



Journal of Laboratory Animal Science and Practices

Laboratuvar Hayvanları Bilimi ve Uygulamaları Dergisi

Official Journal of Atatürk University-Medical Experimental Application and Research Center

Volume 4 • Issue 2 • September 2024

EISSN 2791-8645

<https://dergipark.org.tr/tr/pub/jlasp>


Journal of Laboratory Animal Science and Practices

CHIEF EDITOR / BAŞ EDITÖR

Hakan AYDIN 

Department of Virology, Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Erzurum, Türkiye
Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

Section Editors / Bölüm Editörleri

Nergis ULAŐ 

Department of Internal Medicine, Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Erzurum, Türkiye
Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

Mehmet Özkan TİMURKAN 

Department of Virology, Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Erzurum, Türkiye
Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

Emrah ÖZAKAR 

Department of Pharmaceutical Technology, Atatürk University, Faculty of Pharmacy, Erzurum, Türkiye
Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

Rukiye SEVİNÇ ÖZAKAR 

Department of Pharmaceutical Technology, Atatürk University, Faculty of Pharmacy, Erzurum, Türkiye
Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

Statistics Editor / İstatistik Editörü

Ömer ELTAS 

Department of Biometrics, Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Erzurum, Türkiye
Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyometri Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

Foreign Language Consultants / Yabancı Dil Danışmanı

Başak HANEDAN 

Department of Internal Medicine, Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Erzurum, Türkiye
Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

ADVISORY BOARD / DANIŐMA KURULU

Osman YILMAZ 

Department of Laboratory Animals, Dokuz Eylül University, Faculty of Health Sciences, İzmir, Türkiye
Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Deney Hayvanları Bölümü, İzmir, Türkiye

Mustafa Sinan AKTAŐ 


Department of Internal Medicine, Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Erzurum, Türkiye
Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

Osman AKTAŐ 

Department of Medical Microbiology, Atatürk University, Faculty of Medicine, Erzurum, Türkiye
Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi İkrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

Küşver MAMEDOVA 

Azerbaijan State Agricultural University, Faculty of Veterinary Medicine
Azerbaijan

Latif Emrah YANMAZ 

Department of Veterinary Surgery, Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Burdur, Türkiye
Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Cerrahisi Anabilim Dalı, Burdur, Türkiye

Elena Adriana Aniță 

Department of Virology, "Ion Ionescu de la Brad" University of Life Sciences Iasi, Faculty of Veterinary Medicine, Iasi, Romania

Volkan YILMAZ 

Department of Virology, Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine, Kars, Türkiye
Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Kars, Türkiye

Hatice EFSUN KOLATAN 

Department of Laboratory Animal Science, Institute of Health Science, Dokuz Eylül University, İzmir, Türkiye
Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Laboratuvar Hayvanları Bilimi Bölümü, İzmir, Türkiye



Journal of Laboratory Animal Science and Practices

AIMS AND SCOPE

Journal of Laboratory Animal Science and Practices is a scientific, open access, online-only periodical published in accordance with independent, unbiased, and double-blinded peer-review principles. The journal is an official publication of the Atatürk University, Medical Experimental Application and Research Center, and published biannually in March and September. The publication languages of the journal are Turkish and English.

Journal of Laboratory Animal Science and Practices aims to contribute to the literature by publishing manuscripts at the highest scientific level. The journal publishes research articles, reviews and case reports that are prepared in accordance with ethical guidelines.

The scope of the journal includes but not limited to relevant to the topics of laboratory animals in the fields of medical medicine, veterinary medicine, dentistry, aquaculture, science, agriculture, pharmacy and similar fields in which laboratory animals are used, and all other related interdisciplinary theoretical research.

The target audience of the journal includes researchers and specialists who are interested or working in all fields in the journal's scope.

The editorial and publication processes of the journal are shaped in accordance with the guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), World Association of Medical Editors (WAME), Council of Science Editors (CSE), Committee on Publication Ethics (COPE), European Association of Science Editors (EASE), and National Information Standards Organization (NISO). The journal is in conformity with the Principles of Transparency and Best Practice in Scholarly Publishing (doaj.org/bestpractice).

Journal of Laboratory Animal Science and Practices currently indexed in **DOAJ, EBSCO, CABI, TÜBİTAK ULAKBİM TR Dizin**.

All expenses of the journal are covered by the Atatürk University. Processing and publication are free of charge with the journal. No fees are requested from the authors at any point throughout the evaluation and publication process. All manuscripts must be submitted via the online submission system, which is available at <https://dergipark.org.tr/en/pub/ilasp>. The journal guidelines, technical information, and the required forms are available on the journal's web page.

Disclaimer

Statements or opinions expressed in the manuscripts published in the journal reflect the views of the author(s) and not the opinions of the editors, editorial board, and/or publisher; the editors, editorial board, and publisher disclaim any responsibility or liability for such materials.

Open Access Statement

Journal of Laboratory Animal Science and Practices is an open access publication, and the journal's publication model is based on Budapest Access Initiative (BOAI) declaration. All published content is available online, free of charge at <https://dergipark.org.tr/en/pub/ilasp>. Authors retain the copyright of their published work in the Journal of Laboratory Animal Science and Practices. The journal's content is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC) 4.0 International License which permits third parties to share and adapt the content for non-commercial purposes by giving the appropriate credit to the original work.

From January 2023 onwards, content is licensed under a Creative Commons CC BY-NC 4.0 license. The journal's back content was published under a traditional copyright license however the archive is available for free access.

You can find the current version of the Instructions to Authors at <https://dergipark.org.tr/tr/pub/ilasp>



Contact (Editor in Chief) / İletişim (Baş Editör)

Hakan AYDIN

Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine,
Department of Virology, Erzurum, Türkiye
Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı,
Erzurum, Türkiye

✉ hakanayd@atauni.edu.tr

✉ hakanayd@atauni.edu.tr

🌐 <https://dergipark.org.tr/en/pub/ilasp>

☎ +90 442 231 70 27

Contact (Publisher) / İletişim (Yayıncı)

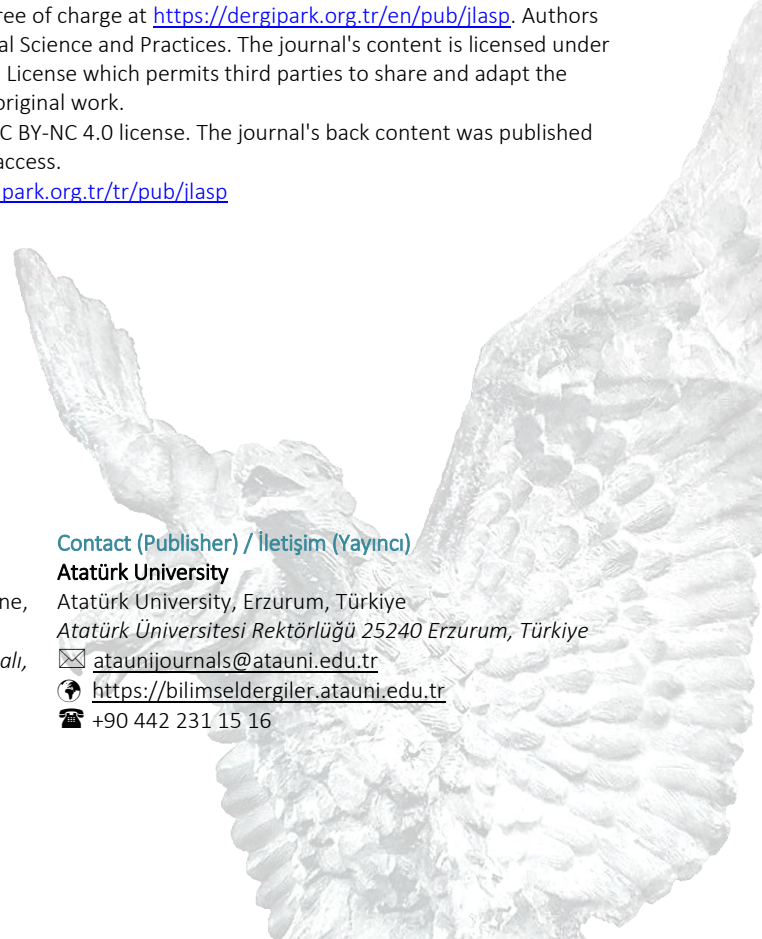
Atatürk University

Atatürk University, Erzurum, Türkiye
Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü 25240 Erzurum, Türkiye

✉ ataunijournals@atauni.edu.tr

🌐 <https://bilimseldergiler.atauni.edu.tr>

☎ +90 442 231 15 16



Journal of Laboratory Animal Science and Practices

AMAÇ VE KAPSAM

Laboratuvar Hayvanları Bilimi ve Uygulamaları Dergisi; bağımsız, tarafsız ve çift-kör hakem değerlendirme ilkelerine bağlı yayın yapan, Atatürk Üniversitesi, Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezinin açık erişimli bilimsel elektronik yayın organıdır. Dergi, Mart ve Eylül aylarında olmak üzere yılda iki sayı olarak yayınlanmaktadır. Yayın dili Türkçe ve İngilizce'dir.

Laboratuvar Hayvanları Bilimi ve Uygulamaları Dergisi, yüksek bilimsel kaliteye sahip özgün araştırma, derleme ve olgu sunumu türündeki makalelerle literatüre katkı sunmayı amaçlamaktadır.

Dergi kapsamına; laboratuvar hayvanlarının kullanıldığı tıp hekimliği, veteriner hekimliği, diş hekimliği, su ürünleri, fen bilimleri, ziraat, eczacılık ve benzeri alanlarındaki ulusal ve uluslararası çalışmalar gibi konular girmektedir.

Derginin hedef kitlesini derginin kapsamındaki alanlarda araştırma yapan bilim insanları, amatör ve profesyonel olarak çalışanlar ve bu alana ilgi duyan tüm kişiler oluşturmaktadır.

Derginin editöryel ve yayın süreçleri, International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), World Association of Medical Editors (WAME), Council of Science Editors (CSE), Committee on Publication Ethics (COPE), European Association of Science Editors (EASE) ve National Information Standards Organization (NISO) kılavuzlarına uygun olarak biçimlendirilmiştir. Laboratuvar Hayvanları Bilimi ve Uygulamaları Dergisi'nin editöryel ve yayın süreçleri, Akademik Yayıncılıkta Şeffaflık ve En İyi Uygulama (doaj.org/bestpractice) ilkelerine uygun olarak yürütülmektedir.

Laboratuvar Hayvanları Bilimi ve Uygulamaları Dergisi; **DOAJ, EBSCO, CABI, TÜBİTAK ULAKBİM TR Dizin** tarafından dizinlenmektedir.

Derginin tüm masrafları Atatürk Üniversitesi tarafından karşılanmaktadır. Makale değerlendirme ve yayın işlemleri için yazarlardan ücret talep edilmemektedir. Tüm makaleler <https://dergipark.org.tr/tr/pub/jlasp> sayfasındaki online makale değerlendirme sistemi kullanılarak dergiye gönderilmelidir. Derginin yazım kurallarına, gerekli formlara ve dergiyle ilgili diğer bilgilere web sayfasından erişilebilir.

Sorumluluk Reddi

Dergide yayınlanan makalelerde ifade edilen bilgi, fikir ve görüşler Laboratuvar Hayvanları Bilimi ve Uygulamaları Dergisi, Baş Editör, Editörler, Yayın Kurulu ve Yayıncı'nın değil, yazar(lar)ın bilgi ve görüşlerini yansıtır. Baş Editör, Editörler, Yayın Kurulu ve Yayıncı, bu gibi yazarlara ait bilgi ve görüşler için hiçbir sorumluluk ya da yükümlülük kabul etmemektedir.

Açık Erişim Beyanı

Laboratuvar Hayvanları Bilimi ve Uygulamaları Dergisi yayınlanma modeli, Budapeşte Açık Erişim Girişimi (BOAI) bildirgesine dayanan açık erişimli bilimsel bir dergidir. Derginin arşivine <https://dergipark.org.tr/tr/pub/jlasp> adresinden ücretsiz olarak erişilebilir. Yazarlar Laboratuvar Hayvanları Bilimi ve Uygulamaları Dergisi'nde yayınlanmış çalışmalarının telif hakkını elinde tutar. Laboratuvar Hayvanları Bilimi ve Uygulamaları Dergisi'nin içeriği, Creative Commons Atıf-GayriTicari (CC-BY-NC) 4.0 Uluslararası Lisansı ile yayınlanmaktadır. Söz konusu telif, üçüncü tarafların içeriği uygun şekilde atıf vermek koşuluyla, ticari olmayan amaçlarla paylaşımına ve uyarlamasına izin vermektedir.

2023 Ocak'tan itibaren dergi Creative Commons CC BY-NC 4.0 lisansı ile yayın yapmaya başlamıştır. Bu tarihten önceki dergi içeriği ücretsiz erişime açık olmakla birlikte geleneksel telif sistemiyle yayınlanmıştır.

Yazarlara Bilgi'nin güncel versiyonuna <https://dergipark.org.tr/tr/pub/jlasp> adresinden ulaşabilirsiniz.



Contact (Editor in Chief) / İletişim (Baş Editör)

Hakan AYDIN

Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine,
Department of Virology, Erzurum, Türkiye
Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı,
Erzurum, Türkiye

✉ hakanayd@atauni.edu.tr

✉ hakanayd@atauni.edu.tr

🌐 <https://dergipark.org.tr/en/pub/jlasp>

☎ +90 442 231 70 27

Contact (Publisher) / İletişim (Yayıncı)

Atatürk University

Atatürk University, Erzurum, Türkiye
Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü 25240 Erzurum, Türkiye

✉ ataunijournals@atauni.edu.tr

🌐 <https://bilimseldergiler.atauni.edu.tr>

☎ +90 442 231 15 16

Journal of Laboratory Animal Science and Practices

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

Derlemeler / Reviews

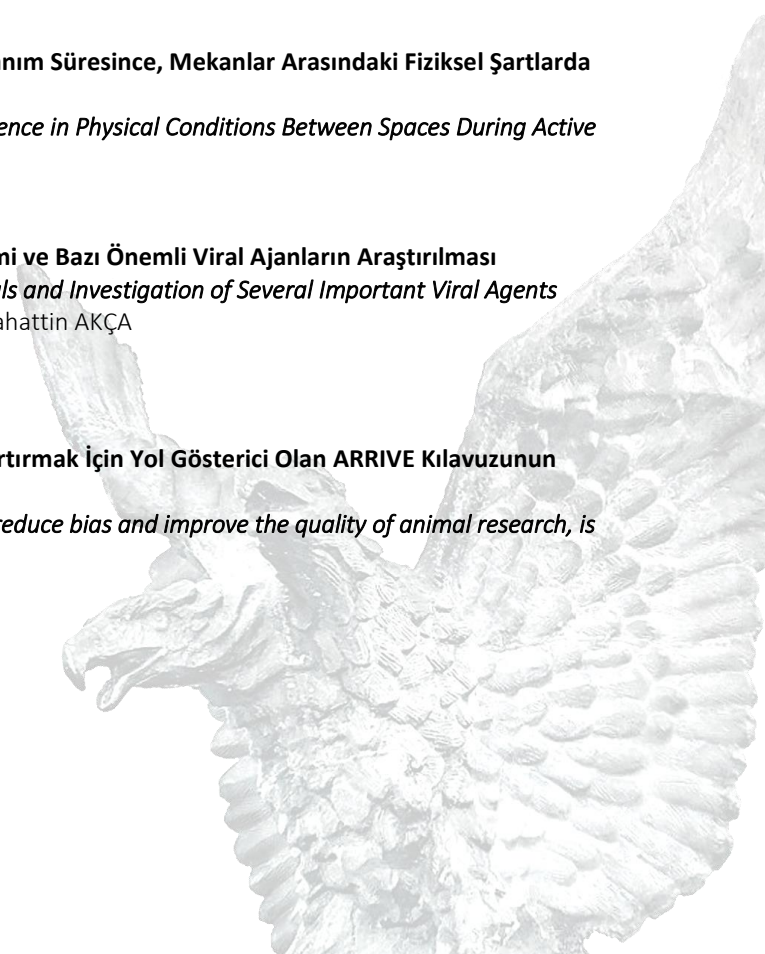
- 1.** Hayati Önemde Bir Balık: Hastalık Senaryolarında Zebra Balığı Modelinin Kullanıldığı Kritik Araştırmalar ve Vaka Raporlarının Taraması
page 53-59
Vital A Fish: A Critical Review of Zebrafish Models in Disease Scenario and Case Reports Screens
Nurdan FİLİK
- 2.** Laboratuvar Hayvanlarında Deneysel Nefrotoksisite Modelleri
page 60-71
Experimental Nephrotoxicity Models in Laboratory Animals
Hikmet Özgün İŞCAN, Abdurrahman AKSOY

Araştırma Makaleleri / Research Articles

- 3.** Kurşun Kaynaklı Oluşan Dalak Toksisitesine Karşı Sinapik Asidin Etkilerinin İncelenmesi
page 72-77
Investigation of the Effects of Sinapic Acid Against Lead-Induced Spleen Toxicity
Elif DALKILINÇ, Sefa KÜÇÜKLER, Şeyma AYDIN
- 4.** Fare ve Ratlarda Tyzerr's Hastalığı'nın Etkeni Clostridium piliforme'nin Moleküler Teşhisi
page 78-82
Molecular Diagnosis of Clostridium piliforme, the Causative Agent of Tyzzer's Disease in Mice and Rats
Ufuk ÜLKER, Sibel KIZIL, Efsun Melike ÇEÇEN, Elif AYDIN
- 5.** Konvansiyonel Laboratuvar Hayvan Tesisinde, Aktif Kullanım Süresince, Mekanlar Arasındaki Fiziksel Şartlarda Farklılık var mıdır?
page 83-90
In Conventional Laboratory Animal Facility, Is There a Difference in Physical Conditions Between Spaces During Active Use?
Hatice Zeynep KOŞAR, Osman YILMAZ
- 6.** Laboratuvar Hayvanlarında Tarama Programlarının Önemi ve Bazı Önemli Viral Ajanların Araştırılması
page 91-100
The Importance of Screening Programs in Laboratory Animals and Investigation of Several Important Viral Agents
Erdal POLAT, Hayrunnisa BOSTAN YÖRÜ, Yasin KALAY, Sebahattin AKÇA

Editöre Mektup / Letter to editor

- 7.** Hayvan Araştırmalarında Yanlılığı Azaltmak ve Kaliteyi Artırmak İçin Yol Gösterici Olan ARRIVE Kılavuzunun Türkçe Çevirisi Resmi İnternet Sitesinde Yayınlandı
Page 101-102
Turkish translation of the ARRIVE Guidelines, which help to reduce bias and improve the quality of animal research, is published on the official website
Halit Güner ORHAN, Ariyan TEIMOORI, Selda EMRE AYDINGÖZ



Journal of Laboratory Animal Science and Practices

Hakem Listesi (2024 Yılı) *Reviewer List (Year 2024)*

Adem ŐAHAN

Ayhan FİLAZİ

Ediz Kaęan ÖZGEN

Ekin Emre ERKILIÇ

Ender DİNÇER

Farah Gönül AYDIN

Fatih Mehmet KANDEMİR

Gökçe ÖZDEMİR

Güşen GÖNEY

Hüsamettin EKİCİ

İlknur KARACA BEKDİK

Mehmet GÜVENÇ

Mine ERİŐİR

Murat GENÇ

Nüvit COŐKUN

Osman YILMAZ

Özgür KAYNAR

Samet TEKİN

Semiha YALÇIN

Sevim ÇİFTÇİ YEGİN

Seyda CENGİZ

Songül ÖTKÜN

Tuęba TANMAN

Veysel PARLAK

Zerrin KUTLU



Vital A Fish: A Critical Review of Zebrafish Models in Disease Scenario and Case Reports Screens

Hayati Önemde Bir Balık: Hastalık Senaryolarında Zebra Balığı Modelinin Kullanıldığı Kritik Araştırmalar ve Vaka Raporlarının Taraması

Nurdan FİLİK



Süleyman Demirel University, Isparta, Turkey.



ABSTRACT

Virtually every major medical advance of the last century and at still has depended upon research with animals. Zebrafish's journey from the ocean to the laboratory leads to major scientific breakthroughs. Transparency structure of zebrafish helps in monitoring their internal structures and are permitting scientist to see effects of nano particles in fish. Their organs share the same main features as humans and so can be used to study human developmental processes. Zebrafish congruence 70% of their genes with humans, and 84% of ailment-dependended genes have zebrafish congruence. The zebrafish embryos can also genetically modified. Certain fishes like zebrafish are able to regenerate damaged retinal nerve cells. Müller glial cells in retina of zebrafish can transform in response to injury and act like stem cells to regrow the retina and replace all damaged neurons. Though humans have the same exact Müller glial cell, they don't respond to damaged in the same way. Zebrafish are also very responsive to having their genomes edited. Zebrafish regenerate some tissue such as heart in during larval stage. In additionally zebrafish are used as an animal model to study pharmacology – how drugs work and what they do to an organism's body. Aim of this review current knowledge of how these specialized structures and model organism by focusing on cellular behaviors and molecular mechanisms, highlighting findings from in vivo models and briefly discussing the recent advances in tissue cell culture and organoids. Review discusses the applications of human organoids models of disease on model organism and outlines the ailment treatments.

Keywords: Model organism, Zebrafish, Disease scenario, Case report screen, Diseases controlling.

Öz

Geçen yüzyılın ve halen de tıbbi gelişmelerin neredeyse tamamı hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalara dayalıdır. Zebra balığının okyanustan laboratuvara olan yolculuğu büyük bilimsel buluşlara yol açar. Zebra balığının şeffaf yapısından dolayı iç organlarının izlenmesine yardımcı olur ve bilim adamlarının balıklardaki nano parçacıkların etkilerini görmesine olanak tanır. Organları insanlarla aynı temel özellikleri paylaşıyor ve bu nedenle insanın gelişim süreçlerini incelemek için kullanılabilir. Zebra balığı genlerinin %70'i insanlarla uyum gösterir ve hastalığa bağlı genlerin %84'ü zebra balığı uyumuna sahiptir. Zebra balığı embriyolarının genetiği de değiştirilebilir. Zebra balığı gibi bazı balıklar, hasar görmüş retina sinir hücrelerini yenileyebilir. Zebra balığının retinasındaki Müller glia hücreleri, yaralanmaya yanıt olarak dönüşebilir ve retinayı yeniden büyütme ve tüm hasarlı nöronları değiştirmek için kök hücreler gibi davranabilir. İnsanlar aynı Müller glia hücresine sahip olsalar da, hasara aynı şekilde tepki vermezler. Zebra balığı aynı zamanda genomlarının düzenlenmesine de oldukça duyarlıdır. Zebra balığı larva döneminde kalp gibi bazı dokuları yeniler. Ayrıca zebra balığı, ilaçların nasıl çalıştığı ve organizmanın vücuduna yaptığı farmakolojik etkiyi incelemek için bir hayvan modeli olarak kullanılıyor. Bu derlemenin amacı, burada, hücresel davranışlara ve moleküler mekanizmalara odaklanarak, in vivo modellerden elde edilen bulguları vurgulayarak ve doku hücre kültürü ve organoidlerdeki son gelişmeleri kısaca tartışarak, bu özelleşmiş yapıların ve model organizmanın nasıl olduğuna dair mevcut bilgileri gözden geçirmektir. Derleme, insan organoid hastalık modellerinin model organizma üzerindeki uygulamalarını tartışmakta ve hastalık tedavilerinin ana hatlarının altını çizmektedir.

Anahtar Kelimeler: Model organizma, Zebra balığı, Hastalık senaryosu, Vaka raporu taraması, Hastalıkların kontrolü

Geliş Tarihi/Received :26.01.2024
Kabul Tarihi/Accepted :22.05.2024
Yayın Tarihi/Publication Date :19.09.2024

Sorumlu Yazar/Corresponding author:

Nurdan Filik

E-mail: nurdanfilik@sdu.edu.tr

Cite this article: Filik N. (2024) Vital a fish: a critical review of zebrafish models in disease scenario and case reports screens. *Journal of Laboratory Animal Science and Practices*, 4(2), 53-59.



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License.

Introduction

“Zebrafish are used as a model for typical and atypical human development. It is surprising how much we have in common with zebrafish” says the NIH. In accompanying manuscript, outlined for using zebrafish models to research human ailments. The use of classical animal model systems and cell line in research during the late twentieth and early twenty-first centuries has been successful in major fields, such as improving of cellular signalling pathways, discovery drug targets and guiding design of candidate drugs for infectious disease (Klein et al., 2002). Model organisms that are produced under in vitro conditions and are easy to produce, have a short generation interval, have experimental advantages, are suitable for laboratory environments, and are used to investigate biological events, especially diseases (Kim et al., 2020).

In recent years, vertebrate model organisms have been frequently used in many studies in biological, genetic, pharmacological and toxicological fields (Kayhan et al., 2018). Selected species which as model organisms has been widely studied because of it is easy to maintain and propagate in laboratory and has certain experimental advantages. This models are non-human species used in the laboratory to help scientists understand biological processes (Jennings, 2011). Model organisms are used to create highly detailed genetic maps. Genetic maps are a visual representation of the location of different genes on a chromosome. Model organisms are widely used to study human diseases when human experiments are not possible or unethical. Research using animal models has been at the heart of many successes of modern medicine. They play important roles in fields such as neuroscience and infectious diseases, contributing much of the fundamental knowledge in fields such as human physiology and biochemistry (Fishmann, 1999; Sprague et al., 2007).

Escherichia coli, *Cavia porcellus*, T4 Phage virus, Phage lambda, Bacteriophage are other examples of model organisms (Pandey, 2011; Podlacha et al., 2021). Following the discovery that non-human creatures have very similar biological mechanisms to humans, it has been realized that we can have reliable ideas about the effects on humans by using newly produced technologies (vaccines, drugs, poisons, food, etc.) on other living creatures before humans. Also plays a key role in toxicology studies and drug screening (Swabe, 2002).

Of course, the creatures used when performing these tests

cannot be chosen randomly; creatures that meet certain criteria must be selected. These creatures used in experiments and research are called "model organisms". A living being; it can be chosen as a model organism because it reproduces quickly, is easy to observe, is easy to care for, is widely available in sellers or in nature, or is similar to humans. The most famous model organism used in experiments is mice. There is even a laboratory mouse monument in Russia to show gratitude for the contributions of mice to science.

Recently, researchers have developed zebrafish models for human viral diseases, suffering new insights into molecular mechanisms of human viral agents as well as discovery of antiviral strategies. The zebrafish model has become model system for understanding host-virus interaction. Review of Liu et al., 2024 provides a comprehensive summary of use of zebrafish models in human viral research (Liu et al., 2024).

While mice are evolutionarily more similar to humans because they are mammals, Zebrafish (*Danio rerio*) have other advantages than just being transparent. One important advantage of zebrafish is that the adults are small and prefer to be housed in large groups. As a result, they require much less space and are cheaper to maintain than mice (Tarique et al. 2023). Zebrafish adults can lay hundreds of eggs every week which means that researchers have many them to work with. In addition, zebrafish development is rapid, so they reach their basic body structure within one day. Early zebrafish embryos are transparent, which makes it easy to visualise specific biological processes at minute details happening in real-time.

Zebrafish is animal model organism used extensively in developmental research. Although it began to be used in the 1960s, it is only since the 1990s/2000s that it obtained a huge fame. The first to use this animal for research was George Streisinger, a tropical fish enthusiast at the University Oregon.

In this paper, ‘model system’ refers to a biological system, such as a type of cell, tissue, organ, organism, etc. that is studied to learn about a phenomenon of interest (Ankeny and Leonelli, 2011). In this review, we will review the recent findings made to elucidate the mechanisms involved in model organism. In addition to this, we will describe the neuronal structure and function of the fish, in order to further unravel how zebrafish plays a role in human diseases.

Zebrafish

The outer skin layer of the zebrafish larva forms a mosaic of mainly hexagonal cells showing a unique pattern of actin ridges.

Being easy to observe is also important in choosing a model organism. Although the adults of zebrafish are yellow-silver with blue stripes (jellyfish genes have resulted in colors such as pink, red, blue, yellow and orange that glow in dark), their offspring are transparent. Even if an experiment is carried out on internal organs, necessary observations can be made without the need to kill and open the animal. In this way, the results of the tests can be examined even while the embryo is developing. Zebrafish are excellent examples for genetic experiments and are frequently used because they can be seen from the outside at the cellular level to see what is going on inside fish.

Another reason why zebrafish are widely used in research is our detailed knowledge of their genomes and their genetic similarities to humans. Since their entire genome has been analyzed, zebrafish are one of the first stops for genetic researchers. Of course, this is not the only advantage. Human genome and zebrafish genome are 70% identical, and 84% of the genes that cause diseases in humans are also found in Zebrafish (McKie, 2013).

These surprisingly high genetic similarities, along with the other features we mentioned, make zebrafish a gem in genetic and medical research. Although many organisms can be used in certain experiments and in narrow areas, the convenience provided by zebrafish is increasing their prevalence of use, as can be seen from the graph below (Teame, et al. 2019).

On Case Report: Model Organism Zebrafish

Zebrafishes are important model organism for studying different biological processes. Information obtained from these studies helps scientist to understand disorders in humans, since many of these processes are similar in humans.

Zebrafish is a go to model organism for many experiments, particularly when studying development. One feature in particular can teach us a lot of about things like cellular communication and movement. The feature Posterior Lateral Line primordium (PLLp). The PLLp is a tight cluster of ~100 cells found behind the ear of a young zebrafish embryo. This cluster breaks away and migrates from the head to the tip of the tail. On its travels, it drops off cells that will become neuromasts, types of neurons that can

sense movement in water. Scientists observed how cells in the PLLp would behave when they changed the tissues surrounding them. They found that the primordium cells weren't able to properly coordinate their movements without there being overlying skin cells. The outermost cells of the primordium need to attach and wrap around skin cells in order to pull the cluster through the body (Calderon-Zavala, 2019; Pathak and Barresi, 2020; Yoshida, 2023).

Investigating the development of blood and lymphatic vessels in the zebrafish eye provides insights into human eye disorders and helps suggest potential avenues for treatment (Yang et al., 2016).

Zebrafish larvae are transparent and so make an excellent experimental model for neurodegenerative diseases, such as ALS. Jeremy Linsley, a postdoctoral scholar in Steve Finkbeiner's laboratory, uses 3D reconstructions of labelled (red) motor neurons to study neurodegeneration in a live zebrafish larvae (Chia et al., 2022).

Transformation of heart from tube to organ needs orchestration of morphogenetic processes. Two structures critical for cardiac function, the cardiac valves and the trabecular network, are formed through extensive tissue morphogenesis endocardial cell migration, adhesion and differentiation into fibroblast-like cells during valve formation, and cardiomyocyte delamination and apico-basal depolarization during trabeculation (Collins and Stainier, 2016). In the Priya Lab, they use zebrafish to study heart development. The basic layout and cellular makeup of the zebrafish heart are very similar to that of the human heart, and with their research they aim to understand the cell and tissue organisational principles that make a healthy, beating heart (Gunawan et al., 2021). Even in the case of "heartbreak", zebrafish can recover through heart regeneration. Unlike humans, zebrafish form new cells called cardiomyocytes, generating heart contraction and enabling a robust comeback. Zebrafish studies provide precious insights for developmental and regenerative biology of heart and cardiovascular diseases treatment (Bournele and Beis, 2016).

Scientist Norine VOISIN works with intellectually disabled patients who have also other symptoms such as morphological defects. Exome sequencing revealed that mutations in a gene called AFF3 are present in 11 patients with similar symptoms. Fortunately this gene is both present in human and zebrafish, which allowed Norine VOISIN to study its function directly in a laboratory. She suspected that accumulation of AFF3 protein causes bone

malformations in patients. So how did she test her hypothesis? Zebrafish is a great model to study developmental diseases since it develops externally, very fast and its organs are transparent! This allows scientist to observe morphological defects at early stages in the development. In order to over Express a gene, one could inject mRNA directly at in Zebrafish eggs, or use morpholinos in order to knock down a spesific gene. Moreover, with CRISPR/Cas9 system it is possible to delete a region, include a spesific mutation or even insert a gene cassette in a desired location in the genome. Injecting human AFF3 mRNA into zebrafish embryos led to high expression of AFF3 protein from early stages of development. As she initially suspected. AFF3 protein accumulation caused developmental defects in zebrafish. So what is this AFF3 It is a member ALF protein family and it regulates transcription of certain genes through facilitating transcription elongation. In contrast to earlier studies on ALF proteins, Norine VOISIN's finding indicate that they are not redundant and might be associated with different developmental disorders (Voisin, 2019).

Worldwide visual ailments effect over 160 million people, of whom 37 million are blind. Major causes of eyes disorders are consist of cataracts, glaucoma, retinopathy and macular degeneration. Model organisms with similar physiology to humans are vital to understand underlying developmental processes, discovery causative genes for human visual disorders, and develop drug. Because of Zebrafish eye is so similar to a human eye, it's used to study human ocular development and diseases (Bibliowicz et al., 2011).

Hearing and balance scientists use the zebrafish for easy. Access to its sensory hair cells, located not only in their inner ear, like humans, but also along the length of their body. Hair cells help fish hear and balance upright in the water and also defect water flow (Nicolson, 2017).

In fact, research using zebrafish is everywhere in modern life, although we may not realize it. Examples of areas where zebrafish are used include development, genetics, immunity, behavior, physiology, and nutrition. They are a treasure trove for medical research. Areas of use include nervous disorders, infectious diseases, cardiovascular diseases, kidney diseases, diabetes, blindness, deafness, digestive disorders, hematopoiesis and muscle disorders (Teame, et al. 2019).

For example, it is hoped that the cell renewal abilities of zebrafish, which can even regenerate heart cells, can be

transferred to humans (Major, et al. 2007). Likewise, it may be possible to transfer some features found in zebrafish to humans for the treatment of Alzheimer's disease. In fact, it is thought that the recent discovery that zebra fish can hibernate and protect themselves from the physiological effects of radiation may realize the idea of hibernating people when sending them to Mars or beyond (Biswas, 2021). Aside from the benefits of zebrafish to humans, they even help us unravel the evolutionary process. In studies conducted with mutant zebrafish, it was determined which genes may have played a role in the evolutionary transition from fin to limb (Hawkins, et al. 2021).

Although humans may appear to be extremely different than zebrafish, we are actually much more similar to them! In fact, 70% of human genes are found in zebrafish (Shrivastav, 2023). Moreover, zebrafish have two eyes, heart, brain, a mouth, spinal cord, muscle, kidney, pancreas, liver, intestine, blood, bile ducts, oesophagus, ear, nose, bone, teeth, and cartilage (Doiphode et al., 2021; Lin et al., 2022). Many of genes and critical pathways that are required to grow these features are highly conserved between humans and zebrafish (Dodd et al., 2000).

They have the amazing ability to heal the heart after various types of heart injuries. This ability is particularly interesting to scientists as they can produce new heart cells, which humans cannot! Scientists are looking in to this phenomenon as a means of mending our "broken" hearts.

It is also a widely used model in pharmacological research. The drug 'verapamil', which is used against hypertension by causing the vessels to relax and the heart rate to decrease, was tested on zebrafish (Justis, 2020).

Conclusions

Transparent as a zebrafish. This suprising although undeniably true expression is not yet part of the common language. But to see how neurobiologists are fascinated by the case of this little vertebrate, it soon will be. Indeed, scientists see it as a model system for studying the transmission of information in the brain and spinal cord. Fluorescent markers present in the nervous system of the larva draw a colorful Picture looking like a Rorschach test (Gomes Da Silva Martinho, 2019).

Zebrafish is a common and useful scientific model organism for studies of brain disorders. Zebrafish models are used to stimulate the pathology of Alzheimer's disease, Parkinson's Disease, stroke, brain, epilepsy, multiple sclerosis or amyotrophic lateral sclerosis. This organism possesses

numerous advantages: its development is very rapid, its genome has been fully sequenced, and it has a high physiological and genetic homology to humans (Han and Jiang, 2021). Drug discovery for Alzheimer's disease are complex due to the higher failure rate in drug process. Zebrafish is vital model for neurodegenerative and other research due to clearly visible forms. Cholinergic and glutaminergic pathways responsible for memory are present in zebrafish participate for transmission process. So, should be studying neurotoxic agents that induce dysfunction of memory neurons in zebrafish (Thawkar and Kaur, 2021).

Applying recent single-cell and labelling technologies to zebrafish, Saunders et al. generated a single-cell transcriptional atlas of 3.2 million cells from 1,812 developing zebrafish embryos, with 23 genetic perturbations across 19 timepoints (Li, 2024).

Most tissues in our faces, like our cheekbones, nose cartilage and teeth, were formed from a unique cell population called the neural crest. These cells are usual in both their origin and their ability to form a huge range of anatomical structures. Despite their intriguing abilities, we still do not know all of the neural crest derivatives of now they form (Terrazas et al., 2017). In a new study, researchers provide significant insights into neural crest cells in zebrafish, revealing key factors involved in cell fate. The team achieved this by creating a new type of computational analysis called Constellations (Burton and Burgess, 2023). This tool helps visualise tissue changes and can predict the future of the cells as well as their developmental fate (Rocha et al., 2020).

Overall, comparing cortical and acortical rodent models with naturally acortical zebrafish reveals both distinct and overlapping contributions of neocortex and 'precortical' zebrafish telencephalic regions to brain functions. Albeit morphologically different, mammalian neocortex and fish pallium may possess more functional similarities than it is presently recognized, calling for further integrative research utilizing both cortical and acortical vertebrate model organisms (Zabegalov et al., 2024).

There are, of course, important differences between zebrafish and human metabolism. Also, as can be understood from the striking concepts here, this tiny organism accomplishes great things.

Researchers using zebrafish as a model organism to model human diseases should consider these major differences between zebrafish and humans and should consider that

zebrafish cell and tissue physiology may not fully reflect mammalian and human physiology conditions and use caution when interpreting findings.

This paper will argue that model organisms are the key components of a unique and distinctively biological way of doing research. Although it is still in development, zebrafish model organism-based diagnosis and treatment crossing strategies will play an increasingly important role in treating vital diseases such as brain diseases.

Ocean tiny organism zebrafish is an important fish in the scientific platform and is frequently used as a vertebrate model organism in genetic and experimental research. It has many homologous genes with the human genome. For this reason, they can be used in experiments that cannot be investigated on humans.

Conflict of Interest: The author has no conflicts of interest to declare.

Financial Disclosure: The author declared that this study has received no financial support.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

References

- Ankeny, R. A., & Leonelli, S. (2011). What's so special about model organisms?. *Studies in History and Philosophy of Science Part A*, 42(2), 313-323. <https://doi.org/10.1016/j.shpsa.2010.11.039>.
- Bibliowicz, J., Tittle, R. K., & Gross, J. M. (2011). Toward a better understanding of human eye disease: Insights from the zebrafish, *Danio rerio*. *Progress in molecular biology and translational science*, 100, 287-330. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384878-9.00007-8>.
- Biswas, J. (2021). Tiny zebrafish can help humans reach mars someday; here's how [New Study]. (21 May 2021). By Jeevan Biswas May 21, 2021 22:12 IST, Access of Date: 12.12.2021. *International Business Times*, <https://www.ibtimes.co.in/tiny-zebrafish-can-help-humans-reach-mars-someday-heres-how-new-study-836571>.
- Bournele, D., & Beis, D. (2016). Zebrafish models of cardiovascular disease. *Heart failure reviews*, 21, 803-813. <https://doi.org/10.1007/s10741-016-9579-y>.
- Burton, E. A., & Burgess, H. A. (2023). A critical review of zebrafish neurological disease models– 2. application: functional and neuroanatomical phenotyping strategies and chemical screens. *Oxford Open Neuroscience*, 2, kvac019. <https://doi.org/10.1093/oons/kvac019>.
- Calderon-Zavala, A. (2019). Examining lateral line development through CXCL14 modulation of CXCL12-CXCR4 mediated gene expression in *Danio rerio*.
- Chia, K., Klingseisen, A., Sieger, D., & Priller, J. (2022).

- Zebrafish as a model organism for neurodegenerative disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15, 940484.
- Collins, M. M., & Stainier, D. Y. (2016). Organ function as a modulator of organ formation: lessons from zebrafish. *Current topics in developmental biology*, 117, 417-433. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.10.017>.
- Dodd, A., Curtis, P. M., Williams, L. C., & Love, D. R. (2000). Zebrafish: bridging the gap between development and disease. *Human molecular genetics*, 9(16), 2443-2449. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.16.2443>.
- Doiphode, P., Bhosale, U., & Doiphode, P. (2021). Use of Laboratory Animals in Biomedical Research. *Medical Journal of Basic and Applied Research*.
- Fishman, M. C. (1999). Zebrafish genetics: the enigma of arrival. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(19), 10554-10556. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.19.10554>.
- Gomes Da Silva Martinho, R. (2019). Genetic and functional analyses of the developing asymmetric zebrafish habenula (Doctoral dissertation, UCL (University College London)).
- Gunawan, F., Priya, R., & Stainier, D. Y. (2021). Sculpting the heart: Cellular mechanisms shaping valves and trabeculae. *Current Opinion in Cell Biology*, 73, 26-34. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2021.04.009>.
- Han, L., & Jiang, C. (2021). Evolution of blood-brain barrier in brain diseases and related systemic nanoscale brain-targeting drug delivery strategies. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11(8), 2306-2325. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.11.023>.
- Hawkins, M. B., Henke, K., & Harris, M. P. (2021). Latent developmental potential to form limb-like skeletal structures in zebrafish. *Cell*, 184(4), 899-911. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.003.
- Jennings, B. H. (2011). Drosophila—a versatile model in biology & medicine. *Materials today*, 14(5), 190-195. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70113-4](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70113-4).
- Justis, B. S. (2020). Elucidating the Developmental Defects in Zebrafish Associated With the Cardiac Drug Verapamil. MSU Graduate Theses.
- Kayhan, F., Kaymak, G., Duruel, H. E. E., & Kızılkaya, Ş. T. (2018). Biyolojik araştırmalarda zebra balığının (Danio rerio Hamilton, 1822) kullanılması ve önemi. *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*, 7(2), 38-45.
- Kim, J., Koo, B. K., & Knoblich, J. A. (2020). Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(10), 571-584.
- Klatt Shaw, D., & Mokalled, M. H. (2021). Efficient CRISPR/Cas9 mutagenesis for neurobehavioral screening in adult zebrafish. *G3*, 11(8), jkab089. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab089>.
- Klein, J., Fasshauer, M., Klein, H. H., Benito, M., & Kahn, C. R. (2002). Novel adipocyte lines from brown fat: a model system for the study of differentiation, energy metabolism, and insulin action. *Bioessays*, 24(4), 382-388. <https://doi.org/10.1002/bies.10058>.
- Li, W. (2024). Single-cell atlas of mutant zebrafish embryos. *Nature Genetics*, 56(1), 9-9. <https://doi.org/10.1038/s41588-023-01634-1>.
- Lin, J., Chen, Q., & Hu, J. (2022). Color Atlas of Zebrafish Histology and Cytology. *Springer Nature*.
- Liu, J., Yuan, X., Fan, C., & Ma, G. (2024). Application of the zebrafish model in human viral research. *Virus Research*, 341, 199327. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2024.199327>.
- Major, R. J., & Poss, K. D. (2007). Zebrafish heart regeneration as a model for cardiac tissue repair. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 4(4), 219-225. doi: 10.1016/j.ddmod.2007.09.002.
- McKie, R. (2013). How the diminutive zebrafish is having a big impact on medical research. (15 Eylül 2013). *The Guardian*. Sun 15 Sep 2013 08.00 CEST. Access of Date: 12.12.2023. <https://www.theguardian.com/science/2013/sep/15/zebrafish-human-genes-project>.
- Nicolson, T. (2017). The genetics of hair-cell function in zebrafish. *Journal of neurogenetics*, 31(3), 102-112. <https://doi.org/10.1080/01677063.2017.1342246>.
- Pandey, G. (2011). Model organism used in molecular biology or medical research. *International Research Journal of Pharmacy*, 2(11), 62-65.
- Pathak, N. H., & Barresi, M. J. (2020). Zebrafish as a model to understand vertebrate development. In *The Zebrafish in Biomedical Research* (pp. 559-591). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00045-2>.
- Podlacha, M., Grabowski, Ł., Kosznik-Kawśnicka, K., Zdrojewska, K., Stasiłojć, M., Węgrzyn, G., & Węgrzyn, A. (2021). Interactions of bacteriophages with animal and human organisms—safety issues in the light of phage therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8937. <https://doi.org/10.3390/ijms22168937>.
- Rocha, M., Singh, N., Ahsan, K., Beiriger, A., & Prince, V. E. (2020). Neural crest development: insights from the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 249(1), 88-111. <https://doi.org/10.1002/dvdy.122>.
- Shrivastav, P. (2023). Zebrafish-A Promising Aspect Towards Heart Regeneration. *International Journal of Novel Research and Development*, 8 (1), 787-802.
- Sprague, J., Bayraktaroglu, L., Bradford, Y., Conlin, T., Dunn, N., Fashena, D., ... & Westerfield, M. (2007). The zebrafish information network: the zebrafish model

- organism database provides expanded support for genotypes and phenotypes. *Nucleic acids research*, 36(suppl_1), D768-D772. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm956>.
- Swabe, J. (2002). *Animals, disease and human society: human-animal relations and the rise of veterinary medicine*. Routledge.
- Tarique, I., Lu, T., & Tariq, M. (2023). Cellular activity of autophagy and multivesicular bodies in lens fiber cells during early lens development in *rbm24a* mutant of zebrafish: ultrastructure analysis. *Micron*, 169, 103446. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2023.103446>.
- Teame, T., Zhang, Z., Ran, C., Zhang, H., Yang, Y., Ding, Q., ... & Zhou, Z. (2019). The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. *Animal Frontiers*, 9(3), 68-77. doi: 10.1093/af/vfz020.
- Terrazas, K., Dixon, J., Trainor, P. A., & Dixon, M. J. (2017). Rare syndromes of the head and face: mandibulofacial and acrofacial dysostoses. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 6(3), e263. <https://doi.org/10.1002/wdev.263>.
- Thawkar, B. S., & Kaur, G. (2021). Zebrafish as a promising tool for modeling neurotoxin-induced Alzheimer's disease. *Neurotoxicity Research*, 39, 949-965.
- Voisin, N. (2019). *Identification Of New Genetic Causes Of Syndromic Intellectual Disability* (Doctoral dissertation, Université de Lausanne, Faculté de biologie et médecine).
- Yang, J. F., Walia, A., Huang, Y. H., Han, K. Y., Rosenblatt, M. I., Azar, D. T., & Chang, J. H. (2016). Understanding lymphangiogenesis in knockout models, the cornea, and ocular diseases for the development of therapeutic interventions. *Survey of ophthalmology*, 61(3), 272-296. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2015.12.004>.
- Yoshida, Y. (2023). Joint representation: Modeling a phenomenon with multiple biological systems. *Studies in History and Philosophy of Science*, 99, 67-76. <https://doi.org/10.1016/j.shpsa.2023.03.002>.
- Zabegalov, K. N., Costa, F. V., Kolesnikova, T. O., de Abreu, M. S., Petersen, E. V., Yenkovyan, K. B., & Kalueff, A. V. (2024). Can we gain translational insights into the functional roles of cerebral cortex from acortical rodent and naturally acortical zebrafish models?. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 110964. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2024.110964>.

Laboratuvar Hayvanlarında Deneysel Nefrotoksisite Modelleri

Experimental Nephrotoxicity Models in Laboratory Animals

Hikmet Özgün İŞCAN¹
Abdurrahman AKSOY¹



¹Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye.



Öz

Hastalıkların mekanizmalarını daha iyi anlamak ve etkili tedavi yöntemleri geliştirebilmek amacıyla *in vivo* ve *in vitro* modellerin kullanımı, modern tıbbın ve biyomedikal araştırmaların temel taşlarından biri olarak kabul edilmektedir. Deneysel hayvanları, bilimsel araştırmalar için vazgeçilmez bir gereklilik olarak karşımıza çıkmakta ve hastalıkların patofizyolojisini anlamada kritik bir rol oynamaktadır. Nefrotoksisite, böbrek dokusunun çeşitli kimyasal maddeler veya ksenobiyotikler tarafından maruz kaldığı zararlı etkileri ifade eder. Bu durum, böbrek hasarına yol açabilecek birçok farklı madde tarafından tetiklenebilir. Örneğin, antibiyotikler (özellikle aminoglikozidler ve vankomisin), non-steroidal antiinflamatuar ilaçlar (NSAID'ler), antiviral ilaçlar, tıbbi görüntüleme için kullanılan kontrast maddeler, ağır metaller (kurşun ve cıva) ve kemoterapi ilaçları, böbrek dokusu üzerinde toksik etkiye sahip maddeler arasında yer alır. Böbrekler, bu ilaçlar ve kimyasalların toksik etkilerine karşı oldukça savunmasızdır ve bu savunmasızlık, ciddi böbrek hasarlarına yol açabilir. Ksenobiyotikler, özellikle ilaçlar, akut böbrek hasarı (ABH), kronik böbrek hastalığı (KBH), akut böbrek yetmezliği (ABY) ve son dönem böbrek hastalığı (SDBH) gibi ciddi sağlık sorunlarının önde gelen nedenleri arasındadır. İlaç kaynaklı nefrotoksisite, genellikle üç ana mekanizma üzerinden incelenir: Proksimal tübüler hasar ve akut tübüler nekroz (ATN), kristal formdaki ksenobiyotik veya ilaç metabolitlerinin neden olduğu tübüler tıkanıklık ve ilaçlar ile metabolitlerinin indüklediği interstisyel nefrit. Böbrek fonksiyonlarını gösteren biyokimyasal parametrelerdeki değişiklikler, nefrotoksisitenin tanısında kritik bir rol oynar. Bu derlemede, deneysel nefrotoksisite modelleri, tanısında kullanılan biyobelirteçler ve bu biyobelirteçlerin klinik önemleri ayrıntılı olarak ele alınmıştır.

Anahtar Kelimeler: Böbrek, Gentamisin, Hayvanlar, Laboratuvar, Nefritis.

ABSTRACT

The use of *in vivo* and *in vitro* models to better understand disease mechanisms and develop effective treatment methods is considered one of the cornerstones of modern medicine and biomedical research. Experimental animals are an indispensable necessity for scientific research, playing a critical role in understanding the pathophysiology of diseases. Nephrotoxicity refers to the harmful effects exerted on kidney tissue by various chemical substances or xenobiotics. This condition can be triggered by a wide range of substances capable of causing kidney damage. For instance, antibiotics (particularly aminoglycosides and vancomycin), non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), antiviral agents, contrast agents used in medical imaging, heavy metals (such as lead and mercury), and chemotherapeutic drugs are among the substances with toxic effects on kidney tissue. The kidneys are highly vulnerable to the toxic effects of these drugs and chemicals, and this vulnerability can lead to significant kidney damage. Xenobiotics, particularly drugs, are among the leading causes of severe health issues such as acute kidney injury (AKI), chronic kidney disease (CKD), acute renal failure (ARF), and end-stage renal disease (ESRD). Drug-induced nephrotoxicity is generally examined through three main mechanisms: proximal tubular injury and acute tubular necrosis (ATN), tubular obstruction caused by crystal-forming xenobiotics or drug metabolites, and interstitial nephritis induced by drugs and their metabolites. Changes in biochemical parameters reflecting kidney function play a critical role in diagnosing nephrotoxicity. This review provides a detailed examination of experimental nephrotoxicity models, biomarkers used in diagnosis, and the clinical significance of these biomarkers.

Keywords: Kidney, Gentamicin, Animals, Laboratory, Nephritis.

Geliş Tarihi/Received :22.02.2024
Kabul Tarihi/Accepted :05.09.2024
Yayın Tarihi/Publication Date :19.09.2024

Sorumlu Yazar/Corresponding author:

Hikmet Özgün İşcan

E-mail: hikmetozgun.iscan@omu.edu.tr

Cite this article: İşcan H. Ö., Aksoy A. (2024). Experimental Nephrotoxicity Models in Laboratory Animals. *Journal of Laboratory Animal Science and Practices*, 4(2), 60-71.

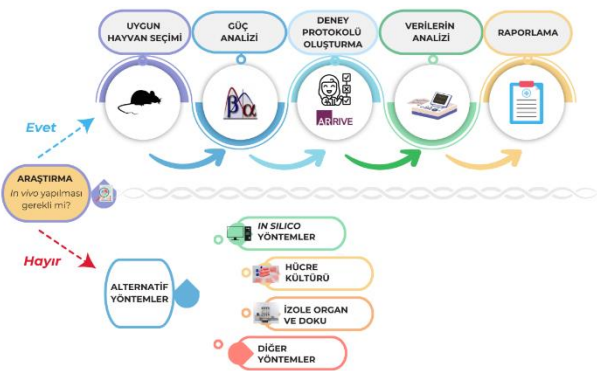


Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License.

Giriş

Hastalıklarının mekanizmasını anlamak ve tedavi yöntemleri geliştirmek amacıyla *in vivo* ve *in vitro* düzeyde birçok metot geliştirilmiştir (Khorramzadeh ve Saadat, 2020). *In vivo* deneyler; karmaşık biyolojik etkileşimlerin, organ düzeyindeki fizyolojik tepkilerin ve sistemik yanıtların bütüncül bir şekilde incelenmesine olanak tanıdığı için tercih edilmektedir. Bu modeller insanlardaki belirli bir hastalık sürecini veya patolojik bozuklukları taklit etme amacı taşır (Kaya ve Çelik, 2011).

Hayvan modelleri kavramını anlamak için anahtar kelime "Analoji"dir. Bunun için en kapsamlı tanım, Wessler'ın orijinal tanımı temel alınarak Held tarafından "Spontan veya oluşturulmuş patolojik bir sürecin araştırılabileceği bir canlı organizma ve bu organizmadaki araştırma konusu olan olgunun bir veya daha fazla yönüyle insanlar veya diğer hayvan türleri ile benzerlik göstermesi durumu" şeklinde yapılmıştır. Her iki tanımlama da bir laboratuvar hayvanı modelinin belirlenmesinde dikkat edilmesi gereken ana noktanın türün, hedef türle ortak bir biyolojik temelde olmasının gerekliliği üzerinde durmuştur. Bir hayvan modelinde hayvanın gösterdiği semptomlar ve durumun seyri insanlar ile tamamen aynıysa homolog modeller olarak adlandırılır. Bu gereksinimleri karşılayan modeller oldukça azdır. Buna en iyi örnek, nöro bilimdeki iyi tanımlanmış lezyonlardır. Bir hayvan modelinde, semptomlar insandakiler ile benzerlik gösterse de semptomların nedeni farklıysa, izomorf model olarak adlandırılır (Hau, 2008). Deneysel hayvan modeli oluşturma süreci 3R prensibi çerçevesinde çalışmanın *in vivo* yapılmasının zorunlu olup olmadığı sorusuyla başlar ve Şekil 1'deki aşamaları izler.



Şekil 1. Deneysel hayvan hastalık modeli oluşturma süreci.

Figure 1. The process of creating an experimental animal disease model.

Hayvan hastalık modelleri, genel olarak beş grupta incelenir;

- Pozitif ve negatif modeller
- Oluşturulmuş (induced) modeller
- Kendiliğinden gelişen (Spontan) modeller
- Genetiği değiştirilmiş (transgenik) modeller
- Olası (orphan) modeller

Pozitif ve negatif modeller

Pozitif modeller belirli bir hastalığın doğal olarak geliştiği canlıları tanımlamak için kullanılan bir terim iken; negatif modeller, belirli bir hastalığın doğal olarak gelişmediği türleri, suşları veya ırkları ifade etmek için kullanılan bir terimdir. Örneğin; diğer hayvanlarda doğal olarak gelişebilen gonokokal enfeksiyonun deneysel bir enfeksiyonla tavşanlarda oluşturulması (Hau, 2008).

Oluşturulmuş (induced) modeller

Deneysel hayvanlarının cerrahi, genetik, kimyasal veya diğer manipülasyonlara maruz bırakılmasıyla normal fizyolojik durumlarında değişiklik oluşturulmasına indüklenmiş modeller adı verilir. İndüklenmiş modellerin en büyük kategorisi, kasıtlı genetik manipülasyonlar sonucu ortaya çıkanlardır (Hau, 2008).

Kendiliğinden gelişen (Spontan) modeller

Spontan modeller, insanlara fenotip olarak benzerlik gösteren hayvanlar veya spontan mutasyon(lar) sonucu ortaya çıkan yeni bir türün (anormal) üyelerinin kullanıldığı modellerdir. En iyi karakterize edilmiş spontan modeller, insanlardaki bozukluklara benzer sonuçlara yol açan doğal mutasyonlara sahip olanlardır. En iyi bilinen spontan modeller arasında Gunn sıçanı (kalıtsal hiperbilirubinemi), Peabald-Lethal ve Lethal Spot fare ırkları (aganglionik megakolon), obez olmayan diyabetik fareler ve BB Wistar sıçanları (tip 1 diyabet), Yeni Zelanda Siyah ve Yeni Zelanda Beyaz fareleri ve bunların melezleri (otoimmün hastalık), Nude fare ırkları (DiGeorge sendromu), SCID fareler (şiddetli kombin immün yetmezlik), Watanabe tavşanları (hiperkolesterolemi), Brattleboro sıçanları (nörojenik diabetes insipidus), obez tavuklar (otoimmün tirodit), spontan hipertansif sıçanlar (SHR- primer hipertansiyon), Duchenne X'e bağlı kas distrofisi olan köpekler ve fareler, hemofili A ve B olan köpekler, hiper-düşük dansiteli lipoproteinemi ve malign hipertermi olan domuzlar, Chediak-Higashi sendromu olan tilkiler, akalazi olan kediler, doğumsal sarılık ve hiperkeratoza sahip sığırlar

veDubin–Johnson sendromu olan koyunlar bulunmaktadır (Maurer ve Quimby, 2015).

Genetik olarak değiştirilmiş (transgenik) modeller

Fare genomu ile insan genomu arasındaki yakınlık, birçok hayvan modelinin ortaya çıkmasına yol açmıştır. Bu yakınlık, istenen insan hastalığı fenotipinin doğrudan taklit edilmesine olanak sağlar. *Knock-in* ve *Knockout* fareler oluşturmak amacıyla çok sayıda teknik kullanılmıştır (Maurer ve Quimby, 2015).

Knock-in modeller

Knock-in modeller, embriyonik kök hücrelerin genetik manipülasyonu ile oluşturulan transgenik hayvanlardır. DNA dizisindeki belirli bir genetik bölgenin değiştirilmesi veya genetik lokusta bulunmayan bir gen ve/veya gen dizisinin eklenmesi ile oluşturulur (Doyle ve ark., 2012).

Knockout modeller

Belirli bir genetik lokalizasyonun hedef alındığı ve hedeflenen bölgedeki gen ve/veya gen dizisinin silinmesi yoluyla elde edilen genetik manipülasyondur (Doyle ve ark., 2012).

Kimyasal mutajenler

Genotipin değiştirilmesi ile fenotip de değiştirilebilir. Kimyasal mutajenlerin kullanılmasıyla belirli fenotipte deney hayvanları üretilebilir. Farklı biyolojik sistemler üzerinde mutajenik etkileri test edilen birçok kimyasal madde bulunmaktadır. Germ hücre aşamalarının duyarlılığına bağlı olarak, kimyasal mutajenler üç gruba ayrılabilir: İlk grup, özellikle kök hücre spermatogonya üzerinde mutasyonlara neden olan ajanları içerir. Bu maddeler arasında N-etil-N-nitrozüre (ENU), metilnitrozüre (MNU), prokarbazin (Prc) ve trietilenmelamin (TEM) bulunmaktadır. ENU, bilinen en güçlü kimyasal mutajendir. İkinci kategori, erken spermatidleri etkileyen kimyasalları içerir. Bu gruba klorambüsil (CHL) ve melfalan dahildir. Üçüncü grup, spermatozoa ve geç spermatidleri etkileyen etil-metansülfonat (EMS), metil metansülfonat (MMS), siklofosamid (CP) ve dietilsülfat (DES) gibi kimyasalları içerir. Spermatogenezin postspermatogoniyal aşamalarını etkileyen kimyasallar genellikle büyük lezyonlara

(intragenik ve intergenik delesyonlar ve yapısal kromozom anormallikleri) neden olur (De Angelis ve ark., 2007).

Radyasyon

Radyasyon, 1920'lerin başına kadar germ hücresi mutajeni olarak kullanılmıştır. X ışınlarının fare spermatogonya, postmeiyotik germ hücreleri ve oositlerde küçük kromozomal anomalilere neden olduğu gösterilmiştir. Yaygın olarak kullanılan radyasyon ile indüklenmiş modeller arasında beige fare (bg), dominant katarakt (Cat-2t) ve cleidocranial displazi bulunmaktadır. X ışınları genellikle büyük delesyonlar ürettiğinden, bu tekniğin pratikte kullanımı oldukça sınırlıdır (Mohammed-Ali ve ark., 2017).

Olası (Orphan) modeller

Bu modellerde kullanılan hayvanlar, insanlarda henüz tanımlanmamış bir hastalık/eksiklik/fonksiyon bozukluğunu gösterirler. Benzer bir hastalık insanlarda tanımlandığında, bir olası model, oluşturulmuş bir modelin temeli haline gelebilir. Örnekler arasında Marek hastalığı, papillomatoz ve sığır spongiform ensefalopati (BSE), koyunlarda Visna virüsü ve kedilerde lösemi virüsü bulunmaktadır (Hau, 2008).

Böbreğin fizyolojik ve patolojik değerlendirmesi

Kemirgen ve insan böbreği fonksiyon, büyüklük ve histolojik yapı yönünden oldukça benzerlik göstermektedir. Böbrekte idrar oluşumunda glomerüler filtrasyon, tübüler geri emilim ve tübüler sekresyon (salgılanma) olmak üzere üç ana süreç rol oynar. Üriner sistem; osmoregülasyon, kan basıncı ve hacmini düzenleme, kırmızı kan hücresi üretiminin uyarılması, kalsiyum emilimi, toksin metabolizması ve atılması gibi çeşitli fizyolojik süreçlerden sorumludur (Delaney ve ark., 2018).

Nefrotoksisite nedir?

Nefrotoksisite, çeşitli maddelerin böbrekler üzerinde oluşturduğu zararlı etkileri ifade eden bir terimdir. Ksenobiyotikler ve özellikle ilaçlar, akut böbrek hasarının (ABH), kronik böbrek hastalığının (KBH), akut böbrek yetmezliğinin (ABY) ve son dönem böbrek hastalığının (SDBH) ana patojenik faktörlerindedir. Böbrek fonksiyonunu ortaya koyan biyokimyasal parametrelerdeki değişiklikler teşhis için önem arz eder (Wu ve Huang, 2018).

Nefrotoksisite tipleri

Nefrotoksisite sınıflandırması doğrudan tübüler hasar

(aminoglikozitler veya cıva), akut interstisyel nefrit (metisilin), azalmış renal perfüzyon (siklosporin), primer glomerülopati (D-penisilamin) ve tıkanıklık nefropatisi (etilen glikol veya metoksifluran) gibi farklı bölgelere zarar verebilen ilaçlara göre yapılabilir. Ancak ilaç kaynaklı nefrotoksisite genel olarak üç temel mekanizma üzerinden sınıflandırılmaktadır:

- proksimal tübüler hasar ve akut tübüler nekroz (ATN) (doza bağlı mekanizma), ilaçlar veya metabolitleri ile apikal temas, ilaçların ve metabolitlerinin apikal yüzeyden taşınması ve ilaçların bazolateral yüzeyden tübüler lümenine salgılanması yoluyla;
- kristal veya ilaç ve metabolit içeren döküntüler tarafından tübüler tıkanıklık (doza bağlı mekanizma);
- ilaçlar ve metabolitleri tarafından indüklenen interstisyel nefrit (doza bağımsız mekanizma).

(Werner ve ark., 1995).

Laboratuvar hayvanlarında deneysel nefrotoksisite modelleri

Sisplatin (CP) ile oluşturulan akut böbrek hasarı modelleri

Sisplatin, tek başına veya farklı ilaçlarla kombinasyonlar halinde çok sayıda tümöral olgunun (meme, serviks, özofagus, mesane, küçük hücreli akciğer, osteosarkom, skuamöz hücre karsinomu ve testis kanserleri) tedavisinde kullanılmaktadır (Le ve Hanna, 2018).

Sisplatinin, DNA ipliğindeki purin bazlarıyla 1-2 intrastrand veya 1-3 interstrand çapraz bağlar oluşturduğu kabul edilmektedir. Bu çapraz bağlanma, DNA onarım mekanizmalarını bozarak DNA replikasyon şablonunun üretimini engeller ve hücre döngüsünün durmasına sebep olarak, hücre ölümüne yol açar. Güçlü terapotik özelliklerine rağmen, sisplatinin ototoksisite, nörotoksisite ve nefrotoksisite gibi ciddi yan etkilerinin varlığı klinik kullanımını sınırlandırmaktadır (McSweeney ve ark., 2021). Bu durum, renal yapı hasarına ve glomerüler filtrasyon hızında azalmaya, serum kreatinin seviyesinde artışa, kan üre azotu (BUN) seviyesinde artışa ve bir dizi yeni biyobelirteçte değişikliklere neden olarak böbrek fonksiyonlarında bozulmaya yol açar (Zaaba ve ark., 2022).

Sisplatin ile oluşturulan akut böbrek yetmezliği modellerinde genellikle ilk uygulamayı takiben 2. günde semptomlar başlar ve doza bağlı olarak 3 ila 4. günlerde maksimuma ulaşır. Dişiler sisplatin tarafından indüklenen hasara erkeklerden daha duyarlıdır. Bu model oldukça basit

ve tekrarlanabilir bir yapıya sahiptir. Sisplatin nefrotoksisitesi, hastaların üçte birinde sisplatinin klinik kullanımını sınırlandırmasına sebep olmuştur. Tedavi metodundaki gelişmelere rağmen, ABH gelişen hastalarda ölüm riski artmıştır. Sisplatin kaynaklı ABH'yi atlatan vakalarda prognoz kötü olarak değerlendirilir. Bu vakaların kronik böbrek hastalığı ve son aşama böbrek hastalığına ilerleme riski yüksektir (Zaaba ve ark., 2022).

Folik asit ile oluşturulan akut böbrek hasarı modelleri

Folik asit, aynı zamanda B9 vitamini olarak bilinir (Goossens ve ark., 2021). Bu madde, karbon metabolizması içinde yer alarak, hücresel çoğalma ve büyüme için esansiyel bir enzim kofaktörü olarak rol oynar. Folik asit, genellikle yumurta sarısı, hayvan karaciğeri, yapraklı sebzeler ve mayadan elde edilebilir. Folik asit ince bağırsakta emilir ve dihidrofolat redüktaz tarafından hücre içinde tetrahidrofolata dönüştürülür (Dipiro ve ark., 2014).

Düşük molekül ağırlığına sahip bir bileşen olarak Folik asit veya folat, glomerül tarafından filtrelenir. Normal şartlar altında renal folat atılımı gözlemlenemez ve folatın böbreklerde neredeyse tamamı geri emilir. Folatın böbrek geri emilimi, proksimal tübüler epitelyal hücrelerin lümen tarafında bol miktarda bulunan ve yüksek afiniteye sahip folat reseptörleri (folat reseptörü 1) aracılığıyla gerçekleşir. Folat reseptöre bağlandığında endositoz yoluyla hücre içine alınır (Dipiro ve ark., 2014; Goossens ve ark., 2021). Folat tüm hücresel bölmelere dağılırken, bunun %40'ı mitokondrilere yerleşir. Bu da oksidatif stres ve ondan kaynaklı diğer anomalilere neden olur. Ayrıca, dihidrofolat redüktaz tarafından tetrahidrofolat oluşturmak için NADPH'yi bir indirgeme gücü olarak kullanması nedeniyle, böbreklerde biriken yüksek folat seviyeleri hücrel antioksidan sistemlerini ciddi şekilde etkileyebilir. Bu durum ise böbreklerde artmış redoks dengesizliği ve oksidatif stresi beraberinde getirir (Yan, 2021). Daha sonra bu endozomal veziküller, diğer organel membranları ile birleşerek folatın salınmasına neden olur ve bu durum organellerde işlev bozukluğuna yol açar. Folat reseptör geninin baskılanması nedeniyle folat reseptörü eksik farelerde folatın tamamen temizlendiği bu sebeple geri emilim gözlemlenemediği bildirilmiştir (Dipiro ve ark., 2014; Goossens ve ark., 2021).

Folik asit aşırı dozla indüklenen deneysel hayvan modellerinin insanlarda gözlenen ABH'nin ana süreçlerini yinelediği bildirilmiştir. Bu nedenle, Folik Asit'in indüklediği ABH hayvan modeli, ABH'nin patogenezi ve tedavilerini araştırmak için yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Zhang ve ark., 2019).

Gentamisin ile oluşturulan akut böbrek hasarı modelleri

Gentamisin, Gram (-) bakterilerin neden olduğu enfeksiyöz hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan aminoglikozit grubu bir antibiyotiktir. Gentamisinin avantajları arasında yüksek etki, düşük maliyet, direnç ve aşırı duyarlılık reaksiyon geliştirme ihtimalinin düşüklüğü bulunmaktadır. Ancak aminoglikozitlere bağlı ABH yaygın görülen bir yan etkidir. Nefrotoksisite belirtileri, tedavi uygulanan hastaların yaklaşık %30'unda, 7 günün sonunda ortaya çıkar. Gentamisin kaynaklı nefrotoksisitenin belirtileri; renal inflamatuvar reaksiyonlar, artmış renal oksidatif stres ve bununla ilişkili patolojik sinyal mekanizmalarındaki artıştır (Erseckin ve ark., 2022; Lee ve ark., 2019).

Aminoglikozit kaynaklı ABH, proksimal tübülde iyon taşıma işlev bozukluğuna bağlı olarak hipomagnezemi, hipokalemi, hipokalsemi ve hipofosfatemiyeye yol açar. Gentamisin kaynaklı nefrotoksisitede; gentamisinin lizozomda birikmesinden kaynaklanan fosfolipidoz, endoplazmik retikulumda (ER) artan basınç, protein sentezinin bozulması, mitokondride apoptoz mekanizmasının aktivasyonu, oksidatif stres artışı, enerji üretiminde rol oynayan peroksizom proliferatör-aktive edici reseptör alfa (PPAR α) aktivitesinin azalması ve hücre membranındaki çeşitli taşıyıcıların disfonksiyonunu içeren çok sayıda mekanizma rol oynamaktadır (Lee ve ark., 2019).

Gentamisinin temel nefrotoksik etki mekanizmaları arasında:

- Proksimal tübüler epitelyal hücre nekrozu
- Su ve çözeltilerin taşınmasında görev alan temel hücresel bileşenlerin işlevinin engellenmesi yer almaktadır.

Gentamisin nefrotoksisitesinin merkezi yönü tübüler sitotoksisitedir. Gentamisinin proksimal tübüllerdeki birikimi, proksimal tübüllerde protein ve katyonların taşınmasında görev alan megalin ve kübilin kompleksi ile ilişkilidir. Bu kompleksin gentamisinin endositoz yoluyla taşınmasından sorumlu olduğu bilinmektedir. İlaç daha sonra lizozomlara, golgi aparatına ve endoplazmik retikuluma taşınır. İlacın lizozom birikimi, lizozomal membranın geçirgenliği üzerinde değişikliklere neden olmaktadır. Gentamisin, membran fosfolipitlerine bağlanır, fonksiyonunu değiştirir. Bu durum insan ve deney hayvanlarında fosfolipidoz olarak bilinen bir duruma yol açar (Randjelovic ve ark., 2017).

Gentamisin kaynaklı ABH'nin temel olarak proksimal tübül ve toplama hücrelerinin apoptozunda kaynaklandığı bildirilmiştir. Bu nedenle, gentamisin'in neden olduğu nefrotoksisitenin kesin mekanizması tam olarak netleşmemiş olup, temel patofizyolojinin reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesi, apoptoz, artmış endotelin-1 seviyeleri ve artmış hücresel infiltrasyonun neden olduğu vurgulanmaktadır (Balakumar ve ark., 2010).

Organeller içindeki gentamisin konsantrasyonu bir eşığı aştığında, gentamisin sitozola salınır. Gentamisin'in mitokondri üzerinde etki ettiği ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunu teşvik ettiği, bu da mitokondrial geçirgenlik geçiş gözeneklerinin açılmasına ve apoptozun intrinsik yolunu tetiklemesine neden olduğu gösterilmiştir. Gentamisin ayrıca doğrudan mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin üretimini uyarabilir, solunum zincirini ve ATP üretimini inhibe edebilir, sitokrom C ve diğer proapoptotik faktörlerin salınımını teşvik edebilir ve apoptoza neden olabilir (Huang ve ark., 2020).

Karadeniz ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada, gentamisin kaynaklı nefrotoksisitenin artmış ROS üretiminin oksidatif stresle ilişkili enzimin inaktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir. Aşırı ROS üretimi, ATN ve azalmış glomerüler filtrasyon oranından (GFR) sorumludur ki bu, ilaç kaynaklı nefrotoksisitenin belirgin özelliklerindedir. Bu nedenle, gentamisin kaynaklı nefrotoksisitenin en aza indirilmesine yönelik çalışmalar, daha çok antioksidan ajanları da içeren böbrek koruyucu ajanların eş zamanlı kullanımına dayanmaktadır. Histopatolojik düzeyde, önceki çalışmalar, gentamisin kaynaklı nefrotoksisitenin, tübüler nekroz, glomerüler mezangial hücre apoptozu, şişme, sitoz ve tübüler düzensizliklerle ilişkili tübüler dejenerasyon dahil hem glomerüler hem de tübüler değişiklikleri içerdiğini ortaya koymuştur (Alsharidah ve ark., 2021). Deneysel nefrotoksisite hayvan modelleri için bazı çalışma örnekleri Tablo 1' de sunulmuştur.

Tablo 1. Laboratuvar hayvanlarında nefrotoksisite modelleri.**Table 1.** Models of nephrotoxicity in laboratory animals.

Model	Patoloji	Deney Hayvanı	Amaç ve Yöntem	Kullanılan Parametreler	Kaynak	
1	<i>Sisplatin</i>	Proksimal tübül hasarı	Miox-NanoLuc transgenik fare	Sisplatin ile oluşturulan Akut Böbrek Hasarı'nda <i>Miox-NanoLuc</i> luminesans değerlerinin erken teşhisteki önemi	Kan üre nitrojen (BUN), Serum Kreatinin, Miox-NanoLuc luminesans	Chiou ve ark., 2020
		Hücrel dejenerasyon, Lökosit infiltrasyonu, Glomerüler atrofi, Konjesyon, Tübül dilatasyon	Wistar Rat	Sisplatin ile oluşturulan Akut Böbrek Hasarı'nda <i>Berberin</i> 'in koruyucu etkisi	Kan üre nitrojen (BUN) ve kreatinin (Cr) seviyeleri. Malondialdehit (MDA), glutasyon (GSH), protein karbonil (PC) ve nitrik oksit (NO) seviyeleri ile katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutasyon peroksidaz (GPx) ve miyeloperoksidaz (MPO) aktiviteleri	Allameh ve ark., 2020
		İnterstitial nefrit, Kortikomedüller bölgede glomerüler konjesyon ve atrofi, Tübül epitelyal hücrelerde dökülme, Kortikal tübül dejenerasyon, İntertübül kanama, Proksimal tübüllerde; hidropik dejenerasyon, piknotik çekirdekler, sitoplazmik vakuolizasyon, tübül hücrelerin nekrozu ve apoptozu, tübül lümenleri dolduran nekrotik epitelyal hücrelerin deskuamasyonu	Evcil Tavşan (<i>Oryctolagus cuniculus domesticus</i>)	Sisplatin ile indüklenen böbrek hasarında sarımsak ekstresinin (<i>Allium sativum</i>) hafifletici etkisi	Kan üre nitrojen (BUN), Serum Kreatinin, Üre	Hassan ve ark., 2023
2	<i>Gentamisin</i>	Bowman kapsülünün büyümesi, Kapsül duvarının kalınlaşması, Renal tübüllerin dejenerasyonu, genişlemesi ve nekrozu İnflamatuvar hücre infiltrasyonu, Glomerüler dejenerasyon	Wistar Rat	Gentamisin ile oluşturulan akut böbrek hasarında <i>Oksimatin</i> 'in rahatlatıcı etkisi	N-asetil-beta-D-glukosaminidaz (NAG), Kan üre nitrojen (BUN), Serum kreatinin (sCRE), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD)	Kang ve ark., 2022
		Glomerüler Atrofi Tübül Tıkanıklık Proksimal Tübül Hasarı	Swiss Albino Fare	Gentamisin ile oluşturulan akut böbrek hasarında <i>Boerhaavia diffusa L.</i> 'nin rahatlatıcı etkisi	Üre, Ürik Asit, Kreatinin, Glutasyon S-Transferaz, Glutasyon peroksidaz, Glutasyon	Ramar ve ark., 2023
		Glomerüler endotel hücrelerde filtrasyon bariyeri hasarı	Sprague Dawley Rat (Erkek)	Gentamisin ile oluşturulan akut böbrek hasarının tedavisinde halihazırda kullanılan <i>Piperazin ferulat</i> 'ın etki mekanizmasının araştırılması	Kan Üre Nitrojen (BUN), Serum Kreatinin (sCRE), Böbrek Hasar Molekülü (KIM-1)	Li ve ark., 2022
3	<i>Folik asit</i>	Tübül dilatasyon, Döküntü oluşumu Tübül Obstrüksiyon	CD-1 Fare (Erkek)	Akut böbrek yetmezliği modelinde mitokondriyal homeostaz	Kan Üre Nitrojen (BUN), Serum Kreatinin (sCRE), İdrar Kreatinin (uCRE), İdrar Glukoz	Stallons ve ark., 2014
		Tübül epitelyal hasar Apoptoz	Wistar albino rat	Akut böbrek yetmezliğinin kalp fonksiyonu ve oksidatif stres belirteçleri üzerindeki etkisi	Kan Üre Nitrojen (BUN), Serum Kreatinin (sCRE)	Nikolic ve ark., 2020

Biyobelirteçler

Böbrek hastalıklarının teşhisi zordur. Hastalığın sebebi prerenal (hipovolemi gibi), intrinsik renal hastalık, (diyabetik nefropati) veya post-renal (benign prostat hiperplazi) olabilir. Bu sebeple, renal fonksiyonda bir bozukluk veya hasara işaret eden, çoğunlukla kan ve idrarda bulunan birçok farklı biyokimyasal belirteç kullanılmaktadır (Sluman ve ark., 2020).

Bu biyobelirteçlerden bazıları GFR belirlemek için kullanılır. GFR, belirli bir analitin birim zamanda temizlenen plazma hacmi olarak tanımlanır. GFR için en ideal biyobelirteç, vücut tarafından nispeten sabit bir hızda endojen olarak üretilen, glomerülde serbestçe filtre edilen, tübüller tarafından sekresyon, geri emilme ve ekstrarenal eliminasyona uğramayan bir özellikte olmalıdır (Treacy ve ark., 2019). Tahmini glomerüler filtrasyon oranı (eGFR), serum kreatinin değerini temel alan bir böbrek fonksiyon tahmini olup, klinik ve epidemiyolojik uygulamalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Azalmış eGFR, böbrek hasarı sonucu veya sadece yaşlanmanın bir sonucu olarak, mevcut böbrek fonksiyonunun azaldığını da gösterebilir. Bu nedenle, mevcut böbrek hasrını tahmin etmek için bir dizi biyobelirteç geliştirilmiştir (Tanaka ve ark., 2022). Bu belirteçler, plazma veya serum örneğinde ölçülebilen, böbrek fonksiyonunu doğrudan gösteren veya böbrek fonksiyonuyla ilişkilendirilebilecek bir parametreyi tahmin etmek için bir formülde yer alabilecek sayısal bir değer sağlayan belirteçlerdir (Treacy ve ark., 2019).

Serum kreatinin ve üre

Serum kreatinin (Scr), böbrek fonksiyonlarını değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir biyobelirteçtir. Kararlı bir durumda, serum kreatininini, çeşitli formüller vasıtasıyla GFR'nı tahmin etmek için kullanılır. Son yirmi yıl içinde, serum ve idrar kreatinin değerine dayalı ABH'nin tanısı ve yönetiminde önemli gelişmelere yol açmıştır. Aynı zamanda, Scr'ın çok sayıda hastalıkla ilişkili olduğu bilinmekte olup, özellikle akut, kararlı olmayan durumlarda ölçüm değerlerini etkileyebileceği düşünülmektedir (Kashani ve ark., 2020).

Sıçanlar, böbrek hastalıklarını incelemek için yaygın olarak kullanılan bir hayvan türüdür. Böbrek fonksiyonlarının izlenmesi, bu modellerin hayati bir parçasıdır ve GFR'nin en doğru ölçümü, eksojen filtrasyon belirteçlerinin infüzyonu yoluyla gerçekleştirilir. Kreatinin, üre veya her ikisinin plazma veya serum düzeyleri endojen filtrasyon belirteçleri olarak, genellikle GFR'nin yerine kullanılır. Ölçümleri

kolaydır ve seri ölçümler gerçekleştirilebilir. Ancak vücut kompozisyonu ve diyet gibi diğer faktörlerden etkilenebilirler. Bu iki madde de küçük bir plazma hacminde kolayca ölçülerek ardışık çoklu ölçümlere olanak tanır. İnsanlarda GFR'yi kreatininini kullanarak tahmin etmek için kullanılan Kronik Böbrek Hastalığı Epidemiyolojik İş birliği (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) denklemi gibi çeşitli formüller klinik uygulamalarda rutin kullanım bulmaktadır. Ancak, sıçanlar için böyle bir formül şu anda mevcut değildir. Altın standart GFR ölçümü için, inulin veya iohexol gibi dış kaynaklı filtrasyon belirteçlerinin infüzyonu gereklidir (Besseling ve ark., 2021).

BUN ve kreatinin rutin olarak böbrek hastalığı ve hasarı biyobelirteçleri olarak kullanılır. Her iki belirteç seviyesi de renal hasardan sonra önemli ölçüde artar. Ancak buna rağmen ilgili belirteçlerde duyarlılık ve/veya özgüllük eksikliği mevcuttur; bu nedenle, daha erken ve daha doğru tespit için yeni biyobelirteçlere ihtiyaç vardır (Togashi ve ark., 2012).

Simetrik dimetilarginin (SDMA)

SDMA ve böbrek fonksiyonu arasında yüksek korelasyon bulunmaktadır. SDMA bir metillenmiş arginin amino asididir. SDMA böbrekler tarafından atılır. Simetrik dimetilarginin (SDMA), intrasellüler proteinlerden kaynaklanan ve post-translasyonel modifikasyon ve metilasyonun ardından proteolize uğrayan bir amino asittir. SDMA'nın küçük boyutu ve pozitif yükü, böbrek glomerülünde serbest filtrasyona izin verir ve renal atılımı en az %90'dır. Simetrik dimetilarginin, serum ve plazmada son derece stabildir ve lipid, hemoglobin veya bilirubin içeriğinden etkilenmez (Yerramilli ve ark., 2016). Ayrıca, SDMA seviyeleri yaş, diyet veya kas kütlelerinden de etkilenmez. SDMA'nın renal disfonksiyonu tespit duyarlılığı sCr'ye kıyasla daha yüksektir (Brans ve ark., 2021; Yerramilli ve ark., 2016). Glomerül tarafından serbestçe filtrelenen bir analit olarak SDMA'nın bu özellikleri göz önüne alındığında, bu, glomerüler filtrasyon ve böbrek fonksiyonunun potansiyel bir biyobelirteci olabilir. Üretimini büyük bir kısmı renal yolla (>90%) gerçekleştirir ve bu, glomerüler filtrasyon ve aktif salgı yoluyla sağlanır (Yerramilli ve ark., 2016).

Nötrofil Jelatinaz İlişkili Lipokalin (NGAL)

Klinik çalışmalardaki tutarsız ve bazen çelişkili bulgular, plazma ve idrar biyobelirteçlerinin farklı biyolojik özelliklerinden kaynaklanabilir. Böbreklerde meydana gelen hasar sonrasında, intrarenal NGAL ekspresyonu

özellikle distal tübüllerde artar, bu da NGAL'in idrarla atılmasıyla sonuçlanır. ABH' de NGAL plazma seviyesi de artış gösterir. NGAL glomerülerde serbestçe filtrelenir ve proksimal tübüller tarafından megalin bağımlı endositoz ile tekrar emilime maruz kalır. Üriner sistem enfeksiyonları sonucunda oluşan lökositüri de idrar NGAL seviyelerinde artışa neden olur (Schley ve ark., 2015).

N-asetil-β-D-glukozaminidaz (NAG)

N-asetil-β-D-glukozaminidaz (NAG), renal proksimal tübüler hücrelerde yaygın olarak bulunan bir lizozomal enzimdir (Kim ve ark., 2015; Lee ve ark., 2018). NAG, renal tübül epitelindeki glikoproteinlerin parçalanmasında rol oynar (Suliska ve ark., 2021). NAG'nin çeşitli böbrek hastalıklarında yükseldiği ve akut böbrek hasarının erken teşhisinde önemli bir gösterge olarak kabul edilmektedir (Park ve ark., 2012). NAG, proksimal tübül hücreleri tahrip olduğunda lizozomlardan salınır; bu nedenle NAG, renal tübüllerde bulunur ve idrarla atılır, buna üriner N-asetil-β-D-glukozaminidaz (U-NAG) denir (Kim ve ark., 2015; Lee ve ark., 2018; Suliska ve ark., 2021). NAG'ın idrardaki konsantrasyonu normal koşullarda çok düşüktür, ancak renal tübüler disfonksiyon, proksimal tübüler epitel hücre hasarına yol açtığına salınımı ve idrar konsantrasyonu önemli ölçüde artar (Liu ve ark., 2021). İdrarda artmış NAG enzimatik aktivitesi, tübüler hasarın derecesiyle ilişkilendirilmiştir. U-NAG, erken renal tübüler hasar belirleyicisi olarak, mikroalbuminüri başlamadan önce değişiklik göstermesi sebebiyle albuminüriden daha duyarlı bir biyobelirteçtir (Li ve ark., 2021) NAG, glomerüler filtrasyonu aşamaz ve idrar konsantrasyonlarını yükseltir. Bu durum, böbrek hasarının erken tespiti olarak kullanılır. İn vivo çalışmalarla, NAG, serumda kreatinin ve üre kadar spesifik bir belirteç olduğu gösterilmiştir. NAG, hasar görmüş proksimal kıvrımlı tüp için özellikle belirgin bir böbrek belirteçidir. Gentamisin, uygulamasından 8 saat sonra yanıtı tetikleyebilir. Klinik çalışmalar ayrıca NAG'yi hafif tübüler hasarın erken belirteci olarak rapor etmiştir (Suliska ve ark., 2021). Bu bulgulara dayanarak, idrar NAG aktivitesinin belirgin bir böbrek hasarı ve proteinüri görülmeyen aktif böbrek yetmezliğinin teşhisinde kullanışlı olabileceği düşünülmektedir (Tanaka ve ark., 2022).

Referans aralıkları, laboratuvar göstergelerinin önemli bileşenleridir ve vücudun normal bir şekilde çalışıp çalışmadığını değerlendirmeyi sağlar. Eğer referans aralığı uygun şekilde temel alınmazsa, klinik müdahalede yanlış uygulamalar ortaya çıkabilir. İdrar NAG için referans aralıklarının belirlenmesine dair az sayıda araştırma bulunmaktadır. Çin'de yapılan bir çalışmada insanlarda NAG değeri için bir referans aralığı oluşturulmaya çalışıldığı

bildirilmiştir (Liu ve ark., 2021).

Sistatin C

Sistatin C, ayrıca sistatin 3 olarak da adlandırılan protein yapıda bir moleküldür. İnsan dokularında ve vücut sıvılarında yaygın bir dağılıma sahiptir. Böbrekler, sistatin c metabolizmasında önemli bir rol oynar. Biyokimyasal özellikleri nedeniyle, yüksek fizyolojik pH'da pozitif yüklüdür ve düşük bir moleküler ağırlığa sahiptir (13.3 kDa). Bu nedenle glomerulus tarafından serbestçe filtrelenir. Böbrekte filtrasyona uğrayan sistatin c, proksimal tübüllerden geri emilir. Burada lizozomal enzimler tarafından neredeyse tamamen parçalanır. Sonuç olarak, sistatin C serbest amino asitler halinde dolaşıma geri döner. Küçük ve önemsiz bir kısmı idrarda kaybolur (0.03-0.29 µg/mL) (Onopiuk ve ark., 2015).

Sistatin C başta seminal veziküller ve merkezi sinir sistemi olmak üzere neredeyse tüm omurgalı dokularda geniş bir şekilde dağılmıştır. Böbrek, sistatin C'nin önemli düzeylerini içerir ve genellikle korteksin proksimal tübülünde lokalizedir (Togashi ve ark., 2012). Sistatin C idrarla atılır. Bu sebeple idrarda Sistatin C analizi böbrek hasarı modellerinde glomerüler hasarı ve ardından proksimal tübül içine reabsorpsiyonun bozulmasını tespit etmek için kullanılmaktadır. Ancak diğer idrar biyobelirteçleri ile karşılaştırıldığında renal hasarın tespitine ilişkin yayınlanmış veriler oldukça azdır (Fernando ve ark., 2020; Togashi ve ark., 2012). Serum sistatin C seviyeleri yaş, cinsiyet, ırk veya kas kütlesi tarafından önemli ölçüde etkilenmez; bu nedenle GFR için ideal bir parametre olarak kabul edilir (Khusainova ve ark., 2023).

Togashi ve ark. (2012) tarafından yayınlanan bir çalışmada nefrotoksisite oluşturulan sıçanlarda sistatin C ve diğer biyobelirteçler karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada ABH'li farelerde idrar sistatin C, KIM-1 ve Glutasyon-S-transferaz gibi değerler plazma BUN ve kreatinin seviyelerindeki artışlardan daha önce tesbit olanağı sağladığı belirtilmiştir, bu da idrarda sistatin C'nin ABH'li farelerde nefrotoksisitenin erken tespiti için kullanışlı olduğunu göstermektedir.

Böbrek Hasarı Molekülü-1 (KIM-1)

KIM-1, bir transmembran glikoprotein olup, proksimal tübüler hücreler tarafından üretilir ve böbrek hasarı için erken, duyarlı ve özgül bir idrar biyobelirteci olarak kabul edilir (Brilland ve ark., 2023). KIM-1 hasarlı doku tarafından salgılanan bir moleküldür. Bu sebeple sağlıklı proksimal tübül hücrelerinde ölçülemez. İdrarda bulunması böbrek hasarı için son derece patognomiktir. KIM-1 ile ilgili ilk

çalışmalar 2002'de yayınlanmıştır. Burada akut tübüler nekroz tanısı konmuş hastaların böbrek biyopsi örneklerinde KIM-1'in belirgin bir şekilde arttığı ve klinik olarak belirgin ABH'ye sahip hastaların idrarında KIM-1 düzeylerinin çok yüksek olduğu belirtilmiştir (Yin ve Wang, 2016).

KIM-1 kardiyovasküler cerrahi geçiren çocuklarda böbrek hasarı için hassas bir belirteçtir. Liangos ve ark. (2007) klinik olarak belirlenmiş 201 ABH hastasında idrar KIM-1 ve başka bir biyobelirteç olan NAG ile karşılaştırmıştır. Bu çalışmada artmış idrar KIM-1 ve NAG düzeylerinin, hastalıkla ilişkili olduğu ve hastalık şiddeti ile değişiklik gösterdikleri belirtilmiştir. Birçok ön klinik çalışmada ve çeşitli toksinler de dahil olmak üzere birçok böbrek hasarına karşı KIM-1'in biyobelirteç olarak BUN ve kreatininden çok daha duyarlı olduğu gösterilmiştir (Yin ve Wang, 2016).

Vaidya ve ark. (2010) KIM-1'in sıçan böbrek hasarı modellerinde SCr, BUN ve idrar NAG değerlerine göre daha doğru sonuçlar sağladığını belirtmiştir. Üriner KIM-1 ölçümleri, klinik öncesi ilaç denemelerinde insan nefrotoksitesinin hassas, spesifik ve doğru teşhis sağlar. Bu çalışmaya göre ayrıca, sispilin, gentamisin ve vankomisin ile oluşturulan nefrotoksitesite araştırmalarında ölçülen idrar KIM-1'inin, histopatoloji ile doğrulanmış vakalarda doğru pozitif sonuç oranı %88 iken; BUN, idrar NAG ve SCr değerlerinde doğru pozitif sonuç oranının sırasıyla %42, %42 ve %40 oranlarında olduğu belirtilmiştir.

Sonuç

Sonuç olarak, nefrotoksitesite, ksenobiyotikler tarafından tetiklenen ve böbrek dokusunu ciddi şekilde etkileyebilen önemli bir sağlık sorunudur. Deneysel *in vivo* ve *in vitro* modeller, bu karmaşık süreçleri daha iyi anlamak, nefrotoksitesiteyi önlemek ve tedavi yöntemleri geliştirmek adına önemli bir rol oynamaktadır. Bu modeller, proksimal tübüler hasar, tübüler tıkanıklık ve interstisyel nefrit gibi ilaç kaynaklı böbrek hasarı mekanizmalarını ve hastalığın patofizyolojisini incelemeye olanak tanımaktadır. Böbrek fonksiyonlarını izleyen biyokimyasal parametrelerin ve yeni biyobelirteçlerin kullanımı, nefrotoksitesitenin erken tanısında önemli bir yer tutmaktadır. Laboratuvar hayvanları üzerindeki *in vivo* araştırmalar, hastalıkların patofizyolojisinin ve ilaçların böbrek üzerindeki toksik etkilerinin anlaşılmasında vazgeçilmez bir araç olarak öne çıkmaktadır. *In vivo* modeller, insan biyolojisine daha yakın bir modelleme sunmaları nedeniyle, gelecekteki araştırmalarda önemli bir rol oynamaya devam edecektir.

Yazar Katkıları: Fikir – HÖİ, AA; Tasarım - HÖİ; Süpervizyon - AA; Kaynaklar - HÖİ; Materyaller - HÖİ; Veri Toplama ve/veya İşleme - HÖİ; Analiz ve/veya Yorumlama - AA; Literatür Tarama - HÖİ; Makale Yazımı - HÖİ; Eleştirel İnceleme - AA; Diğer - AA, HÖİ

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan etmiştir.

Finansal Destek: Çalışma herhangi bir finansal destek almamıştır.

Author Contributions: Concept – HÖİ, AA; Design - HÖİ; Supervision - AA; Resources - HÖİ; Materials - HÖİ; Data Collection and/or Processing - HÖİ; Analysis and/or Interpretation - AA; Literature Search - HÖİ; Writing Manuscript - HÖİ; Critical Review - AA; Other – AA, HÖİ

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Declaration of Interests: The authors declare that they have no competing interest.

Funding: The study has not received any financial support.

Kaynaklar

- Allameh, H., Fatemi, I., Malayeri, A. R., Nesari, A., Mehrzadi, S., & Goudarzi, M. (2020). Pretreatment with berberine protects against cisplatin-induced renal injury in male Wistar rats. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 393, 1825-1833.
- Alsharidah M, Abdel-Moneim A-MH, Alsharidah AS, Mobark MA, Rahmani AH, Shata A, Abdellatif AAH, El-Readi MZ, Mohany KM, Al Rugaie O. (2021). Thymoquinone, but Not Metformin, Protects against Gentamicin-Induced Nephrotoxicity and Renal Dysfunction in Rats. *Applied Sciences*; 11(9):3981.
- Balakumar, P., Rohilla, A., & Thangathirupathi, A. (2010). Gentamicin-induced nephrotoxicity: Do we have a promising therapeutic approach to blunt it?. *Pharmacological research*, 62(3), 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.04.004>
- Besseling, P. J., Pieters, T. T., Nguyen, I. T., de Bree, P. M., Willekes, N., Dijk, A. H., Bovée, D. M., Hoorn, E. J., Rookmaaker, M. B., Gerritsen, K. G., Verhaar, M. C., Gremmels, H. & Joles, J. A. (2021). A plasma creatinine- and urea-based equation to estimate glomerular filtration rate in rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 320(3), F518-F524.
- Brans, M., Daminet, S., Mortier, F., Duchateau, L., Lefebvre, H. P., & Paepe, D. (2021). Plasma symmetric dimethylarginine and creatinine concentrations and glomerular filtration rate in cats with normal and decreased renal function. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 35(1), 303-311.
- Brilland, B., Boud'hors, C., Wacrenier, S., Blanchard, S., Cayon, J., Blanchet, O., Piccoli, G. B., Henry, N., Djema, A., Coindre, J. P., Jeannin, P., Delneste, Y., Copin, M. C., & Augusto, J. F. (2023). Kidney injury molecule 1 (KIM-1): a potential biomarker of acute kidney injury and tubulointerstitial injury in patients with ANCA-glomerulonephritis. *Clinical Kidney Journal*, 16(9), 1521–

1533. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfad071>
- Chiou, Y. Y., Jiang, S. T., Ding, Y. S., & Cheng, Y. H. (2020). Kidney-based in vivo model for drug-induced nephrotoxicity testing. *Scientific Reports*, 10(1), 13640.
- De Angelis, M. H., Michel, D., Wagner, S., Becker, S., & Beckers, J. (2007). Chemical mutagenesis in mice. In *The mouse in biomedical research* (pp. 225-260). Academic Press.
- Delaney, M. A., Kowalewska, J., & Treuting, P. M. (2018). Urinary system. In *Comparative Anatomy and Histology* (pp. 275-301). Academic Press.
- Dipiro, J. T., Talbert, R. L., Yee, G. C., Matzke, G. R., Wells, B. G., & Posey, L. M. (2014). *Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach*, ed. Connecticut: Appleton and Lange, 4, 141-142.
- Doyle, A., McGarry, M. P., Lee, N. A., & Lee, J. J. (2012). The construction of transgenic and gene knockout/knockin mouse models of human disease. *Transgenic Research*, 21(2), 327–349. <https://doi.org/10.1007/s11248-011-9537-3>
- Erseckin, V., Mert, H., İrak, K., Yildirim, S., & Mert, N. (2022). Nephroprotective effect of ferulic acid on gentamicin-induced nephrotoxicity in female rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 45(2), 663-669.
- Fernando, S., & Polkinghorne, K. R. (2020). Cystatin C: not just a marker of kidney function. *Brazilian Journal of Nephrology*, 42, 6-7.
- Goossens, J. F., Thuru, X., & Bailly, C. (2021). Properties and reactivity of the folic acid and folate photoproduct 6-formylpterin. *Free Radical Biology & Medicine*, 171, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.05.002>
- Hassan, O. Y., Khatal, A. A., Alagouri, I. I., Eljriby, L. R., Aljaghdaif, H. M., & Muftah, S. S. (2023). Study of the Histological and Histopathological Effects of Garlic Extract (*Allium sativum*) on Cisplatin-Induced Kidney Damage in Rabbits. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research*, 35(22), 134-152.
- Hau, J. (2008). Animal Models for Human Diseases. In: Conn, P.M. (eds) *Sourcebook of Models for Biomedical Research*. Humana Press.
- Huang, H., Jin, W. W., Huang, M., Ji, H., Capen, D. E., Xia, Y., Yuan, J., Păunescu, T. G. & Lu, H. A. J. (2020). Gentamicin-induced acute kidney injury in an animal model involves programmed necrosis of the collecting duct. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 31(9), 2097.
- Kang S, Chen T, Hao Z, Yang X, Wang M, Zhang Z, Hao S, Lang F, Hao H. (2022). Oxymatrine Alleviates Gentamicin-Induced Renal Injury in Rats. *Molecules*, 27(19):6209. <https://doi.org/10.3390/molecules27196209>
- Karadeniz, A., Yildirim, A., Simsek, N., Kalkan, Y., & Celebi, F. (2008). *Spirulina platensis* protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Phytotherapy research: PTR*, 22(11), 1506–1510. <https://doi.org/10.1002/ptr.2522>
- Kashani, K., Rosner, M. H., & Ostermann, M. (2020). Creatinine: From physiology to clinical application. *European journal of internal medicine*, 72, 9-14.
- Kaya, M. & Çevik, A. (2011). Hayvan deneylerinde planlanma ve model seçimi. *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 1 (2), 36-39. Retrieved from <https://dergipark.org.tr/en/pub/iudtaed/issue/8971/111908>
- Khorramzadeh, M. R., & Saadat, F. (2020). Animal models for human disease. In *Animal Biotechnology* (pp. 153-171). Academic Press.
- Khusainova, M. A. (2023). Cystatin C is an early marker of decreased kidney function. *Oriental renaissance: Innovative, educational, natural and social sciences*, 3(1), 485-490.
- Kim, Y. D., Yim, D. H., Eom, S. Y., Moon, S. I., Park, C. H., Kim, G. B., Yu, S. D., Choi, B. S., Park, J. D., & Kim, H. (2015). Temporal changes in urinary levels of cadmium, N-acetyl-β-d-glucosaminidase and β2-microglobulin in individuals in a cadmium-contaminated area. *Environmental toxicology and pharmacology*, 39(1), 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.10.016>
- Le, X., & Hanna, E. Y. (2018). Optimal regimen of cisplatin in squamous cell carcinoma of head and neck yet to be determined. *Annals of translational medicine*, 6(11), 229.
- Lee, M. C., Cheng, K. J., Chen, S. M., Li, Y. C., Imai, K., Lee, C. M., & Lee, J. A. (2019). A novel preventive mechanism of gentamicin-induced nephrotoxicity by atorvastatin. *Biomedical Chromatography*, 33(11), e4639.
- Lee, M., Hong, N., Lee, Y. H., Kang, E. S., Cha, B. S., & Lee, B. W. (2018). Elevated N-acetyl-β-d-glucosaminidase, a urinary tubular damage marker, is a significant predictor of carotid artery atherosclerosis in type 1 diabetes, independent of albuminuria: A cross-sectional study. *Journal of diabetes and its complications*, 32(8), 777–783. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2018.05.019>
- Li, D., Li, B., Rui, Y., Xie, H., Zhang, X., Liu, R., & Zeng, N. (2022). Piperazine ferulate attenuates gentamicin-induced acute kidney injury via the NF-κB/NLRP3 pathway. *Phytomedicine*, 99, 154021.
- Li, Q. X., Jiang, X. Y., Wang, X., & Li, J. (2021). Protective Effects of Valsartan on Gentamicin Induced Tubular Injury through Down Regulation of Urinary N-Acetyl-B-D-Glucosaminidase in Rats. *Indian Journal of*

- Pharmaceutical Sciences*, 83(1).
- Liagos, O., Perianayagam, M. C., Vaidya, V. S., Han, W. K., Wald, R., Tighiouart, H., MacKinnon, R. W., Li, L., Balakrishnan, V. S., Pereira, B. J., Bonventre, J. V., & Jaber, B. L. (2007). Urinary N-acetyl-beta-(D)-glucosaminidase activity and kidney injury molecule-1 level are associated with adverse outcomes in acute renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 18(3), 904–912. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006030221>.
- Liu, Q., Zong, R., Li, H., Yin, X., Fu, M., Yao, L., Sun, J. & Yang, F. (2021). Distribution of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase and the establishment of reference intervals in healthy adults. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 35(5), e23748.
- Maurer, K. J., & Quimby, F. W. (2015). Animal models in biomedical research. In *Laboratory animal medicine* (pp. 1497-1534). Academic Press.
- McSweeney, K. R., Gadanec, L. K., Qaradakh, T., Ali, B. A., Zulli, A., & Apostolopoulos, V. (2021). Mechanisms of cisplatin-induced acute kidney injury: pathological mechanisms, pharmacological interventions, and genetic mitigations. *Cancers*, 13(7), 1572.
- Mohammed-Ali, Z., Carlisle, R. E., Nademi, S., & Dickhout, J. G. (2017). Animal models of kidney disease. In *Animal Models for the Study of Human Disease* (pp. 379-417). Academic Press.
- Nikolic, T., Petrovic, D., Matic, S., Turnic, T. N., Jeremic, J., Radonjic, K., Srejovic, I., Zivkovic, V., Bolevich, S., Bolevich, S. & Jakovljevic, V. (2020). The influence of folic acid-induced acute kidney injury on cardiac function and redox status in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 393, 99-109.
- Onopiuk, A., Tokarzewicz, A., & Gorodkiewicz, E. (2015). Cystatin C: a kidney function biomarker. *Advances in clinical chemistry*, 68, 57-69.
- Park, H. C., Hwang, J. H., Kang, A. Y., Ro, H., Kim, M. G., An, J. N., In Park, J., Kim, S. H., Yang, J., Oh, Y. K., Oh, K. H., Noh, J. W., Cheong, H. I., Hwang, Y. H., & Ahn, C. (2012). Urinary N-acetyl-β-D glucosaminidase as a surrogate marker for renal function in autosomal dominant polycystic kidney disease: 1 year prospective cohort study. *BMC nephrology*, 13, 93. <https://doi.org/10.1186/1471-2369-13-93>
- Ramar, M., Ravi, S., Duraisamy, P., Krishnan, M., Martin, L. C., Kumaresan, M., Munusamy, A. & Manikandan, B. (2023). Gentamicin-induced acute nephrotoxicity counteraction using *Boerhaavia diffusa* in Swiss albino mice. *Comparative Clinical Pathology*, 1-13.
- Randjelovic, P., Veljkovic, S., Stojiljkovic, N., Sokolovic, D., & Ilic, I. (2017). Gentamicin nephrotoxicity in animals: Current knowledge and future perspectives. *EXCLI journal*, 16, 388.
- Schley, G., Köberle, C., Manuilova, E., Rutz, S., Forster, C., Weyand, M., Formentini, I., Klentsch-Engel, R., Eckardt, K., & Willam, C. (2015). Comparison of plasma and urine biomarker performance in acute kidney injury. *PloS one*, 10(12), e0145042.
- Sluman, C., Gudka, P. M., & McCormick, K. (2020). Acute Kidney Injury: Pre-renal, Intra-renal and Post-renal. *Renal Medicine and Clinical Pharmacy*, 23-44.
- Stallons, L. J., Whitaker, R. M., & Schnellmann, R. G. (2014). Suppressed mitochondrial biogenesis in folic acid-induced acute kidney injury and early fibrosis. *Toxicology letters*, 224(3), 326-332.
- Suliska, N., Kurniati, N. F., & Sukandar, E. Y. (2021). *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis and *Sonchus arvensis* L. inhibit gentamicin-induced nephrotoxicity: The role of urinary N-acetyl beta-D-glucosaminidase. *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences*, 10(2), 256-260.
- Tanaka, S. I., Fujioka, Y., Tsujino, T., Ishida, T., & Hirata, K. I. (2022). Association between urinary N-acetyl-β-glucosaminidase activity–urinary creatinine concentration ratio and risk of disability and all-cause mortality. *Plos one*, 17(3), e0265637.
- Togashi, Y., Sakaguchi, Y., Miyamoto, M., & Miyamoto, Y. (2012). Urinary cystatin C as a biomarker for acute kidney injury and its immunohistochemical localization in kidney in the CDDP-treated rats. *Experimental and toxicologic pathology*, 64(7-8), 797-805.
- Treacy, O., Brown, N. N., & Dimeski, G. (2019). Biochemical evaluation of kidney disease. *Translational andrology and urology*, 8(Suppl 2), S214.
- Vaidya, V. S., Ozer, J. S., Dieterle, F., Collings, F. B., Ramirez, V., Troth, S., Muniappa, N., Thudium, D., Gerhold, D., Holder, D. J., Bobadilla, N. A., Marrer, E., Perentes, E., Cordier, A., Vonderscher, J., Maurer, G., Goering, P. L., Sistare, F. D., & Bonventre, J. V. (2010). Kidney injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in preclinical biomarker qualification studies. *Nature biotechnology*, 28(5), 478–485. <https://doi.org/10.1038/nbt.1623>
- Werner, M., Costa, M. J., Mitchell, L. G., & Nayar, R. (1995). Nephrotoxicity of xenobiotics. *Clinica Chimica Acta*, 237(1-2), 107-154.
- Wu, H., & Huang, J. (2018). Drug-induced nephrotoxicity: pathogenic mechanisms, biomarkers and prevention strategies. *Current drug metabolism*, 19(7), 559-567.
- Yan, L. J. (2021). Folic acid-induced animal model of kidney disease. *Animal models and experimental medicine*, 4(4), 329-342.

- Yerramilli, M., Farace, G., Quinn, J., & Yerramilli, M. (2016). Kidney Disease and the Nexus of Chronic Kidney Disease and Acute Kidney Injury: The Role of Novel Biomarkers as Early and Accurate Diagnostics. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 46(6), 961–993. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2016.06.011>.
- Yin, C., & Wang, N. (2016). Kidney injury molecule-1 in kidney disease. *Renal failure*, 38(10), 1567-1573.
- Zaaba, N. E., Beegam, S., Elzaki, O., Yasin, J., Nemmar, B. M., Ali, B. H., Adeghate, E., & Nemmar, A. (2022). The Nephroprotective Effects of α -Bisabolol in Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury in Mice. *Biomedicines*, 10(4),842. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10040842>.
- Zhang, W., Yang, Y., Gao, H., Zhang, Y., Jia, Z., & Huang, S. (2019). Inhibition of mitochondrial complex i aggravates folic acid-induced acute kidney injury. *Kidney and Blood Pressure Research*, 44(5), 1002-1013.

Kurşun Kaynaklı Oluşan Dalak Toksisitesine Karşı Sinapik Asidin Etkilerinin İncelenmesi

Investigation of the Effects of Sinapic Acid Against Lead-Induced Spleen Toxicity

Elif DALKILINÇ¹
Sefa KÜÇÜKLER¹
Şeyma AYDIN²



¹Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Biyokimya Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye.
²Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Genetik Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye.



Öz

Bu çalışma, fenolik asit içeren doğal bitkisel bileşik olan sinapik asidin (SA), erkek ratlarda kurşun (Pb) kaynaklı dalak toksisitesine karşı etkilerini incelemeyi amaçladı. Dalak toksisitesi, ratların 7 gün boyunca sadece Pb ya da Pb ile kombinasyon halinde SA'nın oral tedavisini takiben değerlendirildi. Doku malondialdehit (MDA) seviyeleri, glutatyon (GSH) seviyeleri, glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) aktiviteleri biyokimyasal olarak belirlendi. Dalak dokusunda Pb uygulanan grupta MDA düzeyi artarken, GSH seviyeleri ve GPx, SOD, KAT aktiviteleri azaldı. Pb ve SA'nın birlikte uygulanmasının MDA düzeyini azalttığı, GSH seviyeleri ve GPx, SOD, KAT aktivitelerini artırdığı gözlemlendi. Ayrıca Pb'nin NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , COX-2, Beklin-1 ve kaspaz-3 seviyelerini önemli ölçüde artırdığını gösterdi. Kontrol ve Pb grubuyla karşılaştırıldığında ise, SA tedavisinin NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , COX-2, Beklin-1 ve kaspaz-3 seviyelerini önemli ölçüde azalttığı belirlendi. Sonuç olarak bu çalışmada SA'nın Pb kaynaklı dalak hasarına karşı koruyucu özelliğe sahip olduğu belirlendi.

Anahtar kelimeler: Antioksidan, Dalak, Kurşun, Oksidatif Stres, Sinapik Asit.

ABSTRACT

This study aimed to examine the effects of sinapic acid (SA), a natural herbal compound containing phenolic acid, against lead (Pb)-induced spleen toxicity in male rats. Spleen toxicity was assessed following oral treatment of rats with Pb alone or in combination with SA for 7 days. Tissue malondialdehyde (MDA) levels, glutathione (GSH) levels, and the activities of glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) were determined biochemically. While the MDA levels increased in the Pb-administered group in the spleen tissue, GSH levels and the activities of GPx, SOD and CAT decreased. It was observed that co-administration of SA and Pb decreased MDA levels and increased GSH levels as well as GPx, SOD, and CAT activities. It also showed that Pb significantly increased the levels of NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , COX-2, Beclin-1 and caspase-3. Compared to the control and Pb groups, SA treatment was determined to significantly reduce the levels of NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , COX-2, Beclin-1 and caspase-3. As a result, in this study, it was determined that SA has protective properties against Pb-induced spleen damage.

Keywords: Antioxidant, Lead, Oxidative Stress, Sinapic Acid, Spleen.

Geliş Tarihi/Received :12.01.2024
Kabul Tarihi/Accepted :05.09.2024
Yayın Tarihi/Publication Date :19.09.2024

Sorumlu Yazar/Corresponding author:

Elif Dalkılınc

E-mail: elif.dalkilinc99@gmail.com

Cite this article: Dalkılınc E., Küçükler S., Aydın Ş. (2024). Investigation of the Effects of Sinapic Acid Against Lead-Induced Spleen Toxicity. *Journal of Laboratory Animal Science and Practices*, 4(2), 72-77.



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License.

Yöntemler

Giriş

Ağır metaller, vücudumuzda biyolojik birikimleri, toksik etkileri ve sudaki kalıcılıkları sebebiyle toksikasyona yol açmaktadır (Şimşek vd., 2023b). Ağır metal toksikasyonunun artmasıyla beraber Pb'nin insan sağlığı üzerindeki zararlı etkileri de araştırılmaya başlanmıştır (Caglayan vd., 2020).

Pb gıda, su ve hava yoluyla insanları etkileyen bir metaldir (Soleimani vd., 2016). Pb, özellikle glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) gibi bazı antioksidan enzimlerin –SH (tiyol) grubuna bağlanır ve oksidatif strese neden olarak toksik etki gösterir (Caylak, 2010). Vücuda alınan Pb kan dolaşımı yoluyla kıkırdak, sinir, timus, tiroid, pankreas, böbrek, akciğer, dalak ve kas dokusuna ulaşır. Bundan dolayı vücutta fiziksel, biyokimyasal, davranışsal bozukluklara sebep olur (Kucukler vd., 2021). Ayrıca, immun yanıtı artırarak, immun sistem organlarında işlevsel hasara ve anemiye yol açar (Li vd., 2021).

Reaktif oksijen türleri (ROT), hücre büyümesi ve çoğalması için gerekli sinyal molekülleri olarak görev yapar; ancak hücre içindeki redoks dengesindeki değişiklikler serbest radikallerin üretimini artırır. Hücreler çeşitli endojen antioksidan korunma sistemlerine sahip olsa da serbest oksijen türlerinin hücreye karşı oluşturduğu hasarı etkili bir şekilde engelleyemez (Şimşek vd., 2023c). Aşırı Pb alımına bağlı olarak vücutta oksidan ve antioksidan dengesi bozulur (Tuncer vd., 2023).

Flavanoidler birçok meyve, sebze ve bitki köklerinde bulunan polifenolik bileşiklerdir. Bu bileşiklerin birçok yararlı etkisi vardır. Bu etkiler antioksidan, anti-inflamatuar, anti-hipertansif, anti-mutajenik, anti-kanser ve anti-bakteriyel özelliklerdir (Şimşek vd., 2023c). Sinapik asit'in (SA) ise çeşitli meyvelerde, sebzelerde, yağlı tohumlarda, bazı baharatlarda, şifalı bitkilerde ve özellikle tahıl tanelerinde önemli miktarlarda bulunduğu ve güçlü antioksidan etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Nićiforović & Abramović, 2014).

Sunulan çalışmada, SA'nın güçlü antioksidan özelliğinden yararlanılarak dalak üzerinde Pb maruziyetine bağlı oluşturacağı etkinin oksidatif stres, inflamasyon, otofaji ve apoptoz parametreleri ölçülerek incelenmesi amaçlanmıştır.

Deney Hayvanları

Çalışmada, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen ortalama ağırlıkları 220-250 g arasında olan, 10 haftalık yaştaki 35 adet erkek Sprague-Dawley cinsi rat kullanıldı. Çalışma süresince, hayvanlar standart laboratuvar koşullarında barındırıldı. Bu koşullar, $24 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklık, $\%45 \pm 5$ nem ve 12/12 aydınlık/karanlık döngüsü şeklinde sağlandı. Ratlar, çalışma süresince standart yem ve su ile ad-libitum olarak beslendi. Çalışma başlatılmadan önce, ratların adaptasyon sağlamaları için bir hafta bekletildi. Bu çalışmamızın etik kurul onayı 20.11.2023 tarihli 195 sayılı karar ile Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı tarafından onaylanmıştır.

Deneysel Uygulamalar

Çalışmada toplamda 35 adet Sprague-Dawley cinsi erkek rat kullanıldı ve her bir grupta 7 adet rat bulunacak şekilde 5 gruba ayrıldı.

1- Kontrol Grubu: Ratlara 7 günlük süre boyunca oral gavaj yoluyla serum fizyolojik verildi.

2- Sinapik Asit Grubu (SA): Ratlara 7 günlük süre boyunca, 10 mg/kg dozunda oral gavaj yoluyla sinapik asit uygulandı (Tuncer vd., 2023).

3- Kurşun Grubu (Pb): Ratlara 7 günlük süre boyunca, oral gavaj yoluyla 30 mg/kg dozunda kurşun verildi (Tuncer vd., 2023).

4- Kurşun + Sinapik Asit 5 mg/kg Grubu (Pb + SA 5): Ratlara 7 gün boyunca her gün 30 dakika arayla 30 mg/kg kurşun ve 5 mg/kg sinapik asit oral yolla verildi.

5- Kurşun + Sinapik Asit 10 mg/kg Grubu (Pb + SA 10): Ratlara 7 gün boyunca her gün 30 dakika arayla 30 mg/kg kurşun ve 10 mg/kg sinapik asit oral gavaj yoluyla uygulandı.

Numunelerin Alınması

Son uygulamadan 24 saat sonra ratlar sevofluran anestezisi altında dekapite edilerek dalak dokusu alındı. Biyokimyasal analizleri yapıncaya kadar -80°C 'de muhafaza edildi.

Biyokimyasal Analizler

Oksidatif stres belirteçlerini değerlendirmek için ihtiyaç duyulan dalak dokusu homojenatları, önceki çalışmamızda belirtilen metodolojiye göre hazırlandı (Çelik vd., 2020). GSH hidrojen peroksit ile oksidasyonunu katalize eden GPx enziminin aktivitesi Matkovics tarafından belirtilen yöntemle ölçüldü (Matkovics, 1988). Nitroblue tetrazolyum indirgenmesini engelleme prensibine dayanan SOD aktivitesi Sun ve ark. tarafından belirtilen yöntemle ölçüldü (Sun vd., 1988). Hidrojen peroksit varlığını gösteren KAT aktivitesi Aebi tarafından belirlenen yöntemle ölçüldü (Aebi, 1984). GSH analizi sülfhidril gruplu bileşiklerin varlığında 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoik) asit indirgenerek sarı renk meydana gelmesi prensibine dayanır. GSH analizi Sedlak ve Lindsay tarafından kullanılan yöntemle ölçüldü (Sedlak & Lindsay, 1968). Lipit peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehit (MDA) düzeyi Placer ve ark. tarafından belirlenen yöntemle ölçüldü (Placer vd., 1966). Dalak dokularının protein içeriği Lowry ve ark. tarafından belirlenen yöntemle ölçüldü (Lowry vd., 1951).

ELISA yöntemi ile dalak dokusunda NF-κB, IL-1β, TNF-α, COX-2, Beklin-1 ve Kaspaz-3 düzeylerinin incelenmesi

Dalak dokusunda Nükleer Faktör-kappa B (NF-κB), İnterlökin-1β (IL-1β), Tümör Nekroz Faktörü-alfa (TNF-α), Siklooksijenaz-2 (COX-2), Beklin-1 (YL Biont, Şangai, Çin) ve Sistein Aspartat Spesifik Proteaz-3 (Kaspaz-3) seviyeleri (Sunred, Şangai, Çin) üreticinin protokolüne göre ticari bir ELISA deney kiti kullanılarak ölçüldü.

İstatistiksel Analiz

Çalışmadan elde edilen tüm veriler, SPSS 20.0 paket programı kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi. Elde edilen biyokimyasal veriler, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile incelenmiş olup, çoklu karşılaştırmalar için Tukey HSD testi uygulandı. P<0.05 seviyesindeki sonuçlar anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Oksidatif Stres Belirteçleri ve Antioksidan Enzimler

Pb'nin dalak dokusunda oluşturduğu oksidatif hasara karşı SA'nın etkileri oksidan belirteç olan MDA ile antioksidan enzimler olan SOD, KAT, GPx aktiviteleri ve non-enzimatik bir belirteç olan GSH analizi ile değerlendirilerek bulgular Tablo 1'de sunulmuştur. Sonuçlarımıza göre, lipid

peroksidasyonunun bir göstergesi olan dalak dokusu MDA düzeyleri incelendiğinde, kontrol ve sadece SA uygulanan gruplara göre Pb uygulanan grupta MDA düzeyinin yükseldiği tespit edildi (p<0.0001). Pb grubunda yükselen MDA seviyelerinin Pb ile kombine uygulanan SA antioksidanının her iki dozunda da azaldığı tespit edildi (p<0.0001). Non-enzimatik bir antioksidan olan GSH düzeyleri ve enzimatik antioksidan olan SOD, KAT ve GPx aktiviteleri kontrol ve sadece SA uygulanan gruplara göre Pb grubunda azalırken (p<0.0001), Pb ile uygulanan SA antioksidanının 5 mg/kg ve 10 mg/kg'lık dozlarında ise arttığı tespit edildi (p<0.0001).

Tablo 1. SA ve Pb'nin dalak dokusunda MDA ve GSH düzeyleri, SOD, GPx ve KAT enzim aktiviteleri üzerine etkisi.

Table 1. Effects of SA and Pb on MDA and GSH levels, SOD, GPx and KAT enzyme activities in spleen tissue.

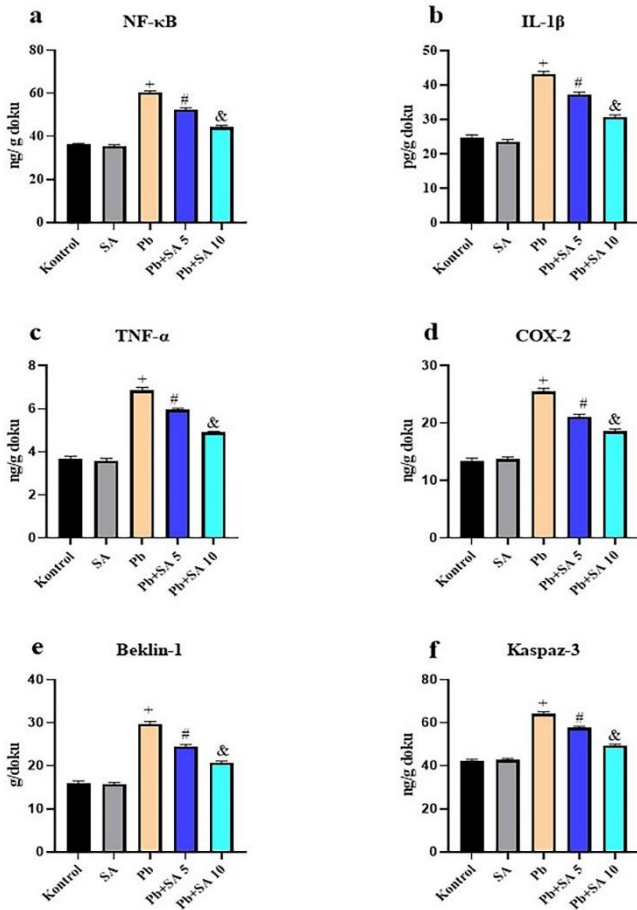
Parametreler	Kontrol	SA	Pb	Pb+SA 5	Pb+SA 10
MDA (nmol/g doku)	15,21 ±0,37	14,76±0,34	28,11±0,43 ⁺	23,18±0,42 [#]	19,34±0,23 ^{&}
GSH (nmol/g doku)	2,32±0,05	2,36±0,04	1,13±0,03 ⁺	1,50±0,02 [#]	1,88±0,03 ^{&}
SOD (U/g protein)	19,17±0,43	19,57±0,45	8,81±0,37 ⁺	11,98±0,37 [#]	15,65±0,39 ^{&}
GPX (nmol/g doku)	10,88±0,39	11,59±0,30	3,39±0,23 ⁺	5,08±0,22 [#]	8,16±0,33 ^{&}
KAT (Katal/g protein)	23,36±0,76	23,99±0,52	11,66±0,38 ⁺	14,92±0,31 [#]	16,71±0,39 ^{&}

Dalak Dokusu; Malondialdehit (MDA), Glutatyon (GSH) Düzeyi ve Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (KAT), Glutatyon Peroksidaz (GPX) Aktiviteleri. Pb: Kurşun, SA: Sinapik Asit. Kontrol ve SA grubuna göre; aynı satırdaki farklı simgeler (+, #, &), gruplar arası önemli bir fark olduğunu ifade eder (p<0.0001).

ELISA Yöntemi ile Dalak Dokusunda NF-κB, IL-1β, TNF-α, COX-2, Beklin-1 ve Kaspaz-3 Düzeylerinin Belirlenmesi

Pb uygulamasının tetiklediği inflamatuvar yanıt üzerinde SA tedavisinin etkisini araştırmak için dalak dokusunda NF-κB, IL-1β, TNF-α, COX-2, Beklin-1 ve Kaspaz-3 seviyeleri değerlendirilerek Şekil 1'de sunulmuştur. NF-κB (Şekil 1a), IL-1β (Şekil 1b), TNF-α (Şekil 1c) ve COX-2 (Şekil 1d) seviyeleri kontrol ve SA grubuna kıyasla Pb grubunda artarken (p<0.0001), Pb ile kombine uygulanan SA'nın 5 ve 10 mg/kg'lık dozunda bu seviyeler azaldı (p<0.0001). Mevcut çalışmada otofajik belirteç olan beclin-1 düzeyi (Şekil 1e) incelendiğinde ise, Pb grubunda kontrol ve SA grubuna kıyasla anlamlı şekilde arttığı tespit edilirken, SA tedavisi uygulanan gruplarda ise seviyenin azaldığı belirlendi (p<0.0001). Ayrıca SA'nın apoptoz üzerine etkisini değerlendirmek için kaspaz-3 düzeyi (Şekil 1f) incelendi.

Çalışmadaki bulgumuza göre kaspaz-3 düzeyi Pb grubunda, kontrol ve SA grubuna göre arttığı belirlenirken, SA tedavisi uygulanan gruplarda ise artan seviyenin azaldığı gözlemlendi ($p < 0.0001$).



Şekil 1: Dalak Dokusu; Nükleer Faktör kappa B (NF-κB), Tümör Nekroz Faktör-alfa (TNF-α), İnterlökin-1β (IL-1β), Siklooksijenaz-2 (COX-2), Beklin-1, Sistein Aspartat Spesifik Proteaz-3 (kaspaz-3) Seviyesi. Pb: Kurşun, SA: Sinapik Asit. Kontrol ve SA grubuna göre; grafik sütunlarındaki farklı simgeler (+, #, &), gruplar arası önemli bir fark olduğunu ifade eder ($p < 0.0001$).

Tartışma

İnsan vücudunun en önemli bağışıklık organlarından biri olan dalak, vücut sıvılarının ve hücrelerinin bağışıklığında rol oynar (Akaras vd., 2023). Vücudumuza alınan Pb'nin büyük oranı atılır, ancak bir kısmı emilir ve kana geçer; emilen Pb, dolaşım sistemi boyunca eritrositler tarafından taşınır; vücuttaki hemen hemen tüm dokular özellikle hematopoetik ve bağışıklık sistemi toksik metale maruz kalır (Aldahmash & El-Nagar, 2016). Pb'ye maruz kalan ratların dalağında splenomegali oluşarak dalak toksisitesine sebep olur (Marques vd., 2006). Dalakta Pb'ye maruz kalan eritrositlerin artan tahribatı anemiye ve serbest demir (Fe)

artışına yol açar. Bu artış, hücrel Fe homeostazisini bozarak makrofajlarda oksidatif stresi artırır (Kasten-Jolly & Lawrence, 2014).

Pb'nin SOD, GPx, KAT aktivitelerinde ve GSH seviyesinde önemli bir azalmaya, MDA düzeyinde ise önemli bir artışa sebep olduğunu gösteren birçok literatür bulunmaktadır (Akaras vd, 2024; Akarsu vd, 2023; Han vd, 2017; Tuncer vd, 2023). Akaras ve ark.'nın yaptığı çalışmaya göre Pb'nin akciğer dokusunda oksidatif strese yol açarak hasara yol açtığı ancak SA uygulaması ile tedavi gruplarında iyileşme olduğu belirtilmiştir (Akaras vd., 2024). Sunulan çalışmamızdaki bulgularımız mevcut literatür bilgilerini destekleyerek, Pb'nin dalak dokusundaki SOD, KAT, GPx aktivitelerini ve GSH seviyelerini azalttığını, MDA seviyelerini ise yükselterek oksidatif hasara yol açtığını göstermiş ve SA tedavisinin bu seviyeleri önemli ölçüde azaltarak oksidatif stres hasarına karşı düzenleyici etkisi olduğu belirlenmiştir. Önceki çalışmalara benzer şekilde mevcut çalışmada, SA'nın antioksidan özelliğe sahip olduğu ve oksidatif strese karşı önleyici etkisi olduğu görülmüştür (Tuncer vd., 2023).

Pb toksisitesi endoplazmik retikulum kaynaklı apoptoz ve otofaji arasında bir bağlantı olduğunu göstermiştir. Dalak, bağışıklık tepkisi ve eritropoezdeki rolü nedeniyle, Pb toksisitesine karşı duyarlı bir dokudur (Corsetti vd., 2017). Mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz (MAPK) sinyal yolunun dalak büyümesine, hücre apoptozuna, çoğalmasına, farklılaşmasına ve mayozuna katkıda bulunduğu belirtilmektedir (Kuang vd., 2022). Yang ve ark.'nın yaptığı bir çalışmaya göre Pb kaynaklı dalak toksisitesiyle MAPK sinyal yolu arasında bir ilişki olduğu belirtilmiştir. MAPK sinyal yolunun aktivasyonu TNF-α, COX-2 ve IL-1β gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin aktivasyonuna ve dalakta apoptoza yol açarak NF-κB yolunun uyarılmasına neden olduğu ifade edilmiştir (Yang vd., 2023). Tuncer ve ark.'nın testis dokusunda yaptığı çalışmada Pb toksikasyonunun NF-κB, IL-1β, TNF-α ve COX-2 seviyelerinde artışa sebep olduğu, SA uygulanan gruplarda ise artan seviyelerin azaldığı belirtilmiştir (Tuncer vd., 2023). Sunulan çalışmada bu bulguları destekleyerek, dalak dokusunda Pb tarafından indüklenen TNF-α, IL-1β, COX-2 ve NF-κB seviyelerinde bir artış olduğu ortaya konmuştur; SA tedavisi ise bu seviyeleri önemli ölçüde azaltmıştır. Bu sonuç, SA'nın inflamasyonu azaltarak NF-κB, IL-1β, COX-2 ve TNF-α yollarındaki düzenleyici özelliklerini göstermektedir.

Otofaji, lizozomlar aracılığıyla yaşlanmış ve hasarlı organellerin çıkarılması sürecidir. Normal fizyolojik koşullar altında düşük seviyede olan otofaji, hücrel homeostazın

korunmasında önemli bir rol oynar (Şimşek vd., 2023a). Beklin-1 sinyal yolağı otofajik süreçte rol oynayan ve otofajik hasarın derecesini belirleyen önemli belirteçdir. Zhang ve ark.'ı Pb maruziyetinin ratlarda Beklin-1'in protein seviyelerinde önemli artış göstererek otofaji hasarına neden olduğunu bildirmiştir (Zhang vd., 2024). Şimşek ve ark'ı yaptığı çalışmada ise SA tedavisinin Pb toksikasyonu sebebiyle artan beclin-1 seviyelerini azaltığını bildirmişlerdir (Şimşek vd., 2023c). Mevcut çalışmada bu bulgularla uyumlu olarak Pb maruziyetinin Beklin-1 seviyesini artırarak otofajik hasara sebep olurken SA tedavisinin 10 mg/kg uygulanan dozu 5 mg/kg uygulanan dozuna göre daha iyi etki göstererek otofajik hasara karşı koruma sağladığı tespit edilmiştir.

Apoptozis, çeşitli uyanlarla tetiklenen hücre ölümünün normal bir sürecidir. Pb'nin dalak dokusunda kaspaz-3 ekspresyonunda önemli bir artışa neden olarak apoptoza yol açtığı bildirilmiştir (Corsetti vd., 2017). Akaras ve ark.'ı akciğer dokusunda Pb maruziyetinin kaspaz-3 seviyelerini artırarak apoptoza yol açtığı, SA uygulanan gruplarda ise apoptozun önemli ölçüde azaldığını belirtmişlerdir (Akaras vd., 2024). Mevcut çalışmamızda bu bulgularla uyumlu olarak dalak dokusunda Pb grubunda kaspaz-3 seviyesinde artış olduğu, SA ve Pb'nin beraber uygulandığı gruplarda ise bu artışın azaldığı ve bu sonucun özellikle 10 mg/kg dozunda daha etkili olduğu bulunmuştur.

Sonuç

Sonuç olarak, Pb'nin dalak dokusunda oksidatif stres, inflamasyon, otofaji ve apoptoza sebep olarak hasara yol açtığını ve SA'nın bu zararları hafifletici bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, dalak dokusunda Pb kaynaklı hasarı önlemek amacıyla SA'nın 5 ve 10 mg/kg'lık dozlarının kullanımının etkili olduğu, özellikle 10 mg/kg verilen dozun daha etkili olduğu tespit edildi.

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma için etik kurul onayı Atatürk Üniversitesi'nden alınmıştır (Tarih: 20.11.2023, Numara: 2023/195).

Yazar Katkıları: Fikir – S.K.; Tasarım – S.K.; Denetleme – S.K.; Kaynaklar – S.K.; Malzemeler – S.K.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi – E.D.; Analiz ve/veya Yorum – S.K., Ş.A.; Literatür Taraması – E.D.; Yazıyı Yazan – E.D., Ş.A.; Eleştirel İnceleme – S.K., Ş.A.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval for this study was received from Atatürk University (Date: 20.11.2023, Number: 2023/195).

Author Contributions: Concept – S.K.; Design – S.K.; Supervision – S.K.; Resources – S.K.; Materials – S.K.; Data Collection and/or Processing – E.D.; Analysis and/or Comment – S.K., Ş.A.; Literature Review- E.D.;

Writing Manuscript – E.D.Ş.A.; Critical Review – S.K., Ş.A.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Declaration of Interests: The authors declare no conflict of interest.

Financial Disclosure: The authors declared that they received no financial support for this study.

Kaynaklar

- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro (ss. 121-126). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- Akaras, N., Kandemir, F. M., Şimşek, H., Gür, C., & Aygörmüş, S. (2023). Antioxidant, Antiinflammatory, and Antiapoptotic Effects of Rutin in Spleen Toxicity Induced by Sodium Valproate in Rats. *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, 12(2), 138-144. <https://doi.org/10.46810/tdfd.1299663>.
- Akaras, N., Kucukler, S., Gur, C., İleriturk, M., & Kandemir, F. M. (2024). Sinaptic acid protects against lead acetate-induced lung toxicity by reducing oxidative stress, apoptosis, inflammation, and endoplasmic reticulum stress damage. *Environmental Toxicology*. <https://doi.org/10.1002/tox.24255>.
- Akarsu, S. A., Gür, C., İleriturk, M., Akaras, N., Küçükler, S., & Kandemir, F. M. (2023). Effect of syringic acid on oxidative stress, autophagy, apoptosis, inflammation pathways against testicular damage induced by lead acetate. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 80. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2023.127315>.
- Aldamash, B. A., & El-Nagar, D. M. (2016). Antioxidant effects of captopril against lead acetate-induced hepatic and splenic tissue toxicity in Swiss albino mice. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(6), 667-673. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.05.005>.
- Caglayan, C., Taslimi, P., Türk, C., Gulcin, İ., Kandemir, F. M., Demir, Y., & Beydemir, Ş. (2020). Inhibition effects of some pesticides and heavy metals on carbonic anhydrase enzyme activity purified from horse mackerel (*Trachurus trachurus*) gill tissues. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(10), 10607-10616. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07611-z>.
- Caylak, E. (2010). Lead Toxication and Oxidative Stress in Children and Antioxidant Effects of Thiol Compounds. *Journal of Child*, 10(1), 13-23. <https://doi.org/10.5222/j.child.2010.013>.
- Corsetti, G., Romano, C., Stacchiotti, A., Pasini, E., & Dioguardi, F. S. (2017). Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis Triggered by Sub-Chronic Lead Exposure in Mice Spleen: a Histopathological Study. *Biological Trace Element Research*, 178(1), 86-97. <https://doi.org/10.1007/s12011-016-0912-z>.
- Çelik, H., Kandemir, F. M., Caglayan, C., Özdemir, S., Çomaklı, S., Kucukler, S., & Yardım, A. (2020). Neuroprotective effect of rutin against colistin-induced

- oxidative stress, inflammation and apoptosis in rat brain associated with the CREB/BDNF expressions. *Molecular Biology Reports*, 47(3), 2023-2034. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05302-z>.
- Han, Y., Li, C., Su, M., Wang, Z., Jiang, N., & Sun, D. (2017). Antagonistic effects of selenium on lead-induced autophagy by influencing mitochondrial dynamics in the spleen of chickens. *Oncotarget*, 8(20), 33725. www.impactjournals.com/oncotarget.
- Kasten-Jolly, J., & Lawrence, D. A. (2014). Lead Modulation of Macrophages Causes Multiorgan Detrimental Health Effects. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 28(8), 355-372. <https://doi.org/10.1002/jbt.21572>.
- Kuang, P., Cui, H., & Yu, L. (2022). Sodium fluoride suppresses spleen development through MAPK/ERK signaling pathway in mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 241, 113764. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113764>.
- Kucukler, S., Benzer, F., Yildirim, S., Gur, C., Kandemir, F. M., Bengu, A. S., Ayna, A., Caglayan, C., & Dortbudak, M. B. (2021). Protective Effects of Chrysin Against Oxidative Stress and Inflammation Induced by Lead Acetate in Rat Kidneys: a Biochemical and Histopathological Approach. *Biological Trace Element Research*, 199(4), 1501-1514. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02268-8>.
- Li, N., Zhao, Y., Shen, Y., Cheng, Y., Qiao, M., Song, L., & Huang, X. (2021). Protective effects of folic acid on oxidative damage of rat spleen induced by lead acetate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 211, 111917. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.111917>.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6).
- Marques, C. C., Nunes, A. C., Pinheiro, T., Lopes, P. A., Santos, M. C., Viegas-Crespo, A. M., Ramalhinho, M. G., & Mathias, M. L. (2006). An Assessment of Time-Dependent Effects of Lead Exposure in Algerian Mice (*Mus spretus*) Using Different Methodological Approaches. *Biological Trace Element Research*, 109(1), 075-090. <https://doi.org/10.1385/BTER:109:1:075>.
- Matkovics, B. (1988). Determination of enzyme activity in lipid peroxidation and glutathione pathways. *Laboratoriumi Diagnostika*, 15, 248-250.
- Ničiforović, N., & Abramović, H. (2014). Sinapic Acid and Its Derivatives: Natural Sources and Bioactivity. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(1), 34-51. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12041>.
- Placer, Z. A., Cushman, L. L., & Johnson, B. C. (1966). Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Analytical Biochemistry*, 16(2), 359-364. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(66\)90167-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(66)90167-9).
- Sedlak, J., & Lindsay, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical biochemistry*, 25, 192-205.
- Soleimani, E., Goudarzi, I., Abrari, K., & Lashkarbolouki, T. (2016). The combined effects of developmental lead and ethanol exposure on hippocampus dependent spatial learning and memory in rats: Role of oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology*, 96, 263-272. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.07.009>.
- Sun, Y., Oberley, L. W., & Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, 34(3), 497-500. <https://doi.org/10.1093/clinchem/34.3.497>.
- Şimşek, H., Akaras, N., Gür, C., Küçükler, S., & Kandemir, F. M. (2023a). Beneficial effects of Chrysin on Cadmium-induced nephrotoxicity in rats: Modulating the levels of Nrf2/HO-1, RAGE/NLRP3, and Caspase-3/Bax/Bcl-2 signaling pathways. *Gene*, 875, 147502. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2023.147502>.
- Şimşek, H., Gür, C., Küçükler, S., İleritürk, M., Akaras, N., Öz, M., & Kandemir, F. M. (2023b). Carvacrol Reduces Mercuric Chloride-Induced Testicular Toxicity by Regulating Oxidative Stress, Inflammation, Apoptosis, Autophagy, and Histopathological Changes. *Biological Trace Element Research*. <https://doi.org/10.1007/s12011-023-04022-2>.
- Şimşek, H., Küçükler, S., Gür, C., Akaras, N., & Kandemir, F. M. (2023c). Protective effects of sinapic acid against lead acetate-induced nephrotoxicity: a multi-biomarker approach. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(45), 101208-101222. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-29410-y>.
- Tuncer, S. Ç., Akarsu, S. A., Küçükler, S., Gür, C., & Kandemir, F. M. (2023). Effects of sinapic acid on lead acetate-induced oxidative stress, apoptosis and inflammation in testicular tissue. *Environmental Toxicology*, 38(11), 2656-2667. <https://doi.org/10.1002/tox.23900>.
- Yang, B., Wang, Z., Hu, Z., Wang, S., Xu, J., & Li, X. (2023). Identification of the Hub Genes Linked to Lead (IV)-Induced Spleen Toxicity Using the Rat Model. *Biological Trace Element Research*. <https://doi.org/10.1007/s12011-023-04036-w>.
- Zhang, W., Luo, S., Zhu, Q., Chen, H., Wang, Q., Bian, Y., Tan, H., Liu, K., Liu, X., & Zhu, G. (2024). Lead exposure induces autophagy via TLR4/EEF2 in neurons. *Food and Chemical Toxicology*, 189, 114734. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2024.114734>.

Molecular Diagnosis of *Clostridium Piliforme*, the Causative Agent of Tyzzer's Disease in Mice and Rats*

Fare ve Ratlarda Tyzzer's Hastalığı'nın Etkeni *Clostridium piliforme*'nin Moleküler Teşhisi

Ufuk ÜLKER¹
Sibel KIZIL²
Efsun Melike ÇEÇEN²
Elif AYDIN³



¹ Department of Microbiology, Bozok University, Faculty of Veterinary Medicine, Yozgat, Türkiye
² Department of Microbiology, Kırıkkale University, Faculty of Veterinary Medicine, Kırıkkale, Türkiye
³ Department of Sterilization and Antisepsis, Kütahya Health Sciences University, Kütahya, Türkiye



*Kızıl S., Ülker U., Çeçen E. M. (2023). Cause of Tyzzer's Disease Detected Molecularly in Rats *Clostridium piliforme* (*C. piliforme*). V. International Ankara Multidisciplinary Studies Congress, 27-29 January, 2023 (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)
Ülker U., Kızıl S. (2023). *Clostridium piliforme* (*C. piliforme*) Caused by Tyzzer's Disease Detected by Pcr in Mice. 10. International Euroasia Congress on Scientific Researches and Recent Trends. February 16-17, 2023/Baku, Azerbaijan (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)

Geliş Tarihi/Received :31.01.2024
Kabul Tarihi/Accepted :24.05.2024
Yayın Tarihi/Publication Date :19.09.2024

Sorumlu Yazar/Corresponding Author:
Sibel KIZIL

E-mail: sibelkizil@kku.edu.tr

Cite this article: Ülker U., Kızıl S., Çeçen E.M., Aydın E. (2024). Molecular Diagnosis of *Clostridium piliforme*, the Causative Agent of Tyzzer's Disease in Mice and Rats. *Journal of Laboratory Animal Science and Practices*, 4(2), 78-82.

ABSTRACT

Tyzzer's disease, caused by *Clostridium piliforme* (*C. piliforme*), occurs in many species of mammals mainly in rodents, rabbits and foals is an acute, epizootic bacterial disease that can result in mortality. In our study, *C. piliforme* was investigated in feces samples from mice and rats in a laboratory experimental animals center by Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. *C. piliforme* was detected in 44 (83.01%) of a total of 53 mouse feces of different ages. *C. piliforme* was detected in 40 (90.9%) of the feces of a total of 44 rats of different ages. *C. piliforme*, the causative agent of Tyzzer's disease, was detected at high rates in mice and rats examined by the classical PCR method. When evaluated in terms of gender, 28 (73.6%) of 40 positive mice for Tyzzer's disease were female and 16 (88.8%) were male; While 25 (96.1%) of the rats were female, 15 (83.3%) were male. When age was evaluated, the disease was found to be higher in mice at the ages of 4, 5, and 8, and in rats at the ages of 4, 5, 6, and 7. Due to the reliability of the analyses and the high risk of transmission to other animals in centers where laboratory animals are raised, necessary precautions must be taken to control Tyzzer's disease and prevent the disease.

Keywords: *Clostridium piliforme*, mice, PCR, rat, Tyzzer's disease.

ÖZ

Clostridium piliforme (*C. piliforme*)'nin neden olduğu Tyzzer hastalığı, başta kemirgenler, tavşanlar ve taylor olmak üzere birçok memeli türünde ortaya çıkan, ölümlü sonuçlanabilen akut, epizootik bir bakteriyel hastalıktır. Çalışmamızda laboratuvar deney hayvanları merkezinde yetiştirilen fare ve ratlardan alınan dışkı örneklerinde, PCR ile *C. piliforme* araştırıldı. Farklı yaşlardaki toplam 53 fare dışkısının 44'ünde (%83,01) *C. piliforme* tespit edildi. Farklı yaşlardaki toplam 44 ratın dışkısının 40'ında (%90,9) *C. piliforme* tespit edildi. Tyzzer'z hastalığı'nın etkeni olan *C. piliforme*, klasik PCR yöntemiyle incelenen fare ve ratlarda yüksek oranda tespit edildi. Cinsiyet olarak değerlendirildiğinde, Tyzzer's Hastalığı 40 adet pozitif bulunan farelerin 28'i (%73.6) dişi, 16'sı (%88.8) erkek; ratların ise 25'i (%96.1) dişi iken, 15'i (%83.3) erkek idi. Yaş olarak değerlendirme yapıldığında hastalık farelerde 4, 5 ve 8. yaşlarda, ratlarda ise 4, 5, 6 ve 7. yaşlarda daha yüksek saptandı. Analizlerin güvenilirliği ve laboratuvar hayvanlarının yetiştirildiği merkezlerde, diğer hayvanlara bulaşma riskinin yüksek olması nedeniyle, Tyzzer's hastalığı'nın kontrol edilmesi ve hastalığın önlenmesi için gerekli önlemlerin alınması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Clostridium piliforme*, fare, rat, PCR, Tyzzer's hastalığı.



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License.

Introduction

Tyzzler's Disease (TD), is an enterohepatic disease caused by *C. piliforme* first known as *Bacillus piliformis*. The disease can be seen generally in laboratory animals, some domestic animal species, and immunosuppressed individuals. *C. piliforme*, unlike other *Clostridium* species, is gram-negative and obligate intracellular spor-forming bacillus with flagella (Waner et al., 2005).

Infection occurs by the ingestion of bacterial spores or contaminated materials by the fecal-oral route (Waner et al., 2005). The spores of the bacteria present in infected feces can contaminate soil and feedstuff and can be ingested by a living host (Banes et al., 2013). After oral contamination of bacterial spores and/or vegetative forms, replication takes place in the ileocaecal- colic region. Depending on the immune system of each animal, the organisms are absorbed in animals and they reach to liver and sometimes to the heart via systemic circulation. Typical lesions may be hepatitis, enterocolitis, and myocarditis, however, hepatic lesions are more frequent (Young et al., 1995; Poonacha KB, 1997). The most common clinical symptoms are diarrhea, abdominal tension, anorexia, and weight loss and although young animals are affected more frequently, infected animals die without any symptoms in general (Sasseville et al., 2007).

TD, widespread in laboratory animals all over the world, has been reported from wild animals in America and Australia, from muskrats (*Ondatra zibethicus*) in many countries of North America, and also from cotton tail rabbits (*Sylvilagus floridanus*) (Ganoë et al., 2020; Ganaway et al., 1976). Because *C. piliforme* grows on routine media, isolation and diagnosis are more difficult than other diseases (Niepceron and Licois, 2010). Molecular methods are preferred in the diagnosis of *C. piliforme*, which has difficulties in isolation, and identification using conventional methods (Weisbroth et al., 1998).

Smith et al. (1996), found in a study that people with weak immunity were susceptible to *C. piliforme* infection, and that caregivers who had contact with laboratory animals (85% positivity) as well as personnel who did not have contact (40.5% positivity) were also serologically positive for *C. piliforme*. For this reason, it has been stated that *C.*

piliforme poses a threat to personnel in close contact with laboratory animals and other personnel.

With a development conducted in China, LAMP-LFD analysis, *C. piliforme* was detected 5.08% of clean-grade animals and 9.96% of specific pathogen-free animals. It is reported that *C. piliforme* is detected at a higher rate in experimental animals used in schools than in companies and research institutes (Tao et al., 2024).

In this study, the incidence of *C. piliforme* infections causative agent of Tyzzler's disease in rats and mice in an experimental animal center was investigated by PCR.

Materials and Methods

Feces Samples

In the experiments, 44 Wistar albino rat feces and 53 mouse feces samples in the laboratory experimental animals center were examined. Feces samples were kept at -20°C till the study started. No clinical findings were observed in animals. Information about the age information of the animals is available in years, but there is no information in weeks. This study was approved by the Veterinary Control Central Research Institute Directorate, Local Ethical Committee Decision date and no. 08.11.2022/43.

DNA Isolation

Feces samples to be examined were left to melt before the extraction procedure. After melting, 1X PBS was added to all samples. After keeping tubes at 95°C for 10 minutes, they were centrifuged at 10.000 rpm for 2 minutes. The supernatants were transferred into the sterile tubes and the amounts of DNA obtained were estimated by nano-drop spectrophotometry (Dallenne et al., 2010).

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Extracted patient DNA samples were used as template DNA in PCR to find *C. piliforme*. Forward 5' ACCATTGACAGCCTACGTAA-3' and Reverse 5' GTCTCGCTTCACTTTGTTGTA-3' primer sequences were used. The reaction was composed of 25 µl volume and 2,5 µl PCR buffer (10X), 0,5 µl dNTP mix (10 mm), 1 µl Primer F (10 pmol), 1 µl Primer R (10 pmol), 0,4 µl Taq polymerase,

13,6 µl H₂O and 3 µl DNA complements. Thermal circle; at 94°C 5 minutes first denaturation, then at 98°C 10 seconds denaturation, at 55°C, 35 seconds primer binding and at 72°C 1 minutes chain extending all contained 40 cycles and at 72°C 5 minutes final extension. The analysis of all PCR findings was run on %1,5 agarose prepared from 5 µl Safe DNA gel at 100 Volt for 40 min, and after that examination under UV light was carried out. In electrophoresis, 270 bp amplified products were accepted as *C. piliforme* gene (Aboellail et al., 2013).

Statistical Analysis

The chi-square test was used as a statistical method. P values between the two genders were investigated. Data were analyzed with Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 25.0 software statistics program.

Results

Of the 44 rats feces samples from different ages, 40 (90.9%) samples were found to have *C. piliforme*. 20 female rats and 24 male rats positive results revealed that 80% of females and 88.8% of males had *C. piliforme* agent.

C. piliforme was detected in 44 (83%) of a total of 53 mice feces of different ages. When age was evaluated, the disease was found to be higher in mice at the ages of 4, 5, and 8, and in rats at the ages of 4, 5, 6, and 7. Of the mice found positive, 28 were female and 16 were male. *C. piliforme* was detected in 80% of females and 88.8% of males. *C. piliforme* PCR positivity is given in Table 1 and Table 2 according to the ages of mice and rats. Considering the ages of the mice examined, it was observed that the agent was detected mostly in young animals. According to the genders of mice and rats *C. piliforme* PCR positivity is given in Table 3.

Table 1. *C. piliforme* PCR positivity according to the ages of mice.

Mice Ages	<1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Positive (%)	4 (80)	1 (50)	4 (80)	9 (90)	6 (85.7)	4 (100)	3 (100)	6 (100)	1 (50)	2 (50)	0 (0)
Negative (%)	1 (20)	1 (50)	1 (20)	1 (10)	1 (14.2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (50)	2 (50)	1 (100)
Total (53)	5	2	5	10	7	4	3	6	2	4	1
Total Positivity (%)	53/4 (7.5)	53/1 (1.8)	53/4 (7.5)	53/9 (16.9)	53/6 (11.3)	53/4 (7.5)	53/3 (5.6)	53/6 (11.3)	53/1 (1.8)	53/2 (3.7)	53/0 (0)

Table 2. *C. piliforme* PCR positivity according to the ages of rats.

Rat Ages	<1	2	3	4	5	6	7	8	9
Positive (%)	1 (100)	2 (100)	10 (90.9)	11 (100)	6 (75)	9 (100)	4 (80)	0 (0)	1 (100)
Negative (%)	0 (0)	0 (0)	1 (9.09)	0 (0)	2 (25)	0 (0)	1 (20)	0 (0)	0 (0)
Total (44)	1	2	11	11	8	9	5	0	1
Total Positivity (%)	44/1 (2.2)	44/2 (4.5)	44/10 (4.4)	44/11 (25)	44/6 (13.6)	44/9 (20.4)	44/4 (9.09)	44/0 (0)	44/1 (2.2)

Table 3. According to the genders of mice and rats *C. piliforme* PCR positivity.

Gender	Mice Number	Positive (%)	Negative (%)	Rat Number	Positive (%)	Negative (%)
Female	35	28 (73.6)	7 (20)	26	25 (96.1)	1 (3.8)
Male	18	16 (88.8)	2 (11.1)	18	15 (83.3)	3 (16.6)
Total	53	44 (83.01)	9 (16.9)	44	40 (90.9)	4 (9.09)

C. piliforme, the causative agent of Tyzzer's disease, was detected at a high rate in mice and rats examined by the classical PCR method. When the percentage of *C. piliforme* PCR positivity of mice and rats is compared according to their genders, the height is significantly observed in males.

C. piliforme PCR positivity is given in Table 1 according to the genders of mice and rats. *C. piliforme* PCR positivity of mice and according to the genders rats is given in graphical form in Figure 1.

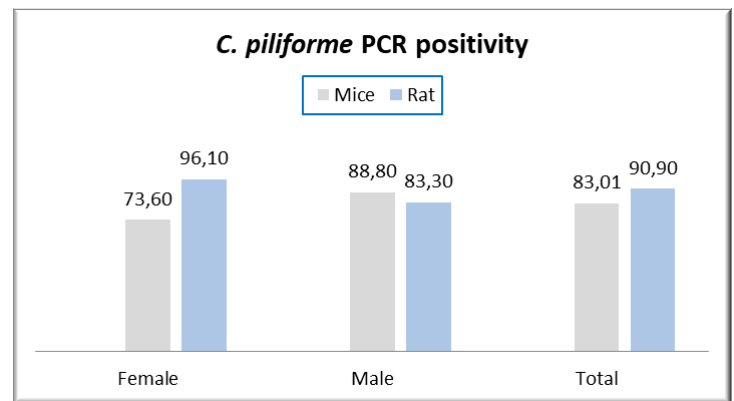


Figure 1. According to the genders of mice and rats *C. piliforme* PCR positivity in graphical form.

When statistically evaluated, no significant relationship was detected between gender-related positivity rates in mice and rats. The p values determined between the genders are given in Table 4.

Table 4. The p values between two genders.

Significance value	Mice-Rat Female	Mice-Rat Male
p	0.6943	0.6818
p	> 0.05	> 0.05

Discussion

C. piliforme is a pathogen that can cause mortality and is known as the cause of enteric, hepatic, and cardiac diseases in some animal species like as mouse, rats, and hamsters. Young animals are more susceptible to this pathogen and stress factors such as extreme crowding, transportation, and poor sanitation are predisposing factors (Ganaway et al., 1971). In 4 different studies conducted in America and Canada on muskrats in 1966, 1971, 1977-79, and 2019, the mortality rate was found to be 67% (Ganoë et al., 2020). In 2022, systemic Clostridium tarantellae infection, whose pathological findings resemble Tyzzer's disease, was detected in the wild Korean raccoon (*Nyctereutes procyonoides koreensis*) (Rho et al., 2022). Between 2000 and 2021, Tyzzer's disease was confirmed in at least one organ in 19 (51%) of 37 kittens under 6 months of age at the Veterinary Medical Teaching Hospital, University of California-Davis. Tyzzer's disease has been reported to be more common than thought in orphaned kittens and is associated with colitis and/or hepatitis (Fingerhood et al., 2023).

Naturally occurring Tyzzer's disease was detected in a calf in 1999 (Ikegami et al., 1999). A study conducted at the University of California Davis reported that PCR can be used for the early and specific diagnosis of Tyzzer's disease in foals (Borchers et al., 2006). It was reported that necrotic hepatitis was the hallmark of 25 horses diagnosed with Tyzzer's disease in the United States in 2022 (Garcia et al., 2022). In a study conducted in America in 2022, Tyzzer's disease was detected in 2 canine littermates and 1 gray fox and was confirmed by PCR (Jacobson et al., 2022).

Researchers from Iran have reported that they had found less than 10% positivity by ELISA for *C. piliforme* in 82 rats randomly chosen among laboratory animals (Fallahi, R., & Mansouri, M. A., 2017). Our study, found *C. piliforme*, the causative agent of Tyzzer's Disease, at high rates in rats and mice.

In a cat dying after upper respiratory tract infection and diarrhea symptoms in necropsy, *C. piliforme* was found and

it was noted the third kitten in the same region dying with similar clinical findings with a similar course (Neto et al., 2015). In a study, *C. piliforme* positive 150 laboratory rabbits were used and immunofluorescence assay (IFA) and multiplexed fluorometric immunoassay (MFIA) techniques were used to assess the results and *C. piliforme* was found to be 73% and 34.7% in order (Pritt et al., 2010).

Conclusion

Without neglecting the subclinical nature of Tyzzer's disease that can be frequently determined, it is important to control laboratory animal breeding centers and that protective and preventive studies be carried out for the accuracy of the analyses and because of the high transmission risk to other animals. In particular, *C. piliforme* pathogen can cause mortality and is highly contagious, additional studies should be carried out in terms of method and efficiency.

Ethics Committee Approval: This study was approved by the Veterinary Control Central Research Institute Directorate, Local Ethical Committee Decision. (Date: 08.11.2022, number 2022/43).

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept – S.K., U.Ü., E.M.Ç.; Design – S.K., U.Ü., E.M.Ç.; Supervision – S.K., U.Ü., E.M.Ç., E.A.; Materials – S.K., U.Ü.; Data Collection and/or Processing – S.K., U.Ü., E.M.Ç.; Analysis and/ or Interpretation – S.K., U.Ü., E.M.Ç., E.A.; Literature Search – S.K., U.Ü., E.M.Ç., E.A.; Writing Manuscript – S.K., U.Ü., E.M.Ç., E.A.; Critical Review – S.K., U.Ü., E.M.Ç., E.A.

Declaration of Interests: The authors declare that they have no competing interest.

Funding: The authors declared that this study received no financial support.

References

- Aboellail, T. A., Naikare, H. K., & Mahapatra, D. (2013). A naturally occurring enterotyphlocolitis associated with dual infection by *Clostridium piliforme* and Enteropathogenic Attaching and Effacing *Escherichia coli* in Syrian Hamsters. *Journal of Veterinary Science & Medicine*, 1(1), 1-7. <https://doi.org/10.13188/2325-4645.1000003>.
- Barnes, K. H., Piripi, S. A., & C. V. Löhr, C. V. (2013). Pathology in practice. Tyzzer's disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 242(6), 765-767. <https://doi.org/10.2460/javma.242.6.765>.
- Borchers, A., Magdesian, K. G., Halland, S., Pusterla, N., Wilson, W. D. (2006). Successful treatment and Polymerase chain reaction (PCR) confirmation of Tyzzer's disease in a foal and clinical and pathologic characteristics of 6 additional foals (1986-2005). *Journal of Veterinary Intern Medicine*, 20, 1212-1218.

- [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2006\)20\[1212:stapcr\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2006)20[1212:stapcr]2.0.co;2).
- Dallenne, C., Costa A. D., Decre, D., Favier, C., Arlet, G. (2010): Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 3, 490-495. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp498.jpg>.
- Fallahi, R., & Mansouri, M. A. (2017). Health monitoring of Razi Institute laboratory mice (NIH strain) to *Clostridium piliforme* in 1395. *Veterinary Researches and Biological Products*, 30 (4), 78-84. <https://doi.org/10.22034/vj.2017.109301.1263>.
- Fingerhood, S., Mendonça, F. S., Uzal, F. A., Marks, S. L., Vernau, K. M., Navarro, M. A., Choi, E. A. (2023). Tyzzer's disease in 19 preweaned orphaned kittens. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 35, 212-216. <https://doi.org/10.1177/10406387231154554>.
- Ganaway, J. R., Allen, A. M., & Moore, T. D. (1971). Tyzzer's disease. *The American Journal Pathology*, 64, 717-730.
- Ganaway, J. R., McReynolda, R. S., Allen, A. M. (1976). Tyzzer's disease in free-living cottontail rabbits (*Sylvilagus floridanus*) in Maryland, *Journal Wild Diseases*, 12, 545-549. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-12.4.545>.
- Ganoe, L. S., Justin, D. B., Yabsley, M. J., Lovallo, M. J., Walter, W. D. (2020). A review of pathogens, diseases, and contaminants of Muskrats (*Ondatra zibethicus*) in North America. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 1-13. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00233>.
- Garcia, J. A., Navarro, M. A., Fresneda, K., Uzal, F. A. (2022). *Clostridium piliforme* infection (Tyzzer's disease) in horses: retrospective study of 25 cases and literature review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 34, 421-428. <https://doi.org/10.1177/10406387211031213>.
- Ikegami, T., Shirota, K., Une, Y., Nomura, Y., Wada, Y., Goto K., Takakura, A., Itoh, T., Fujiwara, K. (1999). Naturally occurring Tyzzer's disease in a calf. *Veterinary Pathology*, 36, 253-255. <https://doi.org/10.1354/vp.36-3-253>.
- Jacobson, S. A., Ferro, P. F., Navarro, M. A., Uzal, F. A., Edwards, E. E. (2022). *Clostridium piliforme* and canine distemper virus coinfection in 2 domestic dog littermates and gray fox kit. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 34, 894-897. <https://doi.org/10.1177/10406387221109899>.
- Neto, R. T., Uzal, F. A., Hodzić, E., Persiani, M., Jolissaint, S., Alcaraz, A., & Carvallo, F. R. (2015). Coinfection with *Clostridium piliforme* and Felid herpesvirus 1 in a kitten. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 27 (4), 547-551. <https://doi.org/10.1177/1040638715593600>.
- Niepceron, A., Licois, D. (2010). Development of a high-sensitivity nested PCR assay for the detection of *Clostridium piliforme* in clinical samples. *The Veterinary Journal*, 185, 222-224. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.05.002>.
- Poonacha, K. B. (1997). Naturally occurring Tyzzer's disease in a serval (*Felis capensis*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 9, 82-84.
- Pritt, S., Henderson, K. S., & Shek, W. R. (2010). Evaluation of available diagnostic methods for *Clostridium piliforme* in laboratory rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Laboratory animals*, 44 (1), 14-19. <https://doi.org/10.1258/la.2009.008079>.
- Rho, J., Parki, H.S., Won, Y. S., Kwun, H. J., Son, H. Y. (2022). Fatal systemic infection of *Clostridium tarantellae* in a wild Korean raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides koreensis*). *Journal of Wildlife Diseases*, 58, 421-424. <https://doi.org/10.7589/JWD-D-21-00007>.
- Sasseville, V. G., Simon, M. A., Chalifoux, L. V., Lin, K. C., & Mansfield, K. G. (2007). Naturally occurring Tyzzer's disease in cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*). *Comparative Medicine*, 57, 125-7.
- Smith, K. J., Skelton, H. G., Hilyard, E. J., Hadfield, C. T., Moeller, R. S., Tuur, S., Decker, C., Wagner, K. F., Angritt, P. (1996). *Bacillus piliformis* infection (Tyzzer's disease) in a patient infected with HIV-1: Confirmation with 16S ribosomal RNA sequence analysis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 34, 343-348. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(07\)80005-3](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(07)80005-3).
- Tao, J., Yan, H., Chen, S., Du J., Zhou, S., Guo, H., Lu, L., Fang, J., Jin, X., Wang, Z., Ying, H., Han, W., Dai, F. (2024). Establishment and application of a loop-mediated isothermal amplification lateral flow dipstick (LAMP-LFD) method for detecting *Clostridium piliforme*. *Veterinary Medicine and Science*, 10, 1-12. <https://doi.org/10.1002/vms3.1318>.
- Waner, T., Cohen, O., & Anug, A. M. (2005). Rosner A. An epizootic of Tyzzer's disease in rabbits in Israel. *Israel Journal Veterinary Medicine*, 60, 63-6.
- Weisbroth, S. H., Peters, R., Riley, L. K., Shek, W. (1998). Microbiological assesment of laboratory rats and mice. *Institute of Laboratory Animal Resources Journal*, 39, 272-290. <https://doi.org/10.1093/ilar.39.4.272>.
- Young, J. K., Baker, D. C. & Burney, D. P. (1995). Naturally occurring Tyzzer's disease in a puppy. *Veterinary pathology*, 32, 63-65. <https://doi.org/10.1177/03009858950320>.

Konvansiyonel Laboratuvar Hayvan Tesisinde, Aktif Kullanım Süresince, Mekanlar Arasındaki Fiziksel Şartlarda Farklılık Var Mıdır?

In Conventional Laboratory Animal Facility, Is There a Difference in Physical Conditions Between Spaces During Active Use?

Hatice Zeynep KOŞAR¹

Osman YILMAZ²



¹ Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı, Balçova, İzmir, Türkiye.

² Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı, Balçova, İzmir, Türkiye.



Öz

Laboratuvar hayvan tesislerinde fiziksel şartların standardizasyonu deneysel hayvan araştırmalarının tekrarlanabilirliği açısından bir zorunluluktur. Laboratuvar hayvan tesislerindeki fiziksel şartların hayvanların fizyolojileri ve davranışları üzerine etkisinden dolayı deneysel araştırmaların sonuçları da etkilenir. Bu çalışma konvansiyonel bir deney hayvanı üretim ve araştırma tesisinde, laboratuvarın aktif kullanım süresi içinde mekanlar arasındaki sıcaklık, nem, ışık şiddeti ve gürültü seviyesi gibi fiziksel farklılıkları ortaya koymak amacıyla yürütülmüştür. Bu çalışma için laboratuvarında hayvanlarının buldukları ortamların fiziksel koşulları haftanın iş günlerinde ve günlük döngününün 12 saatlik gündüz periyodunda laboratuvarın aktif çalışma saatleri arasında (7:00-19:00) dört hafta boyunca ölçülmüştür. Elde edilen verilerin istatistiksel analiz sonuçları Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Kılavuzu ile Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar İçin Kullanılan Hayvanların Refah ve Korunmasına Dair Yönetmeliğin Uygulama Talimatında belirtilen yasal standartlara uygun olduğu belirlenmiştir. Ancak koridorlarda, operasyon ve post-operatif bakım odalarında ölçülen ışık yoğunluğu ve gürültü seviyeleri yasal sınırlar içinde kalsa da hayvan barınma odalarından daha yüksektir. Bunun yanında koridor ve operasyon odasında sıcaklık ve nem, hayvan bakım odaları ve post operatif bakım odasından daha düşük seyretmektedir. Koridor, operasyon, post operatif bakım odalarının ölçüm değerlerinin mümkün olduğunca hayvan barındırma odalarının ölçüm değerlerine yaklaştırılarak mekanlar arasındaki farkın en aza indirilmesi, hem hayvan refahının ve standardizasyonun sağlanması, hem de hayvanların biyolojik yapıları açısından oldukça önemlidir. Mekanlar arasındaki fiziksel değişikliklerin, araştırma sonuçlarına yansımaları nedeniyle, tekrarlanabilirlik ilkesine uymadığından araştırma güvenliğini tehlikeye düşürebilmektedir.

Anahtar kelimeler: Hayvan laboratuvarı ortam şartları, hayvan refahı, ortam standardizasyonu.

ABSTRACT

Standardization of physical conditions in laboratory animal facilities is a necessity for the reproducibility of experimental animal research. The results of experimental research are also affected due to the effect of physical conditions in laboratory animal facilities on the physiology and behavior of animals. This study was conducted in a conventional laboratory animal production and research facility to reveal physical differences such as temperature, humidity, light intensity and noise level between spaces during the active use period of the laboratory. For this study, the physical conditions of the animals' environments in the laboratory were measured for four weeks, on working days of the week and during the 12-hour day period of the daily cycle, during the active working hours of the laboratory (7:00-19:00). The statistical analysis results of the data obtained have been determined to comply with the legal standards specified in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Implementation Instruction of the Regulation on the Welfare and Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. However, although the light intensity and noise levels measured in corridors, operation and post-operative care rooms remain within legal limits, they are higher than in animal housing rooms. In addition, the temperature and humidity in the corridor and operation room are lower than in the animal care rooms and post-operative care room. It is very important to minimize the difference between spaces by bringing the measurement values of corridor operation and post-operative care rooms as close as possible to the measurement values of animal housing rooms, both in terms of ensuring animal welfare and standardization and in terms of biological structures of animals. Since physical changes between locations are reflected in the research results, it may endanger research security as it does not comply principle of repeatability.

Keywords: Animal laboratory environmental conditions, animal welfare, environmental standardization.

Geliş Tarihi/Received :14.02.2024

Kabul Tarihi/Accepted :06.05.2024

Yayın Tarihi/Publication Date :19.09.2024

Sorumlu Yazar/Corresponding author:

Hatice Zeynep Koşar

E-mail: haticezeynepkosar@yahoo.com.tr

Cite this article: Koşar H.Z., Yılmaz O.

(2024). In Conventional Laboratory Animal Facility, Is There a Difference in Physical Conditions Between Spaces During Active Use? *Journal of Laboratory Animal Science and Practices*, 4(2), 83-90.



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License.

Giriş

Deneysel hayvan araştırmalarında mekânın fiziksel özellikleri sıcaklık, nem, ışık şiddeti ve gürültü seviyesi laboratuvar ortam şartlarını ifade etmektedir. Hayvan deneylerinin standartlaştırılması; çalışmalarda kullanılacak hayvanların çevresel ve deneysel koşullarının kontrol altına alınması anlamına gelir. Deneysel çalışmaların sonuçları deneyde kullanılan hayvanların barınma koşulları ile bireysel özelliklerine bağılı olup sadece uygulanan deney koşullarında ve araştırmanın yapıldığı çevre ile aynı özellikleri sağılayan çalışma ortamı için geçerlidir. Yani laboratuvar hayvanı tesislerinin koşullarının standardizasyonu, hayvanın ihtiyaçlarının karşılanmasını garanti altına almakla kalmaz aynı zamanda deney sonuçlarının da güvenilirliğini sağılamış olur. Araştırma verilerinin güvenilirliği ve kalitesi, bilimsel çalışmalarda kullanılan her tür hayvan için en uygun çevresel koşulların belirlenmesine odaklanmıştır. Dünyadaki ülkelerin büyük çoğunluğunda hayvanların kullanımına ilişkin mevzuatın temelini bu veriler oluşturmaktadır (Parker vd., 2022).

Laboratuvar hayvanlarının bakım ve kullanım kılavuzunun mevcut 2011 baskısında kemirgen odalarında ortam sıcaklığının (20-26 °C), bağılı nem aralığının %30 ile %70, oda ışık şiddetinin 130-325 lüks, oda gürültü seviyesinin maksimum 85 dB olması gerektiği belirtilmektedir (National Research Council Committee., 2011). Ülkemizdeki yasal düzenlemelerde laboratuvar hayvan tesislerinde, kemirgenlerin bulunduğu odalardaki ışık şiddetinin 130-325 lüks, sıcaklığın 20°C ile 24°C, nispi nemin %45 ile %65 aralığında olmasının gerektiği belirtilmiştir. Ayrıca ses seviyesinin en fazla 85 dB olması ve laboratuvar teçhizatlarının neden olduğu gürültünün 20 kHz'den yüksek olmaması şarttır (Resmî Gazete, 2012). Deneysel hayvan çalışmalarında tüm önemli değışkenlerin mümkün olduğunca kontrol edilmesi gerekmektedir. Bilimsel çalışmaların güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği ancak bu şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Aynı zamanda laboratuvar hayvanlarının refahının kalitesi, inkâr edilemez bir şekilde hayvanlardan elde edilen bilimsel sonuçların kalitesiyle bağılantılıdır (Marx vd., 2021).

Sıcaklık ve nem, dalgalanmaları laboratuvar hayvanlarında strese neden olduğu için hayvan refahını da olumsuz yönde etkilemektedir. Aslında, birçok çalışmada strese maruz kalan farelerin plazmasında ve adrenal bezlerinde kortizol artmaktadır. Tüm memeliler, herhangi bir çevresel zorlukla karşılaştıklarında uyum sağılamak ve hayatta kalmak için hipotalamik-hipofiz-adrenal (HPA) ekseninin aktivasyonuna

ihtiyaç duyarlar. Bu anahtar nöroendokrin sistem, stres faktörlerine tepki olarak hipotalamustaki nöronlar tarafından aktive edilir ve glukokortikoidler (GC) (GC'ler; insanlarda kortizol veya sıçanlarda ve farelerde kortikosteron (CORT)) adrenal korteks tarafından salgılanır. GC'ler de stres etkeninin neden olduğu bu tür yükselmeler sonuçta hayvanın refahına yönelik tehditlere karşı ilk müdahaleci olarak hizmet eder. Kortizol hormonu vücudun strese verdiği tepkiyi düzenleyen, kan basıncını ve kan şekerini artırarak bağışıklık sistemini baskılayan bir hormondur. Kortizol, hayvanın hayatı için büyük önem taşır. Ayrıca vücudun tüm mekanizmasını çalıştıran bir alarm durumunun habercisi olarak da bilinir. Stresin hipotalamus-hipofiz-adrenal (HPA) ekseninin aktivitesini arttırdığı ve adrenal korteksten kortikosteroid salgısının artmasına neden olduğu bilinmektedir. Kortizol ve kortikosteron bu nedenle sıklıkla stres ve depresif bozukluklar için biyobelirteçler olarak ifade edilir (Texada vd., 2020). Bu hormonal değışiklikler hayvan refahını etkilediği gibi, çalışma sonuçlarını da etkilemektedir. Sıçanlarda düşük bağılı nem, özellikle aşırı sıcaklıklarla birleştiğinde kuyruk ve bazen ayak parmaklarında iskemik nekroz içeren halka kuyruğuna yol açabilir (Crippa vd., 2000). Kemirgen izolasyon kafeslerinde yüksek mikro-ortam bağılı nem aynı zamanda yüksek kafes içi amonyak konsantrasyonlarına da sebep olabilir. (Baumans vd., 2002).

Laboratuvar şartlarının temel bileşenlerinden biri olan ışık, sirkadiyen ritmin düzenleyicilerinin başında gelir. Vücut sıcaklığı, lokomotor aktivite, uyku, bazı hormonların salgılanması gibi çeşitli fizyolojik sistem ve davranışlar, sirkadiyen sistem adı verilen 24 saatlik bir döngü tarafından yönetilir. Sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde rol oynayan pek çok dış uyaran olsa da, en güçlü çevresel uyaran günlük aydınlık-karanlık döngüsüdür (Weng vd., 2013; Emmer vd., 2018; Hanifin vd., 2020). Işık yoğunluğundaki küçük değışiklikler bile hayvanın nörodavranışsal, nöroendokrin, metabolik ve fizyolojik parametrelerinin sirkadiyen düzenlemesini değıştirebilir veya bozabilir. Bir hayvan tesisinde yanlış aydınlatma protokolleri sadece bilimsel araştırma sonuçlarını etkilemekle kalmaz, aynı zamanda hayvan modellerinin iyileştirilmesi ve biyomedikal araştırmalarda kullanılan hayvan sayısının azaltılmasını da olumsuz yönde etkiler (Sato vd., 2017).

Araştırmalarda kullanılan memelilerin %90 'dan fazlasını oluşturan kemirgenler frekans duyarlılığına sahip hayvanlardır. Fareler ve sıçanlar 100K Hz'e kadar veya buna yaklaşan ultrasonik aralığı duyabilirken, insanlar yalnızca yaklaşık 20K Hz frekansa kadar olan sesleri algılayabilirler

(Malakoff, 2000). Gürültünün kemirgenlerin fizyolojisi ve davranışları üzerindeki etkisi yaygın olarak bilinmektedir. Bu durum sıkıntı, stres üreme verimliliğinin azalmasına ve odyojenik nöbetlere kadar değişebilir. Gürültü seviyesindeki dalgalanmalar araştırma sonuçlarına deneysel olmayan değişkenlik getirebilir veya kemirgenlerin sağlığını olumsuz yönde etkileyebilecek potansiyel bir stres etkeni oluşturabilir (Atanasov vd., 2015). Yüksek kortizol seviyeleri kemirgenlerde çeşitli olumsuz etkilere neden olabileceği için hayvan refahını da ciddi şekilde etkilemektedir.

Çalışma konvensiyonel hayvan laboratuvarı tesislerindeki farklı mekanların fiziksel şartlarının optimizasyonu için yapılmıştır. Konvensiyonel hayvan tesisi genel olarak açık kafes (open cage) olarak nitelenmektedir.

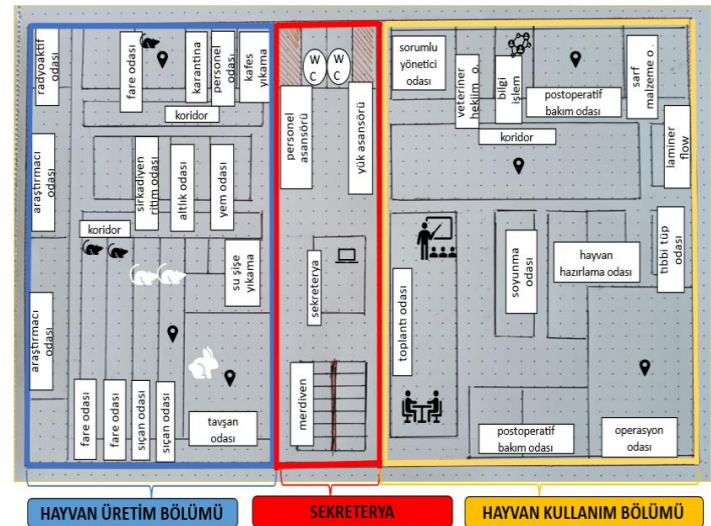
Yöntemler

Çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisipliner Deneysel Hayvanları Laboratuvarının sorumlusunun bilgisi dahilinde gerçekleştirilmiştir. Hayvanlar standart laboratuvar koşullarında, 12:12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsü (07:00 açık/19:00 kapalı) ile barındırılmaktadırlar. Hayvanların standart yeme ve suya ad libitum olarak erişimleri sağlanmaktadır. Haftanın iş günlerinde ve günlük döngünün 12 saatlik gündüz periyodunda laboratuvarın aktif çalışma saatleri arasında (07:00-19:00) hayvanların buldukları ortamların fiziksel koşulları ölçülmüştür. Öncelikle hayvanların bulundurulduğu ortamlar belirlenmiş ve 6 farklı oda (tavşan odası, sıçan odası, fare odası, koridor, operasyon odası ve postoperatif bakım odası) değerlendirmeye alınmıştır. Çalışma 6.11.2023 ile 01.12.2023 arasındaki dört haftalık sürede gerçekleştirilmiştir. Ölçümler odanın ortasından, yerden bir metre yükseklikten birer saat ara ile yapılmıştır. Konvensiyonel hayvan laboratuvarında değerlendirmeye alınan odalar ve ölçüm noktaları Şekil 1'de gösterilmektedir.

Tüm ölçümler Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisipliner Konvensiyonel Deneysel Hayvanları Laboratuvarında yapılmıştır. Her odada 12/12 saat aydınlık/ karanlık döngüsü uygulanmıştır. Hayvan odaları ile koridora çıkış arasında kontrollü kapı uygulaması vardır. Diğer odalar (operasyon ve post operatif bakım odası) koridor üzerine personel ofislerine ve malzeme depolama alanı olarak kullanılan bir odaya da yakındır.

Veri kaydetmek için profesyonel 'Multi-Fonksiyon Environment Metre' cihazı kullanılmıştır. Cihaz kalibre

edildikten sonra bu işlem için kullanılmıştır.



Şekil 1. Konvensiyonel hayvan laboratuvarı planı

Figure 1. Conventional animal laboratory plan

İstatistiksel Yöntem

Deneysel verilerinin değerlendirilmesinde (tavşan, sıçan, fare, operasyon, post operatif bakım odaları ve koridor için aldığımız gürültü şiddeti, ses seviyesi, sıcaklık ve nem verilerinin istatistiksel analizleri SPSS programının 29.0 sürümü kullanılarak yapılmıştır.

Odaların (ışık, gürültü, sıcaklık, nem) ölçümleri normal dağılım göstermediği için her bir parametrenin odalar arası farklılığının anlamlı olup olmadığının analizi Kruskal Wallis testi ile yapılmıştır. Sonuçlarda anlamlı farklılıklar olduğu Hipotez Testleri Özet Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Hipotez Testleri Özet

Table 1. Hypothesis Testing Summary

	Sıfır Hipotezi	Test	Sig. a,b	
1	Işık dağılımı, odalar kategorisinde aynı	Bağımsız örnekler kruskal wallis testi	<.001	Ho Reddet
2	Gürültü dağılımı, odalar kategorisinde aynı	Bağımsız örnekler kruskal wallis testi	<.001	Ho Reddet
3	Sıcaklık dağılımı, odalar kategorisinde aynı	Bağımsız örnekler kruskal wallis testi	<.001	Ho Reddet
4	Nem dağılımı, odalar kategorisinde aynı	Bağımsız örnekler kruskal wallis testi	<.001	Ho Reddet
Anlamlılık Düzeyi ,050				

Farklılıkların hangi ikili gruplar arasında olduğu sonucunu elde etmek için post-hoc testleri gerçekleştirilmiş elde edilen sonuçlar aşağıdaki Tablo 2,3,4,5'de gösterilmiştir.

Bulgular

Işık şiddeti: Laboratuvar tesisindeki seçilmiş olan mekanların oda ışık şiddetleri Tablo 2' de verilmiştir. Tablo 2'de görüldüğü gibi hayvan odaları ile koridor, operasyon ve postoperatif bakım odaları arasında yapılan ışık şiddeti karşılaştırmalarında medyan değerlerine bakıldığında en düşük ışık şiddeti hayvan odalarında, en yüksek olarak da operasyon odasında görülmektedir. Buna göre yapılan istatistiksel analizde tüm mekanların kendi içerisinde ışık şiddeti açısından anlamlı farklılık gösterdiği görülmektedir. Bu anlamlı farklılık yasal sınırlar içerisinde olmakla birlikte koridor, operasyon ve post operatif bakım odalarında ölçülen ışık şiddetinin, hayvan barınma odalarından daha yüksek olduğu bulunmuştur.

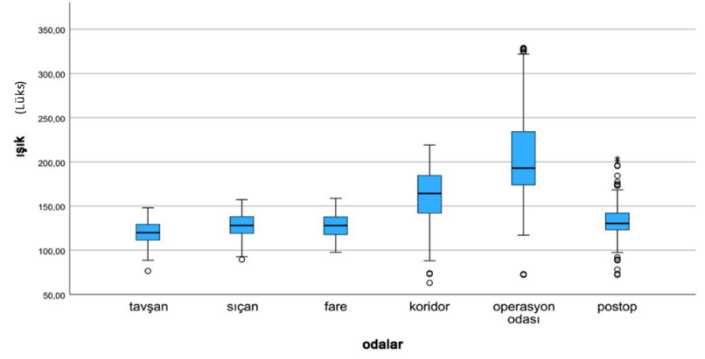
Tablo 2. Işık şiddeti post hoc karşılaştırılan gruplar

Table 2. Light intensity post hoc compared groups

oda	medyan (IQR)	P	Karşılaştırılan ikili gruplar	pposthoc
1	119,9 (18,08)	0.001<	fare-siçan	1
			fare-tavşan	0.001<
2	128,0 (19,00)		fare-koridor	0.001<
			fare-operasyon	0.001<
3	127,9 (20,13)		fare-postop	0.001<
			siçan-tavşan	0.001<
4	164,2 (42,75)		siçan -koridor	0.001<
			siçan-operasyon	0.001<
5	192,8 (60,90)		siçan-postop	0.001<
			tavşan-koridor	0.001<
6	130,8 (19,05)		tavşan-operasyon	0.001<
			tavşan-postop	0.001<
			koridor-operasyon	0.001<
			koridor-postop	0.001<
		operasyon-postop	0.001<	

*1-tavşan, 2-siçan, 3-fare, 4- koridor, 5-operasyon odası, 6-post operatif bakım odası

Odalar arası ışık şiddetinin karşılaştırılması Şekil 2'de verilmektedir. Bu grafikte de anlaşılacağı üzere ışık şiddetinin operasyon odasında en yüksek, hayvan barınma odalarında en düşük olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 2. Işık ölçüm dağılım grafiği

Figure 2. Light measurement scatter plot

Gürültü seviyesi: Laboratuvar tesisindeki seçilmiş olan mekanların oda gürültü seviyesi Tablo 3'te verilmiştir. Hayvan odaları ile koridor, operasyon ve postoperatif bakım odaları arasında yapılan gürültü seviyesi karşılaştırmalarında medyan değerlere bakıldığında, en düşük gürültü seviyesi hayvan odalarında, en yüksek gürültü seviyesi operasyon odasında ölçülmüştür. Buna göre yapılan istatistiksel analizde tüm mekanların kendi içerisinde ışık şiddeti açısından anlamlı farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Bu anlamlı farklılık yasal sınırlar içerisinde olmakla birlikte koridor, operasyon ve post operatif bakım odalarında ölçülen gürültü seviyesinin, hayvan barınma odalarından daha yüksek olduğu saptanmıştır.

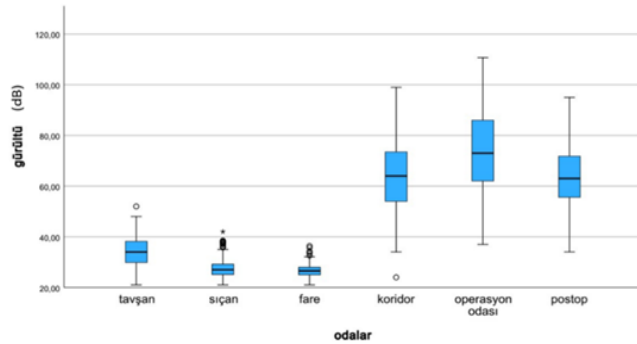
Tablo 3. Gürültü seviyesi post hoc karşılaştırılan gruplar

Table 3. Noise level post hoc compared groups

oda	medyan (IQR)	P	Karşılaştırılan ikili gruplar	pposthoc
1	34,0 (8,38)	0.001<	fare-siçan	1
			fare-tavşan	0.001<
2	27,0 (4,10)		fare-koridor	0.001<
			fare-operasyon	0.001<
3	26,55 (2,95)		fare-postop	0.001<
			siçan-tavşan	0.001<
4	64,0 (19,75)		siçan -koridor	0.001<
			siçan-operasyon	0.001<
5	73,0 (24,0)		siçan-postop	0.001<
			tavşan-koridor	0.001<
6	63,0 (16,60)		tavşan-operasyon	0.001<
			tavşan-postop	0.001<
			koridor-operasyon	0.001<
			koridor-postop	1
		operasyon-postop	0.001<	

*1-tavşan, 2-siçan, 3-fare, 4- koridor, 5-operasyon odası, 6-post operatif bakım odası

Odalar arası gürültü seviyesi karşılaştırılması Şekil 3' te verilmektedir. Bu grafikten de anlaşılacağı üzere gürültü seviyesi operasyon odasında en yüksek, hayvan barınma odalarında en düşük olarak ölçülmüştür.



Şekil 3. Gürültü ölçüm dağılım grafiği
Figure 3. Noise measurement scatter plot

Sıcaklık: Laboratuvar tesisindeki seçilmiş olan mekanların sıcaklık değerleri Tablo 4' te verilmiştir. Hayvan odaları ile koridor, operasyon ve postoperatif bakım odaları arasında yapılan sıcaklık karşılaştırmalarında medyan değerlerine bakıldığında en düşük sıcaklığın koridor ve operasyon odasında olduğu tespit edilmiştir. Buna göre yapılan istatistiksel analizde tüm mekanların kendi içerisinde sıcaklık açısından anlamlı farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Bu anlamlı farklılık yasal sınırlar içerisinde olmakla birlikte, koridor ve operasyon odasında ölçülen sıcaklık değerinin hayvan barınma odalarından daha düşük olduğu bulunmuştur.

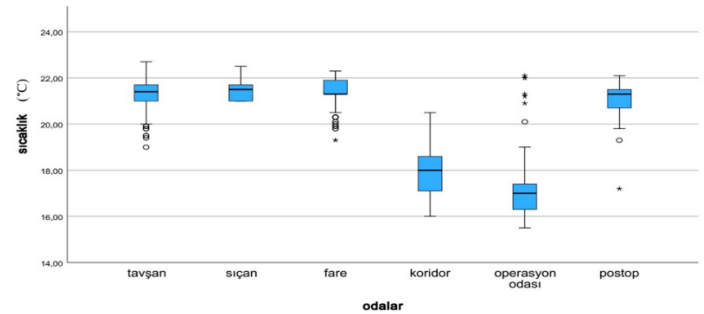
Tablo 4. Sıcaklık post hoc karşılaştırılan gruplar

Table 4. Temperature post hoc compared groups

oda	medyan (IQR)	P	Karşılaştırılan ikili gruplar	pposthoc
1	21,40 (,70)	0.001<	fare-sıçan	1
			fare-tavsan	1
2	21,50 (,70)		fare-koridor	0.001<
			fare-operasyon	0.001<
3	21,30 (,60)		fare-postop	0.001<
			sıçan-tavsan	0.001<
4	18,0 (1,50)		sıçan-koridor	0.001<
			sıçan-operasyon	0.001<
5	17,0 (1,10)		sıçan-postop	0.001<
			tavsan-koridor	0.001<
6	21,30 (,80)		tavsan-operasyon	0.001<
			tavsan-postop	0.001<
		koridor-operasyon	0.001<	
		koridor-postop	0.001<	
		operasyon-postop	0.001<	

*1-tavsan, 2-sıçan, 3-fare, 4- koridor, 5-operasyon odası, 6-post operatif bakım odası

Odalar arası sıcaklık değerleri karşılaştırılması Şekil 4' te verilmektedir. Bu grafikten de anlaşılacağı üzere sıcaklık değerleri operasyon odasında ve koridorda en düşük olarak ölçülmüştür.



Şekil 4. Sıcaklık ölçüm dağılım grafiği

Figure 4. Temperature measurement scatter plot

Nem: Laboratuvar tesisindeki seçilmiş olan mekanların oda nem değerleri Tablo 5' te verilmiştir. Oda karşılaştırmalarında medyan değerlere bakıldığında en düşük nem oranı koridor ve operasyon odasında ölçülmüştür. Buna göre yapılan istatistiksel analizde tüm mekanların nem açısından anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Hayvan odaları ve postoperatif bakım odasının nem oranı, koridor ve operasyon odasından daha düşük olarak saptanmıştır.

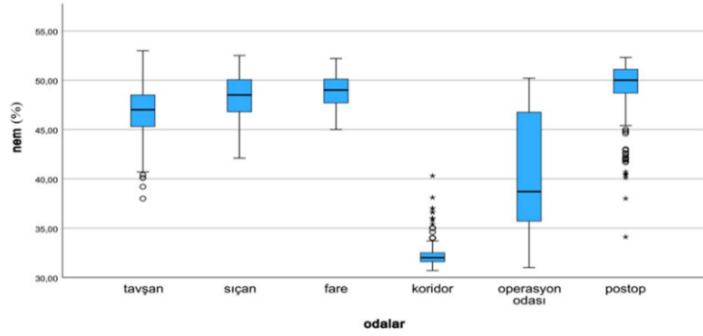
Tablo 5. Nem post hoc karşılaştırılan gruplar

Table 5. Humidity post hoc compared groups

oda	medyan (IQR)	P	Karşılaştırılan ikili gruplar	pposthoc
1	47,0 (3,30)	0.001<	fare-sıçan	0.001<
			fare-tavsan	0.001<
2	48,50 (3,28)		fare-koridor	0.001<
			fare-operasyon	0.001<
3	49,0 (2,40)		fare-postop	0.001<
			sıçan-tavsan	0.001<
4	32,0 (,95)		sıçan-koridor	0.001<
			sıçan-operasyon	0.001<
5	38,70 (11,10)		sıçan-postop	0.001<
			tavsan-koridor	0.001<
6	50,0 (2,40)		tavsan-operasyon	0.001<
			tavsan-postop	0.001<
		koridor-operasyon	0.001<	
		koridor-postop	0.001<	
		operasyon-postop	0.001<	

*1-tavsan, 2-sıçan, 3-fare, 4- koridor, 5-operasyon odası, 6-post operatif bakım odası

Odalar arası nem karşılaştırılması Şekil 5' te verilmektedir. Bu grafikten de anlaşılacağı üzere en düşük nem koridor ve operasyon odasında ölçülmüştür.



Şekil 5. Nem ölçüm dağılım grafiği

Figure 5. Humidity measurement scatter plot

Tartışma

Laboratuvar hayvanları için barınma koşulları, tüm dünyada hayvan tesisleri arasında belli standartlarla sağlanmaktadır. Laboratuvar kemirgenleri, tesisin farklı bölümlerinde belli sürelerde konumlanmak durumunda kalmaktadırlar. Barınma odalarında yetiştirilir, koridordan geçerek operasyon odalarına ve prosedürlerin özelliğine göre operasyon sonrası yoğun bakım odalarında bulunmaktadır. Hayvanların bu farklı mekanlarda uzun süre kalıyor olmaları, biyolojilerini değiştirebilir.

Işık seviyesi; laboratuvar hayvanlarının bakım ve kullanım kılavuzunda oda ışık şiddetinin 130-325 lüks arasında olması gerektiği belirtilmektedir. Ülkemizdeki yasal düzenlemelerde de laboratuvar hayvan tesislerinde, kemirgenlerin bulunduğu odalardaki ışık şiddeti 130-325 lüks olarak belirtilmektedir. Laboratuvar tesisinde hayvan odaları ile koridor, operasyon ve postoperatif bakım odaları arasında yapılan ışık şiddeti karşılaştırmalarında medyan değerlerine bakıldığında en düşük ışık şiddeti hayvan odalarında (tavşan odası 119,9 lüks, sıçan odası 128 lüks, fare odası 127,9 lüks) olarak ölçülmüştür. En yüksek ışık şiddeti (192,8 lüks) olarak operasyon odasında ölçülmüştür. Tüm mekanların kendi aralarında ışık şiddeti açısından anlamlı farklılık gösterdiği ve bu farklılığın yasal sınırlar içerisinde olmasına rağmen koridor, operasyon ve post operatif bakım odalarında ölçülen ışık şiddetinin hayvan barınma odalarından daha yüksek olarak ölçüldüğü tespit edilmiştir. Çevresel ışık kalitesi sirkadiyen ritim üzerinde önemlidir ve dolayısıyla hayvanın refahını etkilemektedir. Bu nedenle hayvan tesislerinde mekanlar arasında ışık şiddeti yakından izlenmelidir. Bir laboratuvar tesisinde uygun olmayan aydınlatma sistemleri, hayvan için stres

kaynağı olmasının yanı sıra deneysel çalışmalarda da önemli bir değişkendir (Hanifin vd., 2020).

Gürültü seviyesi; ulusal ve uluslararası mevzuatlarda oda gürültü seviyesinin maksimum 85 dB olması gerektiği belirtilmektedir. Çalışmada gürültü seviyesi karşılaştırmalarında medyan değerlerine bakıldığında hayvan odaları gürültü değerleri 34 dB, 27 dB, 25,55 dB; koridor, operasyon ve postoperatif bakım odaları 64 dB, 73 dB, 63 dB olarak ölçülmüştür. Sonuç olarak, hayvanlar tesis içinde 85 dB sınırını aşmamış olsalar da barındıkları oda dışına çıkarıldıklarında orta düzeyde (65 dB'den az) gürültüye maruz kaldıkları ortaya çıkmıştır. Operasyon odalarında oluşan gürültünün çoğunun, normal çalışma saatleri sırasındaki insan faaliyetlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu bulgu, ortam gürültüsünün çoğunun ya tesis içindeki personelden kaynaklandığını ya da hayvanların tesis içindeki personele tepki vermesinin bir sonucu olduğunu ortaya koyan önceki araştırmalarla tutarlıdır (Turner vd., 2005).

Sıcaklık; çalışmada hayvan odaları ile koridor, operasyon ve postoperatif bakım odaları arasında yapılan sıcaklık karşılaştırmalarında medyan değerlerine bakıldığında en düşük sıcaklık (17-18 °C) koridor ve operasyon odasında ölçülmüştür. Laboratuvar hayvanlarının bakım ve kullanım kılavuzunda kemirgen odalarında ideal ortam sıcaklığının 20-26 °C olmasının gerektiği belirtilmektedir. Ulusal yasal mevzuatta da sıcaklık 20°C ile 24°C olarak belirtilmektedir. Laboratuvar hayvanları, sınırlı vücut yüzey alanları nedeniyle termoregülasyondaki değişikliklere karşı oldukça duyarlı türlerdir. Bu nedenle ortam sıcaklıkları sabit tutulmak zorundadır (Liu & Fan, 2018). Kemirgenler için belirlenen 20–26 °C kuru termometre sıcaklıkları geniş kapsamlıdır ve davranışsal termoregülasyon için yeterli kaynaklarla barındırılmaları koşuluyla, sıcaklıklar normalde bu aralıkların ortasına yakın minimum dalgalanmayla seçilmeli ve korunmalıdır (Brainard & Hanifin, 2005). Hayvanın sıcaklığı termal stresin (soğuk veya sıcak) etkisiyle değişirse bunu metabolik, kardiyovasküler, solunumsal ve immünolojik değişiklikler takip edecektir (Tan & Knight, 2018).

Nem; laboratuvar hayvanlarının bakım ve kullanım kılavuzunda bağıl nem oranının %30 ile %70 aralığında, ulusal mevzuatta ise nem oranı %45 ile %65 aralığında olması gerektiği belirtilmektedir. Çalışmada oda karşılaştırmalarında medyan değerlerine bakıldığında en düşük nem oranı koridor (%32) ve operasyon odasında

(%38,7) olarak ölçülmüştür. Nem oranı hayvan odaları ve postoperatif bakım odası ölçümlerine göre koridor ve operasyon odasında daha düşük olup ölçüm sonuçları uluslararası mevzuata uygun olduğu halde ulusal mevzuatın altındadır. Daha önce yapılan çalışmalarda, farelerin düşük nem koşullarına maruz kalmasının, onları grip hastalığına karşı daha duyarlı hale getirdiği belirtilmiştir. Kuru havada barındırılan farelerde mukosilyer klirens, doğuştan antiviral savunma ve doku onarım fonksiyonunu bozulmuştur (Dauchy vd., 2016). Yüksek nemde barındırılan farelerde eklem şişmesi, iltihaplanma ve tahribat daha sonra oto antikorlarda artış görülmüştür (Wang vd., 2021)

Sonuç

Konvensiyonel hayvan laboratuvarının ölçüm yapılan 6 farklı odasının (tavşan odası, sıçan odası, fare odası, koridor, operasyon odası ve postoperatif bakım odası) sıcaklık, nem, ışık şiddeti ve gürültü seviyesi değerleri ulusal ve uluslararası rehberlerde (guide) belirtilen sınırlar içerisinde yer aldığı belirtilmiştir. Bununla birlikte sıcaklık, nem, ışık şiddeti ve gürültü seviyesi marjı geniş olduğu için mekanlar arası farklılıklar bulunmuştur. Bu farklılığın en büyük sebebi hayvan barınma odalarının fiziksel şartlarının, diğer mekanlara göre daha iyi kontrol edilebilmesidir. Laboratuvar tesisleri planlanırken hayvan odalarının fiziksel şartları göz önüne bulundurulmalıdır. Tesis oluşturan diğer tüm odalar hayvan odalarının fiziksel şartlarıyla uyumlu olacak şekilde dizayn edilmelidir. Hayvanların mekanlar arası geçiş yaptığı sırada, buralarda minimum sürede tutulması sağlanmalıdır. Eğer uzun süre tutulacaklarsa da hayvanların biyolojik sistemlerinin etkilenebileceği için araştırma sonuçlarındaki tutarsızlıklarda bu konunun göz önünde bulundurulması gerekir. Dolayısıyla laboratuvar hayvan tesisleri tasarlanırken, hayvan refahı değerlendirilirken ve deneysel çalışmalar yapılırken hayvanların mekanlar arası veya tesisler arası nakilleri gerçekleştirilirken bu faktörler mutlaka dikkate alınmalıdır. Çalışmanın sonucunda mekanlar arası fiziksel farklılıklar ortaya konulmuştur. Bu farklılıklar standartlar kapsamında olsa da hayvanların biyolojisi ve refahı üzerine ayrı bir çalışma yapılması gereksinimini doğurabilir. Bu gereksinim hayvan çalışmaları ile kan parametreleri hormon seviyeleri, davranış çalışmaları yapılarak ortaya konulabilir.

Finansal Destek: Yazarlar, bu çalışma için finansal destek almadığını beyan etmiştir.

Author Contributions: Concept- H.Z.K, O.Y.; Design – H.Z.K; Supervision O.Y.; Resources - H.Z.K; Data Collection and/or Processing – H.Z.K; Analysis and/or Interpretation– H.Z.K; Literature Search– H.Z.K; Writing Manuscript– H.Z.K; Critical Review–O.Y.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

Kaynaklar

- Atanasov, N. A., Sargent, J. L., Parmigiani, J. P., Palme, R., & Diggs, H. E. (2015). Characterization of train-induced vibration and its effect on fecal corticosterone metabolites in mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 54(6), 737-744. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4671789/>.
- Baumans, V., Schlingmann, F., Vonck, M., & Lith, H. (2002). Individually ventilated cages: beneficial for mice and men? *Contemporary topics in laboratory animal science / American Association for Laboratory Animal Science*, 41(1):13-9.
- Brainard, G. C., & Hanifin, J. P. (2005). Photons, clocks, and consciousness. *Journal of Biological Rhythms*, 20(4), 314-325. <https://doi.org/10.1177/0748730405278951>.
- Crippa, L., Gobbi, A., Ceruti, R. M., Clifford, C. B., Remuzzi, A., & Scanziani, E. (2000). Ringtail in suckling Munich Wistar Fromter rats: a histopathologic study. *Comparative Medicine*, 50(5), 536-539.
- Dauchy, R. T., Wren-Dail, M. A., Hoffman, A. E., Hanifin, J. P., Warfield, B., Brainard, G. C., Hill, S. M., Belancio, V. P., Dauchy, E. M., & Blask, D. E. (2016). Effects of daytime exposure to light from blue-enriched light-emitting diodes on the nighttime melatonin amplitude and circadian regulation of rodent metabolism and physiology. *Comparative Medicine*, 66(5), 373-383. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5073062/>.
- Emmer, K. M., Russart, K. L. G., Walker, W. H., Nelson, R. J., & DeVries, A. C. (2018). Effects of light at night on laboratory animals and research outcomes. *Behavioral neuroscience*, 132(4), 302-314. <https://doi.org/10.1037/bne0000252>.
- Hanifin, J. P., Dauchy, R. T., Blask, D. E., Hill, S. M., & Brainard, G. C. (2020). Relevance of electrical light on circadian, neuroendocrine, and neurobehavioral regulation in laboratory animal facilities. *ILAR Journal*, 60(2), 150-158. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilaa010>.
- Liu, E. qi, & Fan, J. lin. (2018). *Fundamentals of laboratory animal science*. CRC press.
- Malakoff, D. (2000). The rise of the mouse, biomedicine's

Yazar Katkıları: Fikir - H.Z.K, O.Y.; Tasarım – H.Z.K; Denetleme O.Y.; Kaynaklar - H.Z.K; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi – H.Z.K ; Analiz ve/veya Yorum – H.Z.K; Literatür Taraması – H.Z.K; Yazıyı Yazan – H.Z.K; Eleştirel İnceleme – O.Y

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan etmiştir.

- model mammal. *Science*, 288(5464), 248-253. <https://doi.org/10.1126/science.288.5464.248>.
- Marx, J. O., Jacobsen, K. O., Petervary, N. A., & Casebolt, D. B. (2021). A survey of laboratory animal veterinarians regarding mouse welfare in biomedical research. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, 60(2), 139-145. <https://doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-20-000063>.
- National Research Council Committee. (2011). Guide for the care and use of laboratory animals (8th edition). US. <https://doi.org/PMID:21595115>.
- Parker, A., Hobson, L., Bains, R., Wells, S., & Bowl, M. (2022). Investigating audible and ultrasonic noise in modern animal facilities. *F1000Research*, 11, 651. <https://doi.org/10.12688/f1000research.111170.1>.
- Resmî Gazete (2012). Deneysel ve diğer bilimsel amaçlar için kullanılan hayvanların refah ve korunmasına dair yönetmeliğin uygulama talimatı (sayı:1179). <https://www.resmigazete.gov.tr>.
- Sato, S., Solanas, G., Peixoto, F. O., Bee, L., Symeonidi, A., Schmidt, M. S., Brenner, C., Masri, S., Benitah, S. A., & Sassone-Corsi, P. (2017). Circadian reprogramming in the liver identifies metabolic pathways of aging. *Cell*, 170(4), 664-677.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.042>.
- Tan, C. L., & Knight, Z. A. (2018). Regulation of body temperature by the nervous system. *Neuron*, 98(1), 31-48. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.02.022>.
- Texada, M. J., Koyama, T., & Rewitz, K. (2020). Regulation of body size and growth control. *Genetics*, 216(2), 269-313. <https://doi.org/10.1534/genetics.120.303095>.
- Turner, J. G., Parrish, J. L., Hughes, L. F., Toth, L. A., & Caspary, D. M. (2005). Hearing in laboratory animals: strain differences and nonauditory effects of noise. *Comparative medicine*, 55(1), 12-23. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3725606/>.
- Wang, M., Chen, J., Lin, X., Huang, L., Li, H., Wen, C., & He, Z. (2021). High humidity aggravates the severity of arthritis in collagen-induced arthritis mice by upregulating xylitol and L-pyroglutamic acid. *Arthritis Research & Therapy*, 23, 292. <https://doi.org/10.1186/s13075-021-02681-x>.
- Weng, S., Estevez, M. E., & Berson, D. M. (2013). Mouse ganglion-cell photoreceptors are driven by the most sensitive rod pathway and by both types of cones. *PLoS ONE*, 8(6), e66480. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066480>.

Laboratuvar Hayvanlarında Tarama Programlarının Önemi ve Bazı Önemli Viral Ajanların Araştırılması

The Importance of Screening Programs in Laboratory Animals and Investigation of Several Important Viral Agents

Erdal POLAT¹
Hayrunnisa BOSTAN YÖRÜ²
Yasin KALAY³
Sebahattin AKÇA⁴



¹Siirt Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı, Siirt, Türkiye

²Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Viroloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

³Atatürk Üniversitesi Horasan Meslek Yüksekokulu, Veterinerlik Bölümü, Erzurum, Türkiye

⁴Erzurum Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü, Erzurum, Türkiye



Geliş Tarihi/Received :15.05.2024
Kabul Tarihi/Accepted :01.07.2024
Yayın Tarihi/Publication Date :19.09.2024

Sorumlu Yazar/Corresponding author:
Erdal Polat

E-mail: erdal.polat@siirt.edu.tr

Cite this article: Polat E., Bostan Yörü H., Kalay Y., Akça S. (2024). The importance of screening programs in laboratory animals and investigation of several important viral agents. *Journal of Laboratory Animal Science and Practices*, 4(2), 91-100.



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License.

Öz

Laboratuvar hayvanlarının sağlık tarama programları, biyomedikal araştırmalarda standardizasyonun sağlanması ve hem hayvanların hem de araştırma personelinin sağlığının korunması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda, Hepatit E virusu (HEV), Murine hepatit virusu (MHV) ve Murine norovirus (MNV) gibi patojenlerin düzenli olarak izlenmesi, laboratuvar ortamında hijyen ve sanitasyon standartlarının geliştirilmesine katkıda bulunabilir. Araştırmada, BALB/c mice ve Sprague Dawley, Wistar albino sıçanlarından oluşan rastgele seçilmiş örneklem grupları üzerinde çalışılmıştır. Deney hayvanlarından etik ilkeler çerçevesinde kan ve doku örnekleri toplanmış, laboratuvar ortamındaki ses, ışık, kafes yoğunluğu, yem ve suya erişim gibi faktörler gözlemlenerek kaydedilmiştir. Bu gözlemler, araştırmanın güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini artırmak için elzemdir. RT-PCR testleri kullanılarak HEV, MHV ve MNV için tarama yapılmış ve test edilen tüm örnekler bu patojenler yönünden negatif bulunmuştur. Bu sonuçlar, laboratuvar ortamında uygulanan hijyen ve sanitasyon protokollerinin etkinliğini göstermektedir. Ayrıca, laboratuvar araştırma merkezlerinde eğitilmiş personel ve kemirgen kontrol programlarının önemi vurgulanmıştır. Sonuç olarak, bu çalışma, laboratuvar hayvanlarında sağlık tarama programlarının, araştırılan patojenler ve uygulanan koruma-kontrol tedbirleri ile ilişkili olarak, bilimsel araştırmaların standardını yükseltmede kritik bir rol oynadığını ortaya koymaktadır. Bu tür programlar, laboratuvar hayvanlarının sağlığını korumak ve araştırma sonuçlarının güvenilirliğini artırmak için hayati öneme sahiptir.

Anahtar Kelimeler: HEV, MNV, MHV, sağlık tarama programları, laboratuvar hayvanları.

ABSTRACT

Laboratory animal health screening programs are of great importance to ensure standardization in biomedical research and to protect the health of both animals and research personnel. In this context, regular monitoring of pathogens such as Hepatitis E virus (HEV), Murine hepatitis virus (MHV) and Murine norovirus (MNV) can contribute to improving hygiene and sanitation standards in the laboratory environment. In this study, randomly selected sample groups consisting of BALB/c mice and Sprague Dawley, Wistar albino rats were studied. Blood and tissue samples were collected from the laboratory animals within the framework of ethical principles, and factors such as noise, light, cage density, access to feed and water in the laboratory environment were observed and recorded. These observations are essential to increase the reliability and reproducibility of the study. RT-PCR tests were used to screen for HEV, MHV and MNV and all samples tested were negative for these pathogens. These results demonstrate the effectiveness of hygiene and sanitation protocols applied in the laboratory environment. Furthermore, the importance of trained personnel and rodent control programs in laboratory research centers was emphasized. In conclusion, this study reveals that health screening programs in laboratory animals play a critical role in raising the standard of scientific research in relation to the pathogens investigated and the protection-control measures implemented. Such programs are vital to protect the health of laboratory animals and improve the reliability of research results.

Keywords: HEV, MNV, MHV, health screening programs, experimental animals.

Giriş

Deney hayvanlarının sağlık durumları, deneysel uygulamalara zarar vermemesi açısından en uygun düzeyde olmalıdır. Deney hayvanları laboratuvarlarında hijyen ve sanitasyon kurallarına uyulması yapılacak çalışmaların güvenilirliği açısından önemlidir (Çelik ve ark., 2023). Deneysel enfeksiyonların dışında laboratuvar hayvanlarında; viral etkenlerin (Sendai virusu, Lymphocytic choriomeningitis virus, Myxomavirus, Poxvirus, Papillomavirus, Rabbit hemorrhagic disease virus, Fare rotavirusu, Adenovirus vb.), bakteriyel etkenlerin (*Treponema cuniculi*, *Bacillus piliformis*, *Clostridium perfinges* Tip E, *Pasteurella multocida*, vb.) ve paraziter etkenlerin (*Passalaurus ambiguus*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Psoroptes cuniculi*, *Cheyletiella parasitovorax*, *Haemophysalis liporic* vb.) sebep olduğu hastalıklar mevcuttur (Bilgili ve Gürel, 2002; Karaman, 2015; Müftüoğlu ve Albayrak, 2019). Laboratuvar hayvanlarının yaklaşık %95'lik kısmını fareler ve ratlar oluşturur ve bunların yanı sıra sıklıkla tavşan, kobay, köpek, kedi, koyun, keçi ve maymun gibi hayvanlar da kullanılır (Dhadde, 2019; Hickman ve ark., 2017). Deney hayvanı olarak kullanılan fare, yalnızca enflamasyon, immünite ve enfeksiyonları araştırmak için değil, bunun yanında yeni tanısal, önleyici ve terapötik yaklaşımlar geliştirmek için de model olarak kullanılmaktadır (Aydın, 2022). Deney hayvanlarının viral hastalıkları, bu hayvanların yetiştirildiği laboratuvarlar ve üzerinde çalışılan deneysel araştırmalar açısından çoğu zaman büyük sorunlara yol açabilir. Viral hastalıklar deney hayvanlarında şiddetli enfeksiyona neden olmakta ve tüm koloninin ölümüne sebep olmaktadır (Müftüoğlu ve Albayrak, 2019). Bunun en iyi örneklerini *Coronaviridae* ailesi içerisinde sınıflandırılan Fare hepatit virusu (MURINE Coronavirus / Mouse Hepatitis virus / MHV), *Caliciviridae* ailesinden Murine Norovirus (MNV) ve *Hepeviridae* ailesinin bir üyesi olan Hepatit E virusu (HEV) oluşturmaktadır. Bu önemli viral etkenler yönünden laboratuvar hayvanlarında yapılan sürü tarama çalışmaları oldukça kısıtlıdır. Türkiye'de laboratuvarlarda yetiştirilen fare ve ratlarda çalışmaya dahil edilen etkenler yönünden bilindiği kadarıyla araştırmalara rastlanmamıştır, dünyada ise daha çok aşı, immünizasyon ve patogeneze belirleme çalışmalarında örnek viruslar olarak kullanılmaktadırlar (He ve ark., 2001; Li ve ark., 2001; Ward ve ark., 2006).

İlk olarak 1949'da izole edilen MHV; aerosol, direkt temas, fomitler, deneysel olarak da nakledilebilir tümörler ve transplasental yolla bulaşmaktadır (Baker, 1998; Yılmaz, 1960). MHV, 80-220 nm çapında, zarflı ve helikal simetri

yapısına sahiptir. Genom boyutu 25-31 kb olan lineer pozitif polariteli, tek sarmallı RNA molekülünden oluşur. MHV virionları; başlıca spike glikoprotein (S), zarf proteini (E), membran proteini (M) ve nükleoproteinden (N) oluşan dört yapısal protein kodlamaktadır (Zhou ve ark., 2020). Betacoronaviruslar içerisinde bazı türler (SARS-CoV, MERS-CoV ve SARS-CoV-2 vb.) beşinci bir protein olan hemaglutinin esteraz (HE) proteinini içermektedir (Cotten ve ark., 2013). MHV'nin ilk izolasyonundan bugüne kadar *mus musculus* türünde enfeksiyon oluşturabilen, organ ve doku tropizmi (solunum, gastrointestinal, karaciğer ve merkezi sinir sistemi) farklılıkları gösterebilen birçok farklı suşu belirlenmiştir. Bunlar virulan suşlar olarak tanımlanan MHV-1, MHV-2, MHV-3, MHV-JHM, MHV-A59, MHV-S ile daha az virulan suşlar olan MHV-D, MHV-DVIM, MHV-Y, MHV-RI, MHV-S ve MHV-Nu'dan oluşmaktadır (Aydın, 2022; Körner ve ark., 2020). MHV'nin farklı suşları farklı organlara tropizm gösterebilmektedir, fakat hepatit enfekte farelerde belirgin bir bulgudur. Yavru farelerde sarılığa, koordinasyon bozukluklarına ve tremorlara sebep olurken yetişkinlerde genellikle asemptomatik seyirlidir (Barthold, 1985).

1972 yılında tanımlanan (Dolin, 1978) Noroviruslar, *Caliciviridae* ailesi içerisinde sınıflandırılmaktadır. Genomu 7.5 kb uzunluğunda, zarfsız, pozitif polariteli tek sarmallı RNA viruslarıdır (Wobus ve ark., 2023). Norovirus yapısal (VP1, VP2) ve yapısal olmayan proteinleri (RNA bağımlı RNA polimeraz ve helikaz) kodlamaktadır (Cortes-Penfield ve ark., 2017). 10 genogruba ve 48 genotipe ayrılan Noroviruslar içerisinde genogrup V fare ve sıçanları enfekte eden viruslardan oluşmaktadır (ICTV, 2022). MNV, akut veya kronik bir enfeksiyona neden olabilir. Akut seyreden formunda kısa süren bir diare şekillenebilir. Kronik formunda ise kalın bağırsağa yerleşir ve aylar boyunca dışkı ile saçılır (Wobus ve ark., 2023).

1983'te tanımlanan HEV (Balayan ve ark., 1983); tek zincirli, yaklaşık 7.2 kb uzunluğunda bir genoma sahip zarfsız bir RNA virusudur. HEV, viral replikasyonda önemli role sahip ORF-1, ORF-2, ORF-3 ve ORF-4 proteinlerini içerir ve en az 8 ana genotipten oluşur (Belei ve ark., 2021; Reuter ve ark., 2020). Kemirgenlerde tespit edilen genotip HEV-3 / HEV-C1 olup bu genotipin domuz dışkısı tüketen ratlarda enfeksiyon oluşturduğu düşünülmektedir. Ratlar HEV için birincil rezervuar olarak bildirilmiştir (Porea ve ark., 2023; Yadav ve ark., 2023). Ratların karaciğer ve dışkı örneklerinden tespit edilebilen Rat HEV, spesifik bir klinik bulgu göstermemektedir (Reuter ve ark., 2020).

Bu çalışmada, deney hayvanları araştırma merkezlerinde

yer alan fare ve rat kolonilerinin en önemli patojenlerinden olan MHV, MNV ve HEV varlığının araştırılması ve sağlık tarama programları kapsamında değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler

Deney Hayvanları

Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarında konvansiyonel olarak yetiştiriciliği yapılan hayvanlar içerisinde rastgele seçilen 10 adet fare (BALB/c mice), iki farklı ırktan 10'ar adet rat (Sprague Dawley, Wistar albino) örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir. Fare ve ratlar standart laboratuvar koşullarında ($24\pm 1^{\circ}\text{C}$, $\%45\pm 5$ nem ve 12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsü) barındırıldı. Fare ve ratlar tüm çalışma boyunca ticari bir pelet diyet ve ad libitum suya erişebildi. Bu çalışma; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 2024/130 nolu kararı ve onayıyla gerçekleştirilmiştir.

Örnek Toplama

Canlı hayvanlar tartılmış, ardından sevofluran anestezisi ile sedasyon uygulanmış ve intrakardiyak kan örnekleri antikoagülanlı kan tüpleri içerisine toplanmıştır. Fare ve ratlardan kan alındıktan hemen sonra servikal dislokasyon yoluyla sakrifiye edilmiş ve hedef organları (karaciğer, dalak, bağırsak) elde etmek için abdominal laparotomi yapılmıştır. Kan örnekleri 2000 rpm'de $+4^{\circ}\text{C}$ de 10 dk santrifüj edildikten sonra plazma ve lökosit tabakası toplanarak steril tüplere alınmıştır.

Ayrıca hayvanların karaciğer, bağırsak ve dalak organlarından 3'er gram doku örneği alınarak parçalanmış ve sonrasında phosphate buffered saline ile lizis buffer içerisinde ekstraksiyon işlemi için hazır hale getirilmiştir.

Nükleik Asit İzolasyonu

Homojenizasyonu ve ön hazırlığı tamamlanan örneklerden viral RNA izolasyonu amacıyla Viral Nükleik Asit (DNA/RNA) İzolasyon Kiti (Hibrigen-Türkiye) kullanılmıştır. Toplanan doku örneklerine kit içerisinde belirtilen doku işleme prosedürü uygulanmıştır.

RT-PCR Analizi

Nükleik asit süspansiyonundan komplementer DNA'nın (cDNA) eldesi amacıyla First Strand cDNA Synthesis kiti (Thermo Fisher Scientific-ABD) üreticinin protokolüne göre kullanıldı. Fare örneklerinden elde edilen cDNA'ların HEV, MHV ve MNV yönünden Tablo1'de belirtilen spesifik PCR primer çiftleri kullanılarak analizi gerçekleştirildi. HEV ve MNV tespiti amacıyla ORF2 gen bölgesi, MHV tespiti amacıyla NC gen bölgesi tespiti hedeflenmiştir (Fallahi ve ark., 2019; Huang ve ark., 2002; Kim ve ark., 2011).

Agaroz Jel Elektroforezi

PCR amplikonları %1'lik agaroz jel hazırlanıp elektroforez işlemi ile analiz edilerek UV ışık altında sırasıyla 348, 399 ve 547 bp büyüklüğündeki bantlar sırasıyla HEV, MHV, MNV yönünden pozitif olarak değerlendirildi.

Tablo1. HEV, MHV ve MNV spesifik PCR primer dizisi, RT-PCR için belirlenmiş annealing dereceleri ve replike olan genomun büyüklüğü bilgileri.

Table1. HEV, MHV and MNV specific PCR primer sequences, annealing degrees determined for RT-PCR and size of the replicating genome.

		kaydedildi.			
Primer	Sequence 5'-3'	Uzunlu k(bp)	Anne aling	Ref.	
HEV	3156N	AATTATGCC(T)CAGTAC(T)CGG(A)	731	42	(Huang ve ark., 2002)
	3157N	CCCTA(G)TCC(T)TGCTGA(C)GCATTCTC			
	3158N	GTT(A)ATGCTT(C)TGCATA(T)CATGGCT			
	3159N	AGCCGACGAAATCAATTCTGTC	348	42	
MHV	MurHepV-F	CAGCAGTGTTTTGGAAAGAGAG	399	52	(Fallahi ve ark., 2019)
	MurHepV-R	TGGGCTTTGCAACGCTTA			
MNV	Murine NoroV-allF	AGCGGCCAGGATCTTGTCC	547	56	(Kim ve ark., 2011)
	Murine NoroV-allR	AAGACTCATCACCCGGGCTG			

Bulgular

Laboratuvar hayvanları kullanım, üretim ve araştırma merkezlerinde uygulanan biyogüvenlik önlemleri ve sağlık tarama programları, bu merkezlerin sürekliliği ve standardizasyonu açısından hayati önem taşımaktadır. Popülasyon sağlığının idamesi bilimsel sonuçların standardizasyonunun yanı sıra, araştırmacı ve hayvan bakımından sorumlu çalışanların sağlığı açısından da oldukça önemlidir.

Araştırmamızda, Atatürk Üniversitesi, Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi bünyesinde yetiştiriciliği yapılan BALB/c mice, Sprague Dawley ve Wistar albino ırkı ratlarda, HEV, MNV ve MHV patojenlerinin varlığının araştırılması ve uygulanan sağlık tarama programının etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirdi. (Araştırmamız, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi bünyesinde yetiştirilen BALB/c mice, Sprague Dawley ve Wistar albino ırkı ratlarda HEV, MNV ve MHV patojenlerinin varlığının araştırılması ve uygulanan sağlık tarama programının etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirildi. Bu kapsamda laboratuvar biyogüvenlik koşulları ile alakalı tespitler yapılarak

Araştırma merkezinde rutin biyogüvenlik uygulamaları arasında; haşere ve yabancı rodent mücadelesi amacıyla profesyonel hizmet alımı (bina dışı ve içerisinde kafes uygulamaları ve sprey ilaçlama), tıbbi atıkların muhafazası amacıyla kullanılan derin dondurucular, kesici ve delici atıklar amacıyla özel atık kutuları, tıbbi atıkların kontrolü ve uzaklaştırılması amacıyla hazırlanmış iş akışı ve hizmet alımı, laboratuvar ve uygulama alanları dezenfeksiyon programları, işçi ve araştırmacılara yönelik laboratuvar kullanım talimatlarına uyumun düzenli takibi, vb. biyogüvenlik tedbirlerinin uygulandığı, kayıt defterleri ve takip çizelgelerine bakılarak belirlendi.

Ayrı alanlarda yetiştiriciliği yapılan fare ve ratlarda; stres belirtileri (aşırı hareketlilik, kıl örtüsünde kabarma, kanibalizm, delirium, vb.), kafes yoğunluğu, klinik semptomlar ve buldukları ortamın ses şiddeti ve ışık miktarı açısından dış bakıda herhangi bir olumsuzluk belirlenmedi. Stres sebebi olabilecek ışık (lüx) ve ses şiddeti (desibel) ölçümlerinin kayıt defterlerinde de yer aldığı ve normal değerlerde olduğu belirlendi (ortalama 285 lüx ve 60 desibel). Üretim ve araştırma alanlarında 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık uygulandığı, anlık ısı ve nem göstergelerinin ise 18-21°C ve %45-48 (üretim alanları arasında) bağıl neme sahip olduğu gözlemlendi. Ancak

herhangi bir çevresel zenginleştirmenin uygulanmadığı belirlendi. Ayrıca yem ve suya erişimin ad libitum olarak sağlandığı gözlemlendi. Rodent üretim alanlarından rastgele seçilen kafeslerden alınan fare ve ratların kan ve doku örneklerinde HEV, MNV ve MHV patojenlerinin varlığı RT-PCR analizi ile araştırıldı. Analiz sonucunda kan ve doku örneklerinin tamamı HEV, MNV ve MHV patojenleri yönünden negatif olduğu belirlendi.

Tartışma

Deney hayvanları varlığı ve üretimi, bilimsel çalışmalar açısından çok önemli bir yere sahiptir. Bir ürünün (ilaç, aşı, gıda katkı maddesi, kozmetik ürünleri vb.) insanlara veya hayvanlara uygulanmadan önce terapötik etkisi, oluşturduğu immünizasyonu, toksik ve letal dozların belirlenmesi, haricen veya parenteral uygulama yollarının denenmesi gibi konularda deney hayvanları vazgeçilmez bir unsurdur (Domínguez-Oliva ve ark., 2023).

Bu kapsamda çalışılacak biyolojik veya kimyasal maddenin gerçek etkilerinin görülebilmesi için deney hayvanlarının sağlıklı olmaları ve bu sağlığın sürdürülebilir, kontrol edilebilir olması elzemdir. Laboratuvar hayvanları araştırma ve üretim merkezlerinde ortaya çıkabilecek enfeksiyonlar hayvan refahını ve hayvanlardaki mikrobiyolojik varlığı göz önünde bulundurma gerekliliğini vurgular. Bu ajanlar; hayvanların refahını, deneysel değişkenliği ve bilimsel araştırmaların güvenilirliğini doğrudan etkileyebilir. Bu nedenle, hayvanların mikrobiyolojik yönden izlenmesi ve kontrol edilmesi önem arz etmektedir (Mansfield ve ark., 2010). Bu kapsamda şüphe edilen viral, bakteriyel, paraziter ve fungal ajanların laboratuvardaki hayvanlarda 3R (refinement, replacement, reduction) özelinde test edilmesi gerekmektedir. Viral ajanlar; hücre kültürüne inokülasyon, PCR, serolojik testler, antijen tespiti gibi yöntemlerle teşhis edilebilmektedir (Manivannan ve ark., 2024). Bu çalışmada da varlığı araştırılan etkenler yönünden RT-PCR test yöntemi tercih edilmiştir. Laboratuvar hayvanları için uygulanacak sağlık izleme programları içerisine dahil edilebilecek viral ajanlar: Sendai virusu, Lenfositik koriomenenjit virusu, MHV'nin enterotropik varyantları veya Ectromelia virusu'dur (Buchheister ve Bleich, 2021). Bu virus türleri düzenli olarak taranabilir ve programa şüphe duyulan başka viral, bakteriyel, paraziter ve fungal ajanlar eklenebilir. Çalışmamızda bahsedilen viruslar içerisinden MHV, MNV ve

HEV araştırılmıştır.

Belirli biyolojik parametrelere sahip olduğu bilinen deney hayvanlarının kullanımı, deneysel sonuçların tekrarlanabilirliğini sağlamak için önemlidir. Sağlık izleme programlarının temel amacı, araştırmada kullanılan hayvanların mikrobiyolojik durumu hakkındaki bilgileri ortaya çıkarmaya ve bilimsel, yasal ve refah gereksinimleri karşılamaya yardımcı olmaktır. Kemirgenler ve tavşanlar arasında birçok mikroorganizma grubu enfeksiyonlara neden olabilir. Ancak, çoğu enfeksiyon açık klinik belirtilere yol açmaz. Bu nedenle, hastalık semptomlarının klinik olarak görülmemesi sadece sınırlı bir tanısal değer taşır (Buchheister ve Bleich, 2021). Ancak, gizli enfeksiyonlar, hayvan deneylerinin sonuçlarını önemli ölçüde etkileyebilir. Laboratuvar hayvanlarının fizyolojisi üzerinde mikroorganizmalar davranış değişiklikleri, büyüme oranı, bağıl organ ağırlığı ve bağışıklık yanıtının değişmesi gibi birçok farklı etkiye yol açabilir (Sellers ve ark., 2012; Nicklas ve ark., 1999). Klinik ve gizli enfeksiyonlar, bilimsel sonuçların sapmasına neden olarak, biyolojik ve deneysel farklılıkları artırabilir ve deney hayvanı kullanımında artışa neden olabilir. Nakledilebilir tümörler, dokular, hücre hatları veya embriyolar ve gametler gibi biyolojik materyallerin kontaminasyonu, hayvanlarda gizli enfeksiyonların bir sonucu olarak ortaya çıkabilir (Mahabir ve ark., 2008; Nicklas ve ark., 1993). Bu kontaminasyon, yeni hayvanlara veya kullanılan malzemelere bulaşabilir (Fox ve ark., 2007). Çalışma grubu araştırdığımız viral etkenler yönünden negatif bulunmuştur. Bu durum araştırma merkezleri açısından istenilen bir durumdur.

Bu çalışmanın da konusu olan viral etkenler (MNV, MHV, HEV) sağlığını sürdürmek istediğimiz deney hayvanları için önemli patojenlerdir. MNV; endemik seyirli olması, immun sistem hücrelerini ve çok çeşitli dokuları enfekte edebilmesi, her zaman semptom göstermemesinden dolayı fark edilmesinin güç olması nedenleriyle laboratuvar farelerinde araştırılmıştır (Henderson, 2008). MNV araştırılmasına yönelik ilk çalışma 2005 yılında vahşi tip farelerde antikör varlığına yönelik yapılmıştır (Hsu ve ark., 2005). Bu ilk çalışmada elde edilen pozitifliğin ardından dünyada laboratuvar farelerinde serolojik ve virolojik açıdan varlığı araştırılan bir etken haline gelmiştir (Hsu ve ark., 2005, 2006; Karst ve ark., 2003; Manuel ve ark., 2008; Perdue ve ark., 2007). Türkiye'de fare ve ratlarda MNV araştırılmasına yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Amerika'da 28 adet bağışıklığı yetersiz farede yapılan çalışmada, enfeksiyon sonrası farelerde hepatit, pnömoni, pleural ve periton boşluklarında yangı gözlemlenmiştir (Ward ve ark., 2006). İngiltere'de ise WT ve Stat1^{-/-} farelerinde MNV tespit edilmiş ve asemptomatik seyrettiği bildirilmiştir. WT farelerde MNV'nin karaciğer lezyonlarıyla ilişkili olarak uzun süre farelerde kalıcılığını devam ettirdiği saptanmıştır (Shortland ve ark., 2014). Bu çalışmalar MNV'nin bağışıklığı yetersiz farelerde etkenin varlığının ve enfeksiyonun kalıcılığının önemini vurgulamaktadır. Asemptomatik seyirli hastalıklardan biri olan MNV çalışma konumuza dahil edilmiştir. Çalışmamızda sağlık tarama programlarında istenilen bir sonuç olarak negatiflik elde edilmiştir. Semptom oluşturmayan bir enfeksiyöz ajan olması ve enfekte farelerde uzun süre varlığını devam ettirebilmesi nedeniyle sağlık tarama programları içerisinde bulundurulmalıdır.

Bu çalışma kapsamında taraması yapılan ve laboratuvar fareleri için önem arz eden diğer bir etken MHV'dir. Bu virus vahşi ve laboratuvar farelerinde; karaciğeri enfekte etmesinin yanı sıra enterik ve solunum sistemi hastalığına, merkezi sinir sistemine tropizm göstermesi sebebiyle ensefalitise neden olabilir (Aydın, 2022; Bender ve Weiss, 2010; Matthews ve ark., 2002). MHV, coronavirus olması itibari ile sadece laboratuvar hayvanlarının bir patojeni olarak değil aynı zamanda SARS-CoV-2 ve COVID-19 çalışmaları için de örnek virus olarak çalışılmıştır (Grabherr ve ark., 2021; Körner ve ark., 2020; Tangudu ve ark., 2007). MHV, farelerde yerleşim gösterdiği doku ve organlar itibari ile klinik tablo oluşturur fakat bu klinik tablo virusun suşu ve genetik karakteri, vücuda giriş yolu, konağın yaşı ve bağışıklık durumuna göre çeşitlilik göstermektedir (Aydın, 2022). Bu çalışmanın yapıldığı araştırma merkezindeki fare ve ratlarda herhangi bir klinik bulgu mevcut değildi. Fakat MHV, konağın bağışıklık durumunun iyi olması durumunda klinik bulgu göstermeyebilir ve deney hayvanları laboratuvarında büyük bir tehdit oluşturabilir. Klinik bulgu göstermeden fare ve rat kolonilerinde varlığını sürdürebilmesi sebebiyle MHV bu çalışmada da araştırıldı ve istenilen bir sonuç olan negatiflik elde edildi.

Bu çalışmada araştırılan bir diğer etken HEV'dir. HEV bazı türlerde zoonotik öneme sahip olmasına rağmen laboratuvar hayvanlarında bu durum bildirilmemiştir. Dünyada ve ülkemizde HEV varlığı genellikle insanlarda

araştırılmakta ve potansiyel taşıyıcısı domuz olarak bildirilmektedir. Fakat Türkiye'de domuz yetiştiriciliğinin her bölgede yaygın olmaması sebebiyle potansiyel başka taşıyıcıların varlığı tartışma konusudur. (Aydın ve ark., 2016). Bu kapsamda laboratuvar ve vahşi tip farelerde HEV varlığı araştırılması önem arz etmektedir. Türkiye'de HEV yönünden farelerde yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamışken, dünyada aşı araştırmaları kapsamında farelerin enfekte edildiği çalışmalar mevcuttur (He ve ark., 2001; Li ve ark., 2001). Vahşi fareler insanların yaşam alanlarında sıklıkla yer alarak insanlar tarafından oluşan atıklarla beslenebilmektedirler. Dolayısıyla laboratuvar hayvanlarının yetiştirildiği ve üretiminin yapıldığı merkezlerin çevresinde doğal olarak bulunabilmektedir. Bu merkezlerde yem maddelerinin bulunması vahşi fareleri çekmektedir. Dolayısıyla konvansiyonel yetiştiriciliği yapılan hayvanlarla vahşi kemirgenlerin olası temasını mümkün kılmaktadır. Bu temasın sağlanması durumunda vahşi kemirgenlerin taşıdığı patojenlerin laboratuvar hayvanlarına aktarımı söz konusu olmaktadır. Bu nedenle laboratuvar hayvanları araştırma ve yetiştirme merkezlerinde düzenli olarak vahşi kemirgenlere ve haşerelere yönelik koruyucu önlemler alınmaktadır. Çalışmamızın yapıldığı Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde vahşi kemirgenlerle de aktarılabilecek patojenlere rastlanılamaması, ilgili koruma ve kontrol tedbirlerinin başarıyla uygulanmasının sonucu olarak değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yetiştirilen 1 fare, 2 rat türünden (BALB/c mice, Sprague Dawley, Wistar albino) 10'ar adet seçilerek örneklem oluşturulmuş ve bu farelerin kan, karaciğer, bağırsak ve dalak dokularından RT-PCR testi yapılmıştır. Bu test sonucunda aranan etkenler yönünden pozitiflik bulunamamıştır. Bakteriyel ve paraziter yönden araştırma yapılmamış olması çalışmamızın eksik yönüdür. İleride yapılacak sürü sağlığı taramasına yönelik çalışmalarda mutlaka bakteriyel ve paraziter yönden araştırma yapılması gerekmektedir.

Sürdürülebilir sağlık taramaları ile deney hayvanı kullanımı gerektiren bilimsel çalışmaların sonuçları daha doğru, güvenilir olacak ve bilimsel araştırmanın standardını yükseltecektir (Uludağ, 2019). Geleneksel deneylerde, hayvanlar sıklıkla tek bir belirli hastalığın belirtilerini

gösteren modeller seçilerek kullanılır. Bunun aksine sürdürülebilir sağlık taramaları, hayvanların genel sağlığını izlemeyi, korumayı ve deneysel araştırmaların daha güvenilir sonuçlar üretmesini amaçlar. Ancak bu taramalarda karşımıza çıkacak bazı zorluklar vardır. Bu zorluklar; hangi etkenlerin, parametrelerin rutin olarak kontrol edilmesi gerektiği, laboratuvar içerisinde farklı türlerin mevcudiyeti ve bu türler için farklı hastalıkların önem arz etmesi, yapılacak rutin taramaların maliyeti, bu taramalar esnasında oluşturulacak strestir (Çelik ve ark., 2023). Bu çalışmada kullanılan hayvan türleri rastgele kafesler içerisinden seçilmiş ve yapılan tüm işlemler anestezi altında gerçekleştirilmiş olup stres ve ağrı durumu minimize edilmiştir.

Sonuç

Sonuç olarak, deney hayvanlarında sürdürülebilir sağlık taramalarının etik ve bilimsel standartlara uygun olarak yürütülmesi, bilimsel araştırmaların kalitesini ve toplumun sağlık alanındaki ilerlemesini desteklemektedir. Bu süreçte, hayvan refahının korunması ve etik ilkelerin gözetilmesi, araştırmaların meşruiyetini ve kabul edilebilirliğini artırmaktadır. Deney hayvanları yetiştirilen ve uzun süreli bulunduran her kurumun laboratuvar hayvan sağlık tarama programının oluşturulması ve uygulanması oldukça önemlidir ve araştırma merkezlerinde çalışan personelin sağlığı açısından da bu hayvanların sağlığı oldukça önemlidir. Dolayısıyla bu merkezlerde hayvan sağlığının sürdürülebilir olması için uygulanan haşere ve vahşi kemirgenlerle mücadele tedbirlerine dikkat edilmelidir. Koruyucu tedbirlerin ve sağlık tarama programlarının maliyeti yüksek görünebilir, ancak araştırma projesinin toplam maliyetine göre düşük kalacaktır. Uzun vadede rutin olarak taraması yapılan etkenler yönünden elde edilecek pozitif veya negatif veriler sayesinde araştırma merkezlerindeki toplam maliyet düşürülecek ve tasarruf sağlanmış olacaktır (Timurkan ve Acar, 2021). Gelecekte, bu alandaki teknolojik gelişmeler ve etik tartışmaların, deney hayvanları üzerinde yapılan sağlık taramalarının daha da iyileştirilmesine katkı sağlayacağı öngörülmektedir.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik kurul onayı Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan alınmıştır (Karar numarası: 2024/130).

Yazar Katkıları: Konsept – E.P., H.B.Y., Y.K., S.A.; Tasarım – E.P., H.B.Y., Y.K.; Denetim – E.P., H.B.Y., Y.K.; Veri Toplama ve/veya İşleme – E.P.; Analiz ve/veya Yorum - E.P., H.B.Y., Y.K., S.A.; Literatür Taraması - E.P., H.B.Y., Y.K., S.A.; Yazma- E.P., H.B.Y., Y.K., S.A.; Eleştirel İnceleme- E.P.,

H.B.Y.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan etmiştir.

Finansal Destek: Yazarlar, bu çalışma için finansal destek almadığını beyan etmiştir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval for this study was obtained from Atatürk University Animal Experiments Local Ethics Committee (Decision number: 2024/130).

Author Contributions: Concept - E.P., H.B.Y., Y.K., S.A.; Design - E.P., H.B.Y., Y.K.; Supervision - E.P., H.B.Y., Y.K.; Data Collection and/or Processing - E.P.; Analysis and/or Interpretation - E.P., H.B.Y., Y.K., S.A.; Literature Review - E.P., H.B.Y., Y.K., S.A.; Writing - E.P., H.B.Y., Y.K., S.A.; Critical Review - E.P., H.B.Y..

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Declaration of Interests: The authors declare that they have no competing interest.

Funding: The authors declared that this study received no financial support.

Kaynaklar

- Aydin, H., Uyanik, M. H., Karamese, M., & Timurkan, M. O. (2016). Seroprevalence of hepatitis E virus in animal workers in nonporcine consumption region of Turkey. *Future Virology*, 11(10), 691-697. <https://doi.org/10.2217/fvl-2016-0075>.
- Aydin, H. (2022). Fare hepatit virusu (MHV) üzerine bir derleme. *Laboratuvar Hayvanları Bilimi ve Uygulamaları Dergisi*, 2, 42-48.
- Baker, D. G. (1998). Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(2), 231-266. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.2.231>.
- Balayan, M. S., Andjaparidze, A. G., Savinskaya, S. S., Ketiladze, E. S., Braginsky, D. M., Savinov, A. P., & Poleschuk, V. F. (1983). Evidence for a Virus in Non-A, Non-B Hepatitis Transmitted via the Fecal-Oral Route. *Intervirology*, 20(1), 23-31. <https://doi.org/10.1159/000149370>.
- Barthold, S.W. (1985). Mouse Hepatitis Virus Infection, Liver, Mouse. In Jones, T. C., Mohr, U. (Eds.), *Monographs on Pathology of Laboratory Animals* (pp. 187-216). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-96910-2_25.
- Belei, O., Ancusa, O., Mara, A., Olariu, L., Amaricai, E., Folescu, R., Zamfir, C. L., Gurgus, D., Motoc, A. G., Stânga, L. C., Strat, L., & Marginean, O. (2021). Current paradigm of hepatitis E virus among pediatric and adult patients. *Frontiers in Pediatrics*, 9, 721918. <https://doi.org/10.3389/fped.2021.721918>.
- Bender, S. J., & Weiss, S. R. (2010). Pathogenesis of murine coronavirus in the central nervous system. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 5(3), 336-354. <https://doi.org/10.1007/s11481-010-9202-2>.

- Bilgili, A., & Gürel, Y. (2002). Laboratuvar hayvanlarının hastalıklarının sağaltımı. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 13(1), 77-88.
- Buchheister, S., & Bleich, A. (2021). Health monitoring of laboratory rodent colonies—Talking about (r)evolution. *Animals*, 11(5), 1410. <https://doi.org/10.3390/ani11051410>.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2022). Norovirüs virüs sınıflandırması. <https://www.cdc.gov/norovirus/lab/virus-classification.html>.
- Cortes-Penfield, N. W., Ramani, S., Estes, M. K., & Atmar, R. L. (2017). Prospects and challenges in the development of a norovirus vaccine. *Clinical therapeutics*, 39(8), 1537–1549. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2017.07.002>.
- Cotten, M., Watson, S. J., Kellam, P., Al-Rabeeah, A. A., Makhdoom, H. Q., Assiri, A., Al-Tawfiq, J. A., Alhakeem, R. F., Madani, H., AlRabiah, F. A., Hajjar, S. A., Al-nassir, W. N., Albarrak, A., Flemban, H., Balkhy, H. H., Alsubaie, S., Palser, A. L., Gall, A., Bashford-Rogers, R., Memish, Z. A. (2013). Transmission and evolution of the Middle East respiratory syndrome coronavirus in Saudi Arabia: A descriptive genomic study. *The Lancet*, 382(9909), 1993–2002. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61887-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61887-5).
- Çelik, A., Baksi, N., & Güneli, M. E. (2023). Deney hayvanları araştırmalarında standardizasyonun yeri ve önemi: geleneksel derleme. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 49(1), 125-132. <https://doi.org/10.32708/uutfd.1216412>.
- Dhadde, S. (2019). Commonly used laboratory animals in experimental pharmacology. *Handbook of Experimental Pharmacology*.
- Dolin, R. (1978). Norwalk agent-like particles associated with gastroenteritis in human beings. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 173(5 Pt 2), 615-619.
- Domínguez-Oliva, A., Hernández-Ávalos, I., Martínez-Burnes, J., Olmos-Hernández, A., Verduzco-Mendoza, A., ve Mota-Rojas, D. (2023). The importance of animal models in biomedical research: current insights and applications. *Animals*, 13(7), 1223. <https://doi.org/10.3390/ani13071223>.
- Fallahi, R., Abedini, F., & Shokri, G. R. (2019). Molecular detection of mouse hepatitis virus in laboratory mouse colonies. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*, 11(2). <https://doi.org/10.22067/veterinary.v11i2.77631>.
- Fox, J. G. (2007). The mouse in biomedical research. American College of Laboratory Animal Medicine.
- Grabherr, S., Ludewig, B., & Pikor, N. B. (2021). Insights into coronavirus immunity taught by the murine coronavirus. *European Journal of Immunology*, 51(5), 1062-1070. <https://doi.org/10.1002/eji.202048984>.
- He, J., Hayes, C. G., Binn, L. N., Seriwatana, J., Vaughn, D. W., Kuschner, R. A., & Innis, B. L. (2001). Hepatitis E virus DNA vaccine elicits immunologic memory in mice. *Journal of Biomedical Science*, 8(2), 223–226. <https://doi.org/10.1007/BF02256416>.
- Henderson, K. S. (2008). Murine norovirus, a recently discovered and highly prevalent viral agent of mice. *Lab Animal*, 37(7), 314-320. <https://doi.org/10.1038/labon0708-314>.
- Hickman, D. L., Johnson, J., Vemulapalli, T. H., Crisler, J. R., & Shepherd, R. (2017). Commonly used animal models. *Principles Of Animal Research For Graduate And Undergraduate Students*, 117-175. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802151-4.00007-4>.
- Hsu, C. C., Riley, L. K., Wills, H. M., & Livingston, R. S. (2006). Persistent infection with and serologic cross-reactivity of three novel murine noroviruses. *Comparative Medicine*, 56(4), 247-251.
- Hsu, C. C., Wobus, C. E., Steffen, E. K., Riley, L. K., & Livingston, R. S. (2005). Development of a microsphere-based serologic multiplexed fluorescent immunoassay and a reverse transcriptase PCR assay to detect murine norovirus 1 infection in mice. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(10), 1145-1151. <https://doi.org/10.1128/CDLI.12.10.1145-1151.2005>.
- Huang, F. F., Haqshenas, G., Guenette, D. K., Halbur, P. G., Schommer, S. K., Pierson, F. W., Toth, T. E., & Meng, X. J. (2002). Detection by reverse transcription-pcr and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis e virus from pigs in different geographic regions of the united states. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(4), 1326-1332. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.4.1326-1332.2002>.
- ICTV, 2024. Norovirus cinsi. <https://ictv.global/report/chapter/caliciviridae/caliciviridae/norovirus>.
- Jones, T. C., Popp, J. A., & Mohr, U. (1997). Digestive System. *Monographs on Pathology of Laboratory Animals*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-96910-2_25.
- Karaman, M. (2015). Microbiological standardization in small laboratory animals and recommendations for the monitoring. *Journal of Clinical And Analytical Medicine*, 6(5). <https://doi.org/10.4328/jcam.2195>.
- Karst, S. M., Wobus, C. E., Lay, M., Davidson, J., & Virgin, H. W. (2003). STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science*, 299(5612), 1575-1578. <https://doi.org/10.1126/science.1077905>.
- Kim, J. R., Seok, S. H., Kim, D. J., Baek, M.-W., Na, Y.-R., Han,

- J.-H., Kim, T.-H., Park, J.-H., Turner, P. V., Chung, D. H., & Kang, B.-C. (2011). Prevalence of murine norovirus infection in Korean laboratory animal facilities. *Journal of Veterinary Medical Science*, 73(5), 687-691. <https://doi.org/10.1292/jvms.10-0226>.
- Körner, R. W., Majjouti, M., Alcazar, M. A. A., & Mahabir, E. (2020). Of mice and men: The coronavirus mHv and mouse models as a translational approach to understand SARS-CoV-2. *Viruses*, 12(8), 880. <https://doi.org/10.3390/v12080880>.
- Li, T., Takeda, N., & Miyamura, T. (2001). Oral administration of hepatitis E virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *Vaccine*, 19(25-26), 3476-3484. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(01\)00059-7](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(01)00059-7).
- Mahabir, E., Bauer, B., & Schmidt, J. (2008). Rodent and germplasm trafficking: risks of microbial contamination in a high-tech biomedical world. *Institute for Laboratory Animal Research*, 49(3), 347-355. <https://doi.org/10.1093/ilar.49.3.347>.
- Manivannan, R., Chidambaram, T., Gopal, R., & Ebenezer, K. S. (2024). Microbial diseases of laboratory animals and its monitoring tools. *Journal of Advances in Microbiology*, 24(2), 31-46. <https://doi.org/10.9734/jamb/2024/v24i2794>.
- Mansfield, K. G., Riley, L. K., & Kent, M. L. (2010). Workshop summary: detection, impact, and control of specific pathogens in animal resource facilities. *Institute for Laboratory Animal Research*, 51(2), 171-179. <https://doi.org/10.1093/ilar.51.2.171>.
- Manuel, C. A., Hsu, C. C., Riley, L. K., & Livingston, R. S. (2008). Soiled-bedding sentinel detection of murine norovirus 4. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 47(3), 31-36.
- Matthews, A., Weiss, S., & Paterson, Y. (2002). Murine hepatitis virus-A model for virus-induced CNS demyelination. *Journal of Neurovirology*, 8(2), 76-85. <https://doi.org/10.1080/13550280290049534>.
- Müftüoğlu, B., & Albayrak, H. (2019). Fare, sıçan ve tavşanların viral hastalıkları. *Turkish Veterinary Journal*, 1(2), 84-89.
- Nicklas, W., Kraft, V., & Meyer, B. (1993). Contamination of transplantable tumors, cell lines, and monoclonal antibodies with rodent viruses. *Laboratory Animal Science*, 43(4), 296-300.
- Nicklas, W., Homberger, F. R., Illgen-Wilcke, B., Jacobi, K., Kraft, V., Kunstyr, I., & Pohlmeier-Esch, G. (1999). Implications of infectious agents on results of animal experiments: Report of the Working Group on Hygiene of the Gesellschaft für Versuchstierkunde-Society for Laboratory Animal Science (GV-SOLAS). *Laboratory animals*, 33(suppl 1), 39-87.
- Perdue, K. A., Green, K. Y., Copeland, M., Barron, E., Mandel, M., Faucette, L. J., Williams, E. M., Sosnovtsev, S. V., Elkins, W. R., & Ward, J. M. (2007). Naturally occurring murine norovirus infection in a large research institution. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 46(4), 39-45.
- Porea, D., Raileanu, C., Crivei, L. A., Gotu, V., Savuta, G., & Pavio, N. (2023). First detection of hepatitis E virus (Rocahepevirus ratti Genotype C1) in synanthropic Norway rats (*Rattus norvegicus*) in Romania. *Viruses*, 15(6), 1337. <https://doi.org/10.3390/v15061337>.
- Reuter, G., Boros, Á., & Pankovics, P. (2020). Review of hepatitis E virus in rats: evident risk of species Orthohepevirus C to human zoonotic infection and disease. *Viruses*, 12(10), 1148. <https://doi.org/10.3390/v12101148>.
- Sellers, R. S., Clifford, C. B., Treuting, P. M., & Brayton, C. (2012). Immunological variation between inbred laboratory mouse strains: Points to consider in phenotyping genetically immunomodified mice. *Veterinary Pathology*, 49(1), 32-43. <https://doi.org/10.1177/0300985811429314>.
- Shortland, A., Chettle, J., Archer, J., Wood, K., Bailey, D., Goodfellow, I., Blacklaws, B. A., & Heeney, J. L. (2014). Pathology caused by persistent murine norovirus infection. *The Journal of General Virology*, 95(Pt 2), 413-422. <https://doi.org/10.1099/vir.0.059188-0>.
- Tangudu, C., Olivares, H., Netland, J., Perlman, S., & Gallagher, T. (2007). Severe acute respiratory syndrome coronavirus protein 6 accelerates murine coronavirus infections. *Journal of Virology*, 81(3), 1220-1229. <https://doi.org/10.1128/jvi.01515-06>.
- Timurkan, M. Ö., & Acar, G. (2021). Laboratuvar hayvanlarında sindirim sistemine yerleşen bazı önemli viral enfeksiyonlar. *Journal of Laboratory Animal Science And Practice*, 1(1), 8-16.
- Uludağ, Ö. (2019). Hayvan deneyi çalışmalarında etik kuralların tarihçesi ve önemi. *Adıyaman Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(1), 1401-1413. <https://doi.org/10.30569/adiyamansaglik.482098>.
- Ward, J. M., Wobus, C. E., Thackray, L. B., Erexson, C. R., Faucette, L. J., Belliot, G., Barron, E. L., Sosnovtsev, S. V., & Green, K. Y. (2006). Pathology of immunodeficient mice with naturally occurring murine norovirus infection. *Toxicologic Pathology*, 34(6), 708-715. <https://doi.org/10.1080/01926230600918876>.
- Wobus, C. E., Peiper, A. M., McSweeney, A. M., Young, V. L., Chaika, M., Lane, M. S., Lingemann, M., Deerain, J. M., Strine, M. S., Alfajaro, M. M., Helm, E. W., Karst, S. M., Mackenzie, J. M., Taube, S., Ward, V. K., & Wilen, C. B. (2023). Murine norovirus: Additional protocols for basic and antiviral studies. *Current Protocols*, 3(7), e828.

<https://doi.org/10.1002/cpz1.828>.

Yadav, K. K., Boley, P. A., Lee, C. M., Khatiwada, S., Jung, K., Laocharoensuk, T., Hofstetter, J., Wood, R., Hanson, J., & Kenney, S. P. (2023). Rat hepatitis E virus (HEV) cross-species infection and transmission in pigs. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.07.06.547957>.

Yılmaz, S. (1960). Yurdumuzda yavru atan koyunlardan izole edilen *Listeria monocytogenes*. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(2), 136-144.

Zhou, Y., Hou, Y., Shen, J., Huang, Y., Martin, W., & Cheng, F. (2020). Network-based drug repurposing for novel coronavirus 2019-nCoV/SARS-CoV-2. *Cell Discovery*, 6, 14. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0153-3>.

Hayvan Araştırmalarında Yanlılığı Azaltmak ve Kaliteyi Artırmak İçin Yol Gösterici Olan ARRIVE Kılavuzunun Türkçe Çevirisi Resmi İnternet Sitesinde Yayınlandı

Turkish Translation of the ARRIVE Guidelines, Which Help to Reduce Bias and Improve the Quality of Animal Research, is Published on the Official Website

Halit Güner ORHAN¹
Ariyan TEIMOORI¹
Selda EMRE AYDINGÖZ¹



¹Başkent Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye.



Geliş Tarihi/Received :23.03.2024
Kabul Tarihi/Accepted :28.05.2024
Yayın Tarihi/Publication Date :19.09.2024

Sorumlu Yazar/Corresponding author:

Selda EMRE AYDINGÖZ

E-mail: seldaemre71@yahoo.com

Cite this article: Orhan H.G., Teimoori A., Emre Aydingöz S. (2024). Turkish translation of the ARRIVE Guidelines, which help to reduce bias and improve the quality of animal research, is published on the official website. *Journal of Laboratory Animal Science and Practices*, 4(2), 101-102.



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License.

Sayın Editör,

Bu mektubu, “Hayvan Araştırmaları: İn Vivo Deneylelerin Raporlanması” (Animal Research: Reporting In Vivo Experiments, ARRIVE) kılavuzunun resmi internet sitesi olan <https://arriveguidelines.org/> adresinde kısa bir süre önce yayınlanan, ARRIVE çeviri ekibi ve ekibimizin işbirliği ile çevirisi tamamlanan Türkçe ARRIVE kılavuzu hakkında Türkçe konuşan araştırmacıları bilgilendirmek amacıyla yazıyoruz. Türkçe çevirinin yayınlanmasıyla ARRIVE kılavuzu İngilizce dışında Türkçe dahil, toplam 10 dile çevrilmiş oldu. ARRIVE kılavuzunun Türkçe çevirisinin yayınlanmasının, Türkiye'deki araştırmacılar ve dergiler arasında farkındalığın ve kılavuz uyumun artmasına katkıda bulunacağını düşünüyoruz.

Hayvan araştırmalarında düşük tekrarlanabilirlik ve bulguların kliniğe translasyonu sorunu, bilim çevrelerinde “kriz” olarak tanımlanmaktadır (Macleod & Mohan, 2019). Bu krizin en önemli nedenleri deneysel tasarım ve metodolojideki farklılıklar, yayın yanlılığı ve seçici raporlama, şeffaflık ve veri paylaşımı eksikliği, yetersiz ya da hatalı istatistiksel analiz ve tür farklılıkları olarak sıralanabilir (Frommlet, 2020; Macleod & Mohan, 2019). Bu zorlukların üstesinden gelmek, bilim camiasının ortak çabasını gerektirmektedir (Spanagel, 2022). Önerilen çözümlerden birisi, araştırmanın planlanmasından tamamlanmasına kadar her aşamanın raporlama standartlarını iyileştirmektir. ARRIVE kılavuzu, bu amaç doğrultusunda geliştirilmiştir (Percie du Sert ve ark., 2020a).

ARRIVE kılavuzu, hayvan deneylerine dayanan çalışmaların sonuçlarını bildiren bilimsel yayınlarda yer alması gereken 20 temel maddeden oluşan bir kontrol listesidir. Bu maddeler; çalışmanın amacı, hayvan özellikleri, deneysel süreç, örneklem büyüklüğü, istatistiksel analiz ve sonuçların yorumlanması üzerinedir (Percie du Sert ve ark., 2020a).

ARRIVE kılavuzu ilk olarak 2010 yılında yayınlanmış ve 2020 yılında ARRIVE 2.0 olarak güncellenmiştir (Percie du Sert ve ark., 2020b). Kılavuz, Birleşik Krallık'taki “Hayvan Araştırmalarında Yerine Koyma, İyileştirme ve Azaltma Ulusal Merkezi” (NC3Rs) yönetiminde, hayvan araştırmaları ve bilimsel yayıncılık alanında uzman uluslararası bir grup tarafından geliştirilmiştir (Percie du Sert ve ark., 2020a). Ekip, ARRIVE kılavuzunu geliştirmek için bilim insanları, istatistikçiler, dergi editörleri ve fon sağlayan kurum ve kuruluşlar da dahil olmak üzere çeşitli paydaşlarla işbirliği yapmıştır.

ARRIVE kılavuzunun uygulanması çeşitli avantajlar sunmaktadır. İlk olarak, hayvan araştırmalarının şeffaflığını artırarak başkalarının aynı deneyleri tekrarlamasına olanak tanır. İkinci olarak, çalışma tasarımındaki potansiyel yanlılık veya varyasyon kaynaklarının belirlenmesine yardımcı olarak sonuçların yorumlanmasına yardımcı olur. Üçüncü olarak, hayvanların araştırmalarda sorumlu bir şekilde kullanılmasını teşvik eder ve deneysel protokollerin bu yönde iyileştirilmesine katkıda bulunur (Percie du Sert ve ark., 2020a; 2020b).

ARRIVE kılavuzu ve ilkeleri bilim ve yayın çevrelerinde geniş çapta kabul görmüş olsa da, bazı zorluklar da bulunmaktadır. Bu zorluklardan biri, kılavuza uyumun şu anda zorunlu olmaması nedeniyle dünyada ve Türkiye'deki araştırmacılar arasında değişen kılavuza uyum düzeyleridir (Emre-Aydingoz ve ark., 2022; Jalgaonkar ve ark., 2019; Leung ve ark., 2018). Ayrıca, kılavuz bulguların raporlanmasına odaklanmakta ve yayın yanlılığı veya uygun olmayan istatistiksel yöntemlerin kullanımı gibi tekrarlanabilirlikle ilgili diğer sorunları doğrudan ele almamaktadır (Percie du Sert ve ark., 2020a; 2020b).

Genel olarak kılavuzların yerel dillere çevrilmesinin; erişilebilirliği, kültürel uygunluğu ve araştırmacılar arasındaki farkındalığı artırarak uyumun artmasına katkıda bulunduğu bilinmektedir (Emre-Aydingöz ve ark., 2022; Sousa & Rojjanasrirat, 2011). Türkiye'deki araştırmacılar ve dergiler arasında ARRIVE kılavuzuna uyumu artırmak amacıyla, ekip olarak ARRIVE çeviri ekibiyle işbirliği içinde ARRIVE kılavuzunun Türkçeye çevirisini çok adımlı bir süreci izleyerek gerçekleştirdik. İlk olarak kılavuzun İngilizceden Türkçeye ilk çevirisi; ikinci olarak, bu ilk çevirinin Türkçeden İngilizceye tamamen bağımsız çevirmenler tarafından geri çevirisi; ve son olarak, ARRIVE ekibi tarafından geri çevirinin orijinal İngilizce ile karşılaştırılması yapıldı. Her bir çeviri aşaması birden çok çevirmen tarafından yapılarak çeviriler karşılaştırıldı. Orijinal kılavuz ile geri çeviri kılavuzun ARRIVE ekibi tarafından karşılaştırmasını takiben kılavuzun amaçladığı anlamı korumak için doğru ifadeler üzerinde fikir birliği oluşturmak üzere hem ilk hem de geri çevirmenlerle tartışarak tutarsızlıklar çözüldü. Bu aşamaların tamamlanmasının ardından ARRIVE kılavuzunun Türkçe çevirisi Aralık 2023'te resmi internet adresinde yayınlandı.

Sonuç olarak, ARRIVE kılavuzu hayvan çalışmalarının raporlama kalitesini artırmak için değerli bir araçtır. Şeffaflığı, tekrarlanabilirliği ve sorumlu hayvan kullanımını teşvik ederek hayvan araştırmalarının geçerliliğine ve güvenilirliğine katkıda bulunmaktadır. Ancak bunların uygulanması ve etkisi, araştırmacıların, dergilerin ve kurumların bu kılavuzu benimseme ve etkili bir şekilde uygulama konusundaki istekliliğine bağlıdır. Özellikle dergiler, bu kılavuzların kullanımını zorunlu kılarak ve yazarların tamamlanmış ARRIVE kontrol listesini yayın için bir ön koşul olarak sunmalarını isteyerek çok önemli bir rol oynayabilir. Ayrıca kurumlar, araştırmacıların kılavuzlara aşına olmalarını ve bunları çalışmalarına dahil edebilmelerini sağlamak için onlara eğitim ve destek sağlayabilirler. ARRIVE kılavuzunun Türkçe çevirisinin resmi internet sitesinde yayınlanması, Türkiye'deki araştırmacılar ve dergiler arasında farkındalığın ve kılavuz uyumun artmasına katkıda bulunacaktır.

Yazar Katkıları: Fikir- H.G.O., A.T., S.E.A.; Denetleme- S.E.A.; Literatür Taraması- H.G.O., A.T., S.E.A.; Yazıyı Yazan- S.E.A.; Eleştirel İnceleme- H.G.O., A.T.

Hakem Değerlendirmesi: Bu yazı editöryel değerlendirme sonucunda kabul edilmiştir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan etmiştir.

Finansal Destek: Yazarlar, bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmiştir.

Author Contributions: Concept- H.G.O., A.T., S.E.A.; Supervision- S.E.A.; Literature Search- H.G.O., A.T., S.E.A.;

Writing- S.E.A.; Critical Review- H.G.O., A.T.

Peer Review: This article has been accepted after editorial review.

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Financial Support: The authors declare that they have received no financial support for this study.

Kaynaklar

- Aydingöz, S.E., Efe, O. E. & Çalışkan, G. (2022) Reporting quality of animal studies published in journals listed in ULAKBIM TR index: a systematic review on compliance to the ARRIVE guidelines. *Journal of Research in Pharmacy*; 26(4): 704-713.
- Du Sert, N. P., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., ... & Würbel, H. (2020a). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 40(9), 1769-1777.
- Du Sert, N. P., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., Browne, W. J., ... & Würbel, H. (2020b). Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS Biology*, 18(7), e3000411.
- Frommlet, F. (2020). Improving reproducibility in animal research. *Scientific Reports*, 10(1), 19239.
- Jalgaonkar, S., Mapara, T., Verma, A., & Sayyed, M. (2019). Comparison of adherence to ARRIVE guidelines in animal research articles published in the years 2009 and 2016 in pharmacology journals: an observational study. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 10(3), 77-84.
- Leung, V., Rousseau-Blass, F., Beauchamp, G., & Pang, D. S. (2018). ARRIVE has not ARRIVED: Support for the ARRIVE (Animal Research: Reporting of in vivo Experiments) guidelines does not improve the reporting quality of papers in animal welfare, analgesia or anesthesia. *PLoS one*, 13(5), e0197882.
- Macleod, M., & Mohan, S. (2019). Reproducibility and rigor in animal-based research. *ILAR journal*, 60(1), 17-23.
- Sousa, V. D., & Rojjanasrirat, W. (2011). Translation, adaptation and validation of instruments or scales for use in cross-cultural health care research: a clear and user-friendly guideline. *Journal of Evaluation in Clinical Practice*, 17(2), 268-274.
- Spanagel, R. (2022). Ten points to improve reproducibility and translation of animal research. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 16, 869511.