

MİKOLOJİDE HAYVAN MODEL ÇALIŞMALARINDA ÖNEMLİ İLKELER

Kenan DEĞERLİ

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa, (kdegerli@yahoo.com)

Mikoloji laboratuvarlarında mantar etmenlerinin virülansı, fizyopatolojisi, tanı yöntemleri, tedavi ve korunma yöntemleri, ilaç denemeleri, biyokimyasal özelliklerin 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 olguları sonucu ortaya çıkan fırsatçı mantar infeksiyonları ile ilgili yeni antimikotik ilaçların geliştirilmesi, yeni mantarların tanısı, sitokin ve kemokinlerin antimikotik ilaçlarla kombine edilerek tedavide kullanımlarında hayvan modelleri son yıllarda önemli yer tutmaktadır.

Deney hayvanlarının mikolojideki kullanımı iki ana başlık altında toplanabilir. Bunlar, infeksiyon modeli olarak ve tanı amaçlıdır. Deney hayvanlarını infeksiyon modeli olarak kullandığımız zaman, biyokimyasal özellikler, virülans, fizyopatoloji, immunolojik ve serolojik özellikler, yeni ilaç veya tedavi denemeleri ve korunma, kullanım alanları olarak karşımıza çıkmaktadır. Bunlardan tedavi amaçlı kullanıma bir örnek vermek gerekirse, yeni bir antimikotik aday önce diğer antimikotikler gibi *in vitro* deneyleri, hücre kültürü çalışmalarını başarı ile tamamlamalı, faz 1 ve faz 2 klinik çalışmalara geçmeden önce hayvan modellerinde de başarılı olmalıdır. Kullanılacak hayvan modelleri en basit ve kolay model olan fareden başlamalı; sırasıyla sıçan, tavşan, köpek ve son olarak en karmaşık ve insana genetik olarak en yakın canlı olan maymun kullanılmalıdır. Ancak tüm bu modellerdeki başarılı sonuçlar sonrasında insandaki klinik çalışmalar başlayabilir. Oluşturulan hayvan modellerinde yeni geliştirilen antimikotik ilacın etkinliği, farmakokinetiği, farmakodinamiği, optimum dozu, doku yoğunluğu, toksisitesi araştırılmaktadır. Aynı şekilde; mevcut antimikotik ilaçlar için de bu araştırmalar sıklıkla yapılmaktadır.

1960 yılından beri deney hayvanları kullanılarak birçok hayvan modeli deneysel infeksiyon çalışmaları için tanımlanmıştır. Güvenilir bir hayvan modelinin oluşturulması basit görülebilmekle birlikte uygulanabilmesi son derece güçtür. Bir hayvan modelinin kurulması için pek çok seçimin yapılması gerekmektedir. İnfeksiyon etmeninin davranışı; hayvanın türü, infeksiyonun yolu gibi etkenlere bağlı olarak değişkenlik gösterdiğinden, modelin koşullarına ilişkin seçimler çok dikkatli yapılmalıdır. Yüksek üreme, insan infeksiyonlarına yakınlık, yapılabilme pratikliği gibi pek çok koşullar yerine getirilmelidir. Bu nedenle, pek çok önemli infeksiyon için uygun hayvan modelleri halen yoktur.

Mikolojide en sık kullanılan deney hayvanları sıçan, fare, tavşan; daha az kullanılan deney hayvanları ise kobay, hamster, köpek ve maymundur.

Laboratuvar faresi:

Mus musculus: Küçük ve ucuzdur. Ağırlığı 120-160 g, yaşam süresi 12-24 aydır. Bakımı kolaydır, genetik açıdan sağlıklı kolayca sağlanabilir. Genetik homojenite 20 kuşaktan sonra

%98.6, 35-40 kuşak sonra pratik olarak %100 olur. Tüberkuloza doğal direnci vardır. Laboratuvar faresi aspergilloz, sistemik ve oral kandidoz için en uygun hayvan modelidir. Saf fare ırkları: C57BL/6 fare (C57BL/6Jico), Uluslararası kısaltma: B6, DBA/2 fare (DBA/2Jico), Uluslararası kısaltma: D2, BALB/c fare (BALB/cByJico). Uluslararası kısaltma; C, BALB/c fare (BALB/cByJico), BALB/cByJ-Nude fare (BALB/cByJico-nu), NUDE Fare (Swiss-nu), SCID (Severe Combined Immuno Deficiency) Fare C.B-17 Icr Ico-scid.

Laboratuvar sıçanı: *Rattus norvegicus*: İkinci en çok kullanılan deney hayvanıdır. Vücut kütlesi büyük olduğundan çalışmalarda erkek sıçanlar daha sık kullanılır. Yaşam süresi 24-36 aydır. Üç aylıkken yaklaşık 300 g olan sıçan haftada yaklaşık 5 g alır. Genetik homojenitesini sağlamak kolaydır. Vaginal ve oral kandidoz, son yıllarda önemi artan *Pneumocystis carinii* için en uygun hayvan modelidir. Blastomikoz, aspergilloz, koksidiyoidomikoz üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Saf sıçan ırkları: Wistar **sıçan** Ico: WI (IOPS AF/Han), OFA (Sprague-Dawley) sıçan: Ico OFA SD (I.O.P.S. Caw), Fischer F344 sıçan F344/Ico, Hairless sıçan OFA-hr/hr, SHR sıçan: SHR/Nico, Stroke-Prone SHR sıçan; SHRSP/Nico.

Kobay: *Albino guinea-pigs*: Araştırmalarda kullanılan ilk deney hayvanıdır. Laboratuvar kemiricileri arasında %2 oranında kullanılır. Yetişkin ağırlığı 700-1000 g, yaşam süresi 5-6 yıldır. Dermatofitoz, kandidoz, aspergilloz modelleri üzerinde çalışmalar yapılmaktadır.

Hamster: *Mesocricetus auratus*: Ağırlığı 150-180 g, yaşam süresi 2-3 yıldır. Suriye, Çin, Avrupa ve Ermenistan hamsteri türleri mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılır. Histoplazmoz, blastomikoz, sporotrikoz, penisilloz, parakoksidiyoidomikoz gibi dimorfik ve sistemik mantar enfeksiyonları oluşturulmaktadır.

Tavşan: *Oryctolagus cuniculus*: Yetişkin ağırlığı 2-5 kg, yaşam süresi 5-6 yıldır. Dermatofitozlar, invazif aspergilloz, blastomikoz, koksidiyoidomikoz modelleri üzerinde çalışmalar yapılmaktadır.

Köpek: *Canis familiaris*: Yaşam süresi 10-15 yıl, yetişkin ağırlığı 10-80 kg'dır. Sokak köpekleri uniform olmamaları, tıbbi geçmişlerinin bilinmemesi ve çeşitli hastalıklara yol açabilmeleri gibi nedenlerle bilimsel çalışmalar için uygun bulunmazlar. Laboratuvarda standart araştırma hayvanı **beagle** köpekleridir. Köpeklerdeki çalışmalar özellikle blastomikoz, koksidiyoidomikoz ve histoplazmoz modelleri üzerinde yoğunlaşmıştır.

Primatlar: Bu grup içinde en yaygın olarak kullanılan maymunlardır (*Cercopithecidae*, *Cebidae*, *Callithricidae*, *Lorsidae* türleri). İnsanlara yakın akraba canlılar oldukları için insan çalışmalarına geçmeden önceki hayvan modellerinin son basamağıdır. En değerli deney hayvanıdır. Diğer deney hayvanlarına belirgin üstünlükleri olmasına karşılık, gelişen sempati ve insancıl duygular, yetiştirilmelerinin güç ve pahalı oluşu bu modelin dezavantajlarıdır. *Candida* türleri ile yapılan oral ve vaginal kandidoz modelleri için en uygun hayvan modelidir.

İnfeksiyon oluşturmak için kullandığımız yollar, en sık kullandığımız deney hayvanlarının küçüklükleri göz önüne alındığında öldürücü olabilir. Enjeksiyon bölgelerine göre maksimum miktarlar Tablo 1'de gösterildiği gibidir.

Tablo 1. Enjeksiyon bölgelerine göre maksimum enjeksiyon miktarları

| Tür | sc (ml) | im (ml) | ip (ml) | iv (ml) | id (ml) |
|--------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Fare | 1-3 | 0.05 | 2-3 | 0.2 | 0.05 |
| Sıçan | 5-10 | 0.3 | 5-10 | 0.5 | 0.05 |
| Tavşan | 30-50 | 0.5-1.0 | 50-100 | 1-5 | 0.1 |

Oluşturulan infeksiyonların takibi ve kontrolü için en sık kullandığımız deney hayvanlarımızın kan parametreleri ve kritik kan alma miktarları da akılda tutulması gerekli bir diğer bilgidir (Tablo 2).

Tablo 2. Kan parametreleri ve kritik kan alma miktarları

| Tür | Hb g/dl | Htc % | Erişkin ort. vol. (ml) | Öldürmeden alınabilecek maks. vol. (ml) | Sakrifikasyonda alınabilecek maks. vol. (ml) |
|--------|-----------|-------|------------------------|---|--|
| Fare | 10.2-16.6 | 32-54 | 1.5 | 0.3 | 1.0 |
| Sıçan | 11.1-18.0 | 36-52 | 15 | 1.5 | 10 |
| Tavşan | 9.9-19.3 | 30-53 | 150 | 20 | 100 |

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. İnfeksiyonun başlangıcı bilindiği için yapılacak gözlemler ve bulgularla infeksiyonun kronolojik ilişkisi daha sağlıklı yapılır. İnsanlarda 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. İnsanlarda çok seyrek olarak ortaya çıkan infeksiyonlar oluşturularak üzerinde rahatlıkla çalışılabilir.

Hayvan modellerinin kullanıldığı çalışmalar sayesinde yeni geliştirilen tanı yöntemlerinin özgüllük, 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. Tedaviden sonra infeksiyon takibinde bazı kimyasal maddeler, protein, hormon ve enzimlerin tanındaki değerleri ve tanındaki yerleri konusunda yol gösterici sonuçlar alınabilmekte, çeşitli infeksiyon modellerinde serolojik değerlerin yorumları yapılabilmektedir.

Hayvan modellerinin kullanıldığı çalışmaların yukarıda belirtilen avantajları yanı sıra çeşitli dezavantajları da vardır. Hayvan modeli oluşturulan bir infeksiyonun mekanizması konusunda doğru bilgi sahibi olmak için patofizyolojik bulgular ve kliniğinin insan infeksiyonlarına benzer olması gereklidir. Doğal infeksiyonlarda genetik olarak farklı Mikro-organizmalar ve kökenler yine genetik olarak farklı insanları infekte ederken, deneysel modelde genellikle tek tip bir mikro-organizma genellikle birbirinin eşdeğeri olan hayvanları infekte eder ve bunun sonucunda doğallıktan uzaklaşma gerçekleşebilir. Bazı hayvanların genetik yapıları ve farklı konak yanıtları, araştırmanın sonucunu önemli ölçüde etkileyebilir. Hayvan sağlanmasını ve bakımını gerektirir. İnfeksiyon tedavi modellerinin çoğunda mikro-organizma ile birlikte antimikrobiyal ilaç uygulaması aynı anda yapılır. Bu, tedaviden çok profilaksi ile ilgili sorulara yanıt verebilir.

Planlanan tüm çalışmalar mutlaka etik sınırlar içerisinde ve etik kurulların denetiminde yapılmalıdır. Araştırmacıların günümüzde belki de en fazla bilmesi gereken özellik hayvanların etik kurallara uygun olarak yetiştirilmesi ve kullanılmasıdır. Ülkemizde de bu çalışmaları düzenleyen yasalar bulunmaktadır. Dünyada birçok ülkede değişik yasalar ve uluslararası antlaşmalar vardır. Bütün bu yasaların ortak özelliğini biz 3R kuramı ile açıklayabiliyoruz. Bunlar sırasıyla,

- Azaltma (Reduction):** Bu madde deneylerde yersiz hayvan kullanımını ve kaybedilmesini önleyip mümkün olduğu kadar az hayvan kullanılarak en iyi sonuca varmayı önermektedir.

- b) Yerine koyma (Replacement): Bu madde eğer mümkünse çalışmanın deney hayvanı üzerinde değil de alternatif yöntemlerle yapılmasını önermektedir.
- c) Hayvan rahatının sağlanması (Refinement): Bu maddeye göre hayvanların doğumlarından deney bitimine kadar kullanıldığı süreçte en iyi koşullar içinde bulundurulmaları gerekir. Beslenme, sağlık, yaşanan ortamın ısı, ışık, nem, havalandırma düzeyi, o türe uygun olmalıdır. Hayvanların hangi yaşta hangi alandaki kafese en fazla kaçar tane konacakları dahi belirlenmiştir. Bu sayının üstüne çıktığınızda hayvan haklarına aykırı davranmış olursunuz.

Üretimde ve deneylerde çalışanlar mutlaka 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 olabilir.

Deney sırasında hayvanların yataklıkları ve deney bitiminde de ölüleri ve doku atıkları oluşur. Bunların ideal yok edilmesi yakma fırınlarında veya bu olanak yoksa ayrı ve belirgin bir ambalajlama ile ilgili yerlere teslim edilmelidirler.

Etik ve bilimsel kurallara uygun olarak planlanan ve uygulanan hayvan modellerinin, mikolojinin birçok alanına büyük katkıları olmaktadır.

Kaynaklar

- 1) Zak O, Sande M, O'Reilly T. Introduction: The role of animal models in the evaluation of new antibiotics. Zak O, Sande MA, eds. *Handbook of Animal Models of Infection*. New York: Academic Press, 1999.
- 2) Değerli K, Balcıoğlu C, Kilimcioğlu AA, Girginkardeşler N, Tamay TA, Özbilgin A İmmunitesi baskılanmış modellerde *Pneumocystis carinii* pnömonisi oluşturulması ve trimetoprim-sülfametoksazol profilaksisi. *İnfek Derg* 2000; 14: 261-266.
- 3) Brummer E. Animal models for fungal infections: an update. *Mycopathologia* 2001; 152: 3-4.
- 4) Kuştimur S. Hayvan modellerinde *Candida* infeksiyonları. Kiraz N, Kiremitçi A, Akgün Y, ed. *Candida Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Sempozyumu (21-22 Haziran 2002, Eskişehir)* kitabında. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, 2002; 85-91.
- 5) Kamei K, Miyaji M. Animal models in mycology. Schmidt A, Weber OF, eds. *Animal Testing in Infectiology*. Vol. 9. Basel: Karger, 2001: 45-57.
- 6) Hökelek M. Tüberküloz çalışmalarında hayvan modelleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu (11-12 Haziran 2003, Samsın) kitabında. Samsun: Otakform Ofset, 2003: 464-466.
- 7) Altuğ T. Deneysel hayvan modelleri: genel prensipler ve etik. XI. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi (30 Mart-3 Nisan 2003, Antalya) kitabında. İstanbul: KLİMİK Derneği, 2003: 130-132.