

ENFEKSİYON HASTALIKLARINDA TÜM YÖNLERİYLE DENEYSEL HAYVAN MODELLERİ

Editörler

Dr. Şükran KÖSE

Dr. Osman YILMAZ

Dr. Ahmet Deniz UÇAR

ENFEKSİYON HASTALIKLARINDA TÜM YÖNLERİYLE DENEYSEL HAYVAN MODELLERİ

Editörler

Dr. Şükran KÖSE

Dr. Osman YILMAZ

Dr. Ahmet Deniz UÇAR

İzmir, 2025

ENFEKSİYON HASTALIKLARINDA TÜM YÖNLERİYLE DENEYSEL HAYVAN MODELLERİ

© Bu yayının her hakkı saklıdır. Tamamı ya da bir parçası Editörlerin yazılı izni olmaksızın hiçbir yolla ve biçimde çoğaltılamaz, dağıtılamaz, veri tabanlarında ve bilgi erişim sistemlerinde kullanılamaz.

E-ISBN: 978-625-00-3452-1

Baskı: İzmir, 2025

Editörler

Dr. Şükran KÖSE

Dr. Osman YILMAZ

Dr. Ahmet Deniz UÇAR

Buhasder- Fişekhane Cad. Türkçü Sokak Kayalı Apt.

A-Blok No:6/1 D:7, Bakırköy/İstanbul

Tel : (0212) 543 10 00 / Cep: 0505 3891443

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi- Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği-İzmir

e- posta: ahmetdenizucar@hotmail.com

Yayına Hazırlayan ve tasarım

İsmail BUHUR

buhurismail@gmail.com

KATKIDA BULUNAN YAZARLAR

Dr. İbrahim ÇAVUŞ

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Parazitoloji AD

Dr. Öğr. Üyesi Çağlar ÇELEBİ

Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD.

Dr. Latife Merve OKTAY ÇELEBİ

Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji
Anabilim Dalı

Prof. Dr. Soner DUMAN

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD
Nefroloji BD

Prof. Dr. Ender HÜR

Uşak Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD
Nefroloji BD

Prof. Dr. Pembe KESKİNOĞLU

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik
ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı

Uzm. Dr. Tuba TATLI KIŞ

Sağlık Bilimleri Üniversitesi İzmir Dr. Suat Seren Göğüs
Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji

Öğr. Gör. Dr. H. Efsun KOLATAN,

Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Dokuz
Eylül Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Bilimi AD.

Prof. Dr. Şükran KÖSE

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Dahili Tıp
Bilimleri Bölümü, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İmmünoloji ve Alerji
Hastalıkları Bilim Dalı

Prof. Dr. Timur KÖSE

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi
Bilişim AD

Prof. Dr. Ahmet ÖZBİLGİN,

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Parazitoloji AD

Dr. Öğr. Üyesi Yener ÖZEL

Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji AD

Dr. Engin SÜMER

Yeditepe Üniversitesi, Deney Hayvanları
Laboratuvarı, Kayışdağı- İstanbul

Doç. Dr. Ahmet Deniz UÇAR

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, İzmir Şehir Hastanesi,
Genel Cerrahi Kliniği, Yanık Merkezi

Uzm. Dr. Tuba DEMİRCİ YILDIRIM

İzmir Şehir Hastanesi, Romatoloji Uzmanı,

Prof. Dr. Mehmet YILDIRIM

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, İzmir Tıp Fakültesi,
İzmir Şehir Hastanesi, Genel Cerrahi Kliniği

Dr. Canberk YILMAZ

Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı
ve Hastalıkları AD, Konak- İzmir

Prof. Dr. Osman YILMAZ

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Deneysel
Hayvan Laboratuvarı, Balçova, İzmir

İÇİNDEKİLER

ENFEKSİYON NEDİR, NASIL GELİŞİR, ENFEKSİYON TİPLERİ VE SEYRİ, TANIMI VE BULAŞMEKANİZMALARI NELERDİR?

Prof. Dr. Şükran Köse, Dr. Latife Merve OKTAY ÇELEBİ..... 1

DENEY HAYVANI ARAŞTIRMALARINDA TEMEL PRENSİPLERİ

Dr. Canberk YILMAZ 9

DENEYSEL TASARIM VE ANALİZ

Prof. Dr. Pembe KESKİNOĞLU, Prof. Dr. Timur KÖSE..... 17

ÜLKEMİZDE DENEYSEL HAYVAN ARAŞTIRMALARI YASAL DÜZENLEME, ALTYAPI

Öğr. Gör. Dr. H. Efsun KOLATAN 25

LABORATUVAR HAYVAN TESİSLERİNDE BİYOGÜVENLİK SEVİYESİ

Dr. Canberk YILMAZ 35

LABORATUVAR HAYVANLARINDA BİYOUYUMLULUK TESTLERİ

Dr. Engin SÜMER, Dr. Osman YILMAZ 45

DENEYSEL HAYVAN MODELLERİ

Dr. Öğr. Üyesi Çağlar ÇELEBİ 57

DENEYSEL HAYVAN İNFEKSİYON MODELLERİ

Prof. Dr. Şükran KÖSE, Uzm. Dr. Tuba TATLI KIŞ..... 65

DENEYSEL BAKTERİYOLOJİK HAYVAN MODELLERİ

Prof. Dr. Mehmet YILDIRIM..... 71

DENEYSEL MİKOLOJİK HAYVAN MODELLERİ

Doç. Dr. Tuba DEMİRCİ YILDIRIM 81

PARAZİTOLOJİDE HAYVAN MODELLERİ

Prof. Dr. Ahmet ÖZBİLGİN, Dr. İbrahim ÇAVUŞ, Dr. Öğr. Üyesi Yener ÖZEL..... 87

DENEYSEL ENFEKSİYON MODELLERİNDE MODEL ORGANİZMALAR, BAKTERİLER, MAYA-MANTAR, SİNEKLER

Prof. Dr. Ender HÜR, Prof. Dr. Soner DUMAN 101

DENEYSEL YARA İNFEKSİYON MODELLERİ

Doç. Dr. Ahmet Deniz UÇAR 117

ÖNSÖZ

Enfeksiyon hastalıklarında tüm yönleriyle deneysel hayvan modelleri isimli deneysel cerrahi kitabımız bakteriyel, mikotik, paraziter modellerin fizyolojisi ve cerrahi prosedürlerinin ayrıntılı açıklamalarını ve bunların ardındaki bilimsel prensipleri sunmaktadır. Konusunda uzman olan bir ekip tarafından yazılan deneysel cerrahiye odaklanan kitabımızın, tıp öğrencileri, asistanlar ve uzmanlar için değerli bir kaynak olacağı inancındayız. Tüm yazarlara katkılarından dolayı teşekkür eder, tıp camiasına yararlı olmasını dileriz.

ENFEKSİYON NEDİR, NASIL GELİŞİR, ENFEKSİYON TİPLERİ VE SEYRİ, TANIMI VE BULAŞ MEKANİZMALARI NELERDİR?

WHAT IS INFECTION, HOW DOES IT DEVELOP, WHAT ARE INFECTION TYPES AND COURSE, DEFINITION AND TRANSMISSION MECHANISMS?

Prof. Dr. Şükran KÖSE¹, Dr. Latife Merve OKTAY ÇELEBİ²

¹Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Dâhili Tıp Bilimleri Bölümü, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İmmünoloji ve Alerji Hastalıkları Bilim Dalı, Tel no:05323410545, E-Posta:sukran.kose@deu.edu.tr ORCID:0000-0002-4228-1213

²Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, E-Posta:m.latifeoktay@gmail.com, ORCID:0000-0002-7110-3379

ÖZ

Enfeksiyon, bakteriler, virüsler, mantarlar veya parazitler gibi mikroorganizma olan bir patojen ile konak organizma arasındaki immün yanıtlarla semptomlara neden olan kompleks bir etkileşimdir. Patojenler vücuda solunum, mukozal temas veya gastrointestinal sistem gibi çeşitli yollarla bulaşarak immünojenik moleküler mekanizmaları tetiklemektedir. Enfeksiyonlar patojen türüne göre viral, bakteriyel, fungal ve paraziter olarak çeşitlilik göstermektedir. Doğrudan temas, havadaki partiküller, kontamine su veya gıdalar, damlacıklar ve vektör kaynaklı bulaş yolları, patojen türüne göre spesifikite ve sensitivite göstermektedir. Bulaş sonucunda, influenzadan fungal pnömoni, AIDS ve sıtmaya kadar pek çok hastalık görülmektedir. Enfeksiyonun bilimsel özelliklerinin daha fazla aydınlatılması ile etkili önleyici tedbirlerin alınması, yeni tanı ve tedavi yöntemleriyle halk sağlığı stratejilerinin geliştirilmesi, pandemi gibi nüfusun büyük çoğunluğunu etkileyen hastalıklar dahil pek çok hastalığın önlenmesine katkı sağlayacaktır.

Anahtar Sözcükler: Enfeksiyon, Enfeksiyon Tipleri, Bulaş

SUMMARY

Infection is a complex interaction between a pathogen, which is a microorganism such as bacteria, viruses, fungi, or parasites, and the host organism that causes symptoms through immune responses. Pathogens infect the body by various routes, such as respiration, mucosal contact, or the gastrointestinal tract, and trigger immunogenic molecular mechanisms. Infections vary according to the type of pathogen: viral, bacterial, fungal, and parasitic. Direct contact, airborne particles, contaminated water or food, droplets, and vector-borne transmission routes show specificity and sensitivity according to the type of pathogen. As a result of transmission, many diseases, ranging from influenza to fungal pneumonia, AIDS, and malaria, are observed. Further elucidation of the scientific characteristics of the infection, taking effective preventive measures, and developing public health strategies with new diagnostic and treatment methods will contribute to the prevention of many diseases, including those affecting the majority of the population, such as pandemics.

Keywords: Infection, Types of Infection, Transmission

Enfeksiyon Nedir?

İnsanlık tarihi boyunca enfeksiyon, morbidite ve mortalitenin önde gelen nedeni olmuştur ve ağrı, temel uyarı işaretlerinden biridir (1). Enfeksiyon, klinik olarak belirgin olan/olmayan,

yarışmacı metabolizma, toksinler, intraselüler replikasyon veya antijen-antikor yanıtı nedeniyle lokal hücresel hasarlar ile sonuçlanabilen, mikroorganizmaların vücut dokularına invazyonu ve çoğalması olarak tanımlanmaktadır (2). Diğer bir deyişle enfeksiyon, bir veya daha fazla patojenik ajanın (bakteriler, virüsler veya protozoanlar gibi) uygun bir konakçının vücudunda veya üzerinde yerleşmesiyle ortaya çıkan hastalık durumudur (3). Bulaşıcı hastalıklar olarak da bilinen enfeksiyon hastalıkları, belirli enfeksiyöz ajanların veya bunların toksik ürünlerinin neden olduğu ve bu ajanların enfekte bir birey veya hayvandan duyarlı bir konağa bulaşması sonucu ortaya çıkan hastalıklar olarak tanımlanmaktadır. Bu hastalıklara bakteriler, virüsler, mantarlar ve parazitler de dahil olmak üzere çeşitli patojenler neden olmaktadır (4). Enfeksiyonlar, farklı semptomlara sahip olabilir ve vücudun farklı bölgelerini etkileyebilirler. Bu durum, ilgili patojenin vücutta oluşturduğu spesifik semptomlara bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir. Örneğin, HIV (İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü) vücudun bağışıklık sistemini hedef alan, onu zayıflatan ve bireyleri diğer enfeksiyonlara ve hastalıklara karşı daha duyarlı hale getiren bir enfeksiyondur. Lyme hastalığı ise enfekte kenelerin ısırması yoluyla insanlara bulaşmakta ve ateş, baş ağrısı, yorgunluk ve karakteristik deri döküntüsü gibi semptomlara neden olabilmektedir (5,6).

Nasıl Gelişir?

Bakteriler, virüsler, mantarlar veya parazitler gibi mikroorganizmalar vücuda girip çoğalmaya başladığında vücut içinde enfeksiyon gelişmektedir. Tipik olarak enfekte olmuş insanların lokal bir bölgesinde görülen hastalık, enfeksiyon sonucunda vücuttaki hücreler hasar gördüğünde ve bir hastalığın semptomları ortaya çıktığında oluşmaktadır. Enfeksiyona yanıt olarak immün sistem harekete geçmektedir. Beyaz kan hücreleri, antikorlar ve diğer mekanizmalar vücudu yabancı patojenden korumak için bir tepki oluştururlar. Bu tepkiler, bir enfeksiyon sırasında kişinin acı hissetmesine neden olan semptomlardır. Bunlar genellikle, ateş, halsizlik, baş ağrısı ve kızarıklık gibi semptomlar olup, bu semptomlar enfeksiyonu vücuttan atmaya çalışan immün sistemin faaliyetlerinden kaynaklanmaktadır (7).

Patojen varlığına bağlı olarak enfeksiyonlar çeşitli yollarla farklı bireylere bulaşarak yayılım göstermektedirler. Mikroorganizmalar küçük damlacıklar veya küçük aerosol parçacıkları olarak hava yoluyla yayılabilir. Bu, enfekte bir kişi öksürdüğünde, hapşırdığında, konuştuğunda veya nefes aldığında ve diğerleri kontamine havayı soluduğunda meydana gelebilmektedir. Bu durumda enfekte kişinin öksürmesine veya hapşırmasına bağlı olarak solunum damlacıklarında enfeksiyöz ajanların taşınımı ile damlacık yayılımı bulaşı görülebilmektedir. Mikroorganizmalar, enfekte bireylerle doğrudan temas yoluyla, kontamine yüzeyler veya nesnelerle temas yoluyla dolaylı olarak bulaşabilir. Enfekte bir kişinin cildi, mukus zarları veya dışkı ile temas bulaşmaya yol açabilir. Ayrıca kan, idrar, tükürük, anne sütü, meni ve vajinal salgılar gibi kontamine vücut sıvılarıyla temas da bulaşıcı hastalıkların yayılmasına neden olmaktadır (8,9). Fekal oral bulaş, enfeksiyöz ajanlar dışkı ile temas ve ardından oral yolla bulaştığında ortaya çıkmaktadır. Tuvaleti kullandıktan veya çocuk bezini değiştirdikten sonra ellerin doğru şekilde yıkanmaması, kontamine su kullanımı gibi kötü hijyen uygulamaları nedeniyle gerçekleşmektedir (10-12). Bazı bulaşıcı hastalıklar, sivrisinekler, keneler, pireler veya diğer eklem bacaklılar gibi vektörler aracılığıyla bulaşır. Bu vektörler patojenleri enfekte bireylerden duyarlı bireylere taşıyabilir ve bulaştırabilir. Vektör

kaynaklı hastalıklar, özellikle en yoksul nüfusları orantısız bir şekilde etkiledikleri tropikal ve subtropikal bölgelerde önemli bir halk sağlığı sorunudur. Sıtma ve zika vektörel bulaşın örnekleri arasında yer almaktadır (13-15).

Enfeksiyonlar vücutta bir dizi adımla gelişmektedir. Bakteri veya virüs gibi patojenler önce konak hücrelere yerleşerek invazyon sürecini başlatmaktadır. Bu durum bağışıklık sistemini tetikleyerek beyaz kan hücrelerinin ve diğer savunma mekanizmalarının aktivasyonuna yol açmaktadır (7). Patojenlerin vücut içinde yayılımı, kan dolaşımı veya doğrudan hücreden hücreye bulaşma gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla gerçekleşmektedir. Girdikleri vücut yüzeyinde (örn. deri, solunum yolu, bağırsak, genital sistem veya konjonktiva) lokalize kalabilir veya belirli organlarda lokalizasyon ile ilişkili olan genel enfeksiyonlara neden olabilirler (16). Ayrıca, SARS-CoV-2 gibi belirli enfeksiyonların kalıcılığı da incelenmektedir. Araştırmalar, SARS-CoV-2'nin insan vücudunda kalıcı olabileceğini ve virüsün uzun vadeli etkilerinin anlaşılması için bu çalışmaların katkıda bulunduğunu göstermektedir (17).

Mikroorganizmanın invazyon bölgesinin yakınında kalıp kalmadığı veya başka bölgelere yayılıp yayılmadığı ve enfeksiyonun ne kadar şiddetli olduğu çeşitli faktörlere bağlıdır. Bunlar; mikroorganizmanın toksin, enzim veya diğer maddeleri üretilip üretilmediği, antimikrobiyal ilaçlara karşı direnç geliştirip geliştirmede, vücudun immün sistem mekanizmalarını bloke edip edemeyeceği ve kişinin immün sisteminin ne kadar iyi çalıştığı gibi faktörlerdir. Birçok hastalık yapıcı mikroorganizmada, neden oldukları hastalıkların şiddetini artıran (virülans) ve vücudun savunma mekanizmalarına direnmelerine yardımcı olan toksinler, enzimler gibi vücudun immün sistemini bloke etme özelliğine sahip yapıları bulunmaktadır. Toksinler, bazı böcek ilaçları gibi insan yapımı ya da bazı organizmalar tarafından üretilenler gibi doğal olabilir. Örneğin, enfekte olmuş bir yaradaki *Clostridium tetani* bakterisi tetanoza neden olan bir toksin üretir. Bazı hastalıklara vücut dışındaki mikroorganizmalar tarafından üretilen toksinler neden olur. Örneğin, yiyeceklerde yaşayan stafilokok bakterileri, stafilokoklar öldürülmüş olsa bile, o yiyecek yenildiğinde gıda zehirlenmesine neden olan bir toksin üretebilir. Çoğu toksin, belirli hücrelerdeki (hedef hücreler) moleküllere özel olarak bağlanan bileşenler içerir. Toksinler tetanoz, toksik şok sendromu, botulizm, şarbon ve kolera gibi hastalıklarda merkezi bir rol oynamaktadır (18-22). *Clostridium perfringens* gibi bakteriler dokuları parçalayan enzimler üreterek enfeksiyonun dokulara daha hızlı yayılmasını sağlamaktadır. Diğer bakteriler ise hücrelere girmelerini ve/veya hücrelerden geçmelerini sağlayan enzimler üretmektedir (23). Böylece enfeksiyon konak içerisinde immün yanıt oluşana kadar gelişerek ilerleme eğilimi göstermektedir.

Enfeksiyon Türleri

Enfeksiyonlar çeşitli şekillerde sınıflandırılmaktadır. En yaygın sınıflandırmalardan biri, enfeksiyona neden olan mikroorganizmanın türüne dayanmaktadır. Enfeksiyonlara neden olan dört ana mikroorganizma türü bulunmaktadır: bakteriler, virüsler, mantarlar ve parazitler. Her mikroorganizma çeşidinin kendine özgü özellikleri vardır ve farklı türde enfeksiyonlara neden olmaktadır (24,25).

Virüs enfeksiyonları

Virüs adı verilen küçük organizmaların neden olduğu hastalıklardır. Bu virüsler vücuda girebilir ve soğuk algınlığı, grip, COVID-19, norovirüs, HPV ve herpes simpleks virüs dahil

olmak üzere çok çeşitli bulaşıcı hastalıklara neden olabilmektedir. Virüsler küçük bir genetik kod parçası içermektedir. Protein ve lipid (yağ) moleküllerinden oluşan bir kılıf (kapsid) ile korunmaktadır. Bu kapsid içerisinde genetik materyal (DNA veya RNA) taşınmaktadır (26). Virüsler bir konağı enfekte eder ve kendilerini bu hücreye bağlarlar. Hücreye girdiklerinde genetik materyallerini serbest bırakmaktadırlar. Konağın genetik materyaline virüsün genetik materyalinin transfekte olması ile virüs çoğalmaktadır (24,27). Bir DNA virüsünün genel enfeksiyon ve replikasyon sürecinde, viral bir partikül ilk olarak dış zarındaki veya kapsidindeki protein reseptörleri aracılığıyla belirli bir konakçı hücreye bağlanır. Daha sonra viral genom konak hücreye yerleştirilir ve burada DNA'sını çoğaltmak için konak hücre enzimlerini kullanır, messenger RNA (mRNA) yapmak için DNA'yı transkribe eder ve mRNA'yı viral proteinlere çevirir. Kopyalanmış DNA ve viral proteinler daha sonra tam viral partiküller halinde birleştirilir ve yeni virüsler konak hücreden salınır. Bazı durumlarda, virüs türevi enzimler konak hücre zarlarını tahrip ederek hücreyi öldürür ve yeni virüs parçacıklarını serbest bırakır. Diğer durumlarda, yeni virüs parçacıkları hücreyi zayıflatan ancak yok etmeyen bir tomurcuklanma süreci ile hücreden çıkar(25). Tüm virüsler konak hücrelerini yok etmemektedir. İnsan papilloma virüsü (HPV) ve Epstein-Barr virüsü (EBV) gibi bazı virüsler, hücreleri kontrolsüz bir şekilde proliferasyona zorlayarak kansere neden olmaktadır(28,29). Dolutegravir, Glecaprevir, Tenofovirafenamidedufumarate (TAF) gibi Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onay almış antiviral ilaçlar, hastalığın semptomlarını hafifletmeye ve tedaviye yardımcı olmaktadır. Virüsün çoğalmasını önleyebilir ya da virüsün etkilerine karşı koymak için konağın bağışıklık sistemini güçlendirmektedirler. Aynı zamanda, kombinasyon ilaçların uygulanması durumunda insan hücreleri için toksik olabilmekte ve diğer yandan virüsler antiviral ilaçlara karşı direnç kazanabilmektedir. Ebola, koronavirüsler (SARS-CoV, SARS-CoV-2) gibi yeni virüslerin ortaya çıkması, mevcut ve yeni ortaya çıkan viral enfeksiyonlarla mücadele etmek için daha iyi antiviral ilaçlar geliştirmek üzere daha yenilikçi stratejilere duyulan ihtiyacı vurgulamaktadır(30).

Bakteriyel enfeksiyonlar

Bakteriler tek hücreli prokaryotik organizmalardır; yani çekirdek, mitokondri veya lizozom gibi organize iç zar yapıları yoktur. Genomları, ökaryotik genomlardan çok daha az proteinle ilişkili olan dairesel, çift sarmallı DNA'dır. Çoğu bakteri, ikili fizyon olarak bilinen bir süreçte büyüyerek ve iki hücreye bölünerek çoğalmaktadır. Bakteriler arasında çeşitli morfolojiler vardır, ancak en yaygın üç tanesi basil (çubuk şeklinde), kok (küresel) veya spirillumdur (sarmal çubuklar). Bakteriyel enfeksiyonlar vücuda yaralar, sıyrıklar ve cerrahi kesiklerin yanı sıra ağız ve burun yoluyla girebilen zararlı bakterilerin neden olduğu hastalıklardır. Bakteriler strep, idrar yolu enfeksiyonları, menenjit ve tüberküloz dahil olmak üzere çok çeşitli bulaşıcı hastalıklara neden olmaktadır. Bakteriyel dış yüzey, konak hücrelerle doğrudan temas eder ve konak doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık tepkilerini aktive eden çeşitli antijenik bileşikleri içeren karmaşık yapılardan oluşmaktadır (25,31). Sonuç olarak, patojenik bakteriler, önemli hayatta kalma fırsatları sağlamak için immün sistemden kaçmayı sağlayan çok çeşitli dış yüzey modifikasyonları geliştirmiştir. Gram-negatif bakteriler, immün tanıma ve temizlenmeyi ortadan kaldırmak için karmaşık dış yüzey makromoleküllerini polisakkarit

bakımından zengin bir kapsülle kaplamaktadır. Bu kapsüller, *Escherichiacoli* (E. coli), *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* tip b, *Neisseria meningitidis* ve diğerlerinin patojenik varyantlarının membranlarındaki daha derin yapıları koruyarak kompleman aktivasyonunu sınırlar ve fagositler tarafından yakalanmayı engellemektedir(32,33). Bakteriyel enfeksiyonların semptomları, bakterinin türüne ve vücudun etkilenen bölümüne bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Yaygın belirtiler arasında ateş, titreme, öksürük ve ishal, enflamasyon, halsizlik, lokal kızarıklık ve şişme yer almaktadır (31,34). Menenjit, orta kulak iltihabı, zatürre, tüberküloz, gastrit, göz enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları, cilt enfeksiyonları ve cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar bazı bakteriyel enfeksiyon örnekleri arasında yer almaktadır. Genellikle bakterileri öldürebilen veya çoğalmalarını engelleyebilen ilaçlar olan antibiyotiklerle tedavi edilmektedir. Tedavide kullanılan spesifik antibiyotik, enfeksiyona neden olan bakteri türüne bağlıdır. Bununla birlikte, antibiyotiklerin aşırı kullanımı antibiyotik direncine yol açmaktadır ve bu da bakteriyel enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmaktadır(35).

Fungal enfeksiyonlar

Mantarlar, sert selüloz veya kitin bazlı hücre duvarlarına sahip olan ve öncelikle sporlar oluşturarak çoğalan ökaryotik, heterotrofik organizmalardır. Mayalar gibi bazıları tek hücreli olmasına rağmen mantarların çoğu çok hücrelidir. Mantar enfeksiyonlarına, mantar sporlarının solunması, kontamine gıda veya su, böcek ısırıkları veya cinsel temas yoluyla bulaşabilen zararlı mantarlar neden olur. Koksidioidomikoz, histoplazmoz, kandidiyaz gibi mantarlar enfeksiyona neden olurlar. Deri, tırnaklar, akciğerler ve cinsel organlar da dahil olmak üzere vücudun çeşitli bölgelerini etkileyebilir. Vücuda solunum, sindirim veya kontamine yüzeylerle temas yoluyla girmektedirler (36,37). Süperfisiyal veya subkutan mantar enfeksiyonlarının yaygın semptomları arasında tahriş, kızarıklık, kaşıntı, şişme ve kabarcık oluşumu yer alır (38,39). Akciğerler, beyin veya iç organlar gibi vücudun diğer bölgelerinde bulunan mantar enfeksiyonları sistemik mantar enfeksiyonlarıdır (40). Mantarların neden olduğu hastalıklara örnek olarak saçkıran ve histoplazmoz (yarasa veya kuş dışkılarıyla bulaşan hafif veya şiddetli olabilen bir akciğer enfeksiyonu) verilebilir. Candida cinsi mayalar, immünsupresif veya antibiyotik tedavisi gören kişilerde vajinal mantar enfeksiyonları ve pamukçuk (bir boğaz enfeksiyonu) gibi hastalıklara neden olabilen fırsatçı patojenlerdir. Antibiyotikler normalde boğazda ve vajinada bulunan bakteri popülasyonunu azaltarak mayanın kontrolsüz büyümesine izin verir (25,41). Hafif mantar enfeksiyonları genellikle reçetesiz satılan antifungal kremler, merhemler veya spreylerle tedavi edilebilir. Daha şiddetli veya sistemik mantar enfeksiyonları, oral, topikal veya intravenöz olarak uygulanabilen reçeteli antifungal ilaçlar gerektirebilir. Polienler, azoller, flusitozin ve ekinokandinler gibi antifungal ajanlar mantar tedavilerinde kullanılmaktadır (38).

Parazit enfeksiyonları

Vücutta yaşayan ve üreyen parazitlerin neden olduğu hastalıklardır. Parazitler, hayatta kalmak için ihtiyaç duydukları besinleri almak için başka bir canlıya (konak) ihtiyaç duyan organizmalardır. Parazit enfeksiyonları genellikle ishal ve kusma gibi semptomlarla birlikte bağırsak hastalıklarına neden olur. Ancak aynı zamanda kaşıntılı deri döküntülerine neden

olabilir veya beyin ya da akciğerler gibi vücudun diğer bölgelerini de enfekte edebilirler. İnsanlarda enfeksiyonlara neden olan üç ana parazit türü vardır: protozoa, helmintler ve ektoparazitler. Protozoalar kana, bağırsak sistemine, beyine, deriye, gözlere ve vücudun diğer bölgelerine bulaşabilen tek hücreli parazitlerdir. Helmintler bağırsak sistemi, deri, beyin ve diğer dokuları enfekte edebilen parazit solucanlardır. Ektoparazitler, deriye yuva yapan ve orada yaşayan böcekler ve araknidlerdir (örümcek benzeri böcekler). Birçok parazitik protozoon ve helmint, genellikle antijenik olan, konak istilas ve parazitizmde rol oynayan sıradışıglikan yapıları ve glikan bağlayıcı proteinler (GBP'ler) sentezler. Bu parazitlere deli dana (Creutzfeldt-Jakob hastalığı) gibi hastalıklara neden olan prionlardahildir (42-44). *Plasmodium*, *Trichinellaspiralis* gibi parazitler hastalıklara neden olmaktadır. Bir parazit enfeksiyonunun görünümü ve prognozu, enfeksiyonun türü ve şiddeti, bağışıklık sisteminin zayıf olması ve standart tedavilere verilen yanıt gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Bazı parazit enfeksiyonları ilaçlara iyi yanıt verirken, diğerleri uzun süre devam edebilir veya tekrarlayabilir (25). Antiparaziter ilaçlar, protozoa, helmintler ve ektoparazitler dahil olmak üzere parazitlerin neden olduğu enfeksiyonların yönetimi ve tedavisinde kullanılan bir grup ilaçtır. Antiparaziter ilaçlar, parazitlerin neden olduğu geniş bir hastalık yelpazesini kapsayan çeşitli ilaç sınıflarını içerir. Sıtma, pnömosistis, tripanozomiyazis ve uyuz gibi hastalıkların tedavisinde değerli ajanlar olarak çeşitli antiparazitik ilaçlar tedavi amaçlı kullanılmaktadır (45). Bazı enfeksiyonların mikroorganizmaların bir kombinasyonundan kaynaklanabileceğini unutmamak önemlidir. Örneğin, bazı solunum yolu enfeksiyonlarına hem bakteriler hem de virüsler neden olabilir. Enfeksiyonların insan vücudu üzerindeki yayılımı ve etkileri, ilgili patojenin türüne bağlı olarak değişebilir. Enfeksiyonların tedavisi spesifik nedene bağlıdır ve bakteriyel enfeksiyonlar için antibiyotikler veya viral enfeksiyonlar için antiviral ilaçlar gibi ilaçları içerebilir. Enfeksiyonları önlemek için düzenli ve doğru el yıkama, enfekte kişilerle yakın temastan kaçınma, aşı olma ve uygun gıda güvenliği önlemlerine uyma gibi iyi hijyen uygulamaları gerekmektedir. Sonuç olarak, geniş kapsamlı çalışmalar ve kişiselleştirilmiş tedaviler ile enfeksiyon bulaşını ve enfektiflerin neden olduğu tahribatı en aza indirmek ve önlemek için daha fazla translaşyonel ve multidisipliner çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Cohen SP, Wang EJ, Doshi TL, Vase L, Cawcutt KA, Tontisirin N. Chronic pain and infection: mechanisms, causes, conditions, treatments, and controversies. *BMJ Med.* 2022;1(1):e000108.
2. Thomson PD, Smith DJ. What is infection? *Am. J. Surg.* 1994;167(1 Suppl.):7–11.
3. Rai KR, Shrestha P, Yang B, Chen Y, Liu S, Maarouf M, et al. Acute Infection of viral pathogens and their innate immune escape. *Front. Microbiol.* 2021;12:672026.
4. Barreto ML, Teixeira MG, Carmo EH. Infectious diseases epidemiology. *J. Epidemiol. Community Health.* 2006;60(3):192–5.
5. Deeks SG, Overbaugh J, Phillips A, Buchbinder S. HIV infection. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2015;1:15035.
6. Stanek G, Wormser GP, Gray J, Strle F. Lyme borreliosis. *Lancet* 2012;379(9814):461–73.
7. Drexler M. How Infection Works. In: What You Need to Know About Infectious Disease. Washington (DC): National Academies Press (US); 2010.p.4–10.
8. Guo S, Yu J, Shi X, Wang H, Xie F, Gao X, et al. Droplet-transmitted infection risk ranking based on close

- proximity interaction. *Front. Neurobot.* 2020;13:113.
9. Mao N, An CK, Guo LY, Wang M, Guo L, Guo SR, et al. Transmission risk of infectious droplets in physical spreading process at different times: A review. *Build. Environ.* 2020;185:107307.
 10. Doğan SA, Salt Ö. Fekal oral yolla bulaşan enfeksiyonlar ve korunma yolları. *Türkiye Klin.* 2015;8(1):8–53.
 11. Whittier CA. Fecal–Oral Transmission. *Int. Encycl. Primatol.* 2017;20(6):1–1.
 12. Guo M, Tao W, Flavell RA, Zhu S. Potential intestinal infection and faecal–oral transmission of SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2021;18(4):269–83.
 13. Gutiérrez-Bugallo G, Piedra LA, Rodriguez M, Bisset JA, Lourenço-de-Oliveira R, Weaver SC, et al. Vector-borne transmission and evolution of Zika virus. *Nat. Ecol. Evol.* 2019;3(4):561–9.
 14. İnci A, Düzlü Ö. Vektörler ve vektörlerle bulaşan hastalıklar. *Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg.* 2009;6(1):53–63.
 15. van Seventer JM, Hochberg NS. Principles of infectious diseases: transmission, diagnosis, prevention, and control. *Int. Encycl. Public Heal.* 2017;6(2):22–39.
 16. Fenner F, Bachmann P, Gibbs E, Murphy F, Studdert M, White D. Pathogenesis: infection and the spread of viruses in the body. *Vet. Virol.* 1987;7:133–52.
 17. Stein SR, Ramelli SC, Grazioli A, Chung JY, Singh M, Yinda CK, et al. SARS-CoV-2 infection and persistence in the human body and brain at autopsy. *Nature* 2022;612(7941):758–63.
 18. Otto M. Staphylococcus aureus toxins. *Curr. Opin. Microbiol.* 2014;17(1):32–7.
 19. Schmid-Hempel P. Immune defence, parasite evasion strategies and their relevance for “macroscopic phenomena” such as virulence. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2009;364(1513):85–98.
 20. Peterson JW. Bacterial Pathogenesis. In: Baron S, ed. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
 21. Cohen JE, Wang R, Shen RF, Wu WW, Keller JE. Comparative pathogenomics of *Clostridium tetani*. *PLoS One* 2017;12(8):1–24.
 22. Kassem II. Chinks in the armor: The role of the nonclinical environment in the transmission of *Staphylococcus* bacteria. *Am. J. Infect. Control* 2011;39(7):539–41.
 23. Labbe RG, Juneja VK. *Clostridium perfringens*. In: Dood CER, Aldworth T. et al. eds. *Foodborne Diseases*. Third Edit. Academic press. Elsevier Inc.; 2017. p.235-42.
 24. Sterling JC. Viral infections. In: Rook's Textbook of Dermatology. Ninth Edition, Wiley Online Library; 2016.
 25. National Institutes of Health (US); Biological Sciences Curriculum Study. Bethesda (MD). Understanding Emerging and Re-emerging Infectious Diseases. İçinde: NIH Curriculum Supplement Series [Internet].; 2007. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20370/].
 26. Silasi M, Cardenas I, Kwon JY, Racicot K, Aldo P, Mor G. Viral Infections During Pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2015;73(3):199–213.
 27. Trépo C, Chan HLY, Lok A. Hepatitis B virus infection. *Lancet.* 2014;384(9959):2053–63.
 28. Tsao SW, Tsang CM, Lo KW. Epstein-barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2017;372(1732).
 29. Brianti P, De Flaminio E, Mercuri SR. Review of HPV-related diseases and cancers. *New Microbiol.* 2017;40(2):80–5.
 30. Tompa DR, Immanuel A, Srikanth S, Kadirvel S. Trends and strategies to combat viral infections: A review on FDA approved antiviral drugs. *Int. J. Biol. Macromol.* 2021;172:524–41.
 31. Tekin M, Çalışkan MN, Kayak D, Konca Ç. C-Reaktif protein bakteriyel enfeksiyon tanısında güvenilir bir belirteç midir? *Adıyaman Üniversitesi Sağlık Bilim. Derg.* 2017;3(2):475–86.

32. van Elsland D, Neefjes J. Bacterial infections and cancer. *EMBO Rep.* 2018;19(11):1–11.
33. Gül Ü. Derinin sık görülen bakteriyel enfeksiyonları. *Ankara Med. J.* 2016;16(1):98-114.
34. Doron S, Gorbach SL. Bacterial Infections : Overview. In:Heggenhougen HK. *Int. Encycl. Public Heal.* 2008. p.273-282.
35. Kolář M. Bacterial infections, antimicrobial resistance and antibiotic therapy. *Life* 2022;12(4):10–3.
36. Garber G. An overview of fungal infections. *Drugs* 2001;61(Suppl.1):1–12.
37. de Pauw BE. What are fungal infections? *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 2011;3(1):e2011001.
38. Loh JT, Lam KP. Fungal infections: Immune defense, immunotherapies and vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2023;196:114775.
39. Aissat FZ, Denning DW. Fungal infections in Algeria. *Mycoses* 2023;66(7):594–603.
40. Kuş C, Alp M. Sistemik mantar enfeksiyonlarının tedavisinde yeni hedefler ve yeni bileşikler. *Ankara Ecz. Fak. Derg* 2002;31(2):91–131.
41. Van Thiel DH, George M, Moore CM. Fungal Infections: Their diagnosis and treatment in transplant recipients. *Int. J. Hepatol.* 2012;2012:1–19.
42. Meyer CJ, Cassidy KA, Stahler EE, Brandell EE, Anton CB, Stahler DR, et al. Parasitic infection increases risk-taking in a social, intermediate host carnivore. *Commun. Biol.* 2022;5(1):1–10.
43. Abu-Shakra M, Ling E, Shoenfeld Y. Parasitic infection and autoimmunity. *Infect. Autoimmun.* 2015:621–61.
44. Cummings R, Turco S. Parasitic Infections. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al. eds. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.
45. Campbell S, Soman-Faulkner K. Antiparasitic Drugs. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.

DENEY HAYVANI ARAŞTIRMALARINDA TEMEL PRENSİPLERİ

EXPERIMENTAL ANIMAL RESEARCH AND BASIC PRINCIPLES

Dr. Canberk YILMAZ

Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, Konak- İzmir
 Tel no: 0530.461 66 80, E-posta: canberk.yilmaz1996@outlook.com, ORCID:0000-0002-0049-7614

ÖZ

Bugün kullandığımız bilim ve teknoloji dün yaşayan bilim insanlarının merak ettikleri soruların cevaplarıdır. Bilim insanları doğal olayların mekanizmasını çözmek için tabiatı taklit edildiği deneysel araştırma yöntemi kullanmaktadır. Deneysel araştırmalar, tabiatta olmuş ya da olması muhtemel olayların laboratuvar ortamında kontrollü olarak ortaya konulmasına deneysel araştırma denir. Normal biyolojik olayları taklit eden ve benzerlik gösteren düzenlemelere deneysel modelleme denir. Deneysel araştırmaların temel prensibi tekrar edilebilirliktir. Deney araştırmalarında tekrar edilebilirlik, deney sonuçlarının zamana, mekâna ve kişiye bağlı olmadan aynı şartlar altında yapıldığında aynı ya da benzer deney sonuçlarının tekrar üretilmesidir. Aynı şartlar altında deney tekrar edildiğinde benzer sonuçlar elde edilemiyorsa deney sonuçlarına güvenilirlik azalacaktır. Deneylerin tekrar edilebilmesini sağlayan temel öge standardizasyondur. Deneysel araştırmalarda standardizasyon deneyi uygulayan kişinin, deneyin yapıldığı koşulların, deneyde kullanılan malzeme, alet, cihaz, ekipman, hayvanlar dâhil tüm unsurların standart tanımlanabilir olması gerekir. Hayvan deneyleri planlamasında 3R etik ilkeler göz önünde tutularak hayvan araştırmalarına alternatif olmadığı ve hayvan deneylerine duyulan ihtiyaç ortaya koyulması noktasına kanaat getirilmelidir. Daha sonra hayvan türlerinin seçimi ve deneylerde kullanılmak üzere gerekli hayvan sayısının hesaplanması gerekir. Deneysel prosedür uygulamalar sırasında ve sonrasında prosedür şiddetine uygun olarak alınacak önlemler, ağrının değerlendirilmesi ve yönetimi, deney hayvanlarına sakinleştirici, ağrı kesici ve anestezi uygulanması, insani son noktaların oluşturulması ve ötenazi uygulamalarının tanımlanması gereklidir.

Anahtar Sözcükler: Deneysel Hayvan Araştırma, Temel Prensipleri, Standardizasyon

SUMMARY

The science and technology we use today are the answers to the questions that scientists living yesterday wondered about. Scientists use experimental research method in which nature is imitated to unravel the mechanism of natural events. Experimental research is the controlled investigation of events that have occurred or are likely to occur in nature in a laboratory environment. Arrangements that mimic and resemble normal biological events are called experimental modelling. The basic principle of experimental research is repeatability. Repeatability in experimental research is the ability to reproduce the same or similar experimental results when done under the same conditions, regardless of time, place or person. If similar results cannot be obtained when the experiment is repeated under the same conditions, the reliability of the test results will decrease. The main element that enables experiments to be repeated is standardization. In experimental research, the person performing the standardization experiment, the conditions in which the experiment is carried out, and all elements used in the experiment, including the materials, tools, devices, equipment and animals, must be standard and identifiable. In planning animal experiments, the 3R ethical principles should be taken into consideration and it should be concluded that there is no alternative to animal research and the need for animal experiments should be demonstrated. Then, it is necessary to select the animal species and calculate the number of animals required to be used in the experiments. Precautions to be taken during and after experimental procedures in accordance with the severity of the procedure, evaluation and management of pain, administration of sedatives, painkillers and anesthesia to experimental animals, establishment of humane end points and definition of euthanasia practices are required.

Keywords: Experimental Animal Research, Basic Principles, Standardization

Deneyisel Hayvan Araştırmalarında Temel İlkeler

Deneyisel Hayvan Araştırma Sonuçlarının Geçerliliği ve Uygulanabilirliği: Deneyisel hayvan modellerinin sonuçlarının insan ve hayvan tıbbındageçerli ve uygulanabilir olması için uygun hayvan modelinin seçilmesi şarttır. Translasyonel tıpta, preklinik hayvan deneyi sonuçlarının genelleştirilmesi (geçerli) ve uyarlanması (uygulanabilir) sağlayan en temel unsur türler arasındaki homolojidir. Homoloji, türler arasındaki morfolojik ve fizyolojik benzerliği ifade eder. Araştırmada kullanılan hayvan modeli ile insan arasındaki evrimsel açıdan benzerlik bu açıdan önemlidir.

Filogenetik olarak insan ile hayvan türleri arasında büyük farklılıklar olsa da bazı temel özellikler açısından benzerlikler vardır. Hayvan modellerinin önemli parametreleri homoloji, analogi ve aslına uygunluk kavramlarını içerir. Homoloji, ortak biçimden gelen yapısal benzerliğe sahip karşılık gelen parçaların morfolojik kimliğini ifade eder. Homolog modeller bu nedenle genetik benzerliğe sahiptir. Bir modelin homolog olarak kabul edilmesi için gereken genetik benzerlik derecesi değişkendir. Analogi, işlev veya görünüş yönünden benzerlik olmasına karşılık gelişimi ve genetik temeli farklı olan yapıları ifade eder (benzerliğin kalitesine ifade eder). Bu nedenle, analog benzerlikler sadece işlevsel benzerliğe sahiptir. Genel olarak, hayvan modelleri bu özelliklerin her ikisini de çeşitli derecelerde sergiler ve bu nedenle bunların bir melezi olarak kabul edilebilir (1,2). Başka bir deyişle aynı araştırma aynı modelle tekrarlanırsa aynı sonuca ulaşılabilmenin bir ölçüsüdür (geçerlilik ölçüsü). İşte bu noktadan yola çıkarak model hayvan ve organizma seçiminde benzer özellikleri göz önüne alınarak, deney sonuçları geçerliliği ve uygulama bilirliliği hedeflenmelidir (Şekil 1). Translasyonel tıpta araştırmacılarının, deney hayvanı araştırma tasarımı yaparken deney sonuçlarının insanlarda geçerli ve uygulanabilir olması açısından filogenetik sınıflandırmada insana yakın bir model hayvan seçmesi doğru yaklaşımdır. Bununla beraber, model hayvan seçiminde araştırma sorusunun özelliğine göre en uygun hayvan türü ve soyu seçilmelidir. Ayrıca insanın yaşam dönemi uygun model hayvan yaşam dönemini ile araştırma sorusunun çıktığı insan yaşam dönemini taklit etmesi, üzerinde durulması gereken diğer bir konudur. Deney hayvanı indüksiyon veya uygulama süresini belirlemede, insan yaşam dönem süresi ile deney hayvanın aynı döneminin süresinin arasında yapılan korelasyonu ile deney uygulama süresi belirlenmelidir. Hayvan modelinden elde edilen deney sonuçlarının insanlara uyarlanmasında model hayvandaki indüksiyon ile ortaya çıkan patofizyolojik değişikliklerin, insanda gerçek hastalığın gerçekleştiği patofizyolojik değişiklikleri çok iyi taklit etmesi sonucunda yüksek model uyumu gereklidir. Araştırmacılar, hayvan modeli seçiminde araştırma sorusunu ayrıntılı düşünüp olgunlaştırarak deneyisel modele karar vermelidir. Model hayvan seçim sonuçların geçerliliği üzerinde en etkili unsurdur (2,3).

Deneyisel Hayvan Araştırmalarında Standardizasyon Önemi: Deneyisel araştırma yöntemleri içinde hayvan modellerinin özel bir yeri ve önemi vardır. Bugünkü modern insan ve hayvan tıbbın gelişmesinde deneyisel hayvan modelleri sonuçlarının katkısı çok büyüktür. Deneyisel araştırmaların temel prensibi tekrar edilebilirliktir. Deney araştırmalarında tekrar edilebilirlik, deney sonuçlarının zamana, mekâna ve kişiye bağlı olmadan aynı şartlar altında yapıldığında aynı ya da benzer deney sonuçlarının tekrar üretilbilmesidir. Aynı şartlar altında deney tekrar edildiğinde benzer sonuçlar elde edilemiyorsa deney sonuçlarına güvenilirlik azalacaktır. Deney-

lerin tekrar edilebilmesini sağlayan temel öge **standardizasyondur**. Deneysel araştırmalarda standardizasyon deneyi uygulayan kişinin, deneyin yapıldığı koşulların, deneyde kullanılan malzeme, alet, cihaz, hayvanlar da dâhil tüm unsurların standart tanımlanabilir olmasıdır (1,4).

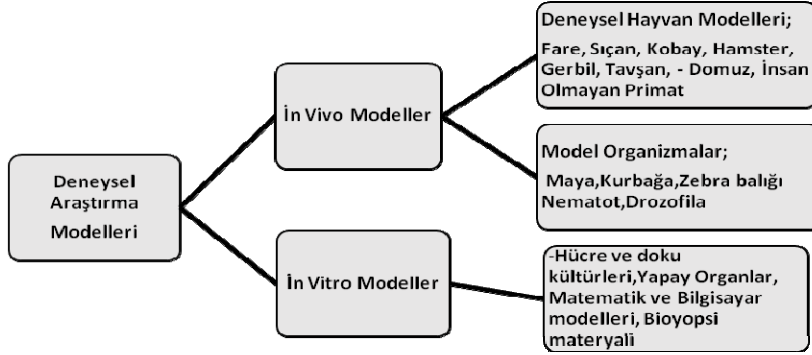


Şekil 1. Deneysel Hayvan Modellerinde Geçerlilik/ Uygulanabilirlik

Deneysel Hayvan Araştırmalarında Temel Etik Kurallar: Deneysel hayvan model seçimi yapılırken hayvan deneyleri etik kurallarının mutlaka göz önüne alınması gerekir. Hayvan deneyleri temel etik kuralları 1959 yılında Russel ve Burch'ın ortaya koyduğu “**3R**” ilkesine dayanır. Daha sonra bu 3R kuralına bir “R” daha ilave edilerek 3R+R kuralı hayvan deneyleri temel etik kuralları ortaya koyulmuştur. 3R+R kuralları İngilizcedeki **Replacement**, **Reduction**, **Refinement** ve **Responsibility** kelimelerinin ilk harfleri kısaltılmalarını ifade eder. **Replacement**, deneysel araştırmalarda hayvan yerine alternatif deneysel yöntemler olan bilgisayar modelleri, hücre kültürü, doku kültürleri, tek hücreliler, omurgasızlar, yapay organlar, matematik ve bilgisayar modelleri gibi invitro modellerin kullanılmasına öncelik verilmesi kuralıdır. Hayvan deneyleri planlamasında 3R etik ilkeler göz önünde tutularak hayvan araştırmalarına alternatif olmadığı ve hayvan deneylerine duyulan ihtiyaç ortaya koyulması noktasına kanaat getirilmelidir (5). Tüm deney hayvanı proje ve araştırmalarında bu kuralla değerlendirilir. Eğer aynı araştırma sorusunun cevaplanmasında alternatif bir yöntem var ise hayvan kullanımına kesinlikle izin verilmez. **Reduction** kuralı birinci kuralı yani araştırma sorusunun cevaplanmasında alternatif yöntem yetersiz kaldığı sonucu ulaşırsa hayvan kullanımına izin verir Hayvan kullanılması zorunlu olduğu çalışmalar için en az hayvan kullanılarak araştırmanın yapılması kuralıdır. En az hayvan kullanmak için modeldeki prosedürün model başarısı veya etki ölçüsü hesaplanarak hayvan sayısı tespit edilmektedir. **Refinement kuralı**, hayvan deneylerinin prosedürlerin en az ağrı, acı ve ıstırap verecek prosedürler tercih edilmeli ve hayvanlarda uygulanan prosedürlerin iyileştirilmesi ve hayvan refahını gözeterek en uygun yöntemin seçilmesi kuralıdır. 3R kuralına daha sonra katılan dördüncü kural **responsibility**, hayvan deneyi yürütücülerinin sorumluluklarını yerine getirmesi kuralıdır (6). Bu 4R kuralı hayvan deneylerinin temel etik kurallarını oluşturmaktadır. Deneysel hayvan araştırma yürütücülerinin, 4R kurallarının algoritması çerçevesinde hayvan modeli seçmeli ve tasarım yapılmalıdır.

Deneysel Araştırma Modelleri: Tabiatı olmuştuk ya da olması muhtemel olayların laboratuvar şartlarında kontrollü olarak ortaya konulmasına deneysel araştırma denir. Deneysel araştırmalar standart tanımlanabilir şartlar altında tekrarlandığında zamana, mekâna ve

araştırmacıya bağlı olmaksızın aynı sonuca ulaşılan araştırmalardır Doğal normal biyolojik olaylara benzerlik gösteren düzenlemelere deneysel araştırma modeller denir (Şekil 2).



Şekil 2. Deneysel Araştırma Modelleri

Deneysel araştırma modellerini genel olarak in vivo ve in vitro deneysel modeller olmak üzere iki grupta toplanabilir. İn vivo modeller, model hayvanlar ve model organizmalar olmak üzere iki ayrıdır. Deneysel hayvan modelleri, modele temel oluşturacak hastalık ya da patolojinin, gerçek görülenlere etiyolojik, patolojik ve semptomatik olarak benzetmesi gerekir. Tüm deneysel hayvan modelleri kullanılması için hayvan deneyleri etik kurulunun izin vermesi gerekir iken model organizmaların kullanımı için etik kurul iznine tabi değildir. İn vitro modeller de deney hayvanı yerine kullanılabilecek alternatif yöntemler hücre ve doku kültürleri, yapay organlar, organoidler, matematik ve bilgisayar modelleri, biyopsi materyali olup ve etik kurul iznine tabi değildir (3).

Deneyisel Hayvan Modelleri

Hayvan modelleri, modern tıbbın birçok başarısının merkezinde yer almış ve insan fizyolojisi, anatomisi, biyokimyası gibi alanlardaki temel bilgilerin elde edilmesinde hayvan modelleri çok önemli katkıda bulunmuştur. Hayvan modelleri temel, cerrahi ve dâhili bilimlerin gelişmesinde çok önemli roller oynamıştır. Translasyonel tıp araştırmalarında deneysel hayvan modellerinin sonuçları çok değerlidir (7). İnsan hastalıklarının taklit eden onun yerine kullanılabilecek alternatif modeller ne yazık ki çok sınırlıdır. Memeli hayvanlar ve İnsan arasındaki dikkate değer anatomik ve fizyolojik benzerlikleri tıp araştırmalarında tercih sebebi olmaktadır. İnsanlar ve memeli hayvanlar modelleri biyolojik özellikler yönünden birbirine oldukça benzer özellikleri olduğu için araştırmalarda avantaj sağlar. Memeli hayvanların ve insanlar arasındaki yapısal benzerlikler araştırma sonuçlarının geçerliliği açısından önemlidir. Deneysel hayvan sonuçlarının insanlarda deney sonuçlarının geçerli ve uygulanabilir olması için filogenetik olarak insana yakın hayvanların seçilmesi gerekir. Araştırmacının hipotezi ve araştırma sorusuna göre hayvan modeli seçilirken aynı zamanda translasyonel tıp açısından uygulanabilir ve geçerli bir hayvan modeli seçmek gereklidir. Araştırmacı araştırma sorusunun özelliğine göre model organizmaları ve diğer alternatif yöntemi tercih edebilir. Bilimsel araştırma özgürlük kısıtlamadan temel hayvan deneyleri etik kurallarına bağlı kalarak deneysel modeline karar verilmelidir. Bununla beraber araştırmacı deney sonuçlarını insanda kullanmak istiyor ise filogenetik sistematikte insana yakın olan hayvan modeli seçmelidir (7).

Deneyisel hayvan modelinin seçimi sürecinde kullanılacak model ile elde edilecek sonuçların geçerliliği, uygulanabilirliği ve etik onay sürecini kısacası tüm deneyi etkileyecek bir karar verme süreci olduğunu asla unutmamalıdır. Bu süreci ünlü düşünür Konfüçyüs'ün şu sözü ile açıklamak daha doğru olacaktır. *Konfüçyüs "Ne aradığını bilmeyen bulduğunu anlayamaz"* diyerek neyi-nerede-nasıl arayacağımızı bilememizin önemli olduğuna işaret etmektedir. Genel olarak deneyisel hayvan modelleri(Poyraz Ö, 2000; Yılmaz O, 2021)ini 4 grupta toplamak mümkündür(4). İnsan hastalıklarının deneyisel hayvan modellerini spontan (kendiliğinden gelişen) modeller, negatif modeller, olası modeller ve indüklenmiş (uyarılmış) modeller olmak üzere dört grupta toplanır. *Spontan modeller*, genetik nedenlerle kendiliğinden gelişen ve insanlardaki hastalığa benzer patoloji ve belirtiler-semptomlara benzerlik gösteren modellerdir (bu tip modeller inbred ve outbredsoylarda). *Negatif modeller*, belirli bir hastalığın kesinlikle gelişmediği hayvan tür, ırkı veya soylardır. Belirli bir hastalık veya tepkinin şekillenmemesinin araştırılıp çözülmesinde bilimsel anlamda büyük yararlar sağlar. *Olası Modeller*: Modele esas teşkil eden hastalık ilk önce hayvanlarda görülmüş ve tanımlanmıştır. Daha sonra insanlarda da tanımlanmasına çalışılan modellerdir. *İndüklenmiş (uyarılmış) modeller*, cerrahi yöntem, kimyasal, fiziksel ve biyolojik aktivitesi olan maddelerin hayvanlara verilmesiyle belirli bir hastalık veya bozukluk oluşturulan modellerdir. Modele temel oluşturacak hastalık ya da patolojinin, modelin olduğu organizmada oluşan patolojinin gerçek görülenlere etiyolojik, patolojik ve semptomatik olarak benzermesi gerekir. Transgenik hayvanlarda bir indüklenmiş hayvan modelleridir (8,9).

Enfeksiyon hastalıkları, toplumu tedirgin eden hastalık etkeni özelliğine göre çok ciddi sonuçları olan hastalıklardır. Enfeksiyon hastalıkları bakteri, virüs, mantar ve parazit gibi farklı etkenler ile geliştiği için oluşan hastalık tablosunun çok bilinmeyen sorularının olması, farklı deneyisel modellerin kullanılmasını zorunlu kılmaktadır. Araştırmacılar her enfeksiyonun patogeneze özelliklerini, bulaşma, tedavi ve koruyucu ajanlarını araştırmak için araştırma sorusu ve hipoteze uygun olan in vitro ve in vivo deneyisel modeller tercih etmeleri gerekir. İn vivo deneyisel enfeksiyon modelleri için laboratuvar model organizmalar (sirke sineği, nematot, ve diğer), laboratuvar hayvan modelleri (fare, sıçan, tavşan) ve büyük memeli enfeksiyon hayvan modelleri (köpek, domuz, primatlar) gerektikçe kullanmak zorunda kalmaktadırlar. Bunun yanında araştırma sorusuna göre in vitro modeller olarak hücre ve doku kültürü, yapay organlar, matematik ve bilgisayar modelleri kullanılmaktadır.

Deneyisel Hayvan Modeli Seçiminde Kriterleri Kararlar

Her yıl dünya genelinde milyonlarca hayvan kullanılmaktadır (10). Deneyisel hayvan araştırmalarında hayvan modeli seçiminde temel ölçüt araştırmacının hipotezine, araştırma sorusuna ve beklentilerini karşılaması olarak kabul edilmelidir. Seçilen hayvan türü, soyu, yaş, cinsiyet, ağırlıklarının modelin oluşturulmasına neden olan hastalığı görüldüğü âlemi en doğru yansıtmalı, hastalığın kliniğe uygun olarak yavru, genç, erişkin veya yaşlı hayvan seçmek en kritik özelliğini oluşturur ve bu durum elde edilen sonuçların güvenilirliği ve geçerliliği açısından da önemlidir. Seçilen tür ya da soyun incelenecek maddeye duyarlılık, tercih edilen hayvanın genetik ve mikrobiyolojik standardizasyonu, beden büyüklüğü ve manüplasyon-operasyon kolaylığı (kan, doku yeterliliği), maliyet, etik ilkeler (öncelik küçük cüsseli hayvanlar) ve seçilen türün barınma, besleme ve yetiştirme imkânları olması gerekir.

Seçilen hayvan türünde tüm uygulamaların için uygun olduğu gözden geçirilmesi gerekir. Hayvan modeli seçimi için çevre standartları kontrol etmek önemlidir. Uygun sağlık standart veya mikrobiyolojik durumu göz önüne almak, bu konuda çalışan personelin yeterince eğitim ve iş tecrübesine sahip olmalıdır (teknisyen, veteriner hekim, mühendis, lojistik destek vb. personel), tedarikçilerle sıkı işbirliği (hayvan, malzeme, ekipman, servis), deneme öncesi uygulamalar ve alt yapısının oluşturulması, deneme gruplarının homojenite çok yüksek seçilmeli (yaş, ağırlık, genetik olarak homojen), ilk denemeler karmaşık gruplar yerine basit karşılaştırılabilir gruplardan kurulmalıdır, hayvan alıştırma uygun mizaç, anestezi yöntemini belirleme, ötenazi yöntemi belirleme, istatistiksel yöntemin belirlenmesi, deney uygulanmasında ortaya çıkabilecek biyolojik ve çevresel riskler (biyolojik, nükleer vb.), deneyde izlenecek sağlık parametreleri (gerekli alt yapıyı hazırlamak için gereklidir), laboratuvar hayvancılığı alt yapı sorunlarının giderilmesi (uygun kateter, respiratör, vb.), ulusal ve uluslararası yasal düzenleme ve etik uygulamalar (1,2,11).

Deneysel hayvan araştırma tasarımında önemli noktalar

1. Araştırma sorusunun veya klinikte karşılaşılan sorunun tanımlanması,
2. Proje araştırma ekibinin oluşturulması,
3. Gerekirse en az hayvan ve uygun hayvan modeli bulunması için ön çalışma,
4. Hayvan manuplasyon tecrübesi ve prosedürü standart oluşturulması,
5. Değerlendirme yöntemlerinin belirlenmesi (biyokimyasal, histopatoloji vb.),
6. Sonuçların yorumlanması ve literatüre katkı (interdisipliner bir yaklaşımla),
7. Deney sonuçlarının geçerliliği ve uygulama bilirliliği,

Deneysel Model Hayvan Seçimi Kriterleri

- Hayvan türü/tipi seçimi
- Yaş, cinsiyet, ağırlık (kliniğe uygun olarak yavru, genç, erişkin, yaşlı)
- İncelenecek maddeye duyarlılık
- Elde edilen sonuçların güvenilirliği ve geçerliliği
- Tercih edilen hayvanın genetik ve mikrobiyolojik standardizasyonu
- Beden büyüklüğü ve manüplasyon-operasyon kolaylığı (kan, doku yeterliliği)
- Maliyet
- Etik ilkeler (öncelik küçük hayvan)
- Seçilen türün barınma, besleme ve yetiştirme imkânları olması
- Eğitilmiş personel (hayvan bakıcı, teknisyen veteriner hekim)
- Deneme öncesi uygulamalar ve alt yapısının oluşturulması
 - Deneme gruplarının homojenite çok yüksek seçilmeli (yaş, ağırlık, genetik vb.)
 - Deneme basit karşılaştırılabilir gruplardan kurulmalıdır
 - Deneme hayvan çalışmaya uygun mizaçta olmalıdır
 - Deneme hayvan uygun anestezi yöntemini belirleme
 - Deneme hayvanına göre ötenazi yöntemi belirleme

- Deneyssel hayvan araştırmasına uygun istatistiksel yöntemin belirlenmesi
- Deneme sonucu ortaya çıkabilecek biyolojik ve çevresel riskler (biyolojik, nükleer vb.)
- Deneyde izlenecek sağlık parametreleri (gerekli alt yapıyı hazırlamak için gereklidir)
- Deneme hayvan türü uygun uygun kateter, respiratör gibi ekipmanların bulunması
- Ulusal/Ülusallararası yasal düzenleme ve hayvan araştırma etik uygulamalar

Deneyssel hayvan araştırma tasarımı yapılırken, proje personeli, deney hayvanı kullanımının gerekçeleri ve seçilen türün uygunluğu, hayvanların temini ve barındırma bilgileri detay proje bilgilerinde verilmelidir. Ayrıca hayvanlarda anestezi ve analjezi, deneylerin sonlandırılması, ötenazi, deney sırasında veya sonrasında ortaya çıkabilecek biyolojik ve çevresel risk faktörleri, deney hayvanında izlenecek olası sağlık parametre ayrıntılı olarak düşünülmeli ve ilgi etik kurula bildirilmelidir (12).

Enfeksiyon hastalıklarında oluşum mekanizmasına bakıldığında son derece karmaşıktır. Bu nedenle ideal bir deneyssel enfeksiyon modeli bulmak çoğu zaman mümkün değildir. Bu yönü ile insanlardaki gerçek görülen hastalığın tüm belirtilerini ve oluşum mekanizmasını hayvanlarda çoğu zaman görülemeyebilir. Bu yüzden belirtilerin bazılarının deneyssel modelde görmek bile yeterli olacaktır. Enfeksiyon ajanlarının hastalık oluşturma yetenekleri ve konakçı duyarlılığı göz önüne alındığında türler arasında temel bariz farklılıklar göstermektedir. İdeal enfeksiyon hayvan modellerinde insanlarda görülen enfeksiyon klinik ve laboratuvar sonuçları ile taklit etmesi beklenir. Ne yazık ki türlerin arasında temel fizyolojik, immünolojik ve türe özgü farklılıklardan dolayı birebir taklit edebilen bir hayvan modeli ile çalışmak oldukça zordur. Bu nedenle enfeksiyon hastalık araştırmalarında araştırmacıların ihtiyaçları doğrultusunda farklı in vitro ve in vivo çok sayıda deneyssel enfeksiyon modelleri kullanmayı zorunlu kılmıştır. İn vitro modeller olarak matematik ve bilgisayar modellerinde (insiliko), izole proteinler ve nükleik asitler, genetik olarak homojen hücre hatları, insan hastalardan veya hayvanlardan elde edilen materyaller, kültürde büyüyen organoidlerden ve hasta biyopsileri materyali gibi alternatif deneyssel yöntemler kullanılmaktadır. Alternatif yöntemler yetersiz kaldığı durumlarda ise in vivo deneyssel kanser modelleri olan model organizmalar maya, kurbağa (*Xenopus laevis*), nematod (*Caenorhabditis elegans*, sirke sineği (*Drosophila melanogaster*), zebra balığı (*Danio rerio*) model hayvanlar fare, sıçan, tavşan, köpek, pirimat, transgenik domuz kullanılmaktadır (1).

İnsan ve hayvan enfeksiyon hastalıklarının çok aşamalı (biyolojik etkenin bulaşma, yerleşimi, çoğalması ve hastalık oluşturma) gelişimini taklit eden temel deneyssel modeller (model hayvanlar) hastalığın patogenezinin karmaşıklığını rasyonalize etmek mekanizmasını aydınlatmak için önemli katkı sağlamaktadır. Diğer deneyssel modeller model organizmalar ve in vitro deneyssel modelleri tüm enfeksiyon sürecini taklit etmezler fakat ilaç ve aşı geliştirme süreçlerinde kullanılmaktadır. Deneyssel hayvan modelleri insan enfeksiyonlarına karşı ilaç ve aşı geliştirilmesinde de prelinik araştırmasında kullanılan değerli temel araştırma yöntemidir. Farklı enfeksiyon hayvan modellerinden elde edilen bilgiler enfeksiyon hastalıklarının patogenezi ve korunmasında hakkında fikir edinmemizi sağlamıştır. Günümüzde enfeksiyon ajanlarına karşı duyarlılığın artırılması için insanlaştırılmış hayvan modelleri üzerinde

çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bunun en son örneğini SARS-CoV-2 virüsüne karşı geliştirilen duyarlı fare modeli verilebilir. Enfeksiyon hastalıklarla ilgili temel ve klinik öncesi çalışmalar için geleneksel hayvan modellerinin yanında transgenik hayvan modelleri kullanımının önemide gün geçtikçe artmaktadır. Model organizmalarının ve model hayvanlarının, enfeksiyon hastalıkların araştırma modelleri olarak önemli ve tamamlayıcı rolleri vardır. Genetiği değiştirilmiş hayvan modelleri ilaç ve aşı geliştirilmesi deneylerinde son yıllarda yoğun olarak kullanılmaktadır. Enfeksiyon hastalık araştırmalarında biyolojik ajanların insan ve çevre sağlığı güvenliği açısından göz önünde tutularak deneysel model seçimi, tesisi altyapısı yeterliliklerine göre değişmekte ve belirlenmektedir.

Sonuç olarak hayvan deneyleri planlamasında 3R etik ilkeler göz önünde tutularak hayvan araştırmalarına alternatif olmadığı ve hayvan deneylerine duyulan ihtiyaç ortaya koyulması noktasına kanaat getirilmelidir. Daha sonra hayvan türlerinin seçimi ve deneylerde kullanılmak üzere gerekli hayvan sayısının hesaplanması gerekir. Deneysel prosedür uygulamalar sırasında ve sonrasın prosedür şiddetine uygun olarak alınacak önlemler, ağrının değerlendirilmesi ve yönetimi, deney hayvanlarına sakinleştirici, ağrı kesici ve anestezi uygulanması, insani son noktaların oluşturulması ve ötenazi uygulamalarının tanımlanması gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Yılmaz O, Çalışır M. Deney Hayvanları ve Enfeksiyon Modelleri. Badur S, Abacıoğlu H, Batıgül Ö, editörler. Enfeksiyon Patogenezi ve Bağışıklık. 1. Baskı. İstanbul; Akademi Yayınları; 2015.p.1415-50.
2. Yılmaz O. Gökmen N. Türkiye’de Hayvan Deneyleri Hakkındaki Yasalar Ve Temel İlkeler. In: Ortopedi ve Travmatolojide Deneysel Hayvan Modelleri. 1.Baskı. Pelin ve Tipo Matbaacılık San. Tic. Ltd.; 2015.p.15-25.
3. Yılmaz O, Yılmaz C. Kanser araştırmalarında model hayvanlar ve organizmalar. Aktaş S, Alakavuklar M, editörler. Klinisyenler İçin Temel Onkoloji. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2021.p.95-101.
4. Yılmaz O. Deney Hayvanı Araştırmalarında Etik Süreç ve Değerlendirilmesi. Ögüt MF, Kırkım G, Başak S, editörler. Tüm yönleriyle Odiyoloji. 1. Baskı. İzmir; US Akademi; 2021.p. 930-50.
5. Shim J, Kim J. Considerations for experimental animal ethics in the research planning and evaluation process. *Kosin Med J.* 2022;37(4):271–7.
6. Festing S, Wilkinson R. The ethics of animal research. *EMBO Rep.* 2007;8(6):526–30.
7. Barré-Sinoussi F, Montagutelli X. Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. *Future Sci OA.* 2015;1(4).
8. Baumans V. Use of animals in experimental research: an ethical dilemma? *Gene Ther.* 2004;11(sup1):64-6.
9. Yılmaz O. Deneysel hayvan modeli ve bazı indüklenmiş hayvan modelleri, *Türk İmmünoloji Dergisi*, 2012; 18, 30-6.
10. Taylor K, Alvarez LR. An estimate of the number of animals used for scientific purposes Worldwide in 2015. *Altern Lab Anim.* 2019 ;47(5–6):196–213.
11. Yılmaz O, Yılmaz C. Türkiye’de hayvanlarda deney yapmanın temel ilkeleri ve deney hayvanlarına ulaşım. Demirçivi Özer F, editör. Nöroşirürjide Klinik Dışı Araştırma Yöntemleri. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2023, p.16-23.
12. Smith AJ. Guidelines for planning and conducting high-quality research and testing on animals. *Lab Anim Res.* 2020;36(1):21.

DENEYSEL TASARIM VE ANALİZ

EXPERIMENTAL DESIGN AND ANALYSIS

Prof. Dr. Pembe KESKİNOĞLU¹, Prof. Dr. Timur KÖSE²

¹ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı,
Tel. no: 05332545631, E-Posta: pembe.keskinoglu@deu.edu.tr, ORCID: 0000-0002-3459-1828

² Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim AD,
E-Posta: timur.kose@ege.edu.tr

ÖZ

İnsan sağlığını ilgilendiren deneysel çalışmalar, insan üzerinde denenmeden invitro koşullarda ve sonrasında hayvan deneylerinde gerçekleştirilerek kanıt elde edilmesi gerekir. Bu amaçla uzun süredir hayvanların kullanıldığı, sağlık hastalıkları ilgili alanlarda deneyler yapılmaktadır. Bu deneylerde denemenin etkisinin incelenmesi için genellikle hayvanların yaşamına son verilmektedir. Bu nedenle bu çalışmaların planlama aşamasından itibaren özenli şekilde yürütülmelidir. Bu çalışmaların yürütülmesi için bilgi birikimini dikkate almak, klavuzlara ve yasal düzenlemelere uymak, çalışmaların tasarım ve analizlerinin doğru yapılandırılması önemlidir. Hayvan deneyi çalışmalarında tasarım ve analiz, deneysel çalışmaların ilkelerine ve biyoistatistik biliminin temel kurallarına uyularak gerçekleştirilmelidir. Bu yazıda enfeksiyon hastalıkları hayvan deneyi çalışmalarında da uyulması gereken hayvan deneyi çalışmaları için tasarım ve analize yönelik genel ilkeler açıklanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Hayvan deneyi, tasarım, analiz

SUMMARY

Experimental studies concerning human health must be conducted in vitro and subsequently in animal experiments to obtain evidence, before testing on humans. For this purpose, experiments using animals have long been conducted in health and disease-related fields. In these experiments, the animals are often killed to examine the effects of the experiment. Therefore, these studies must be conducted meticulously from the planning stage onward. Considering the accumulated knowledge, adhering to guidelines and legal regulations, and correctly structuring the study design and analysis are crucial for conducting these studies. Design and analysis in animal experimental studies should be conducted in accordance with the principles of experimental studies and the fundamental principles of biostatistics. This article describes the general principles for design and analysis in animal experimental studies, which should also be followed in infectious disease animal experimental studies.

Keywords: Animal experiments, design, analysis

“Hayvan deneyleri, sağlık ve hastalıklarla ilgili alanlarda çalışmalar yapmak için hayvanların kullanıldığı deneylerdir.” Hayvan deneyleri araştırmalarından elde edilen sonuçlar, insanda hastalık ve sağlıkla ilgili olayların fizyolojik, patolojik mekanizmalarının anlaşılmasına ışık tutarken ayrıca hastalıkla ilgili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine, ilaç ve kimyasalların güvenilirlik testlerinin gerçekleştirilmesine katkı sağlar.

Deneysel Hayvan Çalışmalarında temel ilkeler

Hayvanlar, insan sağlığını ilgilendiren hastalıklarla ilgili tanı, tedavi ve sağlık eğitimlerinde denek olarak uzun süredir kullanılmaktadır. İnsan ve hayvan refahına katkısı olabilecek, gerçekleşme olasılığı yüksek bilimsel hedeflerin varlığında, gerçekleşme süreci uzun süre öngörülse bile alternatif bir yöntemin olmadığı durumlarda, hayvanlar üzerinde deneysel çalışmaların yapılabileceği bildirilmiştir (1). Bulaşıcı hastalıkların bulaş yollarının belirlenmesi ve etiyopatolojisinin aydınlatılması için 19. yy'dan itibaren hayvanların deneylerde kullanıldığı bilinmektedir. Son yüzyıldan bu yana, infeksiyon hastalık etiyopatolojisinin aydınlatılması haricinde; mikroorganizmaların virulans etkilerinin konakta ve infeksiyondaki rolünün belirlenmesi, antimikrobiyal ajanların denenmesi, bakteriosidal etkinliklerinin ve antibiyotik sonrası etkilerin saptanması için hayvan deneyleri gerçekleştirilmektedir. Bu konuda en önemli örneklerden birisi penisilin keşfinde hayvanların kullanılmasıdır; Fleming (1928), Penisilin keşfi için, streptokok ile enfekte farelere penisilin vererek yaptığı hayvan deneyi çalışması ile bulaşıcı hastalıkların tedavisinde önemli bir buluş yapmıştır (2). Tarihsel süreçte tüberküloz tedavisi, kuduz, menenjit ve çocuk felci aşılarının geliştirilmesi gibi bulaşıcı hastalıklarla ilgili hayvanların kullanıldığı pek çok önemli çalışma bulunur (3). İnfeksiyon hastalıklarının önemli alanı olan aşı geliştirme çalışmaları hayvan denemeleri gerçekleştirilmeden insanlara uygulanması mümkün olmayan çalışmalardır.

İnfeksiyon hastalıkları alanındaki hayvan modelleri ile gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda ve hayvanların kullanıldığı diğer deneysel çalışmalarda, araştırma amaçlı olsa da tüm önlemlere rağmen hayvanlar acı çekmekte ve deney sonunda genellikle ölüm sonrası incelemeler için yaşamı sonlandırılmaktadır. Bu nedenle hayvan deneyi çalışmalarında 1950'li yıllardan sonra etik düzenlemeleri içeren kurallar geliştirilmiştir. İnfeksiyon hastalıklarını ilgilendiren deneysel çalışmalarda da bu kurallara uyulmalıdır. Günümüzde hayvan deneyi çalışmaları için referans oluşturan hayvan deneyi-etik konusunun temellerini özetleyen 3R kuralının "reduction, refinement ve replacement" açıklandığı kitap 1959 yılında yayınlanmıştır (4).

Reduction (azaltmak) ilkesi; deneylerde mümkün olan en az sayıda hayvan kullanarak güvenilir veri elde etmek ve amaçtaki hipotezleri test edebilmek olarak tanımlanır. Bu ilkenin doğru uygulanabilmesi, hayvan deneyinin tasarımının iyi yapılandırılması ve tasarım için optimal örnek büyüklüğünün hesaplanması ile mümkün olabilir. İnfeksiyon hayvan modelleri ile gerçekleştirilen çalışmalar için de geçerlidir. Refinement; deneyde zorunlu olarak kullanılacak hayvanlar üzerinde uygulanan insanlık dışı işlemlerin, şiddet ve insidansını azaltmasıdır. İşlemlerin sıklığı için, tekrarlı denemeler varsa minimum tekrar sayısının belirlenmesinde biyoistatistik yöntemlerden yararlanılır. Replacement ilkesinde, hayvan deneyi yerine doku ve organ kültürleri, tek hücreliler, omurgasız hayvanlar, embriyonlu yumurta gibi biyolojik deneme önermeleri ve matematik modeller, istatistik yaklaşımlar, bilgisayar uygulamaları, veri bankaları, eğitimde yapay modeller gibi alternatif çözümlerin kullanılmasını önerilir.

"Hayvan Deneyleri Etik Yasası" CIOMS tarafından 1984'de yayınlamıştır. Avrupa Birliği (AB) 86/609/EEC sayılı "Deney ve Diğer Bilimsel Amaçlı Kullanılan Hayvanların Korunmasına İlişkin Konsey Direktif" 1986 da yürürlüğe girmiştir (5). Etik yasada hayvan

deneyinin yapılabilmesi için matematik istatistik modeller ve invitro denemelerle deneyin gerekliliğinin kanıtlanmasını koşul vardır.

Ülkemizdeki hayvan deneyleri ile ilgili “Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik” 2006’da yürürlüğe girmiş ve iki kez revize edilmiştir (6). Ulusal yönetmelikte de deneylerde hayvan sayısının azaltılması, alternatif yöntemlerle matematik-informatik modellerin gerekliliğinden söz edilmektedir. Hayvan deneylerinin yürütülmesi ve raporlanması ile ilgili klavuzlarda bulunmaktadır. En önemlisi ve araştırmacıların gözünde bulundurması gereken klavuz olan ARRIVE’de (Animals in Research: Reporting In Vivo Experiments) 20 madde bulunmaktadır ve deneyde kullanılan hayvanların özelliklerini, sayılarını, deneysel tasarımı, biyoistatistik ve tüm analitik yöntemleri bildirilmektedir (7). Etik tartışmalara rağmen; insan ve hayvan refahına katkısı olabilecek, gerçekleşme olasılığı yüksek bilimsel hedeflerin varlığında, alternatif bir yöntem bulunmadığında hayvanlar üzerinde deneysel çalışmalar yapılabilceği bildirilmiştir (8).

İnfeksiyon hastalıkları alanında son 60 yıl içinde 1000’den fazla hayvan modeli geliştirilmiştir (9). Farede peritonit, sıçanda çekal ligasyon ile peritonit, fare ve sıçanda intraabdominal abse, fare yabancı cisim peritonit, sıçan, tavşan, köpekte osteomyelit, fare, hamster, sıçanda artrit fare, sıçan, tavşan, kobay, köpekte pnömoni, tavşanda endokardit, fare ve sıçanda üriner sistem infeksiyon, sıçan, tavşanda menenjit modeli bakteriyolojik infeksiyon modellerine örnektir. Yasal ve etik düzenlemeler göz önüne alınarak omurgasızların infeksiyon modelleri için kullanımı gündeme gelmiştir. Örneğin; *Galleria mellonella*, antibiyotiklere dirençli bakteriler, mantar kökenleri ile ilgili modeller için kullanılmıştır (10-12).

İnfeksiyon hayvan modeli geliştirildikten sonra konak duyarlılığını ya da mikroorganizma virulansını değiştiren maddeler veya tedavi protokollerinin uygulandığı diğer araştırma grupları genellikle deney prosedüründe yer almaktadır. Tedavi protokolleri farklı doz grupları şeklinde denemede sınanabilmektedir. Ayrıca kontrol grubu da deney dizaynında bulunur. Bu durumda infeksiyon hastalıkları alanında hayvan deneylerinde de genellikle faktör olarak incelenen “grup” değişkeni üç ve üzeri grup içermektedir. Daha az sayıda deneme planında iki grup yer almaktadır. Grup sayısı planlama aşamasında gruplarda yer alacak hayvan “n” sayısının belirlenmesi ve deneme sonunda elde edilen verinin analiz yönteminin seçimi için önemlidir.

İnfeksiyon hayvan modellerinin oluşturulduğu hayvan deneyleri öncelikle modelin geliştirilip geliştirilemediğini test etmek için sonrasında ise bu modellerin ve tedavi-aşı modalitelerinin etkinliklerini test etmek için tasarlanır. Hipotezler farklı oluşturulabilir. Örneğin yeni aşı veya antibiyoterapinin, bilinen tedavi veya koruma önlemlerinden daha etkili olduğu hipotezi test edilebilir veya bir doz-cevap eğrisini tahmin etmek şeklinde planlanabilir. Hipotezler gerçekleştirilmek istenen temel amacı kanıtlamak için kurgulanır. Hipotezlerle deneyde kullanılacak hayvan sayısının hesaplanması, için test edilecek analiz yöntemleri de belirlenir. Örneğin; deney ve kontrol grubu arasında ortalamaların farkı veya oranın farkı gibi iki grup için planlama ya da 3 ve üzeri grupta fark aranabilir. Hayvan deneyi çalışmalarının dizaynında hipotezleri test edilmesine olanak tanıyacak optimal hayvan sayısını belirlemek ve hipotezlere uygun en az örnek büyüklüğü ile hayvan deneyi planlanmasının önemi bildirilmektedir (13).

Hayvan deneyleri için uyulması gereken öneri infeksiyon hastalıkları hayvan modelleri için de geçerlidir. Hayvan deneylerinde sonuçlara daha az sayıda hayvan kullanarak ulaşılabilir. Daha az sayıda hayvan kullanılması için; deney dizaynında hayvan sayısı belirlenmeli, deneme yansız olmalı (randomizasyon, standardizasyon). Bu konular ayrıntılı incelerise;

Hayvan sayısı belirleme ve randomizasyon

Deneyde kullanılan hayvan sakrifiye edilmiyorsa tekrar kullanılabilir mi? Denemeler arası arınma periyoduna dikkat edilmelidir. Arınma periyodu, tekrarlı denemede bir önceki tekrarın etkilerinin kaybolduğu dönem kadar geçen süreyi kapsar. Tekrar kullanım hayvan deneylerinde genellikle çok az sayıda planlama için uygundur.

Uygun örnek büyüklüğünü hesaplanmalı; (priori power analysis) test etmek istediğimiz temel hipotez/ler için standartlaştırılmış etki büyüklüğü veya ortalamanın standart sapma, oran, anlamlılık düzeyi, seçilen testin türü gibi öngörülere gerek vardır (14). bu önsel bilgi için çok iyi taranmış literatür bilgisi ve deneyim önemlidir. Literatür bilgisi hipotez parametreleri için tahmin değeri geliştirirken gereklidir, deneyimler ise hata kaynaklarının ne olabileceğinin tahmin edilmesini sağlayacaktır (15).

Öncül invivo çalışma bulunmuyorsa, invitro önsel tahmin için bir ölçü yoksa, örnek büyüklüğü için “kaynakların eşitliği” kuralı yaklaşımı uygulanabilir. Daha az sayıda “n” sayısı ile planlama yapılabilir, kaba bir yöntemdir (16-17). Kaynakların eşitliğinde $E = N - k$ ($0 < E < 20$) formülü kullanılır. (E =Hata, N =hayvan sayı ve k = grup sayısı). Bu yöntemi kullanmak için, hipotezle ilgili önsel bilginin var olup olmadığı çok iyi araştırılmalıdır.

Değişkenliğin (variability) hem grup içi hem de gruplar arası ne kadar olduğu da optimal “n” sayısını hesaplamada önemlidir. Deneyin başında hayvanlar; benzer gruplardan mı seçilmiştir, deney süresince etkisi araştırılan faktör dışında diğer etkenlerin (beslenme barınma, sıcaklık vb.) etkisi sabit tutulabilmiş midir? Sabit tutulamadı ise istatistik analizlerde bu etkenlerin kontrolü gereklidir.

Örnek büyüklüğü arttıkça, temel faktöre bağlı olmayan diğer etkenlerin farklılıkları yok olur, ancak “n” sayısının arttırılmasının gerekçesi çok iyi açıklanmalıdır. Hayvan deneyleri için örnek büyüklüğü ve etki büyüklüğü arasındaki ilişkiyi Krzywinski M, Altman V, grafiksel olarak göstermiştir (18). Diğer etkenlerin dizaynda kontrolü infeksiyon hastalıkları hayvan deneyi çalışmaları için de sağlanmalıdır.

Hayvan deneyi sonrasında etkisini araştırılan faktörden (tedavi, işlem, beslenme vb.grup) kaynaklanan fark beklenir. Planlamada faktör hariç diğer değişkenliklerin standartlaştırılması için, deney birimlerine hayvanların yansız olarak atanması (randomizasyon), değerlendirme ve ölçümlerde körlüğün sağlanması yansız tahminlerin yapılmasını ve bu tahminlerle sonuçların raporlanmasını sağlar.

Hayvan deneyi çalışmaları dizaynında dikkat edilmesi gerekenler genel konular;

Araştırma konusu belirlendikten sonra; konuyu açıklayacak ve neden hayvan kullanımı gerektiğini de bildiren amaç yapılandırılmalıdır. Amacı gerçekleştirmek için hipotez/ler

literatür ve deneyime dayalı oluşturulur. Hipotezlere yönelik önsel örnek büyüklüğü hesaplanır. Örnekleme işlemi (randomizasyon) nasıl yapıldı bildirilir. Deneyde incelenecek temel değişkenler, araştırma dizaynına göre yapılandırılarak açıklanır. Deneysel süreç ayrıntıları ile tanımlanır. Hayvan türü seçimi, hayvan modeli literatür bilgisi ile ve grupların oluşturulması, gruplarda yapılacak tüm işlemler gerekçesi ile açıklanır. Ölçüm ve değerlendirmeler nasıl yapılacak, standardizasyon nasıl sağlanacak, klasik literatür veya cihaz bilgileri verilir.

Hayvan deneylerinde dizaynda biyoistatistik açıdan önemli konular özetlenirse;

Grupların belirlenmesi, gruplarda girişimlerin tanımlanması-girişim için standardizasyon

Gruplardaki denemelerin yapılacağı hayvan sayısının belirlenmesi

Gruplara hayvanların atanması (randomizasyon kuralları, dişi/erkek)

Sonuçları değerlendiren, ölçümleri yapan kişilerin kör olmalıdır. Ölçümleri yapan tek bir araştırmacı değilse araştırmacılar arası ve ölçüm araçları için standardizasyonun nasıl sağlandığı raporlanmalıdır. Ölçüm hatası en aza indirilmelidir. Ölçüm haricinde değerlendirme yöntemlerinin kriterleri ve standartları açıklanmalıdır.

İstatistik değerlendirme yöntemleri; hayvan sayısının azaltılması için, tekrarlı deneme yapılabilir mi ve dizaynda değişkenlik (varyasyon) kontrolü için neler yapıldı soruları araştırılır. Örnek büyüklüğü hesabında önce vazgeçilebilir deney grup var mıdır, kontrol grubundan vazgeçilebilir mi? İyi bilinen, çok araştırılan hayvan modellerinde sağlıklı grup sonuçları, kitap ve literatür bilgisinde hep benzer değerlerde yer almışsa kontrol grubu kullanım gerekliliği düşünülmelidir. Temel hipotez için güç analizi ile en küçük “n” planlamada bildirilmelidir. Değişkenliğin (varyasyon) kontrolü yalnızca ölçümler için değil hayvanlar içinde sağlamak için neler yapıldı bildirilmelidir; genetik olarak farkı az olduğu hayvanlar kullanılabilir, randomizasyon sırasında hayvanların yaş-ağırlık-beslenme bakım koşulları benzer gruptan seçilerek değişkenlik azaltılabilir. Tekrarlı değerlendirmeler örnek büyüklüğünü azaltacaktır. Verinin özelliğine göre uygun analiz yöntemleri seçilmelidir.

İstatistik analiz

Hayvan deneyleri çalışmalarından elde edilen veriler analizi parametrik koşullar sağlanıyorsa parametrik istatistik testlerle, sağlanmıyorsa nonparametrik istatistik testlerle analiz edilir. Bu testleri seçerken veri özellikleri ve dağılımları bilinmelidir.

Değişkenleri gösteren veriler özelliklerine göre (19-21);

Ölçülen (numerik) veriler: Ağırlık, mikroorganizma sayısı vb. değişkenler.

1. Sıralayıcı (ordinal) özellikte veriler: Veri sıralanma özelliği gösterir. Örneğin hayvan dokuları değerlendirilirken histolojik skor (0-1-2), hayvanın doğum sayısı vb.
2. İsimsel (nominal) veriler: Hayvanların cinsiyeti (dişi-erkek) vb., faktör (grup) değişkeni.

Veri yapısı ve dağılım özelliği analizi veri sunumunu belirler. Numerik verilerin tanımlanmasında parametrik koşullar sağlanıyorsa merkezi ve dağılım ölçütü olarak ortalama ve sapma kullanılırken, sağlanmıyorsa ortanca-en küçük/en büyük değer veya çeyreklikler arası değer kullanılır, isimsel-kategorik değişkenler frekans dağılımları ile sunulur. Hipotez testleri de de veri dağılımına göre farklı seçilir.

Numerik veri özeliğinde değişkenler, gruplar arası karşılaştırmada parametrik olasılık dağılışı varsa t testi, F test gibi parametrik hipotez testleri ile parametrik olasılık dağılışı yoksa Mann Whitney U, Kruskal Wallis gibi nonparametrik testlerle karşılaştırılır.

Parametrik koşul varsayımlarının kontrolü için; verilerin normal dağılıma uygunluğu karşılaştırılacak her grup için Kolmogorov Smirnov veya Shapiro Wilk testle, dağılım saçılım grafikleri ile kontrol edilir (19-21). Karşılaştırılacak hayvan gruplarının varyanslarının benzer (homojen) olması diğer bir varsayımdır. Bu varsayım deney hayvanları aynı evrenden çekilmiş ve deney gruplarına yansız olarak atandığını gösterir. Dağılım özellikleri belirlendikten sonra tanımlayıcı ve analitik veri sunumu yapılır. Tanımlayıcı sunumda merkezi istatistik ölçü olarak aritmetik-geometrik ortalama, ortanca ve dağılım ölçüleri (varyans, standart sapma, değişim katsayısı, dağılım aralığı, çeyreklikler arası dağılım) kullanılır (19-21). Hangi merkezi ve dağılım ölçüsünün kullanılacağını parametrik koşula uyum durumu belirler. Kategorik veri, ordinal veri, hayvan deneylerinde sayı ve yüzdelere ile sunulur. Tanımlayıcı olarak verinin sunulmasında hayvan deneylerinde özellikle grafiksel gösterimler sık kullanılır. Nonparametrik özellikte olan verileri ortalama sapma veya ortalama SEM grafikleri ile sunulması sık yapılan hatadır.

Hipotez testleri

Hayvan deneylerinde kullanılan hipotez test sayısı çok fazla değildir. Deney dizaynları genellikle gruplar arası farkı bulmak için yapılandırılır. İki grup veya üç ve üzeri grup karşılaştırılır. Bu karşılaştırmalar öncesi tanımlayıcı analizde parametrik dağılım varsayımları kontrol edildikten sonra amaç ve hipotezlere uygun test seçilir.

Parametrik dağılım varsayımları; her gözlemin kendi grup ortalamasından sapmasının normal dağılıma sahip olduğu, karşılaştırılacak grupların varyanslarının benzer, gözlemlerin bağımsız olduğu, çarpık (skewness) veya basık (curtosis) dağılım olmadığı varsayımları kontrol edilir (22).

Tek bir hayvan grubundan elde edilen değerler bilinen standart bir değerle (örneğin; açlık kan şekeri normal değeri gibi) karşılaştırılması gerekir. Tek örneklem hipotez testi için parametrik koşullar sağlanıyorsa tek örneklem t-test (one sample t-test) sağlanmıyorsa işaret (sign) test ile karşılaştırma yapılır. Deney dizaynı bağımsız iki grubu karşılaştırmak üzere tasarlanmışsa, parametrik olarak bağımsız t-test (independent t-test), parametrik koşullar sağlanmıyorsa; Mann Whitney U test ile hipotez test edilir.

Üç ve üzeri bağımsız grubun (k grup) karşılaştırılmasında; grup sayısı üç, dört, beş,,,k gibi farklı sayılarda da olsa üç ve üzeri sayıda bağımsız grup karşılaştırılacaksa, parametrik koşulda ANOVA F test ve nonparametrik karşılığı Kruskal Wallis H test ile analiz edilir. Bu

her iki hipotez testinde karşılaştırılan grupların bağımsız olması durumunda, “en az bir grubun ortalamasının farklı olduğunu” hipotezini test eder, farkın hangi gruplar arası eşli-ikili karşılaştırmalardan kaynaklandığını test etmek için posthoc testler uygulanmalıdır. ANOVA F test için birden fazla posthoc test seçeneği vardır; örneğin Bonferroni ve Tukey test ile tüm eşli karşılaştırma sonuçları elde edilir, bu posthoc testler için karşılaştırılan grupların varyansları benzer varsayımı gerekir, Dunnet test ise grupların ortalamalarını kontrol grubu ile karşılaştırır. Kruskal Wallis H test, uygulandığında paket programlarda posthoc testi mevcuttur.

Hayvan deneyi çalışmalarında daha az olmak üzere; hayvanı sakrifiye etmeden önce canlı iken yapılan denemelerde ardışık tekrarlayan ölçümler ve bu ölçümlerden elde edilen verilerin karşılaştırılması gereken hipotezler olabilir. Tekrarlı ölçülerek elde edilen verinin analizinde tekrarlı ANOVA (repeated measure ANOVA) kullanılır, ölçümlerin yapıldığı zaman (t) noktaları için zaman noktalarından geçen en uygun doğru (veya eğri) tahminlenir. Varsayımların kontrolü ve posthoc testlerin yorumlanması sorunludur. Gözlemlenen yanıtı göre eğrinin altındaki alan gibi ölçümlerin, iyi bir alternatif ve yorumlanmasının kolay olduğu bildirilmektedir (23,24). Parametrik koşullar sağlanmıyorsa; tekrarlı ANOVA F test yerine Friedman Varyans analizi uygulanır (23,24). Friedman test iki yönlü varyans analizi olarak bilinir (23-24). Deneysel çalışmalarda “İki yönlü” tanımı, bağımsız grup ve tekrarlı denemelerden elde edilen ölçümlerin, ayrı değişkenler olarak yer aldığını ifade eder.

Korelasyon analizi hayvan deneylerinde kullanılan istatistiklerdendir. Sayısal olarak elde edilen değişkenlerin verileri (a ve b verisi) için ilişkinin gücü ve yönünü test edilir, a'daki varyasyonun b'deki varyasyona neden olduğunu açıklamaz. Korelasyon analiz sonucu yalnızca “p” değeri ile değil korelasyon katsayısı ile birlikte yorumlanır, parametrik koşulda Pearson, nonparametrik koşulda sperman korelasyon katsayısı ile sonuçlar yorumlanır. Veri özelliğine göre başka korelasyon katsayıları da bulunur. Korelasyon, bir dağılım kullanılarak grafiksel olarak gösterilebilir.

İki sürekli değişken X ve Y arasındaki ilişkiyi ölçmek için regresyon analizi uygulanır. X'teki varyasyonun Y'de varyasyona neden olduğu varsayılır (22). Hayvan deneyi çalışmalarında, ilaç-doz-toksite araştırmalarında kullanılır. Doğrusal regresyon haricinde eğrisel fonksiyonlarla da regresyon çözümlemesi örneğin zaman bağımlı olarak bir maddenin salınımının açıklanması gibi ilişkiler tahminlenmek istediğinde uygulanır.

Sonuç olarak; infeksiyon hastalıkları alanında gözlemsel, deneysel araştırma tasarımları uygulanır. Hayvan deneyleri deneysel dizaynda amaç ve hipotezlere uygun tasarlanarak, bu deneylerden elde edilen veri ve bilgi iyi analiz edilip, yorumlanarak, bilimsel birikimin gelişmesine katkı sağlanır. Tasarım ve analizlerin iyi yapılandırılması iyi bir biyoistatistik bilgisini gerektirdiği kadar, disiplinler arası ortak çalışma, danışmanlık gerektirir.

KAYNAKLAR

1. Festing MFW, Altman DG. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *ILAR Journal*. 2002;43(4), 244-58.
2. Fleming, A. Penicillin—Its discovery, development and uses in the field of medicine and surgery. *The Journal of the Royal Institute of Public Health and Hygiene*. 1945;8(2), 36–49.
3. Plotkin S L, Plotkin SA. A short history of vaccination. In: *Vaccines*, 2013. p:1-13.
4. Russell WMS, Burch R L. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen & Co. Special edition published by Universities Federation for Animal Welfare (UFAW), 1992.
5. Council Directive. 86/609/EEC.24.11.1986
6. <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2014/02/20140215-6.htm>
7. JC McGrath, GB Drummond, EM McLachlan, C Kilkenny, CL Wainwright. Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. 2010
8. Festing MFW, Altman DG. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *ILAR Journal*. 2002;43(4), 244-58
9. Knudsen JD, Frimodt-Møller N. Animal models in bacteriology. *Contrib Microbiol*. 2001;9:1-14.
10. Fuchs BB, Mylonakis E. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. *Curr Opinion Microbiol*. 2006; 9(4): 346-51.
11. Lionakis MS. *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts. *Virulence* 2011; 2(6):521-7.
12. Zdybicka-Barabas A, Sowa-Jasitek A, Staczek S, Jakubowicz T, Cytrynska M. Different forms of apolipoprotein III in *Galleria mellonella* larvae challenged with bacteria and fungi. *Peptides* 2015; 68: 105-12.
13. Percie du Sert N, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, et al. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS Biol*. 2020; 18(7): e3000411.
14. Festing MFW. Principles: the need for better experimental design. *Trends Pharmacol Sci*. 2003;24(7):341-5.
15. Festing MFW, Altman DG. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *ILAR J*. 2002;43(4):244-58.
16. Mead R, Gilmour SG, Mead A. *Statistical principles for the design of experiments: applications to real experiments*. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2012.
17. Festing MFW, Altman DG. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *ILAR J*. 2002; 43:233-43.
18. Krzywinski M, Altman .N; Power and sample size:*Nat Methods*, 2013(10):1139-40.
19. Everitt B S. The analysis of repeated measures: A practical review with examples. *Statistician*. 1995. 44:113-35.
20. Conover W. J. *Practical Nonparametric Statistics*. 3rd Edition. 1999.
21. Portney G, Watkins M.P. *Foundations of Clinical Research Applications to Practice*. Norwalk: Appleton & Lange; 1993.
22. Altman DG. *Practical Statistics for Medical Research*. London: Chapman and Hall;1991.
23. Kilkenny C, Parsons N, Kadyszewski E, Festing MFW, Cuthill IC, Fry D, et al. Survey of the quality of experimental design, statistical analysis and reporting of research using animals. *PLoS ONE* 2009;4:e7824
24. Matthews JNS, Altman DG, Campbell MJ, Royston P. Analysis of serial measurements in medical research. *Br Med J*. 1990;300:230-5.

ÜLKEMİZDE DENEYSEL HAYVAN ARAŞTIRMALARI: YASAL DÜZENLEME, ALTYAPI

EXPERIMENTAL ANIMAL RESEARCH IN OUR COUNTRY: LEGAL REGULATIONS AND INFRASTRUCTURE

Öğr. Gör. Dr. H. Efsun KOLATAN

Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Dokuz Eylül Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Bilimi AD.,
Tel no:0532 780 38 39, E-Posta:efsun.kolatan@deu.edu.tr, ORCID: 000-0003-4761-2779

ÖZ

Deneyisel çalışmaların planlanmasındaki amaç, sorulan bilimsel sorunun yanıtını bulmaktır. Bakım, barındırma ya da uygulama manipülasyonu farklılıkları nedeniyle deney koşullarında değişikliklerin olması çalışmayı etkiler bu da elde edilen sonuçların güvenilirliğini bozar. Ulusal mevzuatlar tüm tesislerde uyulması zorunlu kurallar getirerek ülke genelinde deneyel çalışmalarda standardizasyonu sağlamaktadır. Deneyisel hayvan araştırmalarında uyulması gereken temel ilke 3R Kuralıdır. Bu ilke değiştirme (Replacement), sayıyı azaltma (Reduction) ve iyileştirme (Refinement) ilkeleridir. Bu kurallar ülkemizde yürürlükte olan deney hayvanı yönetmeliklerinde de yer almaktadır. Bu yönetmelikler, ülkemizde yürürlükte olan başka yasalar ve yönetmelikler ile bilimsel amaçlar için kullanılan hayvanların korunmasına dair Avrupa Konseyi direktifine dayanılarak çıkartılmıştır. Ülkemizde, deney hayvanları ile ilgili iki yönetmelik yürürlükte. Bu yönetmeliklerden bir tanesi, deney hayvanlarının bakım ve barındırma koşulları, tesis çalışma izinleri ile ilgili konuları kapsamaktayken diğer yönetmelik etik kurullar ve hayvan sertifikasyon eğitimi kapsamaktadır.

Anahtar Sözcükler: Hayvan deneyleri yasal mevzuatları, 3R Kuralı, laboratuvar hayvanları

SUMMARY

The purpose of planning experimental studies is to find the answer to the scientific question. Changes in experimental conditions due to differences in maintenance, housing, or application manipulation affect the study, which compromises the reliability of the results. National legislation provides mandatory rules to be complied with in all facilities and provides standardization in experimental studies throughout the country. The basic principle in experimental animal research is the 3R Rule. This principle is replacement, reduction and refinement principles which are also included in the experimental animal regulations in force in Turkey. These regulations have been issued based on other laws and regulations and on European Council of directive on the protection of animals used for scientific purposes. In Turkey, two regulations regarding experimental animals are in force. While one of these regulations covers the care and housing conditions of experimental animals, the other regulation covers ethics committees and animal certification training.

Keywords: Animal research Legislations, 3R Principles, laboratory animals

Giriş

Deneyisel çalışmaların planlanmasındaki amaç, araştırmacının sorduğu bilimsel sorunun yanıtını bulmaktır. Bunun için deneyde değiştirilen koşula (bağımsız değişkene) tepki olarak ortaya çıkan yanıtlar (bağımlı değişken) analiz edilir. Deney prosedürü dahilindeki koşullar haricinde, çalışmadaki hayvanları etkileyen başka bir etmen olması, deney sonuçlarının

değişmesine neden olur, bu da çalışmayı bozar. Bu risk ancak tüm deney hayvanı üretim tesislerinde standardizasyonun sağlanması ile azaltılabilir. Ulusal mevzuatlar, tüm tesislerde uyulması zorunlu kurallar getirerek ülke genelinde deneysel çalışmalarda standardizasyonu sağlamaktadır.

Bir tesiste çalışmalara verilen hayvanlarla birlikte henüz çalışmalara teslim edilmemiş hayvanlar da barındırılmaktadır. Tüm bu hayvanların gönençlerinin gözetilmesi, bakım ve barındırma koşullarının standart olması gerekmektedir. Bunu sağlamanın en etkili yolu ise eğitimidir. Araştırmacılara verilen hayvan kullanımı sertifika kurs eğitimiyle deneysel çalışmalarda standardizasyon sağlanmıştır.

Deney hayvanı tesislerde görev yapan hayvan bakıcıları ve teknik personele verilen eğitim, seviyelerine göre verilen sertifika kurslarıyla sağlanmaktadır. Bu personelin tesis içerisinde yaptıkları işler ve sorumlulukları düşünüldüğüne, sırasıyla 32 saat ve 55 saatlik kuraların yeterli olmadığı görülmektedir. Bu nedenle 2020 yılında, Ulusal Mesleki yeterlilik Enstitüsüne müracaat edilerek “Laboratuvar hayvanı bakıcısı” ve “laboratuvar hayvanı teknik personeli” meslekleri için, meslek standartları oluşturulmuştur (1). Bu meslek standartlarına dayanılarak Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulunda önlisans programı açılmıştır. Bu bölüme Eylül 2023 tarihinden itibaren öğrenci alınması planlanmaktadır. Tesislerde bu alanda eğitilmiş personelin ve tecrübeli akademik ekibin olması, ulusal mevzuatlarda belirtilen şartların ve personele yönetmeliklerce verilen görevlerin yerine getirilmesini kolaylaştıracaktır.

3R Kuralı

Deneysel hayvan araştırmalarında uyulması gereken temel ilkeler, yani 3R Kuralı, 1959 yılında Russell ve Burch adlı İngiliz bilim insanları tarafından oluşturulmuş olup günümüzde de önemini korumaktadır (2). Araştırmacıların ortaya çıkardığı bu ilkeler, laboratuvar hayvanları biliminde etik ilkelerin temelini oluşturmuştur ve ülkemiz yasal mevzuatlarında bu ilkeler yer almıştır.

3R Kuralı İngilizce ilk harfleri “R” olan kelimedenden oluşur. Deneysel bir çalışmaya planlanırken bu kurallara sırasıyla uyulması gerekir. 3R kuralını oluşturan ilkeler;

Değiştirme (Replacement): Canlı hayvan kullanılan yöntemin, aynı ya da yakın sonuçların elde edileceği bir başka yöntemle değiştirilmesi. Özellikle eğitim amaçlı uygulamalarda bilgisayar programları, maket vb. yöntemin kullanılması hayvan deneyi yerine kullanılabilir uygun bir yöntemdir. Kullanılabilir bir diğer yöntem ise hücre kültürü, doku kültürü, organ kültürü ya da *Drosophila sp.* gibi filogenetik olarak daha düşük seviyedeki canlıların deneysel çalışmalarda kullanılmasıdır.

Sayıyı azaltma (Reduction): Çalışma hayvan çalışması yerine alternatif bir yöntemle yapılamıyorsa istatistiksel olarak anlamlı sonuç verecek en az sayıda hayvanın kullanılması gerekmektedir.

İyileştirme (Refinement): Çalışmaya dahil edilen hayvanların iyilik hallerinin çalışmanın her aşamasında korunması, deneyi bozmayacak şekilde ağrı-acı ve ıstıraplarının giderilmesi gereklidir.

Yürürlükte Olan Yönetmeliklerin Yasal Dayanakları

1. 24/6/2004 tarihli ve 5199 sayılı Hayvanları Koruma Kanununun 9 ve 10 uncu maddeleri.

Bu kanunun 9. Maddesinde deneysel amaçlı çalışmalarda kullanılacak olan hayvanların bakım ve barındırılması ve bilimsel çalışmalarda hayvan kullanım koşulları belirtilmiştir. Hayvan deneyi yapan kurum ve kuruluşlarda bu deneylerin yapılmasına kendi bünyelerinde kurulmuş ve kurulacak etik kurullar yoluyla izin verileceği belirtilmiştir. Kanunun 10. Maddesi ise satılmakta olan hayvanların ilgili kriterleri bildirmektedir.

2. 18/3/2010 tarihli ve 5977 sayılı Biyogüvenlik Kanununa dayanılarak.

Bu kanun, genetik yapısı değiştirilmiş organizmalar (GDO) ve ürünleri ile ilgili tüm işlemleri kapsar. Tarım ve Orman Bakanlığından çalışma izni almış olan tesislerdeki transgenik, nakavt gibi genetik yapıları değiştirilmiş hayvanlar da kapsam dahilindedir. 2010 yılı Ağustos ayında bu kanuna dayanılarak Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar ve Ürünlerine Dair Yönetmelik yürürlüğe girmiştir. Bu yönetmelikte “İthal edilecek veya yurt içinde geliştirilen GDO ve ürünlerinin araştırma, geliştirme ve kontrollü şartlar altında deneme çalışmaları” kapsamı dahilindedir(3).

3. 11/6/2010 tarihli ve 5996 sayılı Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanununun 7, 8, 9, 11, 25, 31, 36 ve 43’üncü maddeleri.

Bu kanun genel olarak hayvanların tanımlanması ve kayıt altına alınması, canlı hayvan ve hayvansal ürünlerin sevkleri ile satışa ilişkin sağlık koşulları; hayvanların bakım, barındırma, beslenme, sağlık ve diğer ihtiyaçlarının karşılanması; hayvan barındırılan tesisler ve alanlarda Tarım ve Orman Bakanlığının sorumlulukları ve cezai işlemler açıklanmıştır.

4. Avrupa Parlamentosu, tarafından 2010 yılında yürürlüğe giren 2010/63/EC sayılı Bilimsel amaçlarla kullanılan hayvanların korunmasına dair Avrupa Birliği Direktifi (4).

2010/63/EC sayılı direktifte deneysel hayvan çalışmalarda hayvanlara uygulanacak prosedürlerin şiddet sınıflaması tanımlanmıştır, hayvanların sahiplenilmesi ve tekrar kullanımı konuları belirtilmiştir ve deneysel prosedürlerin etik açıdan değerlendirilmesinde izlenecek yollar belirtilmiştir. Hayvan refah birimi ve bu birimin görev ve sorumlulukları açıklanmıştır. Avrupa Birliğine giriş sürecinde olduğumuz için bu tarihten sonra çıkartılan yönetmelikler, Avrupa Birliğine uyum kapsamında bu direktife paralel hazırlanmıştır(5).

Türkiye’de, deney hayvanları ile ilgili yönetmeliklerin çıktığı zamanlarda, tesislerin çalışma izni, bakım barındırma koşulları ile deneysel prosedürlerin etik yönden incelenmesi ve bununla ilgili konular farklı bakanlıkların sorumluluk ve yetki alanındaydı. İki bakanlık 2018 yılı Temmuz ayında, Cumhurbaşkanlığı Hükümet Sistemi çerçevesinde birleştirildi. Şuan iki yönetmelik Tarım ve Orman Bakanlığına bağlı farklı birimlerin sorumluluğundadır. Avrupa Birliğinde bakım, barındırma ve projelerin etik değerlendirme konuları tek bir direktif altında toplanmıştır.

Yönetmelikler ya da yönetmelik talimatı içerisinde, farklı yönetmeliklerin kapsamında olan açıklamalar, konu ile ilgili maddede belirtilmiştir. Bunlar;

- Kuruluşlarda oluşan tıbbi atıklar, 25/1/2017 tarihli ve 29959 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan Tıbbi Atıkların Kontrolü Yönetmeliği ne uygun olarak toplanır, taşınır ve bertaraf edilir.
- Tesislerde, yapılan deneysel çalışma protokolleri gereği toksik içerik ve radyoaktif etken uygulanmış hayvanlara ait atıklar; laboratuvar içinde kullanılan ya da deneysel model oluşumu için kullanılan kimyasal maddeler, 11 Temmuz 1993 tarihli ve 21634 sayılı Resmi Gazetede yayınlanarak yürürlüğe giren Tehlikeli Kimyasallar Yönetmeliği çerçevesinde etiketlenir, depolanır ve kuruluştan uzaklaştırılır.
- Tesiste, enfeksiyöz atık bulunması durumunda 20 Ocak 2012 tarihli ve 28179 sayılı Resmi Gazetede yayınlanarak yürürlüğe giren Bulaşıcı Hayvan Hastalıkları ile Mücadelede Uygulanacak Genel Hükümlere İlişkin Yönetmelik çerçevesinde işlem yapılır.
- Aile yanına verilmeye uygun görülen hayvanlar 08.10.2011 tarihli ve 28078 sayılı Resmi Gazete’de yayımlanarak yürürlüğe giren Ev ve Süs Hayvanlarının Üretim, Satış, Barınma ve Eğitim Yerleri Hakkında Yönetmelik kapsamında sahiplendirilir.

Yönetmelikler

1. Hayvanların Bakımı ve Barındırmaları ile İlgili Yönetmelikler

Ülkemizde, deney hayvanları için çıkartılmış ilk yönetmelik, o zamanki adıyla, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı tarafından çıkartılarak 16 Mayıs 2004 tarihinde yürürlüğe girdi (6). Bu yönetmelik ile hayvanların deneysel ve diğer bilimsel amaçlarla kullanılabileceği çalışma konuları tanımlandı. Bu hayvanların bakımları, barındırılmaları ile ilgili hususlar belirtildi. Bu yönetmelik ile deneysel araştırmalar için hayvan üreten, kullanan ve tedarik eden tesislerin kuruluş izni, çalışma izni alması zorunluluğu getirildi. Bu izinler için gerekli evraklar belirtildi. Evrakların tesliminden sonra, tesis yerinde incelemek üzere komisyon üyeleri tanımlandı.

Yönetmeliğin yürürlüğe girdiği tarihte aktif olarak çalışmakta olan pek çok deney hayvanı tesisi mevcuttu, bu tesisler Yönetmelikte belirtilen kriterlere göre eksiklerinin giderilmesi ve evrakların tamamlanması sonrasında kuruluş izni almadan, doğrudan çalışma izni için müracaat ettiler. Komisyon, çalışmakta olan tesislerin yerinde kontrollerini gerçekleştirdi. Bu işlemlerden sonra ilk çalışma izinleri 2007 yılından itibaren, 10 yıl süreyle verilmeye başlandı. 2017 yılından itibaren bu tesisler, faaliyetlerinde bir değişiklik olmadıysa, çalışma izinlerini gerekli belgeleri teslim ederek yenilediler. Tarım ve Orman Bakanlığı, internet sitesinde “Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar İçin Kullanılan Hayvanların Refah ve Korunmasına Dair Yönetmelik” Çerçevesinde Çalışma İzni Verilen Deney Hayvanı Kuruluşları’nın” listesini paylaşmaktadır.

Deneysel amaçlarla üretilen, kullanılan ve barındırılan deney hayvanlarını kapsayan yeni bir yönetmelik 2011’de yürürlüğe girdi (7). Bu yönetmelikte, kuruluş ve çalışma izinleri için

yapılması gereken işlemler, deneysel amaçlarla üretim, bakım, barındırma ve tedariği yapılacak olan hayvan türleri, bu türlerin bakım ve barındırılması için uygun olan bakım ve barındırma şartlar belirtilmiştir. Ayrıca Avrupa Birliği Direktifinde yer alan hayvan refah birimi görev ve sorumlulukları ile prosedür şiddet sınıflandırmaları açıklanmıştır.

Kuruluş İzni ve Çalışma İzni

Hem “Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar İçin Kullanılan Hayvanların Refah ve Korunmasına Dair Yönetmelik”hem de 2019’da yürürlüğe giren “Bilimsel Amaçlar İçin Kullanılan Sucul Omurgalı Canlıların Refah ve Korunmasına Dair Yönetmelik”kapsamına göre, bu hayvanları üretecek, kullanacak ve tedarik edecek tesislerin öncelikle kuruluş izni alması gereklidir(8). Beyanname, kurulması planlanan tesisin vaziyet vekat planını içeren dosyanın dilekçe ile il müdürlüğüne teslim edilir. İl Müdürlüğü tarafından dosya incelenir ve uygun bulursa, mahallinde inceleme için bir kurul oluşturulur. Bu kurul incelemenin ardından yer seçim raporu oluşturur. Rapor uygun olarak verildiyse 1 yıl süreyle **kuruluş izni** verilir.

Kuruluşun tamamlanması sonrasında çalışma izni için müracaat edilir. Bunun için sorumlu yönetici ve veterinerin noterde yapılan sözleşmeleri, diğer veteriner hekimlerin meslek odalarından alınan belgeleri, kamu kurum ve kuruluşlarına bağlı çalışacak tesislerde devlet memuru ve işçi statüsünde çalışacak olan personelin görevlendirme yazıları ve bu personellerin diploma suretleri dosyaya eklenir. Hayvan sağlığı ve hayvan refahı amacıyla kullanılacak aletlerin teknik özellikleri ve kapasiteleri; kullanılacak olan kimyasal ve biyolojik madde gibi materyallerin kuruluş yetkilisince onaylı listesi; yangın ve patlamaları önlemek için itfaiyeden alınan belgelerin olduğu dosya il müdürlüğüne teslim edilir. Uygun bulunursa komisyon oluşturulup mahallinde inceleme yapılır. İnceleme sonucu uygun bulunursa genel müdürlükçe, tesisin adresine **Çalışma İzni** verilir. Verilen çalışma izni bilimsel amaçlı üretim, kullanım, barındırma yapacak sucul omurgalı hayvan tesisleri için 5 yıl, diğer türlere yönelik tesislerinin 10 yıl süreyle geçerlidir.

Hayvan Refah Birimi

Sadece çalışmalara teslim edilmiş olan hayvanların değil, tesiste barındırılmakta olup henüz bir çalışmaya verilmemiş hayvanların da iyilik hallerinin sürdürülmesi gereklidir. Bu görevin sorumluluğu, Hayvan Refah Birimine verilmiştir. Hayvan refah birimi en fazla 3 kişiden oluşur.

Hayvan refah biriminin temel görevi tesis içinde barındırılmakta ve kullanılmakta olan hayvanların iyilik hallerinin devamlılığını sağlamaktır. Bu kapsamda, 3R kuralına yönelik uygulamalar ve önerilerde bulunur, gerekirse personele eğitim verir. 3R kuralının uygulanmasına ilişkin teknik ve bilimsel gelişmeleri takip edip bu konularda personeli bilgilendirir.

Devam etmekte olan projelerdeki hayvanların iyilik hallerini, projenin gelişimine paralel olarak takip eder. Çalışmada 3R kuralına katkıda bulunabilecek unsurları belirtir ve tavsiyelerde bulunur.

Aile yanına verilecek hayvanların sosyalleşmesi de dahil aile yanına verme programları hakkında bilgi verir. Sahiplenme amacıyla talep bildirildikten sonra, veteriner hekimle birlikte aile yanına verilmesi uygun görülen hayvanın yönetmelik kapsamında rehabilitasyonunu kontrol eder.

Prosedür Şiddet Sınıflandırması

Hayvan deneylerinin belirtildiği projeler, hayvan deneyleri yerel etik kurulunda, çalışmadan elde edilmesi ön görülen sonuçların bilime sağlayacağı katkı ile bu çalışmadaki hayvanların prosedürler sırasında çekeceği acının fayda-zarar analizi yapılarak etik açıdan değerlendirilir. Yönetmelikte, proje “bir ya da daha fazla prosedürü içeren ve belirli bir bilimsel amacı olan işprogramı”; prosedür ise “hayvanların yalnızca organları veya dokularını kullanmak için öldürülmesi hariç; bir hayvanın doğumu, kuluçkadan çıkması, herhangi bir biçimde genetiği değiştirilmiş hayvan soyunun oluşturulması ve devam ettirilmesi süreçlerini de kapsayan, invaziv veya invaziv olmayan, bilinen veya bilinmeyen sonuçları olan deneysel, diğer bilimsel veya eğitici amaçlar için hayvanda iyi veterinerlik uygulamalarına uygun olarak bir iğnenin batırılmasıyla oluşan ağrıya eşit veya daha fazla ağrı, eziyet, sıkıntı veya kalıcı hasara yol açabilen kullanımı” olarak tanımlanmıştır.

Yönetmeliğe ait Ek-8’de prosedürlerin şiddet sınıflaması 4 kategoride tanımlanmıştır.

Hafif şiddetli: Hayvanlar üzerinde uygulanan ve hayvanın kısa süreyle hafif ağrı, eziyet ve sıkıntı çekmesinin mümkün olduğu prosedürler ve hayvanların genel durumu üzerinde önemli bir bozulmaya yol açmayan prosedürler hafif olarak sınıflandırılır. Örnek olarak tek defa, toplam dolaşım hacminin %10’u ya da daha az miktarda kan alımı verilebilir.

Orta şiddetli: Hayvanlar üzerinde uygulanan ve hayvanın kısa süreyle orta düzeyde ağrı, eziyet ve sıkıntı çekmesinin ya da uzun süreli hafif düzeyde ağrı, eziyet ve sıkıntı çekmesinin mümkün olduğu prosedürler veya hayvanların genel durumu ve afiyeti üzerinde orta derecede bozulmaya yol açan prosedürler “orta” olarak sınıflandırılır. Örnek olarak, genel anestezi ve uygun analjeziklerin etkisi altında yapılan ameliyatla bağlantılı örneğin torakotomi ameliyatı sonrası ağrı, sıkıntı ve genel durumda bozulma verilebilir.

Şiddetli: Hayvanlar üzerinde uygulanan ve hayvanın kısa süreyle şiddetli ağrı, eziyet ve sıkıntı çekmesinin ya da uzun süreli orta düzeyde ağrı, eziyet ve sıkıntı çekmesinin mümkün olduğu prosedürler veya hayvanların genel durumu ve afiyeti üzerinde şiddetli bozulmaya yol açan prosedürler “şiddetli” olarak sınıflandırılır. Örnek olarak, ilerleyen hastalığın ölüme yol açtığı, uzun süreli orta şiddette ağrı, eziyet ve sıkıntıyla bağlantılı, hayvanın durumunda kalıcı hasarlarla karakterize olan aşı potens testler verilebilir.

Düzelmez: Tamamen genel anestezi altında gerçekleştirilen ve hayvanın bilincinin açılmasının beklenmediği prosedürler düzelmez olarak sınıflandırılır.

Bu şiddet kategorileri belirlenirken göz önünde bulunması gereken faktörler yönetmelikte maddelenmiştir. Ayrıca yönetmelikte şiddet kategorilerine göre farklı prosedürlerden örnekler de verilmiştir.

Hayvanların aile yanına verilmesi

Genetiği değiştirilmiş hayvanlar hariç, sağlık durumu uygun olan hayvanın iyilik halinin devamının sağlanabileceği durumlarda, hayvanlar sahiplendirilebilir. Yönetmelik talimatında daha ayrıntılı açıklanmıştır.

Yönetmeliğe ait eklerde

Hayvan türlerinin canlı ağırlıklarına göre kafes boyutları; türe özgü barındırma ihtiyaçları; tesiste sağlanması gereken türe özgü nem ve sıcaklık ihtiyaçları; kafes kartları üzerinde belirtilmesi gereken bilgiler, türlere özgü işaretleme yöntemleri ve uygulama yerleri; prosedür şiddet sınıflandırması; türe özgü hayvan öldürme yöntemleri ve dikkat edilmesi gereken hususlar; beyanname formu; yer seçim raporu; açılma raporu; izinli kuruluşlarda üretilmesi zorunlu türler, tesislerin her sene başında doldurup teslim etmekle yükümlü oldukları formlar yer almaktadır.

Yönetmelik uygulama talimatı:

Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar İçin Kullanılan Hayvanların Refah ve Korunmasına Dair Yönetmeliğin uygulanmasını sağlamak üzere 12 Aralık 2018'de Bakanlık tarafından çıkartılmıştır.

Deney hayvanı merkezi olarak kurulacak yerin çevresel özellikleri, kuruluşa bulunması gereken odalar ve bu odaların özellikleri, tesis içerisinde hayvan refahı, hayvan ve halk sağlığı için bulundurulması gereken donanım (örneğin kafesler, nem ve sıcaklık ölçer gibi) belirtilmiştir.

Tesisin güvenliği, tesiste görev yapan personelin ve araştırmacıların güvenliği için bulunması ve yapılması gerekenler belirtilmiştir.

Bazı çalışmalarda Mikrobiyolojik olarak tanımlanmış hayvan (Belirli patojenlerden arındırılmış, *Specific Pathogen Free* (SPF) hayvanlar gibi) kullanılması gerekir. Bu hayvanların mevcut özelliklerinin korunması için onların yediği yem, içtikleri su, temas halinde oldukları kafes ve altlık materyali steril edilir, odadan alınıp kafesin içerisine verilen hava önce HEPA filtreden geçer; kafes içerisinden alınan hava, odaya verilmeden önce tekrar HEPA filtreden geçer. Bu özelliklerinin korunması, bu hayvanların kullanılacağı çalışmaların standardizasyonu, bu hayvanların mikrobiyolojik özelliklerini koruyarak üretilmesi ve bazı suşlarda yaşamlarının devam edebilmesi için oldukça önemlidir. Bu nedenle, tesiste mikrobiyolojik olarak tanımlı hayvan barındırılacaksa bakım ve barındırma sırasında çapraz kontaminasyonun önlenmesi için yapılması gerekenler talimatta belirtilmiştir. Çapraz kontaminasyon olmamasını sağlamak için bu hayvanların kullanıldığı çalışmalarda prosedürler sırasında da dikkat edilmesi gereklidir.

Prosedürü tamamlanmış hayvanların aile yanına verilmesi için uyulması gereken kuralları belirtilmiştir. Bu kurallara göre, öncelikle hayvanların sahiplenilmek üzere sorumlu yöneticiden talep edilmesi gerekli. Bu talebe istinaden etik kurulun onayı alınmalıdır. Bu süre içinde sahiplendirilmeye uygun görülen hayvan 15 gün süreyle prosedür öncesi yaşadığı

ortamda bakımı ve barındırılması yapılmalıdır. Sahiplendirilme formuna hayvan hakkında bilgiler, hayvanı sahiplenen kişiler hakkındaki bilgiler ve etik kurul onayına dair bilgiler yazılır. Üç nüsha hazırlanan bu belgenin bir nüshası sahiplenen kişiye verilir. Deneysel çalışmalarda kullanılan hayvanlar, sahiplendirilmiş olsa da asla doğal hayata ya da geliştiği güzel bir ortama bırakılamaz.

2. Etik Kurallar ve Uygulamalarına Yönelik Yönetmelikler

2004 yılında yürürlüğe giren Hayvanları Koruma Kanunu'nun 9. Maddesinde, Hayvan deneyi yapılan kuruluşlarda, kurulmuş ya da kurulacak olan etik kurullar tarafından yapılması planlanan deneysel çalışma için onay alması gerektiği belirtilmiştir. Bu yasaya istinaden, bu konuyla ilgili bir yönetmelik yürürlüğe girmeden önce üniversiteler bünyesinde etik kurullar kurulmuş ve kendi yönergelerini hazırlayarak kurumlarına ait deney hayvanı tesisinde gerçekleştirilmesi planlanan deneysel çalışmaları etik yönden değerlendirilmeye başlamışlardır.

Hayvan deneyleri etik kurullarının çalışma usul ve esaslarına dair ilk yönetmelik 2006 yılında yürürlüğe girmiştir(9).Bu yönetmelikle, Hayvan deneyleri merkezi etik kurulunun (HADMEK) ve Hayvan deneyleri yerel etik kurulunun (HADYEK) kuruluşu, üyelerinin özellikleri, çalışma yöntemleri ve kurulun görevleri belirtilmiştir. Deney hayvanları ile çalışmaya yapacak araştırmacıların deney hayvanı kullanım sertifikası kursuna katılarak sertifika alması zorunluluğu bu yönetmelikle getirildi.

Şu an yürürlükte olan yönetmelik 15 Şubat 2014'de yürürlüğe girmiştir(10). Bu yönetmelikle HADYEK'in Bakanlıktan çalışma izni almış tüm kuruluşlarda oluşturulmuş olması ve her bir kuruluşta hayvan refah birimi oluşturulmuş olması zorunluluğu getirildi.

HADYEK toplantılarını en az ayda bir yapılacağı; projelere uygun, düzeltilmesi gerekir, uygun değil şeklinde karar verileceği belirtildi. Projelerin yapılabilirliğini sınamak için az sayıda hayvan üzerinde ön deneme yapılmasının isteyebileceği ve onaylanan projelere 5 yıl süreyle izin verileceği belirtildi.

HADYEK, izin verdiği çalışmaların, kurula sunulan şekilde yapıldığını kontrol etmekle yükümlüdür. Bu nedenle bir HADYEK'in izin verdiği çalışma, başka HADYEK'in sorumluluğundaki hayvan tesisinde yapılamaz.

Deney Hayvanı Kullanım Sertifikası Eğitim Programına Dair Genelge

Şu an yürürlükte olan deney hayvanları kullanım sertifikası eğitim programına dair genelge 02 Nisan 2019'da yürürlüğe girdi.

Bu genelgede 3 tür sertifika kategorisi açıklandı;

- A Kategorisi: araştırmacılara yönelik
- B Kategorisi: Yardımcı personele yönelik (teknik personel, veteriner sağlık teknisyeni vb.)
- C kategorisi: Hayvan bakıcılarına yönelik

Her kategori için alınması gereken teorik ve uygulama dersleri ve bu derslerin süreleri belirtildi.

Sertifika kursu hangi türe göre düzenlendiyse alınan sertifika ile sadece türdeki hayvanlarla deney/ manüplasyon yapılabilir. Bu nedenle hayvan türlerine göre gruplama yapılmıştır. Sertifikanın alındığı grup numarası sertifika üzerinde de belirtilmektedir. Bu gruplamaya göre;

Grup 1: Kemirgenler (fare, sıçan, kobay, hamster türleri, gerbil) ve tavşan

Grup 2: Çiftlik hayvanları (küçükbaş, büyükbaş hayvanlar ve tek tırnaklılar)

Grup 3: Domuz ve minipig

Grup 4: Evcil kanatlılar (tavuk, hindi, kanatlı pet hayvanı)

Grup 5: Su hayvanları (omurgalı ve kafadan bacaklılar)

Grup 6: Sürüngenler ve amfibiler

Grup 7: Etçiller

Grup 8: İnsanharici primatlar ı kapsayan sertifika gruplarıdır.

HADYЕК, sorumlu olduğu tesisin çalışma izninde belirtilen hayvan türleri için bir eğitim programı düzenleyebilir.

Kursta başarılı olup sertifika almaya hak kazanabilmek için öncelikle teorik ve uygulama derslerin her ikisine de %80 devam edilmiş olmak gerekli ve teorik ve uygulama sınavlarından toplamda 100 üzerinden 70 puan alınması gerekli. Alınan sertifikaların geçerliliği için bir süre sınırlaması bulunmamaktadır. Projede sadece hayvanlarla ilgili uygulamaları yapacak olan kişilerin sertifika alması yeterlidir. Sertifikası olmayan kişiler de proje yapmak üzere HADYЕК'e başvuruda bulunabilir. Sertifika kursu HADYЕК tarafından düzenlenir ve yürütülür. Kursta verilmesi gereken ders konuları ve saatleri eğitim genelgesinde açıklanmıştır.

Araştırmacılara yönelik A kategorisi kursu 40 saati teorik, 35 saati uygulama olmak üzere toplam 75 saatlik bir kurstur. Teorik konular arasında hayvan deneyleri etiği, alternatif yöntemler, hayvan davranışı ve refahı; anatomi, histoloji, biyokimya, anestezi ve ötenazi teknikleri, biyoistatistik, ağrı, sıkıntı ve insani son noktanın belirlenmesi, hayvan tesislerinde iş sağlığı ve güvenliği, standardizasyon, hayvan deneyi modelleri, hayvan deneylerinin tasarlanması, deney hayvanlarının üretimi, yetiştirilmesi ve barındırılması enjeksiyon ve kan alma teknikleri, cerrahi teknikler gibi pek çok teorik konu işlenir. Uygulamalarda ise tutuş teknikleri, ilaç verme ve enjeksiyon teknikleri, kan ve örnek alma teknikleri, anestezi, anatomi diseksiyonu ve cerrahi tekniklere yönelik uygulamalar yapılır. Hayvan deneylerinin tasarlanması uygulaması olarak kursiyerlerden örnek bir deneysel çalışmanın hazırlanarak sunulması istenir.

Sonuç

Araştırmacılar aldıkları etik kurul izinleri ile birlikte bu hayvanların sorumluluklarını da üstlenmiş oluyorlar. Sorumluluk, 3R kuralının içindeki sessiz ilkedir. Ancak 3R ilkesinin

uygun bir şekilde yerine getirilebilmesi için hatırlatılması gerekmektedir. Bu nedenle, Uluslararası Etik Araştırmalar Vakfı, (*The International Foundation for Ethical Research* (IFER)), 1985 yılında 3R ilkesine, sorumluluk (*responsibility*) ilkesini de ekleyerek temel ilkeleri 4R olarak geliştirmiştir.

Pandemi döneminde görüldüğü gibi, yeni hastalıkların ortaya çıkması, bu hastalıkların tedavisini sağlamak ve yayılmalarının engellemek / yayılma hızını yavaşlatmak üzere yeni hastalık modellerinin geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. Bu süreç, hayvan deneylerinin önemini bir kez daha vurgulamıştır.

Hayvan deneyi yapacak olan araştırmacıların bu hayvanlarla birlikte aldıkları sorumluluğun bilincinde çalışmaları, deneysel çalışmadan elde edilecek sonuçların da daha sağlıklı olmasını sağlayacaktır. Ancak bu şekilde bilime bir katkı sağlanmış olur.

KAYNAKLAR

1. Ulusal Meslek Standartlarına Dair Tebliğ, Resmi Gazete.11.08.2021. Sayı :31565 .
2. Russell WMS, Burch RL. The Principles of Humane Experimental Technique. Thomas Hartung's Publications; 1959.
3. Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar ve Ürünlerine Dair Yönetmelik, Resmi Gazete. 13.08.2010. Sayı: 27671.
4. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes, Official Journal EC. 10. 09. 2010. L 276/33.
5. Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar İçin Kullanılacak Hayvanların Refah ve Korunmasına Dair Kılavuz. Tarım ve Orman Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü. 14.05.2012. Sayı: 1117.
6. Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar İçin Kullanılan Deney Hayvanlarının Korunması, Deney Hayvanlarının Üretim Yerleri İle Deney Yapacak Olan Laboratuvarların Kuruluş, Çalışma, Denetleme, Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik, (2004, 16 Mayıs). Resmi Gazete. 16.05.2004.Sayı: 25464.
7. Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar İçin Kullanılan Hayvanların Refah ve Korunmasına Dair Yönetmelik, Resmi Gazete. 13.12.2011.Sayı: 28141.
8. Bilimsel Amaçlar İçin Kullanılan Sucul Omurgalı Canlıların Refah ve Korunmasına Dair Yönetmelik, Resmi Gazete.20.04.2019. Sayı: 30751.
9. Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik, Resmi Gazete. 06.07.2006.Sayı: 26220.
10. Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik, Resmi Gazete.15.02.2014. Sayı: 28914.

LABORATUVAR HAYVAN TESİSLERİNDE BİYOGÜVENLİK SEVİYESİ

BIOSAFETY LEVEL IN LABORATORY ANIMAL FACILITIES

Dr. Canberk YILMAZ

*Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, Konak- İzmir;
Tel -no: 0530.461 66 80, E-posta: canberk.yilmaz1996@outlook.com;
ORCID:0000-0002-0049-7614*

ÖZ

Hayvan modelleri biyolojik araştırmanın temel bir bileşeni olup ve transgenik hayvanların yaratılması da dâhil olmak üzere insan hastalıklarının araştırılmasında birçok açıdan kritik bir rol oynar, ancak bunlar aynı zamanda hayvan popülasyonlarında doğal olarak meydana gelen hastalıkları araştırmak için de kullanılabilir. Ayrıca dezavantajları ve benzersiz biyogüvenlik sorunlarını da beraberinde getirmektedir. İnsan ve hayvanlarda bakteri, virüs, mantar ve parazitler enfeksiyon hastalıklara neden olmaktadır. Bu enfeksiyon etkenleri neden olduğu hastalıkların oluş mekanizması, tedavi edecek ilaçların geliştirilmesi ve bu hastalıklardan koruyacak aşılarda geliştirilmesi için deneysel araştırmalara ihtiyaç vardır. Bu enfeksiyon hastalık ajanlarının laboratuvar ortamında üretilmesi ve üzerinde araştırmalar yapılması için biyogüvenlik seviyesi yüksek laboratuvarlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu enfeksiyon ajanlarının üretilmesi ve üzerinde araştırma yaparken insan, hayvan ve çevre sağlığın koruyacak biyogüvenlik seviyesi ajanın türüne uygun olarak tasarlanan laboratuvarlar bulunmalıdır. Bu laboratuvarlar enfeksiyon ajanın yaratacağı tehlike derecesine göre biyogüvenlik Seviyesi 1-2-3-4 düzeyinde laboratuvarlarda çalışılmaktadır. Eğer bu enfeksiyon ajanları hayvanlar üzerinde araştırma yapılacaksa hayvan güvenlik düzeyi 1-2-3-4 olarak tasarlanan laboratuvarlarda çalışılmaktadır. Biyolojik ajanın deneysel hayvanlar üzerinde yapılacağı araştırmalarda insan, hayvan ve çevreye vereceği tehlikeleri ortadan kaldıracak önlemlerin alındığı güvenli laboratuvardır. Son yıllarda tüm dünyayı etkileyen salgınların etkinlerin üretmek ve üzerinde araştırma yapılabilmesi için bu tür biyogüvenlik düzeyi yüksek hayvan laboratuvarına çok ciddi ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Hayvan Güvenlik Düzeyi, Enfeksiyon Ajan, Laboratuvar Hayvanı

SUMMARY

Animal models are an essential component of biological research and play a critical role in many aspects of investigating human diseases, including the creation of transgenic animals, but they can also be used to study naturally occurring diseases in animal populations. It also brings disadvantages and unique biosecurity issues. Bacteria, viruses, fungi and parasites cause infectious diseases in humans and animals. Experimental research is needed to investigate the mechanism of diseases caused by these infectious agents, the development of drugs to treat them, and the development of vaccines to protect against these diseases. Laboratories with high biosafety levels are needed to produce and conduct research on these infectious disease agents in a laboratory environment. While producing and researching these infectious agents, there should be laboratories designed with a biosafety level appropriate to the type of agent that will protect human, animal and environmental health. These laboratories operate at biosafety level 1-2-3-4, depending on the degree of danger posed by the infectious agent. If these infectious agents are to be researched on animals, they are studied in laboratories designed to have an animal safety level of 1-2-3-4. It is a secure laboratory where precautions are taken to eliminate the dangers of biological agents to humans, animals and the environment in research on experimental animals. There is a serious need for such animal laboratories with high biosafety levels in order to produce and conduct research on the effects of epidemics that have affected the whole world in recent years.

Keywords: Animal Safety Level, Infectious Agent, Laboratory Animal

Giriş

Tüm dünya, küresel ısınma ve iklim değişikliğinin olumsuz etkilerini tüm yönleri ile hissetmektedir. Küresel ısınma ve iklim değişikliğinin çevre sağlığı üzerindeki geri tamir edilemez olumsuz etkileri insan, hayvan ve ekosistem sağlığı üzerine çok ciddi olumsuz etkileri olmaktadır. Bu etkilerden biride enfeksiyon ajanları, onların ara konak ve konakçılarındaki değişimler sonucu dünyayı etkileyen salgınlara neden olmasıdır. Bu salgınlara sebep olan biyolojik ajanların hastalık yapıcı özelliklerinin araştırılması, bunlara karşı koruyucu ve tedavi ajanların geliştirilmesi gereklidir. Bilim insanları farklı araştırma yöntemleri ile bu salgınlara neden olan biyolojik ajanla üzerinde araştırma yapması için çevre, insan ve hayvan sağlığı ve güvenliğini önceleyen güvenli hayvan laboratuvarlarına ihtiyaç duymaktadır. Hayvan modelleri biyolojik araştırmanın temel bir bileşeni olup ve transgenik hayvanların yaratılması da dâhil olmak üzere insan hastalıklarının araştırılmasında birçok açıdan kritik bir rol oynar, ancak bunlar aynı zamanda hayvan popülasyonlarında doğal olarak meydana gelen hastalıkları araştırmak için de kullanılabilir. Ayrıca dezavantajları ve benzersiz biyogüvenlik sorunlarını da beraberinde getiriyorlar (1).

Enfeksiyon hastalık araştırmacıları, bilimsel araştırma soru ve hipotezlerini test etmek için farklı araştırma yöntemleri kullanmaktadırlar. Bilimsel araştırma yöntemlerinde biriside deneysel araştırma yöntemidir. Deneysel araştırma, tabiatta olmuş ya da olması muhtemel olayları laboratuvar şartlarında kontrollü olarak tekrar ortaya koyulmasıdır. Deneysel araştırmalarda in vivo ve in vitro modeller kullanılır. İn vivo modeller model hayvanlar (fare, sıçan, kobay, hamster) ve model organizmalar (maya, nematod) olmak üzere iki grupta toplanır. İn vitro modeller ise hücre kültürü, doku kültürü, bilgisayar modelleri, yapay organlar gibi modellerdir (2). Deneysel araştırmaları içinde hayvan modelleri çok özel bir yeri vardır. Enfeksiyon hastalıklarının patogenezi araştırmalarında, enfeksiyon hastalıklarının tedavi ve korunmasında hayvan modelleri yeri tartışılmaz. Enfeksiyon hastalıklarının araştırmalarında hayvan modeli seçiminde hastalığın insanda görülen patoloji ve semptomları mutlaka taklit etmesi gerekir (3,4). Hayvan model seçiminde, araştırmacının araştırtma sorusuna ve ihtiyaçlarına bağlı olarak en doğru model seçilmelidir. Enfeksiyon ajanları, enfekte edebilecekleri ve hastalığa neden olabilecekleri türlerde sınırlılık göstermekle birlikte son yıllarda çoğu kez bu tür engelini aşarak salgınlara neden olmaktadır. Bu nedenle enfeksiyon hayvan modellerinde konakçı duyarlılığı her zaman önemli bir sınırlılıktır (5). Bu nedenle, deneysel hayvan enfeksiyon modellerinde enfeksiyon oluşturmak için duyarlı hayvanları seçmek önemlidir. Son yıllarda enfeksiyon model hayvanlar için tür engelini aşmak için tür içinde genetiği değiştirilmiş hayvan modeli kullanmak çok önemli hale gelmiştir. Normalde biyolojik ajana duyarlı olmayan hayvan türünü genetiği değiştirilerek duyarlı hale getirilmesi çalışmaları önem kazanmıştır. Böylece tür içinde duyarlılığı geliştirilen enfeksiyon model oluşturma başarı yüksek olmaktadır. Daha az hayvan kullanılması (Reduction) hayvan araştırma etiği açısından da çok önemlidir. SARS CoV-2 pandemisinde insanlaştırılmış fare modeli kullanılması bu durumun en önemli örneğini oluşturmaktadır. Biyolojik ajanlar ve onların ürünleri ile laboratuvarında çalışırken insan, hayvan ve çevre sağlığını korumak için çalışılan ajanın özelliğine göre biyogüvenlik önlemleri almak gerekir. Gelişmiş ülkeler bu biyolojik ajanların laboratuvar ortamında üretilmesi, identifikasyonu ve bunlara karşı ilaç ve

aşı araştırmalarının yapılabildiği biyogüvenlik seviyesi yüksek laboratuvarlar kurmuştur. Bu biyogüvenlik seviyesi yüksek laboratuvarlarda iki temel bölümü bulunmalıdır. Coronavirüs biyolojik enfeksiyon ajanların üzerinde yapılacak çalışmaların in vitro çalışmaların yapıldığı biyogüvenlik düzeyi -3 laboratuvarı (Biosafetylevel- BSL, -3) ve in vivo deneylerin yapıldığı biyogüvenlik hayvan laboratuvarı -3 (Animal Biosafety Level –ABSL-3) laboratuvarları altyapısına ihtiyaç vardır (2,3).

Enfeksiyon hastalık araştırmalarında hayvan modeli

Deneysel araştırmalar içinde hayvan modelleri özel bir yeri vardır. İnsan sağlığı ile ilgili birçok alanda araştırma yöntemi olarak yerine koyulabilecek bir araştırma yöntemi halen yoktur. Ancak doğru hayvan modeli seçilmez ve doğru tasarım yapılmaz ise bilimsel ilerlemeyi engelleyen, yanıltan, gereksiz hayvan, para ve zaman kullanımına neden olmaktadır. Doğru seçilen bir hayvan modeli, insanlar ve hayvanlar arasındaki fizyolojik benzerlikleri ve farklılıkları çok irdelemeli, doğru değerlendirme ve analiz yöntemi ile değerlendirilmeli, üretilen sonuçları doğru yorumlanmalı geçerli ve uygulanabilir genelleme yapılmalıdır (6). Enfeksiyon hastalıkların araştırılmasında hayvan dışı deneysel modeller: Deneysel enfeksiyon modelleri her zaman hayvan modelleri kullanmak durumunda değildir. Örneğin bazı biyolojik ürünlerin, toksinlerin etkilerini, özellikleri test etmek için model organizmalarda (hücre ve doku kültürler, nematod, sinekler, omurgasızlar vb.) Kullanılmaktadır. Seçilen model, araştırmacının araştırtma sorusuna ve ihtiyaçlarına bağlı olarak en doğru model seçilmelidir.

Enfeksiyon hastalıkları konusunda hayvan modeli kullanmak birçok yönden zorunludur. Enfeksiyon hastalık modelleri insanlar üzerindeki verilerinin bulunmadığı yeni ortaya çıkan enfeksiyon hastalıkların patogenezinin anlama, bunlara karşı aşılardan veya terapötiklerin geliştirilmesi için çok önemlidir. Hayvan modelleri, özellikle yeni ortaya çıkan bulaşıcı hastalık araştırmalarında kritik rolü ortaya çıkan hastalık, potansiyel olarak ölümcül veya kalıcı olarak sakat bırakabilir. Bu etkiler tam bilinmeden araştırmalarda insan denekler kullanılarak yapılamaz. Hayvan modelleri, insan sağlığının birçok alanında bilimsel ilerleme için gereklidir. İyi tasarlanmış bir hayvan modeli, insanlar ve hayvanlar arasındaki fizyolojik benzerliklerin ve farklılıkların iyi bilinmesi ve elde edilen sonuçların geçerli ve uygulanabilirliği üzerinde öncelikle durulmalıdır.

Deneysel hayvan modelleri genel olarak indüklenmiş hayvan modelleri, spontan hayvan modelleri, negatif hayvan modelleri ve olası hayvan modelleri olmak üzere dört grupta toplanır (2). Deneysel enfeksiyon hayvan modellerinde çoğunlukla virüs, bakteri, parazit gibi biyolojik ajanları hayvanlara verilerek oluşturulan modellerdir. Deneysel enfeksiyon hayvan modeli, doğal olarak insan veya hayvanlarda olmuş yada olması muhtemel enfeksiyonları laboratuvar ortamında ortaya koyulan modellerdir. Bir modele, deneysel enfeksiyon hayvan modeli demek için, gerçek görülen hastalığın veya patolojinin semptomatik, etiyolojik ve patolojik özelliklerinin deneysel enfeksiyon hayvan modeli taklit etmesi gerekir. Deneysel enfeksiyon hayvan modeli semptomatik, patoloji ve etiyolojik olarak orijinal hastalığı taklit etmiyor ise deneysel hayvan modeli demek mümkün değildir. İnsanlarda geçerli ve

uygulanabilir sonuçlar hedefleniyorsa hayvan modeli seçiminde birçok özellik yönünde insanlara seçilen modelin fizyolojik, morfolojik, homoloji olarak benzerlik göstermelidir.

Bununla birlikte, birçok biyolojik ajan seçicidir ve türe özgü tepkilere neden olur. Bu özellikle bakteri ve virüsler dâhil enfeksiyon ajanları için geçerlidir. Birçok enfeksiyöz ajan, enfekte edebilecekleri ve hastalığa neden olabilecekleri türlerde sınırlılık göstermektedir. Enfeksiyon ajanlarının bazıları normal insanlarda hastalığa neden olurken bazıları sadece immün yetmezliği bireylerde hastalık yapmaktadır. Bu nedenle enfeksiyon hayvan modellerinde konakçı duyarlılığı her zaman önemli bir engel oluşturmaktadır. Bu durumda, deneysel hayvan enfeksiyon indüksiyonlarında duyarlı hayvanları seçmek önemlidir. Son yıllarda bu tür duyarlılığını aşmak için türün içinde genetiği değiştirilmiş hayvan modeli kullanılmaya başlanmıştır. Bu genetiği değiştirilmiş enfeksiyon hayvan modelleri araştırmacıların talepleri doğrultusunda genetik manipülasyonlarla üretildiğinden aslında bit tür indüksiyon deneysel hayvan modelidir. Bu hayvanların tür bazında duyarlı değil iken genetik manuplasyon ile belirlenen enfeksiyon ajanına duyarlı hale getirilmiş hayvan modelleri oluşturulmaktadır. Bu durumun en son örneği SARS-CoV-2 virüsüne normal fareler duyarlı değil iken genetiği değiştirilmiş fareler duyarlı hale getirilmiş ve COVID-19 aşısının geliştirilmesinde kullanılmıştır.

Negatif enfeksiyon hayvan modelleri, bir biyolojik ajanın hastalığa neden olmadığını araştırmak, hastalık süreci hakkında da daha iyi incelemek için negatif modeller kullanılır. Olası hayvan modelleri, bir tür için tanımlanmış hastalık ya da patolojinin muhtemelen diğer bir türde korelasyon yaptığımız modellerdir. Olası model olarak örneğin hamsterlere antibiyotik verilmesinin neden olduğu enterit ve ölümün, toksite Clostridiumdifficile'nin aşırı büyümesini kolaylaştırarak insanlarda antibiyotikle ilişkili psödomembranöz kolit ile ilişkili olduğunun farkına varılması gibi sonuçlara olası modeller örnek verilebilir. Bir türde görülen patolojinin diğer türde olasılıkla neden olduğu düşünülen modellerdir.

Deneysel Enfeksiyon Hayvan Modeli Seçiminde Temel Adımlar şu şekilde sıralayabiliriz; Araştırma sorusu ve hipoteziniz belirlenmesi ve laboratuvar hayvan tesisi çalışma izninde model tür veya soy uygunluğu belirlenmesidir. Biyolojik ajanın özelliğine göre hayvan laboratuvarının biyogüvenlik düzeyini belirlenerek biyolojik ajana duyarlı hayvanın veya altyapının mevcut durumunu kontrol edilmesi gerekir. Çalışılacak biyolojik ajanın hayvanların bertarafının nasıl yapılacağının belirlenmesi, model hayvan ve biyolojik ajanın hastalık sürecinin patolojik ilerlemesi faktörleri tanımlanması, enfeksiyon modelinin oluşturulan çevresel faktörleri (ısı, nem, ışıklandırma vb) tanımlanması önemlidir. Hayvanmodel seçiminde konu ile ilgili literatürü gözden geçirin ve seçilen hayvan modellerinin geçerliliğini değerlendirin. Bir proje ekibi oluşturun ve ekibin içinde tüm yönleri ile tartışılmasından sonra hayvan deneyleri etik kurulunun onayını alınması süreci başlar. Araştırma kaynaklarının yönetilmesi önemli bir aşamadır. Gerekir ise ön çalışma yaparak deney içi hayvan sağlık izleme parametreleri belirlemesi prosedür sonuçları için değerlidir. En önemlisi de deney sonuçlarını raporlanması sürecidir.

Burada sıraladığımız süreç yönetiminde araştırmacının karşılaşacağı olası zorlukların önceden çözüm üretmesi gerekli basamaklardır. Araştırmacı öncelikle model hayvana karar verirken

enfeksiyon hayvan modelleri seçiminde öncelikle konu ile ilgili literatür taranması çok önemlidir. İnsanlarla yakın bir filogenetik ilişkisi olan hayvanlar, daha yüksek bir homoloji ve benzer özellik taşıdığı için sonuçların geçerliliği ve uygulanabilirliği daha geçerlidir. Bununla beraber hayvan deneylerinde temel alınan etik kurallara göre aynı sonuca ulaşılabilecek ise filogenetik skalanın daha altındaki hayvan modellerini ve türlerini tercih etmek zorunluluğunda dolayı fare, sıçan, kobay, hamster, gerbil gibi hayvanları tercih etmek gerekir. Eğer bu türler yetersiz kalırsa daha büyük hayvan modelleri tercih edilebilir. Özellikle enfeksiyon ajan duyarlılığı engelini göz önünde tutulmalıdır (7)

Laboratuvarların biyogüvenlik düzeyi

Deneyisel hayvan araştırmalarında “*Laboratuvar biyogüvenlik düzeyi*” enfeksiyöz ajanların kendisi yada toksinlerin istemeden kontaminasyonundan kaynaklanan diğer biyolojik tehlikelerin ele alınmasıyla ilişkili sağlıkla ilgili riskleri azaltmak için laboratuvarlarda biyogüvenlik ilkelerinin ve uygulamalarının kullanımını açıklar (8). Laboratuvar biyogüvenlik seviyeleri (Biosafety Laboratory Levels- BSL'ler), yürütülen işle ilgili sağlıkla ilgili riskin ciddiyetine bağlı olarak laboratuvarlarda yürütülen faaliyetlere artan koruma sırasına göre uygulanan işlemleri gösterir. Amerika Birleşik Devletleri'nde, BSL-1, BSL-2, BSL-3 ve BSL-4 adları, bulaşıcı ajanlar, toksinler ve diğer biyolojik ürünler üzerinde çalışmak için gerekli minimum güvenli çalışma uygulamalarını, özel olarak tasarlanmış binaları ve güvenlik ekipmanlarını açıklar (9). Araştırma laboratuvar güvenliği, çalışan kişinin, çevrenin ve çalışma materyalinin korunması amacıyla laboratuvar iş akışı kurallarına uyarak, laboratuvar alt yapı, tasarım, donanım ve uygulamalarından en uygun şekilde yararlanılması ile sağlanır. Araştırma laboratuvarı enfeksiyöz ajanlar söz konusu olunca klinik örnekleri, mikroorganizmaların kendileri ya da çeşitli hücresel yapılarını araştıran laboratuvarların yanı sıra, hayvan laboratuvarları için de benzer kurallar geçerlidir. Laboratuvarlarda hem çalışanlar hem de çevreleri için çeşitli enfeksiyon etkenleri ve kazalarla karşılaşma riski bulunmaktadır. Bu noktadan yola çıkarak Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) mikroorganizmaları konakçı varlığı ve özellikleri, patojenitesi, bulaş yolu, birey ve toplum sağlığı açısından etkileri, korunma ve tedavisinin bulunup bulunmadığı gibi özellikleri dikkate alarak dört risk grubu altında toplamıştır. Benzer kriterler dikkate alınarak deneyisel araştırmalar yapan hayvan laboratuvarları dört kategoriye ayrılmıştır. Bu uygulama ile laboratuvarların işleyişi, fiziksel ve teknik donanımları, birincil ve ikincil korunma önlemlerini içeren bir rehber oluşturulmuştur. Öncelikle tüm laboratuvar uygulamalarında olduğu gibi hayvan laboratuvarlarında da hangi kategoride olursa olsun temel laboratuvar güvenliğinin evrensel kurallarına uyulması gerekmektedir (10).

Laboratuvar hayvan tesislerinde riskler ve biyogüvenlik

Laboratuvar hayvan tesisleri mikrobiyolojik riskler yönünden en az risk taşıyan düzeyinden en yüksek risk taşıyan düzeyine kadar dört kategoride toplanmaktadır. Bunlar sırasıyla en düşük risk düzeyinden en yüksek risk düzeyine doğru ABSL-1, ABSL-2, ABSL-3 ve ABSL-4 şeklinde adlandırılmaktadır (Animal Biosafety Level; ABSL). Laboratuvar güvenliği; çalışan kişinin, çevrenin ve çalışma materyalinin korunması amacıyla çalışma sırasında belirli

laboratuvar kurallarına uyulması, laboratuvar alt yapı, tasarım, donanım ve uygulamalarından en uygun şekilde yararlanılması olarak tanımlanmaktadır(11). Tüm laboratuvar uygulamalarında olduğu gibi hayvan laboratuvarlarında da hangi kategoride olursa olsun temel laboratuvar güvenliğinin evrensel kurallarına uyulması gerekmektedir. Bu kurallar aşağıda belirtilmiştir (10).

- Laboratuvar yöneticisi, laboratuvar içindeki iş akışını, günlük rutinde ve acil durumlarda uyulması gereken kuralları içeren bir rehber oluşturmalı, kuralları yazılı ve sözlü olarak çalışanlar ile paylaşmalıdır.
- Laboratuvar hayvanları biriminde çalışacak personel işe alınmadan önce ve alındıktan sonra düzenli olarak gerekli sağlık kontrollerinden geçirilmeli, ön eğitim verilmeli ve hizmet içi eğitimin sürekliliği sağlanmalıdır.
- Laboratuvara görevli personel dışında giriş ve çıkışlar sınırlı olmalıdır.
- Çalışma sırasında uygun giysiler giyilmeli (ayakkabılar kapalı olmalı, palto gibi hareket kısıtlayıcı ya da pahalı ve zarar görebilecek giysiler giyilmemeli), kişisel koruyucu malzemelerden eldiven ve önlük kullanmaya özen gösterilmeli, gerekli durumlarda gözlük, yüz koruyucu kullanılmalı, bu malzemeler ile laboratuvar dışına çıkılmamalıdır.
- Enfeksiyöz materyale veya enfekte hayvana temastan sonra, eldiven çıkarıldıktan sonra ve laboratuvar terk edilmeden önce eller mutlaka yıkanmalıdır.
- Laboratuvar alanı içinde bir şey yenilip içilmemeli, sigara içimi kesinlikle yasaklanmalı, kozmetik maddesi uygulanmamalı, çalışmayı kısıtlayıcı takı ve aksesuarlardan kaçınılmalı, saçlar toplanmalıdır.
- Aerosol oluşumuna ya da etrafa sıçramaya neden olabilecek tüm uygulamalardan kaçınılmalıdır.
- Kesici ve delici aletlerle çalışmalarda gerekli önlemler alınmalı, bu atıkların uzaklaştırılmasında sert plastik ya da sert kartondan atık kapları kullanılmalıdır. Hayvanlara ait tüm dokular tıbbi atık olarak sınıflandırılıp kırmızı renkli plastik torbalar ile atılmalıdır. Bu atıklar günlük olarak birimden uzaklaştırılamıyor ise soğuk hava depolarında bekletilmelidir.
- Hayvana ait tüm biyolojik materyaller (leş, doku, kan, idrar, dışkı, salya gibi vücut sıvıları) potansiyel olarak enfekte kabul edilmeli, temas sonrası derhal su ve sabunla temas bölgeleri yıkanmalıdır.
- Çalışma yüzeyi en az günde bir kez ve her çalışma sonrası dekontamine edilmelidir.
- Zoonozlar ve alerjenler gibi ilave risklere karşı önlemler alınmalıdır.
- Kemirici ve böcekler ile mücadele edilmelidir.

Dünya Sağlık Örgütü-DSÖ ve CDC (Centers for Disease Control and Prevention) tarafından hayvan laboratuvarlarında standardizasyonu sağlamak amacıyla biyogüvenlik düzeylerinin ve laboratuvar uygulamalarının tanımlandığı hayvan biyogüvenlik düzeyi (Animal Biosafety Level; ABSL) rehberinin ana noktaları şu şekilde özetlenebilir (3,9).

Tablo 1. Biyogüvenlik Düzeylerine Göre Hayvan Laboratuvarları Özellikleri ve Çalışılan Ajanlar

Biyogüvenlik Düzeyi	Enfeksiyöz Etkenin Özellikleri	Laboratuvar Uygulamaları ve Güvenlik Donanımları	Çalışılabilen Biyolojik Ajanlar
ABSL 1	Sağlıklı insanda hastalık yapmaz.	Laboratuvara sınırlı erişim, koruyucu giysi ve eldiven kullanılmalı	Escherichiacoli, suçiçeği gibi virüsler ve bakteriler ve birçok bulaşıcı olmayan bakteri içerir. Bu seviyedeki önlem seviyesi minimaldir
ABSL 2	Perkütan, müközmembran yaralanmaları, sindirim yolu bulaş riski taşır.	ABSL-1 artı: • Tehlike uyarı işaretleri girişe asılmalı • Sınıf I-II BGK kullanılır • Atık ve kafes dekontaminasyonu yapılmalı	İnsanlarda enfeksiyonlardan sorumlu olan ve hepatitA-B-C, Lyme hastalığı, Salmonella, kızamık, kabakulak, HIV, Dang gibi aerosol haline gelmiş parçacıklar yoluyla bulaşması zor olan mikroorganizmaları içerir.
ABSL 3	Aerosol yolu ile yerli ya da egzotik ajanlar ciddi hastalık oluşturur.	ABSL-2 artı: • Tüm çalışmalar için özel koruyucu giysi giyilmeli • Tüm işlemler için sınıf II BGK kullanılmalı	İnsanlar için ölümcül olabilen, ancak aşılardan ve diğer tedavilerin mevcut olduğu mikroorganizmaları içerir. Bu grupta şarbon, birçok viralensefalit, coronavirüshantavirüs, rift vadisi ateşi, sıtma, Rocky mountain benekli ateşi ve sarı hummayı içerir.
ABSL 4	Aerosol yolu ya da bilinmeyen geçiş yolları ile tehlikeli ve ölümcül hastalık riski taşır	ABSL-3 artı: • Girişte kıyafet değiştirilmeli ve çıkışta duş alınmalı. • Tüm işlemler için sınıf III BGK ve özel giysiler kullanılmalı. • Ayı bir binada yapılandırılmalı	Ebola, Marburg virüsü, Lassa ateşi, Bolivya hemorajik ateşi birçok tehlikeli virüsleri içerir. Sadece belirli kişiler bu virüslerle çalışabilir ve ayrı bir hava kaynağı ile pozitif basınçlı personel kıyafeti giymelerini gerektirir. Bu virüsler için herhangi bir tedavi yoktur ve aşırı izolasyon önlemleri zorunludur. Bu grupta bakteri yok.

ABSL; Animal Biosafety Level

- ABSL 1: Sağlıklı insan yetişkinlerinde hastalık ile ilişkili olmayan organizmalar.
- ABSL 2: Tıbbi önlemlerin alınabileceği hafif hastalığa neden olabilecek organizmalar.
- ABSL 3: Tıbbi karşı önlemlerin alınabileceği ve toplumda veya çevrede yayılma potansiyeli düşük olan ciddi veya ölümcül hastalığa neden olabilecek organizmalar
- ABSL 4 Tıbbi önlemlerin alınmasının mümkün olmadığı ve toplumda veya çevrede yayılma potansiyeli yüksek olan ciddi veya ölümcül hastalığa neden olacak organizmalar

Gerekli biyogüvenlik önlemlerinin risk grubu sınıflandırması, laboratuvar kaynaklı enfeksiyonları en aza indirmek için mantıklı bir yaklaşımdır. Bununla birlikte, her laboratuvar gerekli özel hususları kolayca belirleyip karşılayabilse de laboratuvar iş akışının günlük durumunun pratikliği hala daha önemlidir. Bu biyolojik tehlike seviyelerine sıkı sıkıya bağlı kalmak, uyma kapasitesine sahip bazı tesisler için yararlı ve faydalı olabilir. TB laboratuvarları için daha önce tarif edilen benzer bir durumda, güvenlik önlemlerinin her

klirik laboratuvarın faaliyetlerine "uyarlanması" için riske dayalı bir yaklaşım daha uygulanabilir. Bunu küresel ölçekte gerçeğe dönüştürmek için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir (9,12).

Hayvan Laboratuvarları Biyogüvenlik Düzeyleri (3,9).

Hayvan Biyogüvenlik Düzeyi 1 (ABSL-1): ABSL-1 laboratuvarlarında, sağlıklı erişkinde hastalık yapmadığı bilinen etkenler ile çalışma söz konusudur. Laboratuvar çalışanları ve çevre için potansiyel tehlike en az düzeydedir. Bu tür laboratuvarlarda tehlikeleri uzaklaştırmak için standart uygulamalar yeterli olmakta, özel uygulamalara gerek duyulmamaktadır. Birincil bariyerler için önlük ve eldiven kullanmak yeterlidir. Ancak insan dışı primatlar ile çalışılıyorsa yüz ve müközmembranların korunması açısından gözlük ve maske kullanımı önerilmektedir.

Hayvan Biyogüvenlik Düzeyi 2 (ABSL-2): Perkütan ve müközmembran temaslarının yanı sıra sindirim yolu bulaşmaları ile insanda hastalık oluşturan patojenlerin çalışıldığı laboratuvarlardır. ABSL-1 uygulamalarına ek olarak bazı önlemlerin alınması gerekmektedir. Öncelikle laboratuvara personel giriş çıkışları sıkı kontrol altında olmalıdır. Çalışan personelin immünizasyon durumu özellikle HBV aşısı, tüberkülin deri testi ve akciğer grafiği düzenli izlenmelidir. Biyogüvenlik el kitabı hazırlanmalı, hizmet içi eğitim daha sıklıkla yapılmalıdır. Hayvan odalarının tüm atıkları (hayvan dokuları, karkaslar, kontamine altlık materyali vb.) üzeri örtülü ve dış yüzeyi dekontamine edilmiş taşıyıcı araçlar ile laboratuvar dışına çıkarılmalı, mümkünse önce otoklav koyulmalı daha sonra bina dışına çıkarılmalıdır. Hayvan odalarından çıkarılacak tüm ekipmanlar önce dekontamine edilmelidir. Aerosol oluşturacak işlemler için sınıf I veya II biyogüvenlik kabini (BGK) kullanılmalıdır. Kafes dezenfeksiyonu elle veya otomatik yıkama makineleri ile yapılabilir.

Hayvan Biyogüvenlik Düzeyi 3 (ABSL-3): Bir bölgeye özgü ya da egzotik hayvanlar ile çalışan laboratuvarlar bu sınıflamada yer almaktadır. Aerosol yolu ile geçiş sonucu ciddi ya da ölümcül hastalıklara neden olabilirler. ABSL-2 düzey laboratuvarlardaki önlemlerin yanı sıra zorunlu uygulamalar vardır. Laboratuvar alanı ile diğer alanlar arasında çift kapı sistemi olmalı ve görevli personelin giriş çıkışı denetlenmelidir. Çalışanların rutin sağlık izlemleri ve serum taramaları yapılmalıdır. Bu kişilerde zoonotik hastalıkların dışında enfeksiyonlara yatkınlık da gelişebilir, bu konuda dikkatli olunmalıdır. Kafesler ve kullanılan tüm malzemeler otoklavlandıktan sonra kullanılmalıdır. Hayvan odalarından çıkan tüm atıklar yönetmeliğe uygun şekilde yakılmalıdır. Kişisel koruyucu ekipmanlara ilave olarak özel koruyucu giysiler giyilmelidir. Laboratuvar içindeki tüm uygulamalar sınıf II BGK içinde yapılmalıdır.

Hayvan Biyogüvenlik Düzeyi 4 (ABSL-4): Aerosol yolu ile geçtiği bilinen ya da diğer geçiş yolları henüz bilinmeyen, çok tehlikeli ve egzotik ajanlar ile çalışan laboratuvarlar bu grupta yer almaktadır. Ciddi ve ölümcül hastalıklara neden olurlar. Bu laboratuvarlar diğer tüm çalışma alanlarından tamamen ayrı bir binada yapılandırılmalıdır. ABSL-3 uygulamalarına ek olarak tüm çalışmalar sınıf III BGK içinde gerçekleştirilmelidir. Çalışanların izlemi, serum örneklerinin toplanması, immünizasyon takiplerinin yapılmasının yanı sıra bilinen risk

faktörleri için profilaktik önlemler alınmalıdır. İster klinik, ister deneysel araştırmalar yapan hayvan laboratuvarları olsun biyogüvenlik kavramının ana unsurları arasında BGK önemli bir yer tutmaktadır (9). Bu risk faktörleri ile temas laboratuvar hayvanının türüne göre (kemirgenler, sürüngenler, kuşlar, primatlar vb.) değişmekle birlikte temel olarak beş başlık altında toplanmaktadır.

Sonuç olarak enfeksiyon ajanların üzerinde yapılacak araştırmalar insan, hayvan ve çevre sağlığı üzerinde oluşturacağı tehlikelerin önlenmesi için biyolojik ajanın özelliğine göre laboratuvar biyogüvenlik önlemleri alınmalıdır. Son yıllarda çıkan salgınlar göz önüne alındığında bu ajanların üzerinde yapılacak araştırmalar için biyogüvenlik seviyesi yüksek hayvan laboratuvarlarına ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Chaplinski N. Animal biosafety. Ensuring Natl Biosecurity. 2016;137–50.
2. Yılmaz O, Yılmaz C. Kanser araştırmalarında model hayvanlar ve organizmalar. Yılmaz O.editör. Klinisyenler İçin Temel Onkoloji. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2021.p.95-101.
3. Yılmaz O, Çalışır M. Deney Hayvanları ve Enfeksiyon Modelleri. Enfeksiyon Patogenezi ve Bağışıklık. 1. Baskı, İstanbul, Akademi Yayınları; 2015. p. 1415-50.
4. Yılmaz O, Çevizci S., Serpen A. Zoonozlarla Mücadelede Veteriner Halk Sağlığı ve Tek Sağlık. 1. Baskı. İzmir Veteriner Hekimleri Odası Yayınları: Berke Matbacılık- İzmir; 2018.
5. JY Richmond, RW McKinney. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. US Government Printing Office.; 2009.
6. Yılmaz O. Gökmen N. Türkiye’de Hayvan Deneyleri Hakkındaki Yasalar Ve Temel İlkeler. In: Ortopedi ve Travmatolojide Deneysel Hayvan Modelleri. 1.Baskı. Pelin ve Tipo Matbaacılık San. Tic. Ltd.; 2015. p.15-25.
7. Yılmaz O. Deney Hayvanı Araştırmalarında Etik Süreç ve Değerlendirilmesi. Tüm Yönleriyle Odyoloji. 1. Baskı, İzmir: US Akademi; 2021. p.930-50.
8. National Research Council. NRCouncil. Guide for the care and use of laboratory animals. 2010.
9. Karaman M. Laboratuvar Hayvanları Biliminde Biyogüvenlik ve İş Sağlığı. Derman MedPubl. 2016; 1:52-64.
10. World HealthOrganisation WHO, Laboratory Biosafety Manuel. [Internet]. 2004. Availablefrom: <https://www.who.int/publications/i/item/9241546506>
11. Centers for Disease Control and Prevention (CDC C for DC and P (CDC. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. HHS Pub., CDC-93. 1999.
12. Peichl P. Health, safety and environmentalprotection in a biologicalresearch laboratory. Int Arch Occup Environ Health. 2000;73(1):8–13.

LABORATUVAR HAYVANLARINDA BİYOUYUMLULUK TESTLERİ

BIOCOMPATIBILITY TESTS IN LABORATORY ANIMALS

Engin SÜMER¹, Osman YILMAZ²

¹ Yeditepe Üniversitesi, Deney Hayvanları Laboratuvarı, Kayışdağı- İstanbul, Tel no: 0546 231 38 76
E-posta: vetenginsumer@gmail.com, ORCID: 0000-0002-9228-7963

² Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Deneysel Hayvan Laboratuvarı, Balçova, İzmir,
Tel no: 0532.350 70 60, E-posta: osman.yilmaz@deu.edu.tr, ORCID:0000-0001-7817-7576

ÖZ

İnsan vücuduyla temas eden tıbbi cihazların, biyomalzemelerin ve biyolojik ajanların düzenleyici otoriteler tarafından olası etkileşimler ve olası istenmeyen yan etkiler açısından test edilmesi zorunlu tutulmaktadır. Biyouyumluluk testi yapmanın amacı, bir cihazın insan kullanımına uygunluğunu belirlemek ve cihazın kullanımının herhangi bir potansiyel zararlı fizyolojik etkiye sahip olup olmayacağını görmektir. Bu testler uluslararası düzeyde standartlaştırılmıştır. Özellikle Avrupa Topluluğu'nda bu alandaki her araştırma için EN ISO 10993 kuralları kılavuz niteliğindedir. Ürün sınıflarına göre yapılması gereken *in vivo* testler sensitizasyon testi, irritasyon testi, akut sistemik toksisite, implantasyon testi ve tekrarlı doz toksisite testleridir. Ayrıca mutajenite, kanserojenite, üreme ve gelişim toksisitesi özellikle insan vücudu üzerinde uzun süre kalması planlanan malzemeler için yapılması gereken *in vivo* testleri oluşturmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Biyouyumluluk testleri, toksisite testleri, tıbbi cihazlar

SUMMARY

Medical devices, biomaterials, and biological agents that come into contact with the human body are required to be tested by regulatory authorities for potential interactions and possible unwanted side effects. The purpose of conducting biocompatibility testing is to determine the suitability of a device for human use and to assess whether the device may have any potential harmful physiological effects. These tests are standardized on an international level, with EN ISO 10993 guidelines being particularly important for research in the European Union. Depending on the product class, *in vivo* tests that should be conducted include sensitization testing, irritation testing, acute systemic toxicity testing, implantation testing, and repeated dose toxicity testing. Additionally, mutagenicity, carcinogenicity, reproductive and developmental toxicity testing are required, especially for materials intended to remain in the human body for an extended period.

Keywords: Biocompatibility tests, toxicity tests, medical devices

Biyouyumluluk, bir tıbbi cihazın veya malzemenin belirli bir uygulamada uygun konak yanıtıyla performans gösterme yeteneği olarak tanımlanır. Tıbbi cihazlar ve bunların bileşen malzemeleri klinik olarak kullanıldığında istenmeyen etkiler yaratabilecek bileşikleri sızdırabilir veya yüzey özelliklerine sahip olabilir. Biyouyumluluk testi, canlı sistemlerdeki malzemelerin, cihazların ve farmasötiklerin uyumluluğunu ve güvenliğini değerlendirmenin temel amacına hizmet eder. Bu amaç için *in vivo* ve *in vitro* test sistemleri geliştirilmiştir ve ulusal-uluslararası kılavuzlar yayınlanmıştır.

Biyouyumluluk test seviyeleri 3 aşamada incelenir

Seviye 1: *Invitro* Biyolojik Etkileşim: Tıbbi malzemelerin kontrollü laboratuvar ortamlarında canlı hücre ve dokularla etkileşimini değerlendirir. Amacı tıbbi malzemelere karşı hücresel tepkiyi ölçmek ve potansiyel toksisiteyi belirlemektir. Yöntem olarak hücre kültürü çalışmaları, sitotoksikite testleri kullanılır. En çok kanla temas eden tıbbi cihazlar ve implantlar için yapılmaktadır.

Seviye 2: *Invivo* Biyolojik Etkileşim-Hayvan Testleri: Tıbbi cihazlarda sistemik ve lokal reaksiyonları değerlendirmek için canlı organizmalar kullanılır. Amacı daha karmaşık biyolojik sistemlerde biyouyumluluğun değerlendirilmesi, seviye 3 öncesi veri toplanmasıdır. Bu amaçla sistemik toksisite çalışmaları, implantasyon testleri, irritasyon ve hassasiyet testleri en çok yapılan testlerdir.

Seviye 3: Klinik Araştırmalar: Klinik deneyler yoluyla insanlarda malzeme performansını inceler. Bu seviyenin amacı gerçek dünya senaryolarında biyouyumluluğu doğrulamaktır. Daha çok gözlemsem ve kontrollü çalışmalar yapılır.

Sistemik Toksikite Testleri

Akut Sistemik Toksikite

Bir kimyasalın veya ürünün tek dozunun ya da çoklu dozlarının 24 saat içinde belirli bir yoldan (oral, dermal veya inhalasyon) deney hayvanına verilmesi ve buna bağlı olarak oluşacak toksik etkilerin değerlendirilmesini içerir. Toksik etkilere bağlı klinik semptomlar madde alınmasından hemen sonra ya da çok kısa bir süre sonra şekillense gözlem süresi 21 güne kadar uzayabilir. Testin yapılaş amacı FAZ 1 çalışmaları ve uzun süreli tekrarlı doz toksisite testleri için temel toksikolojik veri elde etmektir. Aynı zamanda elde edilecek olan verilerin olası hedef organ ve olası etki şekilleri hakkında da bilgi vermesi açısından önemlidir. Akut sistemik toksisite çalışmalarında elde edilecek sonuçlar, uzun süreli toksisite çalışmalarında hayvanlara verilecek-uygulanacak doz hesaplamasında kullanılır (1). Akut sistemik toksisite testleri, uygulama yollarına göre aşağıdaki kılavuzlar baz alınarak yapılır.

- Akut Oral Toksikite- Sabit Doz Prosedürü: OrganisationforEconomicCo-operationand Development (OECD) Test Kılavuzu 420
- Akut Oral Toksikite- Akut Toksik Sınıf Yöntemi: OECD Test Kılavuzu 423
- Akut Oral Toksikite – Doz Azaltma ve Artırma Prosedürü: OECD Test Kılavuzu 425
- Akut DermalToksikite: OECD Test Kılavuzu 402
- Akut Solunum Toksikitesi: OECD Test Kılavuzu 403
- Akut Solunum Toksikitesi- Akut Toksik Sınıf Yöntemi: OECD Test Kılavuzu 436
- Akut Solunum Toksikitesi- Sabit Konsantrasyon Prosedürü: OECD Test Kılavuzu 433

Deney hayvanlarında akut sistemik toksisite testleri sonucunda, LD₅₀ ve LC₅₀ değerleri hesaplanmaktadır. LD₅₀ değeri, bir defada verilen ve bir grup test hayvanının % 50'sinin (yarısının) ölümüne neden olan madde miktarıdır. LC₅₀ değeri ise maddelerin hava veya sudaki öldürücü konsantrasyonlarıdır ve bir grup test hayvanının yarısının ölümüne neden olacak doz miktarını belirtir.

Akut sistemik toksisite çalışmalarında tipik olarak kemirgen (fare veya sıçan) kullanılır. Tıbbi cihaz ya da kimyasal tek cinsiyette kullanılacaksa deneyde o cinsiyetteki hayvanda yapılabilir. Sağlıklı, genç-erişkin hayvanların kullanılması zorunludur. Hayvanların laboratuvar ortamlarında bakılması ve test uygulama süreçlerinde mutlaka yerel ve merkezi yönetimlerin mevzuatlarına uyulmalıdır (2). Teste alınacak hayvanlar randomize edilmeli daha sonra tek tek kafeslere konulmalıdır. Verilecek olan dozaj hacimlerinde ulusal veya uluslararası kılavuzlardan yararlanılabilir. Vücut ağırlığı ölçümleri, doz verilmeden hemen önce, doz verildikten sonra ilk üç gün boyunca günlük olarak ve çalışma süresi gerektiriyorsa ilk dozdan sonra haftalık olarak ve çalışma sonunda yapılmalıdır. Klinik gözlem süresi en az 3 gün ve gerektiriyorsa daha fazla süre boyunca yapılmalıdır. Klinik gözlemlerin ne sıklıkla yapılacağı kesin olarak belirlenmelidir. Kafeslerde can çekişen hayvanların hemen izole edilmesi ve gerekirse feda edilmesi, ölü bulunan hayvanlarında hızlı bir şekilde nekropsi edilmesi gerekebilir. Hayvanların solunum sistemi, sindirim sistemi ve sinir sistemi gibi hayati fonksiyonların takip edilmesi açısından klinik gözlemlerin deney hayvanlarında tecrübeli bir kişi tarafından yapılması önemlidir. Klinik patoloji ve gros patoloji yapılması klinik gözlemler sonucuna dayanır. Histopatolojik inceleme genel olarak akut sistemik çalışmalarında yapılmaz.

Subakut Sistemik Toksisite

Deney hayvanının 24 saat ile 28 gün arasında test maddesine birden çok kez veya sürekli maruz kalmasıyla ortaya çıkabilecek toksisitenin belirlenmesi amacıyla yapılır(3). Oluşabilecek olan zehirlenme akut zehirlenmeye göre oranla daha geç şekillenir ve daha uzun sürelidir. Vücutta meydana gelecek hasarın geri dönüşümü, maddeye karşı oluşabilecek tolerans ve maddenin hangi hedef organda birikim yapabileceği hakkında bilgiler vermesi açısından önemli bir testtir. Deney için sağlıklı genç-erişkin kemirgen hayvanlar kullanılır. Her iki cinsiyette toplamda 10 hayvan ve bunları temsil edecek kontrol gruplarına ihtiyaç vardır. Madde uygulama oral, dermal, inhalasyon ya da parenteral yol ile yapılabilir. Yalnız intravenöz uygulamalarda test süresi 28 gün yerine 14 gün olarak belirlenmelidir. Klinik olarak hayvanların canlı vücut ağırlığı günlük ve/veya haftalık olarak tartılmalıdır. Hayvanlar klinik olarak uzman kişilerce gözlenmelidir. Klinik gözlemlerde solunum sistemi, motor hareketler, konvülsiyon, refleksler, göz, kardiyovasküler sistem, salivasyon, piloereksiyon, kas tonu, gastrointestinal sistem ve deri her hayvanda ayrı ayrı incelenmeli ve klinik gözlem formuna varsa bulgular yazılmalıdır. Ayrıca hayvanların yeme-içme durumları günlük olarak takip edilmeli ve not alınmalıdır. Test sonunda tüm hayvanlar ötanazi yapılmalı klinik patolojik incelemeler için kan örneği toplanmalıdır. Gros patoloji gerekirse kör bir gözlemci tarafından yapılmalı ve histopatolojik incelemeler için örnekler alınmalıdır.

Subkronik Sistemik Toksisite

Deney hayvanının ortalama yaşam süresinin yaklaşık 1/10'luk kısmı kadar süren çalışmalardır. Madde kemirgen hayvanlara 30-90 gün arası uygulanır. Günlük uygulamalar oral, dermal, inhalasyon ya da parenteral yol ile yapılabilir. Genelde haftanın her günü uygulansada haftada 5 kez yapılan test çalışmaları daimettir. Subkronik testin yapılış amacı spesifik olarak etkilenen hedef organı bulmak ve maddenin NOAEL değerini hesaplamaktır. Test için her iki cinsiyetten toplam 20 hayvan kullanılır. Sağlıklı genç-erişkin hayvanların kullanılması gerekmektedir. Haftalık olarak test ve kontrol grubundaki hayvanların canlı vücut ağırlıkları ile beraber yem ve su tüketimi kayıt altına alınır. Test sonunda hematolojik incelemeler için kan örnekleri alınması gerekebilir. Aynı zamanda klinik gözlem olarak gerek görülürse diğer vücut sıvı ve sekresyonlarının toplanması ve analiz edilmesi gereklidir. Test sonunda grosnekropsi ve tam histopatolojik inceleme yapılması gerekmektedir.

Kronik Sistemik Toksisite

Test maddesine deney hayvanının tüm yaşamı boyunca ya da yaşamının büyük bir kısmı boyunca maruz bırakılması ile yapılan uzun süreli bir deneydir. Test süresi kemirgenler için 6 ay – 24 ay arası olabilir. Bu test uzun süre kullanılan ilaçlar, gıda katkı maddeleri ve vücutta çok uzun süre kalması muhtemel tıbbi cihazların hem toksik etkilerini hem de kanser yapıcı etkilerini ortaya koyması açısından önemlidir. Madde uygulama haftada 7 gün olduğu gibi bilimsel açıdan gerekçelendirilerek bu süre 5 güne düşürülebilir. Hayvanların canlı ağırlık ve yem-su tüketimi haftalık olarak kaydedilir. Deney sonunda kapsamlı bir hematolojik inceleme yapılır. Diğer vücut sıvı ve sekresyonlarının analiz edilmeside önemli bir yere sahiptir. Grosnekropsi ve histopatolojik inceleme için dokular toplanır incelemeye gönderilir, şahit numuneler ayrı ayrı sıvı azot tanklarında veya -80°C'deki derin dondurucularda saklanır.

Tüm uzun süreli test çalışmalarında hematolojik kan incelemeleri için pıhtılaşma potansiyeli (PT, APTT), hemoglobin derişimi, hematokrit sayımı, trombosit sayımı, kırmızı kan hücresi sayımı, beyaz kan hücre sayımı, ve beyaz kan hücresi ayrıcının değerlendirilmesi tavsiye edilir. Kanda bakılması tavsiye edilen biyokimyasal incelemelerde karaciğer ve böbrek enzimleri başta olmak üzere albümin, total protein, bilirubin, fosfor, potasyum, sodyum, klor, kalsiyum, kolesterol, trigliserit ve bilimsel olarak gerekli görülen diğer enzimlerdir. Gerekli durumlarda idrar ve omurilik sıvısı dahil tüm vücut sekresyon ve sıvılarında analiz yapılmalıdır.

Uzun süreli ve tekrarlı doz toksisite testlerinde histopatolojik incelemelerde alınması gerekli doku ve organlar: adrenal bezler, bütün gros lezyonlar, kemik iliği, beyin, sindirim sisteminin tüm kısımları, üreme sisteminin tüm kısımları, gözler, kalp, solunum sistemi (burun boşluklarından bronşlara kadar), lenf düğümleri, kas, sinir, pankreas, cilt, timüs bezi, tükrük bezleri, tiroid ve paratiroid, dalak, pankreas, mesanedir. Ayrıca hedef organa göre alınacak dokuların artırılması mümkündür. Doku ve organlar çıkartılmadan önce renk, hacim, yapışma, koku ve deformasyon varlığı açısından makroskobik olarak incelenmelidir. Doku analizlerine ilk önce yüksek doz test grubundan başlanılmalı ve bunun sonucunda gerekli görülürse düşük ve orta doz grupları incelenmeye alınmalıdır. Doku ve organlar çıkartılırken bazı organların

yaş ağırlıklarının tartılması gereklidir. İşlemi yaparken zarar vermeden ve gerekirse çevre dokulardan tutularak çıkartılması ve dişli pensetler kullanılmaması gerekir.

İmplantasyon Testleri

İmplantasyon testleri; vücuda yerleştirilen tıbbi cihazların veya biyomalzemelerin deney hayvanında uygun bir alana kısa veya uzun süreli yerleştirilmesi sonucu ortaya çıkabilecek toksik etkilerini incelemek amacıyla yapılır (4). Test malzemesi klinik olarak nerede kullanılacaksa deney hayvanında da oraya implante edilmelidir. Test için fare, sıçan ve tavşan gibi laboratuvar hayvanları tercih edilir. Test süresinin belirlenmesinde genellikle tıbbi cihazın kullanımına göre bir bilimsel gerekçe oluşturulmalıdır. Testi yapacak kişinin deney hayvanlarının anestezisi, preoperatif, operasyon ve post operatif işlemlerine hakim olması, grosnektomi yapacak kişinin deney hayvanlarının özellikle doku ve organ bazında anatomik bilgilerine hakim olması önemlidir. Test maddesi deney hayvanlarında cilt altı, kas veya kemik bölgesine implante edilir. Deney sonunda makroskopik ve mikroskopik inceleme yapılır. Kemik ve kas bölgesine implant işlemlerinde fare veya sıçan yerine kobay ve tavşan gibi daha büyük hayvanların kullanılması tercih edilir. Kontrol maddesi ve test maddesi aynı deney hayvanında aynı anatomik bölgeye yerleştirilmeli ama birbiri ile teması engellenmelidir.

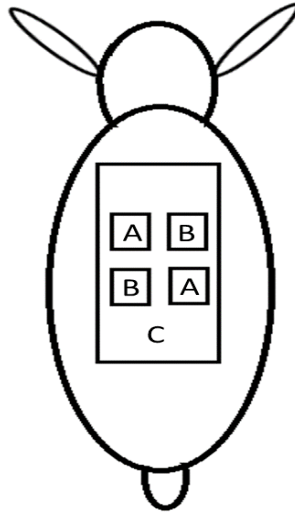
Tahriş Testleri

Tıbbi cihazlar, biyomalzemeler veya kimyasal malzemelerden genellikle cilde ve daha az sıklıkla vücudun diğer yerlerine temas kaynaklı oluşabilecek olan irritasyonun derecesini belirlemek için yapılan testlerdir. Cilt tahrişi ve özel bölgelerin tahrişi (göz, intradermal, oral, rektal, anal, penil) aynı kılavuz içinde ayrı ayrı kısımlar altında incelenmelidir. Kimyasal Maddelerin Zehirli Etki Kayıtlarında (RTECS) tavşanlar ile ilgili çok miktarda dermal tahriş bilgisi bulunduğundan dolayı, tavşan tercih edilen deney hayvanıdır. 2000'in üzerinde RTECS kayıtları, % 85 tavşanla, % 7,5 insanla, % 4 fareyle ve % 3 kobayla yapılan deney sonuçlarını rapor etmektedir.

Hayvan Deri Tahriş Testi

Test maddesinin tavşan derisini tahriş etme potansiyelini ölçmek için yapılır. Teste başlamadan önce deney hayvanına alternatif yöntemlerin değerlendirilmesi gerekir. Birçok ulusal ve uluslararası kuruluş tarafından akredite edilmiş *in vitro* test yöntemleri mevcuttur. Test kılavuzları için OECD 404 veya TS EN ISO 10993-23'e bakılmalıdır(5). Test maddesinin hayvana uygulanmadan önce fiziksel ve kimyasal analizlerinin yapılmış olması gerekir. Test maddesinin pH'ı 2'ye eşit veya daha düşükse veya 11,5'e eşit veya daha yüksekse, malzeme tahriş edici olarak beyan edilmeli ve daha fazla deneyin yapılmasına olanak verilmemelidir. Test maddesi hazırlanmasında TS EN ISO 10993-12 kılavuzu referans alınmalıdır. Hayvanların bakım ve beslemeleri için TS EN ISO 10993-2 kılavuzuna uyulmalıdır. Hayvan deri tahriş testinde, genç-erişkin, her iki cinsiyetten tavşanlar kullanılır. Eğer dişli tavşanlar kullanılacaksa daha önce hiç doğum yapmamış olması gerekir. Testte kullanılacak tavşanın sırt derisinin düzgün ve pürüzsüz olması, yaralanma ve kaşımaya bağlı çizikler,

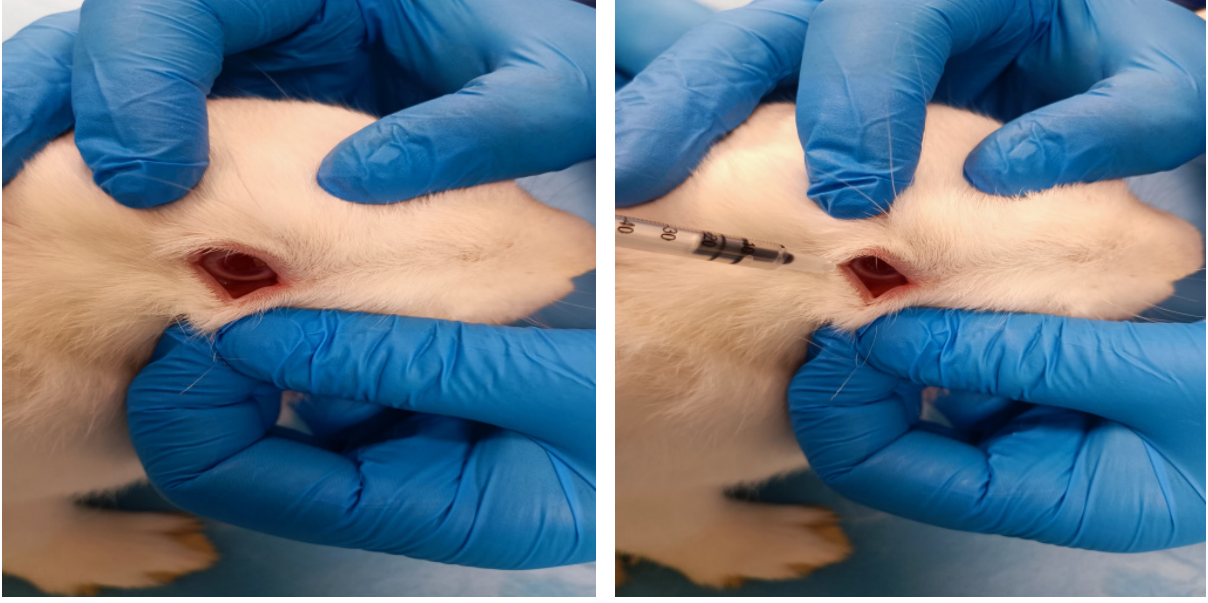
kabuklanmaların olmaması gerekir. Hayvanın sırt kısmı testten yaklaşık 4-24 saat öncesi tıraş edilir. Test maddesi 0,5 mg veya 0,5 ml miktarda hayvanın sırt bölgesinde 2,5 cm x 2,5 cm'lik test maddesi alanına uygulanır (Şekil 1). Kontrol maddesi ve pozitif kontrol maddeleride yine hayvanın sırt kısımlarına aynı miktarlarda kendi bölgelerine uygulanır. Uygulama bölgeleri kapatıcı bir bez ile kapatılarak üzerleri elastik bandajla örtülür. Hayvanın ağız veya arka ayakları ile bölgeye ulaşma ihtimaline karşı Elizabeth yakalıkları ve restrainerlar kullanılabilir. Kapatıcı sargılar uygulamadan sonra 4. saat çıkarılarak bölge su veya başka bir tahriş özelliği olmayan çözücü ile temizlenir. Test ve kontrol maddelerinin bölgeleri işaretlenir. Bölgeler eritem ve ödem açısından yamaların çıkmasından sonraki 1. saat, 24. saat, 48. saat ve 72. saat gözlemlenir. Yapılan gözlemler sonucunda birincil tahriş indeksi hesaplanarak test maddesinin iritan özelliği belirlenmiş olur.



Şekil 1. A Bölgesi: Test Maddesi, B Bölgesi Kontrol Maddesi,
C Bölgesi: Tıraşlı sırt bölgesi

Oküler Tahriş Testi

Tavşan göz tahriş deneyi insanlarda oküler tahriş tahmin etmek amacıyla geliştirilmiştir. Test maddesi göz ve/veya göz kapağı ile temas edecekse bu teste ihtiyaç duyulmaktadır. Göz tahriş etkilerini araştırmak için alternatif *in vitro* yöntemler mevcuttur ve test yapılmadan önce bunların değerlendirilmesi büyük önem arz etmektedir. Test maddesinin hayvana uygulanmadan önce fiziksel ve kimyasal analizlerinin yapılmış olması gerekir. Test maddesinin pH'ı 2'ye eşit veya daha düşükse veya 11,5'e eşit veya daha yüksekse, malzeme tahriş edici olarak beyan edilmeli ve daha fazla deneyin yapılmasına olanak verilmemelidir. Testte deney hayvanı olarak tavşan kullanılır. Teste başlamadan önce gözler bir oftalmoskop ile ayrıntılı bir şekilde incelenmelidir. Test maddesi tavşanın bir gözünün alt konjunktivasına (Resim1) 0,1 ml damlatılır (Resim 2) ve göz kapakları 1 saniye kapalı tutulur. Diğer göze işlem yapılmaz, kontrol bölgesi olarak değerlendirilir. Damlatmadan sonraki 1. saat, 24. saat, 48. saat ve 72. saat gözler oftalmoskop yardımı ile muayene edilir. Kornea ve irisde meydana gelen hasarlar TS EN ISO 10993-23 veya OECD 405 kılavuzlarına göre puanlanarak maddenin oküler irritasyon derecesi belirlenmiş olur.



Resim 1-2. Test maddesi tavşanın bir gözünün alt konjunktivasına 0,1 ml damlatılması

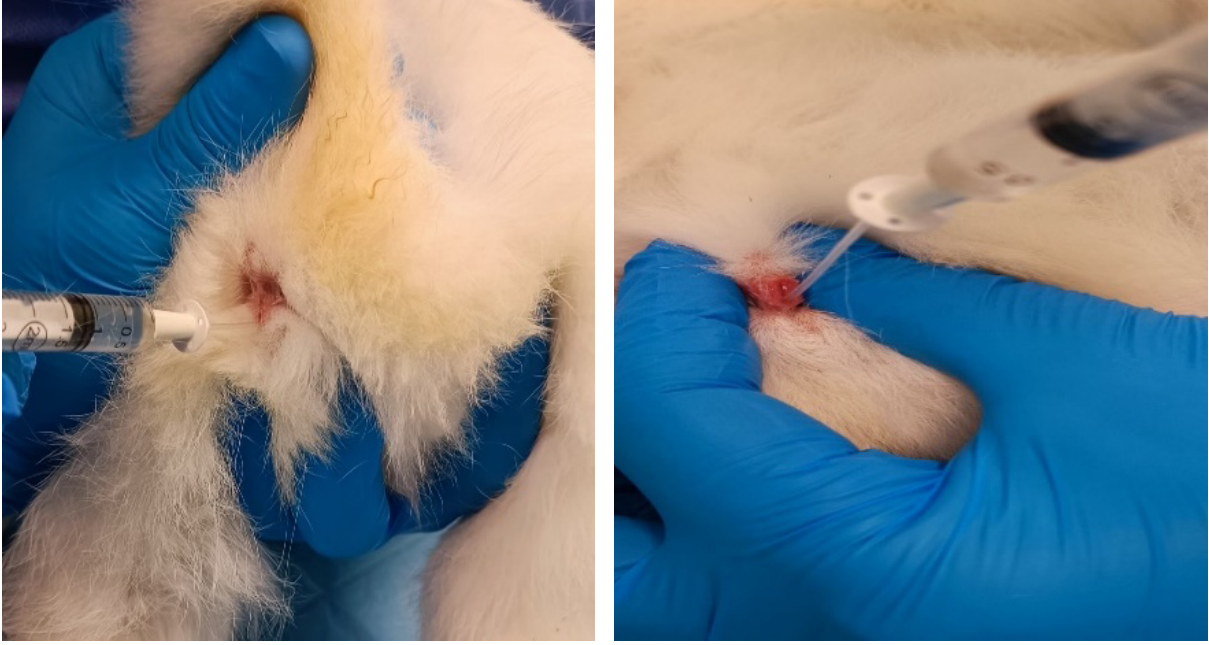
Oral Mukoza Tahriş Testi

Ağız mukozası ile temas edecek olan tıbbi cihaz ya da kimyasalların tahriş oluşturma potansiyelini belirlemek için yapılır. Cilt veya göz için tahriş edici olduğu gösterilen veya $\text{pH}'ı \leq 2$ veya $\geq 11,5$ olan herhangi bir malzeme deneye tabi tutulmamalı ve ağız dokusu için potansiyel tahriş edici olarak tanımlanmalıdır. Test için hamster kullanılır. Hayvanların tek bir suştan olması, akraba olmaması ve her iki cinsiyette suriyehamsterları olması gerekmektedir. Deney malzemesi bir pamuk yardımı ile hayvanın ağzında bulunan keseye yerleştirilir. Kontrol bölgesi olan diğer yanağa bir şey yerleştirilmez. Test maddesine en az 5 dakika süre ile maruz kalınır. Akut değerlendirmeler için 4 saat boyunca her saat başı bu işlemler tekrarlanır. Son uygulamadan sonra 24. saatte hayvanların test ve kontrol bölgeleri makroskopik olarak incelenir. Daha sonra hayvanlar ötanazi edilerek histopatolojik incelemeler için ağız bölgesinden doku örnekleri alınır.

Vajinal Tahriş Testi

Vajinal doku ile temas edecek olan tıbbi cihaz, biyomalzeme veya kimyasalların bu bölgede tahriş oluşturma potansiyelini belirlemek için yapılır. Deri veya göz için tahriş edici olduğu gösterilen veya $\text{pH}'ı \leq 2$ veya $\geq 11,5$ olan herhangi bir malzeme deneye tabi tutulmamalı ve vajinal doku için potansiyel tahriş edici olarak tanımlanmalıdır. Testte tek bir suştan, 2 kg ve üstü, sağlıklı, genç-yetişkin dişi albino tavşanlar kullanılmalıdır. Hayvanlar her uygulamadan önce vajinal akıntı, şişme ve/veya diğer vajinal enfeksiyon belirtisi, tahriş ve/veya yara için kontrol edilir. Vajinadaki fizyolojik değişimlere bağlı olarak yanlış bir pozitif reaksiyonun verilmediğinden emin olmak için estrus (kızışma) devresinde de bir kontrol yapılmalıdır. Bunun içinde vajinal sürüntü bir steril swap ile alınmalı ve mikroskop altında incelenmelidir. 1 ml test maddesi 6 cm uzunluğunda bir kateter yardımı ile hayvanın vajinasının içine verilir (Resim 3-4). Kısa süreli çalışmalar için bu işlem ardışık 5 gün boyunca tekrarlanmalıdır. İlk

uygulamadan sonra 24. saatte ve her uygulamadan hemen önce akıntı, eritem ve ödem belirtileri için vajina açıklığı ve perineumun görünümü kaydedilir. Son dozlamadan 24 saat sonra deney hayvanları ötanazi yapılarak vajina önce makroskopik inceleme tabi tutulur sonra mikroskopik inceleme için örnek alınır.



Resim 3 -4. 1 ml test maddesinin 6 cm uzunluğunda bir kateter yardımı ile hayvanın vajinasının içine verilmesi

Rektal Tahriş Testi

Sadece rektal dokuya temas edecek test maddelerinin toksisitesinin belirlenmesi amacıyla yapılır. Deri veya göz için tahriş edici olduğu gösterilen veya pH'sı ≤ 2 veya $\geq 11,5$ olan herhangi bir malzemedeneye tabi tutulmamalı ve rektal doku için tahriş edici olarak tanımlanmalıdır. Tek bir suştan her iki cinsiyette 2 kg'dan daha hafif olmayan sağlıklı genç yetişkin albino tavşanlar kullanılmalıdır. Kısa yumuşak bir kateter (6 cm) veya kör uçlu bir kanül 1 mL'den daha fazla kapasiteye sahip bir enjektöre takılır, enjektör ve kateter 1 mL deney numunesi ile dozlanacak şekilde doldurulur. Her bir hayvan için katetertakılı ayrı bir enjektör hazırlanır. Kateter, takılmadan hemen önce kontrol numunesi veya uygun bir kayganlaştırıcı ile ıslatılır. Perineuma uygulama yapmak için hayvanın kuyruğu tutularak kaldırılır. Islatılmış kateter yavaşça rektumasokulur ve şiringadaki 1 mL doz verilir (Resim 5). Daha sonra kateter geri çekilir ve uygun bir şekilde atılır. Her bir hayvanın rektum kapasitesindeki farklılıklardan dolayı deney numunesinin bir kısmı verilme sırasında veya verildikten hemen sonra dışarı akabilir. Dışarı atılan malzeme yumuşak bir kağıt mendille nazikçe silinmelidir. Yukarıdaki işlem 5 ardışık gün boyunca 24 saat aralıklarla her gün tekrarlanır. Uzun süreli tekrar maruz kalma deneyleri için, uygulamaların sayısı, süresi ve aralığı, klinik ortamda beklenen maruz kalma sürelerine dayandırılır. Son dozdan sonra 24. saatte hayvanlar etik kurallara uygun olarak ötanazi yapılır. Alt bağırsağın tamamı kesilerek çıkartılır, uzunlamasına açılır ve tahriş, epitel tabaka hasarı ve nekroz belirtileri için incelenir.

Rektum ve kalın bağırsağın distal kısmı histolojik inceleme işleminden önce uygun bir tespit maddesi içine yerleştirilir. Deney tavşanlarının rektal dokuları, kontrol hayvanlarının rektal dokuları ile karşılaştırılır.

Penil Tahriş Testi

Penil dokuya temas etmesi beklenen malzemelerin tahriş oluşturma potansiyelini belirlemek için yapılır. Deri veya göz için tahriş edici olduğu gösterilen veya pH'sı ≤ 2 veya $\geq 11,5$ olan herhangi bir malzeme deneye tabi tutulmamalı ve penil doku için potansiyel tahriş edici olarak tanımlanmalıdır. Test için erkek albino tavşanlar veya kobaylar kullanılmalıdır. Sağlıklı, genç, yetişkin 2 kg'dan daha hafif olmayan tavşanlar ve 300 gram ila 500 gram ağırlığındaki kobaylar kullanılabilir. Ayakları bir asistan tarafından emniyetli şekilde tutularak hayvan sırtüstü yatırılır. Penis dışarı çıkarmak için işaret parmağı ve orta parmak ile genital bölgeye nazikçe baskı uygulanır. Penis dışarı çıktığında penis kaplayacak şekilde yeterli miktarda deney numunesi (yaklaşık 0,2 mL) uygulanır (Resim 6). Penisin kılıf içine geri çekilmesine izin verilir. Hayvanın deney yerini yalamasını ve birincil tahrişin ikincil faktörlerle etkilenmesini engellemek amacıyla gerekli önlemler alınmalıdır. Akut maruz kalma için yukarıdaki işlem 4 saat süreyle her saat tekrarlanır. Akut maruz kalma için penisin görünümü ilk uygulamadan 1 saat sonra ve sonraki uygulamalarda kaydedilir. Penisin görünümü son uygulamadan sonra 1. saatte, 24. saatte ve 48. saatte kaydedilir. Makroskobik ve mikroskobik incelemeler sonucunda test maddesinin penil tahriş skoru oluşturulur.



Resim 5.Test maddesinin rektuma verilmesi



Resim 6. Deney maddesinin penisi kaplayacak şekilde uygulanması

Intradermal Reaktivite Testi

Tıbbi cihaz ve biyomalzeme özütlerinin deney hayvanının sırt derisine intradermal enjeksiyonu ve buna bağlı olarak tahriş oluşturma potansiyeline dayanır. Cilt, göz veya mukoza dokusu için tahriş edici olduğu gösterilen veya pH'sı ≤ 2 veya $\geq 11,5$ olan herhangi bir malzeme intradermal olarak deneye tabi tutulmamalıdır. Tek bir suştan her iki cinsiyette 2 kg'dan daha hafif olmayan

sağlıklı genç yetişkin albino tavşanlar kullanılmalıdır. Deney malzemesini değerlendirmek için başlangıçta en az iki hayvan kullanılmalıdır. Test maddesi uygulamasından önceki 4.-18. saatte tüyler tıraş edilir. Polar ve polar olmayan çözücüler ile birlikte kontrol maddesi tıraşlı alandaki 5'er bölgeye intradermal yol ile enjekte edilir. Kullanılan enjektörün madde geçişine izin verecek en küçük çapta olması önemlidir. Madde verildikten sonra 3 gün boyunca günde bir kez test bölgesi eritem ve ödem açısından değerlendirilir.

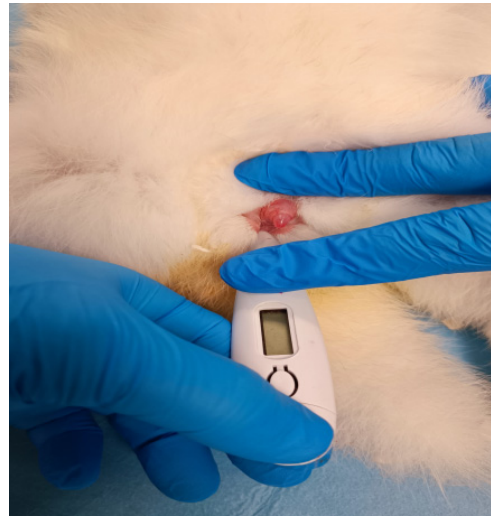
Pirojenite Testi

Pirojen 'ısı üreten' anlamına gelmektedir. Pirojen maddeler ise gram pozitif bakteri veya mantarların ürettikleri metabolizma ürünleridir. Pirojenlik, malzeme aracılı ve endotoksin aracılı olarak ikiye ayrılır. Malzeme aracılı ürünlerin pirojenite testi için tavşanlarda pirojenite testi yerine alternatif yöntemler (Limulus Amebosit Lisat) yapılabilir. Endotoksin aracılı ürünlerin pirojenite testinde kılavuz olarak Avrupa ve Amerika Farmakopesi

Kullanılabilir(6). Pirojenite testi maddenin tavşanlara damar içi (Resim 7) verilmesini takiben vücut ısısı artışına dayanan bir test türüdür. Testte sağlıklı, her iki cinsiyetten en az 1,5 kg hayvanlar kullanılır. Test öncesi testte kullanılacak bütün materyalin buharlı otoklav cihazında steril edilmesi gerekir. Test işlemi sırasında tavşanların vücut ısısının artışına neden olacak stres parametrelerinin en az düzeyde olması sağlanır. İşlem yapılırken hayvanın restrainera konulması ya da örtü ile sarılması vücutta ısının artışına neden olacağı için tavsiye edilmez. Test başlangıç testi ve esas test olarak iki kısımdan oluşur. Her iki kısımda da hayvana bir gün önceden yem verme işlemi durdurulur ve test sürecinde su verilmez. Başlangıç testinde amaç hayvanın deneye alıştırılmasıdır ve madde olarak fizyolojik tuzlu su verilir. Esas testte hayvana en çok kg başına 10 ml madde verilir. Madde verilmeden önceki 90. dk ve madde verildikten sonraki 3. saate kadar her yarım saatte 1 kere vücut ısısı ölçülür (Resim 8). Madde verilmeden önceki ve verildikten sonraki değerler karşılaştırılarak test maddesinin pirojen olup olmadığı hakkında bilgi edinilir.



Resim 7. Pirojenite testi maddenin tavşanlara damar içi verilmesi



Resim 8. Vücut ısısının ölçülmesi

KAYNAKLAR

1. Şener S, Yıldırım M. Genel Toksikoloji. Veteriner Toksikoloji. 1. Baskı. İstanbul: Teknik Yayıncılık; 2000. p.11-3.
2. Hellman B. Genel Toksikoloji. Mulder JG, Dencker L. Editörler. Farmasötik Toksikoloji. 1. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp; 2006. p. 26-9.
3. TS EN ISO 10993-11 Sistemik Toksisite Deneyleri
4. TS EN ISO 10993-6 İmplantasyon sonrası yerel etkiler için deneyler
5. TS EN ISO 10993-23 Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi
6. European Pharmacopoeia 9.0 Bölüm 2.6.8

DENEYSSEL HAYVAN MODELLERİ

EXPERIMENTAL ANIMAL MODELS

Dr. Öğr. Çağlar ÇELEBİ

Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD.

E-posta: caglarcelebi@outlook.com, ORCID:0000-0002-2858-8526

ÖZ

Deney hayvanları, bilimsel araştırmalarda çok önemli bir rol oynamaktadır ve önemli bilimsel etkiye sahip çeşitli amaçlara hizmet etmektedir. Deneysel hayvan modellerine dayalı araştırmalar uzun bir geçmişe dayanmaktadır ve son birkaç yüzyılda araştırmalar hızlanmıştır. Deneysel hayvan modelleri, bilimsel araştırmalarda hastalıkların moleküler mekanizmalarını açıklamak, yeni ilaç geliştirilmesi dahil çeşitli biyolojik süreçleri incelemek, hipotezleri test etmek, tanı ve yeni tedaviler geliştirmek için kullanılmaktadır. Fareler, sıçanlar, zebra balığı, sirke sineği (*drosophila*), nematodlar, kobaylar, tavşanlar, insan dışındaki primatlar, domuzlar, köpekler ve koyunlar deneysel hayvan modelleri arasında yer almaktadır. Bu modeller, insan fizyolojisi, genetiği veya patolojisinin belirli yönlerini simüle etmektedirler. Böylece, bilimsel temel bilgiler sağlanarak temel biyolojik süreçlerin aydınlatılmasında etkili olmaktadır. Etik unsurlar ve deneysel çıktıları etkilemeden hayvan kullanımını en aza indirme yönündeki çalışmalar, bilimsel araştırmacıların temel hedefleri arasında olduğu unutulmamalıdır.

Anahtar Sözcükler: Deneysel Hayvan Modelleri, Enfeksiyon, Viroloji

SUMMARY

Experimental animals play a crucial role in scientific research and serve a variety of purposes with significant scientific impact. Research-based on experimental animal models has a long history and has accelerated in the last few centuries. Experimental animal models are used in scientific research to explain the molecular mechanisms of diseases, to study various biological processes including new drug development, to test hypotheses, and to develop diagnostics and new treatments. Experimental animal models include mice, rats, zebrafish, vinegar flies (*Drosophila*), nematodes, guinea pigs, rabbits, non-human primates, pigs, dogs, and sheep. These models simulate specific aspects of human physiology, genetics, or pathology. Thus, it is effective in elucidating basic biological processes by providing scientific basic information. It should not be forgotten that ethical considerations and efforts to minimize animal use without affecting experimental outcomes are among the main goals of scientific researchers.

Keywords: Experimental Animal Models, Infection, Virology

Deneysel Virolojik Hayvan Modelleri

Hayvan modeline dayalı araştırmalar çok uzun bir süredir yapılmaktadır. M.Ö. 5. yüzyıldan bu yana, hayvanların kullanıldığı deneylerin raporları belgelenmiştir, ancak 19. yüzyıldan bu yana hayvanların kullanım sıklığında bir artış gözlemlenmiştir (1). Hayvanların deneylerde kullanımını çevreleyen etik konular nedeniyle, deney hayvan modellerine kıyasla daha sınırlı olan alternatif in vitro veya in silico yöntemlerin olduğu araştırma alanları da mevcuttur (1). Dünyadaki tıbbi araştırma kurumlarının çoğu insan dışındaki canlılar olarak hayvanları deneysel hayvan modeli olarak kullanmaktadır. Hayvan modelleri doğadaki hayvan

enfeksiyonlarını doğrudan kopyalamaktadır ve bu modellerin çoğu insan patofizyolojisini bütünsel olarak yansıtmaktadır (2). İnsanların viral enfeksiyonları için etik değerlendirmeler, virüs-konak etkileşiminin birçok yönünü ele almak için hayvan modellerinin kullanılmasını gerektirmektedir. Deneysel virolojik hayvan modelleri, viral enfeksiyonların davranışını, bulaşmasını, patogenezi ve tedavisini incelemek için bilimsel araştırmalarda kullanılmaktadır. Bu modeller, hayvanlar üzerindeki etkilerini gözlemlemek ve virüs-konak etkileşimleri hakkında bilgi edinmek için hayvanlara belirli virüslerin bulaştırılmasını içermektedir (3). Hayvan modelleri, viral hastalıkların anlaşılmasında, aşılarda ve antiviral tedavilerin geliştirilmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Hayvan enfeksiyonları için bile doğal konağın kullanılması her zaman mümkün değildir ve model olarak farklı bir türün kullanılması gerekebilir. Fare, sıçan, kobay, hamster, gerbil, tavşan ve zebra balığı gibi hayvan modelleri virolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin, AG129 fareleri çoğunlukla ölümcül bir DENV enfeksiyon modeli olarak kullanılmaktadır (4). Ayrıca, Gine domuzu, hamster, ağaçkakan, çayır köpeği, pamuk sıçan, yer sincabı, gelincik, tavuk, makak, domuz ve ruminant hayvanlar, virolojik hayvan modellerinde yer almaktadır (5).

Fareler

Fareler, küçük boyutları, kullanım kolaylıkları ve iyi karakterize edilmiş genetik altyapıları nedeniyle virolojik hayvan modellerinde yaygın olarak araştırılmaktadır. Çok çeşitli viral enfeksiyonların incelenmesinde etkili olmuşlar ve viral patogenezi, immün yanıt ve antiviral tedavilerin geliştirilmesi konusundaki anlayışımıza önemli ölçüde katkıda bulunmuşlardır. Fareler, Hepatit B Virüsü'nün (HBV) farklı genotiplerinin enfektivitesini, virolojik özelliklerini ve tedaviye yanıtlarını incelemek için kullanılmıştır. Farklı genotiplerde yüksek titrelili HBV üreten stabil hücre hatları oluşturulmuş ve fare pasajlı primer insan hücrelerinde ve insanlaştırılmış kimerik fare modelinde test edilmiştir (6). Fareler, Machupo virüsü gibi kemirgen kaynaklı hemorajik ateş virüslerinin patogenezi incelemek için hayvan modeli olarak kullanılmıştır. Örneğin, Machupo virüs enfeksiyonunun patogenezi anlamak için bir STAT-1 nakavt fare modeli geliştirilmiştir (7). Viral yayılım, bulaşma ve hastalık patogenezi incelemek için fareler SARS-CoV ve SARS-CoV-2 ile enfekte edilebilmektedir. Fareler, enfekte farelerin bir alt kümesinde SARS-CoV-2'nin neden olduğu merkezi sinir sistemi enfeksiyonunu araştırmak için kullanılmıştır (8,9). Fareler, Rift Vadisi Ateşi Virüsü (RVFV) enfeksiyonunun patogenezi incelemek için kullanılmıştır. Fare modeli, RVFV enfeksiyonunun virolojik, klinikopatolojik ve histopatolojik özelliklerini karakterize etmek için çalışmalar yapılmıştır (10). Rotavirüs enfeksiyonuna karşı bağışıklık tepkilerini incelemek için model olarak kullanılmıştır. Örneğin, T hücresi eksikliği olan fareler rotavirüse karşı bağışıklığı araştırmak için model oluşturulmuştur. Rotavirüs enfeksiyonuna duyarlı farelerin optimal yaşı incelenmiştir. Fare modeli, farelerin rotavirüs enfeksiyonuna en duyarlı olduğu yaşı belirlemek için kullanılmıştır (11). Örneğin, fare IgG1 Fc alanının VHH fragmanına (ARP1) füzyonunun bir bebek fare modelinde rotavirüs kaynaklı diyareye karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (12). Bu çalışmalar doğrultusunda, virolojik araştırmalarda hayvan modeli olarak farelerin çok yönlülüğünü vurgulamaktadır.

Viral enfeksiyonlar, konak immün yanıtları ve potansiyel terapötik müdahaleler hakkında değerli bilgiler sağlamaktadır. Bununla birlikte, fareler yaygın olarak kullanılsa da viral

enfeksiyonlara karşı insan tepkisini her zaman tam olarak yansıtamayabileceklerini belirtmek önemlidir. Bu nedenle, fare modellerinden elde edilen bulgular dikkatle yorumlanmalı ve diğer ilgili hayvan modellerinde veya insan çalışmalarında doğrulanmalıdır.

Sıçanlar

Sıçanlar, virüs enfeksiyonunun biyolojisini incelemek ve ilaç geliştirmek için virolojik hayvan modellerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Sıçanlar COVID-19'u incelemek için alternatif bir model olarak kullanılmıştır. Sıçan ACE2 reseptörleri SARS-CoV-2 enfeksiyonunu destekleyebilir, bu da onları virüsü anlamak ve potansiyel terapötikleri test etmek için değerli bir model haline getirmektedir (9). İnsan T-hücreli Lösemi Virüsü tip 1'in (HTLV-1) biyolojisini ve hastalık ilerlemesini incelemek için insan olmayan primatlar, tavşanlar ve farelerle birlikte sıçanlar da yer almaktadır (13). Pamuk sıçanları da dahil olmak üzere sıçanlar, hMPV enfeksiyonu, patogenezi ve korunmasını incelemek için küçük hayvan modelleri olarak kullanılmaktadır. Bu modeller, araştırmacıların virüsün solunum yolu üzerindeki etkisini anlamalarına ve potansiyel müdahaleleri değerlendirmelerine yardımcı olmaktadır (14). Sıçanlar ve diğer kemirgenler, Arenaviridae ve hantavirüsler gibi virüsler için kritik rol oynamaktadır. Bu hayvanlar üzerinde, kemirgen kaynaklı hemorajik ateş virüslerinin bulaşmasını ve patogenezi incelemek için araştırmalar yapılmaktadır.⁷Klinik hastalık geliştirmemelerine rağmen Varicella Zoster Virüsü (VZV) enfeksiyonunu incelemek için sıçanlar üzerinde araştırmalar yapılmıştır. Subkutan, oküler ve intraperitoneal gibi enfeksiyon yolları, sıçanlarda immün yanıtı ve serokonversiyonu araştırmak için yol göstermektedir (15). Sıçanlar, hepatit C virüsü (HCV) enfeksiyonunu incelemek için hayvan modeli olarak araştırılmaktadır. Virüsün patogeneze ilişkin bilgiler sağlanıp, araştırma araçlarının geliştirilmesinde ve potansiyel önleyici tedbirlerin test edilmesinde etkili olmaktadır (16). Konjenital Sitomegalovirüs (CMV) enfeksiyonlarını incelemek ve potansiyel aşılı değerlendirmek için kobay sıçan CMV modelleri üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Fakat, CMV'ler sadece kendi türlerindeki hayvanları enfekte eder; yani bir fare CMV'si, bir insan CMV'si, bir sıçan CMV'si vardır, ancak bu virüsler farklı türleri enfekte etmemektedir (17). Pamuk sıçan, influenza virüsü patogenezi incelemek için yararlı bir küçük hayvan modeli olarak kullanılmakta ve virolojik araştırmalardaki önemini göstermektedir (18). Ayrıca sıçanlar, transplant reddi ilaçları kullanılarak immün sistemi baskılanmış olabilir ve bu da kronik sıçan Hepatit E Virüsü (HEV) enfeksiyonu için sağlam bir model olabileme potansiyelini desteklemektedir (19). HIV-1 transgenik sıçan modeli, nöroHIV'i incelemek için geliştirilmiştir. HIV ile ilişkili nörolojik durumlar hakkında bilgi sağlayan immün değişiklikler için karakterize edilmiştir. Transgenik bir HIV modeli geliştirmek için sıçanlar seçilerek HIV çalışmalarındaki önemleri ortaya konulmaktadır (20,21).

Sıçanlar viral enfeksiyonlar, immün yanıtlar ve potansiyel müdahaleler hakkında değerli bilgiler sağlamaktadır. Bununla birlikte, hayvan modeli seçiminin çalışılan spesifik virüse ve araştırma hedeflerine bağlı olmaktadır. Viral enfeksiyonların kapsamlı bir şekilde anlaşılması için sıçan modellerinden elde edilen bulgular kümülatif bilgiler çerçevesinde yorumlanmalıdır.

İnsan Olmayan Primatlar

İnsan olmayan primatlar (NHP'ler), insanlarla olan yakın filogenetik ilişkileri ve oldukça benzer bağışıklık sistemleri de dahil olmak üzere fizyolojik benzerlikleri nedeniyle virolojik hayvan modellerinde araştırılmaktadırlar (22). Rhesus makakları gibi insan olmayan primatlar, insan hastalıklarına yakından benzeyen viral enfeksiyonları incelemek için model olarak incelenmektedir. HIV, Ebola ve Zika gibi hastalıkların patogenezi, immün yanıtı ve potansiyel tedavileri hakkında değerli bilgiler sağlamaktadırlar. İnsan olmayan primatlar, aşılardan ve antiviral tedavilerin prelinik testleri için özellikle yararlıdır. Hepatit virüsleri, solunum yolu enfeksiyonları ve HIV/AIDS gibi çeşitli insan viral enfeksiyonlarının incelenmesinde önemli bir rol oynamaktadırlar (23,24). NHP'ler, insan immünolojisini ve başlıca solunum yolu enfeksiyonlarının patofizyolojisini yansıtmaları açısından özellikle değerlidir; bu da onları viral hastalıklara ilişkin anlayışımızı ilerletmek ve potansiyel tedaviler veya aşılardan geliştirmek için gerekli kılmaktadır (25). NHP'ler üzerinde HIV bulaşını modellemek ve HIV enfeksiyonundaki kritik adımları anlamak için araştırmalar yapılmaktadır (25). NHP'ler, özellikle makaklar, insanlardaki HIV enfeksiyonunu taklit eden simian immün yetmezlik virüsü (SIV) veya simian-insan immün yetmezlik virüsü (SHIV) kimerik virüsleri ile enfekte edilebilir. Bu modeller, HIV bulaşmasının incelenmesinde ve hastalığın ilerleyişinin anlaşılmasında etkili olmuş, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde önemli rol oynamıştır (26). NHP'ler, HIV'li bireyler için büyük bir yük olan HIV ile ilişkili nörobilişsel bozuklukları (HAND) incelemek için kullanılmaktadır. Bu modeller, araştırmacıların bilişsel bozukluğun altında yatan mekanizmaları araştırmasına ve potansiyel müdahaleler geliştirmesine yardımcı olmaktadır (27). Marburg Virüs Hastalığı (MVD): NHP'ler, Marburg Virüs Hastalığı (MVD) virüsüne yönelik aşı ve terapötiklerin geliştirilmesi ve test edilmesi için hayvan modeli olarak kullanılmaktadır. NHP modeli, insanlarda MVD patogenezi en iyi şekilde yansıtmaktadır (28). Rhesus makakları, sinomolgus maymunları ve marmosetler gibi NHP'ler, SARS-CoV-2 enfeksiyon patogenezi incelemek için hayvan modelleri olarak kullanılmaktadır. COVID-19 araştırmaları için kullanılan NHP modelleri arasında rhesus maymunları (*M. mulatta*) ve cynomolgus maymunları (*M. fascicularis*) uygun modeller olarak tanımlanmışlardır (29). NHP çalışmaları, COVID-19 aşılardının immünojenitesinin ve koruyuculuğunun değerlendirilmesinde de önemli bir rol oynamaktadır. COVID-19'a neden olan virüs SARS-CoV-2 ile enfekte olan NHP'ler, insanlara benzer şekilde burun ve orofaringeal sürüntülerde viral RNA için pozitif sonuçlar göstermiştir bu da uygun hayvan modellerinin oluşturulmasına katkı sağlamıştır (30). NHP'ler, insanlara filogenetik yakınlıkları ve insan patogenezi doğru bir şekilde taklit etme yetenekleri nedeniyle virolojik hayvan modelleri için seçilmektedir. Viral enfeksiyonlar, bulaş mekanizmaları, tedavi ve aşılardan geliştirilmesi konusunda değerli bilgiler sağlamaktadırlar.

Domuzlar

Domuzlar, insanlarla olan anatomik ve immünolojik benzerlikleri nedeniyle virolojik araştırmalarda değerli modeller olarak hizmet etmektedir. Çeşitli bulaşıcı hastalıklar için virolojik araştırmalarda hayvan modeli olarak yer almaktadır. Özellikle influenza A virüsü (IAV) enfeksiyonlarını ve buna bağlı doğrudan gelen immün yanıtı incelemek için uygun

olmaları, onları bu alanda önemli bir odak noktası haline getirmektedir (31). Biyomedikal araştırmalar ve IAV enfeksiyonu çalışmaları için uygun bir hayvan modelidir (32). İnsan influenza virüsü enfeksiyonları için bir model olarak incelenmiştir. H1N1 influenza virüsü de dahil olmak üzere influenza virüslerinin patogenezi için kullanılmışlardır. İnsan Lassa ateşi için taşıyıcı küçük hayvan modeli olarak kullanılmıştır. Hastalığın virülansını ve patogenezi incelemek için rekombinant Pichinde virüsü ile enfekte edilmişlerdir (33). İnsan meta pnömovirüsü (hMPV) gibi solunum yolu virüslerinin incelenmesinde katkıda bulunmuş ve hMPV enfeksiyonunu, patogenezi ve korunmasına ilişkin yeni sonuçların bulunmasında model olarak çalışılmıştır. Gine domuzları, Göttingen minipigleri de dahil olmak üzere, Zika virüsü enfeksiyonunu incelemek için model olarak kullanılmıştır. Gine domuzları fizyolojik ve immünolojik olarak diğer küçük hayvan modellerine göre insanlara daha çok benzemektedir, bu da onları konjenital enfeksiyonlar ve cinsel bulaşma üzerine çalışmalar için uygun hale getirmektedir (34). COVID-19 ile mücadeledeki katılımları da dahil olmak üzere virüs araştırmalarında çok önemli bir rol oynamaktadır. Araştırma domuzları, çeşitli viral hastalıkların anlaşılmasına aktif olarak katkıda bulunarak, bulaşıcı hastalıklar hakkındaki bilgilerimizi ilerletme ve potansiyel müdahaleler geliştirme konusundaki önemlerini vurgulamaktadır. Domuzlar, kök hücre tedavisi de dahil olmak üzere insan tıbbi uygulamaları için değerli ve temel büyük hayvan modellerinden biridir. Ayrıca, genetiği değiştirilmiş domuz organlarının doğrudan insan vücuduna aşılanması ve domuzların insan hücrelerinin, dokularının veya organlarının büyümesi ve gelişmesi için in vivo biyoreaktörler olarak kullanılması için önemli çaba sarf edilmiştir (35). Domuzlar ve insanlar arasındaki anatomik ve organ boyutu benzerlikleri, domuz modellerinden elde edilen bulguların insan uygulamalarına aktarılmasını hızlandırarak, onları insan hastalıklarını ve viral yönlerini incelemek için umut verici ve pratik bir seçim haline getirmektedir (36). Virolojik hayvan modellerinde domuzlar kullanılmış olsa da hayvan modeli seçiminin spesifik araştırma hedeflerine, kullanılabilirliğe ve modelin çalışılan belirli virüs için uygunluğuna bağlı olması çalışma sonuçlarının verimliliğinin sağlanmasında primer sonlanım kriterleri arasında yer almaktadır.

Zebra Balıkları

Zebra balığı (*Danio rerio*) virolojinin çeşitli yönlerini incelemek için değerli bir model organizma olarak ortaya çıkmıştır. Omurgalı biyolojisi, genetik, embriyonal gelişim, insan ve hayvan sağlığı araştırmaları için mükemmel bir model olarak hizmet vermektedir (37). Araştırmacılar, zebra balıklarının balık virüsleri ile enfeksiyonlar için bir model olarak değerlendirilmesi de dahil olmak üzere viral enfeksiyonların çeşitli yönlerini incelemek için zebra balıklarını kullanmışlardır. Bu, zebra balığının geleneksel memeli modellerinin ötesinde viral hastalıkları anlamamıza katkıda bulunma potansiyelini göstermektedir (38). Örneğin, zebra balıklarında yılanbaşı rabdovirüs (SHRV) enfeksiyonunun patogenezi inceleyen bir çalışmada, enfekte balıklardaki histopatolojik değişiklikler ve antiviral yanıt tanımlanmıştır. (39) Konak içinde viral yayılım mekanizmalarını araştırmak için kullanılmıştır. Bu modeller, in vivo viral yayılımı yöneten hücresel ve moleküler programları gözlemlemek ve anlamak için şeffaf bir pencere sağlamaktadır. (40) Chikungunya virüsü (CHIKV) de dahil olmak üzere çeşitli virüsler için enfeksiyon modeli olarak kullanılmıştır. Bu modeller, araştırmacıların viral

enfeksiyonun dinamiklerini ve konak dokular üzerindeki etkisini incelemelerine olanak sağlamaktadır. Viral enfeksiyonlarda rol oynayan genetik faktörleri incelemek için kullanılmaktadır. Genetik manipülasyon ve ileri genetik taramalar için avantajlar sunarak araştırmacıların viral patogeneze ve konak tepkilerinde yer alan genleri tanımlamasına olanak tanımaktadır (39). Viroloji araştırmalarının belirli yönleri için memeli modellerine alternatif olarak düşünülmüştür. Yüksek verimli tarama için fırsatlar sunmaktadırlar ve konak inflamatuvar yanıtlarını görselleştirmek için özellikle yararlı olabilmektedirler (41). Ayrıca, COVID-19'u incelemek için zebra balığı modelleri geliştirilmiş ve bunların çağdaş virolojik araştırmalarda çok yönlülüğü ve uygunluğu gösterilmiştir (42). Özellikle zebra balığı, konak-virüs etkileşimlerini ve enflamasyonu incelemek için kullanılmış ve virüs kaynaklı inflamatuvar tepkiler hakkında değerli bilgiler sağlamıştır (43). Erken gelişim aşamalarındaki şeffaflıkları, viral enfeksiyonların gerçek zamanlı olarak gözlemlenmesine olanak tanıyarak onları virolojinin karmaşıklıklarını çözmede uygun bir model haline getirmektedir. Zebra balıklarının virolojik araştırmalarda benzersiz avantajlar sunmasına rağmen, insanlardaki viral enfeksiyonların karmaşıklığını tam olarak yansıtamayabileceğini belirtmek önemlidir. Bu nedenle, zebra balığı modelleri, viral enfeksiyonların kapsamlı bir şekilde anlaşılması için genellikle diğer hayvan modelleri ve in vitro çalışmalarla birlikte kullanılmaktadır. Bu bağlamda, deneysel hayvan modellerinin geliştirilmesi genetik homojenliğe, insan fizyolojisi ve hastalığını taklit etme yeteneğine, sınırsız tedarik ve manipülasyon kolaylığına, benzersiz biyolojik özelliklere, etik ve pratik hususlara bağlıdır. İleriye dönük çalışmaların artması, insan fizyolojisi ve hastalıklarının daha iyi anlaşılmasını ve zengin bir veri seti sağlayacak, model geçerliliğini artıracak, bulguları insan araştırmalarına daha iyi aktaracak ve hayvan modellerindeki sınırlamaları ve değişkenliği ele alarak deneysel hayvan modellerinin geliştirilmesini önemli ölçüde etkileyecektir.

KAYNAKLAR

1. Kiani AK, Pheby D, Henahan G, Brown R, Sieving P, Sykora P, et al. Ethical considerations regarding animal experimentation. *J. Prev. Med. Hyg.* 2022;63(2):E255–E266.
2. Sang Y, Miller LC, Nelli RK, Giménez-Lirola LG. Harness Organoid Models for Virological Studies in Animals: A Cross-Species Perspective. *Front. Microbiol.* 2021;12.
3. Sitali MC, Schmidt V, Mwenda R, Sikasunge CS, Mwape KE, Simuunza MC, et al. Experimental animal models and their use in understanding cysticercosis: A systematic review. *PLoS One* 2022;17:1–19.
4. Kayesh MEH, Tsukiyama-Kohara K. Mammalian animal models for dengue virus infection: a recent overview. *Arch. Virol.* 2022;167(1):31–44.
5. Baxter VK, Griffin DE. Animal Models: No Model is Perfect, But Many Are Useful. *Viral Pathog. In: Basics to Syst. Biol.* Third Ed. 2016;125–38.
6. Zhang M, Zhang Z, Imamura M, Osawa M, Teraoka Y, Piotrowski J, et al. Infection courses, virological features and IFN- α responses of HBV genotypes in cell culture and animal models. *J. Hepatol.* 2021;75(6):1335–45.
7. Golden JW, Hammerbeck CD, Mucker EM, Brocato RL. Corrigendum to “animal models for the study of rodent-borne hemorrhagic fever viruses: Arenaviruses and hantaviruses”. *Biomed Res. Int.* 2015;2015. doi:10.1155/2015/313190.
8. Knyazev S, Chhugani K, Sarwal V, Ayyala R, Singh H, Karthikeyan S, et al. Unlocking capacities of genomics for the COVID-19 response and future pandemics. *Nat. Methods.* 2022;19(4):374–80.

9. Zeiss CJ, Compton S, Veenhuis RT. Animal Models of COVID-19. I. Comparative Virology and Disease Pathogenesis. *ILAR J.* 2021;62(1–2):35–47.
10. Smith DR, Steele KE, Shamblin J, Honko A, Johnson J, Reed C, et al. The pathogenesis of Rift Valley fever virus in the mouse model. *Virology* 2010;407(2):256–67.
11. Du J, Lan Z, Liu Y, Liu Y, Li Y, Li X, et al. Detailed analysis of BALB/c mice challenged with wild type rotavirus EDIM provide an alternative for infection model of rotavirus. *Virus Res.* 2017;228:134–40.
12. Günaydin G, Yu S, Gräslund T, Hammarström L, Marcotte H. Fusion of the mouse IgG1 Fc domain to the VHH fragment (ARPI) enhances protection in a mouse model of rotavirus. *Sci. Rep.* 2016;6:1–11.
13. Panfil AR, Al-saleem JJ, Green PL. Animal Models Utilized in HTLV-1 Research. *Virol.* 2013;18(4):49–59.
14. Williams J V., Tollefson SJ, Johnson JE, Crowe JE. The Cotton Rat (*Sigmodon hispidus*) Is a Permissive Small Animal Model of Human Metapneumovirus Infection, Pathogenesis, and Protective Immunity . *J. Virol.* 2005;79(17):10944–51.
15. Haberthur K, Messaoudi I. Animal models of varicella zoster virus infection. *Pathogens* 2013;2(2):364–82.
16. Trivedi S, Murthy S, Sharma H, Hartlage AS, Kumar A, Gadi S V, et al. Viral persistence, liver disease, and host response in a hepatitis C–like virus rat model. *Hepatology* 2018;68(2):435–48.
17. Schleiss MR. Developing a vaccine against congenital CMV infection: What have we learned from animal models? Where should we go next? *Future Virol.* 2013;8(12):1161–82.
18. Bryant JL. Animal models in virology. *Source B. Model. Biomed. Res.* 2008:557–63.
19. Sridhar S, Wu S, Situ J, Shun EHK, Li Z, Zhang AJX, vd. A small animal model of chronic hepatitis E infection using immunocompromised rats. *JHEP Reports* 2022;4(10):100546.
20. Vigorito M, Connaghan KP, Chang SL. The HIV-1 transgenic rat model of neuroHIV. *Brain. Behav. Immun.* 2015;48:336–49.
21. Denaro F, Benedetti F, Worthington MD, Scapagnini G, Krauss CC, Williams S, et al. The HIV-1 transgenic rat: Relevance for HIV noninfectious comorbidity research. *Microorganisms* 2020;8(11):1–24.
22. JD E, SW W, Brenchley JM. Nonhuman primate models of human viral infections. *Nat Rev Immunol* 2018;18(6):390–404.
23. Estes JD, Wong SW, Brenchley JM. Nonhuman primate models of human viral infections. *Nat. Rev. Immunol.* 2018;18(6):390–404.
24. Vitral CL, Yoshida CFT, Gaspar AMC. The use of non-human primates as animal models for the study of hepatitis viruses. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 1998;31(8):1035–48.
25. Lemaitre J, Naninck T, Delache B, Creppy J, Huber P, Holzapfel M, et al. Non-human primate models of human respiratory infections. *Mol. Immunol.* 2021;135:147–64.
26. Evans DT, Silvestri G. Nonhuman primate models in AIDS research. *Curr. Opin. HIV AIDS* 2013;8(4):255–61.
27. Byrnes SJ, Angelovich TA, Busman-Sahay K, Cochrane CR, Roche M, Estes JD, vd. Non-Human Primate Models of HIV Brain Infection and Cognitive Disorders. *Viruses* 2022;14(9):1–20.
28. Shifflett K, Marzi A. Marburg virus pathogenesis - Differences and similarities in humans and animal models. *Virol. J.* 2019;16(1):1–12.
29. Lu S, Zhao Y, Yu W, Yang Y, Gao J, Wang J, et al. Comparison of nonhuman primates identified the suitable model for COVID-19. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2020;5(1).
30. Santos WJ, Guiraldi LM, Lucheis SB. Should we be concerned about COVID-19 with nonhuman primates? *Am. J. Primatol.* 2020;82(8):1–3.

31. Starbæk SMR, Brogaard L, Dawson HD, Smith AD, Heegaard PMH, Larsen LE, et al. Animal Models for Influenza A Virus Infection Incorporating the Involvement of Innate Host Defenses: Enhanced Translational Value of the Porcine Model. *ILAR J.* 2018;59(3):323–37.
32. Rajao DS, Vincent AL. Swine as a model for influenza avirus infection and immunity. *ILAR J.* 2015;56(1):44–52.
33. Lan S, Shieh WJ, Huang Q, Zaki SR, Liang Y, Ly H. Virulent infection of outbred Hartley guinea pigs with recombinant Pichinde virus as a surrogate small animal model for human Lassa fever. *Virulence* 2020;11(1):1131–41.
34. Kumar M, Krause KK, Azouz F, Nakano E, Nerurkar VR. A Guinea pig model of Zika virus infection. *Virol. J.* 2017;14(1):1–8.
35. Kawai Y, Tohyama S, Shimizu H, Fukuda K, Kobayashi E. Pigs as Models of Preclinical Studies and In Vivo Bioreactors for Generation of Human Organs. *Xenotransplantation - Compr. Study* 2020:1–7.
36. Hou N, Du X, Wu S. Advances in pig models of human diseases. *Anim. Model. Exp. Med.* 2022;5(2):141–52.
37. Nowik N, Podlasz P, Jakimiuk A, Kasica N, Sienkiewicz W, Kaleczyc J. Zebrafish: An animal model for research in veterinary medicine. *Pol. J. Vet. Sci.* 2015;18(3):663–74.
38. Rakus K, Adamek M, Mojżesz M, Podlasz P, Chmielewska-Krzesińska M, Naumowicz K, et al. Evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) as an animal model for the viral infections of fish. *J. Fish Dis.* 2019;42(6):923–34.
39. Phelan PE, Pressley ME, Witten PE, Mellon MT, Blake S, Kim CH. Characterization of Snakehead Rhabdovirus Infection in Zebrafish (*Danio rerio*) . *J. Virol.* 2005;79(3):1842–52.
40. Gaudin R, Goetz JG. Tracking Mechanisms of Viral Dissemination In Vivo. *Trends Cell Biol.* 2021;31(1):17–23.
41. S S, Heise M. Mouse Models as Resources for Studying Infectious Diseases. *Clin Ther* 2019;41(10):1912–22.
42. Tyrkalska SD, Candel S, Pedoto A, García-Moreno D, Alcaraz-Pérez F, Sánchez-Ferrer Á, et al. Zebrafish models of COVID-19. *FEMS Microbiol. Rev.* 2023;47(1):1–19.
43. Sullivan C, Soos BL, Millard PJ, Kim CH, King BL. Modeling Virus-Induced Inflammation in Zebrafish: A Balance Between Infection Control and Excessive Inflammation. *Front. Immunol.* 2021;12:1–26.

DENEYSEL HAYVAN İNFEKSİYON MODELLERİ

EXPERIMENTAL ANIMAL INFECTION MODELS

Uzm. Dr. Tuba TATLI KİŞ

Sağlık Bilimleri Üniversitesi İzmir Dr. Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi
Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji
Tel.no: 05076165500, E-Posta: tubatatli@hotmail.com, ORCID: 0000-0001-6952-3748

ÖZ

Deneyisel hayvan enfeksiyon modelleri, enfeksiyonların fizyopatolojisinin ve bulaşıcı hastalıklarda konak ile patojen arasındaki etkileşimlerin çözülmesine önemli ölçüde katkıda bulunur. Hayvanlar üzerinde yapılan deneyisel çalışmalar; ilaçlar, invaziv prosedürler ve aşılarla müdahale stratejileri hakkında prelinik düzeyde bilgi sağlar. Günümüzde aşı ve translasyonel tıp araştırmalarında hayvan modelleri yerine alternatif modellerin kullanılması ile ilgili tartışmalar olmaktadır. Bununla birlikte, aşı geliştirilmesinde koruyucu bağışıklığın ortaya çıkarılması; hücresel ve humoral bağışıklık sistemlerinin araçları arasındaki çoklu, oldukça karmaşık etkileşimlere bağlı olan bir süreçtir. Bu nedenle, bugün itibarıyla, bu etkileşimleri araştırmak için hayvanların kullanılması en önemli seçenek olmaya devam etmektedir. Hayvan modelleri, humoral ve hücre aracılı bağışıklık, bağışıklığın başlangıcı ve süresi, sistemik ve mukozal bağışıklık, enfeksiyona karşı koruma ve hastalık bulaşmasının azaltılması gibi çeşitli immünolojik parametreleri değerlendirmek için yaygın olarak kullanılır. Deneyisel hayvan enfeksiyon modelleri, insan çalışmalarından önce prelinik düzeyde verdiği veriler nedeniyle önemini korumaya devam etmektedir.

Anahtar Sözcükler: Hayvan modeli, enfeksiyon, translasyonel tıp

SUMMARY

Animal models contribute significantly to unraveling the pathophysiology of infections and the interactions between host and pathogen in infectious diseases. Experimental studies on animals; provides preclinical information about drugs, invasive procedures, and vaccine intervention strategies. Today, discussions continue regarding the use of alternative models instead of animal models in vaccine and translational medicine research. However, stimulating the immune system to elicit protective immunity in vaccine development; it is a process that depends on multiple, highly complex interactions between mediators of the cellular and humoral immune systems. Therefore, as of today, using animals to investigate these interactions remains the most important option. Animal models are widely used to evaluate various immunological parameters such as humoral and cell-mediated immunity, onset and duration of immunity, systemic and mucosal immunity, protection against infection, and reduction of disease transmission. Experimental animal studies continue to be important due to the data they give at the preclinical level before human studies.

Keywords: Animal model, infection, translational medicine

Translasyonel Tıpta Deneyisel Hayvan Enfeksiyon Modellerinin Yeri

Hayvan modelleri, enfeksiyonların fizyopatolojisinin ve bulaşıcı hastalıklarda histopatojen etkileşimlerinin çözülmesine önemli ölçüde katkıda bulunur. Hayvanlar üzerinde yapılan deneyisel çalışmalar; ilaçlar, invaziv prosedürler ve aşılarla müdahale stratejileri hakkında prelinik düzeyde bilgi sağlar. Biyolojik araştırma ve ilaç geliştirme alanında hayvan modellerinin bilimsel uygulaması, insanlar ve hayvanlar, özellikle memeliler arasındaki fizyoloji ve anatomideki dikkate değer benzerlik nedeniyle uygulanmaktadır (1). Hayvan

modellerinin, antimikrobiyal ilaçlarla ilgili klinik deneyleri tasarlamak ve riski en aza indirmek için yararlı olduğu kanıtlanmıştır (2). İlaç geliştirilmesinde, hayvan modelleri, klinik deneyler uygulanmadan önce klinik öncesi araştırmalar için kullanılmaktadır. Bu klinik öncesi veriler, ilaç etkinliği, güvenlik, toksikolojik çalışmalar gibi temel farmakokinetik parametreler açısından en önemli in vivo modeller olarak kabul edilir. Genel toksisite, mutajenite, karsinojenite ve teratojenite gibi çok sayıda hayvan üzerinde toksikolojik testler yapılır ve ilaçların etkileri değerlendirir. Çoğu durumda, hem in vitro hem de in vivo modeller, tıbbi denemelere geçmeden önce doğrulanır. İn vivo modeller çoğunlukla farelerde, sıçanlarda ve tavşanlarda gerçekleştirilir (3). Hayvan modelleriyle yapılan preklinik denemelerde belirli aşamalar yer alır. İlaç arzu edilen etkiyi gösterirse, yalnızca o zaman daha ileri çalışmalar gerçekleştirilir; hayvanlar üzerinde klinik öncesi deneylerde bir ilacın güvenli olduğu kanıtlanırsa, o zaman küçük insan gönüllü gruplarında uygulanır, aynı zamanda, uzun süre uygulandığında ilacın etkisini değerlendirmek için hayvan deneyi devam eder. İnsanlara benzer biyolojik özelliklere sahip oldukları ve laboratuvarlarda işlenmesi ve yetiştirilmesi kolay olduğu için çoğunlukla kemirgenler bu denemelerde kullanılmaktadır. Biyomedikal araştırmalar için ideal bir hayvan modelinin seçimi sırasında birçok faktör göz önünde bulundurulmalıdır. En önemli kriter, fizyolojik ve/veya fizyopatolojik açıdan hayvan türleri ile insanlar arasındaki filogenetik benzerlik açısından uygun model seçimidir. Belirli ilaçların, moleküllerin, cihazların uygulanması sırasında detaylı değerlendirme ve bunların insanlarla aynı seviyede hastalık veya patoloji üretme kapasiteleri, ele alınan hayvan türlerinin büyüklüğü gibi faktörler değerlendirilmelidir. Sıçan ve fare modelleri, biyomedikal araştırmalarda önemlerini kanıtlamıştır. Ayrıca kobay, hamster, tavşan, dağ gelinciği, kuşlar, amfibiler, balıklar, sinekler, solucanlar gibi diğer memeli ve memeli olmayan küçük hayvanların anatomik ve fizyolojik benzerlikleri nedeniyle çalışmaları mevcuttur. Büyük hayvan modelleri ile yine anatomik ve fizyolojik özellikler nedeniyle çalışılmaktadır. Hayvan modellerinin biyomedikal önemi ve sınırlamaları Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Hayvan modellerinin biyomedikal çalışmalar ve aşı çalışmalarındaki önemi ve sınırlamaları

Hayvan Modeli	Önemi ve Kısıtlılığı
Sıçan ve Fare	Kolay üreme, taşıma, daha az yetiştirme bakımı (4). Çoğunlukla kendi içinde yetiştirilirler, bu nedenle geniş genetik varyasyonları yoktur (5).
Gine domuzu	Çoğunlukla tüberküloz araştırmasına, aşı çalışmasına uygundur (6). Yüksek fenotipik varyasyonları mevcuttur (7).
Hamster	Sık östrojen döngüsü nedeniyle üreme araştırmaları için kullanılır (8), leptospiroz enfeksiyon modeli (9), aşı çalışmaları mevcuttur.
Tavşan	Cerrahi olarak oluşturulan osteoartrit, yara iyileşme modeli, ilaç çalışması, astım modeli, kardiyovasküler hastalık modelleri mevcuttur (10-13).
Atlar	Eklem patolojileri, ortopedik modeller, tendinopatiler, astım modeli, üreme modelleri çalışmaları için önemlidir. Ancak, bakım maliyeti yüksektir (14-18).
Sığırlar	Dişi üreme modeli, gebelik ile ilgili konular, tüberküloz çalışması için modelleri mevcuttur (19-21). Ancak bakım maliyeti yüksektir.
Koyun	Kullanımı kolay, kolay numune alma, fizyolojik ve anatomik yapı benzerliği avantajıdır. Kemik ve yara iyileşmesi için cerrahi model, astım modeli, kalp patolojisi, aşı geliştirme çalışmaları için kullanılmıştır (22,23).
Kedi	Astım, obezite, tip-2 diabetes mellitus, HIV, serebral palsi için önemli modelleri mevcuttur (24-26).
Köpek	Narkolepsi, hemofili B veya kalıtsal hastalıklar, kanser, kas-iskelet araştırmalarında modelleri kullanılmıştır (27-29).

Aşı Geliştirilmesinde Deneysel İnfeksiyon Modellerinin Önemi

Aşılar, tarihteki diğer tüm tıbbi müdahalelerden daha fazla hayat kurtarmıştır. Aşılar, dünyadaki çoğu halk sağlığı programının önemli bir parçasıdır ve ortaya çıkan veya yeniden ortaya çıkabilecek birçok hastalığın kontrolü için gereklidir. Aşıların tarihçesinde hayvanların kullanımına bakılacak olursa, bilinen en eski tıbbi standart eser olan Corpus Hippocraticum (Hipokrat'ın toplu yapıtları; yaklaşık MÖ 350), domuzlar üzerinde yapılan deneylerin açıklamalarını içerir (30). İlk immünoprofilaksi girişimi 6. yüzyıla kadar uzansa da (Çin'de insanları çiçek hastalığına karşı korumak için varyasyon uygulanıyordu), hayvan deneylerinin aşı geliştirme ve kalite kontrolünde tam bilimsel statü kazanması ancak 19. yüzyılın ortalarında mümkün oldu (30). Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarla bulaşıcı hastalıklar ve mikroorganizmalar arasındaki nedensel ilişkiyi desteklemeyi başaran ve böylece bu hastalıkların bir kısmı için etkili terapötik ve profilaktik ajanların keşfinin yolunu açan Louis Pasteur ve Robert Koch'du. On dokuzuncu yüzyılın son on yılında difteri tedavisi ve önlenmesinde etkili ve güvenilir bir yol bulmak için yürütülen deneyssel hayvan çalışmaları, birçok açıdan hayvanların kullanımını belirlemiştir (30). İmmünobiyojlojilerin kalite kontrolünde yaygın olarak kullanılan birçok rutin hayvan testi, difteri araştırmalarından ortaya çıkmıştır (30). Difteri deneyssel hayvan araştırmaları ile elde edilen veriler sayesinde çocuk ölümlerinin etkili bir şekilde azalmasının, o günlerde toplumun hayvan deneylerine karşı tutumu üzerinde çok derin bir etkisi olmuştur (30). Günümüzde ise halen aşı ve translayonel tıp araştırmalarında hayvan modelleri yerine alternatif modellerin kullanılması ile ilgili tartışmalar olmaktadır. Bununla birlikte, koruyucu bağışıklığı ortaya çıkarmak için bağışıklık sisteminin uyarılması; hücresel ve hümmoral bağışıklık sistemlerinin araçları arasındaki çoklu, oldukça karmaşık etkileşimlere bağlı olan bir süreçtir. Bu nedenle, bugün itibarıyla, bu etkileşimleri araştırmak için hayvanların kullanılması en önemli seçenek olmaya devam etmektedir. Hayvan modelleri, hümmoral ve hücre aracılı bağışıklık, bağışıklığın başlangıcı ve süresi, sistemik ve mukozal bağışıklık, enfeksiyona karşı koruma ve hastalık bulaşmasının azaltılması gibi çeşitli immünolojik parametreleri değerlendirmek için yaygın olarak kullanılır. Uygun hayvan modelinin seçilmesi, modern ve daha etkili aşıların geliştirilmesi için kritik öneme sahiptir. Belirli bir aşı tarafından indüklenen bir bağışıklık tepkisinin türünü değerlendirmek için, hem sitokin salgılanmasını hem de belirli antikor izotiplerini değerlendirmek için, Balb/c fareleri yaygın olarak kullanılır. Bununla birlikte yaygın olarak kullanılan diğer türler arasında tavşanlar, sıçanlar ve kobaylar bulunur. Hayvan modellerinin biyomedikal çalışmalar ve aşı çalışmalarındaki önemi ve sınırlamaları Tablo-1'de gösterilmiş idi. Bu modeller, belirli bir antijene karşı bağışıklık tepkisini hızlı bir şekilde değerlendirme ve adjuvanların, aşı formülasyonlarının geniş testlerinde veya en iyi bağışıklama yolunun değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılır. Doğru hayvan modelini seçmek, aşının başarısı için kritik öneme sahiptir. Aşı geliştirmede hayvan modelleri, aşı formülasyonunu (antijen, adjuvan), uygulama yolunu (örn. kas içi ve mukozal), etkili ve güvenli aşı dozajını optimize edebilir. İndüklenen bağışıklık tepkisi, korumanın bağışıklık bağıntılarını bulmak için değerlendirilebilir. Bu klinik öncesi araştırma, bir aşı adayının insanlara uygulanmadan önce koruyucu ve güvenli olma şansını en üst düzeye çıkarır (31).

KAYNAKLAR

1. Barré-Sinoussi F, Montagutelli X. Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. *Future Sci OA*. 2015;1(4):FSO63.
2. Andes DR, Lepak AJ. In vivo infection models in the pre-clinical pharmacokinetic/ pharmacodynamic evaluation of antimicrobial agents. *Curr Opin Pharmacol*. 2017; 36: 94-9.
3. Pehlivanovic B, Dina F, Emina A, Ziga Smajic N, Fahir B. Animal models in modern biomedical research. *Eur J Pharm Med Res*. 2019;6(7):35–8.
4. Antony JJ, Sithika MAA, Joseph TA, Suriyakalaa U, Sankarganesh A, Siva D, et al. In vivo antitumor activity of biosynthesized silver nanoparticles using *Ficus religiosa* as a nanofactory in DAL induced mice model. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013;108:185–90.
5. Liu X, Manzano G, Kim HT, Feeley BT. A rat model of massive rotator cuff tears. *J Orthop Res*. 2011;29(4):588–95.
6. Clark S, Hall Y, Williams A. Animal models of tuberculosis: guinea pigs. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(5):a018572.
7. Cashman KA, Broderick KE, Wilkinson ER, Shaia CI, Bell TM, Shurtleff AC, et al. Enhanced efficacy of a codon-optimized DNA vaccine encoding the glycoprotein precursor gene of lassa virus in a guinea pig disease model when delivered by dermal electroporation. *Vaccines*. 2013;1(3):262–77.
8. Chanut FJA, Williams AM. The Syrian golden hamster estrous cycle: unique characteristics, visual guide to staging, and comparison with the rat. *Toxicol Pathol*. 2016;44(1):43–50.
9. Evangelista KV, Lourdault K, Matsunaga J, Haake DA. Immunoprotective properties of recombinant LigA and LigB in a hamster model of acute leptospirosis. *PLoS ONE*. 2017;12(7): e0180004.
10. Brunner AM, Henn CM, Drewniak EI, Lesieur-Brooks A, Machan J, Crisco JJ, et al. High dietary fat and the development of osteoarthritis in a rabbit model. *Osteoarthr Cartil*. 2012;20(6):584–92.
11. Camacho P, Fan H, Liu Z, He J-Q. Small mammalian animal models of heart disease. *Am J Cardiovasc Dis*. 2016;6(3):70–80.
12. Dos Santos RA, Südy R, Peták F, Habre W. Physiologically variable ventilation in a rabbit model of asthma exacerbation. *Br J Anaesth*. 2020;125(6):1107–16.
13. Elmorsy S, Funakoshi T, Sasazawa F, Todoh M, Tadano S, Iwasaki N. Chondroprotective effects of high-molecular-weight cross-linked hyaluronic acid in a rabbit knee osteoarthritis model. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014;22(1):121–7.
14. Colbath AC, Frisbie DD, Dow SW, Kisiday JD, McIlwraith CW, Goodrich LR. Equine models for the investigation of mesenchymal stem cell therapies in orthopaedic disease. *Oper Tech Sports Med*. 2017;25(1):41–9.
15. Gastal EL, de Gastal MO, Wischral Á, Davis J. The equine model to study the influence of obesity and insulin resistance in human ovarian function. *Acta Sci Vet*. 2011;39(Suppl 1):s57-70.
16. Kajabi AW, Casula V, Sarin JK, Ketola JH, Nykänen O, Te Moller NCR, et al. Evaluation of articular cartilage with quantitative MRI in an equine model of post-traumatic osteoarthritis. *J Orthop Res*. 2021;39(1):63–73.
17. Nixon AJ, Begum L, Mohammed HO, Huibregtse B, O’Callaghan MM, Matthews GL. Autologous chondrocyte implantation drives early chondrogenesis and organized repair in extensive full- and partial-thickness cartilage defects in an equine model. *J Orthop Res*. 2011;29(7):1121–30.
18. Vargas A, Boivin R, Cano P, Murcia Y, Bazin I, Lavoie JP. Neutrophil extracellular traps are downregulated by glucocorticosteroids in lungs in an equine model of asthma. *Respir Res*. 2017;18(1):207.

19. Brooks-Pollock E, Wood JLN. Eliminating bovine tuberculosis in cattle and badgers: insight from a dynamic model. *Proc Biol Sci.* 1808;2015(282):20150374.
20. Chen Z, Robbins KM, Wells KD, Rivera RM. Large offspring syndrome. *Epigenetics.* 2013;8(6):591–601.
21. Hoeck VV, Sturmey RG, Bermejo-Alvarez P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Leese HJ, et al. Elevated non-esterified fatty acid concentrations during bovine oocyte maturation compromise early embryo physiology. *PLoS ONE.* 2011;6(8): e23183.
22. Clifton VL, McDonald M, Morrison JL, Holman SL, Lock MC, Saif Z, et al. Placental glucocorticoid receptor isoforms in a sheep model of maternal allergic asthma. *Placenta.* 2019;83:33–6.
23. Emmert MY, Schmitt BA, Loerakker S, Sanders B, Spriestersbach H, Fioretta ES, et al. Computational modeling guides tissue-engineered heart valve design for long-term in vivo performance in a translational sheep model. *Sci Transl Med.* 2018;10(440):eaan4587.
24. Asquith CRM, Sil BC, Laitinen T, Tizzard GJ, Coles SJ, Poso A, et al. Novel epidithiodiketopiperazines as anti-viral zinc ejectors of the feline immunodeficiency virus (FIV) nucleocapsid protein as a model for HIV infection. *Bioorg Med Chem.* 2019;27(18):4174–84.
25. Aun MV, Bonamichi-Santos R, Arantes-Costa FM, Kalil J, Giavina-Bianchi P. Animal models of asthma: utility and limitations. *J Asthma Allergy.* 2017;10:293–301.
26. Clowry GJ, Basuodan R, Chan F. What are the best animal models for testing early intervention in cerebral palsy? *Front Neurol.* 2014;5:258.
27. Cantore A, Ranzani M, Bartholomae CC, Volpin M, Valle PD, Sanvito F, et al. Liver-directed lentiviral gene therapy in a dog model of hemophilia B. *Sci Transl Med.* 2015;7(277):277ra28.
28. Correard S, Plassais J, Lagoutte L, Botherel N, Thibaud J-L, Hédan B, et al. Canine neuropathies: powerful spontaneous models for human hereditary sensory neuropathies. *Hum Genet.* 2019;138(5):455–66.
29. Brown DC, Agnello K, Iadarola MJ. Intrathecal resiniferatoxin in a dog model: efficacy in bone cancer pain. *Pain.* 2015;156(6):1018–24.
30. Hendriksen CF. A short history of the use of animals in vaccine development and quality control. *Developments in Biological Standardization.* 1996; 86:3-10.
31. Kaser T, Renois F, Wilson HL, Cnudde T, Gerds V, Dillon JR, et al. Contribution of the swine model in the study of human sexually transmitted infections. *Infect Genet Evol.* 2018; 66: 346-60.

DENEYSSEL BAKTERİYOLOJİK HAYVAN MODELLERİ

EXPERIMENTAL BACTERIOLOGICAL ANIMAL MODELS

Prof. Dr. Mehmet YILDIRIM

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, İzmir Tıp Fakültesi, İzmir Şehir Hastanesi, Genel Cerrahi Kliniği
Tel. no: 0 532 2855557, E- posta: mehmetyildi@gmail.com, ORCID:000-0001-9948-9106

ÖZ

ÖZ

Peritonit ve sepsise giden bakteri kökenli infeksiyonların yüksek mortalitesi nedeni ile fizyopatoloji ve tedavisine yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Ancak çalışmaların insanlar üzerinde yapılamaması nedeni ile deneysel modellerin geliştirilmesi gereklidir. Çalışmalar feçes yada üretilmiş bakteriler ile yapılmaktadır. Başlıca bakteri modelleri intraperitoneal ya da intravenöz bakteri verilmesi, çekumu bağlama ve delme metodu, intraperitoneal kapsül modeli, çıkan kolona stent uygulamasıdır. Pratikte çekum bağlama ve delme metodu peritonitin oluşumu ve tedavisi, intraperitoneal kapsül bakterinin periton boşluğuna yavaş dağılımı ve uzamış etkileri nedeniyle peritonit ve apse oluşturulması için kullanılmaktadır. Çıkan kolona stent anastomoz perforasyonunun etkilerini yansıtan bir modeldir. Bakteriyel translokasyon modeli olarak yanık oluşturulması, hemorajik şok ve intraabdominal damar bağlanması yöntemleri kullanılmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Deneysel model, bakteriyolojik, çekum bağlama ve delme, bakteriyel translokasyon

SUMMARY

The studies of physiopathology and treatment are carried out due to the high mortality of bacterial infections leading to peritonitis and sepsis. However, due to the fact that studies cannot be performed on humans, it is necessary to develop experimental models. Studies are carried out with faeces or produced bacteria. The main bacterial models are intraperitoneal or intravenous bacteria administration, cecum ligation and puncture method, intraperitoneal capsule model, and colon ascendens stent peritonitis. In practice, while the cecum ligation and puncture method is used for the formation and treatment of peritonitis, the intraperitoneal capsule is used for peritonitis and abscess formation due to the slow distribution of bacteria into the peritoneal cavity and their prolonged effects. Colon ascendens stent peritonitis model that reflects the effects of perforation of anastomosis. Burn injury, hemorrhagic shock and intra-abdominal vessel ligation methods are used as bacterial translocation model.

Keywords: Experimental model, bacteriologic, cecum ligation and puncture, bacterial translocation

Klinik pratiğinde peptik ülser delinmesi, appendisit, barsak delinmesi ya da bakteriyel translokasyon (BT) ile aerobik ve anaerobik mikroorganizmaların neden olduğu intraabdominal peritonit ve sepsis tablosu çoklu organ yetmezliği nedeni ile yüksek morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır. Barsak distaline gidildikçe lümen içi mikroorganizma sayısının 10^{10-12} bakteri/ gr. a yükselmesi ve anaerobik/aerobik oranındaki değişim yanında, ilk fazda *E. coli* kaynaklı peritonit oluşumu, ikinci fazda da anaerobik bakteri suşları ile intraabdominal apselerin oluşumu deneysel çalışmaların bifazik sepsis konusunda

yoğunlaşmasına neden olmuştur. İntraabdominal kaynaklı sepsisler genellikle polimikrobiyal kaynaklı olup, laboratuvar koşullarında anaerobik bakterilerin aerobik gr(-)lerin etkilerini arttırması nedeni ile yüksek endotoksin düzeyine neden olmaktadır. Yüksek endotoksin varlığında bakteriyal kökenli enfeksiyonlar organizmada inflamasyon ve koagülasyon yolağını aktive ederek sepsis gelişmesine neden olmaktadır. İnsan hastalıklarının çalışıldığı tüm hayvan modelleri kısıtlılıkları olsada invitro modellere göre üstündürler (1,2). Temelde bakteriyel modellerin amacı bakteriyemi oluşumundan sonra peritonit, sistemik yangısal yanıt sendromu ve sepsise giden tabloların ortaya çıkarılması olmaktadır.

Yüz yılı aşan süredir hayvan deneysel modelleri kullanılmakta olup, başlangıç çalışmaları 1905 yılında intraperitoneal pnömokok enjekte edilerek öldürücü etkinin incelenmesi ve 1911 yılında antibakteriyal bileşiklerin verilmesi işlemleri olmuştur (3). Bakteriyolojik deneysel çalışmalar ise ilk kez 1930' lu yıllara kadar uzanmakta olup son dört dekatta aralarında Browder, Teale, Atkinson, Evans ve Briggs'in bulunduğu araştırmacılar tarafından bakterilerin virulansı, patojenezi, antibiyotik kullanımının etkileri, gr(-) sepsis ve sitokinlerin bakteriyel peritonitteki etkileri gibi farklı modeller üzerinde çalışılmıştır.

Bakteriyolojik modellerin önemi

Bakteriyel enfeksiyonların anlaşılması ile insanları iyileştiren yada ölüme götüren patojenezin ortaya çıkarılması ve çözümüne yönelik invitro metodlar yanında deneysel hayvan modelleri de geliştirilmiştir. Bu amaçla köpek, domuz ve koyunlar kullanılmışsada fare ve sıçanlar uygulanabilirlik kolaylığı nedeni ile daha sıklıkla kullanılan deney hayvanlarıdır. Günümüzde fare modelleri enfeksiyonların önlenmesinde ve tedavisinde önemli avantajlara sahiptir. İnsanlar üzerindeki bakteriyolojik araştırmalar; insanların farklı genetik özellikleri, daha önce geçirdikleri hastalıkların farklılığı ve karşılaştıkları antijenlerin çeşitliliği, organ ve sistem özellikleri olması nedeniyle tekdüze çalışmalar değildir. İnsan ve fare arasında da belirgin fark olmasına rağmen, fizyolojik benzerliklerden yararlanarak bu modellerde deney hayvanının genetik geçmişlerinin özgünlüğü, organ sistemlerinde çalışılabileceği, immun sisteminin aktif olması, çalışmanın kolay uygulanabilirliği, küçük boyutta olması ve bakım kolaylığı gibi özellikleri ile insanda denenmesi mümkün olmayan bakteriyel peritonit ve sepsis modellerini uygulanabilir kılmaktadır (4). Bununla birlikte deney hayvanlarının önceden hastalık geçirmemiş olmaları, yaş ve biyolojik rezervlerinin dikkate alınmaması da eleştiri konusu olmaktadır (1).

Bakteriler ile oluşturulan modellerdeki amaç; etkin sitokinlerin tanımlanması, koruyucu yada mortalitede rol alan sitokin ve mediatörlerin belirlenmesi, peritonite karşı savunmada saptanan yolları ve antibiyotiklerle ilgili yardımcı çalışmaların yapılmasıdır (5,6). Deney hayvanlarında adenotonsillit, sinüzit, osteomyelit, periodontitis, nekrotizan fasiyit, vaginit, peritonitler başlıca bakteriyolojik çalışma alanları olmuştur. Tanımlanan sepsis modellerinin temel metodu bakteri ve/veya endotoksininin intravenöz verilmesi yada periton içine bakteri verilmesi şeklindedir. Periton içi bakteri uygulamaların başlıcaları fekal suspansiyonun verilmesi, bakterinin intraperitoneal enjeksiyonu, bakteri içeren kapsüllerin periton içine yerleştirilmesi yada çekum ligasyonu yapıldıktan sonra çekumun delinerek(punktur) (ÇLD) hayvanın kendi feçesi ile peritonun kontaminasyonudur (7). İntravenöz bakteri uygulaması

gr(-) bakterilerin yada endotoksinlerin verilmesi ile yapılmaktadır. ÇLD ise peritonitin kolaylıkla oluşturulabilmesi ve insanlarda intraabdominal organ perforasyonları sonrası görülen hemodinamik ve metabolik etkilere benzer özellikleri nedeni ile bakteriyel infeksiyonun klinik ve laboratuvar özelliklerinin çalışılmasına uygun bir metottur (8). Ayrıca intravasküler ve intraperitoneal sepsis modeli ile karşılaştırıldığında insan hastalıklarına daha benzer olup polimikrobiyal doğası ile daha öne çıkmaktadır. Bu model ayrıca proinflamatuvar sitokin yanıtını göstermek açısından bakteriyeminin endotoksemiden daha önemli olduğunu da göstermek için uygun bulunmuştur.

Deney hayvanı seçimi ve bakteriyolojik materyalin hazırlanması

Hayvanlar üzerinde bakteriyolojik çalışmalar sistemik infeksiyonlar oluşturulması yada peritonit modellerinin üzerinde yapılmaktadır. ÇLD modelinde 6-8 haftalık 20-30 gr lık Swiss Webster, C3H/HeN, C3H/Hej türü endotoksin dirençli ratlar kullanılmaktadır. İntraabdominal apse modelinde Wistar(160 gr), Swiss Albino(25 gr) , Sprague- Dowley(150 gr), CFI(20 gr) sıçanlar kullanılmaktadır. Bakteriyel translokasyonda ise BR Holtzmann , Sprague- Dowley türü kullanılmaktadır. Son 10 yılda deneysel bakteriyolojik çalışmalarda boyutları, anatomi, fizyolojisinin, immun yanıtın ve doğal yol ile oluşan infeksiyonlarının insana benzerliği nedeni ile domuzlar da kullanılmaktadır. Ancak bakteriyel çalışmalarda hayvan seçiminde küçük, ucuz ve ele sığabilen hayvan türü önemli olup, bu şartlara uyan hayvan tipi fare ve sıçanlardır. Çalışmada fare kullanılacak ise fareler arasında ağırlık farkının 2-3 g dan fazla olmamasına dikkat edilmelidir.

Peritonit oluşturmak için insan ya da sıçan feçesinden hazırlanan 10^7 - 10^9 cfu/ml konsantrasyonda *E. coli*, *B. fragilis* ve *Enterococcus fecalis* kullanılmakta olup, işlem öncesi bakteri kültürlerinin santrafuj edilmesi, elde edilen sedimentinin salin ile süspansiyon haline getirilmesi gereklidir. İntraabdominal apse oluşturmak için 10^7 /gr *B. fragilis* tipi anaerobik ve 10^5 /gr konsantrasyonda *E.coli* tipi aerobik bakteri içeriği hazırlanmaktadır. Apsenin yoğunluğunu sağlamak için bu içeriğe baryum sülfat, hemoglobın, fibrin pıhtısı, ölü dokular gibi adjuvanlarda ilave edilmektedir. Peritonit oluşturulması işleminde bakteri ortamına safra, kan ve müsin eklenmesi hastalığın şiddetinde artışa neden olmaktadır.

Bakterinin peritona enjeksiyonundan 20 dakika sonra bakteriyemi ortaya çıkmakta, bakteri inokülasyonu modelinde ise bu süre 1-3 saat arasında olmaktadır. Sepsis bulgularının ortaya çıkması ise 6-12 saat sonra görülmektedir. Fekal pellette hazırlanan bakterinin fibrin pıhtısı içinde verilmeside ip feçes verilmesi gibi hızlı ölüme götüren tablo ile birliktedir. Ancak steril feçes, agar ve bakteriden oluşan pellet 0.8 ml gibi düşük dozlarda verilirse hafif metabolik değişikliklere neden olmakta ve mortalite saptanmamaktadır (9).

Periton boşluğuna katater türünde yabancı cisim konarak peritonit oluşturulan model de ise *Staphylococcus aureus* ve koagülaz-negatif stafilokoklar kullanılmaktadır. Bu modelde intraabdominal yabancı cisim yerleştirildikten sonra, 10 - 60 dakika arasında saline ile hazırlanmış stafilokok intraperitoneal olarak enjekte edilmektedir. Peritona 10^8 cfu bakteri verildiğinde birkaç gün içerisinde sayısı 10^4 - 10^5 / ml bakteri olmakta ve 3-4 gün içerisinde de bakteri kaybolmaktadır. Bakterinin kanül etrafında kolonize olduğu durumlarda ise 30 güne

kadar saptanması mümkün olabilmektedir. Çalışmada kullanılmak amacı ile apse içerisinden 0.05-0.15 ml. aspirat alınması mümkün olmaktadır. Domuzlarda kullanılacak bakteri modellerinde katater, deri ve kalb çalışmasında *Staphylococcus aureus*, gastrointestinal ve üriner sistem de ise *E.Coli* inokulumu olup 10^6 - 10^8 cfu dozda kullanılmaktadır (10).

Çalışmalarda peritondan bakteri sayılımı yapılacak ise pratik yöntem periton boşluğuna 2 ml salin verildikten sonra farenin karın bölgesinin 1 dakika süre ile hafif masaj yapılarak sıvının karın içine dağılmasının sağlanmasıdır (11). Daha sonra batın insizyonu yapılarak, barsaklar laterale itilmeli ve pipet ile 1 ml intraperitoneal sıvı alınmalıdır. BT incelemesinde ise kan örnekleri tüp içerisine alınarak 37°C de 48 saat inkübe edilerek 24-48 saat sonra bakteri üremesi incelenmelidir. Küçük miktarda kan için kuyruk veni, büyük miktarda (1-1.5 ml) kan için aksilla yada kardiyak kan alınmalıdır. Doku örnekleri için kolona en yakın mezenter lenf düğümleri yanında karaciğer ve dalak çıkarılarak homojenize edilir ve aerobik kültüre ekilerek bakteri sayımı yapılmalıdır. Doku histolojik bakışında ise ödem ve barsak nekrozu gibi değişiklikler çalışılabilir.

Deney hayvanlarının bakteriyel çalışmalar öncesi ve sonrası hazırlanması

İnsanlarda kolon içeriği anerobik mikroorganizmalardan zengin iken sıçan kolon bakterilerinin aeroblarca zengin olması insana uyumlu model olması ile bağdaşmamaktadır. Bu nedenle sıçanlarda barsak bakteri yapısının tahıl diyetinin değiştirilmesi ile insan barsak içeriğine benzerlik sağlanması mümkündür. Sıçanlara yağsız kıyma gibi et ürünlü yemler verildiğinde bakteri florası kısa sürede anaerob hale gelmektedir. ÇLD modeli uygulanacak ise sıçanlar 2 hafta süre ile hayvan bakım merkezinde barsak florasının ortak hale gelmesi için fare yemi ve *ad liberum* su ile beslenmelidir. Aynı beslenmeye cerrahi uygulamadan 8 saat öncesine kadar devam ettirilmelidir.

Peritonit yapılacak sıçanlarda işlem 15-30 dakikada tamamlandığı için anestezi olarak yaklaşık 5 dakikada etkisini gösteren 30mg/kg ketaminin yeterli olabileceği gibi 6 mg/kg Ksilazin ile kombine edilerek intramusküler yada subkütan yol ile kullanılmaktadır (12). ÇLD yapılacak sıçanların ise verilecek sıvı ve antibiyotik miktarının belirlenmesi için işlemden önce tartılarak 200-300 g ağırlığında olduğu tespit edilmelidir (13). Uygulanacak anestezi ise 80mg/kg ketamin ve 5-15 mg/kg Ksilazin karışımının insülin enjektörü ile intramusküler yada ip yapılması ile sağlanabilmektedir. Anestezide pentobarbital sodyum kullanılan çalışmalarda ise 25 mg/kg dozda yeterli olabilmektedir. Gaz inhalasyonu uygulanacak ise isoflurane 0.25-2.5 %/kg dozda uygulanmalıdır. Anestezinin etkisi kuyruk yada ayak parmaklarının sıkıştırılması ile denlenmelidir. Anesteziden 1-2 dakika sonra tepki kaybolmaktadır. Karın cildi temizliği için %70 lik alkol, isopropanol ya da iyod bazlı solüsyonlar kullanılmalıdır. İşlem sonrası sıvı resüsitasyonu uygulanarak kafese alınmalıdır. Sıvı uygulama yolu karın katları kapatılmadan ip olarak 37°C ısıtılmış %0.09 saline yada 0.15M NaCl, 25ml/kg dozda verilmelidir. Sıvı resüsitasyonu yapılmayan ratlarda çalışmalar için gerekli olan hipermetabolik faz meydana gelmemektedir (14).

Çalışmalarda oluşturulan polimikrobiyal infeksiyonlar için aerobik ve anaerobiklere etkili metranidazol, sefoksitin, gentamisin, aztreonam türü antibiyotikler kullanılmalıdır. Antibio-

tiklerin devamlı uygulamasının aralıklı uygulamadan daha fazla etkili olduğu gösterilmiştir. Sıçanlarda antibiyotik uygulaması 3-12 kez, 6 saat aralıklarla yapılmalıdır. Yaşam süresi çalışmalarında kullanılan başlıca maddeler pentoksifilin, anti CD8 antikorları, anti-TNF ve anti IL1 dir. ÇLD modelinde çalışma sonunda kan kardiyosentez yolu ile alınmalıdır. Koloni oluşturma ünit(cfu) petride manuel sayılmalıdır. Peritoneal cfu antibiyotik kesildikten sonra bakılmalıdır (7). Aerobik bakteri 3 saatte ortaya çıkmakta olup 24 saatte kültür(+)liği saptanırken, anaerob bakteriyemi 1 saatte ortaya çıkarken kültür (+) liği 6 saatte görülmektedir (15). Peritonit modelinde sakrifikasyon sonrası peritondan sıvı toplanır ya da ip lavaj sıvısı alınır. Peritonitli ortamda fagositler ilk 6 gün, sitokinler ise 3. güne kadar yükselme ve üç gün kadar devam etme eğilimindedir. BT modelinde ratlarda çalışma öncesi lümen içi bakteri yükünün içme suyuna 4 gün önceden 4 mg. streptomisin sülfat konulması ile feçesteki floranın 10^2 cfu ya azaldığının boyama ile gösterilmesi gereklidir (16). Daha sonra laboratuvarıda üretilmiş *E.Coli* ratların midesine 3×10^8 cfu verilir ya da içme suyuna ilave edilir. Antibiyotik tadı nedeniyle bazı sıçanların su içmediği durumlarda suya sakarin ilavesi yapılabilir. Sistemik ya da portal kan tüpleri 48 saat 37^0 de inkübe edilerek, 24 saat sonra bakteri üremesi kontrol edilmelidir. BT nun saptanması için ileum ve çekumu drene eden lenf düğümlerini de içeren barsak mezosu ile birlikte eksize edilerek steril tüp içine alınmalıdır. Ayrıca uygun koşullarda karaciğer ve dalakta homojenize edilerek ayrı ayrı mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilir. Kültürde üreyen bakteriler gram boyama ile identifiye edilirler. BT yanık, hemorajik şok yada vasküler ligasyona bağlı olarak ortaya çıkarılmışsa ileum ve çekum ışık mikroskopu ile incelenir. Bunun için ileum ve çekum mukozası örneklerinin 2-4 mm çapında eksize edilmesi gerekmektedir.

Deney hayvanlarında peritonit ve sepsis bulguları

Sepsis bulguları haraketsizlik, tüylerinin dikleşmesi, diğer hayvanlarla gruplaşma yapmaması, titreme, tüylerinin kirli olması, su ve yiyecek alımının durması, gözlerinin parlaklığını kaybetmesidir. Hayvanlar taşikardiktir ve idrarı koyulaşmıştır. Sıçanların karnında distansiyon ve diyare görülerek birkaç gün içinde %25' e varan kilo kaybı görülür. Hastalığın şiddetine bağlı olarak ilk ölüm 6-12 saatte görülmekle birlikte bu süre 5 güne kadar uzayabilir. Ölmeyen hayvanlar tamamen iyileşebileceği gibi intraabdominal apse oluşumu ile de sonuçlanabilir. Çalışmadaki bakterilerin dozuna bağlı olarak düşük mortaliteli ve uzun süreli apse oluşumunda sağlanabilmektedir (17).

Bakteriyolojik Deneysel modeller ve özellikleri

İntravenöz ya da intraperitoneal bakteri verilmesi

ÇLD modelinde bakteri kültürlerinin standart olmaması nedeni ile peritona bırakılan bakteri suşu ve sayısı (koloni oluşturma ünit-cfu gr/ml) bilinmemektedir. Bu nedenle bakterinin laboratuvar şartlarında hazırlanması aynı büyüme fazındaki bakterinin verilmesini sağlamaktadır. Bakteri inokulumu modeli içerisinde belirli sayıda cfu *E. coli* mevcut olan materyalin ip olarak verilmesidir. Ratlarda ip uygulamada karın derisi göbekten geçen yatay ve dikey iki çizgi ile dört kadrana ayrılmakta ve enjeksiyon vital organların bulunmadığı sol alt kadrana yapılmaktadır. Deney hayvanının başaşağı tutulması ile organların yer değiştirilerek ip enjeksiyon için uygun

kadran sağlandığı belirtildi organların immobil olması nedeni ile sorgulanan bir manüplasyondur (18). Saf kültür bakterisinin verilmesi endotoksik şok modeli olarak kullanılmakta olup *B. fragilis* yada *E. coli* ve *B. Fragilis* suşları kullanılarak uygulanmaktadır. Bu model iki fazlı olup ip apse modeli olarak da kullanılmaktadır(19). Çalışmalarda endotoksin enjeksiyonu ile endotoksin duyarlı ya da duyarsız grupların birbirinden farklı olmaması nedeni ile başka faktörlerin incelenmesi için uygun bir model olmaktadır. Bakteri kültürlerinin ip enjeksiyonu septik şok ve hızlı ölüme neden olmaktadır. Yüksek doz bakteri verilmesi immün sistemin bakteriyi imhası ile sonuçlanmaktadır. *E. coli* verilmesi sepsise neden olurken *E. coli* ve *B. fragilis* kombinasyonu intraabdominal apse oluşumuna neden olmaktadır. Bu modelin başlıca dezavantajı ise manüplasyona bağlı iç organ yaralanmasıdır.

Polimikrobiyal sepsis çalışmaları için ip uygulamaların yapıldığı bir başka model de çekum bulamaçı hazırlanmasıdır. Bu modelde üç sağlıklı insanın feçesinden oluşan içerik 1.75 ml/kg saline ile sulandırılarak 21G kanül ile ip olarak uygulanmaktadır. İnjektasyondan 2 saat sonra hastalık belirtileri ortaya çıkmaktadır. Benzer bulamaç için farklı sıçanlardan yada kurban edilmiş sıçanlardan hazırlanan süspansiyonlarda kullanılmaktadır. Bu süspansiyon sıçan karın bölgesinde orta hattın yapılan 0.5 cm. lik kesi ile periton boşluğuna girilerek 5-15 ml/kg dozda verilerek uygulanmaktadır (20).

İntraperitoneal bakteri ile infekte edilmiş inokulum verilerek yabancı cisim reaksiyonu modelinde uygulanabilmektedir. Bu amaçla periton açılarak batin içine 10-15 mm. uzunlukta ve dış çapı 4.5 mm. yi geçmeyen silikon dren parçası konulmaktadır. İşlemden 10-60 dakika sonra 10^5 dozda *S. Aureus* bakterisi ile infekte inokulum ip olarak uygulanır. Uygulamanın 24 saatten sonraya uzaması yabancı cisim reaksiyonu görülme oranını azaltmaktadır. Katater çıkarıldıktan sonra 1 ml %0.9 salin içine konur ve 10 saniye sıvı içinde karıştırıldıktan sonra kültür alınır. Bu yöntem farklı profilaksi ve tedavi yöntemlerinin çalışılması için öncelikli olmasının yanında farklı içerikli ve boyutlardaki yabancı cisimlerin değerlendirilmesinde de önem taşımaktadır.

Intraperitoneal kapsül tekniği

İntraabdominal apse çalışmaları önceleri kolonun serbest perforasyonu ile yapılmış olup, infeksiyonun incelenmesi ve antimikrobiyal tedavi sorgulanmıştır. Daha sonra pepton ve baryum sülfat içeren kapsül tekniği geliştirilmiştir. Bu tekniğin amacı, bakteri içeren jelatin kapsüllerin ip olarak yerleştirilmesi ile intraabdominal apse oluşturulmasının sağlanmasıdır. Kapsül içinde bakteri kaynağı olarak et ile beslenmiş sıçan çekum içeriği kullanılmakla birlikte bakteri tür ve dozunun farklı olması dezavantajıdır. İdeal olan invitro üretilmiş istenen sayıda bakteri içeriğinin kapsül içerisine konmasıdır. Modelin temel prensibi kapsül sayesinde feçesteki bakterinin intraabdominal yayılımının yavaşlaması ile organizmanın yanıtının uzamasına neden olmasıdır. Jelatin kapsüllerde *E. coli*, *B. fragilis* ve adjuvan maddeler kullanılmaktadır (21). Kapsül içeriği pelviste lokalize olmakta 24 saatte süpürasyon ve ileusa neden olmaktadır. Modelde iki fazlı etki görülmekte olup, birinci fazda 48 saatte periton yapışıklıkları ve kolay dağılan pü oluşumları saptanmakta, ilk 3-5 günde akut sepsise uzanan peritonit oluşmakta ve tedavi edilmez ise hayvanların %40 kadarı bu fazda ölmektedir. İkinci faz ise 5-7. gün aralığında ortaya çıkan intarabdominal apselerdir. İkinci haftada apseler örnek

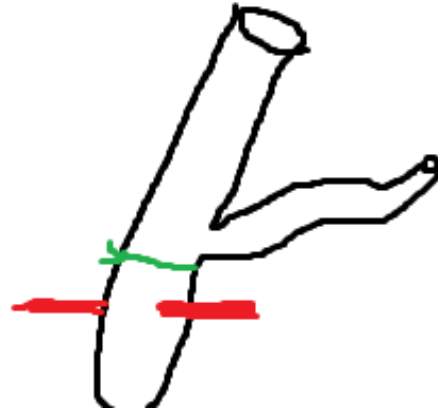
alınacak büyüğe erişmekte ve dördüncü haftada kendiliğinden perfore olmaktadır. İlk fazda *E.coli* gibi aerobik, 2.fazda ise ağırlıklı olarak *B. fragilis* türü anaerobik bakteriler görülmektedir (20). Modelde apsenin makroskobik olması tanı için yeterli olup histopatolojik inceleme gerekli değildir. Bu modelde antimikrobiyal tedaviler profilaksi yada tedavi edici etkilerinin araştırılması amacı ile kullanılmaktadırlar (22). Antibakteriyal ilaçlar profilaksi amacı ile kullanılacaksa bakteri inokülasyonundan 1 saat önce, tedavi amaçlı ise işlemten 4 saat sonra verilmeye başlanarak 5-15 gün süreyle uygulanmaktadır (23).

Çekum ligasyonu ve delme tekniği

Bu metotta sıçana anestezi ve cilt temizliği yapıldıktan sonra karın derisi orta hattan yada sol alt kadrandan bistüri ile 1 cm lik kesi yapılarak açılmakta olup, daha sonra makasla karın duvarının line albası kesilir. Çekum karın dışına alınarak çıkan kolondaki feçes çekum içini dolduracak şekilde sağılır ve çekum ileoçekal valvin hemen altından 3/0 ipek ile bağlanır. Sepsis modelinde immun çalışma yapılacak ise çekum ortasından ya da 1/3 distalinden bağlanarak karın içi bulaşın daha az olması sağlanabilir (Resim 1) (24). İstenen inflamasyon miktarına göre çekum antimezenterik kenarından 18-22 G iğne ile delinir ve periton boşluğuna bırakılır (Resim 2). Standart uygulama ligasyonun 1 cm. distalinden delinme yapılmasıdır. Başka bir alternatif ise çekumun nazıkçe sıkılarak az miktar feçesin çekumdan çıkmasının sağlayarak çekumun karın boşluğuna bırakılmasıdır. İşlemden sonra batın katları iki planda, müsküler tabaka 4/0 absorbabl iplik ve deri 4/0 naylon iplik kullanılarak dikilerek kapatılmalıdır. Sıçanlar işlem sonrası 6 saate bir kontrol edilmelidir.



Resim 1. Üç farklı çekum ligasyonu yöntemi



Resim 2. Çekumun iğne ile delinmesi(kırmızı çizgi =kanül)

Sıçanlarda mortalite peritonite bağlı sepsis ile 3 gün içinde olmakla birlikte çekum ligasyonunun distalden yapılması ve çekumun ince çaplı iğne ile delinmesi ile bu sürenin uzatılması mümkün olmaktadır(25,26). Çekumun 18G iğne ile tek delik ile delindiği modelde mortalite %60 iken, çift delik uygulandığında mortalite oranı %90 dır. Hayvanlara 72 saat devamlı antibiyotik uygulaması ile de düşük mortalite sağlanabilmektedir. ÇLD modelinde sepsis sonu mortalite gençten yaşlıya artış gösterdiğinden çalışmanın aynı yaştaki farelerde yapılması idealdir. ÇLD modeli akut model olduğu için akut barsak perforasyonlarıda kullanılmakta olup kronik organ yetmezliğini incelemek amacı ile kullanılamamaktadır. ÇLD

nin mortalite ve IL-6 yada TNF artışını göstermesinin iğne çapı, perforasyon sayısı, çekumun ligatüre kısmının uzunluğu, infüzyon ve antibiyotik uygulaması ile ilişkili olduğu da unutulmamalıdır. Ancak cerrahi işlemin tüm deney grubunda tektip yapılması gerekli olup, çalışma sonuçları teknik metodla doğrudan ilişkili bulunmuş ve deneyimsiz ekibin yüksek mortalite ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir (15).

Çıkan kolon stenti ile peritonit modeli

Bu modelde çıkan kolona yerleştirilen bir kanül yada stent ile anastomoz kaçağı modeli ve peritonit oluşturulması sağlanmaktadır (27,28). Bu metotta karın duvarı açıldıktan sonra önce ilecekal bölge ve çıkan kolon batin dışına alınmaktadır. Çıkan kolona ileocekal valvden 10 mm uzaklıkta barsak serozasına 7/0 iplikle dikiş atılarak düğümlenmekte ve düğümden 1 mm uzaklıktan 18 G branül kanülü yaklaşık 2-3 mm kadar lümen içine sokulmaktadır. Atılan dikişin serbest ipleriyle kanül sabitleştirilmektedir. Daha sonra branülün kılavuzu çıkarılarak branül barsak dışında 2 mm kalacak kadar kesilmektedir. Çekumdan çıkan kolona doğru barsak sıvazlanarak feçesinin geldiği görülerek stentin çalıştığı kontrol edilmektedir. Batin içindeki katater işleminden birkaç saat sonra omentum ile sarılmakta olup 3 gün içerisinde apse formasyonu ortaya çıkmaktadır. Bu grupta işleminden sonra ortaya çıkan başlıca sepsis bulguları hareket azalması, yiyecek alımında azalma ve zayıflamadır. Sepsise bağlı mortalite 48 saatte gelişmekte olup, 18G kanül ile mortalite oranı %50 iken 14 G kanül kullanıldığında oran %100 olmaktadır. Daha geç dönemdeki bulguların çalışılması için yöntemin modifiye edilmesi gerekmektedir.

Sepsisin erken dönemlerinde çalışma yapılabilmesi amacı ile bu yöntemin bir modifikasyonu geliştirilmiş olup, çıkan kolon lümenine tarif edilen şekilde 14 G Branül yerleştirilerek laparotomi kesisi kapatılmaktadır. İşlemden beş saat sonra re- eksplorasyon yapılarak barsak serozasında stenti tespit eden dikiş kesilerek stent çıkarılmakta ve barsaktaki kanül giriş deliği 7/0 dikişle tek plan kapatılmaktadır. Bu metodun sonuçları stent çıkarıldıktan sonra geçen zamana bağlı olarak değişmektedir. Bu yöntem ile hayvanlarda 10 güne kadar uzayan gözlem süresi sağlanabilmektedir (28).

Bakteriyal translokasyon modelleri

BT ye bağlı lümeniçi bakteri çoğalması, immün sistem yetmezlikleri ve artmış permeabilite sonrası lümen içi bakteri ve endotoksinin ekstralümenal yayılması nedeni ile bakteriyolojik çalışmalarda uzun yıllardır kullanılmakta olan modeldir. BT; yanıklar, hemorajik şok, superior mezenter arter(SMA) ligasyonu ve endotoksemia ile ortaya çıkan bir durumdur. Ayrıca açık abdomen modelleride uygulanmakta olup yaşam süresinin uzatılması, patojenlerin gecikmiş eradikasyonu ve lokal antibiyotik etkileri çalışılabilmektedir. Deneyisel modelde BT 4-6 saatte meydana gelmekte olup translokasyon lenf düğümleri, karaciğer, akciğer, dalak, böbrekler ve portal ya da sistemik kan örneklerinden incelenmektedir. Bu model çalışılacak ise ideal ortam için gastrointestinal sistem floarasını elimine etmek amacı ile antibiyotik ile dekontaminasyon yapmak gerekmektedir.

Yanık modeli

Yanık nedeni ile barsak mikrobiyotasında değişiklikler ortaya çıkmakta, koruyucu bakteriler azalırken fırsatçı bakteriler artmaktadır. İlaveten hücreler arası bağlayıcı proteinlerin

ekspersyonunda bozulmalar ortaya çıkmaktadır. Sonuçta mikrobiyata değişikliğine ilaveten yanık hasarına bağlı intestinal permeabilite artması, barsağın bariyer fonksiyonunun zarar görmesine ve intraluminal bakterilerin lümen dışına çıkmasına neden olmaktadır. Ekstraluminal bakteri önce lenf bezlerine daha sonrada karaciğer ve dalağa yayılmaktadır (29). Bu modelde BT oluşturmak için sıçan sırt bölgesinde Mech formülü ile hesaplanarak, %20 yanık oluşturulması gerekmektedir. Yanık oluşturma yöntemi; sıçan ya da farenin 100 derece sıcak suda 10 saniye tutulması yada 250 dereceye ısıtılmış çelik şablon ile karın derisine 7 saniye teması ile yapılmaktadır(16). Şokun önlenmesi için 1 ml saline ip olarak verilmelidir.

Hemorajik şok modeli

Bu modelde femoral artere konan heparinli 3 musluklu kanülden kapalı sisteme kan çekilerek tansiyon 30 mm Hg. ya düşürülmektedir. Ratlarda 30, 60 ve 90. dakikada BT' a etkileri incelenmektedir. Bu sürelerde tansiyonun sabit kalması için alınan kan gerektiğinde tekrar vasküler sisteme verilmesi kolaylığı vardır. Çalışma sonunda alınan kanların geri verilmesi ile resüsitasyon yapılır. Sıçanlar işlem sonrası çalışmanın metoduna göre 1,6,12,24 saat aralıklarında sakrifiye edilirler.

SMA ligasyonu modeli

İskemik modeller de vasküler ligasyon ile ileum ya da çekumda nekroz oluşması sağlanmaktadır. SMAnın aortadan çıktığı yerden geçici olarak bağlanması ile ince barsaklar ve çekumda renk değişikliği ortaya çıkar. Hayvanın batını gazlı bez ile geçici olarak kapatılarak beklenir ve SMA düğümü 45 dakika sonra açılır. Sıçanlar 1, 3, 8, 24 saatte sakrifiye edilir.

Sonuç

Bakterinin yada inokulumun iv-ip verilmesi, ÇLD, ip kapsül uygulaması ve intraluminal stent yöntemleri ile peritonit, sepsis, anastomoz kaçağı, intraabdominal apse modelleri yapılmaktadır. Günümüzde bakteriyel modellerde, bakteri ya da bakteri duvarının deneysel hayvan modellerinde kullanımı ile oluşturulan peritonit ya da sepsiste, laboratuvar tetkikleri ve histopatolojik incelemeler ile değişik klinik tabloların değerlendirilmesi sağlanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Ağalar C, Ağalar F. Sepsis modelleri. Cantürk NZ, Sayek İ. editöler. Cerrahi Araştırma. 1. Baskı. İstanbul: Nobel; 2005. p.309-17.
2. Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models and human sepsis. J Leucocyte Biology. 2007;81:137-43.
3. Morgenroth J, Levy R. Chemotherapie der pneumokokken infection. Berlin Klin Wschr. 1911; 34: 1560-1.
4. Bakaletz LO. Developing animal models for polymicrobial diseases. Nat Rev Microbiol. 2004; 2(7): 552-68.
5. Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. Shock. 2000;13(2):110-6.
6. Villa P, Shaklee CL, Meazza C, Agnello D, Ghezzi P, Senaldi G. Granulocyte colony-stimulating factor and antibiotics in the prophylaxis of a murine model of polymicrobial peritonitis and sepsis. J. Infect. Dis. 1998;178(2):471-6.
7. Wichterman KA, Baue AE, Chaudy IH. Sepsis and septic shock: a review of laboratory models and proposal. J Surg Res. 1980;29(2):189-201.

8. Toscano MG, Ganea D, Gamero AM. Cecal ligation puncture procedure. *J Vis Exp* 2011;(51):2860.
9. Nakatani, Sato T, Trump BF, Siegel JH, Kobayashi K. Manipulation of the size and clone of an intra-abdominal abscess in rats. *Res Exp Med (Berl)* 1996;196(2):117-26.
10. Jensen LK, Henriksen NL, Jensen HE. Guidelines for porcine models of human bacterial infections. *Laboratory Animals* 2019; 53(2):125-36.
11. Frimodt-Moller N, Knudsen JD, Espersen F. The Mouse peritonitis/sepsis model. In : Zak O, Sande MA, eds. *Handbook of Animal Models Infection*. 1st ed. London: Academic Press; 1999. p.127-36.
12. Jaber SM, Hankenson FC, Heng K, McKinstry-Wu A, Kelz MB, Marx JO. Dose regimens, variability, and complications associated with using repeat-bolus dosing to extend a surgical plane of anesthesia in laboratory mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2014; 53(6): 684–91.
13. Capcha JMC, Moreira RS, Rodrigues CE, Silveira MAD, Andrade L, Gomes SA. Using the cecal ligation and puncture model of sepsis to induce rats to multiple organ dysfunction. *Bio-protocol* 2021;11(7):e3979.
14. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JU, Rue III LW, Bland KI et al. Cecal ligation and puncture. *Shock*. 2005;24(Suppl.1):52-7.
15. Shrotri M, Peyton JC, Cheadle WG. Mouse peritonitis Model using cecal ligation and puncture. In : Zak O, Sande MA, eds. *Handbook of Animal Models Infection*. 1st ed. London: Academic Press; 1999. p.173-81.
16. Magnotti L, Deitch EA. Translocation of gut bacteria during trauma. In : Zak O, Sande MA, eds. *Handbook of Animal Models Infection*. 1st ed. London: Academic Press; 1999. p.213-21.
17. Buyné OR, Bleichordt RP, Verweij P, Groenewoud HMM, Godor H. A peritonitis model with low mortality and persisting intra-abdominal abscesses. *Int J Exp Pathol*. 2006;87(5):361-8.
18. Nebendahl K. Routes of administration. In: Krinke GJ, ed. *The laboratory rat (Handbook of Experimental Animals)* 1st Edition. London: Academic Press; 2000. p.463-82.
19. Onderdonk AB, Weinstein WM, Sullivan NM, Barlett JG, Gorbach SL. Experimental intra-abdominal abscesses in rats: quantitative bacteriology of infected animals. *Infection and Immunity* 1974;10(6):1256-9.
20. Murando F, Peloso A, Cobianchi L. Experimental abdominal sepsis: sticking to an awkward but still useful translational model. *Mediators of Inflammation* 2019; Article id:8971036
21. Wandall DA, Arpi M, Wandall JH. A rat model of non-lethal bacterial infection. *APMIS* 1997;105(3):187-91.
22. Matsushita T, Okuno S, Maezawa I, Ohshima S, Yamaguchi T, Sawada Y, et al. A new model of bacterial peritonitis in mice for evaluation of antibiotics. Effects of aspoxicillin and piperacilin. *Jpn J Antibiot*. 1986;42(4):887-95.
23. Brooke I. Intra-abdominal abscess. In: Zak O, Sande MA, eds. *Handbook of Animal Models Infection*. 1st ed. London: Academic Press; 1999. p.163-72.
24. Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nature Protocols*. 2009;4(1):31-6.
25. Ruiz S, Vardon-Bouines F, Merlet-Dupuy V, Conil JM, Buléon M, Fourcade O, et al. Sepsis modeling in mice: ligation length is a major severity factor in cecal ligation and puncture. *Intensive Care Medicine Experimental*. 2016;4:22.
26. Singleton KD, Wischmeyer PE. Distance of cecum ligated influences mortality, tumor necrosis factor- α and interleukin-6 expression following cecal ligation and puncture in the rat. *Eur Surg Res* 2003;35(6): 486-91.
27. Chen L, Cao D, Liu E, Xiao C, Xiong M, Kou Q. Rat Model of cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: comparative study for oxidative stress. *Advances in Infectious Diseases*, 2017; 7(3):80-92.
28. Traeger T, Koerner P, Kessler W, Cziupka K, Diedrich S, Busemann A, et al. Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP) - a Standardized model for polymicrobial abdominal sepsis. *J. Vis. Exp.* 2010; 46: e2299.
29. Maejima K, Deitch EA, Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tracts of rats receiving thermal injury. *Infection and Immunity* 1984;43(1):6-10.

DENEYSSEL MİKOLOJİK HAYVAN MODELLERİ

EXPERIMENTAL MYCOLOGICAL ANIMAL MODELS

Uzm. Dr. Tuba DEMİRCİ YILDIRIM

*İzmir Şehir Hastanesi, Romatoloji Uzmanı, Tel no:05062697271,
E-Posta:tubademirci87@gmail.com, ORCID: 0000-0003-3186-0591*

ÖZ

Tıp ve biyolojik araştırma projeleri kapsamında bazı deneyler etik, uygulama ve ekonomik sebeplerle insan üzerinde yapılamamaktadır. Böyle durumlarda hayvan modellerinin oluşturulması zorunludur. Enfeksiyon hayvan modeli seçiminde de insanda görülen patoloji ve semptomları en iyi taklit eden hayvan modeli tercih edilmelidir. Kitabımızın bu bölümünde mikolojik araştırmalar için hali hazırda literatürde yeri olan deneysel hayvan modelleri özetlenecektir.

Anahtar Sözcükler: Aspergilloz, mantar, hayvan modelleri

SUMMARY

Within the scope of medical and biological research projects, some experiments cannot be performed on humans for ethical, practical, and economic reasons. In such cases, it is necessary to create animal models. When choosing an infection animal model, the model that best mimics the pathology and symptoms seen in humans should be preferred. In this section of our book, experimental animal models that are already available in the literature for mycological research will be summarized.

Keywords: Aspergillosis, fungi, animal models

Giriş

Enfeksiyon hastalıklarında patogenezi, tedaviyi ve korunmayı araştırmada hayvan modellerinin yeri tartışılmazdır. Kitabımızın bu bölümünde sık görülen mikolojik etkenler için hali hazırda literatürde yeri olan deneysel hayvan modelleri derlenmiştir.

Dermatofitozun hayvan modeli

Dermatofitoz, insan ve hayvanların keratinize dokusunu istila eden dermatofitlerin neden olduğu yüzeysel mantar enfeksiyonudur (1). İnsan dermatofitozunun patofizyolojisini aydınlatmak ve antifungal ajan etkinliğini değerlendirmede tinea corporis, tinea pedis ve tinea unguium için dermatofitoz hayvan modeli kullanılarak çeşitli deneyler yapılmıştır.

Tinea corporis hayvan modeli, insanlardaki Tinea corporis'e temel olarak *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* ve *Microsporum canis* neden olur. Enfeksiyonun şiddeti değişkendir, lezyonlar genellikle keskin kenarlı, kabarık eritematöz veziküler sınırları olan halka ve pullu yamalar şeklindedir (2). İlk tinea corporis hayvan modeli oluşturma çabası 1908 yılında Block ve arkadaşlarına aittir (3). Modeli oluşturup günümüze temel oluşturan ise Sakai ve arkadaşlarıdır (4). Tinea corporis hayvan modelleri için horoz ibiği, fare, tavşan, tavuk, sıçan ve kobaylar kullanılmıştır (1).

Trichophyton mentagrophytes ile oluşturulmuş modellerde kobay derisi insana daha benzer özellikler sergilemiş fakat horoz ibiğinde mantar enfeksiyonunun gelişimi daha kolay olmuştur. Horoz ibiğinde oluşturulan enfeksiyonun tedavisi daha uzun sürmüştür (5). Köpek kaynaklı *Trichophyton mentagrophytes*' in intravenöz ya da perkütan yolla tavşanlara verilmesi ile oluşan cilt lezyonlarının aynı özellikte olduğu bildirilmiştir (6). Tinea için kobayların daha kullanılabilir ve tekrarlanabilir olduğu söylene de klinik belirtilerin ve patolojinin seyrinin insanlara benzememesi bir sorun olarak bildirilmiştir (7). Kobaylar üzerinde deriyi aşındırma yöntemi uygulanmadan oklüzyon ile az miktarda mantarla (100 spor/3,8 cm²) hayvan modeli yapılmıştır (8). *T. mentagrophytes* ile enfekte olmuş kobayların zaman içindeki değişikliklerin patofizyolojisi incelenerek tinea corporis modeli tanımlanmıştır. Aşılardan 4 ila 6 gün sonra eritem ve kırmızı papüller oluşmuş, ardından 7 ila 8 gün arasında trikofitine verilen reaksiyon pozitif hale gelmiş, bu durum *T. mentagrophytes*'e karşı hücrel bağışıklık oluştuğunu göstermiştir. Sonrasında eritem ve papüllerin boyutu giderek artarak birbiri ile kaynaşmıştır. 14-15. günde doruğa ulaşan lezyonlarda kalın pullu ve kabuklu, infiltratif plak benzeri eritem görülmüş, daha sonra bu döküntüler yavaş yavaş ortadan kaybolarak aşılardan sonraki 4 hafta içinde neredeyse kendiliğinden iyileşmiştir(9). Tedavi çalışmalarında ise oral ya da intravenöz (IV) verilen antifungaller lezyonların ortaya çıkış zamanında uygulanmış, bazı çalışmalarda terbinafinin gastrointestinal sistemden emilim süresi göz önünde bulundurularak, ilaçların farmakokinetiğine göre uygulanışı değişmiştir(10). Profilaksi çalışmalarında ise ilacın verilme süresi değişkenlik göstermiş, net bir zamanlama verilememiştir. Ayrıca kobaylarda tineanın kendiliğinden iyileşmesi de tedavi çalışmalarını zorlaştırmıştır (11).

Tinea pedis hayvan modeli, ayaklar özellikle de ayak tabanları ve parmak araları insanlarda tinea pedis'in en sık görüldüğü yerlerdir. En sık görülen klinik bulgu, dördüncü ve beşinci ayak parmakları arasındaki boşluklarda maserasyon, soyulma ve çatlaklarla kendini gösteren dermatittir. Veziküllerin, püstüllerin ve bazen de büllerin oluşumuyla karakterize edilen akut inflamatuvar bu duruma en sık *T. mentagrophytes* neden olur. *T. Rubrum*, *T. interdigitale* ve *E. Floccosum* ise Tinea pedis'indaha kronik etkenleridir (2). Kobay modelinde kâğıt disk ve bandaj yöntemi ile tinea pedis enfeksiyonu oluşturulmuştur (12). Lokal tedavilerinde denendiği tinea pedis hayvan modellerinde insan ve hayvan arasındaki mikolojik iyileşme oranı farkından dolayı klinik etkinlik net değerlendirilememiştir (13).

Tinea unguium hayvan modeli, insanlarda tırnak yatağının dermatofit tarafından infekte edilmesine tinea unguium adı verilir. Tinea unguium için tavşan ve kobaylar kullanılmıştır. Tinea unguium oluşturmak için *T. mentagrophytes* SM-110'un artrosporları 108^{spor} /mL'lik bir konsantrasyonda iki kâğıt disk mantar süspansiyonu oluşturularak kobayın arka pençe parmaklarının arasına (ikinci üçüncü ayak parmakları arasına ve üçüncü ve dördüncü ayak parmakları arasına) bir köpük ped ile uygulanmış ve ardından yapışkan elastik bantla sabitlenmiş, diskler 21 gün tutulduktan sonra çıkarılarak tedavi için lokal ve oral antifungal tedaviler uygulanmıştır. Çalışmaların sonuçlarında tinea unguium için lokal uygulanan topikal amorolfen ve terbinafinin etkisiz olduğu fakat oral terbinafinin uzun dönem uygulamada mantar yükünü azalttığı gösterilmiştir (14).

Aspergillozun hayvan modelleri

Aspergilloz, her yerde bulunan bir grup küf olan *Aspergillus* spp.'nin neden olduğu, hava yoluyla bulaşan bir mantar hastalığıdır. Şimdiye kadar yaklaşık 185 yaygın *Aspergillus* türü tanımlanmıştır. Bu hastalık hem insanlarda hem de hayvanlarda yüksek morbidite ve mortaliteye neden olur (15). İnsanlarda *Aspergillus* ile ilişkili hastalıklar, kronik lokalize aspergillomadan akut invaziv aspergilloza kadar geniş klinik spektrum gösterir (16). Aspergilloz için model olarak çeşitli memeli türleri kullanılmıştır; en sık olarak fareler, sıçanlar, kobaylar ve tavşanlar seçilmiştir. Ayrıca bazı araştırmacılar, inekler de dahil olmak üzere geleneksel olmayan laboratuvar türlerinde de deneysel aspergillozu tanımlamışlardır (17).

Deneysel aspergilloz hakkındaki yayınların %85'inden fazlasının odak noktası fare modelleridir (18). Çalışmalarda aspergillozu incelemek için 20'den fazla farklı fare suşu kullanılmış ve bunların hepsi enfeksiyona duyarlılık açısından önemli farklılıklar göstermiştir. Albino Swiss Webster ve CD1 gibi fare suşları özellikle terapötik analizler için kullanılmıştır (19). Kobaylar ve tavşanlar, invazif aspergillozun spesifik yönleri açısından insanlarla iyi bir korelasyon göstermiştir (20). Mantar endokarditini incelemek için kobaylar mantar keratit modelinde ise tavşanlar kullanılmıştır (21). Aspergilloz hayvan modeli için ilk önce immunsupresyon amacı ile tekrarlayan siklofosamid ve/veya steroid uygulamaları yapılır, bu uygulamanın genellikle 14. gününde immunsuprese hale gelen hayvan modeline oluşturulmak istenen aspergilloz enfeksiyon türüne göre intravenöz, intratekal, nebulizasyon ya da intranazal yol ile *Aspergillus conidia* uygulanır. Klinik belirtiler bu uygulamadan 48-72. saatte ortaya çıkmaya başlar. Aspergilloz oluşmuş hayvan modeli ilgili protokole göre incelenmeye başlar. Bu modeller üzerinde histopatoloji, mikolojik kültür, tedaviyi de içeren çalışmalar yapılabilir. Çalışmaların planına göre modeli oluşturacak Aspergilloz suşları da farklılık gösterebilir. Örneğin, daha düşük mortaliteye neden olan az virülan bir tür, hastalığın erken evresi sırasında ve hastalığın seyri boyunca çeşitli teşhis yöntemlerini incelemek için daha faydalıdır. Virülansı yüksek bir suş ise müdahale olmadan ölüm oranlarının neredeyse %100 olduğu klinik öncesi terapötik analizlerde genel sağkalımı değerlendirmek için daha uygundur (22). Aspergillozun hayvan modellerinden elde edilen bilgiler, bunların insanlarda ve hayvanlarda klinik enfeksiyonun anlaşılması ve tedavisinde faydalı olduğunu göstermektedir. Ancak halen en iyi deneysel metodolojiye ilişkin bir fikir birliği yoktur (18).

Candida enfeksiyonunun hayvan modelleri

Candida türleri her yerde bulunan mantar patojenleridir ve insanlarda mukozal ve invaziv mantar enfeksiyonlarının en yaygın nedenidir. Kandidiyazın önde gelen nedeni *Candida albicans*'dır. Candida için olan hayvan modelleri de anatomik ve immünolojik benzerlikleri, kolay kontrol edilebilir olmaları sebebiyle daha çok fare ve sıçan olarak seçilmiştir. Oral, gastrointestinal, vaginal candidiazis ve sistemik candidiazis için modeller oluşturulmuştur. Farelere lateral kuyruk venleri yoluyla *Candida albicans* süspansiyonu verilerek disemine candidiazis modeli geliştirilmiştir (23). Bu modellerde mortalite, böbrek-karaciğer-dalak gibi organların tutulumları-histopatolojileri incelenebilir, tedavi çalışmaları planlanabilir. Mukozal candidiazis hayvan modelleri ise *Candida albicans* muamele edilmiş swabların farelerin ağız

boşluklarına aşılması ile oluşturulmuştur. Mortal olmayan bu modelde virülans, mutant suşun hastalık yapma özelliği, immünomodülatör stratejiler ve anti-fungallerin etkinliği araştırılabilir (24).

Mukormikozun hayvan modelleri

Genel olarak mantar enfeksiyonlarına yönelik patogenezi anlamada ve yeni tedavi yaklaşımları geliştirmede çok önemli olmuştur. Bu özellikle görülme sıklığı düşük olan ancak genellikle ölümcül olan mukormikoz için geçerlidir. Klinik vakalarda en sık karşılaşılan *Rhizopus*, *Mucor* ve *Lichtheimia* cinsleridir. Her ne kadar mukormikoz diğer mantar enfeksiyonlarından nadir olsa da hastalığın klinik seyri sıklıkla hızla ilerler ve agresif tedaviye rağmen yüksek mortalite görülür (25). Literatürde mukormikoz hayvan modeli geliştirilmesinde fareler, sıçanlar, kobaylar ve tavşanlardan Asya manda buzağıları gibi daha egzotik türlere kadar çeşitli türler kullanılmıştır. Çalışmalar daha çok fare ve tavşanda yoğunlaşmıştır. Fareler ve tavşanlarda immunsupresyon, alkileyici ajan (siklofosfamid gibi) ya da kortizon-metilprednizolon ile oluşturulmuştur. Bazı modellerde streptozosin ya da alloxan ile diyabetik ketoasidoz oluşturularak deney hayvanları mukormikoza duyarlı hale getirilmiştir. Mukormikoz etkenleri ise fare ve tavşanlara pulmoner mukormikozu taklit etmek için burun içi, intratrakeal-endotrakeal yol ile verilmiştir (26,27). Verilen etkenler genellikle spor formda seçilmiştir. İmmünsupresyon veya ketoasidoz gibi risk faktörlerinin varlığında deney hayvanlarında verilen sporların akciğer lezyonu oluşturmaları kaçınılmaz olur. Bu lezyonlar histolojik olarak vasküler invazyon, intravasküler tromboz, koagülatif nekroz ve pulmoner kanama ile karakterizedir. Deneysel pulmoner mukormikoz oluşturulduktan sonra gelişmiş yaygın mukormikoz modelleri de vardır, fakat çalışmalar genellikle pulmoner mukormikoz aşamasında çeşitlenmiştir (28). İntravenöz olarak verilen sporların yayılımı ile geliştirilmiş hayvan modellerinin *Mucor* ve *Rhizopus* patogenezi ve terapötik yaklaşımların etkinliğini araştırmak için yararlı olduğu gösterilmiştir (29).

İnsanlarda rino-orbital mukormikozis paranazal sinüslerden kaynaklanır, burun ve sinüslerin yumuşak dokusunu etkiler. Rino-orbital mukormikoz tüm mukormikoz hastalarının %20-39'unu oluşturur (30). Bu yüksek orana rağmen hayvan modelinde lokal olarak bu enfeksiyon modelini oluşturmak zor olduğu için nadiren deneysel olarak incelenebilmiştir. Yine aynı şekilde deri mukormikozu için de model oluşturmak zordur. *Rhizopus'un* lokalize deri enfeksiyonu, diyabetik tavşanlarda ve sıçanlarda ve bağıışıklığı baskılanmış farelerde sporların deri altına enjeksiyonu yoluyla oluşturulmuştur (31). Memeli modelleri fizyolojik, anatomik ve immünolojik özellikleri ile insanlara benzerdir ancak etik ve pratik hususlar bunların büyük ölçekli tarama amaçları ve tür karşılaştırmaları için uygulanmasını sınırlamaktadır. Ayrıca, memeli modellerinin kullanılması, tüm araştırmacıların erişemeyeceği özel tesisler ve personel gerektirir. Bu nedenle enfeksiyon çalışmalarına daha az etik ve pratik kısıtlamalarla izin veren alternatif model konaklar geliştirilmiştir. Bunlar mukormikoz araştırmalarında alternatif omurgalı modelleri olarak zebra balığı ve embriyonlu tavuk yumurtası olarak örneklenebilir (32). Büyük balmumu güvesi *Galleria mellonella'nın* larvaları geleneksel olarak balıkçılık için yem olarak yetiştirilir, ancak son yıllarda mantar enfeksiyonlarını incelemek için bir model konakçı olarak kullanılmaktadır. Larvalara mantar inokülasyonu

yapıldıktan sonra larvaların hayatta kalmasına ek olarak, enfeksiyon sürecini karakterize etmek için mantar yükünün ölçümü, histopatoloji ve bağışıklık parametrelerinin analizi yapılabilmektedir (33). Meyve sineği *Drosophila melanogaster*ise mucor dahil olmak üzere çeşitli viral, bakteriyel ve fungal patojenler için mini konakçı olarak kullanılmıştır. Sinekler glukokortikoid uygulaması, genetik müdahale ile mukormikozise duyarlı hale getirilebilir. Model, sineklerin dorsal göğüs kafesinin belirli sayıda mikrop içeren bir süspansiyona batırılmış bir iğne ile delinmesiyle gerçekleştirilir. Sinekler üzerinde mukormikozisin virülansı ve antifungal stratejiler çalışılmıştır (34).

Mantarların patogenezi, virülans faktörlerini ve terapötik müdahalelerini incelemek için farklı enfeksiyon modelleri literatürde oluşturulmuştur. Hem pratik hem de teknik açıdan ve insanlarda mantar enfeksiyonlarının farklı tezahürlerinin ne kadar doğru bir şekilde taklit edildiğini incelemeye tüm modellerin avantajları ve dezavantajları vardır. Doğru modeli seçmek için, model konağınspesifik patofizyolojik özelliklerini, mantar ile ilişkili risk faktörlerini ve bunların modellenip modellenemeyeceğini/nasıl modellenebileceğini anlamak önemlidir.

KAYNAKLAR

1. Shimamura T, Kubota N, Shibuya K. Animal model of dermatophytosis. J Biomed Biotechnol. 2012; 2012:125384.
2. Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. Clin Microbiol Rev. 1995;8(2):240-59.
3. Bloch B. Zur lehre von den dermatomykosen. Archives of Dermatological Research. 1908;93(1-2):157-220.
4. Sakai S, Kada T, Saito G, Muraoka N, Takahashi Y. Studies on chemotherapy of trichophyton infection. 1. Antifungal properties of halogen phenol esters. Journal of the Scientific Research Institute. 1952; 46:113-7.
5. Sulzmann R, Weuffen W, Kramer A. Testing of antimycotically active substances on the model of experimental cockscomb dermatophytosis. 3. Comparative histological studies of mycosis foci of the cockscomb and of the back skin of the guinea pig. Mykosen. 1971;14(1):15-8.
6. Van Cutsem J, Janssen PA. Experimental systemic dermatophytosis. Journal of Investigative Dermatology. 1984;83(1):26-31.
7. Uchida K, Yamaguchi H. Preclinical therapeutic evaluation of agents for treating dermatophytosis. Japanese Journal of Medical Mycology. 1996;37(4):199-205.
8. Kerbs S, Greenberg J, Jesrani K. Temporal correlation of lymphocyte blastogenesis, skin test responses and erythema during dermatophyte infections. Clinical and Experimental Immunology. 1977;27(3):526-30.
9. Fujita S. Conditions required for successful experimental dermatophytosis and its histopathogenesis. Japanese Journal of Medical Mycology. 1992;33(2):115-25.
10. Ghannoum MA, Hossain MA, Long L, Mohamed S, Reyes G, Mukherjee PK. Evaluation of antifungal efficacy in an optimized animal model of Trichophyton mentagrophytes-dermatophytosis. Journal of Chemotherapy. 2004;16(2):139-44.
11. Tatsumi Y, Yokoo M, Arika T, Yamaguchi H. KP-103, a novel triazole derivative, is effective in preventing relapse and successfully treating experimental interdigital tinea pedis and tinea corporis in guinea pigs. Microbiology and Immunology. 2002;46(7):425-32.
12. Fujita S, Matsuyama T. Experimental tinea pedis induced by non-abrasive inoculation of Trichophyton mentagrophytes arthrospores on the plantar part of a guinea pig foot. Journal of Medical and Veterinary Mycology. 1987;25(4):203-13.
13. Watanabe S, Takahashi H, Nishikawa T, Takiuchi I, Higashi N, Nishimoto K, et al. A comparative clinical study between 2 weeks of luliconazole 1% cream treatment and 4 weeks of bifonazole 1% cream treatment for tinea pedis. Mycoses. 2006;49(3):236-41.

14. Tatsumi Y, Yokoo M, Senda H, Kakehi K. Therapeutic efficacy of topically applied KP-103 against experimental tinea unguium in guinea pigs in comparison with amorolfine and terbinafine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002;46(12):3797–801.
15. Desoubeaux G, Bailly É, Chandenier J. Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: updates and recommendations. *Med. Mal. Infect.* 2014;44(3):89–101.
16. Kousha M, Tadi R, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *Eur Respir Rev.* 2011;20(121):156–74.
17. Jensen HE, Styne D, Sarfati J, Latgé JP. Detection of galactomannan and the 18-kDa antigen from *Aspergillus fumigatus* in serum and urine from cattle with systemic aspergillosis. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1993;40:397–408.
18. Desoubeaux G, Cray C. Animal models of aspergillosis. *Comp Med.* 2018;68(2):109-23.
19. Barchiesi F, Santinelli A, Biscotti T, Greganti G, Giannini D, Manso E. Delay of antifungal therapy influences the outcome of invasive aspergillosis in experimental models of infection. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(8):2230–3.
20. Patterson TF. The future of animal models of invasive aspergillosis. *Med Mycol.* 2005;43 (Suppl 1):S115–S119.
21. Komadina TG, Wilkes TD, Shock JP, Ulmer WC, Jackson J, Bradsher RW. Treatment of *Aspergillus fumigatus* keratitis in rabbits with oral and topical ketoconazole. *Am J Ophthalmol* 1985;99(4):476–9.
22. Hanson LH, Clemons KV, Denning DW, Stevens DA. Efficacy of oral saperconazole in systemic murine aspergillosis. *J Med Vet Mycol.* 1995;33(5):311–7.
23. Clancy CJ, Cheng S, Nguyen MH. Animal models of candidiasis. *Methods Mol Biol.* 2009; 499:65-76.
24. Kamai Y, Kubota M, Kamai Y, Hosokawa T, Fukuoka T, Filler SG. Contribution of *Candida albicans* ALS1 to the pathogenesis of experimental oropharyngeal candidiasis. *Infect. Immun.* 2002;70:5256–8.
25. Petrikos G, Skiada A, Lortholary O, Roilides E, Walsh TJ, Kontoyiannis DP. Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis. *Clin. Infect. Dis.* 2012;54: S23–S34.
26. Lopez-Fernandez L, Sanchis M, Navarro-Rodriguez P, Nicolas FE, Silva-Franco F, Guarro J, et al. Understanding *Mucor circinelloides* pathogenesis by comparative genomics and phenotypical studies. *Virulence.* 2018; 9:707–20.
27. Reinhardt DJ, Licata I, Kaplan W, Ajello L, Chandler FW, Ellis JJ. Experimental cerebral zygomycosis in alloxan-diabetic rabbits: Variation in virulence among zygomycetes. *Sabouraudia.* 1981;19:245–56.
28. Schulze B, Rambach G, Schwartze VU, Voigt K, Schubert K, Speth C, Jacobsen ID. Ketoacidosis alone does not predispose to mucormycosis by Lichtheimia in a murine pulmonary infection model. *Virulence.* 2017; 8(8):1657–67.
29. Liu M, Lin L, Gebremariam T, Luo G, Skory CD, French SW, et al. Fob1 and Fob2 Proteins Are Virulence Determinants of *Rhizopus oryzae* via Facilitating Iron Uptake from Ferrioxamine. *PLoS Pathog.* 2015;11: e1004842.
30. Skiada A, Pagano L, Groll A, Zimmerli S, Dupont B, Lagrou K, et al. in Europe: Analysis of 230 cases accrued by the registry of the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Working Group on Zygomycosis between 2005 and 2007. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011; 17:1859–67.
31. Lewis RE, Ben-Ami R, Best L, Albert N, Walsh TJ, Kontoyiannis DP. Tacrolimus enhances the potency of posaconazole against *Rhizopus oryzae* in vitro and in an experimental model of mucormycosis. *J. Infect. Dis.* 2013; 207:834–41.
32. Jacobsen ID. Animal Models to Study Mucormycosis. *J Fungi (Basel).* 2019;5(2):27.
33. Trevijano-Contador N., Zaragoza O. Immune response of *Galleria mellonella* against human fungal pathogens. *J. Fungi (Basel)* 2018; 5:3.
34. Wurster S, Lewis RE, Albert ND, Kontoyiannis DP. Preexposure to isavuconazole increases the virulence of mucorales but not *Aspergillus fumigatus* in a *Drosophila melanogaster* infection model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2019;63:e01896-18.

PARAZİTOLOJİDE HAYVAN MODELLERİ

ANIMAL MODELS IN PARASITOLOGY

Prof. Dr. Ahmet ÖZBİLGİN¹, Dr. İbrahim ÇAVUŞ², Dr. Öğr. Üyesi Yener ÖZEL³

¹ Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Ana Bilim Dalı
Tel no:05321343531, E-posta:a.ozbilgin@yahoo.com,ORCID:0000-0003-3613-8741

² Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Ana Bilim Dalı
Tel no:05053181491, E-posta:icvs26@yahoo.com, ORCID:0000-0002-3860-0146

³ Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Tel no:05443257352
E-Posta:yener_ozel@hotmail.com;ORCID:0000-0001-6618-8251

ÖZ

Parazit, yaşamının bir kısmını veya tamamını başka bir canlının vücudu üzerinde veya içerisinde geçiren ve yerleştiği canlıya daima zarar veren organizmalardır. Parazit, konak ve parazit-konak ilişkisini inceleyen parazitoloji bilim dalı içerisinde parazitolojik hastalıkların tanı, tedavi, fizyopatolojik ve biyokimyasal özelliklerini incelemek amacı ile hastalıkların deney hayvanı modelleri oluşturulmaktadır. Parazitolojide kullanılan deney hayvanı modellerinin büyük bir kısmı *Mus musculus* cinsi beyaz fareler oluşturmaktadır. Dünyada ve Türkiye’de insan sağlığı açısından önemli halk sağlığı problemlerinden olan leishmaniasis, sıtma, toxoplasmosis ve helmintiosis gibi hastalıkların daha iyi anlaşılabilmesi, bu hastalıklar için geliştirilen tanı kitlerinin, tedavi yöntemlerinin ve aşı çalışmalarının daha sağlıklı ilerlemesi için yapılan in vivo çalışmalarda deney hayvanı modelleri oluşturulmaktadır. Bu bölümde, önemli protozoon ve helmint kaynaklı enfeksiyonların araştırılması için kullanılacak deney hayvanı modellerinin nasıl oluşturulması gerektiği ile ilgili bilgiler verilecektir.

Anahtar Sözcükler: Deney hayvanı, parazitoloji, protozooloji, helmintoloji

SUMMARY

Parasites are organisms that spend part or all of their lives on or in the body of another living creature, invariably causing harm to the host organism. Experimental animal models of diseases are created to examine the diagnosis, treatment, physiopathological, and biochemical properties of parasitological diseases within the field of parasitology, which investigates the parasite, host, and parasite-host relationship. The most commonly used experimental animal models in parasitology are white mice of the genus *Mus musculus*. These models are employed in in vivo studies to gain a better understanding of diseases such as leishmaniasis, malaria, toxoplasmosis, and helminthiasis, which pose significant public health concerns globally, including in Turkey. They also contribute to the improvement of diagnostic kits, treatment methods, and vaccine studies developed for these diseases. This chapter provides information on creating experimental animal models to investigate important protozoan and helminth infections.

Keywords: Experimental animal, parasitology, protozoology, helminthology

GİRİŞ

Parazitoloji laboratuvarlarında parazitlerin virülansı, fizyopatolojisi, tanı, tedavi ve korunma yöntemleri, ilaç denemeleri, biyokimyasal özelliklerinin araştırılması, immunolojik ve serolojik alanda birçok konunun aydınlatılmasında hayvan modellerinden yararlanılmaktadır.

Kanser tedavisi, organ transplantasyonu gibi immun sistemi baskılayan tedaviler ve son yıllarda artan AIDS vakaları sonucu ortaya çıkan fırsatçıparazit infeksiyonları ile ilgili yeni ilaçların geliştirilmesi, yeni parazitlerintanı ve antiparazitolojiktedavide hayvan modellerinin kullanılması, son yıllarda önemli yer tutmaktadır. Bu tür çalışmaların tümünde öncelikle akılda tutulması gerekenler modellerin ahlaki değerlere ve etik kurallara uygun olmasıdır.

Deney hayvanlarının parazitolojide kullanımı iki ana başlık altında toplanabilir.

- A.** Enfeksiyon modeli olarak deney hayvanlarının kullanımı, biyokimyasal özellikler, virülans, fizyopatoloji, immünoloji, seroloji, yeni ilaç veya tedavi denemeleri ve korunma gibi alanlarda kendine yer bulmaktadır. İnsan üzerinde yapılacak klinik çalışmalar ancak deney hayvanı modellerinden alınacak başarılı sonuçlar ile başlayabilmektedir.
- B.** Hayvan modellerinin kullanıldığı çalışmalar sayesinde yeni geliştirilen tanı yöntemlerinin özgüllük ve duyarlılığı saptanabilmekte, en azından ön sonuçlar alınabilmekte, hangi dokunun ve bu dokuda hangi yöntemin tercih edilmesi gerektiği konusunda yol gösterici sonuçlar alınmakta, güvenle tanı konabilecek en düşük organizma miktarı tanımlanabilmektedir.

Hayvan modellerinin genel avantajlarını şu şekilde sıralayabiliriz. Hayvan modellerinin kullanıldığı araştırmaların süresi kısa, maliyeti düşük, riskleri azdır. Hayvan çalışmaları birbirine eşdeğer pek çok canlı ile aynı anda çalışma olanağı sunar. Bu şekilde, güvenilir değerlilikte ve istatistiksel olarak yeterli sayıda veri elde edilebilmiş olur. Enfeksiyonun başlangıcı bilindiği için yapılacak gözlemler ve bulgularla enfeksiyonun kronolojik ilişkisi daha sağlıklı yapılır. Deney hayvanları, insanlarda araştırılması mümkün olmayan, morbiditesi ve mortalitesi yüksek hastalıklarla çalışma olanağı sağlar. İnsan çalışmalarında çoğu kez oluşturulması güç olan değişkenlerin kontrolü, hayvan modeli ile gerçekleştirilebilir. Böylece deneyin sonucunun, etken-konak arasındaki ilişkilere mi, yoksa araya giren diğer pek çok parametreye mi bağlı olduğu anlaşılabilir. Ayrıca deney hayvanlarında, insanlarda nadir ortaya çıkan enfeksiyonlarda rahatlıkla çalışılabilir.

Hayvan modellerinin yukarıda belirtilen avantajlarının yanı sıra çeşitli dezavantajları da vardır. Hayvan modeli oluşturulan bir enfeksiyonun mekanizması hakkında doğru bilgi sahibi olmak için patofizyolojik bulgular ve kliniğinin insan enfeksiyonlarına benzer olması gereklidir. Doğal enfeksiyonlardagenetik olarak farklı parazitler ve kökenler yine genetik olarak farklı insanları enfekte ederken, deneysel modeldegenellikle tek tip bir parazit genellikle birbirinin eşdeğeri olan hayvanları enfekte eder ve bunun sonucunda doğallıktan uzaklaşma gerçekleşebilir. Bazı hayvanların genetik yapıları ve farklı konak yanıtları, araştırmanın sonucunu önemli ölçüde etkileyebilir. Hayvan temini ve bakımı da zor ve zahmetlidir.

Planlanan tüm çalışmalar mutlaka etik sınırlar içerisinde ve etik kurulların denetiminde yapılmalıdır. Etik kurulların ortak özelliğini 3R kuramına dayanmasıdır. Bunlar sırasıyla,

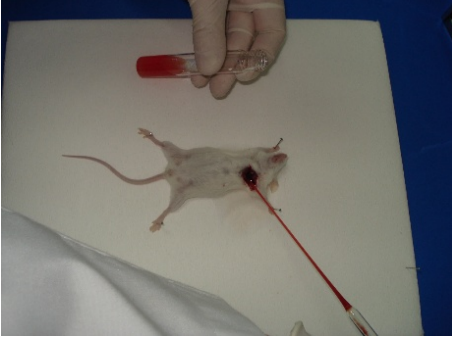
- a. Reduction (azaltma): Deneylerde yersiz hayvan kullanımını ve kaybedilmesini önleyip mümkün olduğu kadar az hayvan kullanılarak en iyi sonuca varmayı önermektedir.
- b. Replacement (yerine bir şey koyma): Eğer mümkünse çalışmanın deney hayvanı üzerinde değil de alternatif yöntemlerle yapılmasını önermektedir.
- c. Refinement (Hayvan rahatının sağlanması): Hayvanların doğumlarından deney bitimine kadar kullanıldığı süreçte en iyi koşullar içinde bulundurulmaları gerekir. Beslenme, sağlık, yaşanılan ortamın ısı, ışık, nem, havalandırma düzeyi, o türe uygun olmalıdır. Hayvanların hangi yaşta hangi alandaki kafese en fazla kaçır adet konacakları dahi belirlenmiştir (1).

Üretimde ve deneylerde çalışanlar, deney hayvanlarından ve bu amaçla kullanılan her türlü araçtan gelebilecek riskleri öğrenmeli ve onlara karşı önlemlerini almalıdırlar. Bunlar kafes veya kapaklarının batması, kesmesi, çizmesi, hayvanların ısırması, tırmalaması sonucu oluşan fiziksel zararlar, oluşabilecek zoonozlar, kullanılan kimyasal ve biyolojik maddeler ve onların metabolitlerinin bulaşması olabilmektedir.

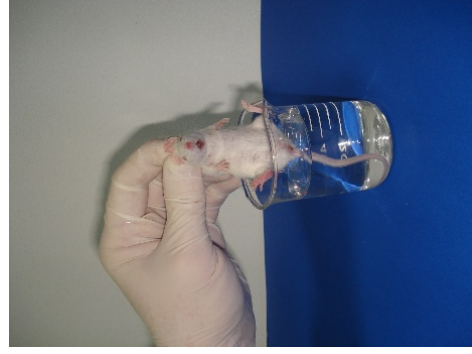
Sıtma

Günümüzde laboratuvarlarda sıtma modelleri oluşturmak için kemirgen sıtma etkeni *Plasmodium (P) yoelii* ve *P.berghei* yaygın olarak kullanılmaktadır. Sıtma için oluşturulan deney hayvanı modellerinde tercihen Balb/c cinsi 25-30gr ağırlığında 2-4 aylık beyaz fareler kullanılmaktadır.

Sıtma modeli oluşturmak için sıvı azotta muhafaza edilen *P. bergheiveya P. yoelii* izolatu, sıvı azottan çıkarılarak 37°C'lik su banyosunda çözünmesi için iki dakika bekletilmelidir. Çözünen izolat 5 mL RPMI-1640 besiyeri içeren tüpün içeresine aktarılır ve 2 dk 2000 rpm'de santrifüj edilmelidir. Santrifüj sonrası dipte kalan pellet üzerine 5 mL RPMI-1640 besiyeri eklenerek yapılan yıkama işlemi üç kez tekrar edilmelidir. Son santrifüj sonunda dipte kalan pellet üzerine 500 µL besiyeri eklenerek homojen süspansiyon elde edene kadar hafifçe karıştırılmalıdır. Elde edilen süspansiyon donör olarak kullanılacak 1-2 fareye intraperitoneal olarak verilmelidir. Enfekte edilen farelerin parazitemi durumlarını takip etmek için 15 gün boyunca gūnaşırı kuyruk ucundan kan alınarak ince yayma preparatları incelenmelidir. Parazitemi oranı %30 olan enfekte fareden koltuk altı veni kesilerek alınan ve enfeksiyon oranı 10^7 /mLP. *Bergheiveya P. yoelii* izolatu olarak seyreltilen kandan her fareye 0.25 mL (2.5×10^7 adet *P.bergheiveya P. yoelii*) kuyruk veninden intravenöz (IV) olarak verilmelidir. *P.bergheii* aynı miktarda peritondan verilebilir. Enjeksiyondan sonra iki gün ara ile farelerin kuyruk ucu kesilerek alınan kandan yapılan preparatlarda sıtmaenfeksiyon yüzdeleri saptanarakparazitemi izlenmeli ve *P. begheii*'de yedi gūnde, *P.yoelii*'de ise 12 gūnde bir pasaj yapılarak suşun canlılığı sürdürülmelidir (Resim 1-13) (2-6). Parazitemi yüzdesi “%parazitemi= (enfekte eritrosit/toplam eritrosit) x 100” formülü kullanılarak hesaplanmalıdır.⁷



Resim 1. Farenin koltuk altından enfekte kanın alınması



Resim 2. Fare kuyruk damarının vazodilasyonu



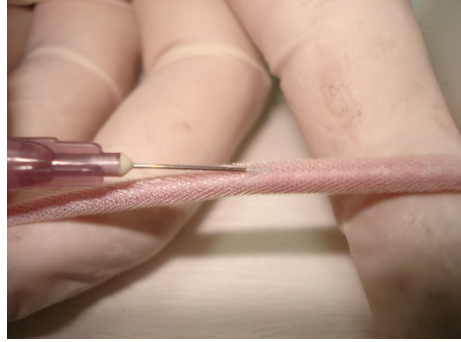
Resim 3-4. İntravenöz enjeksiyon için farenin hazırlanması



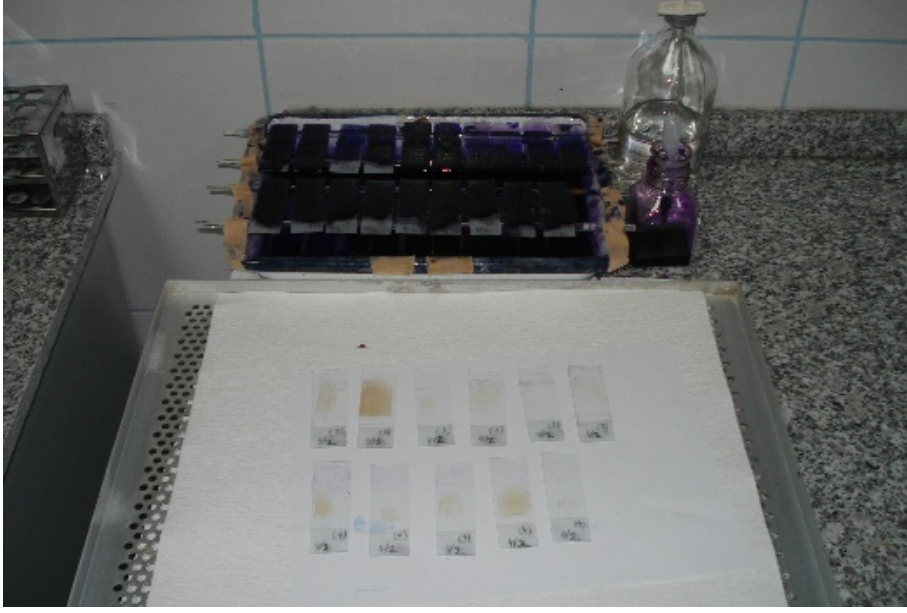
Resim 5-6. *P. berghei* /*P.yoelii* IV enfeksiyonu



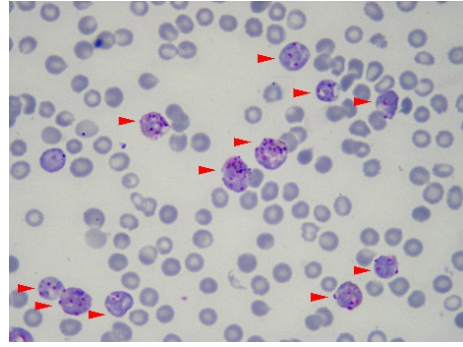
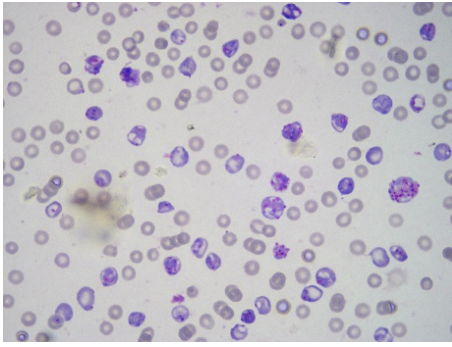
Resim 7. Fareden kan alınması



Resim 8. İnce yayma preparatların hazırlanması



Resim 9. İnce yayma preparatlarının Giemsa ile boyanması



Resim 10-11. Giemsa ile boyalı ince yayma preparatlarında *Plasmodium* formları



Resim 12-13. Etken madde veya aday ilacın gavaj yardımıyla fareye verilmesi

Leishmaniasis

Leishmaniasis modeli oluşturmak için, kutanöz leishmaniasisli hastanın lezyon biyopsisinin yada visseralleishmaniasisli hastanın kemik iliği aspirasyon sıvısının NNN besiyerine ekimi sonucu üreyen *Leishmani* parazitinin promastigot formu kullanılmaktadır (Resim 14,15,26).

NNN besiyerinde üreyen ve daha sonra bol miktarda üremesi için RPMI-1640 besiyerine aktarılan promastigotlar, 10 mL kültür sıvısının 1500 devirde 10 dakika santrifüjlenip, dipte kalan çökeltinin steril serum fizyolojik ile üç kez yıkanması ile elde edilmektedir. Mikroskopta sayılarak promastigot süspansiyonunun son konsantrasyonu 1×10^8 promastigot /mL olacak şekilde ayarlanmalıdır.⁸

a- Kutanöz Leishmaniasis

Kutanöz leishmaniasis modeli oluştururken Balb/c cinsi 25-30gr ağırlığında 2-4 aylık beyaz farelerin sol ayak tabanlarına intradermal yolla 15 μ L *L. tropica* promastigot süspansiyonu enjekte edilmelidir. İnokülasyonun 2. haftasında ayak tabanında kızarıklık ve şişme olan farelerin lezyonlarının genişliği ve deriden yüksekliği mikrometrik ölçüm aleti ile haftalık olarak ölçülerek lezyon takip edilmelidir. Sağlam doku sınırından tüberkülin enjeksiyonu ile serum fizyolojik verilip aspire edilerek alınan örneklerden NNN besiyerlerine ekim yapılarak, yayma preparat hazırlanıp Giemsa ile boyanıp incelenerek *Leishmania* amastigotlarının varlığı araştırılmalıdır (Resim 16-20, 25).

b- Visseral Leishmaniasis

Visseral leishmaniasis modeli oluştururken Balb/c cinsi 25-30gr ağırlığında 2-4 aylık beyaz farelerin kuyruk veninden intravenöz olarak *L. infantum* promastigot süspansiyonu 15 μ L verilmelidir. Farelere promastigotların verilmesinden 30 gün sonra otopsi yapılarak karaciğer ile dalakları çıkarılıp örnekler NNN besiyerlerine ekim yapılmalı, yayma preparat hazırlanmalı ve Giemsa ile boyanıp incelenerek *Leishmania* amastigotlarının varlığı araştırılmalıdır.

Oluşturulan bu modellerde etken madde taramaları da yapılabilir (Resim 14-27) (9-11).



Resim 14. Kutanöz leishmaniasisli hastadan örnek alımı



Resim 15. Visseral leishmaniasisli hastadan kemik iliği aspirasyonu



Resim 16-17. Fare ayak tabanına intradermal yolla *Leishmaniaspp* enfeksiyonu



Resim 18-19. Fare ayak tabanında oluşturulan kutanöz leishmaniasis modeli



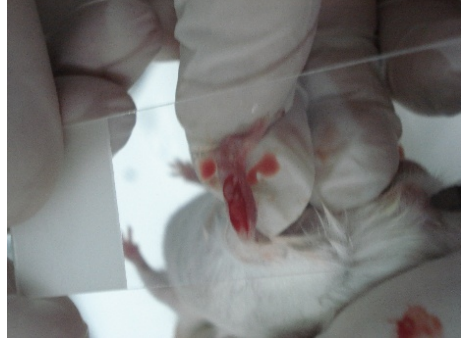
Resim 20. Fare ayak tabanından serum fizyolojik verilip aspire edilerek örnek alınması



Resim 21. Fare ayak tabanından touch preparat hazırlanması



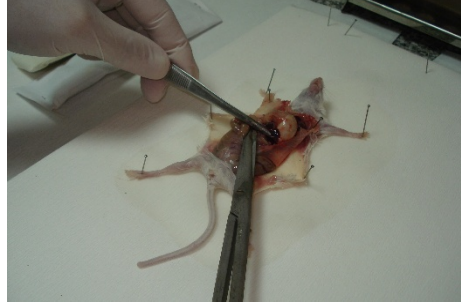
Resim 22. İntravenöz yolla *Leishmaniaspp* enjeksiyonu



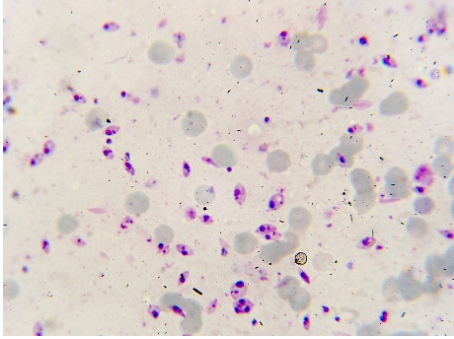
Resim 23. Farede visseralleishmaniasis modeli



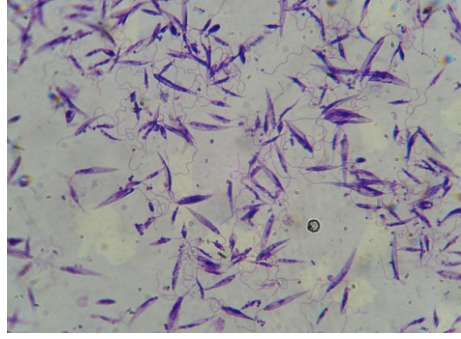
Resim 24. Fare karaciğer örneğinin alınması



Resim 25. Fare dalak örneğinin alınması



Resim 26. Giemsa boyalı yaymada *Leishmania* spp. promastigot formu



Resim 27. Giemsa boyalı yaymada *Leishmanias* pppromastigot formu

Toxoplasmosis

Toxoplasmosis deney hayvanı modeli oluştururken Balb/c cinsi 25-30gr ağırlığında 2-4 aylık beyaz fareler kullanılır. Enfeksiyon için mikroskopun 40'lık büyütmesinde her sahada 4-5 adet takizoit görülen süspansiyondan 22 G bir iğne ile 0.2-1.0 mL arasında deney hayvanına intraperitoneal enjeksiyon uygulanır. Enjeksiyondan 5-6 gün sonra deney hayvanı sakrifiye edilerek periton sıvısı toplanır. Toplanan periton sıvısı mikroskopta kontrol edildikten sonra yeni pasajlar yapılmalıdır (Resim 28-33) (12).

Sonuç olarak; etik ve bilimsel kurallara uygun olarak planlanan ve uygulanan hayvan modellerinin, parazitolojinin birçok alanına büyük katkıları olmaktadır.



Resim 28. Farenin *Toxoplasma gondii* takizoitleri ile intraperitoneal enjeksiyonu



Resim 29. Farenin hazırlanması



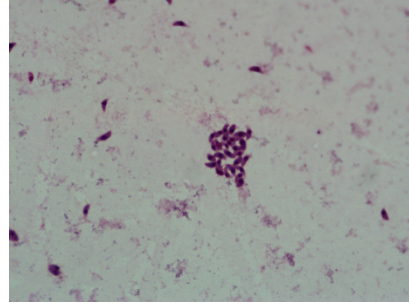
Resim 30. Fare peritonunun açılması



Resim 31. Fareden periton sıvısının alınması



Resim 32. Alınan periton sıvısının tüpe aktarılması



Resim 33. Periton sıvısından yapılan yaymada Giemsa boyalı *Toxoplasma gondii* takozoitleri

TREMATODLARDA HAYVAN MODELİ

Schistosoma Türlerinde Hayvan Modeli

Fare Modeli

Schistosoma türlerine karşı alternatif ilaç adayı moleküllerin ya da kimyasalların araştırılması için en iyi küçük hayvan modeli yetişkin fareler olarak kabul edilmektedir. Fareler, primat kullanımını gerektirmediği için potansiyel veya gerçek şistozomisitlerle ilgili yapılan çok sayıda araştırmada kullanılmıştır (13-20). Laboratuvarında şistozomların üretilmesi ve bunlara karşı çeşitli bileşiklerin test edilmesine yönelik en kapsamlı inceleme, Pellegrino ve Katz tarafından bildirilmiştir, ancak Lee ve Lewert ve Fransden tarafından yapılanlar incelemeler de bulunmaktadır (21-23).

Fare Enfeksiyonu

Enfeksiyon için kullanılan serkarya sayısı, farelerin yaşına, cinsine ve enfeksiyonun veriliş yoluna bağlı olarak değişmekle birlikte sıklıkla 100-130 civarındadır. Ancak fare başına verilen serkarya sayısı genellikle 200'ü geçmemelidir.

- Serkaryaların, enfeksiyon sırasında zarar görmesini önlemek için, geniş çaplı bir iğne ucu kullanılarak intraperitoneal olarak enjekte edilmesi önerilmektedir. Farelerin *Schistosoma japonicum* ile enfekte edilmesinde enjeksiyon kullanımı ile ilgili bilgiler, Moloney ve Webbe tarafından tarif edilmiştir (24).

- b) Farelere anestezi madde olarak barbitürat enjekte edilir. Farelerin karınları traşlanır ve bu kısma paslanmaz çelik bir halka yerleştirilir. Sarkaryalar, bu halka içine pipetlenir ve yaklaşık 20 dakika burada tutulur (25).
- c) Fareler içi su dolu bir kaba alınır ve sığ suda yüzmeleri sağlanır. Bu aşamada, dışkı ve idrar gibi sarkaryaya zarar verebilecek süreçler tamamlanmış olur. Fareler daha sonra tek tek, içinde sarkarya bulunan, uygun şekilde havalandırılmış ve su dolu kaplara aktararak 20 dakika suda yüzmeleri sağlanır (26).
- d) İçinde sarkarya bulunan bir test tüpüne farenin kuyruğu sokularak ve en az 30 dakika bekletilerek fareler enfekte edilir (25). Bu aşamada farelere anestezi uygulanabilir veya bir tutucu kullanılabilir (21,28,29).

Perkütan enfeksiyon yolunun tercih edildiği durumlarda, kafes içinde bulunan talaşlardaki yağlar derideki sarkariyal penetrasyona engel olabileceği için, enfeksiyondan önce farelerin yumuşak ağaç talaşları üzerinde tutulmaması önerilmektedir.

SESTODLARDA HAYVAN MODELİ

Echinococcusgranulosus Hayvan Modelleri

Mevcut Hayvan Modelleri

Echinococcus spp'nin metasesodları düşük konak özgülüğü göstermesi nedeniyle, çok çeşitli memeli türlerinde doğal ara konak olarak yerleşebilmektedir (30). Bu nedenle, deneysel enfeksiyon modelleri için çok çeşitli hayvanlar kullanılmıştır. İnsanlarda yerleşen kistlerde kısmen bir büyüme görülmesi nedeniyle, kemirgenlerde oluşturulan deneysel enfeksiyonlar, insan ekinokokozu için tatmin edici modeller olarak kabul edilmemektedir. Ayrıca, iki konaklı yaşam döngüsü nedeniyle, enfeksiyon durumunu ve hastalığın erken gelişimini modellemek için *Echinococcus* yumurtalarının kemirgenlere oral yoldan verilmesi gerekli olmaktadır. Yumurta kaynaklı laboratuvar bulaş riskini ortadan kaldırmak için, oral enfeksiyon yolu genellikle metacesoda materyalinin (ikincil ekinokokoz) intraperitoneal verilmesi ile değiştirilmektedir. Söz konusu model için çeşitli hayvan türleri ve enfeksiyon yolları tarif edilmiştir. Kesin konakların (köpekler, kediler ve diğer etoburlar) deneysel enfeksiyonları burada dikkate alınmamaktadır (31).

Oral Enfeksiyon

Sporadik olarak diğer memeliler çeşitli amaçlarla enfekte edilmiş olsada, bu enfeksiyon yolu koyunlarda rutin olarak gerçekleştirilmektedir. Model olarak maymunlarla (vervetler ve babunlar) yapılan çalışmalar, enfeksiyon oranları ve yoğunluğundaki büyük farklılıklar nedeniyle tamamen standart değildir. Kemirgen modeli oluşturmak için çok az çalışma yapılmıştır: çeşitli fare türlerine (*Mus musculus*), yumurtalar ağızdan verilmek yerine yapay olarak yumurtadan çıkarılıp, enfektif hale getirilip intraperitoneal veya intravenöz olarak enjekte edildiğinde, kendi kendine iyileşen ve tatmin edici olmayan enfeksiyonlar ile karşılaşmıştır. Literatürde uygulanan tüm çalışmalarda, deneysel olarak enfekte edilmiş köpeklerden alınan yumurtaların kullanıldığı ve enfeksiyon dozunun hayvan başına 500 ile 9000 yumurta arasında değiştiği görülmüştür.

Intraperitoneal Enfeksiyon

Kemirgenlerde kistik ekinokokkoz oluşturmak için en yaygın kullanılan teknik periton içine protoskoleks enjeksiyonudur. Çalışmalarda model olarak çeşitli fare türleri (*M. musculus*) ve Moğol gerbilleri (*Merionesunguiculatus*) kullanılmıştır. Hidatik kistler genellikle periton boşluğunda serbest olarak gelişir, ancak komşu organlara yapışabilir veya büyüyebilir. Büyüme yavaştır; BALB/C faresinde, 15 ay sonra sadece birkaç kist >20 mm çapa ulaşır. O zaman bile, çoğu kist steril kalabilmektedir. *In vitro* olarak kültürlen kistlerin intraperitoneal implantasyonu ile modelde enfeksiyonun daha hızlı bir gelişme gösterdiği bildirilmiştir (32). İkinci teknik, diğer kaynaklardan gelen kistlerin canlılığını test etmek ve farelerde steril kistlerin seri pasajı için de kullanılmıştır. Genel olarak, fare türünün, parazit türünün ve enfeksiyon için kullanılan malzemenin durumunun, enfeksiyon gelişimi üzerindeki etkisi hakkında çok az somut bilgi bulunmaktadır. Laboratuvar hayvanlarında protoskoleks oluşumu zayıf olduğundan veya bulunmadığından, enfeksiyon için protoskoleksler genellikle küçükbaş, at veya sığır kaynaklı kistlerden elde edilmektedir. Çoğu araştırmacı tarafından kullanılan enfeksiyon dozları genellikle 2000-5000 protoskoleks arasında değişmektedir (33). Sekonder ekinokokkoz oluşturmak için protoskolekslerin rolüne ilişkin bilgiler, Gottstein ve ark. tarafından açıklanmıştır (34).

NEMATODLARDA HAYVAN MODELİ

Kancalı Kurtlar için (*Necatoramericanus* ve *Ancylostomaceylanicum*) Hayvan Modeli

Modelin Arka Planı

Kancalı kurt enfeksiyonları için çeşitli hayvan modelleri araştırılmıştır (35). Hamster, deneysel kemoterapi çalışmaları için ilk tercih edilen kemirgendir. Hedef parazit türleri hamsterde rahatlıkla araştırılabilmekte ve laboratuvarında sürekli bir döngüde canlı tutulabilmektedir.

Konak

Hem outbred hem de inbred hamsterler konak olarak kullanılabilir. *N. americanus* enfeksiyonları için genç hayvanlar kullanılmakta olup deneyler için yeterli sayıda hayvan elde etmek için eş zamanlı üretim gerekmektedir. Yetişkin hamsterler *A. ceylanicum* ile enfekte olabilmektedir. Erkek ve dişi hamsterler her iki parazit türü için de kullanılabilir. Hamsterlar, yiyecek (standart hamster yemi) ve su için standart laboratuvar koşullarında *ad libitum* olarak tutulmaktadır.

Parazitler

Kancalı kurt-hamster modelinin önemli bir yönü, hamstere özelleşmiş *N. americanus* ve *A. ceylanicum* suşlarının mevcut olmasıdır (35). Bu suşlar, doğal konakta yerleşen vahşi tür suşlar kadar doğurgan olmasa da, her ikisi de hamsterde, yumurtadan yetişkin bireye kadar tam gelişim göstermektedir. *N. americanus* enfeksiyondan yaklaşık altı hafta sonra enfekte hamsterin dışkısında yumurtalar görülmeye başlar; *A. ceylanicum*'da ise enfeksiyondan yaklaşık iki hafta sonra yumurtalar ortaya çıkmaktadır. Yumurtalar fertildir ve enfeksiyonun

laboratuvarında sürdürülmesi için enfekte hamsterlerin dışkılarından elde edilen yumurtalar enfektif larva aşamasına (L) kadar kültürlenebilir. Yetişkin parazitlerin miktarı, zamanla azalsa da, ince bağırsakta bir yıldan fazla kalabilmektedir.

Antihelmintik Çalışmalar

N. americanus ve *A. ceylanicum* ile oluşturulan hamster modelleri hakkında detaylı çalışmalar literatürde mevcuttur (36,37).

Necator americanus

Yavru hamsterler (1-3 günlük), 100-500 arası enfektif tip larva ile perkütan yolla enfekte edilerek 21 günlük olana kadar annenin bakımına bırakılmaktadır. Olgunlaşmamış solucanlar üzerindeki ilaç etkileri, enfeksiyon sonrası beş haftalık tedavi sonunda izlenebilir hale gelmektedir. Yetişkin parazitlere karşı test edilen ilaçların değerlendirilmesi için enfeksiyondan sonra 50 günlük bir süre geçmesi gerekmektedir. Enfeksiyon oluşumu doğrulamak ve tedavi edilmeyen kontrol hayvanlarında beklenen parazit yükünün görülmesi için tedaviden önce birkaç enfekte hayvan kurbanı edilmelidir. İlaçlar oral olarak tekli veya çoklu dozlarda (3 güne kadar) uygulanabilir. Hamsterlere tedaviden 2-3 gün sonra otopsi yapılır; ince bağırsak çıkarılır, açılır ve kancalı kurtlar, diseksiyon mikroskobu altında sayılmak üzere bir petri kabına alınır. Olgunlaşmamış solucanlar, kemoterapiye yetişkin parazit kadar duyarlıdır (38,39). Parazitin olgunlaşmamış aşamalarında, %90-95 klirensi sağlamak için tek doz 20 mg/kg pyrantel ve 15 mg/kg mebendazol gerekmektedir. Pyrantel, yetişkin solucanlara karşı da benzer bir etki sergilemiştir, %90 klirens için sadece 5 mg/kg mebendazol yeterli olmuştur. *N. americanus*'a karşı güçlü etkinlik için tek doz 7,5 mg/kg ivermektin gerekmektedir. Bu göreceli etki eksikliği, ivermektinin diğer konaklara kıyasla bu türe karşı nispeten zayıf aktivitesini yansıtmaktadır. Thiobendazol, parazitin olgunlaşmamış aşamalarına karşı yüksek miktarda tek doz (700 mg/kg) veya tekrarlanan (2x500 mg/kg) dozlarda etkinlik göstermiştir. Bepheniumun, çeşitli konaklarda kancalı kurtlara karşı aktiviteye sahip olduğu bilinmekle birlikte (çok zayıf bir etkiyle), hamster modelinde 2 veya 3 ardışık günlük doz halinde verildiğinde (sırasıyla günde 400 veya 200 mg/kg) etkili olduğu gösterilmiştir.

Ancylostomacanthum

Yetişkin hamsterler (8-12 haftalık), 21G küt bir iğne kullanılarak oral sonda ile enfekte edilir. Hayvan, enfeksiyonu başlatmak için tipik olarak 50-150 arası enfektif larva yeterli olmaktadır. İlaç tedavisi, enfeksiyondan yaklaşık 18 gün sonra başlayarak erişkin formlar için değerlendirilebilir. Bileşiklerin subkütan ve oral yoldan verilmesi uygun seçeneklerdir. Nekropsi, tedaviden 3-7 gün sonraya planlanabilir. Denenen ilaçların ya da bileşiklerin etkinliği, bağırsakta kalan solucanlar sayılarak belirlenmektedir. Bu modelde, ivermektinin *N. americanus*'a kıyasla, *A. ceylanicum* için yaklaşık 300 kat daha etkili olduğu gösterilmiştir (40). *In vitro* çalışmalarda her iki parazit için benzer duyarlılık farkının kaydedildiği gösterilmiştir (41). Buna karşılık, her iki kancalı solucan türünün pyrantel duyarlılığı, pyrantelin hamsterlerdeki duyarlılığına eşit bulunmuştur.

KAYNAKLAR

1. Poyraz Ö. Laboratuvar Hayvanları Bilimi, Ankara, Kardelen Ofset, 2000, s. 3–18.
2. Çeber K, Soran AF, Özardalı İ. *Plasmodium berghei* Anka suşunun Balb/c farelerde kültürü ve deneysel serebral sıtmanın araştırılması. Türkiye Parazitol Derg. 2005;29(3):154–6.
3. Girginkardeşler N, Balcıoğlu İC, Değerli K, Limoncu ME, Ok ÜZ, Özbilgin A. Trimetoprim-Sülfametaksazol, Eritromisin ve Klorokin farelerdeki *Plasmodium yoelii* enfeksiyonuna karşı *in vivo* etkilerinin karşılaştırılması. Türkiye Parazitol Derg. 1997;21(3):233–6.
4. Moll K, Ljungström I, Perlmann H, Scherf A, Wahlgren M. Animal models, Methods in malaria research, 5th ed., Virginia, Malaria Research and Reference Reagent Resource Center (MR4), American Type Culture Collection, 2008. p.141–6.
5. Özbilgin A, Kuman HA, Özcel MA. Chloroquine ile atenüe edilmiş *Plasmodium berghei*'nin eritrositer formları ile immünizasyon çalışmaları. Türkiye Parazitol Derg. 1992;16(1):16–23.
6. Özbilgin A, Çavuş İ, Nuraydın A, Kaya T. Sıtmada Etken Madde Taramalarında *in vivo* ve *in vitro* Modeller: Pilot Çalışma. Türkiye Parazitol Derg. 2017;41:156–63.
7. Hailesilase GG, Rajeshwar Y, Hailu GS, Sibhat GG, Bitew H. In vivo Antimalarial Evaluation of Crude Extract, Solvent Fractions, and TLC-Isolated Compounds from *Olea europaea* Linn subsp. *cuspidata* (Oleaceae). Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 2020. doi: 10.1155/2020/6731485.
8. Özbilgin A, Çavuş İ, Yıldırım A, Kaya T, Ertabaklar H. Leishmania tropica üzerinde *in vitro* ve *in vivo* ilaç etkinliğinin değerlendirilmesi: Pilot Çalışma. Türkiye Parazitol Derg. 2018;42:11–9.
9. Girginkardeşler N, Balcıoğlu IC, Yereli K, Özbilgin A, Özbel Y. Cutaneous leishmaniasis infection in Balb/c mice using a Leishmania tropica strain isolated from Turkey. J Parasitol. 2001;87(5):1177–8.
10. Yardley V, Croft SL. Animal models of cutaneous leishmaniasis. In: Zak O, Sande AM, eds. Handbook of Animal Models of Infection. New York: Academic Press; 1999. p.775–81.
11. Yardley V, Croft SL. Animal models of visceral leishmaniasis. In: Zak O, Sande AM, eds. Handbook of Animal Models of Infection. New York: Academic Press; 1999. p.783–7.
12. Değerli K, Kilimcioğlu AA, Kurt Ö, Tamay AT, Özbilgin A. Efficacy of azithromycin in a murine toxoplasmosis model, employing a *Toxoplasma gondii* strain from Turkey. Acta Tropica. 2003;88:45–50.
13. Foster R, Cheetham BL, Mesmer ET, Ming DF. Comparative studies of the action of mirasan, lucanthone, hycanthone and niridazole against *Schistosoma mansoni* in mice. Ann Trop Med Parasitol. 1970;65:45–58.
14. Foster R, Cheetham BL, King DF, Mesmer ET. The action of UK 3883, a novel 2-aminomethyl tetrahydroquinoline derivative, against mature schistosomes in rodents and primates. Ann Trop Med Parasitol. 1971;65:59–70.
15. Andrews P. A summary of the efficacy of praziquantel against schistosomes in animal experiments and notes on its mode of action. Drug Res. 1981;31:538–41.
16. Sabah AA, Fletcher C, Webbe G, Doenhoff MJ. *Schistosoma mansoni*: chemotherapy of infection of different ages. Exp Parasitol. 1986;61:294–303.
17. Munro GH, McLaren DJ. Toxicity of cyclosporin A (CsA) against developmental stages of *Schistosoma mansoni* in mice. Parasitology. 1990;100:29–34.
18. El Kouni MH. Efficacy of combination therapy with tubercidin and nitrobenzylthioinosine 5''-monophosphate against chronic and advanced stages of schistosomiasis. Biochem Pharmacol. 1991;41:815–20.
19. Fallon PG, Hamilton JV, Doenhoff MJ. Efficacy of treatment of murine *Schistosoma mansoni* infections with praziquantel and oxaminiquine correlates with infection intensity – role of antibody. Parasitology. 1995;111:59–66.
20. Pendino MLO, Nelson DL, Vieira LQ, Watson DG, Kusel JR. Metabolism by *Schistosoma mansoni* of a new schistosomicide 2-[(1-methylpropyl)amino]-1-octane thiosulphuric acid. Parasitology. 1995;111:177–85.

21. Pellegrino J, Katz N. *Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni*. *Adv Parasitol*. 1968;6:233–90.
22. Lee CL, Lewert R. *The maintenance of Schistosoma mansoni in the laboratory*. *J Infect Dis*. 1956;99:15–20.
23. Fransden F. *Cultivation of schistosomes for chemotherapeutic studies*. *Acta Pharmacol Toxicol*. 1981;49(5):118–22.
24. Moloney NA, Webbe G. *A rapid method of infecting mice with Schistosoma japonicum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1982;76:200–3.
25. Smithers SR, Terry RJ. *The infection of laboratory hosts with cercariae of Schistosoma mansoni and the recovery of adult worms*. *Parasitology*. 1965;55:695–700.
26. Standen OD. *Experimental schistosomiasis, II. Maintenance of Schistosoma mansoni in the laboratory, with some notes on experimental infection with S. haematobium*. *Ann Trop Med Parasitol*. 1949;43:268–83.
27. Olivier L, Stirewalt MA. *An efficient method for exposure of mice to cercariae of Schistosoma mansoni*. *J Parasitol*. 1952;38:19–23.
28. Berrios Duran LA. *An efficient device for exposing mice to schistosome cercariae and holding of small animals for post mortem examination*. *J Parasitol*. 1955;41:641–2.
29. Stirewalt MA, Bronson JF. *Description of plastic mouse restraining case*. *J Parasitol*. 1955;41:328.
30. Rausch RL. *Life cycle patterns and geographic distribution of Echinococcus species*. In: Thompson RCA, Lymbery AJ, eds. *Echinococcus and Hydatid Disease*. Wallingford: CAB International; 1995. p.89–134.
31. Kamiya M, Sato H. *Survival, strobilation and sexual maturation of Echinococcus multilocularis in the small intestine of golden hamsters*. *Parasitology*. 1990;100:125–30.
32. Casode N, Criado A, Jimenez A, et al. *Viability of Echinococcus granulosus cysts in mice following cultivation in vitro*. *Int J Parasitol*. 1992;22:335–9.
33. Pennoit-De Cooman E, De Rycke PH. *Serial passages of larval Echinococcus granulosus from equine origin in mice. II. Infections with sterile cysts*. *Z Parasitenkd*. 1978;56:39–45.
34. Gottstein B, Deplazes P, Aubert M. *Echinococcus multilocularis: immunological study on the Em2-positive laminated layer during in vitro and in vivo post-oncospherical and larval development*. *Parasitol Res*. 1992;78:291–7.
35. Behnke JM. *Laboratory animal models*. In: Sehad GA, Warren KS, eds. *Hookworm Disease: Current Status and New Directions*. London: Taylor and Francis; 1990. p.105–128.
36. Sen HG. *Necator americanus: behavior in hamsters*. *Exp Parasitol*. 1972;32:26–32.
37. Garside P, Behnke JM. *Ancylostoma ceylanicum in the hamster: observations on the host-parasite relationship during primary infections*. *Parasitology*. 1989;98:283–9.
38. Rajasekariah GR, Deh BN, Dhage KR, Bose S. *Response of preadult Necator americanus to some known antihelmintics in hamsters*. *Chemotherapy*. 1986;32:75–82.
39. Rajasekariah GR, Deh BN, Dhage KR, Bose S. *Response of adult Necator americanus to some known antihelmintics in hamsters*. *Ann Trop Med Parasitol*. 1989;32:75–82.
40. Behnke JM, Rose R, Garside P. *Sensitivity to ivermectin and pyrantel of Ancylostoma ceylanicum and Necator americanus*. *Int J Parasitol*. 1993;23:945–52.
41. Richards JC, Behnke JM, Duce IR. *In vitro studies on the relative sensitivity to ivermectin of Necator americanus and Ancylostoma ceylanicum*. *Int J Parasitol*. 1995;25:1185–91.

DENEYSEL ENFEKSİYON MODELLERİNDE MODEL ORGANİZMALAR, BAKTERİLER, MAYA –MANTAR, SİNEKLER

MODEL ORGANISMS, BACTERIA, YEAST-FUNGUS, FLIES IN EXPERIMENTAL INFECTION MODELS

Prof. Dr. Ender HÜR¹, Prof. Dr. Soner DUMAN²

¹ Uşak Üniveristesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD Nefroloji BD, Tel no:05322462487, E-posta:ender.hur@usak.edu.tr; ORCID: 0000-0002-8066-4629

² Ege Üniveristesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD Nefroloji BD, E-Posta:sonerduman@hotmail.com ORCID: 0000-0002-7232-9660

ÖZ

Bulaşıcı hastalıkların araştırılmasında bakteri, maya-mantar ve sinek gibi model organizmaların kullanılması önemli bir rol oynamıştır. Bunlar potansiyel tedavilerin geliştirilmesi ve konakçı-patojen etkileşimlerinin, bağışıklık tepkilerinin ve enfeksiyona dahil olan moleküler mekanizmaların anlaşılması hakkında değerli bilgiler sağladı. Bakteriler, insan ve hayvan sağlığıyla olan ilgilerinden dolayı deneysel enfeksiyon modellerinde model organizmalar olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Örneğin, *Escherichia coli*, konakçının bağışıklık tepkilerini ve virülans faktörlerini araştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Benzer şekilde, maya mantarı *Saccharomyces cerevisiae*, mantar patogenezinin moleküler mekanizmaları üzerindeki mantar enfeksiyonlarının anlaşılmasına ve antifungal ilaçlar için potansiyel hedeflerin belirlenmesine önemli ölçüde katkıda bulunmuştur. Ayrıca meyve sineği *Drosophila melanogaster*, konakçı-patojen etkileşimlerini incelemek için güçlü bir model organizma olarak ortaya çıktı. Bu nedenle, bulaşıcı hastalıklara yönelik anlayışımızı ilerletmek ve etkili müdahaleler geliştirmek için bu model organizmaları kullanarak araştırmaya devam etmek çok önemlidir.

Anahtar Sözcükler: Bakteriler, model organizmalar

SUMMARY

In the study of infectious diseases, the utilization of model organisms such as bacteria, yeast-fungus, and flies has played a crucial role. Those provided valuable knowledge about the development of potential treatments and the understanding of host-pathogen interactions, immune responses, and the molecular mechanisms involved in infection. Bacteria have been extensively used as model organisms in experimental infection models due to their relevance to human and animal health. For example, *Escherichia coli* has been widely employed to investigate host immune responses and virulence factors. Similarly, the yeast-fungus *Saccharomyces cerevisiae* has significantly contributed to our understanding of fungal infections on the molecular mechanisms of fungal pathogenesis and identifying potential targets for antifungal drugs. Additionally, the fruit fly *Drosophila melanogaster* emerged as a powerful model organism for studying host-pathogen interactions. Therefore, it is crucial to continue research using these model organisms to further our understanding and develop effective interventions for infectious diseases.

Keywords: Bacteria, model organisms

GİRİŞ

Modern bakteriyel patogeneze araştırmalarında hiçbir in vitro, in situ veya in silico modelin, bir patojenin canlı bir hayvanda karşılaştığı karmaşık konakçı savunma mekanizmalarını ve doku karmaşıklığını doğru bir şekilde yakalayamayacağı köklü bir prensiptir. Bu anlayış, insan hastalıklarının mikrobiyal nedenini belirlemede hayvan modellerinin önemini fark eden Robert Koch ve bu alandaki diğer öncülerin çalışmalarına yüzyıldan fazla bir süre öncesine dayanmaktadır. Etiyolojinin belirlenmesinde "altın standart" olan Koch'un varsayımları bugün de araştırmalara rehberlik etmektedir. Koch'un ilkelerini temel alan, Stanley Falkow gibi isimlerin önderlik ettiği patogeneze araştırmalarının moleküler çağı, mikrobiyal patogenezin altında yatan moleküler mekanizmalara ilişkin anlayışımızı derinleştirmek için hayvan modellerinden daha fazla yararlanmıştır. Bu araştırmacılar, patojenlerin belirli gen ürünleri ile bunların hastalığa neden olma potansiyelleri arasında işlevsel bir bağlantı kurarak, mikrobiyal patogeneze konusundaki modern anlayışımıza katkıda bulunmuşlardır. Bu nedenle, insan hastalıklarını aslına uygun bir şekilde kopyalayan hayvan modellerinin olması, çağdaş mikrobiyal patogeneze araştırmalarının önemli bir yönü olmaya devam etmektedir.

Bakteri, maya-mantar ve sinekleri içeren deneysel enfeksiyon modellerinin kullanılması, bulaşıcı hastalıkların çeşitli yönlerinin anlaşılması için önemlidir. Bu modeller, *Aeromonas caviae* bakterisi için vektör olarak karasineklerin potansiyelini araştırmak için kullanılmıştır (1). Ayrıca, kutanöz leishmaniasis'in tatarcıklar tarafından bulaşması incelenmiş olup, sinek ısırıkları yoluyla bulaşma mekanizmasının ve bunun insan vücuduna entegrasyonunun belirlenmesinin gerekliliği vurgulanmıştır (2). Ayrıca, tomurcuklanan maya *Saccharomyces cerevisiae*, genetik ve moleküler biyolojisi, yeni genetikçiler için bir temel görevi gören deneysel bir organizma olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (3). Mayadaki poliglutamin toksisitesini değerlendirmek için özetlenen toksik polyQ genişleme proteinlerini eksprese eden maya hücrelerinde toksisiteyi ölçmek için deneysel yaklaşımlar büyüme analizleri, değerli bilgiler sağlamıştır (4). Ek olarak, sineklerde travma ve *Pseudomonas entomophila* enfeksiyonu arasındaki etkileşim araştırılarak çeşitli modellerde JNK yolunun ve CrebA'nın inflamasyon ve enfeksiyondaki önemli rolü vurgulanmıştır (5). Deneysel enfeksiyon modelleri alanında, makrofaj koloni uyarıcı faktörün (CSF-1) fare kandidiyazındaki rolü araştırılmıştır; bu, mantar enfeksiyonuna karşı erken direnç potansiyel katkısını ve deneysel olarak başarılı bir şekilde kullanıldığını ortaya koymaktadır (6). Ayrıca, gerçek zamanlı PCR'nin geliştirilmesiyle çeçe sineklerinin doğal veya deneysel olarak karışık enfeksiyonlar edinme yeteneğine dikkat çekilmiştir (7). Ayrıca L3T4+ lenfositlerin farelerde sistemik *Candida albicans* enfeksiyonuna karşı koruyucu bağışıklıktaki rolü araştırılmıştır. Deneysel enfeksiyon modellerinde hücre dışı patojenlere karşı etkili humoral bağışıklık yanıtları için L3T4+ hücreleri kullanılmıştır. Geleneksel farelerde bağırsak kanalında *Candida albicans* tarafından kolonizasyonu ve antifungal tedavilerin etkisini araştırmak için farklı enfeksiyon modelleri kullanılmıştır (8). Amaç, bu enfeksiyonların patolojisini incelemek ve antimikrobiyal ajanların etkinliğini değerlendirmek için güvenilir bir deneysel model oluşturmaktır (9). Ek olarak mantar enfeksiyonlarının neden olduğu otoimmün hastalıkların alevlenmesi deneysel otoimmün ensefalomyelit gelişimi, *Candida albicans* enfeksiyonu varlığında incelenmiştir (10).

Hayvan Boyutu

Bulaşıcı hastalık çalışmaları için boyutları daha küçük olan hayvanların kullanılması avantajlıdır. Transgenik kemirgenler haricinde, daha küçük hayvanların maliyeti genellikle daha düşüktür, taşınması ve beslenmeleri için daha az alan gerektirir. Örneğin, modern havalandırılmalı kafes sistemleri ile aynı hacimde alan için 800 fare, 140 sıçan, 24 gelincik veya 6 tavşan barındırılabilir. Temel olarak, daha küçük hayvanların barınmasında kafeste tutulmaları genellikle daha az maliyetlidir. Ayrıca daha küçük hayvanlar genellikle daha az atık yönetimi gerektirir; bu nedenle, daha büyük hayvanlara kıyasla daha az otoklav döngüsü gerçekleştirilir, daha az kimyasal kullanılır. Temiz bir çevre sağlamak için daha az emek gerekir. Daha küçük hayvanlar daha küçük hacimlerde test malzemesi gerektirir; aşı ve deneysel ilaç olarak; bu özellik özellikle üretimi pahalı ve zaman alıcı olan yeni bileşiklerin kullanımını gerektiren deneyler için önemlidir. Tam tersine, daha büyük hayvan modellerinin kullanılmasının potansiyel avantajlarına rağmen büyük miktarlarda doku olması, kan veya serumun bir defada toplanması gerekebilir. Mevcut doku miktarı hayvan türleri arasında önemli ölçüde farklılık gösterebilir. Modellerdeküçük kemirgenlerin kullanılması daha fazla sayıda hayvan gerektirebilir. Analiz için yeterli materyal sağlanmalıdır. Kan gerektiğinde sağlıklı bir hayvanın toplam kan hacminin %10'u örnek olarak alındığında kolinerjik homeostatik tepkileri tetikleyebilir ve çok fazla kan alınması hipovolemik şoka neden olabilir (11).

Bulaşıcı Ajanlar

Bulaşıcı hastalık araştırmaları için genetik olarak en uygun hayvanın seçimi, tıpkı uygun genetik bileşime sahip bulaşıcı bir organizmanın seçilmesi gibi, çok önemlidir. Cins ve türün dikkate alınmasının yanı sıra, araştırmacıların etkenin türünü de dikkate alması gerekir. Suşların patogenezi, başlangıçta izole edildikleri kaynak hayvan ve içinde tutuldukları kültür ve büyüme koşulları dahil olmak üzere çeşitli faktörlere bağlı olarak önemli ölçüde farklılık gösterebilir. Genel olarak laboratuvara uyarlanmış bakteri ve virüs türleri, yapay bir kültür ortamında art arda çoğalan nesiller boyunca zayıflama eğilimindedir (12).Öte yandan, klinik izolatların duyarlı bir model konakçıda güçlü bir enfeksiyona neden olmak için gerekli virülans belirleyicilerine sahip olma olasılığı daha yüksektir. Bu nedenle yeni hayvan modelleri oluşturulurken laboratuvara uyarlanmış suşlar yerine klinik olarak hastalardan elde edilen izolatlar tercih edilir. Bunun bir örneği, ilk olarak 1992 yılında ABD'deki bir hasta insandan elde edilen *Yersinia pestis*'in klinik bir izolatı olan CO92'nin kullanımıdır. Bu özel suş, farelerde, sıçanlarda, kobaylarda vebayı tetikleme kapasitesine sahiptir (13, 14).

BAKTERİLER

Fare modelinde *Streptococcus pyogenes* akut deri enfeksiyonu

Bakteriyel Suşlar ve Kültür Koşulları

M1 serotipinin *S. pyogenes* AP1 suşu (40/58) ilk olarak Çek Cumhuriyeti'nin Prag kentindeki Dünya Sağlık Örgütü Streptokok Referans ve Araştırma İşbirliği Merkezi'nden alınmıştır. M1

serotipinin 5448 suşu orijinal olarak nekrotizan fasiit ve toksik şok sendromu olan bir hastadan izole edilmiştir (15).

Bakterileri yetiştirmek için, 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂'de %0,5 maya ekstraktı ilave edilmiş Todd-Hewitt-Broth'ta gece boyunca büyütülmüştür. Enfeksiyon deneyleri için bakteriler orta logaritmik faz sırasında toplanmış ve steril fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkanmıştır. Bakterilerin konsantrasyonu, PBS içerisinde 5x10⁸ koloni oluşturan birim (CFU)/ml'ye ayarlanmıştır.

Fare Enfeksiyon Modeli

Dişi C57BL/6J fareleri (8-12 haftalık) Harlan'dan (Venray, Hollanda) alınmış ve Helmholtz Enfeksiyon Araştırma Merkezi'ndeki (Braunschweig, Almanya) patojen içermeyen bir hayvan tesisine standart koşullar altında kurumsal standartlara uygun olarak yerleştirilmiştir. Fareler, 100 ul PBS içinde 5x10⁷ CFU ile sırtlarından deri altından enfekte edilmiştir. Yalnızca 100 ul PBS enjekte edilen fareler kontrol olarak kullanılmıştır. Farelere enfeksiyondan 6, 12, 24 ve 40 saat sonra CO₂ boğulması yoluyla ötenazi uygulanmıştır. Enfeksiyon türü ve zaman noktası başına 2-3 hayvanla çok sayıda bağımsız tam süreli deney yapılmıştır (16).

Bunun dışında *Streptococcus pyogenes* ile çok çeşitli deneysel enfeksiyon modelleri yapılmıştır:

1. Fare Modelleri: Deri altı ülser/hava kesesi modeli, impetigo, sistemik hastalık modelleri, implante odacık modelleri, ayak tabanı modeli, orofaringeal kolonizasyon modelleri, nazofaringeal ilişkili lenfatik doku kolonizasyon modeli, vajinal kolonizasyon modeli.

Sıçan Modelleri: Orofaringeal kolonizasyon, otoimmün kardit modeli.

2. PANDAS: Akut romatizmal ateş, *S. pyogenes*'in neden olduğu çeşitli otoimmün tip hastalıklardan yalnızca biridir. Bunlardan Sydenham koresi, obsesif kompulsif bozukluk, Tourette sendromu ve Streptokoklarla (PANDAS olarak bilinir) ilişkili pediatrik otoimmün nöropsikiyatrik bozuklukların hepsinde öne çıkan nörolojik veya nöropsikiyatrik bileşenlerdir.
3. Chinchilla Modelleri: Otitis media modeli
4. Primat Modelleri: İnsan dışı primat farenjit modeli, insan dışı primat sepsis modeli
5. Omurgasız Modelleri: İpekböceği ve balmumu kurdu modelleri, *C. elegans* modeli
6. Zebra balığı Modeli: Myonekroz modeli.

Yersinia

Yersinia enterocolitica (Ye), gıda kaynaklı zoonozların önemli sebeplerindendir; BT4/O:3 biyoserotipi, insan enfeksiyonlarında en yaygın olarak bulunan biyoserotiptir. Domuzların Ye için birincil rezervuar olarak kabul edilmesi, bu patojenin enfeksiyon dinamiklerinin hem bireysel hem de grup düzeyinde anlaşılmasını çok önemli kılmaktadır. Bir çalışmada, büyük beyaz domuzlara deneysel bir modeli doğrulamak için BT4/O:3 suşu enfekte edilmiştir.

Sonuçlar, domuzlarda Ye kontaminasyonunun sadece ağız yoluyla değil aynı zamanda burun yoluyla da meydana gelebileceğini ortaya çıkarmıştır. Kolonizasyon süreci, her biri domuzlarda farklı bir kontaminasyon durumunu temsil eden üç ayrı dönemden oluşuyordu. İlk dönem (P1), Ye'nin yutulmasından veya solunmasından sonraki 24 saat içinde bakterilerin tonsillerde veya dışkıda ortaya çıkmasıyla meydana gelmiştir. Aşılamadan 2 gün sonra başlayan ikinci dönem (P2), Ye'nin genişlemesini ve bir IgG serolojik yanıtının eşlik ettiği sindirim sistemi ve bağırsak dışı organların kolonizasyonunu içeriyordu. Aşılamadan 21 gün sonra meydana gelen üçüncü dönem (P3), tonsiller ve dışkıda aralıklı Ye tespiti ile kolonizasyonun gerilemesine işaret etmiştir. Aşılanan suş tüm domuzlarda 56 güne kadar varlığını sürdürmesine rağmen incelenen 30 izolatin %33'ünde genetik varyasyonlar gözlenmiştir. Bu varyasyonlar, insan enfeksiyonunda rol oynayan yadA geninin kaybını ve iki yeni çok lokuslu değişken sayılı tandem tekrar analizi (MLVA) profilinin ortaya çıkmasını içermiştir. Genel olarak, bu deneysel enfeksiyon modeli, bakterilerin zaman içindeki dağılımı ve patojenin genetik stabilitesi de dahil olmak üzere domuzlardaki kolonizasyon sürecine ilişkin değerli bilgiler sağlamıştır (18).

Meningococcal Septik Şok

Yapılan bir domuz çalışmasının deneysel tasarımında her biri sekiz domuzdan oluşan iki grup, 4 saat boyunca her 30 dakikada bir bakteri infüzyon hızını ikiye katlayarak intravenöz olarak artan sayıda NmLPS+ veya NmLPS almıştır. Bakteri sayısının inflamatuvar yanıtı nasıl etkilediği, bir domuzun NmLPS+ aldığı ve diğer domuzun eşit miktarda NmLPS aldığı çiftler halinde eşleştirilmesiyle incelenmiştir. Verilen bakteri miktarı daha sonra her çift için arttırılmıştır. En düşük sayıda bakteri alan çifte toplam $5,7 \times 10^{10}$ meningokok uygulandı; ardışık çiftler bu sayının iki katı, üç katı, dört katı, beş katı, altı katı, 10 katı ve 20 katı meningokok aldı. Üç domuz negatif kontrol olarak alınmış ve yalnızca % 0,9 NaCl uygulanmıştır. Eşit koşullar altında gerçekleştirilen önceki bir çalışmadan alınan altı ek negatif kontrol domuzu, tarihsel referans kontrolleri olarak alınmıştır (19). Hiçbir hayvan ölmemiştir. Deneylerin bitiminden sonra hayvanlara 500 ila 1000 mg pentobarbital, 30 mg morfin ve 40 mmol KCl'nin intravenöz enjeksiyonu yoluyla ötenazi uygulanmıştır. DNA ve sitokin analizi için tam kan, etilendiamintetraasetik asit (EDTA) tüplerine alınmış ve plazma ayrılarak, anında dondurulmuş ve analiz edilene kadar 70°C'de saklanmıştır. Domuzların ötenazisinden hemen sonra akciğer, karaciğer, dalak, böbrek, jejunum, kolon ve kastan (vastus lateralis) biyopsiler alınmış ve ardından sıvı nitrojen üzerinde hızla dondurulmuştur.

Corynebacterium ülserans

Corynebacterium ülserans, difteri toksini üretebilen ve difteriye benzer bir hastalığa neden olabilen zoonotik bir patojendir. Farelerde toksijenik ve toksik olmayan Corynebacterium ülserans enfeksiyonu için yeni bir deneysel model geliştirilmiştir.

Kültür ortamı: Yapılan bir çalışmada bakterilerin çoğaltılması ve tespiti için çeşitli kültür ortamları kullanılmıştır. Bakteriyel çoğalma için kanlı agar plakaları kullanılırken, et suyu kültürü ve agar plakaları için beyin kalp infüzyonu (BHI) et suyu kullanılmıştır. Bakteri tespiti için furazolidon-nalidiksik asit-Kolimisın agar (FNC agar) plakaları da hazırlanmıştır.

Deneyde kullanılan bakteri suşları, Japonya'daki bir solunum yolu enfeksiyonu vakasından izole edilen toksijenik *Corynebacterium* ülserans 0102 ve Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan satın alınan toksijenik olmayan *C. ülserans* ATCC 51799 ve *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 dir (20).

Bakteri soyları: Bakterilerin donmuş stoklardan çoğaltılmasını, bunların BHI et suyunda kültürlenmesini ve bakteri süspansiyonunun belirli bir optik yoğunluğa ayarlanmasını içermektedir. Bu deneysel model, farelerde *Corynebacterium* ülserans'ın neden olduğu enfeksiyonun araştırılması için değerli bir veri sağlamıştır. Seyreltme sonrasında bakterilerin BHI agar plakalarına aşılınmasıyla, 1x süspansiyonun 2×10^9 koloni oluşturan birim (CFU) mL⁻¹ (50 µL başına 10^8 CFU'ya eşdeğer) içerdiği doğrulanmıştır.

Burun içi inokülasyon: Farelere, kas içine enjekte edilen bir ketamin hidroklorür (10 mg/ml) ve ksilazin hidroklorür (20 mg/ml: salin = 4:1.25:20) karışımı ile anestezi uygulanmıştır. Daha sonra anestezi altındaki farelerin burun boşluğuna, farelerin nefes almasıyla kolaylaştırılan 50 µL (her iki tarafta 25 µL) bakteri süspansiyonu aşılanmıştır. Negatif kontrol olarak steril salin solüsyonu kullanılmıştır.

Farelerin gözlemlenmesi ve örneklenmesi:Bakteriyel mücadelenin ardından fareler 14 günlük bir süre boyunca gözlemlenmiştir. İnoküle edilen bakteriyi geri almak için ölen veya kurban edilen farelerin burun boşluğundan, ağız boşluğundan ve trakeasından sürüntü örnekleri toplanmıştır. Ayrıca otopsi sonrasında akciğer, karaciğer, böbrek, dalak, çekal içerik ve kolorektal dışkı dahil olmak üzere örnekler toplanmıştır. Canlı *C. ülserans*, swabların (burun ve trakeal) çizilmesi veya uygun şekilde seyreltilmiş organ homojenatlarının (akciğer, karaciğer, böbrek, dalak) veya kanın BHI agar plakalarına yerleştirilmesiyle tanımlanmıştır. Normal flora bileşenlerinden müdahalenin beklendiği numuneler için (ağız ve göz sürüntüleri, çekal içerik ve kolorektal dışkı), seçici FNC agar plakaları üzerinde sürme ve kaplama yapılmıştır. Swap popülasyonunun kabaca bir tahmini, çizgiler üzerinde görünen kolonilerin sayılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Öte yandan çekal içerik, kolorektal dışkı, kan ve organ homojenatları açısından plakalarda görünen tüm kolonilerin sayımı yapılmıştır.

Corynebacterium* ülserans tanımlaması:Corynebacterium* ülserans'ın tanımlanmasını doğrulamak için BHI veya FNC agar plakalarında görünen koloniler, koloni morfolojilerine veya Gram boyamalarına göre incelenmiştir. Gerekli durumlarda API Coryne kiti (bioMerieux SA, Marcy l'Etoile, Fransa) ve difteri toksin genini (A fragmanı) ve fosfolipaz D (PLD) genini hedefleyen PCR kullanılarak tanımlama yapılmıştır. Difteri toksini geni çeşitli primerler kullanılarak amplifiye edilmiştir: (21-23).

MAYA-MANTAR

Yaygın *Candida auris*'in Deneysel Fare Enfeksiyon Modelleri

Yaygın kandidiyaz, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki hastanelerdeki hastalar için önemli bir risk oluşturan ciddi bir hastalıktır. Gelişmiş antifungal tedavilerin varlığına rağmen, bu hastalığın ölüm oranı son on yılda endişe verici derecede yüksektir. Özellikle endişe verici olan, genellikle sağlık hizmetleri ortamlarıyla ilişkilendirilen, ilaca dirençli bir mantar

patojeni olan *Candida auris*'tir. Bu patojen yakın zamanda küresel bir halk sağlığı tehdidi olarak ortaya çıkmıştır ve bu durum, yaygın *C. auris* kandidiyazında konakçı-patojen etkileşiminin farklı dinamiklerini incelemek için güvenilir bir hayvan modeli geliştirmeyi gerektirmiştir.

Başlangıçta, NE/ ve vahşi tip C57BL/6 farelerinde *C. auris*'in virülansını değerlendirilmiştir, çünkü NE, antifungal immün yanıtlarda yer alan önemli bir serin proteazdır. Bunu yapmak için, her iki suştan farelere yüksek dozda *C. auris*'in intravenöz olarak uygulandığı ön deneyler gerçekleştirilmiştir. Akut invaziv kandidiyazın tetiklenmesi ve *C. auris* ile öldürücü bir karşılaştırma sağlanması için pozitif bir kontrol olarak, öldürücü dozda *C. albicans* SC 5314 (5×10^5 hücre) kullanılmıştır. Fareler daha sonra intravenöz olarak *C. auris* (2×10^8 hücre) ile aşılanmış ve 20 günlük bir süre boyunca günde iki kez hastalık ve ölüm oranı açısından yakından izlenmiştir. *C. albicans* ile enfekte edilmiş farelerde gözlemlenen yüksek ölüm oranı ve klinik hastalık belirtilerinin aksine, *C. auris* ile aşılananların klinik olarak normal olduğu ve hayatta kaldığı görülmüştür. *C. auris*'in böbrekler ve beyin gibi hedeflenen organlardaki mantar yükünün, vahşi tip C57BL/6 farelere kıyasla NE/- farelerde daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu bulgular NE'nin antifungal bağışıklığa katkıda bulunabileceğini ancak hayatta kalmak için gerekli olmadığını göstermektedir. Ayrıca, *C. auris*'in iki klinik izolatu (AR-0381 ve AR-0386) test edildiğinde, her iki suş da farelerde ölüme neden olmamıştır (24).

Deneysel Hayvan Modelinde Cerebral Aspergillosis

Yaygın Cerebral Aspergillosis (CA) için uygun bir model oluşturmak amacıyla, C57BL/6 fareleri, IPA uyarınca CA gelişimi için bilinen bir risk faktörü olan kortikosteroidler kullanılarak immünsüpresyona tabi tutulmuştur. Bağışıklığı baskılanmış fareler daha sonra intranazal olarak *A. fumigatus*'a konidiaya maruz bırakılmış, ardından bir gün sonra intravenöz olarak önceden şişmiş konidiaların 70 kat daha düşük bir aşısı uygulanmıştır. Şişmiş konidiaların kullanılmasının nedeni, bu organizmaların, inhale edilen dinlenme konidialarına kıyasla metabolik ve biyokimyasal olarak daha aktif olmaları, akciğerlerden kaçma ve kan dolaşımına girme olasılıklarının daha yüksek olmasıdır. Kontrol grupları, yalnızca intranazal yolla yükleme yapılan immün sistemi baskılanmış fareleri (IN 1 steroid) ve hem intranazal hem de intravenöz yolla yükleme uygulanan immün sistemi baskılanmamış fareleri (IN 1 IV) içermiştir. Bağışıklığın baskılanması ve ardından IN 1 IV tehdidi, giderek ölümcül bir enfeksiyona yol açmıştır; farelerin %50'si 4. günde ve %100'ü 5. günde hastalığa yenik düşmüştür. IN 1 IV grubunda farelerin %40'ı 10. günde ölmüş, IN 1 steroid grubunda ise farelerin %30'u 10. günde ölmüştür.

Parakoksidioidomikoz (PCM) kronik deneysel modeli

T lenfositlerin gelişiminden sorumlu birincil lenfoid organ olan timus, mikro ortamında önemli değişikliklere uğrar. Parakoksidioidomikoz (PCM), Güney ve Orta Amerika'da yaygın bir sistemik mantar enfeksiyonudur, ancak endemik olmayan bölgelerde de bu bölgelerden gelenler nedeniyle vakalar rapor edilmiştir. Hastalığa, lenfatik ve dolaşım sistemleri yoluyla dalağa, lenf düğümlerine ve cilde yayılan bir mantar olan *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) conidia propagules'un solunması neden olur. Bu enfeksiyon sıklıkla, Th2 sitokinlerinin (IL-10,

IL-4) üretimi, bozulmuş T hücresi fonksiyonu ve antijen sunum başarısızlığı ile karakterize edilen zayıflamış bir hücresel bağışıklık tepkisi ile ilişkilendirilmiştir.

Bir çalışmada Pb18 adı verilen *P. brasiliensis*'in virulan bir izolatu kullanılmıştır. Maya hücreleri Fava-Netto ortamında 37°C'de büyütülmüş ve büyümenin yedinci gününde toplanmıştır. Mantar kütlesi daha sonra fosfat tamponlu salinde (PBS) süspanse edilmiş, iki kez yıkanmış ve 1×10^7 maya/mL konsantrasyonuna ayarlanmıştır. Maya hücrelerinin canlılığının, Trypan mavisi boyama kullanılarak %90'dan yüksek olduğu doğrulanmıştır. Farelere 0,5 mL PBS içerisinde 5×10^6 maya/hayvan veya yalnızca PBS intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Enfeksiyonun intraperitoneal yolu, enfeksiyonun kronik yönünü taklit etmek ve şiddetli kronik PCM vakalarına benzer şekilde mantar yükünün iç organlara eşit şekilde yayılmasını taklit etmek için seçilmiştir.

Ana hedefin akciğerler olduğu trakeada meydana gelen enfeksiyonun aksine, enfeksiyonun kronik doğası ve mantar yükünün iç organlara eşit şekilde yayılması nedeniyle intraperitoneal enfeksiyon yolu seçilmiştir; bu durum ciddi vakalara benzemektedir. Enfeksiyon 120 günlük bir süre boyunca gerçekleştirildikten sonra, farelere ketamin/ksilazin (100 mg/kg ketamin hidroklorür ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorür) ile derin anestezi kullanılarak ötenazi uygulanmıştır (25).

Parazitler

İnsan hastalıkları için model uygunluğu olan tek hücreli parazitler olarak *Plasmodium* spp, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* spp, *Trichomonas vaginalis*, *Giardia duodenalis*, *Entamoeba* spp, *Leishmania* spp, *Trypanosoma brucei* (gambiense and rhodesiense), *Trypanosoma cruzi* sayılırlar.

Toksoplazma çok çeşitli sıcakkanlı hayvanları enfekte etme yeteneğine sahiptir ve araştırmacılar, çalışmalarının spesifik doğasına göre farklı hayvan modelleri seçmektedir. Koyun, keçi ve hatta tavukların insan toksoplazmozunu incelemek için etkili modeller olduğu kanıtlanmış olmasına rağmen, en yaygın kullanılan ve uygun maliyetli model faredir. Bununla birlikte, bulguların çalışmalar arasında karşılaştırılması her zaman basit bir iş değildir; çünkü parazitin türü ve evresi, enfeksiyonun yolu ve konağın bireysel faktörleri gibi çeşitli faktörlere bağlıdır.

Toxoplasma gondii, insanlar da dahil olmak üzere çeşitli sıcak kanlı hayvanları enfekte eden, yaygın olarak dağıtılan bir parazittir. Bu, kapsamlı bir şekilde araştırılan ve hem insanlarda hem de hayvanlarda klinik olarak ilgili diğer parazitlerin araştırılmasında sıklıkla model organizma olarak kullanılan hücre içi bir parazittir. İn vitro kültür ve genetik manipülasyon kolaylığı, bu paraziti bilimsel araştırmalar için değerli bir araç haline getirmiştir. Son zamanlarda patolojideki benzerlikleri nedeniyle inflamatuvar barsak hastalığını incelemek için bir model olarak da kullanılmaktadır. Ancak *T. gondii*'nin araştırmacılar tarafından kullanımı büyük farklılıklar göstermektedir ve bu durum, çalışmaların karşılaştırılması ve yorumlanmasında zorluklara yol açmaktadır. Bir çalışmada, son derece öldürücü Guyana GUY008-ABE suşu karakterize edilmiş ve Prugnau tip II suşu ile karşılaştırılmıştır. Tüm parazit suşları, nemli bir atmosferde %5 CO₂ ile 37°C'de birincil insan sünnet derisi

fibroblastlarında (HFF) seri geçişler yoluyla muhafaza edimiştir. HFF'ler, %10 FCS, 2 mM glutamin, 100 U/ml penisilin ve 100 U/ml streptomisin (Invitrogen) ile desteklenmiş Dulbecco'nun değiştirilmiş Eagle ortamında (DMEM, GibcoBRL) kültür yapılmıştır (26).

SİNEKLER

Leishmaniasis, Leishmania (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) cinsine ait protozoalardan kaynaklanır. Bu parazitleri ısırarak tatarcıklar (Diptera: Ceratopogonidae) birincil vektörler olarak görev yapar ve bunları omurgalı konakçılara aktarır. Enfeksiyon sürecini incelemek amacıyla tatarcık ve kertenkelelerin deneysel enfeksiyonları Leishmania (Sauroleishmania) adleri ve Leishmania (S.) hoogstraali kullanılarak gerçekleştirilir.

Laboratuvar kolonileri, kum sineği biyolojisinin ve tatarcıklarla Leishmania parazitleri arasındaki etkileşimin araştırılmasında çok önemli bir rol oynamaktadır. Bu böceklerin kontrollü laboratuvar koşulları altında yetiştirilmesi için çeşitli teknikler kullanılmıştır. Bununla birlikte, bilinen yaklaşık 700 kum sineği türünden yalnızca küçük bir kısmı laboratuvar ortamında başarılı bir şekilde kolonize edilmiş ve daha da azı deneysel amaçlarla sürekli olarak çok sayıda yetiştirilmiştir. Bu durum araştırmacıların kum sineği fizyolojisini, leishmaniasis epidemiyolojisini ve parazitler, vektörler ve konakçılar arasındaki ilişkileri araştırmasına olanak tanır. Farklı coğrafi kökenlerden gelen farklı kum sineği türlerinin ve kolonilerinin, tükürüklerinin bileşimi de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik ve fizyolojik parametrelerde farklılıklar sergilediğini belirtmekte fayda vardır. Ayrıca kum sineği türleri arasında Leishmania parazitlerine duyarlılık açısından da önemli farklılıklar bulunmaktadır. P. papatasi ve P. sergenti gibi bazı türler, yalnızca tek bir Leishmania türünün olgunlaşmasını ve bulaşmasını destekleyebildikleri için "kısıtlı" veya "spesifik" vektörler olarak kabul edilir. Öte yandan diğer türler, birden fazla Leishmania türünün bağırsaklarında olgunlaşmasına izin vermiştir. Ancak kum sineği türlerinin büyük çoğunluğunun Leishmania'ya duyarlılığı konusunda hala veri eksikliği bulunmaktadır. Bu nedenle, doğal popülasyonlardan yeni kum sineği kolonilerinin kurulması son derece değerlidir ve tıbbi entomologları bu tür çabaları üstlenmesi gerekir.

Kum sineği erginleri, ister gündüzleri dinlenirken, ister geceleri yiyecek ararken, çeşitli yöntemler kullanılarak toplanabilir. Evlerin duvarları, hayvan barınakları, mağaralar, ağaç kovukları gibi dinlenme alanlarından farklı tipte ağız aspiratörleri kullanılarak numune alınabilmektedir.

Aspiratörün her bir parçasının boyutları toplayıcının tercihinə göre ayarlanabilmektedir. Kum sinekleri hassas olduğundan aspiratörün gövdesinin açıklıktan daha geniş olması gerekmektedir. Ancak plastik aspiratörlerin hafif ve dayanıklı olmasına rağmen statik elektrik nedeniyle tatarcıklara zarar verebileceğini unutmamak gerekir. Laboratuvar çalışmalarında cam aspiratörlerin kullanılması tavsiye edilmektedir ancak ticari olarak mevcut değildir ve bir cam üfleyici tarafından özel olarak yapılması gerekmektedir.

Çok sayıda tatarcıkla çalışmak için rezervuar tipi aspiratör tercih edilir. Bu tip aspiratör girişten daha geniş bir gövdeye sahip olup, böceklerin kaçışta zorluk yaşamasını sağlar ve ayrı bir kap veya kafese aktarmaya gerek kalmadan daha fazla numunenin yakalanmasına olanak sağlar.

Koloni Oluşturma

Soğuk veya CO₂ ile hareketsiz hale getirilen kum sinekleri, stereomikroskop altında cinsiyetlerine ve fizyolojik durumlarına göre sınıflandırılır. Kolonilerin kurulması amaçlanan gebe dişiler daha sonra özellikle larva yetiştirmek için kullanılan alçı kaplı plastik kaplara aktarılır. Bu yöntemin mümkün olmadığı durumlarda çıplak gözle görülebilen kanla beslenen dişiler, ağız aspiratörleri kullanılarak tuzaklardan seçilerek transfer edilebilir. Saksı büyüklüğü gebe dişi sayısına göre seçilmeli, kum sinekleri yerleştirilmeden önce saksı su ile nemlendirilmelidir. Bu kaplar daha sonra sıkıca kapanan kapakları olan plastik dikdörtgen kutularda saklanır. Yüksek nemi korumak için kutunun altına bir tabaka nemlendirilmiş filtre kâğıdı veya kâğıt mendil yerleştirilir. Dişilere taze elma dilimi veya %10-50 sakaroz çözeltisi veya bal ile doyurulmuş pamuklu yün ped gibi bir şeker kaynağı sağlanır. Çoğu tür için yetiştirme için en uygun sıcaklık 24-28°C arasındadır. Kutulardaki bu saksılar aynı zamanda sineklerin taşınması için de uygun bir yöntem görevi görsen de taşıma sırasında daha serin koşulların (15-20°C) muhafaza edilmesi önerilir.

Leishmania ile Deneysel Enfeksiyonlar

Tatarecıkların Leishmania ile deneysel enfeksiyonu için iki yöntem kullanılabilir: anestezi altındaki enfekte hayvanlarla beslenme ve membranla besleme. Tipik olarak duyarlı fareler (örn. BALB/c) veya altın hamsterler (*Mesocricetus auratus*) gibi laboratuvar hayvanları intradermal olarak kulağa ve sonunda ayak tabanına aşılanır. Başarılı deneyler için en uygun yaştaki kadınları kullanmak çok önemlidir. Çok genç sinekler (çoğu tür için 3-4 güne kadar) beslenmezken, yaşlı sineklerin (çoğu tür için 10 günden fazla) kanla beslenmeden sonra hayatta kalma oranı düşüktür.

Enfekte bir hayvan kullanıldığında beslenme oranı (kan alan dişilerin yüzdesi) genellikle yüksektir. Ancak enfeksiyon oranı (kanla beslenen dişilerde enfeksiyon gelişen kadınların yüzdesi) çeşitli etkileyici değişkenler nedeniyle tahmin edilemez. Bu değişkenlerden biri de derideki parazit yoğunluğundaki yerel değişiktir. Enfeksiyon oranını maksimuma çıkarmak için sadece lezyon bölgesinin açığa çıkarılması ve hayvanın vücudunun diğer kısımlarının kalın bir bezle örtülmesi faydalıdır. Alternatif olarak, kum sinekleri bir ucu naylon ağ ile kapatılmış plastik şişelere yerleştirilebilir ve anestezi altındaki farelerin kulakları, şişeyi tutan özel olarak tasarlanmış kelepçeler kullanılarak ağa doğru bastırılabilir. Bu yöntemle bile dişiler, değişen parazit yoğunluklarına sahip lezyonun farklı bölgelerinden beslenebilir.

Bu yöntem öncelikli olarak *L. major*, *L. tropica* veya *L. mexicana* gibi kutanöz lezyonlara neden olan ve optimize koşulların yüksek enfeksiyon oranlarına (%50 civarında) ulaşabileceği Leishmania türleri için kullanılır. Ancak tatarecıkların iç organ hastalığı olan hayvanlarla (*L. infantum* veya *L. donovani*) beslenmesi tipik olarak %5 civarında enfeksiyon oranlarıyla sonuçlanır ve bu oran çoğu deneysel amaç için çok düşüktür. Membran beslemesini gerçekleştirmek için, bir cam besleyici aracılığıyla sineklere amastigot veya promastigot ve kan karışımı sağlanır. Bu yaklaşım, bulaşıcı kandaki parazit konsantrasyonunu standartlaştırmamıza olanak tanır. Düzgün bir şekilde uygulandığında, bu yöntem sürekli olarak %90'ın üzerinde enfeksiyon oranlarına ulaşır; bu oldukça yüksektir. Ek olarak, yutulan

parazitlerin sayısını kontrol etmemize olanak tanır, bu da vektör duyarlılığını incelemek için değerlidir.

Farklı tipte membranlarla denemeler yaptıktan sonra, en iyi sonuçların 1-3 günlük civcivlerin derisi kullanılarak elde edildiğini bulunmuştur (Ward ve ark, 1978). Herhangi bir kum sineği türü için ParafilmTM membranlarının kullanılmasından kaçınmak önemlidir. Membranın hazırlanması için göğüs bölgesini kaplayan deriden tüyler alınır ve deri dikkatlice vücuttan uzaklaştırılır. Daha sonra -20°C'de saklanmadan önce %70 etanol ve steril salinle yıkanır. Kullanmadan önce membran eritilir, steril salinle yıkanır ve dış yüzeyi dışarı bakacak şekilde besleyicinin açıklığının üzerine yerleştirilir. Membranı sabitlemek için bir Parafilm şeridi kullanılır. Steril koşullar altında besleyicinin iç haznesini dolduran kanda parazitler bulunur. Besleyici bir standı güvenli bir şekilde bağlanır ve boru kullanılarak su banyosuna bağlanır. Su, besleyicinin su ceketinin içinde 37°C sıcaklıkta dolaşır; bu, membran beslemesi için kritik bir faktördür. Yemlik, manşon vasıtasıyla kafes içerisine sokulur ve kum sineklerinin kaçmasını önlemek ve kafesin doğru pozisyonunda kalmasını sağlamak için elastik bantlar kullanılır. İki veya üç besleyiciyi seri halinde yerleştirmek mümkündür.

Steril tavşan kanı (sitrathlı veya defibrinize edilmiş) veya kan bankasından alınan insan kanı kullanılabilir. Enfeksiyon promastigotlar tarafından başlatılmışsa, kompleman aktivitesini yok etmek için kanın 56°C'de 30-40 dakika inkübe edilmesiyle ısıyla inaktive edilmesi gerekir. Amastigotlar, enfekte hayvanların kutanöz lezyonları (çoğu Leishmania türü), dalak veya karaciğer (visseral leishmaniasis), aksenik amastigotların in vitro kültürleri veya makrofaj benzeri hücre çizgileri istenirse %5-10 DMSO'lu kültür ortamından bölünerek dondurularak saklanabilir, eritilebilir ve kullanımdan hemen önce yıkanabilir. Amastigotların aksine, hemisitometre kullanılarak kolaylıkla yıkanıp sayılabilirler. Kum sineklerinin Leishmania enfeksiyonlarına duyarlılığı doza bağlıdır ve doğal koşulların kopyalanması için enfektif dozun ml başına 10⁶ paraziti aşmaması gerekir.

Besleyicideki beslenme oranları genellikle hayvanınkinden daha düşüktür. Ancak kafeste erkeklerin bulunması, dolaşan suyun sıcaklığındaki hafif değişiklikler, kafeslerin koyu renkli bir bezle örtülmesi ve insan nefesi ile uyarılması beslenme oranlarını arttırabilir. Beslenme başarısını arttırmak için şekerli yem enfeksiyondan bir gün önce kafesten çıkarılabilir. Dişilerin 1-3 saat kadar beslenmesine izin verilir, ardından yemlik dikkatlice çıkarılır (27).

GÖNÜLLÜ İNSANLARDA DENEYSEL ENFEKSİYON MODELLERİ

Kontrollü insan enfeksiyonlarında kan serumu, solunum salgıları veya gaita filtratı, bulaşıcı hastalıklar araştırmalarına temel olmuştur. İshal nedeni olan toksinlerin 1966'da Vibrio cholerae kültür sıvısının damlatılmasının ardından gönüllüler üzerinde tanımlanmıştır (28). Gönüllü insan modellerinin kullanılması anti mikrobiyal ürünlerin geliştirilmesi için kullanılmıştır (29) (Tablo 1).

Tablo 1. Gönüllü İnsanlarda Deneyisel Enfeksiyon Modelleri (29)

	Veriliş yolu	Doz	Tip	Sonlanım	Gönüllü sayısı	
ETEC	Ağızdan	$\geq 5 \times 10^8$ CFU	B7A, H10407, E24377A	İshal	1215	Ayaktan
Vibrio cholerae	Ağızdan	10^5 CFU	El Tor Inaba N16961, O139	İshal	1210	Hastanede yatarken
S Typhi	Ora	$1-5 \times 10^4$ CFU	Quailes	Ateş veya bakteriyemi	1000	Ayaktan
Shigella spp	Ağızdan	$10-10^{10}$ CFU	S flexneri 2457T, S sonnei 53G	İshal, antikor yanıtı	850	Hastanede yatarken
Lactobacillus spp	Ağızdan, vaginal	Ağızdan 10^9 CFU günde bir, vaginal 7.5×10^8 CFU	L rhamnosis GR-1, L reuteri RC-14, L crispatus CTV05	Klinik idrar yolları enfeksiyonu	800	Ayaktan
Streptococcus pneumoniae	İntranazal	10^5-10^6 CFU	6B, 23F	Kolonizasyon	790	Ayaktan
Haemophilus ducreyi	Intra-epidermal ve intradermal	$10-150$ CFU	35000HP	Püstül oluşumu	550	Ayaktan
Francisella tularensis	Aerosol	10^4-10^8 organizma	SCHU S4	Systemic symptoms	500	Hastanede yatarken
Neisseria lactamica	Intranazal	10^4 CFU	Y92-1009	Colonisation	310	Ayaktan
Plasmodium vivax	Sivrisinek ısırığı, intravenöz	2-10 sivrisinek ısırığı, 13000 genom eşi	Wild-tip	Parazitemi	300	Ayaktan
Campylobacter jejuni	Ağızdan	10^6-10^9 CFU	Başlangıçta 81-176, şimdi CG8421	İshal	260	Hastanede yatarken
Cryptosporidium spp	Ağızdan	$10-10^5$ ookist	C muris: RN66, C meleagridis: TU1867, C hominis: Iowa strain, C parvum: Iowa strain	Gaita kistleri	260	Ayaktan
Necator americanus	Transdermal	$10-50$ L3 larva	Papua New Guinea	Gaitada yumurta	250	Ayaktan
Escherichia coli (UTI)	Üretral kateter	10^5-10^6 CFU/mL	83792, HU2117	Clinical UTI	200	Ayaktan
BCG	İntradermal	$1-4 \times 10^5$ CFU	BCG	İmmün yanıt	140	Ayaktan
Neisseria gonorrhoeae	Üretral kateter	1.8×10^3 CFU (Ms11mkC), 1.0×10^5 CFU (FA1090)	FA1090, MS11mkC	Kolonizasyon	140	Ayaktan
Giardia lamblia	Ağızdan	$5-10^4$ trofozoit	GS-M83/85	Gaitada kistler, antikor yanıtı	120	Hastanede yatarken
Helicobacter pylori	Ağızdan	10^4 CFU	Baylor 100	Üre nefes testi, histoloji	80	Ayaktan
S Paratyphi	Ağızdan	$1-5 \times 10^3$ CFU	NVGH308 strain	Ateş veya bakteremi	40	Ayaktan

En sık kullanılan suşlar raporlanmakta ve gönüllü sayısı yayınlardan tahmin edilmektedir. TCID50=%50 doku kültürü enfektif dozu. ETEC=enterotoksijenik Escherichia coli. CFU=koloni oluşturan birim. S Typhi=Salmonella enterica serotip Typhi. PFU=plak oluşturan birim. RT-PCR U=ters transkripsiyon PCR birimleri. İYE=idrar yolu enfeksiyonu. S Paratyphi=Salmonella enterica serotipi Paratyphi

Kontrollü insan enfeksiyonlarında önemli bir kilometre taşı *P. falciparum* circumsporozoite proteini alt birimi kullanılarak yapılan dünyanın ilk sıtma aşısının Avrupa İlaç Ajansından ruhsatı alması olmuştur. Gönüllü denemelerine göre *P. falciparum* ile mücadelede kümülatif olarak %40 civarında koruyuculuk gösterilmiştir. Afrika’da yapılan faz 3 çalışmada çocuklarda %30 koruyuculuğu olduğu gösterilmiştir (30).

İn vitro kültür tekniklerinin geliştirilmesiyle laboratuvarda enfekte edilmiş *Anopheles* türü sivrisineklerin tükürük bezlerinde üretilen sıtma parazitleri radyasyonla zayıflatılarak aşılama için kullanılmıştır (31).

Dünya Sağlık Örgütü 2016 yılında konuyla ilgili CHI denemelerinin kullanımına ilişkin düzenleyici hususlar ve aşı geliştirme ile ilgili bir bildiri yayınlamıştır (32).

Sonuç

Gregor Mendel, bitki melezleri üzerinde çığır açan deneyleriyle "model organizma" kavramında devrim yarattı. Araştırma sorusunu ele alırken belirgin deneysel avantajları nedeniyle özellikle bezelyeyi model organizma olarak seçmiştir. Mendel'in benzersiz çiçek yapısına sahip *Leguminosae* familyası üzerinde yoğunlaşması, sonuçta *Pisum* cinsinin çalışmaları için gerekli niteliklere sahip olduğunu keşfetmesine yol açmıştır (Mendel, 1866). O zamandan bu yana, belirli amaçlar için model organizmaların seçilmesine yönelik bu yaklaşım geniş çapta benimsenmiştir. Bir model organizmanın erişilebilirlik, deneysel fizibilite, kısa nesil süreleri, bakım ve üreme için uygun fiyat ve üzerinde çalışılabilecek açıkça tanımlanabilir özellikler gibi belirli özelliklere sahip olması gerekir. Son zamanlarda, sıralı bir genoma erişim de dahil olmak üzere genetik izlenebilirlik de önemli bir kriter haline geldi. Model sistemlerin biyolojideki önemi, model organizmaların tarihi ve çeşitliliği hakkında kapsamlı incelemelere yol açmıştır; Model organizmalar çok çeşitli taksonları kapsar ve birçok araştırma sorusu için bakteri (*Escherichia coli*) veya mayalar (*Saccharomyces cerevisiae*) gibi tek hücreli organizmalar yeterlidir. Ancak, bulguları insanlara aktarmayı amaçlayan biyomedikal çalışmalara gelince, memeli olmayanlar genellikle çeviri modelleri olarak uygun değildir.

KAYNAKLAR

1. Nayduch D, Noblet G, Stutzenberger F. Vector potential of houseflies for the bacterium *aeromonas caviae*. *Medical and Veterinary Entomology*. 2002;16(2):193-8.
2. Rogers M, Ilg T, Nikolaev A, Ferguson M, Bates P. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fppg. *Nature*. 2004;430(6998):463-7.
3. Duina A, Miller M, Keeney J. Budding yeast for budding geneticists: a primer on the *saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics*. 2014;197(1):33-48.
4. Duennwald M. Growth assays to assess polyglutamine toxicity in yeast. *Journal of Visualized Experiments*. 2012;(61):3461.
5. Ragheb R, Chuyen A, Torres M, Defaye A, Seyres D, Kremmer L, et al. Interplay between trauma and *pseudomonas entomophila* infection in flies: a central role of the jnk pathway and of creba. *Scientific Reports*. 2017;7(1):16222.

6. Cenci E, Bartocci A, Puccetti P, Mocci S, Stanley E, Bistoni F. Macrophage colony-stimulating factor in murine candidiasis: serum and tissue levels during infection and protective effect of exogenous administration. *Infection and Immunity*. 1991;59(3):868-72.
7. Ahmed H, MacLeod E, Welburn S, Picozzi K. Development of real time pcr to study experimental mixed infections of t. congolense savannah and t. b. brucei in glossina morsitans morsitans. *Plos One*. 2015;10(3):e0117147.
8. Cenci E, Romani L, Vecchiarelli A, Puccetti P, Bistoni F. Role of l3t4+ lymphocytes in protective immunity to systemic candida albicans infection in mice. *Infection and Immunity*. 1989;57(11):3581-7.
9. Turner J, Butler T, Johnson M, Gordee R. Colonization of the intestinal tract of conventional mice with candida albicans and treatment with antifungal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1976;9(5):787-92.
10. Fraga-Silva T, Mimura L, Marchetti C, Chiuso-Minicucci F, França T, Zorzella-Pezavento S, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis development is aggravated by candida albicans infection. *Journal of Immunology Research*. 2015;2015:1-11.
11. Field K, Sibold A. Experimental methodology: blood collection, In: *The laboratory hamster and gerbil*. Boca Raton (FL): CRC Press;1998. P. 108.
12. Fux CA, Shirliff M, Stoodley P, Costerton JW. Can laboratory reference strains mirror ‘real-world’ pathogenesis? *Trends Microbiol* 2005;13:58–63.
13. Agar SL, Sha J, Foltz SM, Erova TE, Walberg KG, Parham TE, et al. Characterization of a mouse model of plague after aerosolization of Yersinia pestis CO92. *Microbiology*. 2008;154:1939–48.
14. Lathem WW, Crosby SD, Miller VL, Goldman WE. Progression of primary pneumonic plague: a mouse model of infection, pathology, and bacterial transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:17786–91.
15. Chatellier, S, Ihendyane, N, Kansal, R. G, Khambaty, F, Basma, H, Norrby-Teglund, A, et al. Genetic relatedness and superantigen expression in group A streptococcus serotype M1 isolates from patients with severe and nonsevere invasive diseases. *Infect. Immun*. 2000;68, 3523–4.
16. Loof TG, Sohail A, Bahgat MM, Tallam A, Arshad H, Akmatov MK, et al. Early lymphocyte loss and increased granulocyte/lymphocyte ratio predict systemic spread of streptococcus pyogenes in a mouse model of acute skin Infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2018;8:101.
17. Watson ME Jr, Neely MN, Caparon MG. Animal Models of Streptococcus pyogenes Infection. In: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA, eds. *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations* [Internet]. Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center; 2016.
18. Esnault E, Rouaud A, Labbé A, Houdayer C, Bailly Y, Houard E, et al. Controlled experimental infection in pigs with a strain of yersinia enterocolitica harboring genetic markers for human pathogenicity: Colonization and Stability. *Infect Immun*. 2023;91(7):e0015723.
19. Nielsen EW, Hellerud BC, Thorgersen EB, Lindstad JK, Pharo A, Tønnessen TI, et al. A new dynamic porcine model of meningococcal shock. *Shock* 2009;32(3):302–9.
20. Hatanaka A, Tsunoda A, Okamoto M. Corynebacterium ulcerans diphtheria in Japan. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:752–3.
21. Ackerman JI, Fox JG, Murphy JC. An enzyme linked immunosorbent assay for detection of antibodies to Corynebacterium kutscheri in experimentally infected rats. *Lab Anim Sci*. 1984;34(1):38-43.
22. Nakao H, Popovic T. Development of a direct PCR assay for detection of the diphtheria toxin gene. *J Clin Microbiol*. 1997;35:1651–5.
23. Torres Lde F, Ribeiro D, Hirata R Jr, Pacheco LG, Souza MC, dos Santos LS, et al. Multiplex polymerase chain reaction to identify and determine the toxigenicity of Corynebacterium spp with zoonotic potential and an overview of human and animal infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108:272–9.

24. Xin H, Mohiuddin F, Tran J, Adams A, Eberle K. Experimental mouse models of disseminated *Candida auris* infection. *mSphere*.2019; 4:e00339-19.
25. Alves da Costa T, Di Gangi R, Thome' R, Barreto Felisbino M, Pires Bonfanti A, Lumi Watanabe Ishikawa L, et al. Severe changes in thymic microenvironment in a chronic experimental model of paracoccidioidomycosis. *PLoS ONE* 2016;11(10): e0164745.
26. Loeuillet C, Mondon A, Kamche S, Curri V, Boutonnat J, Cavaillès P , et al. *Toxoplasma* hypervirulence in the rat model parallels human infection and is modulated by the *Toxo1* Locus. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019;9:134.
27. Volf P, Volfova V. Establishment and maintenance of sand fly colonies. *Journal of Vector Ecology* 2011;36 (Supplement 1): S1-S9.
28. Benyajati C. Experimental cholera in humans. *BMJ.* 1966; 1: 140–2.
29. Roestenberg M, Hoogerwerf MA, Ferreira DM, Mordmüller B, Yazdanbakhsh M. Experimental infection of human volunteers. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(10):e312-e322.
30. Vekemans J, Leach A, Cohen J. Development of the RTS,S/AS malaria candidate vaccine. *Vaccine* 2009; 27 (suppl 6): G67–71.
31. Chulay JD, Schneider I, Cosgriff TM, et al. Malaria transmitted to humans by mosquitoes infected from cultured *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 1986; 35: 66–8.
32. WHO. Human challenge trials for vaccine development: regulatory considerations. October, 2016.http://www.who.int/biologicals/expert_committee/Human_challenge_Trials_IK_final.pdf (accessed May 3, 2018)

DENEYSSEL YARA İNFEKSİYON MODELLERİ

EXPERIMENTAL WOUND INFECTION MODELS

Doç. Dr. Ahmet Deniz UÇAR

İzmir Şehir Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği, Cep tel: 05053891443
e-mail:ahmetdenizucar@hotmail.com, ORCID:0000-0002-2678-3133

ÖZ

Yara enfeksiyonları, cerrahi pratiğin en önemli komplikasyonları arasında yer almakta ve morbidite, mortalite ile sağlık maliyetlerinde artışa neden olmaktadır. Bu nedenle yara enfeksiyonlarının patogenezi, immün yanıt mekanizmaları ve tedavi stratejilerinin araştırılmasında deneysel hayvan modelleri kullanılmaktadır. Bu modeller, kontrollü koşullar altında mikroorganizma-konak etkileşiminin incelenmesine ve yeni antimikrobiyal ajanların, pansuman materyallerinin veya cerrahi tekniklerin etkinliğinin test edilmesine olanak tanır. Yara enfeksiyonları üzerine yapılan güncel araştırmalar öncelikli olarak hayvan modelleri üzerinde yürütülmekte ise de bu durum bu çalışmaların doğrudan insanlara aktarılabilirliğini kısıtlamaktadır. Bu sınırlamaların bir kısmı, kozmetik cerrahiden kalan ve normalde atılan deri kullanılarak yapılan “ex-vivo” deneysel modelleri ile aşılabılır. Ex-vivo yara modelinin temel faydaları, sağlıklı insan derisinin kullanılması, ölçülebilir bir bakteriyel enfeksiyon, ölçülebilir bir donöre bağlı bağışıklık tepkisi ve sonuçların tekrarlanabilir olmasıdır. Bu özellikler, ex-vivo yara modelini konak-patojen etkileşimlerinin mekanizmalarını incelemek ve antimikrobiyal ajanları test etmek için değerli bir araç haline getirmektedir.

Anahtar Sözcükler: Deneysel, yara enfeksiyonu, ex vivo

SUMMARY

Wound infections are among the most significant complications of surgical practice, leading to increased morbidity, mortality, and healthcare costs. Therefore, experimental animal models have been used to investigate the pathogenesis, immune response mechanisms, and treatment strategies for wound infections. These models allow for the study of microorganism-host interactions under controlled conditions and the testing of the efficacy of new antimicrobial agents, dressing materials, or surgical techniques. While current research on wound infections is primarily conducted in animal models, this limits their direct transferability to humans. Some of these limitations can be overcome by ex-vivo experimental models using skin from cosmetic surgery that is normally discarded. The key benefits of ex-vivo wound models include the use of healthy human skin, a measurable bacterial infection, a measurable donor-dependent immune response, and the reproducibility of results. These features make the ex-vivo wound model a valuable tool for studying the mechanisms of host-pathogen interactions and testing antimicrobial agents.

Keywords: Experimental, wound infection, ex vivo

Deneyisel Modellerin Temel Prensipleri

Kanıt düzeyi düşük olmasına rağmen deneysel modellerin temel prensiplerini saptamak ve standardize etmek literatürde homojen bilgi birikimi ve tekrarlanabilir çalışmalara olanak sağlayarak kanıt değeri daha kabul edilebilir çalışmalara olanak tanıyacaktır. Temel prensipler;

1. **Standardizasyon:** Reprodüksiyon için yara büyüklüğü, derinliği, mikroorganizma inokulum dozu standartlaştırılmalıdır.
2. **Hayvan Seçimi:** Genellikle fare, sıçan, tavşan ve domuz modelleri tercih edilmektedir. Domuz cilt yapısı, insan cildine en yakın olanıdır.
3. **Etik ve 3R İlkesi:** (Replacement, Reduction, Refinement) etik açıdan temel rehberdir.
4. **İnfeksiyonun İndüksiyonu:** Genellikle *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Streptococcus* türleri kullanılır.

Kullanılan Hayvan Modelleri

Rodent Modelleri (Fare ve Sıçan)

- **Avantajları:** Düşük maliyet, hızlı üreme, genetik manipülasyon imkânı.
- **Kullanım Alanı:** Kronik yara, diyabetik yara, biyofilm oluşumu çalışmalarında yaygın.
- **Yöntem:** Dorsal bölgede tam kat insizyon veya eksizyon yapılarak yara oluşturulur, ardından bakteri inokülasyonu yapılır.

Tavşan Modelleri

- Daha geniş yara alanı oluşturulabilir.
- İmmün yanıt çalışmaları ve yeni antimikrobiyal ajanların testlerinde sık tercih edilir.

Domuz Modelleri

- **İnsan cildine benzerlik** (epidermal kalınlık, ter bezleri, kıl folikülleri).
- **Klinik uyarlanabilirlik** yüksek olduğu için doku mühendisliği ve yeni yara örtülerinin geliştirilmesinde “altın standart” modeldir.

İnfeksiyon Tiplerine Göre Modeller

Akut Yara İnfeksiyon Modelleri

- **Amaç:** Mikroorganizmanın hızlı kolonizasyon ve doku hasarını gözlemlemek.
- **Örnek:** Cerrahi insizyon + *Staphylococcus aureus* inokülasyonu.

Kronik Yara İnfeksiyon Modelleri

- Özellikle diyabetik hayvanlarda, yara iyileşmesinin gecikmesi sağlanarak çalışılır.
- Biyofilm oluşturan bakteriler (*P. aeruginosa*) sık kullanılır.

Yanık Yara Modelleri

- Yanık sonrası infeksiyon patogenezi ve tedavi stratejilerinin incelenmesinde kullanılır.
- Domuz ve sıçan yanık modelleri yaygındır.

İmplant Enfeksiyon Modelleri

- Ortopedik implantlar veya yara üzerine yerleştirilen yabancı cisimler üzerinden enfeksiyon çalışmaları yapılır.
- Biyofilm biyolojisinin anlaşılmasında önemlidir.

Deneyisel yara enfeksiyonu modelleri

Klasik rodent (fare) tam-kat eksizyon + enfeksiyon

- **Kurulum (örnek):** Sırt derisinde 8 mm dairesel tam-kat eksizyon; ardından *Pseudomonas aeruginosa* belirli dozlarda inokülasyon. Çalışmada standart fare suşu seçimi, yara hazırlama ve inokulum dozlarını sistematikleştirerek belirli ana göstergeleri (CFU dinamiği, granülasyon kalınlığı, neovaskülarizasyon, sitokinler vb.) önemlidir.
- **Ne ölçülür?** Yara kapanma yüzdesi, CFU/g doku, IL-1 β /TNF- α ekspresyonu, granülasyon ve damarlaşma skorları (1).

Yanık yara enfeksiyonu modelleri (scald/plaka)

- **Kantitatif fare modeli:** 92–95 °C ısıtılmış pirinç bloklarla ~%5 TBSA'lık düzenli yanık; eskarın *P. aeruginosa* ile inokülasyonu. 10. günde yanık+enfekte grupta sağkalım düşer; erken dönemde kas dokuda yüksek bakteri yükü gösterilir (1).
- **Güncel yaklaşımlar:** Sıçan “Walker–Mason” modifiye skald modelinde *P. aeruginosa* biyofilmi ve yanık patofizyolojisi incelenir. Karma enfeksiyon (*P. aeruginosa* + *S. aureus*) yanık modeliyle polimikrobiyal etkileşimler (2).
- **Büyük hayvan (domuz) yanık-enfeksiyon:** Tam-kat domuz yanıklarında *S. aureus*/*P. aeruginosa* ile enfeksiyon ve topikal antibiyotiklerin etkinliği; incelenir (3).

Diyabetik yara / diyabetik ayak enfeksiyonu

- **Tip-2 diyabetik fare modeli:** Bozulmuş iyileşme fenotipinde MRSA ile enfekte standartlaştırılmış yara protokolü; makro iyileşme serileri, CFU ve histolojiyle zengin görselleştirme prosedürlerini içerir. Diyabetik ayak enfeksiyonunun temel özelliklerini (nekroz, sürekli inflamasyon, invazyon) taklit etmeyi amaçlar (4).
- **Biyofilm ve gecikmiş iyileşme:** Tip-2 diyabetik farelerde *P. aeruginosa* biyofilmine bağlı kronik yara modeli; biyofilm görüntüleme ve iyileşme incelenebilir (5).
- **Yeni moleküler hedefler:** Diyabetik yarada *S. aureus* virülansını artıran sdrH geninin rolü; immün kaçış ve iyileşme gecikmesi incelenebilmektedir (7).

Büyük hayvan (domuz) enfekte yara / kronik yara

- **Büyük kronik yara modeli:** Domuzda geniş kronik yara oluşturup giyilebilir elektro-terapötiklerin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır (7).

Deneyisel Modellerin Avantaj ve Kısıtlılıkları

Bu modellemelerde kontrollü koşullar altında enfeksiyon sürecinin izlenmesi ve yeni tedavi yöntemlerinin ön klinik değerlendirmesi ana avantajlardandır. Bunun yanında insan cildine tam uyumlu olmamaları, bazı mikroorganizmaların doğal enfeksiyon dinamiklerini yansıtmaması ve etik sınırlamalar gibi kısıtlılıklar barındırır. Gelecekte yeni nesil yara enfeksiyon modellerinde 3D biyoprinting, insan deri eşdeğerleri, mikroakışkan çip sistemleri ve immün yetmezlik modelleri ön plana çıkmaktadır. Bu sayede insan klinik tablolarına daha yakın deneyisel ortamlar oluşturulabilecektir. Sonuç olarak deneyisel yara enfeksiyon modelleri hem yara patofizyolojisinin anlaşılmasında hem de tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde temel bir araştırma aracıdır. Doğru model seçimi, araştırma amacına uygun standardizasyon ve etik ilkelerle uyumlu yaklaşım, bilimsel çıktının güvenilirliğini belirleyen anahtar unsurlardır.

Ex vivo insan deri ve karma sistemler

- **Ex vivo insan deri enfeksiyon modeli:** Taze insan deri örneğinde kullanımı kolaylaştırılmış enfeksiyon modeli; maliyet/aktarılabirlik sorunlarını azaltma hedefli çalışmalardır (8).

İn vitro katmanlı biyofilm ve ileri sistemler

- **Katmanlı kronik yara biyofilm modeli:** Wound-like besiyerinde *S. aureus* + *P. aeruginosa* birlikte; biyofilm mimarisi ve tedavi yanıtlarını incelenebilmektedir (9).
- **Topikal antibiyotikli elektrosin taşıyıcıların testleri (in vitro + ex vivo):** Görsel örneklemeler ve biyofilm/CFU sonuç çalışmaları için idealdir (10).

“Skin-on-a-chip” / mikroakışkan ileri modeller

- Deri fizyolojisini taklit eden mikroakışkan sistemler; yara-enfeksiyon çalışmalarına uyarlanabilirlik, çok kanallı besleme ve yüksek çözünürlüklü görüntüleme imkânları sunar (11).
- **Pumpless deri-çip örneği:** PDMS tabanlı, iki katmanlı mikroakışkan akış; kültür odası ve atık çıkışı incelemelerini içerir (12).

İmplant-ilişkili ve hava-poşu/abses benzeri modeller

- **Subkutan hava-poşu implant enfeksiyonu:** Aynı hayvanda iki implantı aynı anda enfekte edip kapsüllü abse ortamında izleme; biyoluminesan *S. aureus* ile dinamik görüntülemeye uygun çalışmalar sunar (13).
- **Cerrahi implant biyofilmi:** *S. aureus* biyofilm oluşumunun kısa süreli elektrik akımıyla baskılanması; in vivo/cerrahi alan görselleri ve kantitatif sonuçlar verir (14).

Ex vivo insan derisi modelleri

Amaç

İnsan epidermis-dermis mimarisini ve konak yanıtını koruyarak *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi patojenlerle oluşan yara enfeksiyonlarını taklit edebilen, tekrarlanabilir ve ölçülebilir bir ex vivo insan deri enfeksiyon modeli geliştirmek; modeli standardize etmek ve antimikrobiyal stratejileri ön-klinik taramalarda test etmektir.

Materyal ve Yöntem

Cerrahi artık/estetik müdahale kaynaklı sağlıklı insan deri parçaları etik onam ile elde edilir. 6–8 mm punch biyopsiler, epidermis bütünlüğü korunarak ve/veya kontrollü “scratch/punch” ile yara oluşturulur. Numuneler hava-sıvı arayüzlü (ALI) kültürde, tanımlı besiyeri üzerinde 37 °C’de inkübe edilir. Bakteriler log-fazda hazırlanıp 10^4 – 10^7 KOB/numune aralığında inoküle edilir. Negatif (PBS) ve pozitif (önceden belirlenmiş yüksek inokulum) kontroller dahil edilir.

Standardizasyon Adımları

1. **Doku kaynağı ve hazırlığı:** Yaş, anatomik bölge ve saklama süresine göre blok randomizasyonu; biyopsi çapı ve kalınlığının sabitlenmesi.
2. **İnokulum kontrolü:** Koloni oluşturma birimi (KOB) doğrulaması; hedef aralıkta (örn. 10^5 KOB) %15’in altında varyasyon.
3. **İnkübasyon koşulları:** ALI nemi, gaz kompozisyonu; süre (6–48 s).
4. **Sonlanım noktaları:** Zaman serilerinde (6, 24, 48 s) kantitatif kültür (KOB/g), biyofilm boyası, histopatoloji (H&E, Gram), immünohistokimya (MPO, Ki-67), sitokinler (IL-1 β , IL-6, IL-8), doku canlılığı (ATP/rezazurin), bariyer fonksiyonu (TEWL) ve görüntüleme (konfokal/OCT).
5. **Tekrarlanabilirlik:** Seri içi ve seriler arası değişkenlik için %CV hesaplanır; hedef %CV < 20.

Modelin Doğrulanması (Validasyon)

- Yüzeysel ve derin yük arasında korelasyon (süpürme vs homogenat KOB).
- Klinik izolatların (MRSA, MDR-*P. aeruginosa*) referans kökenlerle karşılaştırılması.
- “Doz-yanıt” ve “zaman-yanıt” eğrilerinin tekrarı.
- Epitel bütünlüğü bozulduğunda artmış kolonizasyon/biyofilm oluşumu ve pro-inflamatuvar belirteçlerde beklenen artışın gösterilmesi adımlarını içerir

Test Uygulamaları

Topikal antibiyotikler (örn. mupirosin), antiseptikler (POVIDON-iyot, klorheksidin), kombinasyon rejimleri, antimikrobiyal peptidler, bakteriyofajlar ve yara örtüleri (gümüş, PHMB, hidrojel) modele 30–60 dk sonrası uygulanarak etkinlik (log azaltım, biyofilm yoğunluğu, inflamatuvar yanıtın modülasyonu) ile değerlendirilir. Tedavi etkinliği için kısmi iyileşme kriteri (≥ 1.5 log KOB azalımı + histolojik inflamasyon skorunda azalma) kullanılır.

İstatistik ve Veri Analizi

Güç analizine dayalı örneklem (en az $n=6$ /kol) belirlenir. Normal dağılımda ANOVA/Tukey, aksi halde Kruskal-Wallis/Dunn uygulanır. Çoklu sonlanım noktalarında FDR düzeltilmesi kullanılır. Etki büyüklüğü (Hedges g) raporlanır.

Güvenlik ve Etik

BSL-2 biyogüvenlik; insan doku kullanımına yönelik etik kurul onayı ve donör kimlik gizliliği sağlanmalıdır. Antibiyotik direnci taşıyan suşlarla atık inaktivasyonu standartlarına uyulmalıdır.

Sonuç

Sunulan ex vivo insan deri modeli, klinik olarak ilgili patojenlerle kolonizasyon-biyofilm-konak yanıtı ekseninde ölçeklenebilir ve yüksek içerikli (multi-endpoint) değerlendirme imkânı sağlar. Antimikrobiyal ajanların erken faz taraması, dozlama/uygulama stratejilerinin optimizasyonu ve biyobelirteç keşfi için güçlü bir platform sunar. Sınırlılıklar arasında donörler arası biyolojik değişkenlik, sistemik immün yanıtın yokluğu ve uzun süreli rejenerasyon süreçlerinin kısıtlı taklidi sayılabilir. Yine de klinik uygunluğu yüksek, etik açıdan erişilebilir ve maliyet-etkin bir ara yüzey model olarak in vivo çalışmalar öncesi köprü rolü üstlenir.

Tablo 1. Deneysel Yara İnfeksiyon Modellerinde Kullanılan Hayvanların Avantaj ve Dezavantajları

Hayvan Modeli	Avantajları	Dezavantajları
Fare	- Düşük maliyet - Genetik manipülasyon kolaylığı - Hızlı üreme	- Küçük yara alanı - İnsan cildinden yapısal farklılık
Sıçan	- Yara takibi kolay - Kronik yara modellerinde yaygın	- İnsan cildinden farklı epidermal yapılar
Tavşan	- Daha geniş yara alanı - İmmün yanıt çalışmalarına uygun	- Daha pahalı - Etik zorluklar daha belirgin
Domuz	- İnsan cildine en yakın model - Doku mühendisliği ve biyomateryal testlerinde ideal	- Yüksek maliyet - Laboratuvar şartlarında zor uygulanabilir

Tablo 2. Karşılaştırma ve Dikkat Edilmesi Gerekenler

Model	Avantajları	Dezavantajları / Sınırlamalar
Tam kat eksizyon modelleri	Yara iyileşme süresi, epitelleşme, dermis yapısı gibi birçok parametreyi takip etme imkânı; tedavi etkisini net görme	Araştırma süresi uzun olabilir; ağrı/rahatsızlık kontrolü gerek; biyofilm oluşturmak bazen zor
Kronik yara / biyofilm modelleri	İnsan kronik yara benzeri koşullar; tedavi direnç mekanizmalarını inceleme	Standardizasyon zor; hayvan refahı; immün sistem farklılıkları insanla tam örtüşmeyebilir
Enfekte model + dirençli patojenler	Klinik olarak anlamlı; yeni ajanların gerçekçi testleri	Patojen inokülasyonu kontrolü, bulaşma riskleri; sonuçların çoğu makroskopik + bakteriyolojik + histolojik analiz gerektirir
Ex vivo modeller	Hayvan kullanımı azaltılabilir; deri yapısı insan-yakın olabilir	Hayvanın canlı bağışıklık tepkisini içermez; sistemik yanıtları gözlemleyemez

KAYNAKLAR

1. Hou J, Wu Q, Xiong R, Malakar PK, Zhu Y, Zhao Y et al. A Standardized Mouse Model for wound infection with *Pseudomonas aeruginosa* Int J Mol Sci. 2024;25(21):11773. doi: 10.3390/ijms252111773.
2. Brandenburg KS, Weaver AJ, Qian L, You T, Chen P, Karna SLR et al. Development of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in partial-thickness burn wounds using a Sprague-Dawley Rat model J Burn Care Res. 2018 ;40(1):44–57. doi: 10.1093/jbcr/iry043
3. Tsai DM, Tracy LE, Lee CCY, Hackl F, Kiwanuka E, Minasian RA, Onderdonk A et al. Full-thickness porcine burns infected with *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa* can be effectively treated with topical antibiotics Wound Repair Regen 2016;24(2):356-65. doi: 10.1111/wrr.12409. Epub 2016 Mar 31.
4. Mendes AI, Peixoto MJ, Marques AP, Pedrosa J, Fraga AG. An optimized mouse model of *Staphylococcus aureus* infected diabetic ulcers BMC Res Notes. 2022 ;15:293. doi: 10.1186/s13104-022-06170-5
5. Zhao G, Hochwalt PC, Usui ML, Underwood RA, Singh PK, James GA et al. Delayed wound healing in diabetic (db/db) mice with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm challenge – A model for the study of chronic wounds Wound Repair Regen. Author manuscript; available in PMC: 2011 Sep 1. Published in final edited form as: Wound Repair Regen. 2010 ;18(5):467–477. doi: 10.1111/j.1524-475X.2010.00608.x
6. Nie K, Wang K, Wen Y, Peng J, Tang S, sdrH enhances *Staphylococcus aureus* infection in diabetic wounds Front. Microbiol., 19 June 2025 Sec. Infectious Agents and Disease Volume 16 - 2025 doi:10.3389/fmicb.2025.1502428
7. Shiff J, Schwartz K, Hausman B, Seshadri DR, Bogie KM, Development and use of a porcine model with clinically relevant chronic infected wounds Journal of Tissue Viability Volume 32, Issue 4, November 2023;32(4):527-35 doi:10.1016/j.jtv.2023.08.004
8. Yoon DY, Fregoso DR, Nguyen D, Chen V, Strbo N, Fuentes NJ et al. A tractable, simplified ex vivo human skin model of wound infection.Wound Repair Regen. 2019 ;27(4):421–425. doi: 10.1111/wrr.12712
9. Chen X, Lorenzen J, Xu Y, Jonikaite M, Thaarup ID, Bjarnsholt T et al. A novel chronic wound biofilm model sustaining coexistence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* suitable for testing of antibiofilm effect of antimicrobial solutions and wound dressings Wound Repair Regen. 2021 ;29(5):820–829. doi: 10.1111/wrr.12944
10. Cheng Y, De Bank PA, Bolhuis A, An in vitro and ex vivo wound infection model to test topical and systemic treatment with antibiotics J Appl Microbiol. 2022 ;133(5):2993–3006. doi: 10.1111/jam.15756
11. Monfared GS, Ertl P, Rothbauer M, Microfluidic and Lab-on-a-Chip Systems for Cutaneous Wound Healing Studies Pharmaceutics. 2021 ;13(6):793. doi: 10.3390/pharmaceutics13060793
12. Mohamadali M, Ghiaseddin A, Irani S, Amirkhani MA, Dahmardehei M, Design and evaluation of a skin-on-a-chip pumpless microfluidic device Sci Rep. 2023 ;13(1):8861. doi: 10.1038/s41598-023-34796-3.
13. Nishizawa M, Saleh B, Marcucio R, Morioka K, A unique mouse model for quantitative assessment of biofilm formation on surgical implants in subcutaneous abscess J Vis Exp 2025 :(220). doi: 10.3791/68067.
14. Ovchinnikov E, Silanteva T, Stogov M, Diuriagina O, Godovykh N, Kubrak N, Suppression of *Staphylococcus aureus* biofilm formation under a short-term impact of low-intensity direct current in vitro and in a rat model of implant-associated osteomyelitis Iran J Basic Med Sci. 2024;27(2):247–255. doi: 10.22038/IJBMS.2023.72411.15938

