία του ζωικού αυτού είδους έχει επεκταθεί και στο χώρο της τεχνολογίας, όπου η συσκευή σύνδεσης του υπολογιστή με τον εξωτερικό κόσμο, εξαιτίας της ομοιότητάς του με τον μυ, έχει πάρει παγκοσμίως και την ονομασία του. Στο χώρο του κινηματογράφου επίσης υπάρχουν δεκάδες μύες που εμφανίζονται στην οθόνη, με διασημότερο τον ήρωα του Disney, το γνωστό μας Mickey Mouse.

Η χρησιμοποίηση των μυών στην έρευνα (Εικ. 1) είναι ευρεία όχι μόνο γιατί είναι θηλαστικά, αλλά και γιατί έχουν μεγάλο βαθμό γενετικής ομοιότητας με τον άνθρωπο. Η αλληλουχία των γονιδίων του μυός έχει εξακριβωθεί (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002) και έχει διαπιστωθεί η αντιστοιχία των γονιδίων του μυός με τα ομόλογά τους ανθρώπινα γονίδια. Σε αυτά, επίσης, τα ζώα εργαστηρίου μπορούν να γίνουν γενετικοί χειρισμοί με ποικίλους τρόπους που θεωρούνται ασύμβατοι με τη βιοηθική για γενετικούς χειρισμούς στον άνθρωπο. Υπάρχουν και άλλοι λόγοι που οι μύες είναι τα πιο πολύ χρησιμοποιημένα ζώα εργαστηρίου από την παγκόσμια επιστημονική κοινότητα: είναι μικρά σε μέγεθος, οικονομικά στην αγορά τους και τη συντήρησή τους, διατηρούνται εύκολα και αναπαράγονται γρήγορα. Πολλές γενεές μυών μπορούν να παρατηρηθούν σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα.

Υπάρχουν εκατοντάδες στελέχη μυών που έχουν αναπαραχθεί με ενδο ή/και εξωγαμία (in- and outbreeding), καθώς και μεταλλαγμένοι και διαγονιδια-

Figure 1.
Of mice and men: Stavros *Panagiotakis, 2009.*

Εικόνα 1. Of mice and men: *Σταύρος Παναγιωτάκης, 2009.*

κοί μύες. Η ενδογαμιαία αναπαραγωγή των περισσότερων στελεχών μυών επιτυγχάνει γενετική ομοιότητα ανάμεσα στους απογόνους, που είναι επιθυμητή στους επιστήμονες. Τα πρώτα στελέχη μυών που αναπαράχθηκαν με ενδογαμία δημιουργήθηκαν από τον Clarence Cook Little το 1909 (Crow, 2002). Ο Little είναι ο επιστήμονας που προήγαγε τη χρησιμοποίηση του μυός ως ζώο εργαστηρίου. Το 1921 ο Leonell Strong δημιούργησε στελέχη μυών στα οποία τυχαία και με μεγάλη συχνότητα αναπτύχθηκαν νεοπλασίες (UCCAA: University of California, Center for Animal Alternatives, 2009). Αυτή η δυνατότητα ουσιαστικά χρησιμοποιήθηκε ως αστείρευτη πηγή παραγωγής διαφόρων μορφών όγκων, κάνοντας για πρώτη φορά δυνατή τη μελέτη του τρόπου ανάπτυξής τους και των γενικών χαρακτηριστικών τους. Όταν το 1929 ο Little ίδρυσε την εταιρεία παραγωγής ζώων εργαστηρίου Jackson Laboratory στο Bar Harbor, Maine, είχαν ήδη αναπτυχθεί στελέχη μυών με ενδογαμία που σήμερα φτάνουν μέχρι και τις 4.000. Τα στελέχη ταυτοποιούνται συνήθως με ειδικούς συνδυασμούς γραμμάτων και αριθμών (π.χ.: C57BL/6, BALB/c, κ.λπ.).

Η πορεία προς την ανοσοανεπάρκεια

Το 1962 δημιουργήθηκαν οι πρώτοι μύες με ανοσοανεπάρκεια (Isaason και Cattanach, 1962) και περιγράφηκαν από τον Flanagan (Ruchill Hospital, Glasgow) το 1966. Η μετάλλαξη παρατηρήθηκε σε μία αποικία μυών με εξωγαμιαία αναπαραγωγή, αλλά μόνο μετά από δύο χρόνια πιστοποιήθηκε πως δεν έχουν θύμο αδένα (Pantelouris, 1968).

Η γενετική βάση των λεγόμενων αθυμικών μυών είναι μία αδρανοποίηση στο Foxn1 γονίδιο. Φαινοτυπικά, ο συγκεκριμένος μυς χαρακτηρίζεται από έλλειψη τριχώματος στο σώμα του (Εικ. 2) και γι' αυτόν το λόγο χαρακτηρίζεται ως "γυμνός μυς" (nude mouse). Αυτό το ζώο ήταν το πρώτο που μπορούσε να δεχθεί διάφορους τύπους ιστών και όγκων χωρίς να τους απορρίπτει, καθόσον, εξαιτίας της έλλειψης του θύμου αδένα, δεν παράγει Τ λεμφοκύτταρα. Οι αθυμικοί μύες βοήθησαν για να διευκρινιστούν θέματα που έχουν σχέση με το ανοσιακό σύστημα, τις λευχαιμίες, τους συμπαγείς όγκους, το σύνδρομο της επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS) και άλλες μορφές ανοσιακής ανεπάρκειας, ακόμη και τη λέπρα. Αυτά τα πειραματικά μοντέλα έφεραν επανάσταση στο χώρο της έρευνας του καρκίνου, εφόσον μπορούσαν πια οι επιστήμονες να αναπτύξουν ανθρώπινους όγκους *in vivo* και να δοκιμάσουν θεραπευτικά σχήματα. Έτσι, το 1969 από τους Rygaard και Povlsen γίνεται η πρώτη επιτυχής μεταμόσχευση ανθρώπινου καρκίνου του εντέρου στους αθυμικούς μύες. Τα περισσότερα στελέχη των αθυμικών μυών αναπτύσσουν το φαινόμενο της "διαρροής" και εμφανίζουν μερικά Τ λεμφοκύτταρα κυρίως με την πάροδο του χρόνου.

Το 1980 ο Dr. M.J.Bosma, μαζί με την ερευνητική του ομάδα στο Fox Chase Cancer Center στη Philadelphia, USA, ανακάλυψε τυχαία ένα άλλο εξίσου σημαντικό στέλεχος μυών που εμφανίζει μετάλλαξη και συνοδεύεται από την έλλειψη και των Β και των Τ λεμφοκυττάρων. Κατά τη διάρκεια ελέγχου ρουτίνας του ανοσιακού τους συστήματος διαπίστωσαν πως αυτά τα ζώα δεν παρήγαγαν αντισώματα. Είχαν προκύψει από ενδογαμία φαινομενικά υγιών

μυών (C.B-17/lcr) που έφεραν το υποτελές μεταλλαγμένο γονίδιο που τώρα ονομάζεται scid. Κάποιοι από τους απογόνους αυτών των μυών κληρονόμησαν ολοκληρωμένο ζεύγος του scid γονιδίου και έτσι γεννήθηκαν με το "ελάττωμα" *scid* (ομοζυγωτοί για την *Prkdc*^{scid}, που καλούνται συνήθως *scid*). Οι ερευνητές παρατήρησαν πως αυτά τα ζώα είχαν πολύ μικρά λεμφογάγγλια και το μέγεθος του θύμου αδένα ήταν το ένα δέκατο του φυσιολογικού. Χρειάστηκαν 3 χρόνια (Bosma et al., 1983) για να οριστεί και να αποδειχθεί πως αυτά τα ζώα παρουσίαζαν τη συγκεκριμένη ανοσοανεπάρκεια (βαριά συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια: **ΒΣΑ),** που στην αρχή τράβηξε το ενδιαφέρον των ερευνητών γιατί προσομοιάζει με ένα συγγενές, μη ιάσιμο σύνδρομο που εμφανίζεται στον άνθρωπο. Εκτός από τον άνθρωπο, η συγγενής αυτή ανωμαλία έχει παρατηρηθεί και στα ιπποειδή (VetGen: Veterinary Genetic Services) και στα σαρκοφάγα (στο σκύλο), (Henthorn et al., 1994; Bell et al., 2002).

Τα όργανα του λεμφικού συστήματος των μυών με ΒΣΑ (Εικ. 3) είναι μικρά σε μέγεθος και δύσκολα ανιχνεύονται στη διάρκεια της νεκροψίας. Παρατηρείται μια γενικευμένη λεμφοπενία, υποτυπώδης μυελώδης στιβάδα του θύμου αδένα, χωρίς καθόλου φλοιώδη στιβάδα. Τα λεμφογάγγλια δεν εμφανίζουν λεμφοζίδια και ο σπλήνας είναι μικρός σε μέγεθος και δεν εμφανίζει λευκό πολφό. Ο διάχυτος λεμφικός ιστός στους πνεύμονες και στο γαστρεντερικό σωλήνα είναι υποτυπώδης και αποτελείται κυρίως από δικτυοενδοθηλιακά κύτταρα. Σε ένα ποσοστό μέχρι και 15% αναπτύσσονται θυμικά λεμφώματα στα προχωρημένης ηλικίας ζώα. Εναποθέσεις μετάλλων στο επικάρδιο έχουν παρατηρηθεί σε κλινικά υγιείς μύες με ΒΣΑ. Η συμπεριφορά των ζώων αυτών είναι νευρώδης ειδικά μέχρι την ηλικία των 6 εβδομάδων (οι πληροφορίες για τα χαρακτηριστικά των στελεχών μυών με ΒΣΑ προέρχονται από την εταιρεία Charles River: research animal models).

Οι μύες με ΒΣΑ χρησιμοποιούνται από πολλούς ερευνητές παγκοσμίως ως μοντέλα για την έρευνα του ανοσιακού συστήματος των θηλαστικών και των ασθενειών τους. Έχουν, επίσης, χρησιμοποιηθεί ως δέκτες φυσιολογικών και νεοπλασματικών ιστών, όπως και για τον έλεγχο ασφάλειας καινούριων εμβολίων ή θεραπευτικών ουσιών σε ανοσοανεπαρκή άτομα.

Η ανοσοανεπάρκεια οφείλεται σε μία σπάνια υποτελή μετάλλαξη στο χρωμόσωμα 16, που είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση ενός ενζύμου που εμπλέκεται στον ανασυνδυασμό του DNA (Prkdc ή "protein kinase DNA activated, catalytic polypeptide"). Επειδή ο συνδυασμός V(D)J δεν επιτυγχάνεται, δεν είναι δυνατή η ωρίμανση της χυμικής και κυτταρικής ανοσίας. Έτσι, οι μύες με ΒΣΑ εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα να παράγουν Τ και Β λεμφοκύτταρα ή να ενεργοποιούν το συμπλήρωμα και δεν μπορούν να αντιμετωπίσουν με αποτελεσματικότητα τις λοιμώξεις (Bosma et al., 1989). Ταυτόχρονα δε μπορούν να απορρίψουν όγκους ή μοσχεύματα, χαρακτηριστικό επιθυμητό.

Figure 2. Athymic mice are hairless.

Εικόνα 2. Οι αθυμικοί μύες χαρακτηρίζονται από έλλειψη τριχώματος.

Εξαιτίας της ανοσοανεπάρκειας αυτών των ζώων είναι αναγκαία η προστασία τους από οποιασδήποτε μορφής παθογόνους μικροοργανισμούς. Γι' αυτόν το λόγο είναι αναγκαία η λήψη μέτρων από τη στιγμή της γέννησής τους. Η παραλαβή των νεογέννητων ανοσοκατεσταλμένων μυών γίνεται μετά από υστερεκτομή και μεταφορά εμβρύων, ενώ χρειάζεται να διατρέφονται με ειδική χλωρίδα για διατήρηση της ομοιόστασης. Η διατήρηση των μυών με ΒΣΑ γίνεται σε αποστειρωμένους χώρους, ενώ η υγρή και στερεή τροφή τους, καθώς και κάθε στοιχείο του περιβάλλοντος χώρου τους είναι επίσης αποστειρωμένα. Οι χειριστές των ζώων εισέρχονται στο χώρο στέγασης των ζώων με ειδική ενδυμασία, ενώ οι κλωβοί των ζώων επιτρέπεται να ανοιχθούν μόνο μέσα σε ειδικό αεραγωγό-απαγωγό κάθετης νηματικής ροής αέρα με HEPA (High Efficiency Particulate Arresting) φίλτρα (laminar airflow cabinet). Οι κλωβοί στέγασής τους είναι ειδικά σχεδιασμένοι για τα ζώα αυτά και χαρα-

κτηρίζονται ως ατομικά αεριζόμενοι κλωβοί (Individually Ventilated Cages: IVC). Κάθε κλωβός είναι ένα μικροπεριβάλλον απολύτως ελεγχόμενο που, εκτός από την ασφαλή διατήρηση των ζώων, παρέχει και απόλυτη ασφάλεια για τα στοιχεία κάθε πειραματισμού. Οι σωλήνες προσαγωγής και απαγωγής του αέρα κάθε κλωβού είναι συνδεδεμένοι με ειδικό μηχάνημα προκειμένου να διασφαλίζεται η διέλευση του αέρα από απόλυτα φίλτρα (HEPA). Τα ίδια φίλτρα αέρα υπάρχουν και στο θάλαμο στέγασης των μυών παρέχοντας καθαρότητα του αέρα που πλησιάζει το 100% (Wikipedia, 2009).

Το 1988 δύο διαφορετικές ερευνητικές ομάδες σχεδόν ταυτόχρονα κατάφεραν να τοποθετήσουν επιτυχώς στους μύες με ΒΣΑ κύτταρα ανθρώπινου ανοσιακού συστήματος (McCune et al., 1988; Mosier et al., 1988) και να κατασκευάσουν τις χίμαιρες ανθρώπου-μυός (hu-PBL-scid mice). Με διάφορους τρόπους, όπως με την παραγωγή αντισωμάτων εναντίον της τοξίνης του τετάνου μετά από έγχυσή της, αποδείχθηκε πως τα hu-PBL-scid ζώα μιμούνται πιστά τη λειτουργία του ανθρώπινου ανοσιακού συστήματος. Την ίδια χρονιά (1988) οι Namikawa και συν. και οι Mosier και συν. το 1991 κατάφεραν να αναπτύξουν σε αυτά τα ζώα τον HIV-1 ιό στα ανθρώπινα Τ-λεμφοκύτταρα, ανοίγοντας καινούριους δρόμους στη θεραπεία της ασθένειας.

Το 1990 η ομάδα του Croy στο Πανεπιστήμιο του Guelph ανέπτυξε μυ που κατέχει ταυτόχρονα τις υποτελείς μεταλλάξεις scid και beige (bg) που έχουν περιγραφεί το 1979 από τον Roder, μετά από ζευγάρωμα C.B-17 SCID/SCID σε C57BL/6 bg/bg επίμυες (MacDougall et al., 1990). Αυτά τα υβρίδια εμφάνιζαν επιπρόσθετα μειωμένη δραστηριότητα των κυττάρων-μεσολαβητών σε σύγκριση με τους κλασικούς μύες με ΒΣΑ.

Γενικώς, έχουν γίνει πολλές προσπάθειες να δημιουργηθούν γενετικά τροποποιημένοι μύες με ΒΣΑ με ζευγαρώματα με ενδογαμία ή με άλλα μεταλλαγμένα στελέχη μυών με σκοπό την παραγωγή ζώων με εντονότερη ανοσοανεπάρκεια (Nomura et al., 1990; Boermans et al., 1992; Nonoyama et al., 1993; Christianson et al., 1996). Και αυτό γιατί, όπως οι αθυμικοί μύες, έτσι και οι μύες με ΒΣΑ εμφανίζουν το φαινόμενο που ονομάζεται "διαρροή" καθώς τα ζώα μεγαλώνουν σε ηλικία. Πιο συγκεκριμένα, γύρω στους 12 με 14 μήνες ζωής τους οι μύες με ΒΣΑ εμφανίζουν ανιχνεύσιμα ποσά Τ και Β λεμφοκυττάρων ικανών να απορρίψουν όγκους ή μοσχεύματα (Taconic, 2009). Εξάλλου αυτά τα ζώα έχουν και κάποια μικρά ποσά κυττάρων-μεσολαβητών, καθώς και μακροφάγα. Για την αντιμετώπιση αυτής της "διαρροής" που εμφανίζεται στους ανοσοανεπαρκείς μύες διάφορες τεχνικές έχουν αναπτυχθεί. Μία από αυτές είναι η ελαφριάς δοσολογίας ακτινοβολία ή/και η χορήγηση αντισωμάτων ενδοπεριτοναϊκά εναντίον των κυττάρων-μεσολαβητών και των μακροφάγων (Sandhu et al., 1996).

Figure 3. Albino appearance is characteristic of SCID mice.

Εικόνα 3. Η εμφάνιση των μυών με ΒΣΑ είναι ίδια με αυτή των ζώων με αλφισμό.

Ως αποτέλεσμα αυτών των προσπαθειών δημιουργήθηκαν το 1995 από τους Greiner και συν. οι μύες NOD/LtSz-*scid* που αποδείχθηκαν καλύτεροι δέκτες των ανθρώπινων κυττάρων. Στα ζώα αυτά μεταφέρθηκε το γονίδιο *scid* σε ζώα με υπόστρωμα ειδικό για την έρευνα του διαβήτη (μη παχύσαρκοι διαβητικοί μύες με ΒΣΑ, NOD-SCID mice). Η μεγαλύτερου βαθμού ικανότητα για εμφύτευση των ανθρώπινων κυττάρων οφείλεται σε βαρύτερη ανοσοανεπάρκεια εξαιτίας δυσλειτουργίας του ανοσιακού συστήματος, συμπεριλαμβανομένης της μειωμένης λειτουργίας των μακροφάγων, της αιμολυτικής δραστηριότητας και των κυττάρων-μεσολαβητών (Shultz et al., 1995). Έχει αναφερθεί πως το επίπεδο εμφύτευσης ανθρώπινων κυττάρων στους NOD/SCID μύες, μετά από μεταμόσχευση κυττάρων σπλήνα (Greiner et al., 1995), μονοκυτταρικών κυττάρων περιφερικού αίματος (Hesselton et al., 1995), μυελού των οστών ή κυττάρων αίματος από τον ομφάλιο λώρο (Lowry et al., 1996;

Pflumio et al., 1996; Cashman et al., 1997), μπορεί να είναι 5 με 10 φορές υψηλότερο από αυτό που επιτυγχάνεται στους κλασικούς μύες με ΒΣΑ.

Μύες με στοχευμένη μετάλλαξη, παρέχοντας ισχυρότερη ανοσοανεπάρκεια, έχουν διευκολύνει μελέτες για την ανάπτυξη αιμοποιητικών στελεχιαίων κυττάρων, την αυτοανοσία και τα λοιμώδη νοσήματα. Αυτά συμπεριλαμβάνουν μύες με μείωση της έκφρασης των γονιδίων της μικροσφαιρίνης β2 (*B2m*), που είναι αναγκαία για τη δραστηριότητα των κυττάρων-μεσολαβητών (Christianson et al., 1997; Kollet et al. 2000), καθώς και μύες με διαταραχή των γονιδίων που ενεργοποιούν τον ανασυνδυασμό (recombination activating gene-1; *Rag-1, Rag-2*), καθώς και των γονιδίων περφορίνης (*PRF1*). Η παρουσίαση αυτών των γενετικά τροποποιημένων μυών με ανοσοανεπάρκεια γίνεται από τους Macchiarini και συν. (2005). Επίσης, ζευγαρώνοντας μύες με ΒΣΑ με μύες που φέρουν μεταλλάξεις σε συγγενή γονίδια, όπως στον υποδοχέα της ιντερλευκίνης 2Rγ (Ito et al, 2002), μπορούν να δημιουργηθούν βαρύτερες μορφές ανοσοανεπάρκειας για να χρησιμοποιηθούν επιτυχέστερα στην έρευνα. Ο βαθμός ανεπάρκειας διαφόρων στοιχείων του ανοσιακού συστήματος εξαρτάται από την επιπρόσθετη μετάλλαξη που φέρει ο μυς εκτός από αυτήν του scid.

Χρήσεις των ανοσοανεπαρκών μυών

Οι μύες με ΒΣΑ είναι ιδανικοί για την ανάπτυξη υβριδωμάτων *in vivo* και για την παραγωγή συνεχούς αποθέματος αντισωμάτων, που είναι απαραίτητα για διαγνωστικές, κλινικές και πειραματικές διαδικασίες.

Στο πεδίο της σκλήρυνσης κατά πλάκας, μία ερευνητική μελέτη κατάφερε να παράγει την πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα σε ανοσοανεπαρκείς μύες, στους οποίους παρατηρήθηκε μεγαλύτερο ποσοστό ανάπτυξης της νόσου (71% σε σύγκριση με το 5% στους μη ανοσοανεπαρκείς μύες), δίνοντας έτσι τη δυνατότητα να μελετηθούν οι μηχανισμοί που οδηγούν στην εμφάνιση της νόσου (Jones et al., 1999).

Οι Shioji et al. (2004) κατάφεραν να μεταφέρουν την αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα στους ανοσοανεπαρκείς μύες και με τη χορήγηση ειδικών ανοσοσφαιρινών μείωσαν την εμφάνιση των συμπτωμάτων της.

Μια ακόμη αυτοάνοση ασθένεια που οι ανοσοανεπαρκείς μύες έχουν βοηθήσει πολύ στη μελέτη της είναι η ρευματοειδής αρθρίτιδα. Η δυνατότητα εισαγωγής ανθρώπινων αρθρικών στοιχείων (χόνδρος, ινοβλάστες) στους ανοσοανεπαρκείς μύες είχε ως αποτέλεσμα την πιστή αναπαραγωγή της νόσου και τη δυνατότητα για ταυτοποίηση καινούριων θεραπευτικών παραγόντων (Pierer et al., 2003).

Η μελέτη θεραπευτικών προσεγγίσεων διαφόρων δερματικών παθήσεων έχει ωφεληθεί ιδιαίτερα από τη δυνατότητα που παρέχουν οι ανοσοανεπαρκείς μύες. Έχοντας τη δυνατότητα να μην απορρίπτουν κάποιο μόσχευμα, στους μύες αυτούς γίνεται προσπάθεια αναγέννησης δέρματος που στη συνέχεια τοποθετείται στο άτομο που πάσχει. Από τις αρκετές εργασίες που υπάρχουν γύρω από το θέμα, παραθέτουμε ενδεικτικά μία μελέτη για τα υπάρχοντα μοντέλα της ψωρίασης (Boehncke και Schön, 2007).

Ανάμεσα στις άλλες χρήσεις που μπορούν να έχουν οι ανοσοανεπαρκείς μύες αναφέρουμε την ικανότητα τοποθέτησης ανθρώπινων ερυθρών αιμοσφαιρίων στα οποία παρασιτεί το *Plasmodium falciparum* με δυνατότητα για αναπαραγωγή της ελονοσίας στα πειραματόζωα (Badell et al., 2000). Οι Davis και Stanley (2003) αναφέρουν στη μελέτη τους διάφορες άλλες λοιμώδεις νόσους, των οποίων η παθογένεια και η θεραπεία διευκολύνθηκε από τη χρήση αυτών των μυών.

Στο χώρο της έρευνας του καρκίνου οι ανοσοανεπαρκείς μύες δεν έχουν χρησιμοποιηθεί μόνο για την παθογένεια, εμφάνιση και πιθανή θεραπεία των πρωτογενών όγκων, αλλά και για τον οστεοτροπισμό διάφορων μορφών όγκων, επιπλοκή που οδηγεί σε κακή ποιότητα ζωής του ασθενούς και σε αυξημένη θνησιμότητα. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί κάποια μοντέλα ανθρώπινων νεοπλασιών στα οποία επιτυγχάνεται η ορθοτοπική ανάπτυξη (στο πρωτογενές σημείο ανάπτυξης) του όγκου και στη συνέχεια ερευνάται η μετάσταση αυτών των κυττάρων στα οστά του μυός. Με αυτόν τον τρόπο βελτιώθηκε αρκετά η δυνατότητα εξέτασης μηχανισμών οστεοτροπισμού των νεοπλασματικών κυττάρων. Μοντέλα, όμως, που μιμούνται πλήρως την ασθένεια είναι αυτά που έχουν αναπτυχθεί πρόσφατα και στηρίζονται στην τοποθέτηση ανθρώπινου οστικού μοσχεύματος στους μύες με ανοσοανεπάρκεια. Για παράδειγμα, μικρά τμήματα από οστό εμβρύων και, πιο ευστόχως, από οστό ενήλικων ανθρώπων (Hu-bone SCID mice) έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη του καρκίνου του προστάτη (Tsingotjidou et al., 2001; Yonou et al., 2001; Tsingotjidou et al., 2003) και του μαστού (Kupperwasser et al., 2005), που κατεξοχήν προκαλούν οστικές μεταστά-

σεις στον άνθρωπο. Οι ίδιες τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί και για τη μελέτη αιμοτολογικών νεοπλασιών, όπως είναι το πολλαπλούν μυέλωμα (Sjak-Shie et al., 1999; Huang et al., 2004; Tassone et al., 2005a) και η μακροσφαιριναιμία Waldenström (Tassone et al., 2005b; Tsingotjidou et al., 2009).

Δύο είναι οι κύριοι τομείς της κτηνιατρικής έρευνας που γίνεται χρήση των μυών με ΒΣΑ: παρασιτικές μολύνσεις (Arai et al., 1998; Lagapa et al., 2002) και οι νεοπλασίες (Fork et al., 2008). Εκτός από αυτά τα κύρια πεδία, οι μύες με ΒΣΑ χρησιμοποιούνται και σε άλλα ερευνητικά πεδία με κτηνιατρικό ενδιαφέρον, όπως η τεχνητή γονιμοποίηση και η μελέτη του αναπαραγωγικού συστήματος (Dobrinski and Rathi, 2008).

Όλα τα προηγούμενα φανερώνουν την ευεργετική επίδραση του μυός στον ανθρώπινο πολιτισμό, η οποία αποκορυφώνεται από τη δημιουργία ανοσοανεπαρκών μυών δίνοντας αστείρευτες δυνατότητες στον επιστημονικό κόσμο που ασχολείται με την υγεία.

REFERENCES - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Arai S, Tsuji M, Kim SJ, Nakade T, Kanno Y, Ishihara C (1998) Babesia canis infection in canine-red blood cell-substituted SCID mice. Int J Parasitol., 28(9):1429-1435.

Badell E, Oeuvray C, Moreno A, Soe S, van Rooijen N, Bouzidi A, Druilhe P (2000) Human malaria in immunocompromised mice: an in vivo model to study defense mechanisms against Plasmodium falciparum. J Exp Med,192(11):1653-1660.

Bell TG, Butler KL, Sill HB, Stickle JE, Ramos-Vara JA, Dark MJ (2002) Autosomal recessive severe combined immunodeficiency of Jack Russell terriers. J Vet Diagn Invest, 14 (3): 194–204.

Boehncke WH, Schön MP (2007) Animal models of psoriasis Clin Dermatol, 25(6): 596-605.

Boermans H-J, Percy D-H, Stirtzinger T, Croy B-A (1992) Engraftment of severe combined immune deficient/beige mice with bovine foetal lymphoid tissues. Vet Immunol Immunopathol, 34:273-289.

Bosma GC, Owen J, Easton G, Marshall G, Dewitt C, Bosma MJ (1980) Concentration of IgG1 and IgG2a allotypes in serum of nude and normal allotype-congenic mice. J Immunol, 124(2):879-884.

Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ (1983) A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse Nature, 301(5900):527-530.

Bosma GC, Davisson MT, Ruetsch NR, Sweet HO, Shultz LD, Bosma MJ (1989) The mouse mutation severe combined immune deficiency (scid) is on chromosome 16 Immunogenetics, 29(1):54-57.

Cashman JD, Lapidot T, Wang JC, Doedens M, Shultz LD, Lansdorp P, Dick JE, Eaves CJ (1997) Kinetic evidence of the regeneration of multilineage hematopoiesis from primitive cells in normal human bone marrow transplanted into immunodeficient mice. Blood, 89:4307-4016.

Charles River: research animal models (2008) http://www.criver.com/en-US/ProdServ/ByType/ResModOver/Pages/home2.aspx [accessed 30 January 2009].

Christianson SW, Greiner DL, Schweitzer IB, Gott B, Beamer GL, Schweitzer PA, Hesselton RM, Shultz LD (1996) Role of natural killer cells on engraftment of human lymphoid cells and on metastasis of human T-lymphoblastoid leukemia cells in C57BL/6J-scid mice and in C57BL/6J-scid, bg mice. Cell Immunol, 171:186-199.

Christianson SW, Greiner DL, Hesselton RA, Leif JH, Wagar EJ, Schweitzer IB, Rajan TV, Gott B, Roopenian DC, Shultz LD (1997) Enhanced human CD4+ T cell engraftment in 2-microglobulin-deficient NOD-scid mice. J Immunol, 158:3578-3586.

Crow JF (2002) C. C. Little, Cancer and Inbred Mice. Genetics, 161:1357-1361.

Davis PH, Stanley SL (2003) Breaking the species barrier: use of SCID mouse-human chimeras for the study of human infectious diseases. Cell Microbiol, 5 (12): 849-860.

Dobrinski I, Rathi R (2008). Ectopic grafting of mammalian testis tissue into mouse hosts. Methods Mol Biol, 450:139-148.

Flanagan SP (1966) 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse Genet Res, 8(3):295-309.

Fork MA, Murua Escobar H, Soller JT, Sterenczak KA, Willenbrock S, Winkler S, Dorsch M, Reimann-Berg N, Hedrich HJ, Bullerdiek J, Nolte I (2008) Establishing an in vivo model of canine prostate carcinoma using the new cell line CT1258. BMC Cancer, 8:240.

Greiner D-L, Shultz L-D, Yates J, Appel MC, Perdrizet G, Hesselton RM, Schweitzer I, Beamer WG, Shultz KL, Pelsue SC, Leif JH, Rajan TV (1995) Improved engraftment of human spleen cells in NOD/LtSz-scid/scid mice as compared with C.B-17-scid/scid mice. Am J Pathol, 146:888-902.

Henthorn PS, Somberg RL, Fimiani VM, Puck JM, Patterson DF, Felsburg PJ (1994). IL-2R gamma gene microdeletion demonstrates that canine X-linked severe combined immunodeficiency is a homologue of the human disease. Genomics, 23 (1): 69–74.

Hesselton RM, Greiner DL, Mordes JP, Rajan TV, Sullivan JL, Shultz LD (1995) High levels of human peripheral blood mononuclear cell engraftment and enhanced susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection in NOD/LtSz-scid/scid mice. J Infect Dis, 172:974-982.

Huang SY, Tien HF, Su FH, Hsu SM (2004) Nonirradiated NOD/SCID-human chimeric animal model for primary human multiple myeloma: a potential in vivo culture system. Am J Pathol, 164(2):747-756.

Isaason JH, Cattanach BM (1962) Report. Mouse News Letter, 27:31.

Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, Ueyama Y, Koyanagi Y, Sugamura K, Tsuji K, Heike T, Nakahata T (2002) NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. Blood, 100(9):3175-3182.

Jones RE, Mass M, Bourdette DN (1999) Myelin basic protein-specific T lymphocytes induce chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in lymphocyte-deficient (SCID) mice. J Neuroimmunol, 93(1-2):92-101.

Kollet O, Peled A, Byk T, Ben-Hur H, Greiner D, Shultz L, Lapidot T

(2000) beta2 microglobulin-deficient (B2m(null)) NOD/SCID mice are excellent recipients for studying human stem cell function. Blood, 95:3102-3105.

Kuperwasser C, Dessain S, Bierbaum BE, Garnet D, Sperandio K, Gauvin GP, Naber SP, Weinberg RA, Rosenblatt M (2005) A mouse model of human breast cancer metastasis to human bone. Cancer Res, 65(14):6130-6138.

Lagapa JT, Oku Y, Nonaka N, Kamiya M (2002) Taenia taeniaeformis larval product induces gastric mucosal hyperplasia in SCID mice. Jpn J Vet Res, 49(4):273-285.

Lowry PA, Shultz LD, Greiner DL, Hesselton RM, Kittler ELW, Tiarks CY, Rao SS, Reilly J, Leif JH, Ramshaw H, Stewart FM, Quesenberry PJ (1996) Improved engraftment of human cord blood stem cells in NOD/LtSz-scid/scid mice after irradiation or multiple-day injections into unirradiated recipients. Biol Blood Marrow Transplant, 2:15-23.

Macchiarini F, Manz MG, Palucka AK, Shultz LD (2005) Humanized mice: are we there yet? Exp Med, 202(10):1307-1311.

MacDougall JR, Croy BA, Chapeau C, Clark DA (1990) Demonstration of a splenic cytotoxic effector cell in mice of genotype SCID/SCID.BG/BG. Cell Immunol, 130(1):106-117.

McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H, Shultz LD, Lieberman M, Weissman IL (1988) The SCID-hu mouse: murine model for the analysisof human hematolymphoid differentiation and function. Science, 241(4873):1632-1639.

Mosier DE, Gulizia RJ, Baird SM, Wilson DB (1988) Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. Nature, 335(6187):256-259.

Mosier DE, Gulizia RJ, Baird SM, Wilson DB, Spector DH, Spector SA (1991) Human immunodeficiency virus infection of human-PBL-SCID mice. Science, 251:791-794.

Mouse Genome Sequencing Consortium (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. Nature, 420(6915): 520-562.

Namikawa R, Kaneshima H, Lieberman M, Weissman IL, McCune JM (1988) Infection of the SCID-hu mouse by HIV-1. Science, 242(4886):1684-1686.

Nomura T, Takahama Y, Hongyo T, Inohara H, Takatera H, Fukushima H, Ishii Y, Hamaoka T (1990) SCID (severe combined immunodeficiency) mice as a new system to investigate metastasis of human tumors. J Radiat Res (Tokyo), 31:288-292.

Nonoyama S, Smith FO, Bernstein ID, Ochs HD (1993) Strain-dependent leakiness of mice with severe combined immune deficiency. J Immunol, 150:3817-3824.

Pantelouris EM (1968) Absence of thymus in a mouse mutant. Nature, 217(126):370-371.

Pflumio F, Izac B, Katz A, Shultz LD, Vainchenker W, Coulombel L (1996) Phenotype and function of human hematopoietic cells engrafting immune-deficient CB17-severe combined immunodeficiency mice and nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency mice after transplantation of human cord blood mononuclear cells. Blood, 88:3731-3740.

Pierer M, Müller-Ladner U, Pap T, Neidhart M, Gay RE, Gay S (2003) The SCID mouse model: novel therapeutic targets - lessons from gene transfer. Springer Semin Immunopathol, 25(1):65-78.

Roder JC (1979) The beige mutation in the mouse. I. A stem cell predetermined impairment in natural killer cell function. J Immunol, 123(5):2168-2173.

Rygaard J, Povlsen CO (1969) Heterotransplantation of a human malignan tumour to "Nude" mice. Acta Pathol Microbiol Scand, 77(4):758-760.

Sandhu JS, Clark BR, Boynton EL, Atkins H, Messner H, Keating A, Hozumi N (1996) Human hematopoiesis in SCID mice implanted with human adult cancellous bone. Blood, 88(6):1973-1982.

Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Schweitzer IB, Tennent B, McKenna S, Mobraaten L, Rajan TV, Greiner DL (1995) Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. J Immunol, 154:180-191.

Sjak-Shie NN, Tsingotjidou AS, Zhang K, Vescio RA, Said JW, Lieberman JR, Berenson JR (1999) Development of a SCID-hu animal model that more closely resembles human multiple myeloma. Blood, 94 (10 Suppl. Part 1): 2447.

Shioji K, Yuan Z, Kita T, Kishimoto C (2004) Immunoglobulin treatment suppressed adoptively transferred autoimmune myocarditis in severe combined immunodeficient mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol., 287(6):H2619-2625.

Taconic (2009) http://www.taconic.com/wmspage.cfm?parm1=326 [accesed 06 October 2009]

Tassone P, Neri P, Kutok JL, Tournilhac O, Santos DD, Hatjiharissi E, Munshi V, Venuta S, Anderson KC, Treon SP, Munshi NC (2005a) Combination therapy with interleukin-6 receptor superantagonist Sant7 and dexamethasone induces antitumor effects in a novel SCID-hu In vivo model of human multiple myeloma. Clin Cancer Res, 11(11):4251-4258.

Tassone P, Neri P, Kutok JL, Tournilhac O, Santos DD, Hatjiharissi E, Munshi V, Venuta S, Anderson KC, Treon SP, Munshi NC. (2005b) A SCID-hu in vivo model of human Waldenstrom macroglobulinemia. Blood, 106(4):1341-1345.

Tsingotjidou AS, Zotalis G, Jackson KR, Sawyers C, Puzas JE, Hicks DG, Reiter R, Lieberman JR (2001) Development of an animal model for prostate cancer cell metastasis to adult human bone. Anticancer Res, 21 (2A):971-978.

Tsingotjidou AS, Ahluwalia R, Zhang J, Conrad H, Emmanouilides C (2003) A metastatic human prostate cancer model using intraprostatic implantation of tumor produced by PC-3 neolacz infected cells. Int J Oncology, 23(6):1569-1574.

Tsingotjidou AS, Emmanouilides CE, Siotou E, Poutahidis T, Xagorari A, Loukopoulos P, Sotiropoulos D, Bekiari C, Doulberis M, Givissis P, Fassas A, and Anagnostopoulos A (2009) Establishment of an animal model for Waldenstrom's macroglobulinemia. Exp Hematol, :37(4):469-476.

UCCAA: University of California, Center for Animal Alternatives (2009) http://www.vetmed.ucdavis.edu/Animal_Alternatives/cancer.htm [accessed 30 January 2009].

VetGen: Veterinary Genetic Services (2009) http://www.vetgen.com/equine-scid-service.html και http://www.vetgen.com/equine-ref-new-SCID.html [accessed 29 January 2009].

Wikipedia (2009) http://en.wikipedia.org/wiki/HEPA [accessed 05 October 2009].

Yonou H, Yokose T, Kamijo T, Kanomata N, Hasebe T, Nagai K, Hatano T, Ogawa Y, Ochiai A (2001) Establishment of a novel species- and tissue-specific metastasis model of human prostate cancer in humanized non-obese diabetic/severe combined immunodeficient mice engrafted with human adult lung and bone. Cancer Res, 61(5):2177-2182.