

# Hayvan deneylerinde planlanma ve model seçimi Planning in animal experiments and choosing model

Mehmet Kaya<sup>1</sup>, Aydın Çevik<sup>2</sup>

<sup>1</sup>İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

<sup>2</sup>Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Deneysel Hayvanları Biyolojisi ve  
Biyomedikal Uygulama Teknikleri Anabilim Dalı, İstanbul

## ÖZET

Hayvan çalışmalarında amaç, hücre/doku/organ/sistem bağlamında fizyolojik ve patolojik mekanizmaları anlamak, sistem ve sistemler arası ilişkiyi öğrenmek, hastalıklara karşı tedavi yolları bulmak, hastalık ve/veya hasarın tanısı için yöntemler geliştirmek ve geleceğin bilim insanı ve hekimini yetiştirmektir. Hayvanlarla insan arasında biyolojik açıdan birçok benzerlik vardır. Bu benzerliklere; immün fonksiyon: İnsan-Fare; kardiyovasküler fonksiyon: İnsan-Köpek; çocuk felci (Polio): Maymun-İnsan eşleşmeleri örnek verilebilir. Ayrıca köpeklerde diyabette insulinin önemi, Fare ve Zucker obez sıçan modellerinde obezitede leptinin rolü; Sıçan, kedi ve köpek çalışmaları ile de hipertansiyonun tedavi yolları gösterilmiş, bebek ölümleri koyun/kuzu çalışmalarıyla hiyalin membran hastalığının bebeklerde en önemli ölüm nedeni olduğu ispatlanmıştır. Gen-tedavi yaklaşımları üzerine genetiği iyi bilinen fare modellerinde çalışılmaktadır. Uygun hayvan modeli seçmeden önce "Alternatif yöntemler" yani hayvan dışı modeller üzerinde durulmalıdır. Ancak zorunlu ise hayvan modeli düşünülmelidir. Deneyler; çeşitli düzeylerde organize edilen parametrelere ait etkilerin hayvan üzerinde uygulanması ve sonuçlarının elde edilmesidir. Öncelikle, doğru deneysel tasarım yapılmalıdır. Çalışma süresince, esas araştırmaya geçiş/veri toplama/işlenmesi adımları tamamlanmalı ve verilerin anlamlandırılması, çıktıların tamamlanması ve teslim edilmesi, idari işlerin tamamlanması, deneyimlerin değerlendirilmesi ve bunlardan ders çıkarılması gerekir.

## ABSTRACT

The purpose of animal studies is to understand the physiologic and pathologic mechanisms at the level of cell/tissue/organ/tissue, to learn the systems and relations between various systems, to develop novel treatments against diseases, to develop novel diagnostic measures for diseases and/or disorders, to contribute to the education of scientists and physicians of the future. There are many similarities between humans and animals. These similarities in immune system; Human-Mouse; similarities in cardiovascular function: Human-Dog; poliomyelitis: Monkey-test in humans. Banting and Best have shown the impact of insulin in dogs in diabetes studies. Obesity: Leptin research in Mouse and Zucker obese rat models; hypertension treatment modalities by research in rats, cats and dogs; infant deaths; hyaline membrane disease was shown to be the leading cause of death in preterm infants by studies in sheep/lambs. Gene therapy approaches" are being tested in mouse models. Alternatives" before choosing the appropriate animal model non-animal models. Animal model should be considered only if it is inevitable. Experiments consist of demonstrating the application of the effects of parameters organized at various levels and of obtaining the results on the animals. First of all, true experimental design should be done. During the study, it requires to consider the starting of real experiment/Data recruitment and processing. It is also necessity the interpretation of data, completion and submission of outputs, completion of administrative affairs, interpretation of experiences and taking lessons. Therefore, sharing the results with the scientific world is also required.

## GİRİŞ

Hayvanlar üzerinde gerçekleştirilen deneysel araştırmaların sonuçları insanda hem fizyolojik hem de patolojik mekanizmaların çözümlenmesine önemli katkılar sağlamaktadır. Bu amaçla, sadece 2005 yılında Japonya’da 11 milyon, Avrupa birliği ülkelerinde 12 milyon ve Amerika Birleşik devletlerinde 17 milyon kadar omurgalı hayvanın kullanıldığı bilinmektedir (1, 2, 3, 7, 15). Yukarıda adı geçen ülkelerde deneysel amaçla kullanılan omurgalı hayvanların başında fare (%65) ve sıçan (%23) gelmektedir. Kullanım sırasına göre bu türleri ikiyaşayışlılar ve balıklar takip etmektedir. Listenin geriye kalanını ise kuş, kobay, tavşan, kedi, köpek, çiftlik hayvanları ve maymunlar oluşturmaktadır.

Bilimsel araştırma ve eğitim faaliyetlerinde laboratuvar hayvanı üzerindeki çalışmalara; hücre, doku, organ ve sistem bazında fizyolojik ve patolojik mekanizmalarının anlaşılması, sistem ve sistemler arası ilişkilerin öğrenilmesi, hastalık veya fonksiyonel bozukluklar için yeni tanı yöntemlerinin geliştirilmesi, hastalık veya bozuklukların tedavisine yönelik yeni bilgiler edinilmesi ve geleceğin bilim insanları ve araştırmacıların eğitimine katkı sağlanması amacıyla gereksinim duyulmaktadır.

### Hayvan çalışmalarından elde edilen veriler insanlar için kullanılabilir mi?

Hayvan modeli seçiminde hayvan türleri ve insanlar arasındaki benzerlikler dikkate alınmaktadır (9). Bu benzerliklere örnekler verilecek olursa, immün sistem fonksiyonu bakımından farenin insana oldukça yakın olduğunu, kardiyovasküler ve diyabet mekanizmaları söz konusu olduğunda ise insana en yakın benzerlik gösteren türün köpek olduğu bilinmektedir. Hipertansiyon çalışmalarında ise çoğunlukla sıçan, kedi ve köpekler tercih edilmekte, yeni doğan ölümleri araştırma konusu ise deney hayvanı olarak koyunlar kullanılmaktadır. Kistik fibrozis modeli olarak özellikle domuz seçilirken, genetik bazlı çalışmalarda fare modelleri sıklıkla tercih edilmektedir. Obezite araştırmalarında fare soyları hızlı kilo artışıyla birlikte diyabete yakınlıkları ve kısa ömürlü oluşları nedeniyle iyi birer model olarak kabul edilirken aynı türün soyları yaşam sürelerinin kısalığı nedeniyle uzun süreli toksisite çalışmalarında uygun görülmezler. Filogenetik bakımdan insana yakınlık önemli olmakla birlikte her zaman model olarak seçilme garantisi sağlamaz. Örneğin evrimsel süreç bakımından şempanzeler insanlara daha yakın bir türdür. HIV virüsü ile enfekte olabilirler fakat hastalık tablosu gelişmeyebilir. Bu durumda insana daha az yakın bir tür olan kedilerde FIV(Kedi immün yetersizliği virüsü) virüsünün varlığında, insandaki HIV virüsünün yol açtığı AIDS hastalığının gelişimi ve belirtilerine benzer bir tablo ortaya çıkabilmesi nedeniyle daha iyi bir model olarak değerlendirilirler (8).

### Hayvan çalışmalarında deneysel planlama nasıl

### yapılmalı?

Uygun hayvan modeli seçiminden önce araştırma konusu için literatür ve alternatif yöntem taramaları hayvan kullanımının zorunluluğuna işaret ediyorsa hayvan modeli düşünülmelidir. Örneğin körlük konulu çalışmaların bakteriler üzerinde, hipertansiyonun tedavisine yönelik çalışmaların doku kültüründe yapılması, ya da transplantasyon gibi cerrahi girişimlerde matematiksel modellemelerle anlamlı bir sonuca ulaşılması beklenemez. Deneyin planlanmasında hayvan deneyleri etiğinin temeli kabul edilen 3R kuralından (Replacement-Reduction-Refinement) mutlaka yararlanılmalıdır (5, 6, 7).

**Deney;** organize edilen parametrelerin uygulanması ve sonuçların elde edilmesidir. Ancak, her deneyin başta para olmak üzere deneyimli araştırmacı, zaman ve malzeme gibi birçok maliyeti söz konusudur.

Deneyin organizasyonunda, öncelikle planlama, ardından deneyin uygulanması ve sonuçların elde edilmesi gelir.

**Planlama:** Problem tanımlanmalı ve hedefler saptanmalı, sonrasında da araştırma konusu ile ilgili bilgi toplanmalı ve orijinal hipotez kurulmalıdır.

**Uygulama:** Proje konusu kapsamında deneyin planlanması, çalışma ekibinin ve deneysel sorumlulukların belirlenmesinin ardından yerel etik kurulunun onayını takiben deneye başlanmalıdır.

**Tamamlama:** Verilerin yorumlanması, çalışmanın yazılması, parasal destek veren kurum veya kişilere proje ilgili kesin rapor verilmesi, çalışma sırasındaki yaşananlar hakkında genel bir durum değerlendirilmesi ve bunlardan ders çıkarılmasını takiben çalışmanın bir dergide yayınlanması ile bilim dünyasına duyurulmasından ibarettir.

Hayvanlar bireysel olarak karakteristik farklılıklar gösterdiklerinden, deneysel çalışmalar; tekrarlanabilir ve doğrulanabilir olmalı ve geçerli testler kullanılmalıdır. Deneylerde standardize cihaz ve aletler kullanılarak standart işlemler uygulanmalıdır. Teknik veya yöntemler; çalışmalar ve türler arasında karşılaştırma yapmak için yeteri kadar duyarlı olmalıdır. Uygulanan maddenin tipi, dozu ve yolu ile elde edilen sonuçlar kıyaslanabilir olmalıdır (6).

Normal biyoloji ya da davranışların çalışılabileceği kendiliğinden ya da indüklenmiş bir patolojik durumun araştırıldığı ve bir biyolojik işlev yönünden insan veya diğer hayvan türlerine benzerlik gösteren hayvanların kullanıldığı model “hayvan modeli” olarak tanımlanır (8).

### Hayvanların model olarak seçiminde dikkat edilmesi gereken adımlar

Hayvan modeli seçiminde planlanan türe ait anatomik, fizyolojik ve davranış karakterlerinin iyi bilinmesi önemli bir avantaj sağlayacaktır (4). Deneyin planlanması aşamasında kullanılacak hayvanların “tür, soy, altsoy, mikrobiyolojik ve genetik statüleri gibi bilgileri göz önüne alınarak seçilmelidir. Seçilen modelin çok iyi tanımlanmış olması ve diğer araştırmacılara yol gösterici olması için önemlidir. Deneye spesifik ve en az sayıda hayvan ile ideal veri elde edilmeye

çalışılmalıdır (10, 11, 14, 18). Laboratuvar hayvanları, standart koşullarda barındırma, üretim ve düzenli olarak sağlık taraması yapılan tedarikçi kurumlardan sağlanmalıdır. Hayvan modeli seçiminde en önemli adım, öncelikle literatür taraması yapılarak hangi modelin olası ve gerçekçi olduğuna karar vermektir.

Model olarak kullanılacak hayvanlar hedef türün normal yaşam şartlarını temsil etmelidir. Mikrobiyolojik durumları aynı olmayan hayvanlar araştırmada birlikte değerlendirilmemelidir. Örneğin, konvansiyonel koşullarda üretilen fare ile patojen-free farenin çeşitli ajanlara karşı verdikleri yanıt birbirlerinden farklılık göstermektedir.

Hayvan modelinin belirlenmesinde etkili faktörlerin başında uygulanacak plana ve istatistiğe göre kullanılacak hayvan sayısı, çalışılması istenen insan hastalığına model veya organ sisteminin uygunluğu, genetik durumu, uygulamalara hayvanın yanıtı, çevrenin spesifik hayvan modeli üzerine etkisi ve kullanılan hayvan ile ilgili tüm yaşamsal bilgiler gelmektedir (4, 12, 18). Diğer yandan tür seçimi olanak, maliyet ve deneyimlere dayandırılmalı, ancak araştırmacı yeterli deneyime sahip değilse deneyimli araştırmacılardan destek sağlanmalıdır. Böylelikle yayınlarda belirtilmeyen ama araştırmanın deneysel aşamasında büyük katkı sağlayabilecek "püf noktaları" hakkında bilgi ve öneriler alınabilmektedir.

Deney verilerini etkileyen deney dışı faktörler arasında fiziki ve çevresel faktörler, barınma ortamı ve bakım koşulları önde gelmektedir (12, 13, 17). Örneğin hayvan için özel bakım zorunlu ise (genetik modeller veya domuz, maymun vs.); uygun altyapı varlığının yanı sıra gerekli bakım koşullarının sağlanması için deneyimli personele gereksinim vardır.

Deneyi etkileyecek hayvan faktörleri ise; hayvanın vücut hacmi, yaşam süresi, yaşı, cinsiyeti, gebelik durumu, biyolojik ritimi, üretim tarzı, genetik (inbred, outbred, mutant veya transgenik, knock-out, knock-in) ve mikrobiyolojik (konvansiyonel, gnotobiyotik, germ-free, SPF vs.) durumlarıdır. Stres faktörü de mutlaka dikkate alınması gereken bir unsurdur. Örneğin bir hayvanın barınma ortamından başka bir yere taşınması durumunda uyum süreci yaklaşık olarak bir hafta sürmektedir. Hayvanların aynı ortam koşulları altında tutulması deneyi olumlu etkileyecektir.

Hayvanın barınma ortamı, çevre koşulları ve fizyolojik gereksinimlerinin karşılanması oldukça önemlidir. Mikropsuz ortamda "patojen-free" yaşayan hayvanların yaşadıkları alanlar ile konvansiyonel laboratuvar hayvanlarının yaşadıkları alan şartları farklı olmasından dolayı bu durumun çalışma sonuçlarını etkileyebileceği dikkate alınmalıdır.

Diğer taraftan, deney hayvanlarının metabolizmasını etkileyen değişkenlerin çok sıkı bir şekilde kontrol edilmesi gerekir. Bu değişkenler esas olarak diyet alışkanlıkları, cinsiyet, yaş, hayvana verilecek ajanın etki yolu (deri altı, periton veya damar içi, vs.), örnek alma yeri ve zamanı, mevsim, günlük vücut ısısı ve diürenal varyasyonlardan oluşmaktadır. Kemirgenlerin metabolizması insana kıyasla oldukça hızlıdır, örneğin sıçanda kalp frekansı 325-350 kadardır. Ancak, metabolizmanın kontrolü ve işleyişi vücut büyüklüğü arttıkça yavaşladığından ilaç dozlarının buna göre ayarlanması gerekir

(13).

Cinsiyet ve büyüme hızının deney verilerini etkiledikleri bilinmektedir. Cinsiyet ilacın kandaki yarı ömrünü etkileyebilir. Aynı çevre koşullarında genç erkek sıçanlar, dişi bireylere göre daha hızlı kilo alırlar.

Bir hayvan modelinin seçiminde önemli kriterlerden biri de kullanılacak ajanın "kimyasal madde, aşı, virüs, bakteri, hücre" özellikleri, etken dozu ve uygulanma yolunu göz önünde bulundurmaktır (8, 13). Kullanılacak ajanın verilme yolu insandaki gibi olmalı (inhalasyon, oral, i.v, vs.), etki bilimsel verilerle ifade edilebilmeli, etken doz tekrarlandığında aynı sonuçlar alınabilmeli, doz ve sonuç arasında ölçülebilir bir ilişki gösterilmeli ve hastalık etmeni insanda hastalığa sebep olan ajanla aynı olmalıdır.

Hayvan araştırmalarından elde edilen test sonuçlarını doğrulamamak yanlış çıkarımlara neden olabilir ve birçok insanın sağlığını olumsuz etkileyebilir. Bir deney hayvanı için zehirsiz veya etkin bir madde, insan için zehirli veya etkisiz olabilir.

Bilindiği üzere, hayvan hastalık modelleri homolog (insanlarla aynı neden, belirti ve tedavi seçenekleri sunan), izomorfik (aynı belirti ve tedavi seçeneklerini paylaşan) ve prediktif (tedavi seçenekleri açısından benzer) modeller olmak üzere üç belli başlı grupta toplanmaktadır. Bu son gruptaki hayvanlar bir hastalığın nedeni bilinmediğinde tercih edilmektedir. Örneğin astım ve bronşit çalışmalarında sıçanlar "prediktif bir model" olarak yetersiz kalmaktadır. Bir hayvan modeli insan hastalığını her yönüyle tam olarak temsil edemez. Aslında deneysel bilim yaklaşık bilgi edinme çalışmasıdır. Dolayısıyla modeller de yaklaşık bir fikir edinmemize katkıda bulunmaktadır.

Deneysel hayvan modellerinden elde edilen sonuçlar; insan için çoğu kez kalitatif ya da kantitatif olarak uyarlanabilmektedir. Farmakokinetik ve/veya dinamiği üzerinden insanda etkili bir doz seçimine katkı sağlamakta, insanda morbidite ve mortalite oranlarının azalmasına neden olmakta ve insan sağlığına önemli yarar sağlamaktadır. Hayvandan elde edilen bilginin insana doğrudan aktarılabilmesi bir sonraki adıma kalmakta ve her zaman garanti edilememektedir. Hayvan sonuçlarının geçerliliğini olumsuz etkileyen faktörlerin başında genç, sağlıklı, tek cinsiyetten ve homojen dağılım gösteren deney hayvanlarından elde edilen verilerin, birden fazla hastalığı olan, her iki cinsiyetten ve heterojen dağılım gösteren insanlar üzerinde uyarlanmaya çalışılması gelmektedir. Ayrıca, insandakine tam olarak benzer koşullarda oluşturulamayan hastalık ya da hasar modeli olan hayvanların kullanımı da söz konusudur (16).

Sonuç olarak araştırmacılar deneysel çalışmalarında hayvan haklarını ve etiğini esas alarak insanlığa yararlı bilgiler sağlamayı hedeflemelidir. Bu bilimsel hizmet adına hayvan modellerinin kullanımı şimdilik geçerliliğini korumaya devam edecek ve böylece hayvan deneylerinin sonuçları yarının doğru veya yanlışları olmaya devam edecektir.

## Kaynaklar

1. Amerika Birleşik Devletleri, Federal Tarım Bakanlığı Verileri 2005. "2005a Report on Enforcement of the Animal Welfare Act U.S. Department of Agriculture. Retrieved February 8, 2008".
2. Amerika Birleşik Devletleri, Federal Tarım Bakanlığı Verileri 2005b "The humane care and treatment of laboratory animals National Association of Biomedical Research. Retrieved February 8, 2008".
3. Avrupa Birliği Komisyon Raporu-2005. "Fifth Report on the Statistics on the Number of Animals used for Experimental and other Scientific Purposes in the Member States of the European Union Commission of the European Communities, published November 2007".
4. De Aguilar-Nascimento JE. Fundamental steps in experimental design for animal studies. *Acta Cirúrgica Brasileira* 2005; 20 (1): 1-8.
5. De Boo J, Knight A. Increasing the implementation of alternatives to laboratories animal use. *AATEX* 2008; 13(3): 109-117.
6. Festing MFW. Reduction of animal use: Experimental design and quality of experiments. *Laboratory Animals* 1994; 28: 212-221.
7. Fred W. Quimby. Animal Models in Biomedical Research. In: James G. Fox, Lynn C. Anderson, Franklin M. Loew, Fred W (ed). *Laboratory Animal Medicine*. Academic Press. Amsterdam, Netherlands, 2nd ed., 2002; pp 1185-1200.
8. Hau J. Animal models. In: Hau J. and Van Hoosier L. Jr (ed). *Handbook of laboratory animal science*, Vol. II, CRC Press, Boca Raton,US, 2nd ed.,2003:pp 1-9.
9. Henry J. Baker, J. Russell Lindsey. Research in Laboratory Animal and Comparative Medicine. In: James G. Fox, Lynn C. Anderson, Franklin M. Loew, Fred W (ed). *Laboratory Animal Medicine*. Academic Press. Amsterdam, Netherlands, 2nd ed., 2002; pp 1228-1237.
10. Hessler JR, Learly SL. Design and Management of Animal Facilities. In: James G. Fox, Lynn C. Anderson, Franklin M. Loew, Fred W (ed). *Laboratory Animal Medicine*. Academic Press. Amsterdam, Netherlands, 2nd ed., 2002; pp 909-948.
11. Johnson PD, Besselsen DG. Practical aspects of experimental design in animal research. *ILAR Journal* 2002; 43 (4): 202-206.
12. Lipman NS, Perkins SE. Factors that may influence animal research. In: Fox JG, Anderson LC, Loew FM, Quimby FW (ed). *Laboratory Animal Medicine*. Academic Press. Amsterdam, Netherlands, 2nd edition., 2002; pp 1143-1165.
13. Morrow PE, Haseman JK, Hobbs CH, Driscoll KE, Vanessa VU, Oberdorster G. The maximum tolerated dose for inhalation bioassays: Toxicity vs overload. *Fundamental and Applied Toxicology* 1996; 29: 155-167.
14. Rigalli A, Elina Di Loreto V. *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat*, CRC Press Taylor & Francis Group. New York, USA, 2009 ed., 2009.
15. Trull FL. More Regulation of Rodents. *Science* 1999; 284 (5419): 1463.
16. Van der Worp HB, Howells DW, Sena ES, Porritt MJ, Rewell S, et al. (2010) Can Animal Models of Disease Reliably Inform Human Studies? *PLoS Med* 7(3): e1000245.
17. Wolfensohn S, Lloyd M. *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*, Blackwell Publishing Ltd. Oxford, UK, 3rd ed., 2003.
18. Wood MW, Hart LA. Selecting appropriate animal models and strains: Making the best use of research, information and outreach. *AATEX* 2008; 14 Special Issue: 303-306.