



ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
&
ΤΜΗΜΑ ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

**" ΚΑΙΝΟΤΟΜΕΣ ΛΥΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΗΘΙΚΗ ΕΠΙΣΤΗΜΗ: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ
ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΤΙΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΣΕ ΖΩΑ "**

υπό

ΚΟΥΒΑΡΑ ΦΩΤΕΙΝΗ

Νοσηλεύτρια

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των
απαιτήσεων για την απόκτηση του
Διπλώματος Μεταπτυχιακών Σπουδών
«Δεοντολογία και Ηθική στις Βιοϊατρικές Επιστήμες»

Λάρισα, 2024

Επιβλέπων:

Γεώργιος Χ. Φθενάκης, Καθηγητής Φυσιοπαθολογίας της αναπαραγωγής των ζώων, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1. Γεώργιος Χ. Φθενάκης,*
- 2. Δημήτριος Γκουγκουλής*
- 3. Μαριάννα Μπαρμπαγιάννη*

Τίτλος εργασίας στα αγγλικά:

"Innovative solutions in Ethical Science: A comparative analysis of alternative methods to animal testing"

Πίνακας Περιεχομένων

Κεφάλαιο 1 Εισαγωγή/Introduction	6
1.1 Ιστορικό Πλαίσιο	6
1.2 Η ανάγκη για ρύθμιση: Το ιστορικό της απαγόρευσης χρήσης εργαστηριακών ζώων.	10
1.3 3Rs – Replacement, Reduction & Refinement	12
1.4 Ζώα Εργαστηρίου	14
Κεφάλαιο 2 Σκοπός/Aim	23
Κεφάλαιο 3 Μεθοδολογία/Methods.....	24
3.1 Εμφάνιση εναλλακτικών μεθόδων.....	25
3.2 In vitro testing και καλλιέργεια κυττάρων.....	26
3.3 Silico models.....	30
3.4 3D Bioprinting	34
3.5 Organ-on-a-chip και microfluidic chip	38
Κεφάλαιο 4 Συμπεράσματα – Συζήτηση / Conclusion – Discussion	43
Κεφάλαιο 5 Βιβλιογραφία	46

Περίληψη

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία αναλύει τις ηθικές προκλήσεις που ανακύπτουν από τη χρήση ζώων στην επιστημονική έρευνα και επικεντρώνεται στις εναλλακτικές μεθόδους που δεν περιλαμβάνουν ζώα. Διερευνά και παρουσιάζει επιλεγμένες, πρωτοποριακές και εναλλακτικές μεθόδους, όπως οι δοκιμές *in vitro*, *in silico*, 3D Βιοεκτύπωση και η τεχνολογία *organ-on-a-chip* (OOC). Μέσω αυτών και τονίζοντας τη σημασία των αρχών 3Rs (Reduction, Refinement, Replacement) υπογραμμίζεται η αναπόφευκτη ανάγκη για μια σταδιακή, αλλά συγκεκριμένη και εμφανή αλλαγή προσανατολισμού. Στόχος είναι να υποστηρίξει τις προοπτικές αντικατάστασης των δοκιμών σε ζώα και να επισημάνει την ανάγκη για ελαχιστοποίηση της χρήσης τους. Με την ενσωμάτωση της επιστήμης, της τεχνολογίας και της ηθικής, προάγεται μια νέα εποχή στην επιστήμη, όπου οι ηθικοί παράγοντες καθίστανται πρωταρχικής σημασίας.

Λέξεις – Κλειδιά: Αρχές 3Rs, Εναλλακτικές μέθοδοι, *in vitro*, *in silico*, 3D Βιοεκτύπωση, *Organ-on-a-chip* (OOC)

Abstract

The present research analyzes the ethical challenges arising from the use of animals in scientific research and focuses on alternative methods that do not involve animals. It investigates and presents selected, innovative, and alternative methods, such as in vitro and in silico tests, 3D Bioprinting, and organ-on-a-chip (OOC) technology. Through these, emphasizing the importance of the 3Rs principles (Reduction, Refinement, Replacement), the inevitable need for a gradual, yet specific and evident shift in orientation is underlined. The goal is to support the perspectives of replacing animal testing and to highlight the need for minimizing their use. By incorporating science, technology, and ethics, a new era in science is promoted, where ethical factors become of primary importance.

Key words: 3Rs Principles, Ethical Challenges, in vitro, in silico, 3D Bioprinting, Organ-on-a-chip (OOC)

Κεφάλαιο 1 Εισαγωγή/Introduction

1.1 Ιστορικό Πλαίσιο

Πρωταρχικές μέθοδοι δοκιμών σε ζώα

Η χρήση ζώων στην επιστημονική έρευνα αποτελεί μία από τις πλέον αμφιλεγόμενες, αλλά και θεμελιώδεις πτυχές της βιολογικής και ιατρικής έρευνας. Διαπλέκοντας την ιστορική της πορεία, από την αρχαιότητα μέχρι το σήμερα, αναδεικνύεται η διαχρονική της σημασία, αλλά και οι συνεχείς προκλήσεις που έχει θέσει στην ηθική και την κοινωνία. Από τους αρχαίους Έλληνες επιστήμονες και την ιεραρχική τους αντίληψη για τον άνθρωπο σε σχέση με τα ζώα, μέχρι τις σύγχρονες επιστημονικές αντιλήψεις και την προσπάθεια για την ηθική της επιστήμης, το παρόν κείμενο αποτελεί μια εξονυχιστική ανασκόπηση της θεματικής αυτής, με ειδική έμφαση στην εξέλιξη των επιστημονικών πρακτικών και των κοινωνικών αντιδράσεων που προκάλεσαν.

Η χρήση ζώων στην επιστημονική έρευνα έχει τις ρίζες της στην αρχαιότητα (500 π.Χ.) (1). Οι αρχαίοι Έλληνες επέλεξαν τα ζώα ως πρότυπα για την ανατομία και τη φυσιολογία του ανθρώπου. Οι περιορισμοί όμως στην ανθρώπινη ανατομία, οδήγησαν τους Έλληνες ιατρούς στη διατομή ζώων (1). Διακεκριμένοι Έλληνες ιατροί και επιστήμονες, όπως ο Αριστοτέλης, ο Ηρόφιλος και ο Ερασίστρατος, ενδιαφέρθηκαν και εργάστηκαν πάνω σε πειράματα προκειμένου να εξετάσουν τη λειτουργία των ζωντανών οργανισμών (2). Ο όρος «ζωοτομία», που αναφέρεται στη διαδικασία της χειρουργικής εξέτασης ζωντανών ζώων, υιοθετήθηκε και χρησιμοποιήθηκε ευρέως από αυτούς τους πρώτους Έλληνες επιστήμονες (3). Ο κύριος σκοπός πίσω από τις ερευνητικές αυτές πρωτοβουλίες ήταν η ικανοποίηση της ανατομικής τους περιέργειας (1), καθώς και η βαθύτερη κατανόηση των διαφορών μεταξύ των αισθητηριακών νεύρων, των κινητικών νεύρων και των τένοντων (3). Γενικότερα, επιθυμούσαν να κατανοήσουν τους μηχανισμούς που διέπουν τη ζωή (1).

Το έργο και η γνώση των πρώιμων αυτών επιστημόνων κληροδοτήθηκαν στον Ρωμαίο ιατρό Γαληνό της Περγάμου (2ος–3ος αιώνας μ.Χ.), ο οποίος υποστήριξε την ύπαρξη ομοιοτήτων μεταξύ της φυσιολογίας των ζώων και των ανθρώπων (1,4). Τα έργα του Γαληνού, που ενσωματώνουν τόσο ανατομικές μελέτες όσο και ζωοτομίες, παρέμειναν

αναφορές στον επιστημονικό κόσμο μέχρι την περίοδο της Αναγέννησης (1). Ο Γαληνός είχε αποκτήσει φήμη για τις ανατομίες του σε χοίρους και κατσίκες (4).

Για τους περισσότερους αρχαίους Έλληνες, η χρήση ζωντανών ζώων σε πειράματα δεν προκαλούσε κανέναν ηθικό προβληματισμό (1). Αυτή η στάση καθοριζόταν σε μεγάλο βαθμό από τη 'scala naturae' (η αλυσίδα της ύπαρξης), μια αυστηρή ιεραρχική κοσμολογία που αναγνώριζε την ανωτερότητα των ανθρώπων έναντι των ζώων (1). Η ιουδαιοχριστιανική κοσμοθεωρία συμφωνούσε με αυτή την αντίληψη, με θεολόγους όπως ο Αυγουστίνος Ιπώνος να επικροτούν την ανθρώπινη πρωτοκαθεδρία (1). Παρ' όλα αυτά, ορισμένοι, όπως ο Θωμάς Ακινάτης, καταδίκασαν την κακοποίηση των ζώων, προβληματιζόμενοι ότι αυτό θα μπορούσε να προκαλέσει παρόμοια συμπεριφορά απέναντι στους ανθρώπους (1).

Προχωρώντας το 12ο αιώνα, ο Άραβας γιατρός Ibn Zuhr υιοθέτησε τις δοκιμές σε ζώα ως τεχνική για την εξάσκηση χειρουργικών επεμβάσεων προτού εφαρμόσει τις ίδιες τεχνικές σε ανθρώπους ασθενείς (3).

Λίγους αιώνες αργότερα, κατά την Εποχή του Διαφωτισμού (3), η πρακτική της ζωτομίας όχι μόνο διατηρήθηκε αλλά η χρήση της ήταν εκτεταμένη (1,3). Διακεκριμένες προσωπικότητες, όπως ο Γάλλος φιλόσοφος René Descartes, είναι γνωστό ότι πραγματοποίησαν ζωτομίες κατά τη διάρκεια αυτής της εποχής (3). Ο Descartes αντιμετώπιζε τα ζώα ως "μηχανικές οντότητες", υποστηρίζοντας ότι δεν έχουν την ικανότητα να αισθανθούν



Εικόνα 1: "A physiological demonstration with vivisection of a dog," του Émile-Édouard Mouchy. Αυτό το έργο τέχνης του 1832, απεικονίζει την αξία που απέδιδαν οι Γάλλοι επιστήμονες στη φυσιολογική πειραματική διεργασία προς όφελος της επιστημονικής προόδου. Παρατηρείται πως ο αγώνας του ζώου δεν επηρεάζει τον φυσιολόγο ή τους παρατηρητές του. Πηγή:(1)

τον πόνο όπως οι άνθρωποι (1). Ωστόσο, οι θεωρίες του δεν συγκέντρωσαν αδιαίρετη συμφωνία (1). Φιλόσοφοι όπως ο Σπινόζα αναγνώρισαν την αίσθηση και την συναισθηματικότητα των ζώων, ενώ άλλοι, όπως ο John Locke και ο Immanuel Kant, εξέφρασαν ηθικές επιφυλάξεις, επισημαίνοντας την πιθανή συσχέτιση μεταξύ της

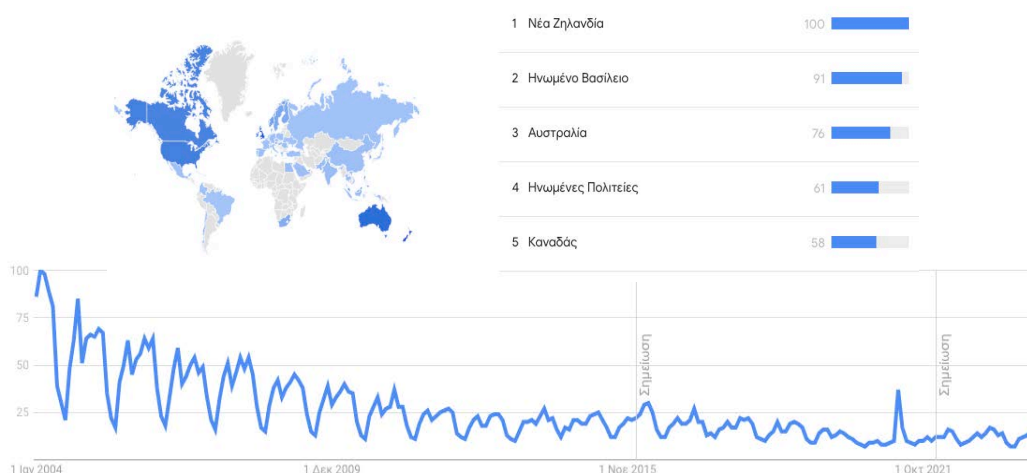
κακοποίησης των ζώων και των ανθρώπων (1). Την ίδια εποχή και στο Ηνωμένο Βασίλειο, η χρήση ζώων για επιστημονικούς ερευνητικούς σκοπούς αρχίζει να γίνεται έντονη (3). Ο William Harvey (1578-1657) εφαρμόζοντας πειράματα σε ζώα, κατέληξε σε πρωτοποριακές ανακαλύψεις στον τομέα της κυκλοφορίας του αίματος (2,3).

Δύο αιώνες αργότερα η χρήση των ζώων στην επιστημονική έρευνα γίνεται ακόμη πιο έντονη (4). Εν μέσω μιας εποχής όπου το ιατρικό πεδίο εξελισσόταν με έμφαση στην παθολογία και την προέλαση των νόσων, η εργαστηριακή έρευνα αναδείχθηκε ως κεντρικός πυλώνας της επιστημονικής προόδου (3). Η εργαστηριακή έρευνα γνώρισε ανατροπές, με κορυφαίες φυσιολογικές όπως ο François Magendie και ο μαθητής του, Claude Bernard, να υποστηρίζουν την αναγκαιότητα των πειραμάτων σε ζώα για τη λήψη αξιόπιστων φυσιολογικών και παθολογικών δεδομένων (3). Ακόμη, η ανακάλυψη των αναισθητικών καθώς και η δημοσίευση του Darwin σχετικά με τις βιολογικές ομοιότητες μεταξύ ανθρώπων και ζώων συνέβαλαν περαιτέρω στην αύξηση των πειραμάτων σε ζώα (5). Η σημαντικότερη ίσως αναφορά συνέβη στα τέλη του 19^{ου} αιώνα όταν ο Louis Pasteur χορήγησε άνθρακα σε πρόβατα και έδειξε τη σημασία των εμβολίων με τη θεωρία των μικροβίων του (6). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν και οι περιπτώσεις δοκιμών σε ζώα, που περιλάμβαναν ψυχολογικά πειράματα και διεξάγονταν από τον Ivan Pavlov με στόχο να δείξει πώς τα σκυλιά μπορούσαν να «ρυθμιστούν» σε σχέση με τη μνήμη και τις επαναλαμβανόμενες εργασίες (7). Ωστόσο, η αντίδραση της κοινωνίας εντεινόταν, ιδιαίτερα στη Βρετανία, λόγω της βαθυρριζούσας αγάπης για τα κατοικίδια ζώα (3). Αποτέλεσμα αυτής της αντίθεσης ήταν η ίδρυση οργανισμών όπως η Victoria Street Society for the Protection of Animals Liable to Vivisection το 1875. Επιπλέον, η βασίλισσα Βικτώρια εξέφρασε την αντίθεσή της σε αυτές τις πρακτικές, γεγονός που συνέβαλε στην κατάρτιση του Νόμου για την Προστασία των Ζώων από τη Σκληρότητα του 1876 στη Βρετανία (2,3).

Από το 1970 έως τις αρχές του 1990 εκτιμάται πως η εργαστηριακή χρήση των ζώων μειώθηκε κατά περίπου 50% από την κορύφωσή της στις αρχές τις δεκαετίας του '70 (4). Ο 20^{ος} αιώνας χαρακτηρίζεται από αμέτρητα επιτεύγματα στον τομέα της υγείας, με την έρευνα σε ζώα να συμβάλλει σημαντικά σε πολλές από αυτές τις ανακαλύψεις (1). Από τα 103 Νόμπελ φυσιολογίας ή ιατρικής που απονεμήθηκαν από το 1901, σε 83 από αυτά βραβεύτηκαν έργα που πραγματοποιήθηκαν σε μη-ανθρώπινα σπονδυλωτά, ενώ σε άλλες τέσσερις περιπτώσεις η έρευνα βασίστηκε κυρίως σε

αποτελέσματα που προέκυψαν από πειράματα σε σπονδυλωτά (1). Τέλος, κατά τον 20ο και 21ο αιώνα παρατηρείται μια μετατόπιση της επιστημονικής έρευνας από τα πλέον διαδεδομένα ζώα που χρησιμοποιούνταν σε πειράματα (σκύλοι, γάτες, μη-ανθρώπινοι πρωτεύειδες κ.λπ.) προς μικρότερα είδη, όπως ποντίκια, αρουραίοι και ψάρια, τα οποία δεν προκαλούν τόσο έντονες αντιδράσεις στο κοινό (8).

Είναι λοιπόν εμφανές πως οι πρωταρχικές κατευθυντήριες δυνάμεις πίσω από τη χρήση ζώων στα προγενέστερα επιστημονικά πειράματα πηγάζουν κυρίως από την ανάγκη κατανόησης των θεμελιωδών βιολογικών μηχανισμών που ρυθμίζουν τη ζωή, καθώς και της ανθρώπινης φυσιολογίας. Τα ζώα υπηρετούσαν ως πρακτικά μοντέλα, στα οποία οι επιστήμονες θα μπορούσαν να εφαρμόσουν τις τεχνικές τους, παρακάμπτοντας τους ηθικούς περιορισμούς που θα συνεπαγόταν η εφαρμογή τους στον άνθρωπο. Ωστόσο, καθώς περνούσαν οι αιώνες, τόσο η μεθοδολογία όσο και οι προθέσεις πίσω από τις δοκιμές σε ζώα υπέστησαν εμφανείς αλλαγές. Από την αρχική αναζήτηση ατομικής γνώσης, η επιστημονική προσέγγιση μετασχηματίστηκε προς την κατεύθυνση ανάπτυξης θεραπευτικών μεθόδων, φαρμακευτικών προϊόντων και πρωτοποριακών τεχνικών για το καλό της ανθρωπότητας. Παράλληλα, η αυξανόμενη ευαισθητοποίηση του κοινού στα δικαιώματα των ζώων οδήγησε στην επισήμανση της ανάγκης για πιο ανθρωποκεντρικές μεθοδολογίες και στην αναζήτηση εναλλακτικών προσεγγίσεων.



Εικόνα 2: Διάγραμμα τάσης παγκόσμιου ενδιαφέροντος της φράσης "Animal testing", οι κορυφαίες πέντε χώρες όπου η φράση αναζητήθηκε συχνότερα και η εξέλιξη της δημοτικότητας του όρου με την πάροδο του χρόνου. Πηγή: Google Trends

1.2 Η ανάγκη για ρύθμιση: Το ιστορικό της απαγόρευσης χρήσης εργαστηριακών ζώων

Η ιστορία της επιστημονικής έρευνας συνοδεύεται από μια διαρκή προσπάθεια ισορροπίας μεταξύ προόδου και ηθικής. Καθώς η κοινωνία εξελίσσεται και οι επιστημονικές μέθοδοι προχωρούν, η ανάγκη για ισχυρές νομοθετικές ρυθμίσεις που προστατεύουν τα εργαστηριακά ζώα γίνεται επιτακτική. Αυτή η εξέλιξη έχει οδηγήσει στη θέσπιση μιας σειράς σημαντικών νόμων και κανονισμών που στοχεύουν στη διασφάλιση της ευημερίας των ζώων και στην εφαρμογή αυστηρότερων κριτηρίων για τη χρήση τους σε ερευνητικές δραστηριότητες. Οι νόμοι αυτοί αντανακλούν μια σημαντική μεταβολή στην προσέγγιση της επιστημονικής κοινότητας προς την εργαστηριακή ζωή, υπογραμμίζοντας τη σημασία της ηθικής διάστασης στην επιστημονική έρευνα.

Η ανάπτυξη της νομοθεσίας

Η πορεία προς τη νομοθεσία προστασίας των ζώων ξεκίνησε στις αρχές του 19ου αιώνα, σηματοδοτώντας μια σημαντική μεταβολή στις κοινωνικές και ηθικές αντιλήψεις (9). Ιστορικό σημείο αναφοράς στην εξέλιξη της νομοθεσίας αποτελεί ο νόμος για τη σκληρή μεταχείριση των βοοειδών του **1822**, γνωστός και ως «**Martin's Act**», που ονομάστηκε έτσι από τον υπέρμαχο των δικαιωμάτων των ζώων Richard Martin (9,10). Υιοθετήθηκε από το Κοινοβούλιο του Ηνωμένου Βασιλείου με τον πλήρη τίτλο "An Act to prevent the cruel and improper treatment of cattle" και αποτελεί το πρώτο γνωστό νομοθετικό μέτρο για την καλή διαβίωση των ζώων σε παγκόσμιο επίπεδο (10). Ο νόμος του Μάρτιν αποτέλεσε εφαλτήριο και μια πρωτοποριακή ενέργεια για την εποχή του (10).

Παρά την πρωτοποριακή αυτή κίνηση, η ρύθμιση των πειραμάτων σε ζώα παρέμεινε αρκετά χαλαρή μέχρι τα τέλη του 19ου αιώνα, όπου η συνεχής ανάγκη για προστασία και η εξέλιξη των κοινωνικών αξιών οδήγησαν σε περαιτέρω ανάπτυξη της νομοθεσίας (9).

Ο πρώτος νόμος που θεσπίστηκε για την προστασία των ζώων σε εργαστηριακές δοκιμές και την κακοποίησή τους ήταν το «**Cruelty to Animals Act 1876**» στο Ηνωμένο Βασίλειο (9,10). Ο νόμος αυτός έθεσε τις βάσεις για τη ρύθμιση των πειραμάτων και ήταν ο πρώτος που παρείχε κανονισμούς για τη χρήση ζώων στην

επιστημονική έρευνα, θέτοντας ως στόχο τη μείωση της άσκοπης ζωικής κακοποίησης (9,10). Συγκεκριμένα, ο νόμος του 1876 θέσπισε ελέγχους για τα πειράματα που δημιουργούν πόνο (painful experiments) και δημιούργησε ένα νομικό πλαίσιο για την προστασία των ζώων κατά τη διενέργεια τέτοιων πειραμάτων (9). Αυτή η νομοθεσία αντικατόπτριζε μια αυξανόμενη κοινωνική ευαισθησία για την ευζωία των ζώων και την ανάγκη ελαχιστοποίησης του πόνου και της ταλαιπωρίας τους στην επιστημονική έρευνα.

Ο 20^{ος} αιώνας χαρακτηρίζεται από την ενίσχυση της προστασίας των ζώων με τη θέσπιση πιο αυστηρών νόμων και κανονισμών σε παγκόσμιο επίπεδο, ιδίως μετά το Β' Παγκόσμιο Πόλεμο (9). Χώρες όπως η Γερμανία με το Reichstierschutzgesetz το **1933** και η Αυστρία με το διάταγμα για την ζωτομία (vivisection) το **1885** ήταν μερικές από τις πρώτες που υιοθέτησαν εθνικές νομοθεσίες (9).

Σε αντίθεση με το Ηνωμένο Βασίλειο το κίνημα ενάντια στην ζωτομία στις Ηνωμένες Πολιτείες δεν κατάφερε αρχικά να επιτύχει την έκδοση νόμου λόγω της ισχυρής αντίστασης του ιατρικού κατεστημένου σε οποιαδήποτε μορφή ρύθμισης ή περιορισμού της ζωτομίας (11). Ωστόσο, το **1966**, οι ΗΠΑ εισήγαγαν τον πρώτο νόμο που ρύθμιζε τη χρήση ζώων για ιατρική χρήση, με τίτλο «**Laboratory Animal Welfare Act**», ο οποίος αργότερα έγινε γνωστός ως «**Animal Welfare Act**» (10,11). Αυτός ο νόμος επέβαλε πρότυπα για τη φροντίδα και χρήση των ζώων σε εργαστήρια, πειραματόζωα και άλλες συνθήκες (10).

Η νομοθεσία του 20ού αιώνα αντανάκλασε την επιδίωξη ενός ισορροπημένου πλαισίου μεταξύ της ανάγκης για επιστημονική έρευνα και της προστασίας των ζώων, εστιάζοντας στην εφαρμογή των αρχών των "3Rs" (Replacement, Reduction and Refinement) – Αντικατάσταση, Μείωση και Βελτίωση (9). Αυτές οι αρχές (Ενότητα 1.3) υποστηρίζουν την αντικατάσταση των πειραμάτων σε ζώα με εναλλακτικές μεθόδους, τη μείωση του αριθμού των ζώων που χρησιμοποιούνται και τη βελτίωση των τεχνικών πειραμάτων για να ελαχιστοποιηθεί ο πόνος και η ταλαιπωρία των ζώων (9).

Τον 21^ο αιώνα, η νομοθεσία προστασίας των ζώων συνεχίζει να εξελίσσεται και αντανάκλα τις αυξημένες ηθικές ανησυχίες και επιστημονικές προκλήσεις. Η έμφαση έχει μετατοπιστεί από την απλή ρύθμιση της χρήσης ζώων σε πειράματα προς την

ενθάρρυνση της ανάπτυξης και της υιοθέτησης εναλλακτικών μεθόδων, όπως είναι οι *in vitro* δοκιμές και η χρήση τεχνολογικών προσομοιώσεων. Το **1986** η ΕΕ με την **Οδηγία 86/609/ΕΟΚ** «για την προσέγγιση των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων των κρατών μελών σχετικά με την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς και άλλους επιστημονικούς σκοπούς» καθιέρωσε ένα σύγχρονο πλαίσιο για τη χρήση ζώων στην επιστημονική έρευνα (9). Αυτή η οδηγία αν και πέτυχε σε μεγάλο βαθμό τη βελτίωση της ευημερίας των ζώων, είχε αρκετούς περιορισμούς, οδηγώντας την Ευρωπαϊκή Επιτροπή στην αντικατάστασή της από ένα πιο ολοκληρωμένο νομοθετικό πλαίσιο **την Οδηγία 2010/63/ΕΕ** «περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς». Η νέα αυτή οδηγία εστιάζει στην εναρμόνιση των κανονισμών σε όλα τα κράτη-μέλη της ΕΕ, στοχεύοντας στη βελτίωση της ευημερίας των ζώων κατά τη διάρκεια των πειραμάτων και στην προώθηση των αρχών των "3Rs" (12). Η Οδηγία καθορίζει σαφείς κανόνες για την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται σε επιστημονικές έρευνες, μελέτες, διδασκαλία και δοκιμές, εστιάζοντας στην αναγκαιότητα αναισθησίας και αναλγησίας στα ζώα κατά τη διαδικασία των πειραμάτων και τον περιορισμό της χρήσης ζώων σε πειράματα (12). Ακόμη, ενθαρρύνει την ανάπτυξη και την υιοθέτηση εναλλακτικών μεθόδων στην επιστημονική έρευνα, με στόχο τη μείωση του αριθμού των ζώων που χρησιμοποιούνται και την αντικατάσταση των ζωικών πειραμάτων όπου είναι δυνατόν (12).

1.3 3Rs – Replacement, Reduction & Refinement

Η συζήτηση γύρω από τη χρήση ζώων στην επιστημονική έρευνα δεν είναι πλέον απλώς ένα θέμα τεχνικής ή επιστημονικής φύσεως, αλλά συνδέεται άρρηκτα με ηθικές αρχές και προτεραιότητες. Σε αυτό το πλαίσιο, οι αρχές των 3Rs (Replacement, Reduction, Refinement – Αντικατάσταση, Μείωση και Βελτίωση) έχουν κερδίσει σημαντική αναγνώριση και αποδοχή, αναδεικνύοντας την ανάγκη για ανθρωποκεντρικές και ηθικά υπεύθυνες πρακτικές στην επιστημονική έρευνα. Η εφαρμογή τους αντανακλά μια στροφή προς μια πιο συνετή και ευαίσθητη χρήση των ζώων στα εργαστήρια, στοχεύοντας στην ελαχιστοποίηση του πόνου και του στρες που βιώνουν, ενώ ταυτόχρονα διαφυλάσσει την ακεραιότητα και την ποιότητα της επιστημονικής έρευνας.

Η αρχή των 3Rs, η οποία θεσπίστηκε από τους βρετανούς επιστήμονες William Russell και Rex Burch στην πρωτοποριακή τους δημοσίευση το 1959 με τίτλο "The Principles of Humane Experimental Technique", αντιπροσωπεύει τη Μείωση, την Αντικατάσταση και την Βελτίωση στο πλαίσιο της χρήσης ζώων για επιστημονική έρευνα (13–16). Αρχικά εισήχθη ως μια μορφή επαγγελματικής αυτορρύθμισης, αποτέλεσε απάντηση στην αυξανόμενη ποσότητα της έρευνας με ζώα και τα ζητήματα που σχετίζονται με τη μη ηθική μεταχείρισή τους, στοχεύοντας στη βελτίωση τόσο της ευζωίας των ζώων όσο και της ποιότητας της επιστημονικής έρευνας (13,16). Από την αρχική της θεμελίωση, η αρχή 3R έχει εξελιχθεί παράλληλα με τις τεχνολογικές προόδους, αντανακλώντας αλλαγές στην επιστημονική μεθοδολογία και την ηθική σκέψη (15,16).

Κατά τη δεκαετία του 1980, οι αρχές των 3R είχαν γίνει αναπόσπαστο μέρος διαφόρων νομικών κανονισμών και είχαν συμπεριληφθεί σε επίσημες δηλώσεις καλής πρακτικής σε πολλά ευρωπαϊκά και μη ευρωπαϊκά πανεπιστήμια και ερευνητικά ιδρύματα (16). Στην Ευρώπη η αρχή των 3R αναπτύχθηκε περαιτέρω στην ενημερωμένη Οδηγία 2010/63/EE από το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο και το Συμβούλιο της 22ας Σεπτεμβρίου 2010. Αυτή η οδηγία, η οποία εστίαζε ιδιαίτερα στην προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς, απαιτούσε από όλα τα κράτη μέλη να ενσωματώσουν αυτές τις αρχές στην εθνική τους νομοθεσία (13).

Τα βασικά «συστατικά» της αρχής των 3R είναι η Βελτίωση, η Αντικατάσταση και η Μείωση (13,14). η Μείωση επικεντρώνεται στον περιορισμό του αριθμού των ζώων που χρησιμοποιούνται σε πειράματα, βελτιστοποιώντας τον σχεδιασμό των πειραμάτων και χρησιμοποιώντας αποτελέσματα από προηγούμενες μελέτες. Αυτή η προσέγγιση εξασφαλίζει την επιστημονική εγκυρότητα χρησιμοποιώντας λιγότερα ζώα (13,15,16). Από την άλλη πλευρά, η Αντικατάσταση ενθαρρύνει τη χρήση εναλλακτικών μεθόδων σε σχέση με τα ζωικά μοντέλα, περιλαμβάνοντας αρχικά μη-αισθαντικά υλικά και λιγότερο περίπλοκους οργανισμούς. Με τον καιρό, αυτή η έννοια εξελίχθηκε ώστε να περιλαμβάνει τόσο τη μερική όσο και την πλήρη αντικατάσταση, με την τελευταία να εξαλείφει πλήρως τη χρήση ζώων (13,16). Τέλος, η βελτίωση των συνθηκών διαβίωσης και της μεταχείρισης των πειραματόζωων για να ελαχιστοποιηθεί η δυσφορία τους και να βελτιωθεί η ευζωία τους (13,15,16).

Οι αρχές των 3Rs δεν έχουν παραμείνει στατικές· οι τεχνολογικές πρόοδοι στην επιστήμη συνεχώς επηρεάζουν τον τρόπο εφαρμογής τους. Για παράδειγμα, οι εξελίξεις στις στρατηγικές καλλιέργειας κυττάρων και την γενετική μηχανική, όπως το CRISPR-Cas9, έχουν διευρύνει το πεδίο των στρατηγικών μερικής και πλήρους αντικατάστασης (15,16).

Οι αρχές, που διατυπώθηκαν από τους Russell και Burch πάνω από 60 χρόνια πριν, συνεχίζουν να αποτελούν ένα πολύτιμο εργαλείο στη διασφάλιση τόσο της ευζωίας των ζώων όσο και της ποιότητας των δεδομένων που συλλέγονται στα εργαστήρια (13).




1.4 Ζώα Εργαστηρίου




Ζώα εργαστηρίου ονομάζονται τα ειδικά εκτρεφόμενα ζώα για την βιοϊατρική έρευνα (17). Για να είναι κατάλληλα για τέτοιες έρευνες, αυτά τα ζώα πρέπει να πληρούν ορισμένες προδιαγραφές (17):



- **Γενετικός Έλεγχος:** Θα πρέπει να προέρχονται από σαφής πηγές, εκτρεφόμενα σε περιβάλλοντα όπου οι συνθήκες και η διαδικασία αναπαραγωγής είναι αυστηρά ελεγχόμενες. Αυτό εξασφαλίζει συνέπεια και αξιοπιστία στα δεδομένα που προκύπτουν από την έρευνα.
- **Μικροβιακός Έλεγχος:** Θα πρέπει να διασφαλίζεται η απουσία μικροοργανισμών, ιών ή παρασίτων που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα των ερευνών. Αυτό σημαίνει αυστηρούς ελέγχους υγιεινής και καραντίνας σε περιπτώσεις ύποπτων λοιμώξεων.
- **Εφαρμογή στην Έρευνα:** Ο πρωταρχικός στόχος για τη χρήση των ζώων εργαστηρίου είναι η συμβολή τους σε επιστημονικές μελέτες. Αυτό περιλαμβάνει την αξιοποίηση των μοναδικών ιδιοτήτων τους σε ποικίλες μορφές έρευνας, από τη βασική βιολογία μέχρι την ανάπτυξη νέων θεραπειών και φαρμάκων.



Μέσω αυτών των προδιαγραφών, τα ζώα εργαστηρίου παρέχουν ένα ακριβές και ελεγχόμενο μοντέλο για την εξερεύνηση βιολογικών διεργασιών και τη δοκιμή νέων θεραπειών, συμβάλλοντας έτσι στην πρόοδο της ιατρικής επιστήμης (17).




Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται κατηγορίες εργαστηριακών ζώων και αναλύονται ορισμένα χαρακτηριστικά τους (18).



Κατηγορία	Γένος	Είδος	Περιγραφή	Περιορισμοί ως Πειραματικά Μοντέλα
<p>Ποντίκι</p> 	Mus, Peromyscus	musculus, famulus, domesticus, spretus, fragalicauda, macedonicus	Έχουν σώμα μήκους 6-9 cm και ουρά 6-10 cm, βάρους 12-30 gr. Αναπαράγονται καθ' όλη τη διάρκεια του έτους με εγκυμοσύνη 19-21 ημερών και το μέσο όριο ζωής τους φτάνει τα 2 έτη.	Τα ποντίκια, ως εργαστηριακά μοντέλα, έχουν περιορισμούς στην μελέτη ανθρώπινων ασθενειών λόγω του μικρού τους μεγέθους και των διαφορών στην αντίδραση σε φαρμακευτικές θεραπείες και την ανάπτυξη νόσων όπως ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις, σε σχέση με τον άνθρωπο.
<p>Επίμυς (Αρουραίος)</p> 	Rattus	Novergicus, rattus, xanthurus, osgoodi	Έχουν μήκος σώματος 12-14 εκατοστά, μήκος ουράς 12-15 εκατοστά και βάρος 300-500 γραμμάρια για τα αρσενικά, ενώ τα θηλυκά ζυγίζουν 250-350 γραμμάρια. Αναπαράγονται όλο το χρόνο, έχουν εγκυμοσύνη διάρκειας 21-22 ημερών και ζουν κατά μέσο όρο 2-4 χρόνια.	Οι αρουραίοι, στην έρευνα για ανθρώπινες νόσους, έχουν περιορισμούς όπως η αδυναμία αξιολόγησης αντιεμετικών φαρμάκων, διαφορές στο σύστημα πήξης του αίματος και τις δερματικές λειτουργίες σε σύγκριση με τον άνθρωπο, και περιορισμένη χρησιμότητα σε μελέτες για διαβήτη και επισκευή χόνδρων.
<p>Ινδικό Χοιρίδιο</p> 	Cavia	Porcellus, aperea, fulgida, tschudii, magna	Έχουν μήκος σώματος 20-40 εκατοστά και τα αρσενικά ζυγίζουν 500-1500 γραμμάρια. Αναπαράγονται όλο το χρόνο, με εγκυμοσύνη 59-72 ημερών και γεννούν 3-6 μικρά. Φτάνουν στη σεξουαλική ωριμότητα σε 3-5 εβδομάδες και έχουν μέσο όριο ζωής 4-5 χρόνια.	Το ινδικό χοιρίδιο, παρά την εκτεταμένη χρήση του σε έρευνες, έχει περιορισμούς ως εργαστηριακό ζώο. Ο περιορισμένος αριθμός εκτροφών και γενετικών στελεχών μειώνει τη γενετική διαφοροποίηση, ενώ η ευαισθησία του σε ορισμένες λοιμώξεις και η διαφορετική του αντίδραση σε φάρμακα και αλλεργιογόνα μπορεί να περιορίζει τη χρήση του σε συγκεκριμένους τύπους έρευνας.


Κατηγορία	Γένος	Είδος	Περιγραφή	Περιορισμοί ως Πειραματικά Μοντέλα
Χρυσόμαλος κρικητός (Χάμστερ) 	Mesocricetus, Cricetulus	Auratus, brandti, newtoni, griseus, barabensis, longicaudatus	Έχει μήκος 15-20 εκ. και βάρος 100-400 γρ., αναπαράγεται όλο το χρόνο με εγκυμοσύνη 2-3 εβδομάδων. Γεννά κατά μέσο όρο 5-6 μικρά, ωριμάζει σεξουαλικά σε 6 εβδομάδες και ζει 1.5-3 χρόνια.	Αν και παρέχουν μοναδικά οφέλη στην ερευνητική χρήση, αυτά τα ζώα έχουν περιορισμούς λόγω της διαφορετικής φυσιολογίας τους και της αλληλεπίδρασης με ανθρώπινες κυτταροκίνες. Η απόκρισή τους σε ιούς και μολυσματικές νόσους μπορεί να μην αποτελεί πάντα ακριβή αντανάκλαση της ανθρώπινης παθοφυσιολογίας.
Γεβρίλος Μογγολίας 	Meriones	Meriones unguiculatus	Έχει μήκος σώματος 10-15 cm και ίσο μήκος ουράς. Το μέσο βάρος του ενήλικα είναι περίπου 50-100 gr. Φτάνει στη σεξουαλική ωριμότητα σε 12 εβδομάδες και η εγκυμοσύνη διαρκεί 21-26 ημέρες, με τη γέννα να κυμαίνεται από 1 έως 8 μικρά. Ο μέσος όρος ζωής τους είναι 2-5 χρόνια.	Τα gerbils είναι χρήσιμα στην έρευνα ακοής, αλλά παρουσιάζουν περιορισμούς σε άλλες μελέτες λόγω της ευαισθησίας τους σε επιληψία και λοιμώξεις, καθώς και της διαφορετικής αντίδρασης σε φαρμακευτικές ουσίες, περιορίζοντας την καταλληλότητά τους ως μοντέλα για κάποιες ανθρώπινες νόσους.
Κόνικλος 		Oryctolagus cuniculus	Ζυγίζουν κατά μέσο όρο 4-5 kg, με τα θηλυκά λίγο βαρύτερα, φτάνουν στη σεξουαλική ωριμότητα σε 8-12 εβδομάδες, και έχουν εγκυμοσύνη 28-35 ημερών με μέση γέννα 8 μικρών και μέσο όριο ζωής 1-2 χρόνια.	Ενώ είναι δημοφιλές εργαστηριακό μοντέλο, έχει περιορισμούς στη μελέτη ανθρώπινων νόσων. Συγκεκριμένα, διαφορές στην εκφραση ενζύμων και αντίδραση σε φαρμακευτικές ουσίες, η έλλειψη αδρενεργικών αγγειοδιασταλτικών νεύρων και κέντρου εμέτου, καθώς και η μη αντιπροσωπευτική δομή της ωχράς κηλίδας τους, περιορίζουν την εφαρμογή τους σε ορισμένες ανθρώπινες παθήσεις.

Κατηγορία	Γένος	Είδος	Περιγραφή	Περιορισμοί ως Πειραματικά Μοντέλα
<p>Γάτα</p> 	Felis	Felis catus	Έχουν μέσο μήκος σώματος 46-51 εκατοστά, ουρά περίπου 30-35 εκατοστά, και βάρος 3,6-4,5 κιλά. Με αναπαραγωγική περίοδο κυρίως την άνοιξη και το καλοκαίρι, εγκυμοσύνη 64-67 ημερών και μέσο όρο ζωής 12-15 χρόνια, αποτελούν σημαντικό μοντέλο για επιστημονικές μελέτες.	Είναι χρήσιμες σε έρευνες για νευρολογικές διαταραχές και μολυσματικές ασθένειες, αλλά παρουσιάζουν διαφορές στην αντίδραση σε φαρμακευτικές αγωγές και στην ανάπτυξη κάποιων νόσων συγκριτικά με τους ανθρώπους. Η αντίδρασή τους στην ισταμίνη και η αδυναμία τους να χρησιμεύσουν ως μοντέλο για τη μελέτη του ανακτητικού αντανακλαστικού είναι παραδείγματα περιορισμών για ορισμένες ανθρώπινες νόσους.
<p>Χοίρος</p> 	Sus-scrofa domestica	Duroc, Landrace, Yorkshire, Large white pig, Mexican hairless pig, Clawn miniature pig	Είναι πολύτιμο λόγω των ανατομικών και βιοχημικών ομοιοτήτων του με τον άνθρωπο, ιδιαίτερα στην καρδιακή κυκλοφορία και τη δομή του παγκρέατος, και χρησιμοποιείται σε μελέτες ανακατασκευαστικής χειρουργικής και επούλωσης τραυμάτων.	Τα γουρούνια αντιμετωπίζουν πρακτικές προκλήσεις ως εργαστηριακά μοντέλα λόγω του μεγάλου μεγέθους τους και του αυξημένου κόστους συντήρησης και σίτισης. Η έλλειψη στεφανιαίας κυκλοφορίας δυσκολεύει τη μελέτη ορισμένων καρδιακών παρεμβάσεων. Επιπλέον, διαφορές στη φυσιολογία και στην αντίδραση σε φάρμακα περιορίζουν την εφαρμογή των ευρημάτων τους στον άνθρωπο.

Κατηγορία	Γένος	Είδος	Περιγραφή	Περιορισμοί ως Πειραματικά Μοντέλα
Σκύλος 	Canis familiaris	Mongrel, Beagles	Είναι σημαντικό για την έρευνα, ειδικά στις καρδιαγγειακές αντιδράσεις σε φάρμακα, την κατανόηση του διαβήτη μέσω της μελέτης του παγκρέατος και της ινσουλίνης, και στην έρευνα των πεπτικών διεργασιών και της γαστρικής έκκρισης. Έχει την ικανότητα να αναπτύξει υπέρταση, παρόμοια με τους ανθρώπους.	Παρόλο που είναι χρήσιμα σε καρδιαγγειακές και διαβητολογικές μελέτες, μπορεί να μην αποτυπώνουν πλήρως τις ανθρώπινες αντιδράσεις σε φαρμακευτικές αγωγές ή την ανάπτυξη ορισμένων νόσων. Διαφορές στις καρδιαγγειακές αντιδράσεις και στη φυσιολογία του πεπτικού συστήματος μπορεί να περιορίζουν την εφαρμογή των ευρημάτων τους στην ανθρώπινη ιατρική.
Άλογο 	Equus caballus		Από το 2009, μετά την αποκωδικοποίηση του γονιδιώματός του, αυτό το μοντέλο είναι σημαντικό στη μελέτη πάνω από 90 κληρονομικών ασθενειών με ανθρώπινες ομοιότητες, της αντίστασης στην ινσουλίνη, του "Μεταβολικού Συνδρόμου του Ανθρώπου", της παραγωγής αντιοφικών ορών και της μελέτης συμπεριφορικών μοτίβων στην κατάθλιψη.	Αντιμετωπίζουν περιορισμούς ως εργαστηριακά μοντέλα για ανθρώπινες νόσους λόγω του μεγάλου μεγέθους τους που καθιστά δύσκολη τη σίτιση και στέγαση, ενώ το υψηλό κόστος ανά ζώο περιορίζει την παραγωγή δεδομένων από μεγάλα δείγματα. Επιπρόσθετα, η αδυναμία τους να εμετίσουν κανονικά περιορίζει την αξιολόγηση αντιεμετικών φαρμάκων σε αυτά.

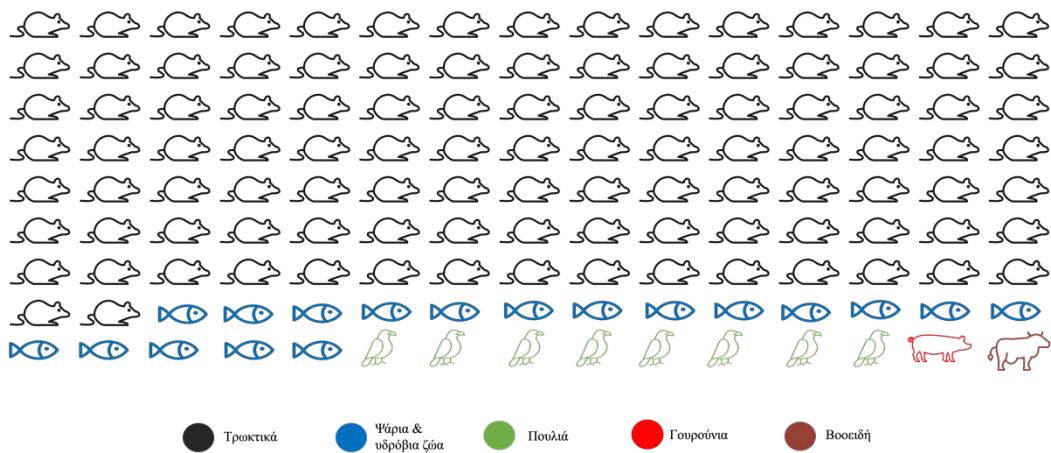
Κατηγορία	Γένος	Είδος	Περιγραφή	Περιορισμοί ως Πειραματικά Μοντέλα
<p>Πρόβατο</p> 	Ovis aries		<p>Το συγκεκριμένο εργαστηριακό μοντέλο είναι σημαντικό λόγω της παρόμοιας δομής και λειτουργίας του αναπνευστικού του συστήματος με των ανθρώπων, χρησιμοποιούμενο στη μελέτη του άσθματος και άλλων πνευμονικών νοσημάτων.</p>	<p>Παρά τη χρήση τους σε αναπνευστικές μελέτες, έχουν περιορισμούς λόγω διαφορών στην παθοφυσιολογία και αντίδραση σε θεραπείες σε σχέση με τους ανθρώπους. Η μακρά διάρκεια ζωής τους και οι ειδικές απαιτήσεις στέγασης και φροντίδας αποτελούν πρόσθετες προκλήσεις στην επιστημονική τους χρήση.</p>
<p>Όρνιθα</p> 	Gallus	Gallus domesticus, Gallus gallus	<p>Το κοτόπουλο είναι πολύτιμο εργαστηριακό μοντέλο, ιδανικό για in vitro μελέτες λόγω της εύκολης πρόσβασης στους ιστούς του. Το έμβρυό του και η αμνιακή μεμβράνη έχουν βοηθήσει στην ανάπτυξη εμβολίων για κίτρινο πυρετό, ανεμοβλογιά, πολιομυελίτιδα, λύσσα και ευλογιά.</p>	<p>Παρόλη την αξία του στην εμβολιαστική έρευνα, έχει περιορισμούς λόγω των διαφορών του με την ανθρώπινη φυσιολογία και την περιορισμένη ικανότητα γενίκευσης των ευρημάτων σε ανθρώπινες νόσους. Επομένως, οι ανακαλύψεις σε αυτό μπορεί να μην είναι πάντα εφαρμόσιμες ή συγκρίσιμες με τις ανθρώπινες παθήσεις.</p>
<p>Περιστέρι</p> 	Columbidae	Columbia livia	<p>Το περιστέρι είναι ένα σημαντικό εργαστηριακό μοντέλο, ιδιαίτερα χρήσιμο στη μελέτη αντιεμετικών φαρμάκων μέσω της κίνησης του ράμφους. Χρησιμοποιείται επίσης για έρευνα σε μάθηση, μνήμη και αρτηριοσκλήρωση, βοηθώντας στην κατανόηση αυτών των φαινομένων.</p>	<p>Τα περιστέρια έχουν περιορισμούς στην αναπαράσταση ανθρώπινων νόσων λόγω της ειδικής τους φυσιολογίας, ειδικά στις εμετικές αντιδράσεις, και των σημαντικών ανατομικών και φυσιολογικών διαφορών από τους ανθρώπους, περιορίζοντας την άμεση εφαρμογή των ευρημάτων τους στην ανθρώπινη ιατρική.</p>

Κατηγορία	Γένος	Είδος	Περιγραφή	Περιορισμοί ως Πειραματικά Μοντέλα
<p>Βάτραχος</p> 	Anura	Xenopus laevis, Rana tigrina, Rana hexadactyla, Bufo bufo	Οι βάτραχοι διακρίνονται για τα μακριά πόδια τους, το λεπτό δέρμα και την ικανότητά τους να αναπνέουν μέσω του δέρματος, το οποίο είναι υψηλά διαπερατό στο οξυγόνο. Γεννούν πολύ μεγάλα αυγά στο νερό και χρησιμοποιούν στη μελέτη της οργανογένεσης και της μοριακής γενετικής.	Οι βάτραχοι έχουν περιορισμούς στην έρευνα ανθρώπινων νόσων λόγω της τριθάλαμης καρδιάς τους, της διαφορετικής χρήσης αδρεναλίνης και νορεπινεφρίνης στα νευροδιαβιβαστικά συστήματα, και της αντίδρασής τους σε φάρμακα και τοξίνες, που διαφέρει από τους ανθρώπους.
<p>Ζεβρόψαρο</p> 		Danio rerio	Είναι ένα γλυκού νερού ψάρι με εντυπωσιακές μπλε οριζόντιες ρίγες στα πλευρά του σώματος. Περίπου το 70% του ανθρώπινου γονιδιώματος αντικατοπτρίζεται στο γονιδίωμα του ζεβρόψαρου. Η αναπαραγωγή του διαρκεί μόλις 10 ημέρες, συντομότερη από των τρωκτικών, ωφέλιμο σε μελέτες αναπαραγωγής. Η ανάπτυξη του από το γονιμοποιημένο αυγό έως το νεαρό ψάρι μπορεί να παρατηρηθεί μικροσκοπικά.	Διαφορετική φυσιολογία και ανατομία του από τους ανθρώπους, καθώς και την περιορισμένη ικανότητα αναπαραστάσης ορισμένων ανθρώπινων νόσων. Ενώ η δημιουργία τρανσγενικών ζεβρόψαρων είναι σχετικά εύκολη, οι διαφορές στους μηχανισμούς διάταξης των γονιδίων μπορεί να επηρεάσουν την εγκυρότητα των μοντέλων για την ανθρώπινη νόσο.

Κατηγορία	Γένος	Είδος	Περιγραφή	Περιορισμοί ως Πειραματικά Μοντέλα
<p>Πίθηκοι & άλλα πρωτεύοντα πλην του ανθρώπου</p> 	Rhesus	Macaca mulatta	<p>Οι πίθηκοι χρησιμοποιούνται όταν τα αποτελέσματα από τα τρωκτικά δεν μεταφράζονται αποτελεσματικά στους ανθρώπους, προσφέροντας έτσι πιο κοντινές ομοιότητες στις ανθρώπινες αντιδράσεις. Είναι ιδανικοί για ψυχοφαρμακολογία λόγω της προηγμένης νευρολογικής ανάπτυξης και της εγκεφαλικής δομής παρόμοιας με τους ανθρώπους.</p>	<p>Οι πίθηκοι ως εργαστηριακά μοντέλα αντιμετωπίζουν ηθικές και λειτουργικές προκλήσεις. Η νοητική τους ανάπτυξη προκαλεί ηθικές ανησυχίες, ενώ οι υψηλές δαπάνες συντήρησης και οι ειδικές απαιτήσεις φροντίδας περιορίζουν την ευρεία χρήση τους. Επιπλέον, μπορεί να μην αντικατοπτρίζουν πάντα ακριβώς τις ανθρώπινες παθήσεις.</p>

Πίνακας 1: Τα ζώα που χρησιμοποιούνται πιο συχνά ως ζώα εργαστηρίου. Πηγή: (18)

Από αυτά τα τροφικά αντιπροσωπεύουν το 80% όλων των σπονδυλωτών και τα ποντίκια συγκεκριμένα περισσότερο από το 70% των τροφικών (18).



Στην Ελλάδα για το έτος 2022 Η Ελληνική Κεντρική Αρμόδια Αρχή (Διεύθυνση Προστασίας των Ζώων, Φαρμάκων και Κτηνιατρικών Εφαρμογών του ΥΠΑΑΤ), δημοσίευσε πως χρησιμοποιήθηκαν **37.818** ζώα συνολικά στις αδειοδοτημένες εγκαταστάσεις χρήσης ζώων για επιστημονικούς σκοπούς, εκ των οποίων **22.252** ανήκουν στην κατηγορία των μυών.

Η PETA (People for the Ethical Treatment of Animals), η οποία αποτελεί τη μεγαλύτερη οργάνωση για τα δικαιώματα των ζώων παγκοσμίως, δημοσίευσε ένα άρθρο παρουσιάζοντας 11 σημαντικά στατιστικά στοιχεία σχετικά με τη χρήση ζώων σε εργαστηριακές δοκιμές. Κάποια κύρια σημεία περιλαμβάνουν ότι πάνω από **110 εκατομμύρια** ζώα σκοτώνονται ετησίως σε εργαστήρια στις ΗΠΑ, το **95%** των φαρμάκων που είναι ασφαλή στις δοκιμές σε ζώα αποτυγχάνουν στους ανθρώπους, και το **99%** των ζώων στα εργαστήρια δεν καλύπτονται από τους ομοσπονδιακούς νόμους προστασίας των ζώων. Επιπλέον, το **93%** των πειραματικών φαρμάκων κατά του καρκίνου αποτυγχάνουν στις κλινικές δοκιμές στον άνθρωπο, χημικές ουσίες που προκαλούν καρκίνο στους αρουραίους επηρεάζουν μόνο το **46%** των πειραμάτων σε ποντίκια, και **100** εμβόλια για τον ιό HIV που ήταν επιτυχημένα σε ζώα απέτυχαν στους ανθρώπους (19).

Κεφάλαιο 2 Σκοπός/Aim

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία επιδιώκει να διερευνήσει και να παρουσιάσει μια συγκριτική ανάλυση των καινοτόμων λύσεων στον τομέα της ηθικής επιστήμης σχετικά με τις δοκιμές σε ζώα. Σε μια εποχή όπου οι ηθικές ανησυχίες και οι προκλήσεις των παραδοσιακών ερευνητικών πρακτικών γίνονται όλο και πιο επιτακτικές, η έρευνα αυτή εστιάζει στην ανάδειξη και την ανάλυση εναλλακτικών προσεγγίσεων που προσφέρουν ελπιδοφόρες λύσεις για τη μείωση ή ακόμη και την πλήρη αντικατάσταση των δοκιμών σε ζώα.

Η εργασία προσπαθεί να αναδείξει τον ρόλο των εναλλακτικών μεθόδων, όπως οι δοκιμές *in vitro*, *in silico*, η τεχνολογία *organ-on-a-chip* και το 3D *bioprinting*, στην αναπαραγωγή και μελέτη της ανθρώπινης βιολογίας. Εξετάζει την αποτελεσματικότητα, τις τεχνολογικές απαιτήσεις και τους περιορισμούς αυτών των μεθόδων. Στόχος είναι να προσφέρει μια συγκριτική ανάλυση μεταξύ των παραδοσιακών και των εναλλακτικών μεθόδων δοκιμών, υπογραμμίζοντας την αναγκαιότητα για ελαχιστοποίηση της χρήσης ζώων στην επιστημονική έρευνα.

Επιπρόσθετα, προσπαθεί να αναδείξει τις πρόσφατες καινοτομίες στον τομέα της επιστήμης και της τεχνολογίας που συμβάλλουν στην προώθηση των εναλλακτικών μεθόδων, εξετάζοντας παράλληλα τον αντίκτυπο αυτών των τεχνολογιών στην ηθική και την επιστημονική πρακτική. Η σημασία των αρχών των 3Rs (Replacement, Reduction, Refinement) στην εξέλιξη αυτών των εναλλακτικών μεθόδων αποτελεί έναν κεντρικό άξονα στην παρούσα έρευνα, ενώ δίνεται έμφαση και στην ανάγκη για μια ολιστική και συνεκτική προσέγγιση που ενσωματώνει επιστήμη, τεχνολογία και ηθική.

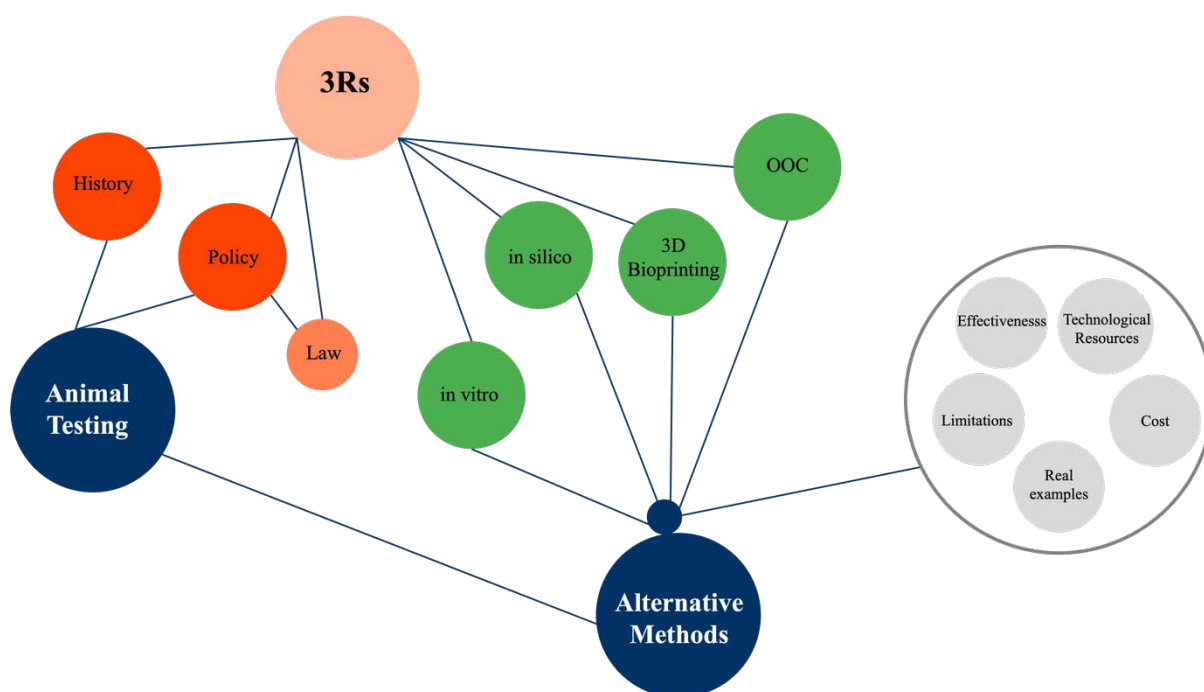
Συνοψίζοντας, ο σκοπός της εργασίας είναι διττός: αφενός να αναδείξει την ανάγκη για μεταστροφή από τις παραδοσιακές μεθόδους δοκιμών σε ζώα προς πιο ανθρωποκεντρικές, ακριβείς και ηθικά αποδεκτές προσεγγίσεις, και αφετέρου να εξετάσει τις επιπτώσεις αυτής της μετάβασης στην επιστημονική κοινότητα και την έρευνα

Κεφάλαιο 3 Μεθοδολογία/Methods

Η επιτυχία και η αξιοπιστία κάθε επιστημονικής έρευνας εξαρτάται από την ακριβή και συστηματική εφαρμογή μιας συνεκτικής μεθοδολογίας. Στην παρούσα μελέτη, ακολουθήθηκε μια σχεδιασμένη διαδικασία συλλογής και ανάλυσης των δεδομένων, με στόχο την εμπειριστατωμένη και αντικειμενική αξιολόγηση των εναλλακτικών μεθόδων δοκιμών σε ζώα. Για τη συγκέντρωση της σχετικής βιβλιογραφίας, χρησιμοποιήθηκαν διάφορες βάσεις δεδομένων και πηγές, όπως αναφέρεται στον Πίνακα 2.

Μορφή	Πηγή
Ακαδημαϊκά Papers	<ul style="list-style-type: none"> - Google Scholar - Science Direct - MDBI - National Library of Medicine - PubMed
Άρθρα	<ul style="list-style-type: none"> - People for the Ethical Treatment of Animals
Reports	<ul style="list-style-type: none"> - Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης & Τροφίμων - Publication Office of the European Union

Πίνακας 2: Βιβλιογραφικές πηγές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανασκόπηση.



Εικόνα 3: Mind map των όρων αναζήτησης. Πηγή: Ιδία επεξεργασία

Στόχος της παρούσας έρευνας είναι να εξετάσει κριτικά τις εναλλακτικές μεθόδους δοκιμών σε σύγκριση με τις παραδοσιακές, με έμφαση στην ελαχιστοποίηση της χρήσης ζώων στην επιστημονική έρευνα. Επιπλέον, θα αναλύσει τις τελευταίες καινοτομίες στον τομέα της επιστήμης και της τεχνολογίας που συνεισφέρουν στην προαγωγή των εναλλακτικών μεθόδων, προσδιορίζοντας ταυτόχρονα τον αντίκτυπό τους στην ηθική και την επιστημονική πρακτική.

Ερευνητικά Ερωτήματα & Υπόθεση Εργασίας

Για την επιτυχή διεξαγωγή αυτής της μελέτης, ορίστηκαν τα ακόλουθα ερευνητικά ερωτήματα και διατυπώθηκε η σχετική υπόθεση εργασίας:

1. Πώς και γιατί αναπτύχθηκαν εναλλακτικές μέθοδοι στις δοκιμές σε ζώα;
2. Ποιες εναλλακτικές μέθοδοι υπάρχουν και ποια η αποτελεσματικότητά τους στη μίμηση της ανθρώπινης βιολογίας;
3. Ποιες είναι οι τεχνολογικές απαιτήσεις και πόροι που απαιτούνται για την εφαρμογή αυτών των μεθόδων;
4. Ποιοι είναι οι περιορισμοί και προκλήσεις αυτών των μεθόδων και πώς μπορούν να ξεπεραστούν;

Οι εναλλακτικές μέθοδοι μπορούν να αποτελέσουν ισχυρά και αποτελεσματικά εργαλεία για την αντικατάσταση των δοκιμών σε ζώα, προσφέροντας παράλληλα ευκρινέστερες και πιο άμεσες ενδείξεις σχετικά με την ανθρώπινη βιολογία.

3.1 Εμφάνιση εναλλακτικών μεθόδων

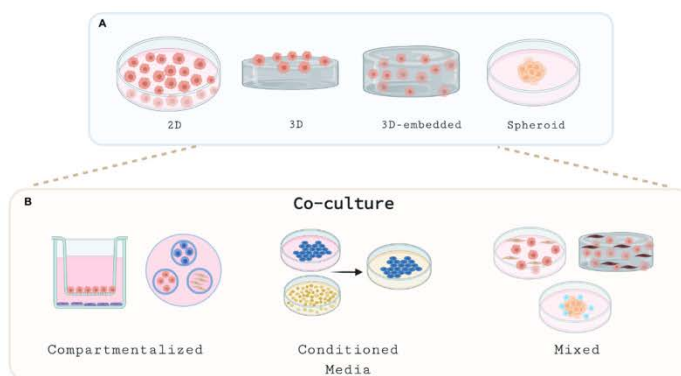
Καθώς η ιστορία της χρήσης των ζώων στην επιστημονική έρευνα αναπτύσσεται, οι ηθικές ανησυχίες και οι προκλήσεις που αυτή παρουσιάζει καθίστανται ολοένα και πιο εμφανείς. Υπάρχουν διάφοροι λόγοι για τους οποίους χρειάζονται εναλλακτικές μέθοδοι στις δοκιμές σε ζώα, συμπεριλαμβανομένων ηθικών, επιστημονικών και οικονομικών λόγων. Η ανάγκη για πιο ανθρωποκεντρικές, ακριβείς και ηθικά αποδεκτές μεθόδους προκύπτει ως επιτακτική. Παρά την αναγνωρισμένη συνεισφορά της ζωικής δοκιμής στην επιστημονική πρόοδο, η κοινωνία και η επιστημονική κοινότητα οδηγούνται προς την αναζήτηση εναλλακτικών λύσεων. Οι εναλλακτικές μέθοδοι, που έχουν κάνει την εμφάνισή τους υπόσχονται καινοτομία και μπορούν να μεταβάλλουν τον τρόπο με τον οποίο η επιστήμη προσεγγίζει την έρευνα.

3.2 In vitro testing και καλλιέργεια κυττάρων

Η φράση "in vitro" προέρχεται από τα λατινικά και σημαίνει "στο γυαλί" (20). Χρησιμοποιείται για να περιγράψει ιατρικές διαδικασίες, δοκιμές και εξετάσεις που διεξάγονται εκτός του ζωντανού οργανισμού (20). Μια μελέτη in vitro λαμβάνει χώρα σε ένα ελεγχόμενο περιβάλλον, όπως ένα εργαστηριακό δοχείο ή τρυβλίο καλλιέργειας Πέτρι, για την αξιολόγηση διαφόρων βιολογικών φαινομένων (20).

Η ιστορία των μεθόδων in vitro ξεκινά από τις αρχές του 20ού αιώνα, όταν οι επιστήμονες άρχισαν να καλλιεργούν ιστούς και κύτταρα έξω από τους οργανισμούς για ερευνητικούς σκοπούς (21). Αυτό αποτέλεσε μια επανάσταση στη βιολογική έρευνα, καθώς επέτρεψε τη λεπτομερή μελέτη των βιολογικών διαδικασιών σε ένα ελεγχόμενο περιβάλλον, αποφεύγοντας την επίδραση από εξωτερικούς παράγοντες και τις πιθανές διαταραχές που μπορεί να επηρεάσουν την ακρίβεια και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων (20,21).

Η δοκιμή in vitro αποτελεί μια απλή επιστημονική μεθοδολογία (20). Οι ερευνητές μπορούν να διεξάγουν πιο λεπτομερείς αναλύσεις και να εξετάζουν τις βιολογικές επιπτώσεις σε έναν μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων in vitro σε σύγκριση με τον αριθμό που



Εικόνα 4: Καλλιέργειες in vitro: A) Κύτταρα σε 2D μονοστρώματα ή 3D υποστρώματα. B) Συν-και πολυ-καλλιέργειες για μελέτη αλληλεπιδράσεων κυττάρων. Πηγή:(62)

θα μπορούσαν να εξετάσουν σε δοκιμές που πραγματοποιούνται σε ζώα ή ανθρώπους, προσδίδοντας τη δυνατότητα επαναληψιμότητας στη μέθοδο (20). Στην πράξη, οι μέθοδοι in vitro περιλαμβάνουν την απομόνωση κυττάρων ή ιστών από ένα ζωντανό οργανισμό και τη διατήρησή τους σε ένα τεχνητό περιβάλλον (21). Αυτά τα κύτταρα ή ιστοί στη συνέχεια εκτίθενται σε διάφορες συνθήκες ή ουσίες, επιτρέποντας στους ερευνητές να παρατηρούν βιολογικές αντιδράσεις και αλληλεπιδράσεις σε πραγματικό χρόνο (21). Αυτή η μέθοδος είναι ζωτικής σημασίας στη βιοϊατρική έρευνα, την

ανάπτυξη φαρμάκων και την τοξικολογία, καθώς προσφέρει μια πιο ηθική και συχνά πιο αποτελεσματική εναλλακτική στις δοκιμές σε ζώα (21).

Μίμηση της Ανθρώπινης Βιολογίας και Μελέτες Περίπτωσης

Οι μέθοδοι *in vitro* αποτελούν ουσιαστικές εργαστηριακές τεχνικές που μιμούνται πτυχές της ανθρώπινης βιολογίας έξω από ένα ζωντανό οργανισμό, κυρίως χρησιμοποιώντας κύτταρα ή ιστούς.

Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα των μεθόδων *in vitro* είναι η ικανότητά τους να χρησιμοποιούν ανθρώπινα κύτταρα, παρέχοντας πολλές φορές πιο ακριβή δεδομένα για την ανθρώπινη υγεία σε σύγκριση με τα ζωικά μοντέλα. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό στην ανάπτυξη φαρμάκων και τις δοκιμές τοξικότητας, όπου τα ανθρώπινα κύτταρα μπορούν να προβλέψουν με μεγαλύτερη ακρίβεια πώς μια ουσία θα επηρεάσει την ανθρώπινη υγεία (22). Για παράδειγμα, στις δοκιμασίες τοξικότητας *in vitro*, χρησιμοποιούνται σειρές ανθρώπινων κυττάρων για να αξιολογήσουν πόσο τοξικές είναι ορισμένες ουσίες. Αυτή η διαδικασία βοηθά να γίνει καλύτερα κατανοητό το πώς θα αντιδράσει το ανθρώπινο σώμα σε αυτές τις ουσίες (22). Τα αποτελέσματα αυτών των δοκιμασιών είναι πιο σχετικά με την ανθρώπινη υγεία, σε σχέση με τις δοκιμές σε ζώα, και παρέχουν άμεσα εφαρμόσιμα δεδομένα για την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα των ουσιών (23).

Επιπλέον, οι μελέτες *in vitro* δίνουν τη δυνατότητα στους ερευνητές να παρεμβαίνουν στις συνθήκες ενός ελεγχόμενου περιβάλλοντος, ρυθμίζοντας συγκεκριμένες μεταβλητές (24). Αυτό σημαίνει ότι μπορούν να αλλάξουν παράγοντες όπως η γονιδιακή έκφραση, η έκθεση σε χημικές ουσίες και η θερμοκρασία, παρακολουθώντας τις επιδράσεις αυτών των αλλαγών στα κύτταρα ή στους ιστούς (24). Τέτοιου είδους λεπτομερής έλεγχος δεν είναι εφικτός σε ζώα (24). Έτσι, οι μέθοδοι *in vitro* αποτελούν ένα εξαιρετικά ισχυρό εργαλείο για την κατανόηση των μηχανισμών των νόσων και την ανάλυση των επιδράσεων των φαρμάκων σε κυτταρικό επίπεδο (24).

Οι μέθοδοι *in vitro* μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μοντελοποίηση σύνθετων ανθρώπινων ιστών και συστημάτων οργάνων (25). Για παράδειγμα, οι τεχνικές καλλιέργειας κυττάρων 3D μπορούν να δημιουργήσουν δομές παρόμοιες με τους ιστούς που μιμούνται καλύτερα την αρχιτεκτονική και τη λειτουργία των ανθρώπινων

οργάνων σε σύγκριση με τις παραδοσιακές καλλιέργειες 2D (25). Αυτή η πρόοδος έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη πιο ακριβών μοντέλων για τη μελέτη των νόσων και τη δοκιμή φαρμάκων (25)

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα χρήσης της μεθόδου *in vitro* ήταν η ανάπτυξη του εμβολίου πολιομυελίτιδας από τον Jonas Salk τη δεκαετία '50. Η ομάδα του Salk πρωτοπόρησε στην καλλιέργεια του ιού της πολιομυελίτιδας σε καλλιεργημένα ανθρώπινα κύτταρα, μια σημαντική πρόοδος σε σύγκριση με τις προηγούμενες μεθόδους που απαιτούσαν ζωντανά ζώα, επιτρέποντας έτσι στον Salk να αναπτύξει ένα εμβόλιο με «νεκρό ιό», αδρανοποιώντας τον ιό της πολιομυελίτιδας με φορμαλδεΐδη. Το εμβόλιο κατάφερε να μειώσει δραματικά τα κρούσματα πολιομυελίτιδας παγκοσμίως, δείχνοντας τη σημαντική επίδραση των μεθόδων *in vitro* στη δημόσια υγεία και την ιατρική έρευνα (26,27).

Περιορισμοί και Προκλήσεις

Οι μέθοδοι *in vitro*, παρά την ισχύ τους, φέρουν και ορισμένους περιορισμούς και προκλήσεις. Ένας κύριος περιορισμός είναι η υπεραπλούστευση των περίπλοκων αλληλεπιδράσεων που συμβαίνουν σε ένα ζωντανό οργανισμό. Συχνά, τα μοντέλα *in vitro* αποτυγχάνουν να αναπαράγουν τις πολύπλοκες κυτταρικές αλληλεπιδράσεις, τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών οργάνων και τις μεταβολικές λειτουργίες που υπάρχουν στο σώμα, πράγμα που μπορεί να οδηγήσει σε μερική ή ανεπαρκή κατανόηση της επίδρασης μιας ουσίας στον άνθρωπο (28). Ακόμη, τα απλούστερα μοντέλα όπως οι μονοστρωματικές καλλιέργειες κυττάρων, συχνά αντιμετωπίζουν δυσκολίες στην ακριβή αναπαράσταση του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος, επηρεάζοντας την κατανόηση ασθενειών και φαρμάκων (29).

Επιπλέον, ανακύπτει το θέμα της γενετικής και φαινοτυπικής διαφοροποίησης (30). Οι σειρές ανθρώπινων κυττάρων που ενσωματώνονται στις μελέτες *in vitro* συχνά δεν αντικατοπτρίζουν την γενετική πολυμορφία που είναι χαρακτηριστική του ευρύτερου πληθυσμού (30). Αυτή η έλλειψη μπορεί να οδηγήσει σε αποτελέσματα που δεν αποτυπώνουν επαρκώς την πιθανή αντίδραση διαφορετικών ατόμων σε κάποιο φάρμακο ή τοξίνη (30).

Η δυνατότητα μεταφοράς και εφαρμογής των αποτελεσμάτων από τις μελέτες *in vitro* σε ολόκληρους οργανισμούς (*in vivo*) αντιπροσωπεύει μία πρόκληση (30). Τα

ευρήματα από τα πειράματα *in vitro* μπορεί να μην είναι απευθείας εφαρμόσιμα σε ολόκληρους οργανισμούς κυρίως λόγω διαφορών στη συγκέντρωση των ουσιών, στη διάρκεια έκθεσης και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες (30).

Τέλος, παρόλο που οι ηθικές ανησυχίες στις μεθόδους *in vitro* είναι λιγότερο εμφανείς σε σύγκριση με τις δοκιμές σε ζώα, εντούτοις υπάρχουν (31). Η χρήση ανθρώπινων κυττάρων και ιστών, ιδίως εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων, στην έρευνα *in vitro*, φέρει ηθικά ζητήματα που απαιτούν προσεκτική σκέψη και ρυθμιστική προσέγγιση (31)

Αυτοί οι περιορισμοί τονίζουν την ανάγκη για μια πολυδιάστατη προσέγγιση στη βιολογική έρευνα, συνδυάζοντας τις μεθόδους *in vitro* με άλλες τεχνικές για να αποκτηθεί μια πιο ολοκληρωμένη κατανόηση των βιολογικών διεργασιών.

Απαιτήσεις Τεχνολογίας και Πόρων

Οι απαιτήσεις σε τεχνολογία και πόρους για την εφαρμογή των μεθόδων *in vitro* είναι ιδιαίτερα υψηλές, λόγω της εξάρτησής τους από προηγμένο εξοπλισμό και ειδικά υλικά, με αποτέλεσμα να είναι συχνά δαπανηρές. Στις τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται στις *in vitro* μελέτες περιλαμβάνονται εξοπλισμοί για την καλλιέργεια κυττάρων, όπως επωαστήρας, θάλαμοι νηματικής ροής, μικροσκόπια και ειδικά διαλύματα, ουσιαστικά για τη διατήρηση και παρατήρηση των καλλιεργειών κυττάρων σε στείρο και ελεγχόμενο περιβάλλον (21). Για παράδειγμα, ένας επωαστήρας υψηλής ποιότητας, απαραίτητος για την καλλιέργεια κυττάρων, μπορεί να κοστίζει αρκετές χιλιάδες ευρώ, εξαρτάται από τη χωρητικότητα και τα ειδικά χαρακτηριστικά του (21).

Επιπλέον, στις *in vitro* μελέτες συχνά απαιτείται η χρήση περίπλοκων αναλυτικών οργάνων, όπως κυτταρόμετρα ροής, φασματοφωτόμετρα και συστήματα ανίχνευσης υψηλής διαπερατότητας (32). Αυτά τα όργανα μπορεί να είναι πολύ ακριβά, με τα προηγμένα κυτταρόμετρα ροής να κοστίζουν πάνω από 100,000 ευρώ και τους ανιχνευτές υψηλής διαπερατότητας συχνά να υπερβαίνουν αυτό το κόστος (32)

Τα αντιδραστήρια και οι κυτταρικές σειρές αποτελούν σημαντικό παράγοντα στο συνολικό κόστος των μεθόδων *in vitro* (33). Οι σειρές ανθρώπινων κυττάρων, ειδικά όταν πρόκειται για ειδικευμένες ή γενετικά τροποποιημένες, είναι συχνά υψηλού κόστους (33). Τα μέσα καλλιέργειας και τα συμπληρώματα που απαιτούνται για τη

συντήρηση τους αποτελούν επιπλέον δαπάνες. Για παράδειγμα, το κόστος για ένα φιαλίδιο ανθρώπινων κυττάρων μπορεί να κυμαίνεται από μερικές εκατοντάδες έως και αρκετές χιλιάδες ευρώ, ανάλογα με τον τύπο και τις τροποποιήσεις των κυττάρων (33).

Τέλος, η διατήρηση αποστειρωμένων συνθηκών και η τήρηση αυστηρών προτύπων στις καλλιέργειες κυττάρων επιβάλλουν σημαντικές επενδύσεις σε υποδομές και υλικά (34). Αυτή η ανάγκη όχι μόνο επιβαρύνει το κόστος, αλλά απαιτεί και υψηλό επίπεδο τεχνικής εμπειρίας και εκπαίδευσης για το εργαστηριακό προσωπικό, συμβάλλοντας επίσης στην αύξηση των λειτουργικών εξόδων (34)

3.3 Silico models

Ο όρος «in silico» προέρχεται από τη λατινική φράση «σε υπολογιστή ή μέσω προσομοίωσης υπολογιστή» και έχει χρησιμοποιηθεί στο πλαίσιο της υπολογιστικής μοντελοποίησης από τις αρχές της δεκαετίας του 1990 (35). Τα μοντέλα «in silico» αναφέρονται σε υπολογιστικά μοντέλα που διερευνούν διάφορες διαδικασίες, περιλαμβανομένων βιολογικών και φαρμακολογικών φαινομένων, μέσω προσομοιώσεων και αναλύσεων με χρήση υπολογιστών (36). Τα μοντέλα αυτά επιτρέπουν στους ερευνητές να κωδικοποιούν και να δοκιμάζουν υποθέσεις σχετικά με τους μηχανισμούς που υπόκεινται στη λειτουργία των κυττάρων, την παθογένεση των νόσων και τον σχεδιασμό φαρμάκων (36). Η μοντελοποίηση «in silico» συνδυάζει τα πλεονεκτήματα των πειραματισμών «in vivo» και «in vitro», χωρίς τις ηθικές σκοπιμότητες και την έλλειψη ελέγχου που συνδέονται με τα πειράματα «in vivo» (36,37). Επιτρέπει την ενσωμάτωση ενός πρακτικά απεριόριστου φάσματος παραμέτρων, καθιστώντας τα αποτελέσματα πιο εφαρμόσιμα στον οργανισμό συνολικά.

Μίμηση της Ανθρώπινης Βιολογίας και Μελέτες Περίπτωσης

Οι μέθοδοι in silico, όπως αναφέρθηκε, είναι υπολογιστικές τεχνικές που προσομοιώνουν τις βιολογικές διαδικασίες, παρέχοντας ένα εικονικό περιβάλλον για τη μελέτη περίπλοκων βιολογικών συστημάτων και γίνονται όλο και πιο αποτελεσματικές στη μίμηση της ανθρώπινης βιολογίας. Αυτές οι μέθοδοι βασίζονται

σε προηγμένους αλγορίθμους και υπολογιστικά μοντέλα για να μιμηθούν και να προβλέψουν πώς λειτουργούν τα βιολογικά συστήματα στην πραγματική ζωή.

Ένα κύριο στοιχείο των μεθόδων *in silico* είναι η ικανότητά τους να ενσωματώνουν τεράστιες ποσότητες βιολογικών δεδομένων, που περιλαμβάνουν γενετικές, μοριακές και κυτταρικές πληροφορίες, για να αναπτύξουν μοντέλα που αναπαριστούν διάφορα βιολογικά συστήματα. Τα μοντέλα αυτά κυμαίνονται από απλές αναπαραστάσεις συγκεκριμένων διαδικασιών έως περίπλοκα συστήματα που περιλαμβάνουν ολόκληρες βιολογικές διαδικασίες (38).

Οι μέθοδοι *in silico* είναι κρίσιμες στην ανάπτυξη φαρμάκων. Χρησιμοποιούνται τεχνικές μοριακής αναγνώρισης (*molecular docking*) και εντοπίζεται η πιθανή αλληλεπίδραση φαρμακευτικών μορίων με επιλεγμένους στόχους, όπως οι πρωτεΐνες. Οι μέθοδοι αυτοί έχουν βελτιώσει σημαντικά την αποδοτικότητα στον τρόπο αναγνώρισης των στόχων για την παραγωγή φαρμάκων με μελέτες να υποδεικνύουν αύξηση των ποσοστών επιτυχίας έως και 30% σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους. Παράλληλα, οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής παρέχουν ενδείξεις για τη συμπεριφορά αυτών των μορίων με την πάροδο του χρόνου, προσφέροντας μια δυναμική εικόνα των αλληλεπιδράσεων φαρμάκου-στόχου (38).

Εξίσου σημαντική είναι η μοντελοποίηση *Physiologically-Based Pharmacokinetic (PBPK)*, η οποία προσομοιώνει την απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμό και απέκκριση των φαρμάκων μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα μοντέλα αυτά είναι πολύτιμα καθώς μπορούν να προβλέψουν τη συμπεριφορά των φαρμάκων σε διαφορετικές ομάδες πληθυσμού, λαμβάνοντας υπόψη παραμέτρους όπως η ηλικία, το φύλο ή την παρουσία παθήσεων, προσφέροντας έτσι μια πιο εκτενή και ακριβή προσέγγιση στην ανθρώπινη βιολογία σε σύγκριση με τα παραδοσιακά ζωικά μοντέλα (39).

Στην πρόβλεψη της τοξικότητας των φαρμάκων, τα μοντέλα *in silico* έχουν δείξει επίπεδα ακρίβειας που κυμαίνονται από 70% έως 90% σε ορισμένες περιπτώσεις, ανταγωνιζόμενα ή ακόμη και υπερβαίνοντας την ακρίβεια των ζωικών μοντέλων. Στην περίπτωση ιδιαίτερων ασθενειών, όπως ο καρκίνος, τα μοντέλα *in silico* έχουν καταφέρει να προβλέψουν ακριβώς πώς θα αντιδράσουν οι ασθενείς σε συγκεκριμένα

φάρμακα. Αυτό επιβεβαιώνει την υψηλή τους ακρίβεια και τονίζει τη σημασία τους στον τομέα της προσωποποιημένης ιατρικής (40).

Τα τελευταία χρόνια η ενσωμάτωση της μηχανικής μάθησης και της τεχνητής νοημοσύνης έχει ενισχύσει περαιτέρω τις δυνατότητες των μεθόδων *in silico*. Αυτοί οι προηγμένοι αλγόριθμοι είναι ικανοί στην ανάλυση μεγάλων συνόλων δεδομένων, στον εντοπισμό πολύπλοκων μοτίβων και στην κατασκευή ακριβών προβλέψεων, βελτιώνοντας έτσι την ακρίβεια των βιολογικών προσομοιώσεων (41).

Κατά τη διάρκεια της πανδημίας COVID-19, οι στρατηγικές *in-silico* διαδραμάτισαν κρίσιμο ρόλο στην επιτάχυνση της κλινικής έρευνας και της ανάπτυξης θεραπευτικών προσεγγίσεων. Οι προσεγγίσεις *in-silico* χρησιμοποιήθηκαν για να μοντελοποιήσουν με αποτελεσματικότητα τα επιδημιολογικά δεδομένα, να προσδιορίσουν στόχους φαρμάκων για τον σχεδιασμό νέων φαρμάκων, να προβλέψουν επίτοπους για τον σχεδιασμό εμβολίων και να διαμορφώσουν διαγνωστικά μοντέλα. Η τεχνητή νοημοσύνη και η μηχανική μάθηση αξιοποιήθηκαν για να επιταχύνουν τα ερευνητικά προγράμματα που αντιμετωπίζουν τις επείγουσες ανάγκες που έθεσε η πανδημία, συμπεριλαμβανομένης της πρόληψης της μετάδοσης της νόσου και της διαχείρισης των επιδημιών (42).

Περιορισμοί και Προκλήσεις

Παρά τη σημαντική τους πρόοδο και συμβολή στη βιοϊατρική έρευνα, οι μέθοδοι *in silico* δεν είναι απαλλαγμένες από περιορισμούς και προκλήσεις. Ένα κύριο ζήτημα αφορά την ακρίβεια και την αξιοπιστία αυτών των μοντέλων. Η αποτελεσματικότητα των προσομοιώσεων εξαρτάται άμεσα από την ποιότητα και την πληρότητα των εισαγόμενων δεδομένων. Τα ανακριβή ή ατελή δεδομένα μπορεί να οδηγήσουν σε λανθασμένες προβλέψεις, που μπορεί να παραπλανήσουν την έρευνα (43). Αυτό είναι ιδιαίτερα κρίσιμο κατά τη μοντελοποίηση πολύπλοκων ασθενειών, όπου είναι απαραίτητο να αποτυπώνεται με ακριβή τρόπο η σύνθετη αλληλεπίδραση μεταξύ διαφόρων παραγόντων όπως η γενετική, οι περιβαλλοντικές επιδράσεις και ο τρόπος ζωής.

Ένα άλλο πρόβλημα είναι η υπολογιστική πολυπλοκότητα και οι απαιτήσεις πόρων των μεθόδων *in silico*. Υψηλού επιπέδου προσομοιώσεις, ιδίως αυτές που εμπλέκουν

μεγάλα σύνολα δεδομένων ή περίπλοκα βιολογικά συστήματα, απαιτούν σημαντική υπολογιστική ισχύ και εμπειρογνομosύνη. Αυτό μπορεί να περιορίσει την προσβασιμότητα των μεθόδων *in silico*, ιδιαίτερα για μικρότερα ερευνητικά ιδρύματα ή σε αναπτυσσόμενες χώρες (43).

Επιπλέον, παρά τη συνεχή βελτίωση των μοντέλων *in silico*, ακόμη δεν μπορούν να αναπαραγάγουν πλήρως τις πολυπλοκότητες των βιολογικών συστημάτων. Για παράδειγμα, η αντίδραση του ανθρώπινου σώματος σε ένα φάρμακο μπορεί να επηρεαστεί από αμέτρητους παράγοντες και η απεικόνιση αυτού του επιπέδου πολυπλοκότητας σε ένα υπολογιστικό μοντέλο αποτελεί μια δύσκολη διαδικασία, που δεν μπορεί πάντα να λάβει υπόψη όλες αυτές τις μεταβλητές (44).

Ένα άλλο σημείο ανησυχίας είναι η διεπιστημονική συνεργασία. Η αποτελεσματική μοντελοποίηση *in silico* συχνά απαιτεί μια πολυεπιστημονική προσέγγιση, συνδυάζοντας ειδικότητες από τη βιολογία, την πληροφορική, τα μαθηματικά και άλλους τομείς. Ωστόσο, η διεπιστημονική συνεργασία μπορεί να είναι δύσκολη λόγω διαφορών στην ορολογία, τη μεθοδολογία και την ερευνητική κουλτούρα (44).

Τέλος, υπάρχει το ζήτημα της επικύρωσης και της αποδοχής από τις ρυθμιστικές αρχές. Για να χρησιμοποιηθούν ευρέως οι μέθοδοι *in silico*, ειδικά στην ανάπτυξη φαρμάκων και στην κλινική έρευνα, πρέπει πρώτα να επικυρωθούν διεξοδικά και να γίνουν αποδεκτές από τις αρμόδιες αρχές. Αυτή η διαδικασία μπορεί να είναι μακρά και περίπλοκη, καθώς απαιτείται η απόδειξη ότι οι προβλέψεις *in silico* συσχετίζονται αξιόπιστα με πραγματικά αποτελέσματα (44).

Απαιτήσεις Τεχνολογίας και Πόρων

Η τεχνολογία και οι πόροι που απαιτούνται για τις μεθόδους *in silico* είναι μεγάλες, καθώς αντανakλούν τη σύνθετη φύση και την υψηλή υπολογιστική απαίτηση αυτών των τεχνικών. Η μοντελοποίηση αυτή απαιτεί προηγμένα υπολογιστικά συστήματα, όπως υπολογιστές υψηλής απόδοσης, ικανούς να χειρίζονται μεγάλους όγκους δεδομένων και να διενεργούν σύνθετες προσομοιώσεις. Το κόστος για αυτά τα συστήματα είναι σημαντικό, φτάνοντας εκατοντάδες χιλιάδες ή ακόμη εκατομμύρια ευρώ, ανάλογα με το μέγεθος και την πολυπλοκότητα που απαιτείται (45).

Πέρα από το hardware, οι μέθοδοι in silico απαιτούν επίσης εξειδικευμένα λογισμικά εργαλεία. Αυτά περιλαμβάνουν λογισμικά για μοριακή μοντελοποίηση και προσομοίωση, πλατφόρμες μηχανικής μάθησης και ανάλυσης δεδομένων. Αν και υπάρχουν κάποια διαθέσιμα εργαλεία ανοιχτού κώδικα, πολλές προηγμένες λογισμικές εφαρμογές είναι ιδιοκτησιακές και συνοδεύονται από υψηλά τέλη αδειοδότησης (46).

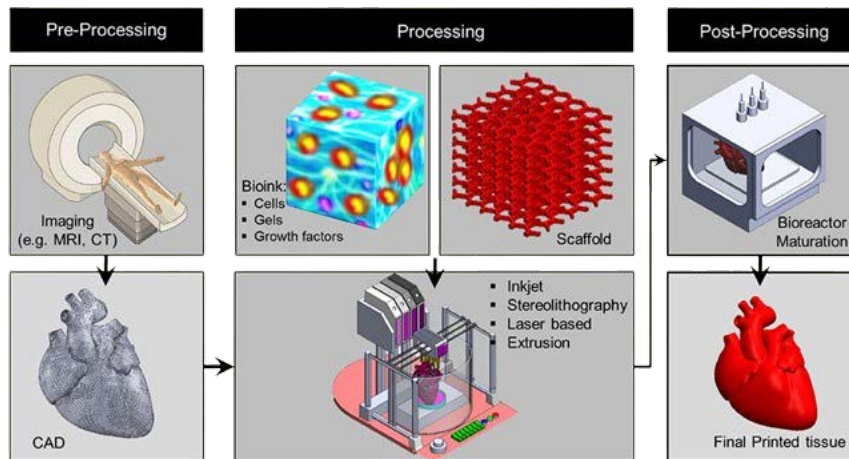
3.4 3D Bioprinting

Η Τρισδιάστατη Βιοεκτύπωση – 3D Bioprinting αποτελεί μια καινοτόμο τεχνολογία, η οποία εφαρμόζει τεχνικές αντίστοιχες με την τρισδιάστατη εκτύπωση για να συνθέσει κύτταρα, παράγοντες ανάπτυξης, βιο-μελάνια και βιοϋλικά με στόχο την κατασκευή βιοϊατρικών εξαρτημάτων που μιμούνται τις ιδιότητες φυσικών ιστών (47). Το 3D Bioprinting διαθέτει τη δυνατότητα να παράγει λειτουργικές βιομεμβράνες, δομές παρόμοιες με ιστούς και ακόμα και όργανα (47). Η εν λόγω τεχνολογία βρίσκεται εφαρμογές σε μια πληθώρα τομέων, ένας από τους σημαντικότερους είναι η μείωση των δοκιμών σε ζώα στην ιατρική έρευνα, καθώς προσφέρει εναλλακτικές λύσεις όπως τα 3D εκτυπωμένα όργανα και μοντέλα ιστών για τη δοκιμή φαρμάκων, την εκπαίδευση χειρουργικών πρακτικών και άλλους ερευνητικούς σκοπούς (47,48).

Η διαδικασία της τρισδιάστατης βιοεκτύπωσης αναπτύσσεται μέσα από τρία βασικά στάδια, καθένα με σημαντικές επιστημονικές προκλήσεις και απαιτήσεις: (48,49):

- **Προ-εκτύπωση/προ-επεξεργασία:** Σε αυτό το στάδιο, αρχικά δημιουργείται ένα σχέδιο του οργάνου που θα εκτυπωθεί. Για παράδειγμα, αν η εκτύπωση αφορά ένα νεφρό, πρώτα πραγματοποιείται μια σάρωση MRI του νεφρού για να δημιουργηθεί μια ακριβή εικόνα του. Μετά, επιλέγονται ποια βιολογικά υλικά και κύτταρα θα χρησιμοποιηθούν για την εκτύπωση. Συνήθως, αυτά τα κύτταρα προέρχονται από τον ίδιο τον ασθενή.
- **Βιοεκτύπωση:** Στο δεύτερο στάδιο, τα επιλεγμένα κύτταρα και υλικά μετατρέπονται σε μια ειδική μορφή μελάνης, γνωστή ως βιο-μελάνη. Αυτή η βιο-μελάνη τοποθετείται στον εκτυπωτή, και ξεκινά η εκτύπωση. Η διαδικασία εκτύπωσης γίνεται στρώση προς στρώση, δημιουργώντας έτσι την τρισδιάστατη δομή του οργάνου.

- **Μετά την εκτύπωση:** Το τελευταίο στάδιο είναι η μετατροπή της εκτυπωμένης δομής σε ένα λειτουργικό όργανο. Αφού ολοκληρωθεί η εκτύπωση, το αντικείμενο μεταφέρεται σε έναν ειδικό θάλαμο όπου "ώριμάζει" και γίνεται πιο σταθερό, έτοιμο για χρήση ή περαιτέρω ερευνητικές δοκιμές.



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας 3D Βιοεκτύπωσης. Πηγή:(50)

Μίμηση της Ανθρώπινης Βιολογίας και Μελέτες Περίπτωσης

Η 3D Βιοεκτύπωση είναι μια επαναστατική τεχνολογία που μιμείται την ανθρώπινη βιολογία δημιουργώντας τρισδιάστατες δομές που μοιάζουν με ανθρώπινους ιστούς και όργανα. Η διαδικασία αυτή ξεκινά με την προετοιμασία των βιομελανών, τα οποία είναι βιοϋλικά μικτά με κύτταρα (51).

Η διαδικασία της 3D βιοεκτύπωσης αφορά την εφαρμογή βιομελανών σε στρώσεις για τη δημιουργία της επιθυμητής δομής ιστού. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται συνήθως με τη βοήθεια ενός εκτυπωτή που ελέγχεται ηλεκτρονικά και τοποθετεί τις βιομελάνες με μεγάλη ακρίβεια, ακολουθώντας ένα προκαθορισμένο σχέδιο. Αυτό το σχέδιο συχνά βασίζεται σε δεδομένα ιατρικής απεικόνισης (52). Χάρη σε αυτή την τεχνική, είναι δυνατή η δημιουργία σύνθετων δομών ιστών με υψηλή ακρίβεια, οι οποίες μιμούνται στενά τη φυσική δομή των ανθρώπινων ιστών.

Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα της 3D βιοεκτύπωσης είναι η ικανότητά της να ενσωματώνει διαφορετικούς τύπους κυττάρων σε μια μοναδική δομή, μιμούμενη την πολυπλοκότητα των ανθρώπινων ιστών (53). Ρυθμίζοντας τη σύνθεση και την

κατανομή των κυττάρων μέσα στη βιομελάνη, είναι δυνατό να δημιουργηθούν ετερογενείς δομές που αντιπροσωπεύουν ακριβέστερα την κυτταρική ποικιλομορφία των ανθρώπινων ιστών (53).

Οι δομές που έχουν εκτυπωθεί με την 3D βιοεκτύπωση υποβάλλονται στη συνέχεια σε μια διαδικασία ωρίμανσης. Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης, οι δομές καλλιεργούνται σε ειδικές συνθήκες που ενισχύουν την ανάπτυξη και εξέλιξη των κυττάρων και των ιστών. Αυτό βοηθά στο να αποκτήσουν οι εκτυπωμένοι ιστοί τις απαραίτητες βιολογικές και μηχανικές ιδιότητες που χρειάζονται για να αποδίδουν σωστά (54).

Έχει αποδειχθεί ότι οι 3D βιοεκτυπωμένοι ιστοί μιμούνται λειτουργίες φυσικών ανθρώπινων ιστών, όπως η ηλεκτρική αγωγιμότητα στους καρδιακούς ιστούς και η φιλτραριστική λειτουργία στους νεφρούς. Αυτή η λειτουργική ομοιότητα είναι κρίσιμη για την πιθανή χρήση τους στη δοκιμή φαρμάκων και τη μοντελοποίηση παθήσεων, καθώς επιτρέπει πιο ακριβείς προβλέψεις για το πώς οι άνθρωποι ιστοί θα ανταποκρίνονται σε διάφορες θεραπείες (53).

Αξιοσημείωτο παράδειγμα 3D Βιοεκτύπωσης ήταν η δημιουργία μιας μικροσκοπικής 3D εκτυπωμένης καρδιάς από ερευνητές του Πανεπιστημίου του Τελ Αβίβ το 2019. Αυτό το επίτευγμα ήταν σημαντικό, καθώς πρόκειται για την πρώτη 3D εκτυπωμένη καρδιά που δημιουργήθηκε με χρήση ανθρώπινων κυττάρων και υλικών προσαρμοσμένων στις ανάγκες ενός ασθενούς (55). Τα κύτταρα του ίδιου του ασθενούς χρησιμοποιήθηκαν για να αποφευχθεί η ανοσολογική απόρριψη. Παρόλο που η καρδιά ήταν σε μέγεθος καρδιάς κουνελιού και δεν ήταν λειτουργική, η ανάπτυξή της αποτελεί ένα σημαντικό βήμα στην ιατρική, ανοίγοντας νέους δρόμους για τη εκτύπωση οργάνων για μεταμόσχευση (55).

Περιορισμοί και Προκλήσεις

Η 3D βιοεκτύπωση, παρόλο που αποτελεί μια επαναστατική τεχνολογία στην ιατρική, αντιμετωπίζει αρκετούς περιορισμούς και προκλήσεις. Ένα από τα κύρια εμπόδια είναι η αναπαραγωγή της πολυπλοκότητας των ανθρώπινων ιστών και οργάνων. Τα ανθρώπινα όργανα αποτελούνται από πολλαπλούς τύπους κυττάρων σε περίπλοκες

δομές, και η αναπαραγωγή αυτής της πολυπλοκότητας είναι πολλές φορές δύσκολη. Για παράδειγμα, η δημιουργία αγγείων μέσα στους εκτυπωμένους ιστούς, που είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση και την πλήρη λειτουργία τους, αποτελεί ένα μεγάλο τεχνικό εμπόδιο (51).

Επιπλέον, οι βιοεκτυπωμένοι ιστοί πρέπει να αντέξουν μακροχρόνια και να ενσωματωθούν επιτυχώς στο ανθρώπινο σώμα, θέματα που απαιτούν περαιτέρω μελέτη (51). Ένας βιοεκτυπωμένος ιστός για να είναι χρήσιμος στην κλινική πρακτική, πρέπει να λειτουργεί όπως ο φυσικός ιστός και ταυτόχρονα να ενσωματώνεται ομαλά στο σώμα του ασθενούς, αποφεύγοντας αντιδράσεις απόρριψης ή άλλες επιπλοκές (51).

Απαιτήσεις Τεχνολογίας και Πόρων

Η 3D βιοεκτύπωση απαιτεί σημαντικούς τεχνολογικούς πόρους, καθώς αντανακλά την προηγμένη φύση της τεχνολογίας και τις ευρύτερες δυνατότητές της για την απομίμηση της ανθρώπινης βιολογίας.

Στον πυρήνα της τεχνολογίας 3D βιοεκτύπωσης βρίσκεται ο βιοεκτυπωτής, μια εξειδικευμένη συσκευή με διαφορετικό κόστος ανάλογα με τις λειτουργίες και την ακρίβεια που προσφέρει. Ένας απλός βιοεκτυπωτής για εκπαιδευτικούς ή βασικούς ερευνητικούς σκοπούς μπορεί να κοστίζει περίπου 10.000 ευρώ, ενώ πιο προηγμένα μοντέλα για επαγγελματική έρευνα μπορεί να έχουν πολύ υψηλότερο κόστος. Αυτή η τιμολογιακή διαφοροποίηση αντανακλά τις πολυδιάστατες εφαρμογές και τη σύνθετη τεχνολογία της 3D βιοεκτύπωσης (52).

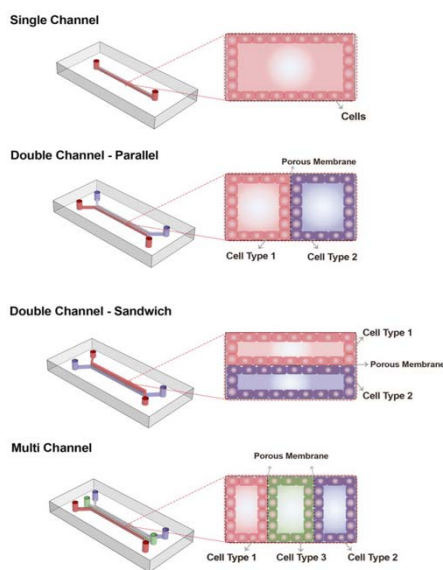
Ένα άλλο κρίσιμο συστατικό είναι η βιομελάνη, η οποία πρέπει να συντίθεται με προσοχή για να διασφαλιστεί η βιοσυμβατότητα και να υποστηρίξει την ανάπτυξη των κυττάρων. Το κόστος των βιομελανών μπορεί να διαφέρει σημαντικά ανάλογα με τη σύνθεσή τους και τον τύπο των κυττάρων που περιέχουν. Οι εξατομικευμένες βιομελάνες, σχεδιασμένες για συγκεκριμένους ερευνητικούς σκοπούς, μπορούν να είναι ιδιαίτερα ακριβές. Κατά μέσο όρο, οι τιμές των βιομελανών μπορεί να κυμαίνονται από 200 έως 500 ευρώ ανά χιλιοστόλιτρο, και περίπλοκα έργα μπορεί να απαιτούν σημαντικούς όγκους αυτών των υλικών (51).

Πέρα από τον βιοεκτυπωτή και τις βιομελάνες, υπάρχει ανάγκη για υποστηρικτικές τεχνολογίες όπως εξοπλισμός απεικόνισης και ανάλυσης. Αυτά τα εργαλεία είναι ουσιαστικά για τον σχεδιασμό των μοντέλων ιστών και την αξιολόγηση της λειτουργικότητας των εκτυπωμένων ιστών. Προηγμένα συστήματα απεικόνισης, όπως οι σαρωτές MRI ή CT που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία μοντέλων, καθώς και διάφορα αναλυτικά όργανα για την αξιολόγηση μετά την εκτύπωση, μπορούν να αυξήσουν σημαντικά το συνολικό κόστος (54).

Το προσωπικό και η εξειδίκευση αποτελούν επίσης κρίσιμες απαιτήσεις πόρων. Η 3D βιοεκτύπωση είναι ένα διεπιστημονικό πεδίο, που απαιτεί γνώσεις στη βιολογία, την επιστήμη υλικών, την μηχανική και την πληροφορική. Η εκπαίδευση και η διατήρηση εξειδικευμένων ερευνητών και τεχνικών σε αυτό το γρήγορα εξελισσόμενο πεδίο μπορεί να είναι δαπανηρή (53).

3.5 Organ-on-a-chip και microfluidic chip

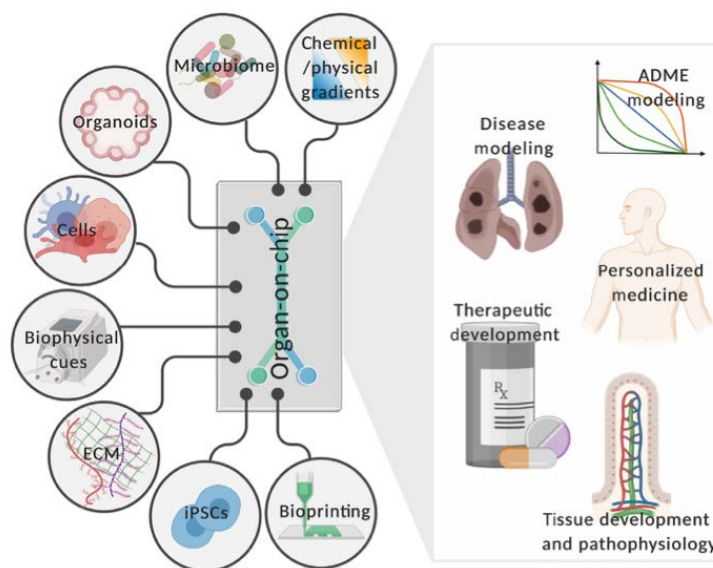
Η ιδέα του organ-on-a-chip άρχισε να αναδύεται στις αρχές του 2000, με σημαντικές εξελίξεις κατά τις δύο τελευταίες δεκαετίες (56). Αναπτύχθηκε αρχικά από ερευνητές στο Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering στο Harvard University, χρησιμοποιώντας τεχνικές μικρορευστονικής για την καλλιέργεια ανθρώπινων κυττάρων σε μικροσκοπικά κανάλια, που προσομοιώνουν τη ροή αίματος ή αέρα και αναπαριστούν τα φυσικά και βιοχημικά περιβάλλοντα του ανθρώπινου σώματος (56). Αυτή η προσέγγιση επιτρέπει τη μελέτη της ανθρώπινης φυσιολογίας in vitro και προσφέρει μια πιο ακριβή και ηθικά αποδεκτή εναλλακτική στις δοκιμές σε ζώα για τις δοκιμές φαρμάκων και τη μοντελοποίηση παθήσεων (56,57).



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση OOC με ένα, δύο και πολλαπλά κανάλια. Τυπικά, αποτελείται από τρία διαφορετικά στρώματα: κατώτερο κανάλι, διαπερατή μεμβράνη και ανώτερο κανάλι. Σχηματική αναπαράσταση OOC. Πηγή: (61)

Μίμηση της Ανθρώπινης Βιολογίας και Μελέτες Περίπτωσης

Η τεχνολογία organ-on-a-chip αντιπροσωπεύει μια επαναστατική καινοτομία στον τομέα της βιοϊατρικής μηχανικής και της ανάπτυξης φαρμάκων, διακρινόμενη ως μια μικρορευστική συσκευή καλλιέργειας κυττάρων που μιμείται τις λειτουργίες και τις φυσιολογικές αντιδράσεις ολόκληρων οργάνων και συστημάτων οργάνων (58). Αυτή η τεχνολογία, η οποία θεωρείται ικανή για τη δημιουργία τεχνητών οργάνων, αναπαράγει πολύπλοκες βιολογικές λειτουργίες των οργάνων, όπως των πνευμόνων, της καρδιάς, του ήπατος και των νεφρών (57,58). Οι συσκευές αυτές, που είναι περίπου στο μέγεθος ενός USB υπολογιστή, αποτελούνται από διαφανές, εύκαμπτο πολυμερές και περιέχουν κοίλα μικρορευστικά κανάλια, τα οποία είναι επενδυμένα με ζωντανά ανθρώπινα κύτταρα. Αυτά τα κανάλια διευκολύνουν μια πιο πιστή προσομοίωση του ανθρώπινου σώματος σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους καλλιέργειας κυττάρων 2D, παρέχοντας ένα πιο εγγυημένο περιβάλλον για την ανάλυση της συμπεριφοράς των κυττάρων (57).



Εικόνα 7: Διαγραμματική αναπαράσταση ΟΟΟ που ενσωματώνουν τεχνικές της μηχανικής ιστών, μικροκατασκευής και βιολογίας βλαστικών κυττάρων, με εφαρμογές στη μοντελοποίηση παθήσεων, τη μελέτη οργανογένεσης, την ανακάλυψη φαρμάκων και την προσωποποιημένη ιατρική. Πηγή: (59)

Η ουσία της τεχνολογίας organ-on-a-chip εντοπίζεται στην εφαρμογή της μικρορευστονικής, μιας προηγμένης τεχνολογίας που επιτρέπει την ακριβή διαχείριση ρευστών σε μικροσκοπική κλίμακα. Αυτή η τεχνολογία διευκολύνει την αναπαράσταση της ροής του αίματος και άλλων κινήσεων των σωματικών υγρών που συμβαίνουν σε πραγματικά όργανα (57). Αυτή η δυνατότητα είναι θεμελιώδης, καθώς

διαμορφώνει την ανάπτυξη, τη λειτουργία και την αντίδραση των κυττάρων στα διάφορα ερεθίσματα, προσφέροντας μια εξαιρετικά ακριβή εκπροσώπηση της ανθρώπινης φυσιολογίας (56). Επιπρόσθετα, τα organ-on-a-chip μπορούν να διαμορφωθούν έτσι ώστε να ενσωματώνουν διάφορες μηχανικές δυνάμεις, όπως έλξη ή συμπίεση, που είναι κρίσιμες για όργανα όπως οι πνεύμονες και η καρδιά, τα οποία υπόκεινται σε διαρκή κίνηση (58).

Ένα από τα πιο σημαντικά πλεονεκτήματα της τεχνολογίας organ-on-a-chip είναι η ικανότητά της να προσομοιώνει με μεγαλύτερη ακρίβεια τις διαδικασίες των ανθρώπινων ασθενειών και τις αποκρίσεις στα φάρμακα σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους καλλιέργειας κυττάρων ή τα ζωικά μοντέλα (57). Χρησιμοποιώντας ανθρώπινα κύτταρα σε ένα περιβάλλον που αναπαριστά στενά το ανθρώπινο σώμα, οι ερευνητές έχουν τη δυνατότητα να παρατηρήσουν πιο ρεαλιστικές αλληλεπιδράσεις φαρμάκων και εξελίξεις ασθενειών (56,58). Αυτό διευκολύνει την καλύτερη πρόβλεψη του τρόπου λειτουργίας των φαρμάκων στους ανθρώπους, πιθανώς μειώνοντας την εξάρτηση από τις δοκιμές σε ζώα και βελτιώνοντας την ταχύτητα και την ασφάλεια της ανάπτυξης φαρμάκων (56,58).

Το lung-on-a-chip που αναπτύχθηκε από ερευνητές στο Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering στο Harvard University αποτελεί ένα εξαιρετικό παράδειγμα εφαρμογής της τεχνολογίας organ-on-a-chip. Αυτή η πρωτοποριακή συσκευή, επενδυμένη με κύτταρα ανθρώπινων πνευμόνων και αιμοφόρων αγγείων, αναπαριστά τις περίπλοκες λειτουργίες του ανθρώπινου πνεύμονα, επιτρέποντας προηγμένες μελέτες σε πνευμονική φυσιολογία, νόσους και φαρμακολογία (60). Καθοριστικό στοιχείο του είναι η μίμηση των μηχανικών κινήσεων της αναπνοής, η οποία είναι ζωτικής σημασίας για την κατανόηση πνευμονικών παθήσεων και την αξιολόγηση των επιπτώσεων φαρμάκων και τοξινών (60). Το πνεύμονας-σε-τσιπ αποδείχθηκε ορόσημο στην εξέλιξη της γνώσης για το πνευμονικό οίδημα, αποκαλύπτοντας τη δυναμική των υγρών και τις δυνατότητες θεραπείας της κατάστασης αυτής (60). Η εφαρμογή του στη μοντελοποίηση φαρμακευτικών αποκρίσεων και στην προσωποποιημένη ιατρική υπογραμμίζει τα πλεονεκτήματα των τεχνολογιών organ-on-a-chip έναντι παραδοσιακών μεθόδων στη βιοϊατρική έρευνα, προσφέροντας πιο εύστοχες και ηθικές εναλλακτικές για τις μελέτες του ανθρώπινου πνεύμονα (60).

Περιορισμοί και Προκλήσεις

Παρά την επαναστατική του φύση, η μέθοδος organ-on-a-chip συναντά σημαντικές προκλήσεις και περιορισμούς. Ένας βασικός περιορισμός αφορά την πολυπλοκότητα της ακριβούς αναπαράστασης του ευρύ φάσματος των λειτουργιών και αλληλεπιδράσεων των ανθρώπινων οργάνων εντός ενός μικροσκοπικού τσιπ ((58). Τα ανθρώπινα όργανα αποτελούν σύνθετα συστήματα με πολυάριθμους τύπους κυττάρων και περίπλοκες βιοχημικές αλληλεπιδράσεις, των οποίων η πλήρης αναπαράσταση σε μια μικρορευστονική συσκευή αποτελεί σημαντική πρόκληση (56,57). Επιπρόσθετα, η κλιμάκωση αποτελεί ένα ζήτημα, καθώς τα organ-on-a-chip αν και μπορούν να μιμηθούν κάποιες λειτουργίες των οργάνων, δεν μπορούν να αναπαραγάγουν πλήρως την κλίμακα των βιολογικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα σε όργανα πλήρους μεγέθους (56).

Ένα άλλο σημαντικό ζήτημα στην τεχνολογία organ-on-a-chip είναι η ενσωμάτωση πολλαπλών συστημάτων οργάνων σε μία ενιαία, ενσωματωμένη πλατφόρμα για τη μελέτη συστημικών αλληλεπιδράσεων και φαρμακευτικών αποκρίσεων (58). Ενώ μεμονωμένα τσιπ οργάνων, όπως το lung-on-a-chip, έχουν σημειώσει επιτυχίες, η δημιουργία ενός body-on-a-chip που αναπαριστά με ακρίβεια τις περίπλοκες αλληλεπιδράσεις διαφορετικών οργάνων αποτελεί ακόμη μια πρόκληση (58). Πέρα από αυτό, υπάρχει και η πρόκληση της διατήρησης της ζωτικότητας και της λειτουργικής σημασίας των κυττάρων μέσα στα τσιπ για παρατεταμένες περιόδους, η οποία είναι ουσιώδης για τις μελέτες χρόνιων νόσων και τις μακροχρόνιες δοκιμές φαρμάκων (57).

Τέλος, παρόλο που η μέθοδος organ-on-a-chip προσφέρει μια δυναμική εναλλακτική στις δοκιμές σε ζώα, δεν μπορούν ακόμα να αντικαταστήσουν πλήρως τα ζωικά μοντέλα σε όλες τις πτυχές της βιοϊατρικής έρευνας και της ανάπτυξης φαρμάκων. Αυτό οφείλεται στους τρέχοντες περιορισμούς στην ακριβή αναπαράσταση της πλήρους φυσιολογίας και των μεταβολικών διεργασιών ενός ολόκληρου οργανισμού (56) Έτσι, ενώ η τεχνολογία organ-on-a-chip έχει μεγάλες προοπτικές και προσφέρει πολυάριθμα πλεονεκτήματα, η αντιμετώπιση αυτών των περιορισμών και προκλήσεων είναι ζωτικής σημασίας για να επιτύχει το πλήρες δυναμικό της στην βιοϊατρική έρευνα.

Απαιτήσεις Τεχνολογίας και Πόρων

Οι απαιτήσεις σε τεχνολογία και πόρους για την ανάπτυξη και τη χρήση συστημάτων organ-on-a-chip είναι σημαντικές. Η τεχνολογία αυτή βασίζεται στη μικρορρευστική, μια επιστήμη που περιλαμβάνει τον ακριβή έλεγχο και διαχείριση ρευστών σε υπο-χιλιοστομετρική κλίμακα. Η δημιουργία αυτών των μικρορρευστικών συσκευών απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό και εμπειρογνωμοσύνη σε τομείς όπως η βιομηχανική, η επιστήμη υλικών και η νανοτεχνολογία (58). Τα τσιπ κατασκευάζονται συχνά από πολύπλοκα πολυμερή και απαιτούν ακριβείς τεχνικές κατασκευής, όπως η μαλακή λιθογραφία, η φωτολιθογραφία ή η 3D εκτύπωση, οι οποίες μπορεί να είναι δαπανηρές και τεχνικά απαιτητικές (57).

Επιπλέον, τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται στα συστήματα organ-on-a-chip συχνά πρέπει να είναι ανθρώπινης προέλευσης για να διασφαλιστεί η σχετικότητα των αποτελεσμάτων. Αυτό απαιτεί πρόσβαση σε σειρές ανθρωπίνων κυττάρων, οι οποίες μπορεί να είναι δαπανηρές και μπορεί να συνοδεύονται από περίπλοκες νομικές και ηθικές σκέψεις σχετικά με την πηγή και τη χρήση τους. Η καλλιέργεια αυτών των κυττάρων και η διατήρησή τους σε κατάσταση που αντανακλά ακριβώς το φυσικό τους περιβάλλον στο ανθρώπινο σώμα αποτελεί μια πρόκληση, απαιτώντας προηγμένες τεχνικές καλλιέργειας κυττάρων, ακριβή έλεγχο του περιβάλλοντος και συχνά, δαπανηρά μέσα ανάπτυξης και συμπληρώματα (56).

Τέλος, η ανάπτυξη και λειτουργία των συστημάτων organ-on-a-chip μπορεί να είναι αρκετά δαπανηρή. Αν και το κόστος διαφέρει σημαντικά ανάλογα με την πολυπλοκότητα του τσιπ και την κλίμακα του έργου, το αρχικό κόστος εγκατάστασης ενός βασικού εργαστηρίου μικρορρευστικής είναι μεγάλο. Επιπλέον, τα συνεχή λειτουργικά έξοδα, που περιλαμβάνουν υλικά, καλλιέργειες κυττάρων και εργατικό δυναμικό, αυξάνουν τις δαπάνες. Παρά το υψηλό κόστος, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα συστήματα organ-on-a-chip έχουν τη δυνατότητα να μειώσουν το συνολικό κόστος ανάπτυξης και δοκιμής φαρμάκων μακροπρόθεσμα, παρέχοντας πιο ακριβή ανθρώπινα δεδομένα νωρίτερα στη διαδικασία ανάπτυξης φαρμάκων, μειώνοντας έτσι την εξάρτηση από τις πιο δαπανηρές ζωικές μελέτες (57).

Κεφάλαιο 4 Συμπεράσματα – Συζήτηση / Conclusion – Discussion

Η διαχείριση της ηθικής διάστασης στην ευζωία των ζώων, σε συνδυασμό με τις προκλήσεις που παρουσιάζει η χρήση τους στην επιστημονική έρευνα, αποτελεί ένα θέμα βαθιάς ανησυχίας, εγείροντας σοβαρά ερωτήματα τόσο στην επιστημονική κοινότητα όσο και στο ευρύτερο κοινωνικό πεδίο. Η αναζήτηση εναλλακτικών μεθόδων, που θα περιορίσουν ή ακόμη και θα αντικαταστήσουν τη χρήση ζώων στα ερευνητικά πειράματα, καταδεικνύει μια συνειδητή προσπάθεια για την εφαρμογή των αρχών της ευζωίας.

Αυτή η στροφή προς προηγμένες και εναλλακτικές τεχνικές, όπως οι *in vitro* και *in silico* δοκιμές, η 3D Βιοεκτύπωση και η τεχνολογία *organ-on-a-chip*, αντανακλά την αναγνώριση της ανάγκης για πιο ανθρωποκεντρικές και ηθικά υπεύθυνες επιστημονικές μεθόδους. Αυτές οι μέθοδοι προσφέρουν τη δυνατότητα πραγματοποίησης πειραμάτων σε ελεγχόμενο περιβάλλον χωρίς τη χρήση ζωικών μοντέλων, ανοίγοντας το δρόμο για πιο ακριβείς και ηθικά αποδεκτές επιστημονικές προσεγγίσεις.

Οι μέθοδοι *in vitro*, θεμέλιο λίθος στον τομέα της βιολογικής έρευνας, επιτρέπουν τη μελέτη βιολογικών διεργασιών μέσα σε ένα ελεγχόμενο περιβάλλον, μειώνοντας σημαντικά την ανάγκη για χρήση ζωικών μοντέλων. Αυτές οι μέθοδοι, παρ' όλα αυτά, συναντούν δυσκολίες στο να αναπαραστήσουν την πολυπλοκότητα των διαδικασιών ενός ζωντανού οργανισμού. Παρά τις περιορισμένες δυνατότητές τους, η εξέλιξή τους είναι ουσιαστική για τον περιορισμό των δοκιμών σε ζώα, ιδιαίτερα σε επιστημονικούς τομείς όπως η τοξικολογία και η φαρμακολογία, όπου οι μελέτες βασισμένες σε ανθρώπινα κύτταρα προσφέρουν πιο σχετικά και εύστοχα αποτελέσματα απ' ό,τι οι ζωικές δοκιμές.

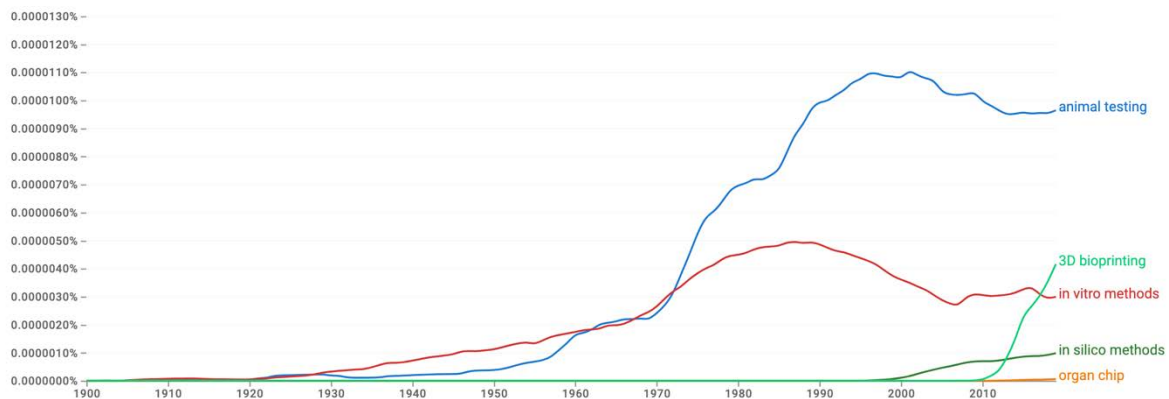
Τα μοντέλα *in silico*, αποτέλεσμα των καινοτομιών στον υπολογιστικό τομέα, έχουν φέρει μια ριζική αλλαγή στη βιολογική και φαρμακολογική έρευνα. Με τους προηγμένους αλγόριθμους και τις προσομοιώσεις τους, είναι κρίσιμα στην ανακάλυψη φαρμάκων και στη μοντελοποίηση νόσων. Παρέχοντας εκτενείς πληροφορίες και συμβάλλοντας στη μείωση των δοκιμών σε ζώα, η αποτελεσματικότητά τους εξαρτάται από την ακρίβεια των εισερχόμενων δεδομένων και την υπολογιστική ικανότητα, επισημαίνοντας την ανάγκη για συνεχή τεχνολογική ενίσχυση.

Η τεχνολογία της 3D Βιοεκτύπωσης, κατέχει μεγάλο δυναμικό στη δημιουργία ρεαλιστικών μοντέλων ιστών και οργάνων, παρέχοντας μία μοναδική βάση για τη δοκιμή φαρμάκων και

την εξομοίωση παθήσεων. Παρά το μεγάλο της δυναμικό, η τεχνολογία αυτή αντιμετωπίζει ακόμα σημαντικές προκλήσεις στην αποτύπωση της περίπλοκης ανθρώπινης βιολογίας. Η διαρκής εξέλιξη και βελτίωση της 3D Βιοεκτύπωσης είναι καθοριστική για την πρακτική της εφαρμογή σε κλινικές διαδικασίες και για την περαιτέρω μείωση της ανάγκης για δοκιμές σε ζώα.

Η τεχνολογία organ-on-a-chip, προϊόν της μικρορευστοδυναμικής, αποτελεί ένα σημαντικό άλμα στην προσομοίωση των λειτουργιών των ανθρώπινων οργάνων. Αναπαράγοντας τις φυσιολογικές και βιοχημικές συνθήκες των ανθρώπινων οργάνων, τα OOC προσφέρουν μια πιο ακριβή εναλλακτική σε σχέση με τα ζωικά μοντέλα. Ωστόσο, η κλιμάκωση αυτών των συστημάτων ώστε να μιμηθούν τις συστηματικές αλληλεπιδράσεις παραμένει μια μεγάλη πρόκληση.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το παρακάτω διάγραμμα στο οποίο φαίνεται η συχνότητα εμφάνισης αυτών των μεθόδων στη βιβλιογραφία από το 1900 έως τη δεκαετία του 2019, βάσει δεδομένων από το Google Books Ngram Viewer. Παρατηρείται ότι η χρήση του όρου "animal testing" σημειώνει αύξηση μέχρι τις αρχές του 2000, ενώ στη συνέχεια αρχίζει να υποχωρεί, καθρεφτίζοντας μια προτίμηση προς πιο ηθικές πρακτικές. Από την άλλη, οι "in vitro methods" εμφανίζουν μία ανοδική πορεία από τα μέσα του 20ού αιώνα, πιθανόν λόγω της ζήτησης για εναλλακτικές μεθόδους που απομακρύνονται από τα ζωικά μοντέλα και προσεγγίζουν περισσότερο τις ανθρώπινες συνθήκες. Ταυτόχρονα, οι "in silico methods" εμφανίζονται από το 1990, με την εξέλιξη της τεχνολογίας, και το "organ-on-a-chip" μετά το 2010, αντικατοπτρίζοντας την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών που μιμούνται τη λειτουργία οργάνων σε μικροσκοπική κλίμακα. Παρόμοια, ο όρος "3D bioprinting" εμφανίζεται την ίδια περίοδο και δείχνει μια συνεχή ανοδική τάση, δείγμα των πρόσφατων προόδων στην εκτύπωση βιολογικών υλικών, που ίσως οδηγήσουν σε μια επανάσταση στον τρόπο που διεξάγεται η επιστημονική έρευνα. Συνολικά, φαίνεται μια μετάβαση από την χρήση ζώων προς πιο προηγμένες τεχνολογίες, που είναι ταυτόχρονα πιο συμβατές με τις σύγχρονες ηθικές απαιτήσεις.



Εικόνα 8: Διάγραμμα τάσης συγκριτικής ανάλυσης των όρων "animal testing", "in vitro methods", "in silico methods", "organ chip" και "3D bioprinting" στην επιστημονική έρευνα από το 1900 έως τη δεκαετία του 2019.
 Πηγή: Google Books Ngram Viewer

Η συνολική επίδραση αυτών των καινοτόμων τεχνολογιών στην αντικατάσταση των δοκιμών σε ζώα είναι αδιαμφισβήτητα σημαντική. Ωστόσο, η πλήρης ενσωμάτωσή τους στην έρευνα εξαρτάται από την επίλυση τεχνικών δυσκολιών, ηθικών ζητημάτων και προκλήσεων στην εφαρμογή τους σε μεγάλη κλίμακα.. Καθώς αυτές οι μέθοδοι συνεχίζουν να αναπτύσσονται, διαγράφουν την πορεία προς ένα μέλλον όπου οι ηθικές ανησυχίες δεν θα αποτελούν απλώς έναν προσθετικό παράγοντα, αλλά θα ενσωματώνονται ως θεμελιώδεις και αναπόσπαστο στοιχείο της επιστημονικής έρευνας.

Συνοψίζοντας, η συγκεκριμένη εργασία υπογραμμίζει μια ηθική αναγκαιότητα στην επιστημονική έρευνα: τη σταδιακή, ωστόσο αποφασιστική μετατόπιση από τις δοκιμές σε ζώα προς εναλλακτικές μεθόδους. Η ενσωμάτωση της επιστήμης, της τεχνολογίας και της ηθικής οδηγεί προς μια νέα επιστημονικής εποχή. Μία εποχή όπου οι αρχές των 3Rs δεν αποτελούν απλώς κατευθυντήριες γραμμές, αλλά θεμελιώδη αρχή που καθοδηγεί την έρευνα και μία εποχή όπου η ευημερία των ζώων δεν αγνοείται στην πορεία προς την επιστημονική πρόοδο.

Κεφάλαιο 5 Βιβλιογραφία

1. Henrique Franco N. Animal experiments in biomedical research: A historical perspective. Vol. 3, *Animals*. 2013. p. 238–73.
2. ProCon.org. ProCon.org. 2023 [cited 2023 Oct 11]. History of Animal Testing | ProCon.org. Available from: <https://animal-testing.procon.org/history-of-animal-testing/>
3. Medical Testing on Animals: A Brief History - Animal Justice [Internet]. [cited 2023 Oct 11]. Available from: <https://animaljustice.ca/blog/medical-testing-animals-brief-history>
4. Rowan AN, Loew FM. Animal Research: A Review of Developments, 1950–2000 [Internet]. *Animal Research: A Review of Developments*. 2001. Available from: https://www.wellbeingintlstudiesrepository.org/sota_2001
5. Amber Young. Young, Amber. "From Curiosity to a Cure: The Role of Animal-Based Research In Treating Alzheimer's Disease. 2010;
6. Smith KA. Louis Pasteur, the father of immunology? Vol. 3, *Frontiers in Immunology*. 2012.
7. Adams M. The kingdom of dogs: Understanding Pavlov's experiments as human–animal relationships. *Theory Psychol*. 2020 Feb 1;30(1):121–41.
8. Kinter LB, Dehaven R, Johnson DK, DeGeorge JJ. A Brief History of Use of Animals in Biomedical Research and Perspective on Non-Animal Alternatives. Vol. 62, *ILAR Journal*. Oxford University Press; 2021. p. 7–16.
9. Binder R. Laboratory Animal Law: An Introduction to Its History and Principles. In: Jensen-Jarolim E, editor. *Comparative Medicine: Anatomy and Physiology* [Internet]. Vienna: Springer Vienna; 2014. p. 267–80. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1559-6_14
10. Dolan SThL K. *Laboratory Animal Law: Legal Control of the Use of Animals in Research* Second Edition.
11. Αποστολίδης Κ, Βασιλικού Κ, Γρηγοριάδου Β, Δελφάκη Δ, Θεολόγου Κ, Καναβούρας Α, et al. Signum 4-5 Περίοδος Β΄ Συνεργάτες του τεύχους [Internet]. Available from: www.ellinoekdotiki.gr,
12. EUR-Lex - 32010L0063 - EN - EUR-Lex n.d. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>.
13. Verderio P, Lecchi M, Ciniselli CM, Shishmani B, Apolone G, Manenti G. 3Rs Principle and Legislative Decrees to Achieve High Standard of Animal Research. 2023; Available from: <https://doi.org/10.3390/ani>
14. Calvillo L. Editorial: 3Rs approach (replace, reduce and refine animal models) to improve preclinical research. Vol. 13, *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
15. eBioMedicine. The 3Rs of Animal Research. *EBioMedicine* [Internet]. 2022;76:103900. Available from: <https://doi.org/10.1016/j>.
16. Camenzind S, Eggel M. The 3Rs principles and genetic pain disenchantment. *Animal Welfare*. 2022 Nov 1;31(4):495–503.
17. Enqi Liu JF. *Fundamentals of Laboratory Animal Science*. 2018;
18. Lakshmanan M. Laboratory Animals. In: Lakshmanan M, Shewade DG, Raj GM, editors. *Introduction to Basics of Pharmacology and Toxicology: Volume 3 : Experimental Pharmacology : Research Methodology and Biostatistics* [Internet]. Singapore: Springer Nature Singapore; 2022. p. 13–36. Available from: https://doi.org/10.1007/978-981-19-5343-9_2

19. 11 Animal Testing Statistics That Will Blow Your Mind PETA. 2023.
20. Eske J. What is the difference between in vivo and in vitro? 2023.
21. Freshney RI. Culture of Animal Cells. 2010 Sep;
22. Hay M, Thomas DW, Craighead JL, Economides C, Rosenthal J. Clinical development success rates for investigational drugs. *Nat Biotechnol.* 2014 Dec;32(1):40–51.
23. Bhattacharya S, Zhang Q, Carmichael PL, Boekelheide K, Andersen ME. Toxicity Testing in the 21st Century: Defining New Risk Assessment Approaches Based on Perturbation of Intracellular Toxicity Pathways. Zhang B, editor. *PLoS One.* 2011 Jun;6(6):e20887.
24. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. Scanning. 2004 Dec;26(3):153.
25. Langhans SA. Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Front Pharmacol.* 2018 Jan;9.
26. Salk JE, Krech U, Youngner JS, Bennett BL, Lewis LJ, Bazeley PL. Formaldehyde Treatment and Safety Testing of Experimental Poliomyelitis Vaccines. *Am J Public Health Nations Health.* 1954 Dec;44(5):563–70.
27. FRANCIS T, J, KORNS RF, VOIGHT RB, BOISEN M, HEMPHILL FM, NAPIER JA, et al. An evaluation of the 1954 poliomyelitis vaccine trials. *Am J Public Health Nations Health.* 1955;1–63.
28. Pound P, Ritskes-Hoitinga M. Is it possible to overcome issues of external validity in preclinical animal research? Why most animal models are bound to fail. *J Transl Med.* 2018 Nov;16(1).
29. Mestas J, Hughes CCW. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *The Journal of Immunology.* 2004 Mar;172(5):2731–8.
30. Hartung T. Toxicology for the twenty-first century. *Nature.* 2009 Dec;460(7252):208–12.
31. Hyun I. The bioethics of stem cell research and therapy. *Journal of Clinical Investigation.* 2010 Jan;120(1):71–5.
32. Zhang JH, Chung TDY, Oldenburg KR. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *SLAS Discovery.* 1999 Dec;4(2):67–73.
33. Masters JRW. Human cancer cell lines: fact and fantasy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000 Dec;1(3):233–6.
34. Baker M. Reproducibility: Respect your cells! *Nature.* 2016 Dec;537(7620):433–5.
35. In silico. 2023.
36. Colquitt B Richard, Colquhoun A Douglas, Thiele H Robert. In silico modelling of physiologic systems. *Best practice & research.*
37. Barh D, Chaitankar V, Yiannakopoulou EC, Salawu EO, Chowbina S, Ghosh P, et al. In Silico Models: From Simple Networks to Complex Diseases. In: *Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation.* Elsevier Inc.; 2013. p. 385–404.
38. Gelpi J, Hospital A, Goñi R, Orozco M. Molecular dynamics simulations: advances and applications. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry.* 2015 Jan;37.
39. Jones HM, RowlandYeo K. Basic Concepts in Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling in Drug Discovery and Development. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* 2013 Jan;2(8):1–12.
40. Raies AB, Bajic VB. In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. *WIREs Computational Molecular Science.* 2016 Jan;6(2):147–72.
41. Lo YC, Rensi SE, Torng W, Altman RB. Machine learning in chemoinformatics and drug discovery. *Drug Discov Today.* 2018 Jan;23(8):1538–46.

42. Basu S, Ramaiah S, Anbarasu A. In-silico strategies to combat COVID-19: A comprehensive review. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 2021 Jan;37(1):64–81.
43. Sacan A, Ekins S, Kortagere S. Applications and Limitations of In Silico Models in Drug Discovery. *Methods in Molecular Biology.* 2012;87–124.
44. Brogi S, Ramalho TC, Kuca K, Medina-Franco JL, Valko M. Editorial: In silico Methods for Drug Design and Discovery. *Front Chem.* 2020 Aug;8.
45. Ai N, Fan X, Ekins S. In silico methods for predicting drug–drug interactions with cytochrome P-450s, transporters and beyond. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015 Jan;86:46–60.
46. Shaker B, Ahmad S, Lee J, Jung C, Na D. In silico methods and tools for drug discovery. *Comput Biol Med.* 2021 Jan;137:104851.
47. 3D bioprinting. 2023.
48. Klinkenbergh D. How can 3D-printing replace animal testing? - Proefdiervrij. 2023.
49. Kaskinen P. What is Bioprinting Part 2 of 6: The Pre-printing/Pre-Processing Step.
50. Ramadan Q, Zourob M. 3D Bioprinting at the Frontier of Regenerative Medicine, Pharmaceutical, and Food Industries. *Front Med Technol.* 2021 Jan;2.
51. Murphy S V, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol.* 2014 Dec;32(8):773–85.
52. Ozbolat IT, Peng W, Ozbolat V. Application areas of 3D bioprinting. *Drug Discov Today.* 2016 Dec;21(8):1257–71.
53. Mandrycky C, Wang Z, Kim K, Kim DH. 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnol Adv.* 2016 Dec;34(4):422–34.
54. Skardal A, Mack D, Kapetanovic E, Atala A, Jackson JD, Yoo J, et al. Bioprinted Amniotic Fluid-Derived Stem Cells Accelerate Healing of Large Skin Wounds. *Stem Cells Transl Med.* 2012 Oct;1(11):792–802.
55. Noor N, Shapira A, Edri R, Gal I, Wertheim L, Dvir T. 3D Printing of Personalized Thick and Perfusable Cardiac Patches and Hearts. *Advanced Science.* 2019 Apr;6(11).
56. Bhatia SN, Ingber DE. Microfluidic organs-on-chips. *Nat Biotechnol.* 2014 Dec;32(8):760–72.
57. Zhang B, Korolj A, Lai BFL, Radisic M. Advances in organ-on-a-chip engineering. *Nat Rev Mater.* 2018 Aug;3(8):257–78.
58. Huh D, Hamilton GA, Ingber DE. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol.* 2011 Dec;21(12):745–54.
59. Jalili-Firoozinezhad S, Miranda CC, Cabral JMS. Modeling the Human Body on Microfluidic Chips. *Trends Biotechnol.* 2021 Jan;39(8):838–52.
60. Huh D, Matthews BD, Mammoto A, Montoya-Zavala M, Hsin HY, Ingber DE. Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip. *Science (1979).* 2010 Jun;328(5986):1662–8.
61. Tajeddin A, Mustafaoglu N. Design and Fabrication of Organ-on-Chips: Promises and Challenges. *Micromachines (Basel).* 2021 Nov;12(12):1443.
62. Rosado-Galindo H, Suarez L, Domenech M. In vitro Approaches to Model Breast Tumor Complexity. *Breast Cancer - Evolving Challenges and Next Frontiers.* 2021 Nov

