

Alerjik Hastalıklarda Fare, Sıçan Modelleri

In Allergic Diseases Mouse, Rat Models

Öz

Son yıllarda alerjik hastalıkların görülme sıklığının artması tanı ve tedavi sürecinde arayışları da beraberinde getirmiştir. Alerjik hastalıkların hayvan modelleri, immunolojik, fizyolojik ve histopatolojik düzeyde patogenezi anlayabilmek, korunma ve tedavide mevcut bilgilere yenilerini ekleyebilmek adına ciddi katkılarda bulunmaktadır. Biyomedikal araştırmalar için kullanılacak olan laboratuvar hayvanı türüne ait anatomik, fizyolojik ve biyolojik özelliklerin bilinmesi, insandaki hastalık sürecine benzeyen modellerin oluşturulmasında, güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesinde önemli bir basamaktır. Bu açıdan bakıldığında alerjik hastalıkların laboratuvar hayvanı modelleri için çok çeşitli hayvan türleri kullanılabilir. Ancak bu derleme makalede; etik açıdan kabul edilebilir, üretim, yetiştirme ve barındırma ortamları daha kolay standardize edilebilir, ekonomik açıdan ulaşılabilir olması nedeniyle fare ve sıçan modelleri üzerinde durulmuştur.

Abstract

During the past few years, the increasing prevalence of allergies has brought about a search for new techniques of diagnosis and treatment. Animal models of allergies play a major role in understanding the pathogenesis at immunological, physiological and histopathological levels as well as elaborating on the existing treatment methods. It is indispensable to know the anatomic, physiological and biological characteristics of the laboratory animals used in biomedical research in order to obtain repeatable and reliable outcomes in the animal models imitating the situation in humans. From this aspect, a variety of animals can be utilized to model allergic illnesses. Yet, in this compiled article, mouse and rat models were emphasized for they are ethical, their production and growing environments are easily standardizable and they are more feasible economically.

Son yıllarda alerjik hastalıkların görülme sıklığının artması tanı ve tedavi sürecinde arayışları da beraberinde getirmiştir. Alerjik yürüyüş ya da atopik marş olarak ifade edilen ve süt çocukluğu döneminden itibaren başlayan süreç, besin allerjenleri-

Doç. Dr. Meral KARAMAN
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp
Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD.

Yazışma Adresleri /Address for Correspondence:

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık
Bilimleri Enstitüsü Laboratuvar
Hayvanları Bilimi AD.

Tel/phone: +90 ?????

mail: meral.karaman@deu.edu.tr

Anahtar Kelimeler:

Astım, Alerjik rinit, Atopik
dermatit, hayvan modeli

Keywords:

Asthma, Allergic rhinitis,
Atopic dermatitis, animal
model

Geliş Tarihi - Received

08/01/2017

Kabul Tarihi - Accepted

30/01/2017

ne duyarlanma ve atopik dermatitin ardından ilerleyen yıllarda buna inhalen allerjenlerin eklenmesi ile genişlemektedir (1). Alerjik astım, alerjik rinit, alerjik konjuktivit, atopik dermatit, besin alerjisi, inek sütü alerjisi gibi çok çeşitli klinik tablolar tek başına veya sıklıkla birkaçı bir arada görülebilmektedir. Hastalar, yaşam kalitelerini olumsuz etkileyen bu klinik tabloların yanı sıra hızlı tanı ve acil tıbbi müdahale gerektiren anafilaksi ile de karşıımıza çıkmaktadır.

Alerjik hastalıkların hayvan modelleri, immunolojik, fizyolojik ve histopatolojik düzeyde patogenezi anlayabilmek, korunma ve tedavide mevcut bilgilere yenilerini ekleyebilmek adına ciddi katkılarda bulunmaktadır. Çeşitli hastalıkların yanı sıra insan biyokimyası, fizyolojisi, endokrinolojisine yönelik sahip olduğumuz bilgilerin in vivo çalışmalara borçlu olduğumuzu biliyoruz. Karşılaştırmalı tıp alanında elde ettiğimiz bu değerli bilgilerle günümüzde temel araştırmaların, in vitro ve in vivo çalışmalarda elde edilen verilerin klinik uygulamalara aktarıldığı bir alan olan translasyonel tıp kavramı ortaya çıkmıştır (2).

Genel olarak tüm hastalıklar için laboratuvar hayvanı modelleri beş başlık altında toplanmaktadır. Bunlar; Spontan modeller, indüklenmiş modeller, negatif modeller, olası modeller ve transgenik modellerdir (3). Alerjik hastalıkların laboratuvar hayvanı modellerinde sıklıkla indüklenmiş modeller kullanılmaktadır. İndüklenmiş modellerde hayvana dışarıdan verilen biyolojik ya da kimyasal bir ajan ile insandaki hastalık süreci taklit edilmeye çalışılır. Son yıllarda genetik mühendisliği alanındaki gelişmeler, insan ve fare genomunun bilinmesi gibi faktörler nedeniyle transgenik modellerde artış görülmektedir. Bazı alerjik hastalıklar için transgenik modeller de kullanılmaktadır (4,5).

Laboratuvar hayvanları; küçük vücut yüz ölçümüne sahip olmaları, kolay üretilebilmeleri nedeniyle laboratuvar bilimsel amaçlı deneylerde kullanılan hayvanlardır (6). Biyomedikal araştırmalar için kullanılacak olan laboratuvar hayvanı türüne ait anatomik, fizyolojik ve biyolojik özelliklerin bilinmesi, insandaki hastalık sürecine benzeyen modellerin oluşturulmasında, güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesinde önemli bir basamaktır. Bu açıdan bakıldığında alerjik hastalıkların laboratuvar hayvanı modelleri için çok çeşitli hayvan türleri kullanılabilir. Ancak bu derleme makalede; etik açıdan kabul edilebilir, üretim, yetiştirme ve barındırma ortamları daha kolay standardize edilebilir, ekonomik açıdan ulaşılabilir olması nedeniyle fare ve sıçan modelleri üzerinde durulmuştur. Fare ve sıçan modellerinin bir

diğer üstünlüğü ise ülkemizde ve dünyada en fazla kullanılan hayvanlar olmaları nedeniyle deneyler sonucunda elde edilen verilerin literatür eşliğinde tartışılabilir olmasıdır.

Alerjik hastalıklar temelde IgE aracılı aşırı duyarlılık reaksiyonu olduğundan hayvan modelleri çoğunlukla bu mekanizma üzerine kurulmuştur. Allerjenle karşılaşma sonrasında bu allerjene özgü antijenik epitoplar, antijen sunan hücreler tarafından tanınıp işlenmekte ve Th2 aracılı sitokinlerin salınmasına neden olmaktadır. IL-4, IL-5, IL-13 gibi sitokinler B lenfositlerin allerjene özgü IgE üretmesini uyarmaktadır. Duyarlanma sonucunda mast hücre degranülasyonu, eozinofilik infiltrasyon gibi tanı testlerinde de yararlanılan inflamatuvar bir süreç yaşanmaktadır (7).

Bu derlemede özetlenmeye çalışılan fare ve sıçanda alerjik hastalık modelleri IgE aracılı hastalık modelleridir. Hayvanların ve deneylerin standardizasyonu, hayvanların genel olarak seçim kriterleri, deneyler sırasında hayvan refahının korunması gibi temel konular daha önce ayrıntılı olarak ele alındığından (8) bu yazıda yer verilmemiştir.

Astım Modeli

Deneyisel astım çalışmalarında spontan modellerde nakavt fareler ile allerjen sensitizasyonu gerekmeden astım oluşabilmektedir (9). Transgenik modellerde ise T-bet KO fareler, Runx3 KO ve IL-13 Tg fareler, adenozin deaminaz eksikliği olan fareler ve BCL-6^{-/-} fareler kullanılabilir (5). Ancak sıklıkla kullanılan model, allerjen sensitizasyonu ve ardından tekrarlanan allerjen inhalasyonu ile gerçekleşen indüklenmiş modellerdir (4,10).

Astım, eozinofilden yoğun inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu, artmış mukus üretimi, havayolu aşırı duyarlılığı ve geri dönüşümlü havayolu obstrüksiyonu ile karakterize olan kronik bir hastalıktır. Kronik inflamasyon, havayolunda bazal membranın kalınlaşması, subepitelyal fibrozis ve havayolu düz kas kütlesindeki artış ile karakterize yeni bir yapılanmaya yol açmaktadır. Bu yapısal değişiklikler, akciğer fonksiyonlarında ilerleyici bir azalmaya ve kalıcı havayolu aşırı duyarlılığına neden olmaktadır (10,11). Astımda yaygın olarak klasik Th2 fenotipini temsil eden modeller tercih edilmektedir. Bu fenotip, yüksek düzeyde antijen spesifik IgE, eozinofil hakimiyeti olan inflamasyon ve Th2 sitokin (IL-4, IL-5, IL-13) yanıtını içermektedir (12). Modelde, IgE üretimi ile birlikte allerjen bağımlı duyarlanma, hava yolu mukozasına eozinofil göçü ile paralel olarak alerjik inflamasyon ve hava yolu yeniden yapılanması insandaki patogenezi iyi yan-

sıtmaktadır. Ancak modelde alerjiden bağımsız kronikleşmenin ve spontan akut atakların görülmemesi, subepitelial fibrozis, goblet hücre hiperplazisi ve hava yolu düz kas hipertrofisini içeren hava yolu yeniden yapılanmasının tam yansıtılmaması gibi kısıtlılıklar olduğu bildirilmektedir (9). Akciğerin pre ve postnatal gelişimi ve maturasyonunun türler arasında farklı olması nedeniyle herhangi bir model seçiminde planlama buna göre yapılmalıdır. Sıçan ve fareler doğumda gerçek alveole sahip değildir, alveologenezin büyük kısmı postnatal 4-14. günler arasında tamamlanır. Sıçanlarda silyalı hücreler yaygın olmasına rağmen sınırlı sayıda goblet hücresi vardır. Farelerde ise silyalı hücreler kümeler halindedir ve goblet hücresi yoktur. Ayrıca akciğerin anatomik yapısı, bronş dallanmaları fare ve sıçanda insana göre farklılıklar göstermektedir. Solda tek, sağda dört loblu akciğere sahip olmaları özellikle intranasal sensitizasyonun kullanıldığı modellerde akılda tutulmalıdır. Kobaylarda ise alveolarizasyon doğumda neredeyse tamdır. Silyalı hücreler ve goblet hücre yapısı, alveolarizasyon ve akciğerin anatomisi açısından bakıldığında en uygun rodent modelinin kobay olduğu söylenebilir. Bununla birlikte kobaylar inbred soylarının az olması, zor temin edilmeleri, kobay spesifik reaktiflerin az sayıda olması gibi nedenlerle genellikle farmasötik çalışmalarda ve mesleksi astım modellerinde tercih edilmektedirler (13-15).

Araştırmacılar için en kritik sorulardan biri astım modeli için rodentler arasında sıçan ya da fareden hangisini tercih etmesi gerektiği sorusudur. Bu sorunun yanıtı için insanda alerjik astımın akciğer fonksiyonuna etkilerine bakılabilir. İnsanda alerjen inhalasyonunu takiben sırasıyla erken faz yanıtı (Early phase responses; EPR), geç faz yanıtı (Late phase responses; LPR) ve solunum yol-

ları aşırı duyarlılığı (Airway hyperresponsiveness; AHR) gelişmektedir. Farelerde astım modelinde ise alerjen inhalasyonunu takiben, astmatik akciğerde akut bronkokonstrüksiyon ile karakterize olan ve 1 saat içinde yatışan EPR gelişir. LPR'nin olup olmadığı ise tartışmalıdır. Çoğunlukla LPR gelişmeden AHR gelişmektedir. Sıçanda ise LPR gelişimi kullanılan protokole göre değişmektedir (16). Sıçanlar çok sayıda inbred alt soya sahip olmaları, model sonucunda yapılacak in vitro değerlendirme testleri için daha kolay ve daha fazla hacimde örnek alınabilmesi (kan, bronkoalveoler yıkama sıvısı; BAL, akciğer dokusu vb.) nedeniyle tercih edilebilirler. Ayrıca çeşitli alerjenlerle kolayca sensitize edilebilen sıçanlarda da, alerjik hastalıkların temelinde Th2 yanıtı rol oynamaktadır. Alerjenlere karşı EPR, LPR ve AHR yanıtları açısından bakıldığında insandaki hastalık sürecine en fazla benzer yanıtı Brown-Norway sıçanlar göstermektedir. Bu nedenle diğer sıçan soylarına göre üstünlükleri bulunmaktadır (17).

Diğer taraftan genetik yapıları, anatomik ve biyolojik özellikleri çok iyi bilinen fareler alerjik hastalık modelleri açısından memeli hayvanlara en iyi örnek olarak gösterilmektedir. Birçok antijen ile (Ovalbümin; OVA, ev tozu akarları, *A. fumigatus* ag.) kolaylıkla sensitize edilebilen bu hayvanlardan özellikle BALB/c soyunun astımın klasik Th2 fenotipini en iyi yansıtan fare soyu olduğu bildirilmektedir (18). Fare alerjik solunum yolu inflamasyonu modelinde insan ile benzerlik ve farklılık gösteren özellikler tablo 1'de özetlenmiştir. (Tablo 1).

Günümüzde akut ve kronik astım modelleri konusunda yapılmış çok sayıda hayvan çalışması bulunmaktadır. Nials ve ark. (19) tüm bu çalışmalarını tablo şeklinde özetlemiştir. Sensitizasyon amacıyla OVA, ev tozu akarları, hamam böceği antijenleri, *Aspergillus fumigatus* gibi pek çok antijen kullanılmaktadır. En yaygın olarak kullanılan

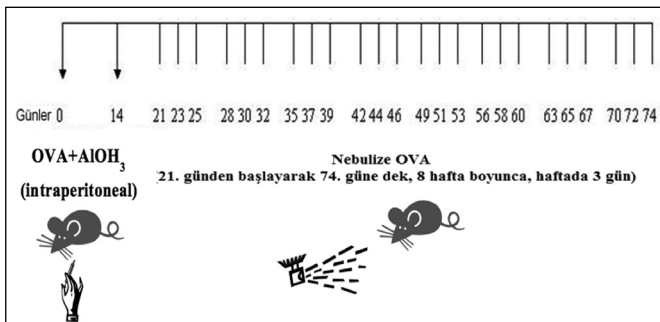
Tablo 1. Fare alerjik solunum yolu inflamasyonu modelinde insan ile benzerlik ve farklılıklar

Özellik	İnsan	Fare
Spesifik IgE yanıtı	++	++
Mast hücre degranülasyonu	+++	++ (serotonin)
Erken bronkokonstrüksiyon	+++	+
Geç bronkokonstrüksiyon	+/- (%50)	-
Solunum yolu hiperreaktivitesi	+++	+
BAL eozinofil (%)	%10-20	%20-80
Eozinofilik degranülasyon	+++	+
Th2 yanıtı	+	+++
Goblet/Mukus	++	++
Fibrozis	+++	++
Bazal membran kalınlığı	+++	+
Düz kas hiperplazisi	+++	+/-
Vasküler hava yolu remodeling	++	+

ise, tavuk yumurtasından köken alan, alerjik epitoplara iyi bilinen, rekombinant peptidleri geliştirilmiş ucuz bir alerjen olan OVA'dır (20). Akut sensitizasyon için OVA'nın bir adjuvanla birlikte sistemik yola verilmesi önerilmektedir. Adjuvan olarak kullanılan alüminyum hidroksit (Al(OH)₃) antijene maruz kalındığında Th2 immün yanıtını artırmaktadır. Bunun yanı sıra ısı ile öldürülmüş B. pertussis, ricin ve karışık adjuvanlar kullanılabilir. Ancak bu adjuvanların Th1 immün yanıtını da uyardığı unutulmamalıdır. Tek başına OVA sensitizasyon oluşturmakla birlikte ilk kez aerosol OVA ile karşılaşan farelerde allerjene özgü IgE yanıtı hiç oluşmamakta ya da çok düşük düzeyde kalmaktadır. Bu durumda eozinofil toplanması ve AHR oluşmayıp, IgG2 artmakta ve yanıt Th2'den Th1'e kaymaktadır. Sonuç olarak alerjene tolerans gelişmektedir (21,22).

Akut ve kronik astım modelleri arasında en fazla kabul gören ve atıf alan çalışma Temelkovski ve ark.'nın çalışmasıdır (14). Bu modelde önce sensitizasyon amacıyla OVA+ Al(OH)₃ karışımı intraperitoneal yolla farelere uygulanmaktadır. Son immunizasyondan 7 gün sonra (21. günden itibaren) günde 30 dakika, haftada üç gün, 8 hafta boyunca serum fizyolojik içindeki %2,5'lik OVA solüsyonu jet nebulizatör aracılığı ile kapalı bir kabinde, bütün vücut inhalasyon sistemi ile farelere uygulanmaktadır. Kontrol grubundaki farelere aynı sistem ile serum fizyolojik inhalasyonu yaptırılmaktadır. (Şekil 1) (14,23).

Alerjik astımın insandaki klinik bulguları, klinik tabloyu hafifleten ya da ağırlaştırıcı unsurlar, kronik astımın çeşitli nedenlerle zaman zaman akut ataklarla kendini göstermesi gibi süreçler iyi bir gözlemlenme ile hayvan modellerine uyarlanabilir. Bir çalışmada kronik astım modelindeki gibi düşük doz (3mg/m³) aerosol şeklinde OVA verilen farelerde 49. gün inhale OVA miktarı 30mg/m³ yoğunluğuna çıkarılmış kronik astımın akut atakları taklit edilmiştir (24). Astım atak modeli bronkokonstrüktif ajan metakolin ile de yapılabilmektedir. Bunun için kronik astım modeli oluşturulan farelerde aerosol OVA



Şekil 1. Farede kronik astım modeli

uygulamasının 75. gününde artan dozlarda (1 saat ara ile 3 dk boyunca 6,25, 12,5 ve 25 mg/ml) metakolin inhalasyonu yapılmaktadır. Metakolin inhalasyonundan önce ve sonra karın cildi traş edilmiş farelerin O₂ saturasyonunun ölçülmesi modelin oluşup oluşmadığı konusunda sağlam veriler sunmaktadır (14,25). Kumar ve ark.(26), astımın akut ataklarının fare modelleri ile yapılan çok sayıda çalışmanın güçlü ve zayıf yönlerini değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar iyi bir akut atak modeli için; alerjen sensitizasyonunun yüksek dozlarda yapılması gerektiğini, tekrarlanan alerjen uyarılar için çevresel hava kirliliği, viral ya da fungal enfeksiyon ajanları ya da bunların bileşenlerinin kullanılabilceğini belirtmişlerdir.

Bütün deneysel modellerde olduğu gibi alerjik astım modellerinde de deneyin sonunda insan hastalık süreci ile benzerlikler ve farklılıklar kanıtlanmalıdır. Bu noktada BAL, serum ve akciğer dokusu örnekleri destekleyicidir. Solunum yolu doku ve organlarında (trakea, akciğer) elektron mikroskobu (EM) ve ışık mikroskobu (IM) değerlendirmelerinde hava yolu inflamasyonu, bazal membran ve subepitelyal düz kas kalınlığının, mün sekrete eden goblet hücreleri, eozinofil ve mast hücrelerinin gösterilmesi, kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak skorlanması güçlü verilerdir. Ayrıca serum ve BAL örneklerinde Th2 sitokin düzeylerinin, serumda alerjen spesifik IgE'nin belirlenmesi değerlendirme kriterleri arasında yer alır (14). Değerlendirme açısından bir diğer parametre solunum fonksiyon testleridir (SFT). SFT, solunum hastalıklarının klinik değerlendirmelerinde kullanılan son derece yararlı ve pratik bir laboratuvar yöntemidir. Solunum sisteminin ventilasyon, diffüzyon ve mekanik özelliklerinin incelenmesinde objektif veriler sağlar. Laboratuvar hayvanlarında KOAH, astım gibi hastalık modellerinin değerlendirme ölçütleri arasında yer alan SFT ölçümü invaziv ya da invaziv olmayan yöntemlerle yapılabilmektedir. Her iki modelin de üstünlük ve kısıtlılıkları bulunmaktadır. İnvaziv olmayan yöntemde (Şekil 2a), herhangi bir anestezi madde verilmeyen hayvan başı sabitlenerek ve hareket edemeyecek şekilde vücut pletismografi içine yerleştirilir. Basit olan bu işlemden solunum hemen hemen doğala yakındır. Güvenli, tekrarlanabilir ve basit bir işlemdir, zaman kazandırır. Ancak bu yöntemin insandaki ölçüm sürecini tam olarak yansıtmadığı da söylenebilir. İnsanda pletismografya kapı kapatılır, volüm ölçümü sırasında ısı sabitlenir, basınç ve volüm saptanır. (Boyle kanunu) Ancak hayvan pletismografında küçük dar bir alanda basınç sinyalinin eksikliğinden dolayı akciğer direnci ve uyumluluğu tam yansıtılamayabilir. Ayrıca yapılan

işlem hayvan için stres kaynağıdır. Solunum ve nabızı hızlanır, burun ve diyafram solunumu da ölçüme yansır. İnvaziv yöntemde ise (Şekil 2b), anestezi altında orotrakeal entübasyon yapılan hayvan spontan solumaya bırakılır. El becerisi gerektiren bu işlem kolay değildir ve zaman alıcıdır. Altın standart olarak tanımlanan bu yöntemde hava yolu direnci, akciğerin solunuma katılımı burun, ağız ve diyaframdan bağımsız olarak ölçülebilir (27). Bununla birlikte hem invaziv hem de invaziv olmayan solunum fonksiyon testlerinin, kemirgenlerde allerjen spesifik ve kolinerjik uyarımlarla temas sonrası bronkokonstrüksiyonun saptanmasında duyarlı olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle seçilecek yöntem alt yapı olanakları, el becerisi ve ekonomik parametreler üzerinden değerlendirilebilir (28).

Alerjik Rinit Modeli

IgE aracılı inflamasyon ile karakterize bir diğer hastalık olan allerjik rinit toplumda oldukça yaygındır. Allerjene maruz kalma ve bu allerjene karşı immunolojik duyarlılığın bulunması durumunda dakikalar içinde başlayan EPR'nin karakteristik bulguları olan nazal mukozada inflamasyon, konjesyon, rinore, kaşıntı, hapşırma görülür. Bu yanıtta mast hücrelerinin degranülasyonu sonucunda ortaya çıkan histamin, lökotrien, prostoglandin, kinin ve sitokinler rol oynar (29,30).

Farelerde oluşturulan allerjik rinit modelinde sensitzasyon amacıyla OVA+AIOH3 karışımı 0. ve 7.günlerde intraperitoneal yol ile verilir. Daha sonra 14. günden başlayarak 1 hafta boyunca, günde 2 kez volümetrik bir pipet aracılığı ile ve intranasal yolla 100 µg OVA uygulanır (Şekil 3). (31, 32).

Fare allerjik rinit modelinde başarılı bir model için öncelikle IgE aracılı yanıt kanıtlanabilmelidir. Bunun için serumda OVA spesifik IgE düzeylerinin yanı sıra nazal yıkama sıvısında inflamatuvar mediatorlerin düzeyinin belirlenmesi de önerilmektedir. Histopatolojik değerlendir-

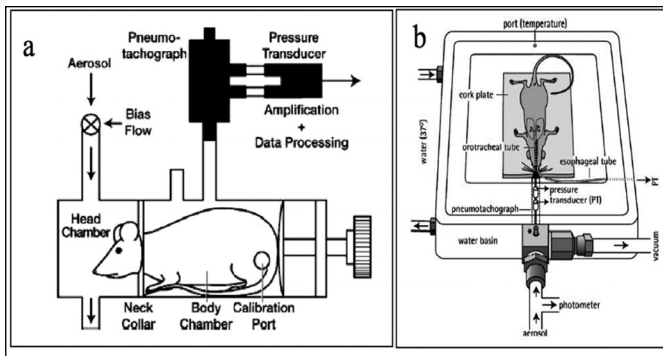
meler açısından trakea ve nazal kavite dokularının EM ve IM görüntülemesi yapılır. Nazal kavitede silya kaybı, eozinofil-goblet hücre sayısında artış, vasküler konjesyon-proliferasyon, kondrosit hipertrofisi yarı kantitatif olarak derecelendirilir (33,34). Allerjik rinit modeli oluşturulan farelerde "Birleşik hava yolu" hipotezi açısından akciğer dokusunun da histopatolojik olarak değerlendirilmesi önerilmektedir.

Değerlendirme yöntemleri arasında allerjik rinit bulgularının derecelendirmesi de yapılabilir. Lokal sensitzasyonun başlangıcı olan 14. günde, 10 dakika süreyle, burun kaşıma hareketi, hapşırma ve burun akıntısı gözlemlenir (Tablo 2). Bulgular sadece fosfat tampon verilen kontrol grubu ile karşılaştırılır. Bu gözlem subjektif olduğundan optimizasyonu gerekir. İdeal olanı grupları bilmeyen farklı iki gözlemci tarafından derecelendirmenin yapılmasıdır. Toplam derecenin >5 puan olması allerjik rinit modelinin insandaki hastalığa benzer olduğunu gösterir (35, 36).

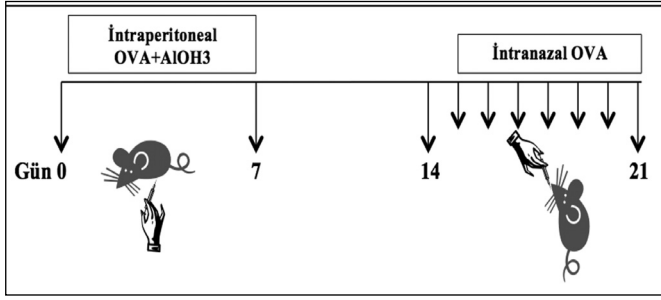
Atopik Dermatit Modeli

Atopik dermatit, artmış IgE düzeyi ve IL-4 ekspresyonu ile karakterize kronik, tekrarlayıcı, inflamatuvar deri hastalığıdır. IL-4, B hücrelerindeki IgE üretimini indükler ve IgE aracılıklı atopik dermatitte mast hücre degranülasyonu ile birlikte çeşitli mediatörler salınır. Atopik dermatitli hastaların deri lezyonlarında Th2 aracılı inflamasyon ile timik stromal lenfoprotein (Thymic stromal lymphopietin; TSLP), IL-25 ve IL-33'ün belirgin artışı gösterilmiştir. Ayrıca deriyi infiltre eden lenfositler tarafından timus ve aktivasyon düzenleyici kemokin (Thymus and activation regulated chemokine; TARC) üretilmektedir (37,38). Farelerde atopik dermatit modeli üç başlık altında ele alınabilir (39);

1. Spontan modeller; ilk spontan dermatit modeli 1997 yılında Nc/Nga farelerde gösterilmiştir (40). Diğer bir spontan model olan NOA (Naruto Research Institute Otsuka) farelerde dermiste mast hücre birikimi ile karakterize kaşıntılı ülseratif dermatit, tüy kaybı ve artmış serum IgE düzeyi saptanmıştır. Ancak bu farelerde, insan atopik dermatitinden farklı olarak karakteristik histolojik değişiklikler gösterilememiştir (41). Diğer bir inbred soy olan DS-Ng farelerde sadece konvansiyonel koşullar (Geleneksel açık kafes sistemi yetiştirme) altında spontan atopik dermatitin geliştiği bildirilmiştir. Bu farelerin özellikle *S. aureus* ile ilişkili atopik dermatit modelleri için uygun olduğu belirtilmektedir (42).



Şekil 2. Kemirgenlerde SFT ölçümü. a: İnvaziv olmayan yöntem, b: İnvaziv yöntem



Şekil 3. Farede alerjik rinit modeli

2. Transgenik modeller; deri bariyer fonksiyonunu sağlayan proteinleri kodlayan çeşitli genler üzerinde yapılan çalışmalar epidermal yapısal protein olan FLG kodlayan genlerdeki genetik mutasyonun anahtar defekt olduğunu göstermektedir. FLG mutasyonu en güçlü genetik risk belirleyicisi olmakla birlikte atopik dermatitli hastaların tümünde FLG mutasyonu olmadığı gibi, FLG mutasyonu olan hastaların tümünde de atopik dermatit görülmemektedir. Ancak atopik dermatitli hastalarda FLG mutasyon varlığının hastalığın erken başlangıç gösterip persistan ve ağır bir süreç izlemesinin yanısıra astım ve diğer alerjik hastalıklara yatkınlığı artırdığı kabul edilmektedir (43). Bu nedenle atopik dermatitin transgenik hayvan modellerinin bir çoğu FLG gen mutasyonu oluşturulmuş farelerde yapılmaktadır (44).

3. İndüklenmiş modeller; atopik dermatitte epikutanöz sensitizasyon için kullanılan çeşitli kimyasal ya da biyolojik ajanlar ile klasik deri lezyonları oluşturulmaktadır. Bu ajanlar arasında OVA (45), oxazolone (Ox) ve trinitrochlorobenzene (TNCB) gibi haptentler (46), S. aureus ekzotoksin B (47) gibi ajanlar kullanılmaktadır. Fare atopik dermatit modelinde immunolojik ve deri lezyonlarını indüklemek için 1-Fluoro-2,4-dinitroklorobenzen (DNFB)'de kullanılabilir (48,49).

Deneyler sonunda serumda spesifik IgE düzeyindeki artışın yanı sıra IL-4, IL-25, IL-33, TSLP, TARC, gibi belirteçler araştırılabilir. Doku düzeyinde incelemelerde lezyon bölgesinde inflamatuvar hücreler ve mast hücrelerinin varlığı gösterilebilir. Ayrıca akciğer dokusunda havayolu inflamasyonu, bazal membran, subepitelyal düz kas kalınlıklarının değerlendirilmesi, münin sekrete eden

gözet hücrelerin, eozinofil ve mast hücrelerinin varlığı değerlendirilebilir.

Fare atopik dermatit modelinde klinik değerlendirme ve deri lezyonlarında hasar derecelendirmesi yapılmalıdır. İnsanda SCORAD (severity scoring of atopic eczema) indeksi ve EASI (eczema area and severity index) en çok kullanılan indekslerdir. SCORAD' da tutulum yüzeylerinin (9'lar kuralı) yanı sıra lezyonların yoğunluğu (eritem, ödem/papül oluşumu, sızıntı/kabuklanma, derinin soyulması, likenifikasyon, kuruluk) ve fonksiyonel etkileri (uyku, kaşıntı, görünüm) değerlendirilmektedir. Atopik dermatitin fare modelinde de benzer bir derecelendirme kullanılmaktadır. Buna göre; lezyonlar haftada iki kez eritem/ödem, skar oluşumu ve kuruluk, ödem ve ekzorsiyon/erezyon bulguları açısından kantitatif [yok (0), hafif (1), orta (2) ve ciddi (3)] olarak saptanmaktadır. Bu derecelendirme sadece çözücü madde uygulanmış deney grubu sonuçları ile karşılaştırılır (50).

Görüldüğü gibi alerjik hastalıkların patofizyolojisinin anlaşılabilmesi ve alternatif tedavilerin geliştirilerek hastaların yaşam kalitesinin artırılmasında hayvan modelleri vazgeçilmezdir. Çok farklı hayvan türlerinde çok farklı modeller yapılabilmektedir. Laboratuvar hayvanlarının üretilme ve yetiştirilmeleri tamamen bilimsel amaçlar içindir. Hayvanlar üzerinde yapılacak her çalışmada bir insan hastalığını taklit etmek hedeflendiğinden seçilecek hayvan türü, alt soyu, model için kullanılacak yöntemler ve modelin oluşumuna ilişkin kanıtların ortaya konmasında iyi bir literatür taraması yapmak, metanalizleri özümsemek gerekmektedir. Ayrıca çalışma ekibinin elde edilen bilimsel verileri yorumlayabilecek, teorik ve uygulamalı olarak bilgi birikimi olan deneyimli araştırmacılardan oluşması da önemlidir.

Teşekkür

* Bu derleme yazıda yer alan, özellikle uygulamaya yönelik bilgi ve tecrübelerde katkıları nedeniyle Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Alerji BD ve Histoloji-Embriyoloji AD'na

** İnsan hayatının her anında ve her alanında koşulsuz sevgi ve destekleri, bilime olan katkıları için tüm hayvan dostlarımıza içtenlikle teşekkürlerimi iletiyorum.

Tablo 3. Alerjik rinit fare modelinde klinik bulguların derecelendirilmesi

Bulgular	0	1	2	3
Burun kaşıma hareketi sayısı	Yok	2 defa/dk	4-6 defa/dk	> 6 defa/dk
Hapşırma sayısı	Yok	2 defa/dk	4-6 defa/dk	> 6 defa/dk
Burun akıntısı miktarı	Yok	Bir burun deliğinde	Her iki burun deliğinde	Dışarıya akan

Kaynaklar

1. Wahn U. What drives the allergic march. *Allergy*. 2000; 55(7): 591-9.
2. Wang X. A new vision of definition, commentary, and understanding in clinical and translational medicine. *Clin Transl Med*. 2012; 1: 5. DOI: 10.1186/2001-1326-1-5
3. Hau J. Animal Models. In *handbook of laboratory animal science*. Hau J, Van Hoosier GL Eds. Vol 2. CRS Press, Denver, 2003
4. Tanaka H, Masuda T, Tokuoka S et al. The effect of allergen-induced airway inflammation on airway remodeling in a murine model of allergic asthma. *Inflamm Res*. 2001; 50: 616-24.
5. Elias J. The relationship between asthma and COPD: lessons from transgenic mice. *Chest*. 2004; 126: 111-6.
6. Preface. *The Welfare of Laboratory Animals*, Kaliste E, ed.. Springer: The Netherlands; 2007, IX-X.
7. Özdemir C, Akdis M, Akdis CA. T cell response to allergens. *Chem Immunol Allergy*. 2010; 95: 22-44.
8. Karaman M. Alerjik Hastalıklarda Laboratuvar Hayvanı Modelleri. *Türkiye Klinikleri J Pediatr Sci*. 2014; 10(2): 123-30.
9. Epstein MM. Are mouse models of allergic asthma useful for testing novel therapeutics? *Exp Toxicol Pathol*. 2006; 57: 41-4.
10. Leigh R, Ellis R, Wattie J, Southam DS, De Hoogh M, Gauldie J et al. Dysfunction and remodeling of the mouse airway persist after resolution of acute allergen-induced airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002; 27:526-35.
11. Mims JW. Asthma: definitions and pathophysiology. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2015;5(1):2-6.
12. Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA, Sly PD. The role of allergy in the development of asthma. *Nature*. 1999; 402(6760): 12-7.
13. Kips JC, Anderson GP, Fredberg JJ, Herz U, Inman MD, Jordana M, et al. Murine models of asthma. *Eur Respir J*. 2003; 22(2): 374-82.
14. Temelkovski J, Hogan SP, Shepherd DP, Foster PS, Kumar RK. An improved murine model of asthma: selective airway inflammation, epithelial lesions and increased methacholine responsiveness following chronic exposure to aerosolised allergen. *Thorax*. 1998; 53: 849-56.
15. Holmes AM, Solari R, Holgate ST. Animal models of asthma: value, limitations and opportunities for alternative approaches. *Drug Discovery Today*. 2011;16(15-16): 659-70.
16. Zosky GR, Sly PD. Animal models of asthma. *Clinical and Experimental Allergy*, 2007; 37, 973-988.
17. Schneider T, van Velzen D, Moqbel R, Issekutz AC. Kinetics and quantitation of eosinophil and neutrophil recruitment to allergic lung inflammation in a brown Norway rat model. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997; 17: 702-12.
18. Shin YS, Takeda K, Gelfand EW Understanding asthma using animal models. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2009; 1(1): 10-8.
19. Nials AT, Uddin S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Disease Models & Mechanisms*. 2008; 1: 213-20.
20. Fuchs B, Braun A. Improved mouse models of allergy and allergic asthma—chances beyond ovalbumin. *Curr Drug Targets*. 2008; 9(6): 495-502.
21. Blyth DI, Pedrick MS, Savage TJ, Hessel EM, Fattah D. Lung inflammation and epithelial changes in a murine model of atopic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996; 14(5): 425-38.
22. Kumar RK, Herbert C, Foster PS. The “classical” ovalbumin challenge model of asthma in mice. *Curr Drug Targets*. 2008; 9(6): 485-94.
23. Karaman M, Fırıncı F, Kiray M, Tuncel T, Bağrıyanık H, Yılmaz O, Uzuner N, Karaman Ö. Beneficial effects of erythropoietin on airway histology in a murine model of chronic asthma. *Allergol Immunopathol*. 2012; 40(2): 75-80.
24. Siegle JS, Hansbro N, Herbert C, Yang M, Foster PS, Kumar RK. Airway hyperreactivity in exacerbation of chronic asthma is independent of eosinophilic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006; 35: 565-70.
25. Uzuner N, Kavukcu S, Yılmaz O, Ozkal S, İşlekel H, Karaman O, et al. The role of L-carnitine in treatment of a murine model of asthma. *Acta Med Okayama* 2002; 56(6): 295-301.
26. Kumar RK, Herbert C, Foster PS. Mouse models of acute exacerbations of allergic asthma. *Respirology*. 2016; 21(5): 842-9.
27. Hoymann HG. Invasive and noninvasive lung function measurements in rodents. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2007; 55(1): 16-26.
28. Hoymann HG. New developments in lung function measurements in rodents. *Exp Toxicol Pathol*. 2006; 57(2): 5-11.
29. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy* 2008; 63(86): 8-160.
30. Günel C, Demirci B, Eryılmaz A, Yılmaz M, Meteoglu İ, Ömürlü İK et al. Inhibitory Effect of Pycnogenol® on Airway Inflammation in Ovalbumin-Induced Allergic Rhinitis. *Balkan Med J*. 2016; 33(6): 620-626.
31. Ouyang Y, Miyata M, Hatsushika K, Ohnuma Y, Katoh R, Oga-wa H, et al. TGF-beta signaling may play a role in the development of goblet cell hyperplasia in a mouse model of allergic rhinitis. *Allergol Int*. 2010; 59(3): 313-9.
32. Işık S, Karaman M, Adan A, Kiray M, Bağrıyanık HA, Sözmén ŞÇ et al. Intraperitoneal mesenchymal stem cell administration ameliorates allergic rhinitis in the murine model. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2016 Jul 5. [Epub ahead of print]
33. Wen WD, Yuan F, Wang JL, Hou YP. Botulinum toxin therapy in the ovalbuminsensitized rat. *Neuroimmunomodulation*. 2007; 14: 78-83.
34. Brozmanova M, Calkovsky V, Plevkova J, Bartos V, Plank L, Tatar M. Early and late allergic phase related cough response in sensitized guinea pigs with experimental allergic rhinitis. *Physiol Res*. 2006; 55: 577-584.
35. Salib RJ, Howarth PH. Remodelling of the upper airways in allergic rhinitis: is it a feature of the disease? *Clin Exp Allergy*. 2003; 33(12): 1629-33.
36. Shimizu T, Shimizu S, Hattori R, Majima Y. A mechanism of antigen-induced goblet cell degranulation in the nasal epithelium of sensitized rats. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 112(1): 119-25.

37. Williams CM, Rahman S, Hubeau C, Ma HL. Cytokine pathways in allergic disease. *Toxicol Pathol.* 2012; 40(2): 205-15.
38. Machura E, Rusek-Zychma M, Jachimowicz M, Wrzask M, Mazur B, Kasperska-Zajac A. Serum TARC and CTACK concentrations in children with atopic dermatitis, allergic asthma, and urticaria. *Pediatr Allergy Immunol.* 2012; 23(3): 278-84.
39. Jin H, He R, Oyoshi M, Raif S, Geha RS. Animal Models of Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2009; 129: 31-41.
40. Matsuda H, Watanabe N, Geba GP, Sperl J, Tsudzuki M, Hiroi J et al. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol.* 1997; 9: 461-6.
41. Watanabe O, Natori K, Tamari M, Shiimoto Y, Kubo S, Nakamura Y. Significantly elevated expression of PF4 (platelet factor 4) and eotaxin in the NOA mouse, a model for atopic dermatitis. *J Hum Genet.* 1999; 44(3): 173-6.
42. Haraguchi M, Hino M, Tanaka H, Maru M. Naturally occurring dermatitis associated with *Staphylococcus aureus* in DS-Nh mice. *Exp Anim.* 1997; 46: 225-9.
43. O'Regan GM, Irvine AD. The role of filaggrin in the atopic diathesis. *Clin Exp Allergy.* 2010; 40(7): 965-72.
44. Moniaga CS, Kabashima K. Filaggrin in atopic dermatitis: flaky tail mice as a novel model for developing drug targets in atopic dermatitis. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2011; 10(6): 477-85
45. Spergel J, Mizoguchi E, Brewer J, Martin T, Bhan A, Geha R. Epicutaneous sensitization with protein antigen induces localized allergic dermatitis and hyperresponsiveness to metacholine after single exposure to aerosolized antigen in mice. *J Clin Invest.* 1998; 101: 1614-22.
46. Man MQ, Hatano Y, Lee SH, Man M, Chang S, Feingold KR, et al. Characterization of a Hapten-Induced, Murine Model with Multiple Features of Atopic Dermatitis: Structural, Immunologic, and Biochemical Changes following Single Versus Multiple Oxazolone Challenges. *J Invest Dermatol.* 2008; 128(1): 79-86.
47. Laouini D, Kawamoto S, Yalcindag A, Bryce P, Mizoguchi E, Oettgen H, et al. Epicutaneous sensitization with superantigen induces allergic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 981-987.
48. Zhang Z, Hener P, Frossard N, Kato S, Metzger D, Li M, Chambon P: Thymic stromal lymphopoietin overproduced by keratinocytes in mouse skin aggravates experimental asthma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, 106(5): 1536-41.
49. Sozmen SC, Karaman M, Micili SC, Isik S, Ayyildiz ZA, Bagriyanik A, Uzuner N, Karaman O. Resveratrol ameliorates 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis-like lesions through effects on the epithelium. *PeerJ.* 2016; DOI 10.7717/peerj.1889
50. Hanifin JM, Thurston M, Omoto M, Cherill R, Tofte SJ, Graeber M. The eczema area and severity index (EASI): assessment of reliability in atopic dermatitis. *EASI evaluator group. Exp Dermatol* 2001; 10: 11-18.