



Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni
Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association
e-ISSN: 2667-8381

Semi Sertaç BAĞIRSAKÇI^{1,a,*}
Ender YARSAN^{2,b}

¹Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Farmakoloji ve Toksikolojisi Bölümü, Ankara

²Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara

ORCID^a: 0009-0008-1800-6095

ORCID^b: 0000-0002-3008-9240

***Sorumlu Yazar:** Semi Sertaç BAĞIRSAKÇI
E-Posta: s.sertac99@hotmail.com

Geliş Tarihi: 23.08.2024

Kabul Tarihi: 28.11.2024

16 (1): 01-08, 2025

DOI: 10.38137/vftd.1537594

Makale atf

Bağır sakçı, S.S. ve Yarsan, E. (2025). Zebra balığı (*Danio rerio*) modelinde ağrı çalışmaları, güncel yöntemler ve hayvan refahı uygulamaları, *Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni*, 16 (1), 01-10. DOI: 10.38137/vftd. 1537594.

ZEBRA BALIĞI (*DANIO RERIO*) MODELİNDE AĞRI ÇALIŞMALARI, GÜNCEL YÖNTEMLER VE HAYVAN REFAHI UYGULAMALARI

ÖZET. Zebra balığı (*Danio rerio*) son yıllarda biyomedikal araştırmalarda sıklıkla kullanılan ve kullanımı gün geçtikçe artan bir model organizmadır. Zebra balığının insan genleri ile yakın bir ilişkiye sahip olması rejenerasyon modellemeleri, transgenik modellemeler, toksisite çalışmaları, davranış çalışmaları, kanser modellemeleri, hastalık modellemeleri oluşturulmasına ve günümüzde sıkça tercih edilmesine sebep olmaktadır. Yeni keşfedilen veya etkileri bilinmeyen kimyasal maddelerin model organizmalarda denemesi kaçınılmazdır. Bu kapsamda zebra balıkları ağrı mekanizmalarını araştırmada ve bu mekanizmaların aydınlatılması ile yeni bileşik veya ilaçların sentezlenmesinde kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar esnasında 3R prensibi (Replacment, Reduction, Refinement) göz önüne alınarak balıkların deney sonlandırılmasına kadar geçen süreçte (taşıma, karantina, bakım-besleme, ortam koşulları, deney sonlandırılması) refah koşullarının en iyi şekilde sağlanması gereklidir. Bu derleme kapsamında; ağrı çalışmalarında zebra balığı modeli, kullanılan güncel yöntemler, ağrının yönetimi ve kullanılan ilaçlar ile balıkların refahının sağlanması için gerekli olan uygulamalara yönelik bilgiler sunulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Ağrı, *Danio rerio*, refah, zebra balığı.

PAIN STUDIES IN ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*) MODEL, CURRENT METHODS AND ANIMAL WELFARE PRACTICES

ABSTRACT. Zebrafish (*Danio rerio*) is a model organism that has been frequently used in biomedical research in recent years and its use is increasing day by day. The fact that zebrafish has a close relationship with human genes causes regeneration modelling, transgenic modelling, toxicity studies, behavioural studies, cancer modelling, disease modelling and is frequently preferred today. It is inevitable that newly discovered chemicals or chemicals with unknown effects should be tested in model organisms. In this context, zebrafish are used to investigate pain mechanisms and to synthesise new compounds or drugs by elucidating these mechanisms. During the studies, the 3R principle (Replacment, Reduction, Refinement) should be taken into consideration and the welfare conditions of the fish should be provided in the best way until the end of the experiment (transport, quarantine, care-feeding, environmental conditions, termination of the experiment). Within the scope of this review, it is aimed to provide information on pain studies in zebrafish model, current methods used, pain management and drugs used, and applications necessary to ensure the welfare of fish.

Keywords: *Danio rerio*, pain, welfare, zebrafish.

GİRİŞ

Zebra balığı (*Danio rerio*) son yıllarda biyomedikal araştırmalarda sıklıkla kullanılan ve kullanımı gün geçtikçe artan bir model organizmadır (Khan ve Alhewairini, 2018). İnsan genleri ile yakın bir ilişkiye sahip olması zebra balığının rejenerasyon modelleri, transgenik modeller ve genetik taramalar, kimyasal maddeler ve toksisite çalışmaları, embriyonik ve yetişkin hastalık modelleri, davranış çalışmaları, kanser modelleri oluşturulmasına ve günümüzde sıkça tercih edilmesine sebep olmaktadır (Galindo-Villegas, 2020; Patton ve ark., 2021). Ayrıca, embriyonun dış ortamda gelişip şeffaf bir yapıda olması, dirençli olması, yetiştirilmesinin kolay olması, bakım ve besleme maliyetlerinin düşük olması diğer model organizmalar ile mukayese edildiğinde zebra balıklarının çalışmalarda kullanımını oldukça öne çıkartmaktadır (Khan ve Alhewairini, 2018).

Yeni keşfedilen veya etkileri bilinmeyen kimyasal maddelerin model organizmalarda denemesi gerekmektedir. Bu bağlamda 3R prensibi (Replacement, Reduction, Refinement) oldukça önem arz etmektedir. Değiştirme (Replacement), toksisite denemelerinde bazı hayvanlar yerine zebra balığı larvaları kullanılmasına imkan tanır. Azaltma (Reduction), deneylerde çok yönlü ve kaliteli bir model olmasından dolayı ileri aşamalarda kullanılacak deney hayvanı sayısının azaltılmasını sağlar. İyileştirme (Refinement), zebra balığı larvasının ilk dönemlerde şeffaf olması larva temelli deney düzenekleri hazırlanmasına ve en az miktarda ağrı, acı, sıkıntı vererek deneylerin sonuçlarının incelenebilmesini sağlamaktadır (Cassar ve ark., 2019).

Zebra balıklarında refah uygulamaları kapsamında 3R prensibi göz önüne alınarak nakliye işlemleri, karantina süreci ve deney sonlandırılması esnasında ötanazi işlemlerinin yapılması hayvanların refahının sağlanması konusunda önemli bir yere sahiptir.

Balıkların refahını arttırmak için nakil esnasında bazı hususlara dikkat edilmesi gerekir (Dhanasiri ve ark., 2013). Bu hususların başında nakil süresi ve bu süre zarfında balıkların içerisinde bulunduğu suyun optimal koşulları sağlanması yer almaktadır. Bunun yanı sıra aracın özellikleri, güvenliği, personel yetkinliği, yükleme veya bekleme tesisinin çevresel kontrolü gibi durumlara dikkat edilmesi gerekir. Oluşabilecek potansiyel sorunların önlenmesi için balıkların embriyo döneminde nakil edilmesi önerilir (Cartner ve ark., 2020).

Karantinanın amacı yeni gelen balıkları izole ederek olabilecek patojenlerin veya zararlı konakçıların çevre sulara karışmasını ve diğer balıklara bulaşmasını engellemektir. Tesise yeni getirilen balıkların düzgün bir şekilde yönetilememesi durumunda tesisteki tüm balıkların patojen riski ile karşı karşıya kalması kaçınılmazdır (Matthews ve ark., 2002).

Her tesisin kendi ortam koşulu ve şartlarına göre standart bir protokol oluşturması en doğru yöntemdir. Protokoller balıkların yaşam dönemlerine göre farklılık göstermektedir. Balıklar tesise embriyo olarak getirilmiş ise; yüzey dezenfeksiyonu yapılmalı ve bulunduğu kaptan başka bir petri kabına aktarılıp ölü embriyolar ve artıklar temizlendikten sonra etüve kaldırılmalıdır. Genel bakım ve beslemesinin yanında ilk 1-2 hafta herhangi bir hastalık belirtisinin olup olmadığı gözlenen balıklar hastalık yok ise 2-4 hafta içerisinde ana sisteme alınmalıdır. Balıklar tesise yetişkin olarak getirilmiş ise; genel durumları değerlendirildikten sonra herhangi bir sağlık sorunu yoksa nakliye torbasına ufak birkaç delik açılıp sistemden ayrılan bir tankın içerisine koyularak su değerlerinin birbirine yaklaşması beklenir. Su değerleri benzer seviyelere gelince balıklar sistemden çıkarılan başka bir tanka aktarılıp 2-4 hafta süre ile gözlemlendikten sonra herhangi bir sağlık sorunu belirlenmediyse ana sisteme dahil edilmelidir (Lieggi, 2020).

Ötanazi; bir hayvanda insancıl ölüme sebep olma eylemi olarak tanımlanır. Bu işlem en az acı, ağrı, rahatsızlık ile hızlı bir şekilde bilinç kaybı oluşturularak ve geri dönüşümsüz bir biçimde gerçekleştirilmelidir (Underwood ve Anthony, 2020). Zebra balıklarında ötanazi uygulaması için kafaya darbe ile beyin sarsıntısı, elektrik verme, yüksek doz anestezi madde uygulanması ve soğuk suda bekletme gibi yöntemler kullanılabilir (Köhler ve ark., 2017) (Tablo 1). Araştırmacılar Trikaın metansülfonat, Öjanol, Lidokain hidroklorit, 2-Fenoksietanol, Benzokain, Etomidat, Propofol gibi maddeleri ötanazide kullanmak için çalışmalar yapmışlardır. Bu maddeler arasından en sık kullanılan kimyasal MS-222/Trikaın/Trikaın metansülfonat'tır (Collymore, 2020). Trikaın; sodyum iyon kanallarını depolarize ederek bilinç kaybı ve hipoksiye bağlı ölüme sebebiyet verir (Collymore ve ark., 2016). Ötanazi yapılmak istenen balıklar bu anesteziikleri ihtiva eden solüsyonlara konulur ve operküler hareketler kesildikten sonra yetişkinlerde en az 10 dakika, larvalarda en az 1 saat bu solüsyonlar içerisinde bekletilir (Collymore, 2020). Hızlı soğutma yönteminde balıklar hipotermal şoka girer, ardından en az ağrı ve rahatsızlık ile birlikte çok kısa sürede ölüm meydana gelir (Matthews ve Varga, 2012).

Tablo 1. Ötanazi yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları

Yöntem	Avantaj	Dezavantaj
Kafaya Darbe	Hızlı Basit cihaz	Zebra balığı küçük boyutlu olduğu için uygulaması zordur. Beyin incelenemez. Embriyo ve larvalarda kullanılamaz. Zebra balıklarında kullanılmak üzere yeterli yöntem ve cihaz yoktur.
Elektrik Verme	Hızlı	Kas dokusunda bükülme ve hasar yapar. Embriyo ve larvalarda kullanılamaz. Balıklar çoğu maddeye karşı olumsuz reaksiyon gösterir. Bazı maddelerin erişilebilirliği zordur.
Yüksek Doz Anestezi	Seçim yapılabilecek birçok madde mevcuttur	Kimyasal kirlenmeye sebep olur. Personel güvenliğini riske atabilir. Etki ve sonuçlar diğer yöntemlerden daha geç gerçekleşir. Embriyo ve larvalarda etkinliği düşüktür.
Hızlı Soğutma	En hızlı yöntem Güvenilir (Geri dönüşümsüz) Çalışanlar için güvenilir Kimyasal kirlenme olmaz Kolay erişilebilir	Cerrahi müdahaleler için uygun değildir. Embriyolarda sadece bu yöntemin kullanılması güvenilir değildir.

Ağrı

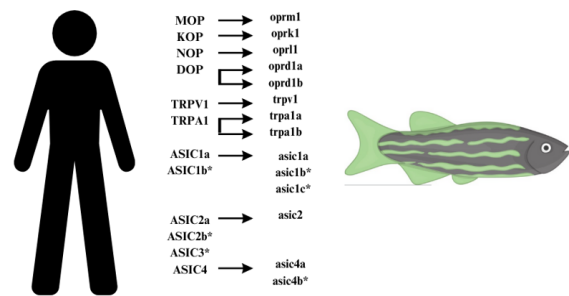
Ağrı, rahatsız edici bir deneyim olsa da vücudun zarar görmemesi için bir uyarı sistemidir. Nositseptör adı verilen özelleşmiş reseptörlerin ağrıya neden olabilecek uyarılar tarafından tetiklenmesiyle başlar. Nositseptörlerdeki ileti Aδ lifleri (hızlı iletim) ve C lifleri (yavaş iletim) aracılığıyla kortekste bulunan, ağrının duygusal ve bilişsel yönlerini oluşturan bölgelerle buluştuğunda ağrı hissi gerçekleşir (Yağcı ve Saygın, 2019).

Nositseptörlerin mikro çevresini düz kaslar ve sinir uçları oluşturmaktadır. Nositseptörler fiziksel uyarılmaların yanında P maddesi, prostaglandin, bradikinin, lökotrienler, Tümör Nekroz Faktör-α, interlökin, histamin gibi aljojenik maddeler aracılığıyla da duyarlılıklarında artış gösterirler. Çevresel sinir uçlarının uyarılması ile birlikte nörotransmitter madde salınımı gerçekleşir. Bu maddeler nositseptörlerin sensitivitelinde artış yaratmanın yanında hücre zarında yıkıcı etkiler meydana getirirler. Siklooksijenaz (COX) enziminin etkinliğiyle arasıdonik asitin önce siklik endoperoksitlere sonra prostaglandinlere dönüşümü gerçekleşir. Prostaglandinler bir yandan nositseptif duyarlılığı arttırırken diğer yandan vazodilatasyonu arttırarak ortamda aljojenik madde birikimine sebep olabilirler (Yağcı ve Saygın, 2019).

Zebra Balığında Ağrı Duyumu

Canlılar yaralanma ve zararlı uyarıların nosisepsiyon yolu ile algılayıp bu zararlı etmenlerden kaçınarak hayatlarına devam edebilirler. Zebra balıkları sıklıkla ağrı ve nosisepsiyon mekanizmalarını araştırmada

model organizma olarak kullanılır. Ağrı ve nosisepsiyon mekanizmalarının anlaşılması ile yeni bileşikler veya ilaçlar ortaya çıkarılabilir. Bu durum hoş olmayan ağrı deneyimini ortadan kaldırmak ve hayvanın refahının sağlanması bakımından önemlidir (Sloman ve ark, 2019). Memelilere benzer şekilde zebra balıklarında da pek çok nosiseptif reseptör ve alt birimlerinin bulunması komplike bir sistem olduğunun göstergesidir (Malafoglia ve ark., 2013) (Şekil 1).



Şekil 1. İnsan ve zebra balıklarında bulunan reseptörler ve genler (Costa ve ark., 2022'den uyarlanmıştır).

Opioid Sistem

Opioid sistem ağrı kontrolü, hemoastaz, ruh hali ve refah açısından önemli bir mekanizmadır. Günümüze kadar üç çeşit ana opioid reseptörü tanımlanmış olup opioid reseptörleri, insanlarda kodlanan en büyük membran proteini olan G protein bağlı reseptör (GPCR) ailesindendir. Bu reseptörler aneljezik etkilere

sahip olmasına rağmen farklı duygusal davranışlar oluşmasına neden olurlar. Delta Opioid Reseptörü (DOP) OPRD1 geni tarafından kodlanır ve DOP agonistlerinin bilinen özellikleri kaygıyı azaltması ve antidepresan etki oluşturmaktadır. Morfin için μ = Mu opioid reseptörü (MOP) OPRM1 geni tarafından kodlanırken MOP agonistleri coşku vericidir ve strese karşı etkilidir. Ketosiklazosin için κ = kappa opioid reseptörü (KOP) OPRK1 geni tarafından kodlanır. KOP agonistleri ise olumsuz duygular ve stres ile ilişkilidir. Bunların yanı sıra opioid sınıfında sayılmayan ama reseptör sisteminin bir üyesi sayılan OPRL1 geni tarafından kodlanan nosiseptin/orfanin (NOP) reseptörü de mevcuttur ve analjezik etkiler gösterir (Chu Sin Chung ve Kieffer, 2013; Valentino ve Volkow, 2018).

Zebra balıkları memelilerle pek çok ortak reseptöre sahiptir ve opioid reseptörleri de bu ortaklık yönünden oldukça benzerlik gösterir. Zebra balığı Mu Opioid Reseptörü (zMOP) insanlardaki Mu Opioid Reseptörü (MOP) ile %74, zebra balığı Kappa Opioid Reseptörü (zKOP) insanlardaki Kappa Opioid Reseptörü (KOP) ile %70, zebra balığı Delta Opioid Reseptörü (zDOPa) insanlardaki Delta Opioid Reseptörü (DOP) ile %66 genetik benzerlik gösterirken (zDOPb) %65 benzerlik gösterir, memelilerde ve zebra balıklarında bulunan NOP ise birbirleri ile %58-59 benzerlik göstermesine rağmen işlevsellik bakımından farklılıklara sahiptir. zMOP, zKOP ve zNOP memelilerde olduğu gibi oprm1, oprk1 ve oprl1 ortolog genleri tarafından kodlanır. zDOP memelilerde oprd1 geni tarafından kodlanırken zebra balıklarında farklı olarak bu oprd1a ve oprd1b geni tarafından kodlanır (Barrallo ve ark., 2000; Alvarez ve ark., 2006; De Velasco ve ark., 2009; Costa ve ark., 2022).

Zebra balıklarında bazı öncüller opioid peptidler tarafından kodlanır. Bu öncüller penka ve penkb diye adlandırılan iki adet proenkefalin genini, pomca ve pomcb diye adlandırılan iki adet proopiomelanokortin genini, pdyn adlı bir adet prodinorfin genini ve pnoca, pnocb olarak adlandırılan iki adet pronosiseptin geninin kodlanmasını sağlar (Gonzalez-Nunez ve Rodriguez, 2009).

Geçici Reseptör Potansiyel (TRP) Ailesi

Geçici reseptör potansiyel (TRP) ailesi ilk olarak 1969 yılında *Drosophila* fotoreseptörleri olarak keşfedilmiştir. Sonrasında yapılan çalışmalarda Ca^{+2} 'a geçirgen iyon kanalları olduğu ve bu sayede sıcaklık, pH, kimyasal ajanlar ve ozmolaritedeki değişikliklere karşı yanıt görevi oluşturduğu anlaşılmıştır. TRP kanalı yapısal olarak katyon gözenekler oluşturacak biçimde tetramerler şeklinde dizilim gösterir (Marwaha ve ark., 2016). İnsanlarda TRP kanallarının vanilloid (TRPV), melastatin (TRPM), kanonik (TRPC), ankirin (TRPA1), polisistin (TRPP) ve mukolipin (TRPML) olarak altı alt ailesi bulunur. Zebra balıkları insanlarda bulunan TRP reseptörlerini içermekle beraber ek olarak

insanlarda bulunmayan NompC'ye (TRPN) sahiptir (Costa ve ark., 2022).

Evrimsel süreçte TRPA1 geninin fonksiyonları hayvan türleri arasında büyük ölçüde korunmasına rağmen zebra balıklarında insanlardan farklı olarak trpa1a ve trpa1b olmak üzere iki tane gen mevcuttur. Yapılan çalışmalarda TRPA1'in duyuşal nöronlarda eksprese edildiği trpa1a'nın tahriş edici kimyasallar ile aktiveleştirildiği, trpa1b'nin ise sıcaklık ile ilgili uyarılara yanıt oluşturduğu bildirilmiştir (Prober ve ark., 2008).

TRPV1 mekanik, ışık, ısı, osmoregülasyon uyarıları ile aktive edilen ve katyonların akışına yol açan polimodal bir reseptördür. Memelilerde TRPV1, TRPV2 ve TRPV4 bulunurken zebra balıklarında TRPV1 ve TRPV2'nin ortologu olarak sadece TRPV1/2 ve TRPV4 bulunur. Bu reseptörlerin etkisi ile özellikle 5 günden küçük olan zebra balığı larvaları 24 °C altındaki ve 31 °C üzerindeki sıcaklıklardan kaçınırlar. Ayrıca bu reseptörün etkilenmesi sonucunda termal hiperaljezi durumu gözlenebilir (Saito ve Shingai, 2006; Marwaha ve ark., 2016).

Endokannabinoid Sistem

Endokannabinoid sistemin ağrı iletimi, sinapslar arası nörotransmisyon, inflamasyon ve enerji metabolizması gibi biyolojik olaylar üzerinde önemli etkileri vardır. Bu sistem kannabinoid reseptörleri, endojen kannabinoid ligandları ve ligandların oluşumuna veya bozunmasına sebep olan enzimlerden oluşur (Basavarajappa ve ark., 2017). Kannabinoidler farmakolojik etkilerini GPCR ailesine mensup kannabinoid reseptörü 1 (CB₁) ve kannabinoid reseptörü 2 (CB₂) üzerinden oluşturur. CB₁ reseptörü aktive olduktan sonra adenilat siklaz ve Ca^{+2} kanallarını inhibe edip K⁺ kanallarını aktive ederek nörotransmitter madde salınmasını engeller (Luchtenburg ve ark., 2019). Bu şekilde merkezi sinir sistemi uyarımı ve inhibisyonu gerçekleştirilerek kaygı, ruh hali, iştah, hafıza ve lokomotor aktivitelerin düzenlenmesini sağlar. CB₂ reseptörüne ise bağışıklık sistemi hücrelerinde sıkça rastlanır. Bu reseptör adenilat siklaz inhibisyonunu sağlayarak antiinflamatuvar etki oluşumunu sağlar (Ibsen ve ark., 2017).

CB₁ reseptörleri özelleşmiş sinir liflerinde eksprese edilerek nörotransmitter salınımını engeller. CB₂ reseptörü ise aferent nöronların zararlı uyarılara karşı tepkisini değiştiren araçların hücrelerden salınımını engelleyerek nosiseptif tepkilerin düzenlenmesine yardımcı olurlar (Wilson ve Nicoll, 2002; Ibrahim ve ark., 2005).

Zebra balıklarının endokannabinoid sisteminin memeli ortologları ile karşılaştırıldığı çalışmalarda CB₁ reseptörünün %73, CB₂ reseptörünün %39 benzerlik gösterdiği ve temel olarak aynı reseptör, ligand ve enzimlere sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır (Krug II ve Clark, 2015). Ek olarak zebra balığı genomu aralarında

%98 benzerlik olan iki adet (cb2a ve cb2b) reseptör genini kodlamasından dolayı memeli muadilleri ile farklılık oluşturur (Rodriguez-Martin ve ark., 2007).

Asit algılayan İyon Kanalları (ASIC)

Asit algılayan iyon kanalları (ASIC) nosisepsiyon, mekanosensiyon ve sinaptik iletimde görevlidir. Bu reseptörlerde herhangi bir uyarım oluşturmak için pH azalmasından sonra hücre dışı protonlar aktive olur ve sodyum kanalının açılarak aksiyon potansiyeli oluşturulması sağlanır (Lingueglia, 2007). Memelilerdeki reseptörler ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3 ve ASIC4 olmak üzere 6 alt birimden oluşurken zebra balıklarında zASIC1a, zASIC1b, zASIC1c, zASIC2, zASIC4a ve zASIC4b alt birimleri mevcuttur. zASIC reseptörlerinin filogenetik analizi yapıldığında zASIC1a, zASIC2 ve zASIC4a'nın memelilerle ortolog olduğu ortaya konulmuştur (Sneddon, 2019).

Zebra Balığında Deneysel Ağrı Oluşturma Yöntemleri

Zebra balığı son yıllarda deneylerde sıklıkla tercih edilen popüler bir model organizmadır. Zebra balıklarının deneylerde kullanımının hızla artması deneylerden kaynaklanan acı, ağrı ve sıkıntının en aza indirilmesi ile hayvanların refahının artırılması konusunda daha fazla araştırma yapma gereği doğurmuştur. Deney esnasında veya deney sonlandırılırken hayvanların en az ağrı ve acıya maruz kalması için etkili ağrı kesicilerin belirlenmesi gereklidir. Ağrı kesicilerin belirlenebilmesi için balıklarda deneysel olarak ağrı oluşturulması önemlidir (Wong ve ark., 2014).

Zebra balıklarında ağrı duyumu oluşturmak için kullanılan yöntemlerin, ağrıya neden olan gerçek mekanizmayı yansıtmaması, ağrının moleküler ve sinirsel temellerinin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olur. Bunun için asetik asit, alil izotiyosiyanat, sinemaldehit, histamin, Freund adjuvanı, formalin gibi maddeler balıkların dudak, periton ve kuyruklarına enjekte edilmiş veya kuyruk kırpma, sıcaklık gibi yöntemler kullanılarak ağrı duyumu oluşması sağlanmıştır. Bu işlemlerin sonunda operküler atım hızının artması, yüzme hızının azalması, kat edilen mesafenin azalması, sallanma benzeri davranış, dudaklarını duvarlara sürme, dipte kalma, tank keşfinde isteksizlik gibi davranışsal değişiklikler tespit edilmiştir (Reilly ve ark., 2008; Taylor ve ark., 2017; Leitte ve ark., 2021; Ohnesorge ve ark., 2021; Costa ve ark., 2022).

Ağrı Tespit Yöntemleri

Ağrıyı tespit etmek için kullanılan yöntemler arasında vücudun davranış ve tepkilerini izlemek en büyük yol göstericilerden birisidir. Bu testlerin uygulanmasında kamera takip sistemleri ve bu verileri anlamlandırmak için yazılım sistemleri gerekmektedir (Ohnesorge ve ark., 2021).

Davranış testlerinde balıklar bir tanka alınır ve belirli bir süre normal hareketleri kamera sistemiyle gözlemlenir. Sonrasında balıklara ağrı oluşturmaya maddeler enjekte edilir ve bir müddet daha gözleme tabi tutulur. Wrihting test yönteminde; bekleme süresinin sonunda kayıtlar bilgisayar programına aktarılır ve balıkların kıvrılma durumları belirlenerek ağrı tespit edilir. Lokomotor aktivite yönteminde ise; bekleme süresinin sonunda kayıtlar bilgisayar programına aktarılır ve baştaki hareketleri ile ağrı oluşturmaya madde enjekte edildikten sonraki hareketleri karşılaştırılır (Ohnesorge ve ark., 2021; Adedara ve ark., 2022).

Zebra balıklarında ağrı yolları ve ağrı duyumu araştırmak için moleküler yöntemlere başvurulmaktadır. Bu yöntemler arasında Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Western Blot, Yerinde Hibridizasyon gibi teknikler yer almaktadır. Bu teknikler kullanılarak genlerin ifade düzeyleri, protein ifadeleri incelenerek ağrı ile ilişkili genler, proteinler ve reseptörler ile ilgili araştırmalar yapılmaktadır (Gonzalez-Nunez ve Rodriguez, 2009; Gau ve ark., 2013; Ohnesorge ve ark., 2021).

Optogenetik teknolojisiyle ışığa duyarlı olan proteinler aracılığıyla bazı hücrelerin aktivite takibi mümkündür. Burada ışığa duyarlı proteinler hücrelere veya dokulara yerleştirilip sonrasında ışık ile uyarılarak herhangi bir hücrenin aktivite durumu olup olmadığı kontrol edilmektedir (Beyaz ve Aslan, 2018). Yapılan bir çalışmada zebra balıklarının başı sabitlenip termal lazer ile nosiseptif bir uyarım oluşturulduktan sonra, RFamid nöropeptid VF (NPVF) eksprese eden nöronlardaki aktivite azalırken kaçış benzeri kuyruk hareketleri arttığı tespit edilmiştir (Madelaine ve ark., 2017).

Larva zebra balığının beyinde yaklaşık 80.000 ile 100.000 arasında nöron bulunur ve bu durum beyin görüntülenmesi için yüksek hücresel çözünürlük sağlayacak kapasitededir. Floresan görüntüleme yöntemiyle; döllenmeden sonra larvaların sinir hücrelerinin belirli bir alt kümesine yeşil floresan proteini (GFP) eklenerek transgenik balıklar üretilir. Bu transgenik balıklarda ağrı duyumu oluşturularak floresan ışık altında tespit yapılır. Buna ek olarak GFP ve kalmodulinin birleştirilmesi ile genetik olarak kodlanmış bir kalsiyum belirteci olan GCaMP elde edilerek ağrı durumları floresan görüntüleme ile belirlenmektedir (Ohnesorge ve ark., 2021).

Zebra Balıklarında Ağrı Yönetimi

Ağrı, zebra balıkları için stresli ve zararlı bir deneyimdir. Zebra balığı ağrı araştırmalarındaki genel amaç deneylerde ağrı oluşturabilecek bir uyarım ile karşı karşıya kalmış balıkların 3R kuralları kapsamında refah seviyesinin yükseltilmesidir. Bu doğrultuda ağrının önlenmesi için etki mekanizmalarına göre opioidler, anestezikler veya non-steroid anti-inflamatuar ilaçlar (NSAID'ler) kullanılır (Tablo 2).

Tablo 2. Zebra balıklarında kullanılan etken maddeler ve dozları.

Kullanılan Madde	Kullanılma Yolu	Doz	Kaynak
2 Fenoksietanol	Daldırma	3 mg /L	(von Krogh ve ark., 2021)
Asetilsalisilik asit	Daldırma	2,5 mg/L	(Schroeder ve Sneddon, 2017)
Benzokain	Daldırma	33 mg/L	(Thomson ve ark., 2019)
Bupivacaine	Daldırma	1 mg/L	(Köhler ve ark., 2017)
Buprenorfin	Daldırma	0,3 mg/ml	(Chatigny ve ark., 2018)
Butorfanol	Daldırma	0,2 ve 0,5 mg/L	(Chatigny ve ark., 2018)
Diklofenak	P.İ.	40 mg/kg	(Costa ve ark., 2019)
Etomidat	Daldırma	2 mg/L	(Martins ve ark., 2016)
Fluniksin	Daldırma	2-20 mg/L	(Chatigny ve ark., 2018)
İbuprofen	Daldırma	400 µm	(Chatigny ve ark., 2018)
İndometazin	P.İ.	5-20 µl	(Magalhães ve ark., 2017)
Izoöjenol	Daldırma	540 mg/L	(von Krogh ve ark., 2021)
İzofluran	Daldırma	0,5 ml/L	(Vargas, 2018)
Ketamin	K.İ.	30-130 µg/ml	(Vargas, 2018)
Lidokain	Daldırma; K.İ.	2,5-5 mg/L	(Schroeder ve Sneddon, 2017)
Morfin	K.İ.; P.İ.; Daldırma	48 mg/L	(Lopez-Luna ve ark., 2017)
MS-222	Daldırma	50-200 mg/L	(Martins ve ark., 2016)
Öjenol	Daldırma	60-100 µg/ml	(Martins ve ark., 2016)
Propofol	Daldırma	2,5-7,5 mg/L	(Martins ve ark., 2016)
Tramadol	K.İ.	10-25 µg/balık	(Chatigny ve ark., 2018)

Ağrı kesici madde seçilmesi esnasında balıklarda ağrı oluşturan etkenin bilinmesi ve balıkların larva (L) veya ergin (A) formuna göre ilaç seçilmesi daha etkili bir sonuç elde edilmesine yardımcı olur (Deakin ve ark., 2019; Ohnesorge ve ark., 2021).

SONUÇ

Zebra balıklarının insan genleri ile yakın bir ilişkiye sahip olması çeşitli hastalık ve toksisite denemelerinde tercih edilmesine sebep olmaktadır. Zebra balıklarının deneylerde kullanımının artmasından dolayı deney esnasında veya sonrasında meydana gelebilecek acı, ağrı, sıkıntının en aza indirilmesi ve hayvanların refahının artırılması göz önünde bulundurulmalıdır. Bunun için zebra balıklarındaki ağrı mekanizması, reseptörler ve davranışların bilinmesi önem arz eder. Ayrıca yapılan çalışmalar, zebra balıkları ile insanların ağrı reseptörlerinin oldukça benzer olduğunu göstermiştir. Bu bulgunun, yeni keşfedilen ağrı kesici ilaçların zebra balığı modelinde test edilmesine imkân sunarak, ağrı tedavisinde önemli gelişmelere yol açabileceği düşünülmektedir. Konu bu yönüyle de değerlendirildiğinde, zebra balıklarında ağrı çalışmaları ve güncel yöntemler üzerinde daha fazla araştırma yapılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

KAYNAKLAR

Adedara, I. A., Costa, F. V., Biasuz, E., Canzian, J., Farombi, E. O. & Rosemberg, D. B. (2022). Influence of acid-sensing ion channel blocker on behavioral responses in a zebrafish model of acute visceral pain. *Behavioural Brain Research*, 416, 113565.

Alvarez, F. A., Rodriguez-Martin, I., Gonzalez-Nuñez, V., Marrón Fernández de Velasco, E., Gonzalez Sarmiento, R. & Rodríguez, R. E. (2006). New kappa opioid receptor from zebrafish *Danio rerio*. *Neuroscience Letters*, 405(1-2), 94-99.

Barrallo, A., González-Sarmiento, R., Alvar, F. & Rodríguez, R. E. (2000). ZFOR2, a new opioid receptor-like gene from the teleost zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Research. Molecular Brain Research*, 84(1-2), 1-6.

Basavarajappa, B. S., Shivakumar, M., Joshi, V. & Subbanna, S. (2017). Endocannabinoid system in neurodegenerative disorders. *Journal of Neurochemistry*, 142(5), 624-648.

Beyaz, S. & Aslan, A. (2018). Optogenetik. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 23(2), 182-191.

Cartner, S. C., Durboraw, E. & Watts, A. (2020). Regulations, policies and guidelines pertaining to the use of zebrafish in biomedical research. In: *The Zebrafish in Biomedical Research* (pp. 451-459). Academic Press.

Cassar, S., Adatto, I., Freeman, J. L., Gamse, J. T., Iturria, I., Lawrence, C., Muriana, A., Peterson, R. T., Van Cruchten, S. & Zon, L. I. (2020). Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, 33(1), 95-118.

Chatigny, F., Creighton, C. M. & Stevens, E. D. (2018). Updated Review of Fish Analgesia. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, 57(1), 5-12.

Chu Sin Chung, P. & Kieffer, B. L. (2013). Delta opioid receptors in brain function and diseases.

- Pharmacology & Therapeutics*, 140(1), 112–120.
- Collymore, C. (2020). Anesthesia, analgesia, and euthanasia of the laboratory zebrafish. In: *The Zebrafish in Biomedical Research* (pp. 403-413). Academic Press.
- Collymore, C., Banks, E. K. & Turner, P. V. (2016). Lidocaine hydrochloride compared with MS222 for the euthanasia of zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 55(6), 816-820.
- Costa, F. V., Rosa, L. V., Quadros, V. A., de Abreu, M. S., Santos, A. R. S., Sneddon, L. U., Kalueff, A. V. & Rosemberg, D. B. (2022). The Use of Zebrafish as a Non-traditional Model Organism in Translational Pain Research: The Knowns and the Unknowns. *Current neuropharmacology*, 20(3), 476–493.
- Costa, F. V., Rosa, L. V., Quadros, V. A., Santos, A. R. S., Kalueff, A. V. & Rosemberg, D. B. (2019). Understanding nociception-related phenotypes in adult zebrafish: Behavioral and pharmacological characterization using a new acetic acid model. *Behavioural Brain Research*, 359, 570–578.
- Deakin, A. G., Buckley, J., AlZu'bi, H. S., Cossins, A. R., Spencer, J. W., Al'Nuaimy, W., Young, I. S., Thomson, J. S. & Sneddon, L. U. (2019). Automated monitoring of behaviour in zebrafish after invasive procedures. *Scientific Reports*, 9(1), 9042.
- Dhanasiri, A. K., Fernandes, J. M. & Kiron, V. (2013). Acclimation of zebrafish to transport stress. *Zebrafish*, 10(1), 87–98.
- Galindo-Villegas, J. (2020). The zebrafish disease and drug screening model: A strong ally against Covid-19. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 680.
- Gau, P., Poon, J., Ufret-Vincenty, C., Snelson, C. D., Gordon, S. E., Raible, D. W. & Dhaka, A. (2013). The zebrafish ortholog of TRPV1 is required for heat-induced locomotion. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(12), 5249–5260.
- Gonzalez-Nunez, V. & Rodríguez, R. E. (2009). The zebrafish: a model to study the endogenous mechanisms of pain. *ILAR Journal*, 50(4), 373–386.
- Ibrahim, M. M., Porreca, F., Lai, J., Albrecht, P. J., Rice, F. L., Khodorova, A., Davar, G., Makriyannis, A., Vanderah, T. W., Mata, H. P. & Malan, T. P., Jr (2005). CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(8), 3093–3098.
- Ibsen, M. S., Connor, M. & Glass, M. (2017). Cannabinoid CB1 and CB2 receptor signaling and bias. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 2(1), 48-60.
- Khan, F. R. & Alhewairini, S. (2018). Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism. *Current Trends in Cancer Management*, 27, 3-18.
- Köhler, A., Collymore, C., Finger-Baier, K., Geisler, R., Kaufmann, L., Pounder, K. C., Schulte-Merker, S., Valentim, A., Varga, Z. M., Weiss, J. & Strähle, U. (2017). Report of Workshop on Euthanasia for Zebrafish-A Matter of Welfare and Science. *Zebrafish*, 14(6), 547–551.
- Krug, R. G. & Clark, K. J. (2015). Elucidating cannabinoid biology in zebrafish (*Danio rerio*). *Gene*, 570(2), 168–179.
- Leite, G. O., Santos, S. A. A. R., Ribeiro, A. D. D. C., Bezerra, F. M. D. H. & Campos, A. R. (2021). Impact of sex and environmental conditions on the responses to pain in zebrafish. *BrJP*, 4(1), 9-14.
- Lieggi, C. (2020). Importation and quarantine. *The Zebrafish in Biomedical Research*, 431-442.
- Lingueglia E. (2007). Acid-sensing ion channels in sensory perception. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(24), 17325–17329.
- Lopez-Luna, J., Al-Jubouri, Q., Al-Nuaimy, W. & Sneddon, L. U. (2017). Reduction in activity by noxious chemical stimulation is ameliorated by immersion in analgesic drugs in zebrafish. *The Journal of Experimental Biology*, 220(Pt 8), 1451–1458.
- Luchtenburg, F. J., Schaaf, M. J. M. & Richardson, M. K. (2019). Functional characterization of the cannabinoid receptors 1 and 2 in zebrafish larvae using behavioral analysis. *Psychopharmacology*, 236(7), 2049–2058.
- Madelaine, R., Lovett-Barron, M., Halluin, C., Andelman, A. S., Liang, J., Skariah, G. M., Leung, L. C., Burns, V. M. & Mourrain, P. (2017). The hypothalamic NPVF circuit modulates ventral raphe activity during nociception. *Scientific Reports*, 7, 41528.
- Magalhães, F. E. A., de Sousa, C. Á. P. B., Santos, S. A. A. R., Menezes, R. B., Batista, F. L. A., Abreu, Â. O., de Oliveira, M. V., Moura, L. F. W. G., Raposo, R. D. S. & Campos, A. R. (2017). Adult Zebrafish (*Danio rerio*): An Alternative Behavioral Model of Formalin-Induced Nociception. *Zebrafish*, 14(5), 422–429.
- Malafoglia, V., Bryant, B., Raffaelli, W., Giordano, A. & Bellipanni, G. (2013). The zebrafish as a model for nociception studies. *Journal of Cellular Physiology*, 228(10), 1956–1966.
- Marron Fdez de Velasco, E., Law, P. Y. & Rodríguez, R. E. (2009). Mu opioid receptor from the zebrafish exhibits functional characteristics as those of mammalian mu opioid receptor. *Zebrafish*, 6(3), 259–268.
- Martins, T., Valentim, A. M., Pereira, N. & Antunes,

- L. M. (2016). Anaesthesia and analgesia in laboratory adult zebrafish: a question of refinement. *Laboratory Animals*, 50(6), 476–488.
- Marwaha, L., Bansal, Y., Singh, R., Saroj, P., Bhandari, R. & Kuhad, A. (2016). TRP channels: potential drug target for neuropathic pain. *Inflammopharmacology*, 24(6), 305–317.
- Matthews, M., Trevarrow, B. & Matthews, J. (2002). A virtual tour of the Guide for zebrafish users. *Lab Animal*, 31(3), 34–40.
- Matthews, M. & Varga, Z. M. (2012). Anesthesia and euthanasia in zebrafish. *ILAR Journal*, 53(2), 192–204.
- Ohnesorge, N., Heintz, C. & Lewejohann, L. (2021). Current Methods to Investigate Nociception and Pain in Zebrafish. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 632634.
- Patton, E. E., Zon, L. I. & Langenau, D. M. (2021). Zebrafish disease models in drug discovery: from preclinical modelling to clinical trials. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(8), 611–628.
- Prober, D. A., Zimmerman, S., Myers, B. R., McDermott, B. M., Jr, Kim, S. H., Caron, S., Rihel, J., Solnica-Krezel, L., Julius, D., Hudspeth, A. J. & Schier, A. F. (2008). Zebrafish TRPA1 channels are required for chemosensation but not for thermosensation or mechanosensory hair cell function. *The Journal Of Neuroscience: The Official Journal Of The Society For Neuroscience*, 28(40), 10102–10110.
- Reilly, S. C., Quinn, J. P., Cossins, A. R. & Sneddon, L. U. (2008). Behavioural analysis of a nociceptive event in fish: Comparisons between three species demonstrate specific responses. *Applied Animal Behaviour Science*, 114(1-2), 248–259.
- Rodriguez-Martin, I., Herrero-Turrion, M. J., Marron Fdez de Velasco, E., Gonzalez-Sarmiento, R. & Rodriguez, R. E. (2007). Characterization of two duplicate zebrafish Cb2-like cannabinoid receptors. *Gene*, 389(1), 36–44.
- Saito, S. & Shingai, R. (2006). Evolution of thermoTRP ion channel homologs in vertebrates. *Physiological Genomics*, 27(3), 219–230.
- Schroeder, P. G. & Sneddon, L. U. (2017). Exploring the efficacy of immersion analgesics in zebrafish using an integrative approach. *Applied Animal Behaviour Science*, 187, 93–102.
- Sloman, K. A., Bouyoucos, I. A., Brooks, E. J. & Sneddon, L. U. (2019). Ethical considerations in fish research. *Journal Of Fish Biology*, 94(4), 556–577.
- Sneddon L. U. (2019). Evolution of nociception and pain: evidence from fish models. *Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London. Series B, Biological Sciences*, 374(1785), 20190290.
- Taylor, J. C., Dewberry, L. S., Totsch, S. K., Yessick, L. R., DeBerry, J. J., Watts, S. A. & Sorge, R. E. (2017). A novel zebrafish-based model of nociception. *Physiology & Behavior*, 174, 83–88.
- Thomson, J. S., Al-Temeemy, A. A., Isted, H., Spencer, J. W. & Sneddon, L. U. (2019). Assessment of behaviour in groups of zebrafish (*Danio rerio*) using an intelligent software monitoring tool, the chromatic fish analyser. *Journal Of Neuroscience Methods*, 328, 108433.
- Underwood, W. & Anthony, R. (2020). AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2020 edition. Retrieved on March, 2013(30), 2020-1.
- Valentino, R. J. & Volkow, N. D. (2018). Untangling the complexity of opioid receptor function. *Neuropsychopharmacology: Official Publication Of The American College Of Neuropsychopharmacology*, 43(13), 2514–2520.
- Vargas, R. (2018). Anesthesiology, anesthetics and zebrafish (*Danio Rerio*). an animal model to perform basic biomedical research. *EC Anaesth*, 4, 202–213.
- von Krogh, K., Higgins, J., Saavedra Torres, Y. & Mocho, J. P. (2021). Screening of Anaesthetics in Adult Zebrafish (*Danio rerio*) for the Induction of Euthanasia by Overdose. *Biology*, 10(11), 1133.
- Wilson, R. I. & Nicoll, R. A. (2002). Endocannabinoid signaling in the brain. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5568), 678–682.
- Wong, D., von Keyserlingk, M. A., Richards, J. G. & Weary, D. M. (2014). Conditioned place avoidance of zebrafish (*Danio rerio*) to three chemicals used for euthanasia and anaesthesia. *Plos One*, 9(2), e88030.
- Yağcı, Ü. & Saygin, M. (2019). Ağrı fizyopatolojisi. *Medical Journal of Süleyman Demirel University*, 26(2), 209–220.