



**TURKISH JOURNAL**  
*of*  
**IMMUNOLOGY**

**The Official Journal of the Turkish Society  
of Immunology**

**Türk İmmünoloji Dergisi – Volume: 2, Number: 18**

**Supplement (Deneysel Hayvan Modelleri Çalıştayı, 2011), 2012**

## TURKISH JOURNAL OF IMMUNOLOGY

The Official Journal of the Turkish Society of Immunology  
Volume: 1, Number: 18

Deneysel Hayvan Modelleri Çalıştayı, 2011

**Editors-in-Chief:** Gunnur DENİZ, PhD, Professor

**Managing Editor:** H. Barbaros ORAL, MD PhD, Professor

### Editorial Reviewer Board

Ahmet GÜL, Turkey

Aydan İKİNCİOĞULLARI, Turkey  
Caner SUSAL, Germany

Cezmi AKDİŞ, Switzerland  
Dicle GÜÇ, Turkey  
Ender TERZİOĞLU, Turkey  
Gaye ERTEN, Turkey  
Güher SARUHAN DİRESKENELİ, Turkey  
Gülderen YANIKKAYA DEMİREL, Turkey

Haner DİRESKENELİ, Turkey

İlhan TEZCAN, Turkey  
Jagues PILOT, France

Jon D. LAMAN, the Netherlands  
Mahmut ÇARİN, Turkey

Mübeccel AKDİŞ,  
Switzerland  
Necil KÜTÜKÇÜLER, Turkey  
Nerin BAHÇECİLER,  
Republic of Northern  
Cyprus  
Özden SANAL, Turkey  
Peter M. JOHNSON, UK  
Pier L. MELONI, Italy  
Şebnem KILIÇ, Turkey  
Selim Badur, Turkey  
Stanimir KYURKCHIEV,  
Bulgaria  
Stefan KAUFMANN,  
Germany  
Stephen E. CHRISTMAS, UK  
Şefik Şanal ALKAN,  
Switzerland  
Tevfik DORAK, USA  
Yehuda SHOENFELD, Israel

## PROGRAM

### 24 Mayıs 2011 Salı

12:00-15:00 Kayıt

15:30-17:00 **Tanışma (TÜSSİDE Eğitimcileri)**

18:00-19:30 Yemek

19:30-20:30 **Konferans**

Oturum Başkanı: Günnur Deniz

Hayvan Deneylerinde Ana İlkelere Genel Bakış

*Tuncay Altuğ*

### 25 Mayıs 2011 Çarşamba

09:00-10:30 **I. OTURUM: PANEL: Laboratuvar Hayvan Çalışmalarında Etik Yaklaşımlar**

Oturum Başkanı: Haydar Bağış

Hayvan Deneylerinde Standardizasyon Refah, Davranış ve Stresin Deney Sonuçlarına Etkisi

*Tuncay Altuğ*

Deneysel Araştırmalarda Güncel Durum ve Geleceğe Bakış

*Hamit Okur*

Deney Hayvanı Seçimi

*Tayfun İde*

10:30-11:00 Kahve arası

11:00-12:30 **II. OTURUM: PANEL: Allerjik Hastalıklarda Hayvan Modelleri ve İndüklenmiş Hayvan Modelleri**

Oturum Başkanı: Hamit Okur

Akciğer ve Trakea Diseksiyonu

*Dinçer Yıldız*

Allerjik Hastalıklarda Hayvan Modelleri

*Tunç Akkoç*

Deneysel Hayvan Çalışmalarında Modeller ve Bazı  
indüklenmiş Hayvan Modellerinde Örnekler

*Osman Yılmaz*

12:30-14:00

Öğle Yemeği

14:00-15:30

**III. OTURUM: PANEL: Transgenik Hayvan Modelleri**

Oturum Başkanı: Tuncay Altuğ

Balık Antifiriz Geni Taşıyan Transgenik Fare Modelinin  
Oluşturulması ve Kullanılması

*Haydar Bağış*

Hepatit B Yüzey Antijen Geni Taşıyan Transgenik Fare Modelinin  
Oluşturulması ve Kullanılması

*Sezen Arat*

15:30-16:00

Kahve Arası

16:00-17:30

**IV. OTURUM: PANEL: Kanser Hayvan Modelleri ve Timosit  
kültürü**

Oturum Başkanı: Tayfun İde

Deney Hayvanlarında Kanser Modelleri Oluşturulması ve  
Sorunları

*Tuncay Altuğ*

Tedavi Yaklaşımlarının Geliştirilmesinde Deney Hayvanı Kanser  
Modellerinin Yeri

*Güneş Esendağlı*

Primer Timosit Hücre Kültürlerinde Canlılık, ROS ve Ca<sup>2+</sup>i  
Monitorizasyonu

*Bayram Yılmaz*

18:00-20:00

Yemek

**26 Mayıs 2011 Perşembe**

08:30-10:00

**V. OTURUM: PANEL: Parazitolojide ve Mikolojide Hayvan  
Modelleri**

Oturum Başkanı: Barbaros Oral

Protozoolojide Hayvan Modelleri

*Ahmet Özbilgin*

Helmintojide Hayvan Modelleri

*Murat Hekelek*

Mikolojide Hayvan Modelleri (Pneumocystosis, Candidiasis)

*Kenan Değerli*

10:00-10:15

Kahve Arası

10:15-12:15

**VII. OTURUM: PANEL: Sepsis ve Yara Oluşumunda Hayvan Modelleri ve Mikrodiyaliz**

Oturum Başkanı: Bayram Yılmaz

Şok ve Sepsis Modelleri

*Tutku Soyer*

Yara Modelleri

*A. Cemal Aygıt*

Microdialysis, An *in vivo* Technique for Continuously Monitoring Events in Living Tissue

*Bodil Kåller*

Brain Microdialysis and Micropunch Techniques: Sample Collection For Monamine Analysis

*Bayram Yılmaz*

12:15-13:30

Yemek Arası

13:30-15:30

**VIII. OTURUM: PANEL: Nörolojik ve Gastrointestinal Sistem Hayvan Modelleri**

Oturum Başkanı: Güher Saruhan Direskeneli

Nörodejenerasyon - İnflamasyon'da Hayvan Modelleri

*Eda Tahir Turanlı*

Gastrointestinal İnflamasyon Modelleri

*Berrak Yeğen*

Gastrik İmmünopatoloji Modeli ve İmmünregölasyon

*Ayça Sayı*

T lenfosit Gelişiminin Transgenik ve Knockout Fare Modellerinde Çalışılması

*Batu Erman*

15:30-15:45	Kahve Arası
15:45-17:15	<b>VII. OTURUM: PANEL: Çeşitli Metabolik Hastalıklara Deneysel Model Yaklaşımlar</b> Oturum Başkanı: Gaye Erten  Diyabet ve Aterosklerozda Deneysel Modeller <i>Ümit Zeybek</i> Deneysel Langerhans Adacık İzolasyonu <i>Ali Osman Gürol</i> Obezite ve Deneysel Model <i>Aydın Çevik</i>
17:15-18:30	Ekip Çalışması
18:30-20:00	Yemek

### **27 Mayıs 2011 Cuma**

09:00-10:00	AHENK
10:00-11:00	<b>Konferans</b> Oturum Başkanı: Tunç Akkoç Minimum Hayvan Sayısının Belirlenmesi <i>Mesut Akyol</i>
11:00-12:00	<b>Konferans</b> Oturum Başkanı: Işıl Barlan Novel Mouse Model of Food Allergy <i>Hans Oettgen</i>
12:00-13:00	Yemek
13:00-14:00	Değerlendirme ve Kapanış

## Deney Hayvanı Seçimi

**Tayfun İDE, Ali Reha AĞAOĞLU**  
**Gülhane Askeri Tıp Akademisi, AR-GE Merkez Başkanlığı,**  
**Deney Hayvanları Kısmı, Etlik, Ankara**

### Giriş

Hayvan deneyleri hakkında en eski bilgiler Yunan filozof ve fizikçi Aristotle (M.Ö. 384-322) tarafından yazılan metinlerden günümüze ulaşmıştır (1). Ayrıca ilk yazılı tıp kitabı olan *Corpus Hippocraticum*'da (yaklaşık M.Ö. 400) hayvanların, insan vücudunun işleyişini anlayabilmek için kullanıldıklarına ilişkin örnekler bulunmaktadır (2). Erasistarus (M.Ö. 304-250), yaşayan hayvanlar üzerinde ilk bilimsel deneyi gerçekleştirmiştir. Milattan sonra 130-201 yılları arasında Roma'da yaşamış olan doktor ve fizyolog olan Galen; domuz, maymun ve köpeklerde deneyler yapmış ve fizyoloji bilimine büyük katkılar sağlamıştır. Deneysel araştırmaların ilk çağı Galen ile son bulmuş, Ortaçağ Avrupası'nda, kilisenin etkisiyle bilimsel çalışmalar ciddi bir duraklama dönemine girmiş ve bu alandaki gelişmeler de durma noktasına gelmiştir. Deneysel çalışmalar bin yıl kadar bir süre yasaklanmıştır.

Araştırmalarda hayvanların geniş bir biçimde kullanımları geçtiğimiz yüzyılın ortalarında Avrupa'da başlamış ve çok hızlı bir şekilde çalışma alanları büyümüştür. Deney hayvanları modellenerek; fizyoloji, mikrobiyoloji, immünoloji, onkoloji, farmakoloji ve cerrahi gibi birçok biyomedikal alanlarında araştırmalar yapılmakta ve daha sonra insan modellerine geçilmektedir (3).

Bilimin ilerlemesiyle geliştirilen hücre kültürü, matematiksel hesap yöntemleri, simülasyon modelleri gibi *in vitro* yöntemleri, araştırmalarda hayvan kullanılmalı mı? sorusunun oluşmasına yol açmıştır. Ancak geliştirilen bu *in vitro* yöntemlerin kompleksitesinin düşük olması, kısacası etkilenen hücrelerin diğer hücreleri, dokuları, organları hatta tüm organizmayı nasıl etkileyebileceğine yanıt alınamamaktadır. Diğer yandan, oluşturulan hayvan modellerinin, insan davranışları, psikolojisi, yaşam kalitesi gibi konularda bilgi veremeyeceği de kesindir (4). Ancak; "laboratuvar hayvan modeli", normal biyoloji veya davranışların çalışılabilirliği, kendiliğinden gelişen ya da uyarılmış bir patolojinin araştırılabilirliği, biyolojik yönden de insana benzerlik gösteren yegane araştırma modelidir (3).

### İmmünoloji Araştırmalarında Hayvan Modelleri

Hayvan modellerinde yapılacak deneysel çalışmalarda ve yöntemin planlanmasında en önemli nokta, çalışılacak etkenin deneysel hayvan modelinde oluşturduğu enfeksiyonun özelliklerinin, klinik belirtilerinin ve ortaya çıkan immünolojik reaksiyonların insana en yakın özellikte olmasıdır. Hayvan modellerindeki deneysel çalışmaların en önemli dezavantajı, insan patojenlerinin bu modellere inokülasyonunu takiben etkenin deney hayvanına uyumudur. Buna bağlı olarak patojenin yayılması veya replikasyonundan ziyade konağın immün yanıtları analiz edilebilmektedir.

İmmünolojide hayvan modellerinin kullanılması; bağışıklık sisteminin uyum becerisini, yaşlanma sürecinde oluşan değişiklikleri, otoimmün hastalıkların mekanizmalarını ve dejeneratif değişikliklerin nasıl olduğunu anlamamızı sağlar. Bağışıklık sistemi vücuda ait olmayan ve olanı ayırır. Ancak bu durum erken fetal dönemde immün adaptasyon ile engellenir. Yani % 50'si babaya ait olan fetusa immün yanıt oluşmaz. Bu konuda gebelik immünolojisi üzerine yapılan çalışmalar vardır.

İmmünolojide deneysel çalışmalar tasarlanırken; yanıtı aranacak olan sorunun belirlenmesi, yapılabilir bir model olması ve konuyla ilgili en iyi modelin bulunması gereklidir.

Hayvan modeli seçilirken; hayvanın türü, ırkı, soyu, yaşı, cinsiyeti ve çevre faktörlerinin çok iyi belirlenmesi gereklidir. İmmünolojik çalışmalarda, araştırma yöntemi tasarlanırken yapılan en büyük hatalar; melez hayvanların kullanılması, canlı ağırlık ölçümünde yapılan hatalar sonucu yanlış ilaç dozlaması, elde edilen verilerin kayıtları sırasında yapılan hatalar, çevre koşullarının uygun olmaması (ses, ısı, nem, besin ihtiyacı, kafes tipi vb.), ani yem değişiklikleri olarak sıralanabilir (16).

### **İmmünolojide İndüklenmiş Hayvan Modelleri**

İnsanda görülen problemlerin hayvanlarda deneysel olarak oluşturulması olarak da ifade edilebilir. Örneğin, ratlar "streptozotosin" ile uyarılarak diyabet yapılabilirler. Aynı şekilde MPTP uyarısı ile primatlar Parkinson hastalığına tutulabilirler.

### **İmmünolojide Negatif Hayvan Modelleri**

Bu tip modeller; belirli bazı hastalıkların doğal olarak oluşmadığı hayvanları içerir. Örneğin; "opposum" (Avustralya'da yaşayan küçük, keseli bir hayvan) doğal olarak kuduz virüsüne dirençlidir. Rhesus maymunları, hepatit B'ye dirençlidir. Ağaç sıçanları, yılan zehrine karşı bağışıklıdır. Köpek balıkları kansere karşı dayanıklıdır gerbiller ise radyasyondan etkilenmezler.

### **İmmünolojide Spontan Hayvan Modelleri**

Bu modeller kendiliğinden hastalanan ve insan hastalıklarına benzeyen bir seyir gösteren hayvanları kapsar. Örneğin Doberman Pinscher köpekler doğal olarak von Willebrands hastalığına yakalanırlar ya da özel olarak üretilmiş bazı rat ve fare soyları diyabet gibi bazı hastalıklara doğal olarak yakalanırlar.

### **İmmün Yetersizlik (immunodeficiency) Modelleri**

Bu modeller özellikle immünoloji ve onkoloji çalışmalarında kullanılır. Amaç bağışıklık sisteminin hastalık sürecinde üstlendiği rollerin ortaya konmasıdır. Ayrıca tümör hücrelerinin gelişmesi, çoğalması ve yayılması aşamalarının incelenmesinde de kullanılmaktadır (16).

### **Spontan İmmün Yetersizlik Modelleri**

İmmün yetersizlik modeli çalışmalarda en çok genetiği değiştirilmiş hayvanlar kullanılmaktadır. Bu hayvanlarda özellikle; lenfositler, makrofajlar ya da hematolojik faktörlerin yetersizlikleri veya yoklukları söz konusudur. Bu hayvanlara



örnek olarak verilebilecek olan çıplak fare (nude mouse) doğuştan timusu yoktur. Bu durum bu farede T hücrelerinin olmadığı anlamına gelmektedir. Bu nedenlerle bu tip farelerin özel barınma ve beslenme koşullarının sağlanması gereklidir. Bu tip farelerin yanı sıra; B hücre defekti bulunan CBA/N (B hücre proliferasyonu baskılanır), Xid (X bağlantılı immün yetersizlik, bu tip mutasyonda tirozin kinaz enzimi yetersizliği olur. Bu durum B hücre fonksiyonlarını bozar) Asplenik fare soyları bulunmaktadır. B ve T hücre defektleri birlikte bulunan SCID (severe combined immunodeficiency) hastalığına sahip soylar ve doğal öldürücü hücre defektine sahip olan "Beige" soyu fareler bulunmaktadır (16).

### **İndüklenmiş (uyarılmış) İmmün Yetersizlik Hayvan Modelleri**

Bu amaçla kullanılan yöntemler şu şekilde sıralanabilir;

- A. **Cerrahi yöntemler:** Cerrahi yöntemlerle timus bezinin uzaklaştırılması vb.,
- B. **Kimyasal yöntemler:** Toksik ajanlarla DNA veya RNA'nın sentezinin engellenmesi,
- C. **Radyasyon ile uyarma:** Gamma ışınları (kobalt izotopları, sezyum izotopları),
- D. **Transgenik ve knock out teknolojisi:** Spesifik genetik immün yetersizliği olan hayvanların üretilmesi (16).

### **Antikor Üretimi**

- A. **Klasik aşı üretimi:** Hastalık oluşturan organizmalar veya komponentlerinin alıcı hayvanlara verilerek oluşturulan antikorlar ile üretilir.
- B. **Poliklonal antikorlar:** Tavşanlar, koyunlar ve keçiler kullanılır. Deri altı (SC), kas içi (IM) ve intradermal (ID) antijen enjeksiyonları yapılır. Enjeksiyondan 3 hafta sonra serum toplanır ve antikor varlığı araştırılır. Oluşan antikorlar heterojendir.

### **Kanser Modelleri**

#### **Uyarılmış Kanser Modelleri**

Toksinler, virüsler ve diğer bazı uyaranlarla kanser oluşumu sağlanabilir. Doğrudan kanser hücresi enjeksiyonu, kanser oluşumuna neden olacak kimyasalların topikal uygulamaları, aynı soyda bulunan inbred hayvanlar içerisinde spontan oluşmuş bir kanserin bireyler arasında transplantasyonu.

#### **Spontan Oluşan Kanser Modelleri**

Bazı inbred kemirgen soyları doğal olarak kansere yakalanma riskine sahiptirler. Örneğin AKR soyu fareler bir yaşına gelmeden önce % 80 oranında lösemi olmaktadır (16).

### **Uygun Hayvan Modeli Seçiminde Dikkat Edilmesi Gereken Konular**

Hayvan deneylerinden elde edilen bulguların doğruluğu ve geçerliliği uygun bir hayvan modelinin seçilmesine bağlıdır. Araştırma bulgularının insanlara uyarlanabilmesi hayvan tipine, araştırmanın özelliğine ve çalışılan parametrelere bağlıdır. Model olan hayvandan elde edilen bulguların insanlara uyarlanmasına

ilişkin kesin kurallar yoktur. Bununla birlikte, araştırma konusu ile ilgili olarak karşılaştırmalı biyomedikal bilgilere sahip olunmasının yararı vardır (5).

## **Sık Kullanılan Deney Hayvanlarının Genel Biyolojik Özellikleri**

### **Fare**

Biyomedikal araştırmalarda en çok kullanılan memeli türüdür. Ev faresinden (*Mus musculus*) türetilmiştir. Çok sayıda mutasyona sahip olmalarından dolayı genetik çalışmalarda en çok tercih edilen tür olmuştur. Dünyada araştırma amacıyla yetiştirilen, *inbred* ve *outbred* olmak üzere 400 değişik fare soyu bulunmaktadır. Farelerin *inbred* soyları arasında anatomik ve fizyolojik farklar bulunur. Yapılacak olan araştırmalar doğrultusunda çeşitli özelliklere sahip özelleşmiş fare soyları üretilmiştir. Bu fareler başlıca; kanser, immünoloji, aşı yapımı gibi alanlarda kullanılmaktadırlar.

Boyları kuyruk uzunluğu ile birlikte 12-15 cm. arasında değişmektedir. Bedenleri kısa ve sert kıllarla kaplıdır. Kuyrukları uzun ve kılsızdır. İskelet sistemleri; kafatası, omurga, sternum, pektoral kuşak, pelvik çatı ve iki çift ekstremiteden oluşur. Ön ayaklarda 4, arka ayaklarda 5 parmak bulunur. Omurga formülleri; 7C 13T 6L 4S 28C, diş formülleri ise; 1/1-0/0-0/0-3/3 şeklindedir.

Solunum sistemi üç ana bölüme ayrılmaktadır. Anterior bölge; nostril, nazal boşluk, nazofarinksten oluşur. İntermediyer bölge; larinks, trachea ve bronşlardan, posterior bölge ise; akciğerlerden oluşmaktadır. Sol akciğer lobu tek, sağ akciğer lobu dört loptan oluşur.

Kalpleri dört odacıklıdır, sistolik kan basıncı 84-105 mm Hg, kalp atım sayısı dakikada 310-840'dır.

Dişi reproduktif organları; bir çift ovaryum ve oviduktlar, uterus, serviks, vagina, klitoris ve klitoral bezlerden oluşmaktadır. Dişiler, beş çift meme bezine sahiptirler. Bunların üç çifti servikotorasik bölgede, iki çifti inguinoabdominal bölgede yer alır. Erkek reproduktif organları ise bir çift testis, uretra, penis ve eklenti bez ve kanallarından oluşur. Dişiler 3 haftalıkken, ovaryumlarında folikül gelişimi başlar. Cinsel olgunluğa ise 6 haftalıkken ulaşırlar. Fareler poliöstrik hayvanlardır. Östrus siklusları 4-5 gün sürer. Fareler spontan ovulasyon gösterirler.

Fertil bir çiftleşme sonrası gerçekleşen gebelik; 19-21 gün sürer. Yeni doğanlar yaklaşık olarak 3 hafta süt emerler (6).

### **Sıçan (rat)**

Deneyel araştırmalarda kullanılan sıçanlar, *Rattus norvegicus*'tan köken almışlardır. Bu amaçla üretilen ilk sıçan soyu Philedelphia'da bulunan Wistar Enstitüsü'nde üretilmiştir. Günümüzde araştırmalarda kullanılan *inbred* soyların büyük bölümü Wistar Albino soyundan köken almıştır.

Sıçanlar; temel tıp, farmakoloji, gıda, davranış gibi alanlarda yapılan araştırmalarda kullanılmaktadır. Genetik olarak tanımlanmış yaklaşık 400 inbred ve 50 outbred soy bulunmaktadır.

Sıçanlarda orbitanın medialinde yerleşmiş "Harderian bezleri" bulunmaktadır. Bu bezler porfirin içeren kırmızı-kahverengi salgı üretirler. Sağlıklı hayvanlar normalde bu salgılarını temizlerler. Hayvanlar strese girdiği zaman (beslenememe, dehidratasyon, hastalık, çevresel faktörler vs.) ise bu işlem aksar. Klinik olarak bu durum ratların sağlık durumları hakkında bilgi veren bir gösterge olarak kabul edilir. Boyları kuyruk uzunluğu ile birlikte 20-25 cm arasında değişmektedir. Araştırmalarda en çok kullanılan ikinci bir ırk olan Sprague-Dawley, Wistar sıçanlardan daha büyüktür. Kuyrukları uzun ve kılsızdır. İskelet sistemleri; kafatası, omurga, sternum, pektoral kuşak, pelvik çatı ve iki çift ekstremiteden oluşur. Omurga formülleri; 7C 13T 6L 4S 27-30C, diş formülleri ise; 1/1-0/0-0/0-3/3 şeklindedir. Mideleri iki bölüme ayrılır; bunlardan kardiyak bölüm, glandüler yapılarla sahip değilken, pilorik bölüm glandüler bir yapıya sahiptir. Akciğerler, solda tek loblu sağda dört loblu olmak üzere yerleşmiştir. Akciğer lobları kalbi her yönden sarar. Kalbin yalnızca kranioventral yüzü serbesttir (11).

## **Kobay**

Deney hayvanı olarak kullanılan kobayların (Guinea pig) ana yurdu Güney Amerika'dır. Kobaylar özellikle; anafaksi, astım, gnotobiyotikler, immünoloji, enfeksiyöz ve nutrisyonel hastalıkların araştırmalarında kullanılırlar. Tüm Caviidae'ler, ön ayaklarında dört arka ayaklarında üç parmağa sahiptirler. Burunları küt ve kısadır. Büyük bir kafaları, büyük kulakları, inguinal bölgede bir çift memeleri ve vestigial kuyrukları vardır. Boyları 25 cm kadardır. Kısa tüylüler, beyaz, siyah, kahverengi, kırmızı vb. renklere ve bunların ikili üçlü alacalılarına sahip olabilirler ve "İngiliz Kobayı" olarak adlandırılırlar. Uzun tüylüler ise; "Habeşistan Kobayı" olarak adlandırılırlar. Diş formülleri; 1/1-0/0-1/1-3/3 şeklindedir. Öğütücü dişleri, çapraz biçimde eğik ve çene hareketleri önden arkaya doğrudur. Hem kesici hem de öğütücü dişleri sürekli uzama eğilimindedir (hypodontic). Omurga formülleri; 7C 13-14T 6L 3-4S 7C şeklindedir. Akciğerler kalbi sol ventrikül ve kulakçıklar açıkta kalacak şekilde sarar. Mide karaciğerin gerisinde yer alır. Tek midelidirler. Büyükçe bir sekumları vardır. Genellikle 4-7 yıl yaşarlar. Kobaylar, çevre koşullarına, özellikle nem ve sıcaklığa çok duyarlıdırlar. % 70 ve üstünde nem ve 28°C ısının üstündeki sıcaklıklara tolerans gösteremezler. Bakteriyel enfeksiyonlara karşı aşırı duyarlıdırlar. Penisilin ve türevleri kobaylar için öldürücü olabilir. Kortikosteroidlerden çok az etkilenirler ve histamin kobaylarda ölümle sonuçlanabilecek bronşiyal spazmlara yol açabilir. Kobaylar, insan ve diğer primatlar gibi C vitamini sentezleyemezler. Bu nedenle rasyonlarında C vitamini bulunmak zorundadır.

Kobaylar mevsime bağlı poliöstrik hayvanlardır. Östrusta, dişilerin vaginasını kapatan zar açılır. Bu nedenle kolay ayırt edilirler. Çiftleşme sonrası kobaylarda da vaginal tıpa oluşur. Doğum öncesi symphysis pubis ayrılır ve doğum kanalı genişler. Yavrular gelişmiş olarak doğarlar. Diğer kemirgenlere oranlar uzun bir gebelik süresine sahiptirler (ortalama 68 gün) (7).

## Tavşan

Evcilleştirilmiş ve deneysel çalışmalarda kullanılan Yeni Zellanda soyu, *Oryctolagus cuniculi*'den köken almıştır. Diş formülleri 2/1-0/0-3/3-3/3 şeklindedir. Dişleri sürekli uzama eğilimindedir. Üst dudakları yarıktır. Ağızları rölatif olarak, küçüktür, ağız boşluğu ve farinks uzun ve dardır. Mide gastrointestinal kanalın % 15'ini oluşturacak şekilde büyüktür. Sekum midenin yaklaşık on katı büyüklüktedir. Karaciğerleri dört lobludur. Farinks, uzun ve dardır. Akciğerler, ikişer adet kranial, intermediyal ve kaudal lop olmak üzere altı lopludur. Sağ böbrek sol böbreğe göre daha kranialde yer alır. İdrarları, amonyum magnezyum fosfat ve kalsiyum karbonat monohidrat yoğunluğunun fazla olması nedeniyle normal olarak bulanıktır. İdrar, sarı-kahverengi arasında değişir, albüminüri normaldir ve idrar baziktir (pH: 8.2). Dişilerde uterus iki kornudan oluşmuştur. Her bir kornunun kendisine ait serviksi vardır. Ovulasyon kendiliğinden oluşmaz. Ovulasyon çiftleşmeyle birlikte "provake ovulasyon" şeklinde oluşur. Gebelik yaklaşık olarak 30-33 gün sürer (8).

## Koyun

Koyunlar (*Ovis aries*) birçok ırk ve alt ırka sahip yüksek varyasyon gösteren hayvanlardır. Sahip oldukları ırk özellikleri dışında genel hatlarıyla koyun; çift tırnaklı bir ruminanttır (geviş getiren hayvan). Diş formülleri; 3/0 – 0/0 – 3/3 – 3/3, omurga formülleri; 7C 13T 6-7L 4S 16-18Co şeklindedir. Dört midelidirler (rumen, retikulum, omazum, abomazum). Sol akciğer üç, sağ akciğer ise 4-5 lopludur. Karaciğerleri 3 lopludur.

Koyunlar mevsime bağlı poliöstrik hayvanlardır. Seksüel aktiviteleri kuzey yarım kürede günlerin kısalmaya başlamasıyla başlar. Ülkemizde, Ekim-Kasım aylarında seksüel sezona giren koyunlar bu dönemde çiftleştikten yaklaşık 150 gün sonra doğururlar (9, 10).

## Domuz

*Sus scrofa*, günümüzde bilinen birçok domuz ırkına kaynak oluşturmaktadır. Biyomedikal araştırmalarda kullanılan domuzlar, genellikle ilaç, aşı ve gıda araştırmaları için tercih edilmektedirler. Ayrıca, insanlarla anatomik ve fizyolojik benzerliklere sahip olmalarından ötürü deri, iskelet, gastrointestinal sistem, pankreas, böbrek, kalp damar sistemleri ile ilgili çalışmalarda hayvan modeli olarak tercih edilmektedirler.

Domuzlar tek mideli ve omnivordurlar. Diş formülleri; 3/3 – 1/1 – 4/4 – 3/3 şeklindedir. Köpek dişleri yukarı doğru kıvrılmıştır ve içleri boştur. Bu dişler sürekli uzama eğilimindedir. Omurga formülü 7C 14-15T 6-7L 4S 20-23Co şeklindedir. Çift tırnaklı hayvan grubundadırlar. Sol akciğer 3, sağ akciğer 4 lopludur. Karaciğer 5 lopludur. Dişilerde, bir çift ovaryum ve ovidukt, uterus bicornis, serviks, vagina ve vulva bulunur. Erkeklerde, bir çift testis, vesicula seminalis, prostat, Cowper bezleri ve penis bulunur. Evcil domuzlar, poliöstrik hayvanlardır. 21 gün arayla östrus gösterirler (9, 10).

## Anahtar Elementin Belirlenmesi ve Tür Seçimi

Çalışmaya başlamadan önce, araştırmanın temelini oluşturacak bilimsel yöntem, soru ve varsayımların net olarak ortaya konulması, çalışma için seçilecek

olan hayvan modelinin belirlenebilmesi için önemlidir. Bu elementin belirlenmesi, çalışmanın devamı için zorunludur. Anahtar element; hastalıklı mı sağlıklı mı, gelişmekte olan mı, erişkin mi yoksa yaşlı mı gibi soruların yanıtlarını kapsamaktadır. Hastalıklı hayvanlar kullanılacaksa, hastalık indüklenmiş bir modelin mi yoksa spontan gelişen bir modelin mi daha uygun olduğu sorusunun da yanıtının verilmesi gerekir.

Hayvan modeli belirlemede izlenecek aşamalar kısaca şu şekilde özetlenebilir;

- I. Temel anahtar sorunun tanımlanması,
- II. Temel anahtar elementin ne olması gerektiğine karar verilmesi,
- III. Temel anahtar elementin, hangi hayvan hangi ırk ve hangi soyda bulunduğu belirlenmesi,
- IV. Anahtar elementi içeren hangi hayvan tür/soyunun teknik olarak daha avantajlı olduğu ve deneysel işlemlerden hangi hayvanın en az düzeyde rahatsızlık hissedeceğinin belirlenmesi,
- V. Hayvanların temini, barındırılması, bakımı, takibi, literatür bilgileri, hayvanlarla ilgili deneyim gibi uygulamada karşılaşılabilecek olan faktörlerin belirlenip gözden geçirilmesi,
- VI. Bilimsel, uygulama ve etik yönlerden uygun bir hayvan modelinin seçilmesi (5).

Genel olarak deneysel çalışmalarda kullanılacak olan hayvanların fiziksel büyüklükleri arttıkça kullanılacak hayvan sayısı azalır. Çok sayıda özellik araştırılacaksa, büyük hayvan kullanıldığında ölçüm tahmini artıyorsa, istatistiksel olarak hassasiyeti daha az olan analizler sonuç verme açısından yeterli oluyorsa, daha az sayıda ve daha büyük hayvanlar kullanılabilir. Bu durumun yanı sıra, genetik olarak birçok varyasyonlara sahip olan fareler daha çok genetik çalışmalarda, ratlar ise normal kontrollü deneylerde tercih edilmektedirler (11).

### **Hayvanların Sağlık Durumları**

Bilimsel çalışmalarda kullanılan hayvanların sağlık durumlarının kötü olması, deneysel çalışmaların sonuçlarını olumsuz etkileyebilir. Tüm laboratuvar hayvanlarında çeşitli viral, bakteriyolojik ve paraziter nedenli hastalıklar bulunmaktadır. Bu hastalıklar klinik veya subklinik olarak seyrederler ve hayvanların yaşam sürelerini kısaltmak, deneysel çalışmaların sonuçlarının hatalı olmasına yol açmak ve bazı zoonotik etkenler aracılığıyla çalışmacılara bu hastalıkları bulaştırmak gibi durumlara neden olurlar. Klinik veya subklinik hastalığı bulunan hayvanlar çok yüksek oranda değişkenlik göstereceği için istatistiksel olarak bir sonuca varmak zor olmakta, sonuçlar ya anlamlı olmamakta ya da daha çok hayvan kullanımını gerektirmektedir. Bu nedenlerle hasta hayvanların bilimsel çalışmalarda kullanılması etik açıdan sakıncalıdır (11).

SPF (Specific patogen free) hayvanlar tüm önemli patojenlerden arındırılmış hayvanlardır. SPF hayvanlar, mümkün olan her çalışmada hem daha ekonomik hem de daha güvenilir sonuçlar vereceği için tercih edilmelidirler (11). SPF fare, rat, tavşan ve diğer bazı türler birçok ticari üreticiden kolaylıkla elde edilebilmektedir.

### **Genetik Tiplendirme**

Fare ve sıçanlar genetik olarak üç ana sınıfa ayrılırlar;

- I. Genetik olarak tanımlanmamış "outbred" stoklar
- II. Genetik olarak tanımlanmış izogenik soylar (inbred, kongenik, konsomik, rekombinant inbred soylar ve F1 hibridler)
- III. Genetik olarak kısmen tanımlanmış soylar (mutant ve transgenler) (12).

Bu sınıflar içerisinde, değişik özellikleri bulunan birçok farklı soy ve stokları bulunmaktadır. Bir araştırma için uygun özelliklere sahip soyun belirlenmesi uzun bir süreci kapsayabilir. Örneğin hipertansiyon, spesifik bir tümör veya diyabet gibi istenen özelliklerinden dolayı özel bir soy, mutant veya transgenik soylar tercih edilebilir.

## **Laboratuvar Hayvanlarının Temel Sınıflarının Özellikleri**

### **Outbred Soylar**

Genel olarak, özellikle bir tiplendirme yapılmadıkça, genotipleri hakkında kısıtlı bilgilere sahip olunan veya hiç bilgi bulunmayan hayvanlardır. Outbred bir stok; başka stok veya soylardan yeni hayvan girişinin olmadığı, kapalı bir koloni halinde barındırılan, genetik olarak heterojen bir dağılım gösteren hayvan grubudur. Temel avantajları; satın alma veya üretimlerinin ucuz olmasıdır.

Outbred soylar; genotipin önemli olmadığı çalışmalarda kullanılırlar. Ayrıca; izogenik alternatiflerin bulunmadığı türlerde ve araştırmacıların izogenik soyların avantajlarından haberdar olmamaları durumunda da kullanılmaktadır (12).

Outbred soyların bilimsel araştırmalarda kullanımları her geçen gün azalmaktadır. Bunun nedenleri; fenotipik olarak izogenik soylardan daha çok varyasyona sahiptirler. İstatistikî sonuçlara varabilmek için daha fazla sayılarda kullanılmaları, uygun standartlarda tutulmadıklarında birkaç jenerasyon içinde ciddi genetik kayıplar oluşması olarak sıralanabilir (11).

### **İzogenik Soylar**

Bu sınıftaki hayvanlar; inbred, F1 hibrid, kongenik ve konsomik soylar ile monozygous ikizlerdir. Bu soyların en önemli özelliği her bireyin genotipinin bir veya daha fazla bireyde replikasyonudur. İnbred soylar, 20 ve daha fazla ardışık jenerasyon erkek ve dişi kardeşlerin çiftleştirilmesiyle elde edilir (F20). Yirmi veya daha fazla jenerasyon boyunca tüm yavrular tek bir atasal çifte kadar geri izlenebilir. Böyle inbred üretilen soylar izogenik (genetik olarak tanımlanmış) soylar olarak tanımlanır. Soylar fenotipik olarak tek tip olma eğilimindedirler. Bu soylar birçok jenerasyon boyunca stabil olarak kalırlar ve önemli bir kısmı genotiplendirilmiş durumdadır. Her soy için köken, geçmiş genotipik ve fenotipik bilgiler mevcuttur (12).

Dünya üzerinde 400'den fazla fare, 200'den fazla rat inbred soyu bulunmaktadır. İzogenik soyların kullanıldığı araştırmaların % 80'inden fazlası en popüler 10 soy üzerinde yapılmıştır. Her soy kendine özgü özellikler taşımaktadır. Bazı soylar yüksek oranda kanser insidensi gösterirken bazıları da kalp hastalıklarına predispozisyon gösterirler. Örneğin, AKR fare soyuna ait bireyler, uzun süren araştırmalarda kullanılmamalıdır. Çünkü bu farelerin büyük bölümü bir yaşına gelmeden lösemiden ölürlere (12).

İzogenik soylar kullanılan araştırmalar başka laboratuvarlarda da tekrarlanabilir. İzogenik soylara bazı özel rakam ve sayılar verilmiştir. Bu nedenle izogenik soylarla yapılan araştırmaların yayınlanması aşamasında, bu hayvanlara ait nomenklatur doğru bir şekilde verilmiştir. Bu nomenklatur kuralları; [www.informatics.jax.org](http://www.informatics.jax.org) internet sayfasında bulunmaktadır.

İzogenik soylar fenotipik olarak outbred soylara göre bir örnektirler. Bu nedenle anlamlı bir istatistik sonuç elde edebilmek için daha az sayıda izogenik hayvana ihtiyaç vardır.

Kongenik, konsomik ve rekombinant inbred soylar izogenik soyların özel tipleridir. Kongenik soylar; iki inbred soyun, 5-10 jenerasyon geriye melezlenmesiyle elde edilir. Genetik bir özellik bu şekilde devamlı geri melezleme ile bir inbred soya aktarılabilir. Kongenik soylar genellikle transplantasyon immünolojisinde, kanser araştırmalarında, diyabet, hipertansiyon araştırmaları yapılan çalışmalarda kullanılırlar.

Konsomik soylar; bir kromozomun başka bir inbred soyun homolog kromozomuyla yer değiştirmesi sonucu oluşturulurlar. Rekombinant soylar ise iki farklı inbred soyun melezlerinin F2 jenerasyonuna ait bireyleri arasında yapılan öz kardeş birleştirmesiyle üretilmiş soylardır (13).

### **Bakım ve Barınma Koşulları**

Yapılan deneysel çalışmaların sonuçlarını, deney hayvanlarının barındırıldığı ortam, kafeslerin durumu, altlıklar ve beslenme gibi çevresel faktörler de etkileyebilmektedir (14, 15, 16).

Hayvanların beslenmesinde kullanılan yemlerin, muhtemel kontaminasyonlara karşı kontrollerin yapıldığı, profesyonel üreticilerden alınması gerekir. Kemirgen yemleri, hayvanların metabolik ihtiyaçlarına göre formüle edilmiş; gebelik ve doğum sonrası laktasyon döneminde artan ihtiyaçları karşılar özellikte olmalıdır (11).

Tek başına barındırılan hayvanlar; grup halinde barındırılan hayvanlara oranla daha değişken vücut ağırlıklarına sahiptirler. Bu nedenle bir örneklik açısından gruplar halinde barındırma tercih edilmelidir (17).

### **Sonuç**

Sonuç olarak immünolojik araştırmalar yapılacak hayvan deneylerinde, klinik ve subklinik olarak hastalıklardan arındırılmış, genetik tanımlaması yapılmış (izogenik, mutant, transgenik vb.) iyi bakım ve besleme koşullarına sahip, iyi kalitede hayvanlar kullanılmalıdır. Böylece daha az sayıda hayvan kullanılacak, sonuçlar daha güvenilir olacak ve yapılan deney herhangi başka bir laboratuvarda tekrarlanabilir özelliklere sahip olacaktır.

### **Kaynaklar**

1. Loew FM, Cohen BJ Laboratory Animal Medicine: Historical Perspectives. In: Fox JG, Anderson LC, Loew FM, Quimby FW eds. Laboratory Animal Medicine 2nd Edition, American College of Laboratory Animal Medicine Series, 2002; 1-16.
2. İde T. Giriş In: Translation ed. İde T, Laboratuvar Hayvanları Biliminin Temel İlkeleri Türkçe Çeviri, Zupthen LFM, Baumans V, Beynen AC, Ankara: Medipres Yayınları-Ozkan Matbaacılık: 2003; 1-11.

3. Salen J. Animal models, principles and problems. In: Svendsen P, Hau ed. Handbook of Laboratory Animal Science Vol. II Animal Models, Boca Raton, Florida: CRC Press: 1994; 1-6.
4. Gnadt BJ. Ethical and Legal Perspectives. In: Suckow MA, Wiesbroth SH, Franklin CL ed. The Laboratory Rat, Elsevier Academic Press, U.S.A, 54-68.
5. İde T. Hayvan Modelleri In: Translation ed. İde T, Laboratuvar Hayvanları Biliminin Temel İlkeleri Türkçe Çeviri, Zupthen LFM, Baumans V, Beynen AC, Ankara: Medipres Yayınları-Ozkan Matbaacılık: 2003; 187-194.
6. Jacoby RO, Fox JG, Davisson M. Biology and Diseases of Mice. In: Fox JG, Anderson LC, Loew FM, Quimby FW ed. Laboratory Animal Medicine 2<sup>nd</sup> Edition, American College of Laboratory Animal Medicine Series, 2002; 35-113.
7. Harkness JE, Murray KA, Wagner JE. Biology and Diseases of Guinea Pigs In: Fox JG, Anderson LC, Loew FM, Quimby FW ed. Laboratory Animal Medicine 2<sup>nd</sup> Edition, American College of Laboratory Animal Medicine Series, 2002; 203-241.
8. Suckow MA, Brammer DW, Rush HG, Chrisp CE. Biology and Diseases of Rabbits In: Fox JG, Anderson LC, Loew FM, Quimby FW ed. Laboratory Animal Medicine 2<sup>nd</sup> Edition, American College of Laboratory Animal Medicine Series, 2002; 329-358.
9. İde T. Laboratuvar Hayvanlarının Biyolojisi, Yetiştirme ve Barındırılması In: Translation ed. İde T, Laboratuvar Hayvanları Biliminin Temel İlkeleri Türkçe Çeviri, Zupthen LFM, Baumans V, Beynen AC, Ankara: Medipres Yayınları-Ozkan Matbaacılık, 2003; 19-76.
10. İde T, Kozak O. Deney Hayvanlarının Genel Biyolojisi. In: Özmen MM, Besim H, Korkmaz A ed. Türk Cerrahi Derneği 1. Uygulamalı Deneysel Cerrahi Kursu Kitapçığı, Ankara: Öncü Basımevi; 1-18.
11. Festing MFW, Overend P, Das RG, Borja MC, Berdoy M. The Desing of Animal Experiments. London: The Royal Society of Medicine Pres Limited, 2008; 17-28.
12. Festing MFW. Laboratory Animal Genetics and Genetic Quality Control. In: Hau J, Van Hooiser GL ed. Handbook of Laboratory Animal Science 2<sup>nd</sup> Edition Vol 1 Essential Principles and Practices, Boca Raton, Florida: CRC Pres, 2003;173-203.
13. İde T. Genetik Standartlaştırma. In: Translation ed. İde T, Laboratuvar Hayvanları Biliminin Temel İlkeleri Türkçe Çeviri, Zupthen LFM, Baumans V, Beynen AC, Ankara: Medipres Yayınları-Ozkan Matbaacılık, 2003; 127-145.
14. Mulder JB. Bedding preferences of pregnant laboratory reared mice. Behavior Research Methods&Instrumentation, 1975; 7:21-22.
15. Odynets A, Simonova O, Kozuhov A T. Saitsev, A. Verreva, L. Gnilomedova, and R. Rudzish. Beddings for laboratory animals: criteria of biological evaluation. Laboratornye Zhyvotnye, 1991; 1:70-76.
16. Höglund AU, Renström A. Evaluation of individually ventilated cage systems for laboratory rodents: cage environment and animal health aspects. Lab Anim, 2001; 35(1):51-57.
17. Van Loo PL, Van Zupthen LF, Baumans V Male management: Coping with aggression problems in male laboratory mice. Lab Anim, 2003; 37(4):300-313.
18. Harn, D. Model design [www.montana.edu/wwwarc/Micro%20501/model%20design.ppt](http://www.montana.edu/wwwarc/Micro%20501/model%20design.ppt) 2006; Erişim tarihi: 13.04.2011.



## **Animal Models of Asthma**

**Tunç AKKOÇ**

***Marmara University Medical Faculty, Pediatric Allergy and Immunology  
Department, İstanbul, Turkey***

### **Summary**

Allergic disease such as asthma, rhinitis, and eczema are increasing prevalence and affect up to 15 % of population in Westernized countries. Among them, asthma is a chronic inflammatory disease of airways and the underlying physiological and immunological processes are not fully understood. Mouse models of asthma duplicates many features of human asthma, including airway hyperreactivity, and airway inflammation. Therefore, relevant models for asthma are important to understand the mechanism of disease and therapeutic approach. In this article, basically various animal models of asthma and some therapeutic approaches are discussed.

### **Introduction**

The prevalence of allergic diseases such as allergic asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis and food allergy are rapidly increasing mostly in Westernized countries, with the prevalence over % 30 in childhood (1, 2). Human allergic asthma is a chronic inflammatory disorder of the airways and is characterized by airway inflammation, persistent airway hyperresponsiveness (AHR) and intermittent, reversible airways obstruction (3). Additional histopathological features of asthma are structural changes in airways including subepithelial and airway wall fibrosis, goblet cell hyperplasia/metaplasia, smooth muscle thickening and increased vascularity, that are shown not to be reversed by corticosteroids (4, 5). These structural changes referred as 'airway remodelling' and result with repeated exposure to allergen, that lead to chronic inflammation in the airways (6).

Although, today there are several therapeutic and preventive approaches discussing for allergic asthma, there is still important part left to be understood. Because of the ethical reasons, clinical studies with allergic individuals are limited and experimental murine models became more important for drug treatment studies.

Animal models, especially mouse models, have been developed for almost all allergic diseases as asthma (7), allergic rhinitis (8), food allergy and anaphylaxis (9), atopic dermatitis (10), and allergic conjunctivitis (11). These murine models are important in order to examine the mechanism of the disease, the activity of a variety of genes and cellular pathways, and to predict the safety of new drugs or chemicals before being used in clinical studies (12). As a result, animal models have been developed to study pathogenesis of the diseases, including genetic factors, to define the pathogenic pathways and suggest new therapeutic views (13). This review focuses on the murine models of asthma and discusses current therapeutic approaches carried on mouse models of asthma.

## **Immune Response to Allergens**

Immune tolerance cannot be established to certain allergens such as, aeorallergens, foods and insect venom, leads to induction of type I hypersensitivity reactions. Several factors, including genetic susceptibility, the nature of antigen, that initiates the disease (antigen dose, time of exposure, route of exposure, and structural characteristics), and challenge with infections and bacteria, (14) influence the type of immune response.

The initial event responsible for the development of allergic disease is the generation of allergen-specific CD4<sup>+</sup> T helper cells. Depending on the stimulus, naive T cells can differentiate into Th1, Th2, Th17 or recently suggested Th9 effector cells. Based on these T-cell subsets, the immune system can promote different types of inflammatory responses. The current view is that with the IL-4 stimulation in an appropriate condition, naive T cells easily differentiate into T helper (Th) 2 cells (15, 16). Once Th2 response is established, further allergic immune response may establish in two main phases: first sensitization and development of memory and later followed by effector phase and tissue injury. In sensitization phase, CD4<sup>+</sup> Th2 cells secrete IL-4, IL-5 and IL-13 and mediate several regulatory and effector functions. These cytokines induce class switching of antibody isotypes to the  $\epsilon$  heavy chain for IgE antibody production by B cells, development and recruitment of eosinophils, production of mucus and contraction of smooth muscles (15-17). Later, this allergen specific IgE, binds to high affinity receptor for IgE (Fc $\epsilon$ RI receptors) on the surface of mast cells and basophils. These series of activation lead to the sensitization of the patients to a specific allergen. In the final phase, upon the re-exposure to sensitized allergens, effector cells are activated and tissue injury occurs. Here, the degranulation of basophils and mast cells by IgE mediated by crosslinking of receptors that is the crucial event in the type I hypersensitivity, which may lead to chronic allergic inflammation. All these events require allergen specific T cell activation in allergic individuals and for healthy ones, peripheral T cell tolerance prevents formation of atopic immunopathology.

## **Animals Used in Allergic Asthma Models**

Experimental studies revealed that, there is wide variety of animal models of asthma in different species. Mice, rats, guinea pigs, dogs, sheep, monkeys and horses have been employed to study the inflammatory processes and alternations in airway function (18-20).

Within these animals, mice are the most common animal studied in models of asthma. We will discuss mouse models of asthma later in this review.

Although a majority of studies of allergic airway disease are carried out in the mouse, the guinea pig initially was utilized as an animal model of pulmonary hypersensitivity and AHR for many decades (21). Studies with guinea pig showed increased IgG1 and IgE in response to allergen and hyperreactivity reaction due to allergen sensitization. Model studies showed, allergen sensitization requires allergen inhalation. One of the benefits of the model is that the lung serves as the primary target organ of type I hypersensitivity reactions to allergen. Further immediate and late phase reactions are also seen in carried asthma models. Another advantage of the asthma model with guinea pigs is the rich eosinophilic and neutrophilic pulmonary infiltration. On the other hand, one of the major

disadvantages in guinea pig is the predominance of IgG1 rather than IgE as the major anaphylactic antibody (22).

In several studies, investigators have been used another small rodent, rat, for allergic animal models. Allergen specific IgE production is predominant and plays crucial role in anaphylaxis. Once, asthma model with rat developed, there is long-lasting airway hyperreactivity. Also immediate- and late-phase airway responses established in the successful asthma model. In comparison with guinea pig asthma model, sensitization requires injection of allergen, rather than administration via the inhalation route (23, 24).

The rabbit elicit an asthma model and lung is the target organ for anaphylactic response as humans. Moreover, both immediate- and late-phase airway responses are seen with the increased IgE which is the anaphylactic antibody.

Although, larger animals such as monkey, sheep and horses have been used in asthma models, they are hard to handle and too expensive in order to use on regular basis.

### **Mouse Models of Asthma**

Mice are the most common animals studied in animal models of asthma. In principle, mice are systemically sensitized to allergen with alum as an adjuvant via intraperitoneal injection and challenged to allergen via the airways. The nature of acute inflammatory mouse model directly influenced by the genetic background of the mice, the allergen, the sensitization and challenge protocol (6).

### **Genetic Background of Mice**

In laboratory conditions, it is available to get various inbred mouse strains. However, it is inappropriate to develop asthma model with all these mouse strains. Based on the level of allergen-specific IgE/IgG1 production and the degree of airway inflammation following repeated airway allergen challenges, high- and low-responder mouse strains were identified. Each different mouse strain shows different response patterns following immunization to allergens. There is difference in the ability to induce allergic inflammation and AHR within those mouse strains. A/J and AKR/J mice bear high levels of allergen-induced AHR and reactivity to metacholine (25) while, C3H/HeJ and DBA/2 mice are resistant to the development of allergen-induced AHR (26).

In many studies, either BALB/c or C57BL/6 mice were used. BALB/c mice are known as IgE-high responders to many allergens (e.g. Ovalbumin, Bet v 1) and goat anti-mouse IgD-stimulation, whereas C57BL/6 mice is characterized as a low-IgE responder animal (27). Supportingly, several experimental mouse models with BALB/c strain, showed well developed Ovalbumin (OVA) induced allergic immune response with allergen-specific IgE, AHR and eosinophilic airway inflammation (4). On the other side, C57BL/6 mice exhibit Th1-dominant immune response compared to BALB/c mice.

## Allergen

In order to perform murine asthma model, different types of allergens may be used. Among them, OVA derived from chicken egg is a frequently used allergen that induce robust, allergic pulmonary inflammation in mice (28). There are some advantages to use OVA in models such as considerably inexpensive, can be highly purified, the immunodominant epitopes have been well characterized, and recombinant peptides have been generated (29).

The way of allergen administration is important in developing asthma model without induction of tolerance. Especially, repeated inhalation or sublingual administration of OVA induces tolerance instead of sensitization. For priming allergen sensitization, allergen should be given combined with adjuvant and via intraperitoneal injection (30). Following sensitization, a series of inhaled or intranasal challenges are administered to elicit allergic response. OVA-induced allergic airway models may not represent the same conditions experienced by asthmatics where allergen exposure may be more frequent and much longer periods of time (28). However, OVA is seldom implicated in human asthma, and other groups have used alternative allergens that have greater clinical relevance, for example house dust mite (HDM) and cockroach extracts (31, 32).

## Sensitization and Challenge Protocols

Mice do not spontaneously develop AHR or allergic airway inflammation. There are many different sensitization and challenge protocols existing. Due to experimental approach, acute or chronic asthma models may be developed. Acute sensitization protocols usually require multiple systemic administration of allergen in the presence of an adjuvant. Aluminium hydroxide (Al(OH)<sub>3</sub>) is one of the best choice for adjuvant in case, it promotes the development of the Th2 immune response when it is exposed to antigen. Although there are adjuvant-free protocols, they usually require a greater number of exposures to achieve suitable sensitization (33). Both OVA and HDM can be used as an antigen to induce pulmonary inflammation. If OVA administered via inhalation instead of systemic delivery, tolerance can develop. However, inhaled delivery of HDM seems to be more successful in developing allergy model because of intrinsic enzymatic activity of this allergen. Extracts or purified protein derived from potent human allergens including cockroach, ragweed or fungi have been increasingly used as allergens in mice and other species (34-36). After sensitization period (usually 14-21 days), allergen challenge via airways will be carried out for several days. The administration of allergen through airways may be applied by nebulization, intratracheal (i.t) or intranasal (i.n.) instillation (4). With these sensitization and challenge protocols mice develop key features of clinical asthma, as increased levels of allergen specific and total IgE, inflammatory cell infiltration to airways which referred as airway inflammation, goblet cell hyperplasia, epithelial hypertrophy, AHR to specific sensitized allergens or metacholine, early- and late-phase bronchoconstriction in response to allergen challenge (37) (Fig. 1).

Although acute allergen challenge model develops many aspects of human asthma, there are limitations to these models in comparison with asthmatics. For this, several research groups have developed chronic allergen challenge models in order to reproduce more of the features of clinical asthma, such as goblet cell

metaplasia, epithelial hypertrophy, subepithelial fibrosis and limited smooth muscle hyperplasia which together referred as airway remodelling and persistent AHR (4, 33). In order to develop chronic asthma model, low levels of allergen should be repeatedly exposed to the airways for periods up to 12 weeks. Mostly in experimental models, OVA has been used as an allergen (38-40) and in some experimental models environmentally relevant antigens such as, HDM extract or grass pollen have been used to develop chronic allergen challenge asthma models (31, 41).

## **Regulatory T Cells in Murine Models in Allergic Inflammation**

T cells with the capacity of suppressing the unwanted immune response were first described in the beginning of 1970s (42). Since mid-1990s, the notion of the T-cell-mediated immune suppression has been strongly explored. T cells with suppressive ability have been described in several systems, and their biology has been subject of intensive investigation. Although recent advances of T cells controlling immune responses via cell-cell interactions and/or the production of cytokines is currently well described, many aspects of the mechanisms through which suppressor cells exert their effects are currently being elucidated (43-45).

### **Type-1 T Regulatory Cells**

Type-1 regulatory (Tr1) cells, also known as inducible Tregs, are defined by their ability to produce high levels of IL-10 and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (43, 46). Antigen-specific Tr1 cells arise *in vivo*, but may also differentiate from naive CD4<sup>+</sup> T cells. IL-10 and IFN- $\alpha$  have been described to induce the generation of IL-10-producing Tr1 cells from naive CD4<sup>+</sup> T cells activated through T cell receptor and CD28 (47). In order to inhibit Th1 or Th2 differentiation by using anti-IL-12 and anti-IL-4 Abs, together with a combination of dexamethasone and the active form of vitamin D3, were shown to induce human and naive CD4<sup>+</sup> T cells to differentiate into large numbers of IL-10-producing Tr1 cells *in vitro* (48). In addition, immature DCs and DCs treated with IL-10 or IFN- $\alpha$  were shown to induce naive CD4<sup>+</sup> T cells to differentiate into IL-10-producing Tr1 cells (47, 49, 50). Activation of inducible costimulator (ICOS) on CD4<sup>+</sup> T cells by ICOS ligand (ICOSL) enhances differentiation into IL-10-producing Tr1 cells (51-53). During the early course of allergen-specific immunotherapy (SIT), IL-10- and/or TGF- $\beta$ -producing Tr1 cells in humans are propagated *in vivo*, which demonstrates that Tr1 cells are induced by high and increasing dose of allergens (44, 54-55). IL-10 that is produced and progressively secreted during allergen-SIT appears to counter-regulate synthesis of allergen-specific IgE and IgG (46). IL-10 potently suppresses both total and allergen-specific IgE, and it simultaneously increases IgG4 production (56). In control of Th2 immune response against naturally exposed harmless environmental antigens is mediated by Tr1 cell (57). In contrast to several Treg related suppressor factors, OX40L has an important role in the negative regulation of the generation and function of IL-10-producing Tr1 cells (58).

### **CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg Cells**

The naturally occurring CD4<sup>+</sup> Treg cells, constitute approximately 10 % of peripheral CD4<sup>+</sup> T cells in normal individuals, and characteristically express CD25

(the interleukin-2 (IL-2) receptor  $\alpha$  chain, that is component of the high-affinity IL-2 receptor) (59). CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg cells play major role in maintaining immunological self-tolerance and immune homeostasis. Depletion of this population leads to a variety of autoimmune inflammatory disease such as arthritis and diabetes.

The transcription factor forkhead box p3 (Foxp3) is successfully expressed by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg cells and essential for functioning regulatory activity. Foxp3 was originally identified as the gene product affected in lethal X-linked recessive lymphoproliferative disease in mice and human (60). Mutations in the gene encoding Foxp3 leads to lymphoproliferative disease of the scurfy mouse. Male mice with Foxp3 deficiency die about third week of age (61, 62). Foxp3 deficient mice also experience allergic dysregulation (63). Adoptive transfer of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg cells rescues scurfy mice from disease, and Foxp3-transduced CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells suppressed wasting and colitis induced by transfer of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells into RAG-deficient mice (61, 64). Foxp3 mutations also results homologous autoimmune lymphoproliferative disorder in human subjects, termed immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy-X-linked (IPEX) syndrome and X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome (XLAAD) (65-67). Males represent with neonatal autoimmune type 1 diabetes with islet cell destruction by infiltrating T cells. Another prominent feature of IPEX/XLAAD is severe allergic inflammation with eczema and food allergy. The IgE levels can be dramatically increased with intense peripheral eosinophilia (66-68).

Numerous additional evidence support the role of Foxp3 in Treg cells generation and function. Foxp3-transduced T cells exhibited impaired proliferation and production of cytokines including IL-2 and IL-10 upon TCR stimulation, up-regulated the expression of regulatory T cell-associated molecules such as CD25 and CTLA-4 and suppressed *in vitro* proliferation of other T cells in a cell-cell contact-dependent manner (69, 70). Foxp3 negatively regulates the gene encoding IL-2 and enhances CD25 expression and other Treg cell-associated molecules (69, 71-72). Mice genetically deficient in IL-2, CD25, or CD122 (the IL-2 receptor  $\beta$  chain) and humans with genetic deficiency of CD25 have both reduced numbers and impaired function of Foxp3<sup>+</sup> Treg cells. This leads to severe autoimmune inflammatory disease (69, 73-74). Foxp3 binds to other transcription factors such as NFAT (nuclear factor of activated T cells) and AML1 (acute leukemia-a)/Runx1 (Runt-related transcription factor 1) and potentially interacts with activator protein 1 and nuclear factor  $\kappa$ B (75). The interaction of Foxp3 with NFAT leads the expression of CTLA-4 and CD25 (76). Recently, thymic production of Foxp3<sup>+</sup> Treg cells was analyzed from birth to 10 years of age in humans. The study suggests that from birth to 10 years of age, the thymic production of Foxp3<sup>+</sup> Treg cells is stable and correlates with T-lymphopoiesis. However, there is no correlation between thymic and peripheral Foxp3 levels (77). Taken together Foxp3 is a crucial regulatory gene for the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells, and can be used as marker for Treg cells. Furthermore, Treg cells *de novo* produced from normal naive T cells by Foxp3 transduction can be instrumental for treatment of autoimmune/inflammatory diseases that require downregulation of hyperactive immune responses.

Downregulated interleukin-7 receptor (CD127) in Treg cells distinguishes Treg cells from activated T cells, facilitating both Treg-cell purification and their

functional characterization in human diseases (78). CD127 has been suggested as a marker, which might distinguish peripheral Foxp3<sup>+</sup> Treg cells from activated Foxp3<sup>+</sup> nonregulatory T cells (79).

Animal model studies have shown that, naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg cells can control allergic airway disease. Anti-CD25-mediated Treg cell depletion before house dust mite treatment increased several features of the allergic disease (AHR, eosinophilia, and IgE), which was concomitant with elevated Th2 cytokine production (80). In this study, Treg cell-depleted mice revealed increased numbers of pulmonary MDCs with elevated expression of MHCII, CD80 and CD86. In addition Treg cell-depleted mice have capability to stimulate proliferation of T cells and Th2 type cytokine production with a reduced IL-2 expression. Furthermore, transfer of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells to sensitized mice prevents the features of allergic airway disease *in vivo* (81). This downregulation of eosinophils, Th2 recruitment, AHR and Th2 cytokine production paralleled with concomitant increase in pulmonary IL-10 production. These studies highlight that CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg cells may be used before allergic sensitization to control the development of allergic disease.

In an allergic airway inflammation model with Der p 1 antigen showed that depletion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg cells exacerbates lung eosinophilia, increased draining mediastinal lymph node IL-5 and IL-13, but not IL-10 secretion (82). Transfer of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg cells from naive mice reverses allergic inflammation with decreasing IL-5 and IL-13 secretion. In parallel experiment increased IL-10 secretion from regional lymph nodes was observed. In a recent study from our group, it was showed that *in-vivo* CD25 neutralization do not decrease OVA-specific IgE in intranasal OVA immunotherapy group (Fig. 2, Unpublished data).

One of the mechanisms to induce mucosal tolerance is to increase antigen-specific Treg cells. Using birch pollen allergen intranasally (Bet v 1) before (prophylaxis) or after sensitization (treatment) resulted in increased Foxp3 mRNA expression in CD4<sup>+</sup>T cells with IL-10 and TGF-β secretion. A prolonged effect was observed 1 year after immunotherapy. Long-term efficacy of specific tolerance seems to be associated with the presence of Foxp3<sup>+</sup> T cells (83).

It was previously reported that high levels of the soluble form of the IL-6R (sIL-6R) stimulates CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg cell suppressive function in the airways of asthmatic subjects (84). Blockade of IL-6 *in vivo* induced local expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> lung Treg cells with increased immunosuppressive capacities (85). Again, blockade of IL-6 led to a significant decrease in inflammatory cells by an apoptosis-independent mechanism. In another study, local treatment with anti-IL-6R antibodies that also block signaling via the membrane-bound IL-6R (mIL-6R), which led to decreased signal transducers and activators of transcription (STAT)-3 but not STAT-1 phosphorylation in the lung of treated mice. Moreover, this treatment induces apoptosis of the cells present in the airways of OVA-treated mice as well as apoptosis of lung CD4<sup>+</sup> effector T cells. Blockade of mIL-6R signaling leads to cell death of lung effector T cells by activating Treg cells in experimental model of asthma (86). These recent data suggest that local targeting of IL-6R signaling upregulates Th2 cell death in allergic airways via Treg cells.

Sublingual administration of two different tricyclated pseudo-dipeptidic molecules modulates Th1/Treg polarization. While both OM-197-MP-AC and OM-294-BA-MP polarize naive T cells toward the Th1 type with IFN- $\gamma$  production, only OM-294-BA-MP induces IL-10 gene expression on CD4<sup>+</sup> naive T cells (87). In this study, sublingual administration of OM-294-BA-MP with antigen enhances tolerance in OVA sensitized BALB/c with preventing both airways hyperresponsiveness and lung inflammation. In another study, adjuvants stimulating IL-10 gene expression by human or murine immune cells are tested sublingually in BALB/c mice sensitized to OVA. A combination of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 plus dexamethasone (VitD3/Dex) as well as *Lactobacillus plantarum* induce IL-10 production by human and murine DCs. Following stimulation with VitD3/Dex-pretreated DCs, CD4<sup>+</sup> naive T cells exhibit a Foxp3<sup>+</sup>Treg cells (88).

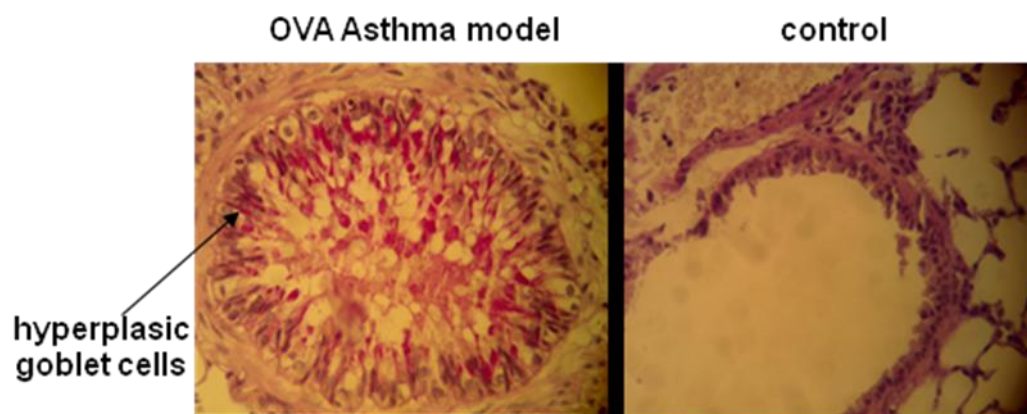
## Conclusion

Animal models of allergic disease such as, AR, AD, food allergy, allergic conjunctivitis and allergic asthma are valuable models in laboratory studies. Although those models cannot carry all clinical features itself, they are important in order to understand entire mechanisms of the disease and therapeutic approaches. Especially mouse models are being developed to model asthma exacerbations, and investigators are using acute and chronic allergen challenge in their investigations.

Animal models which are more closely reflect asthma, and use of human system will boarden our knowledge of the disease and help identify and evaluate new therapeutic targets.

## Acknowledgments

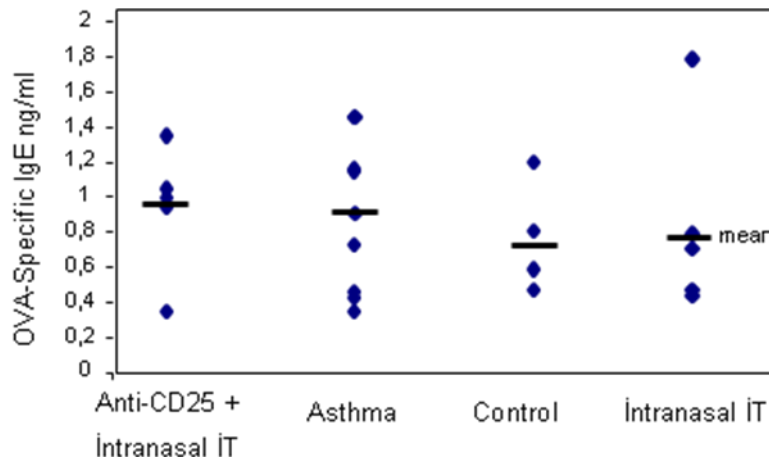
This work was founded by Marmara University research project BAPKO No. SAĞ-A-070808-0204



airways of airways. PAS staining / 40x

**Figure 1.** PAS stained lung sections of all groups (40x)





**Figure 2.** OVA-specific IgE levels

## References

1. Asher MI, Montefort S, Bjorksten B, et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*, 2006; 368:733-743.
2. Janson C, Anto J, Burney P, et al. The European Community Respiratory Health Survey: what are the main results so far? *European Community Respiratory Health Survey II. Eur Respir J*, 2001; 18:598-611.
3. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000; 161:1720-1745.
4. Akkoc T, Tolunay S, Barlan I, Basaran M. Airway remodeling and serum total immunoglobulin E (IgE) levels in a murine model of asthma. *J Asthma*, 2001; 38:585-591.
5. Fish JE, Peters SP. Airway remodeling and persistent airway obstruction in asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 1999; 104:509-516.
6. Zosky GR, Sly PD. Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy*, 2007; 37:973-88.
7. Nials AT, Uddin S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Dis Model Mech*, 2008; 1:213-220.
8. Wagner JG, Harkema JR. Rodent models of allergic rhinitis: relevance to human pathophysiology. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2007; 7:134-140.
9. Dearman RJ, Kimber I. A mouse model for food allergy using intraperitoneal sensitization. *Methods*, 2007; 41:91-98.
10. Jin H, He R, Oyoshi M, Geha RS. Animal models of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 2009; 129:31-40.
11. Niederkorn JY. Immune regulatory mechanisms in allergic conjunctivitis: insights from mouse models. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2008; 8:472-476.
12. Karol MH. Animal models of occupational asthma. *Eur Respir J*, 1994; 7:555-568.
13. Bice DE, Seagrave J, Green FH. Animal models of asthma: potential usefulness for studying health effects of inhaled particles. *Inhal Toxicol*, 2000; 12:829-862.

14. Akdis M, Akdis CA. Therapeutic manipulation of immune tolerance in allergic disease. *Nat Rev Drug Discov*, 2009; 8:645-660.
15. Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol*, 1994; 12:227-257.
16. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*, 1996; 17:138-146.
17. Corry DB. IL-13 in allergy: home at last. *Curr Opin Immunol*, 1999; 11:610-614.
18. Schneider T, van Velzen D, Moqbel R, Issekutz AC. Kinetics and quantitation of eosinophil and neutrophil recruitment to allergic lung inflammation in a brown Norway rat model. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997; 17:702-712.
19. Bautsch W, Hoymann HG, Zhang Q, et al. Cutting edge: guinea pigs with a natural C3a-receptor defect exhibit decreased bronchoconstriction in allergic airway disease: evidence for an involvement of the C3a anaphylatoxin in the pathogenesis of asthma. *J Immunol*, 2000; 165:5401-5405.
20. Shin YS, Takeda K, Gelfand EW. Understanding asthma using animal models. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2009; 1:10-18.
21. Noelpp B, Noelpp-Eschenhagen I. Experimental bronchial asthma in the guinea pig. IV. Experimental asthma in the guinea pig as an experimental model. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1952; 3:207-217.
22. Ricciardolo FL, Nijkamp F, De Rose V, Folkerts G. The guinea pig as an animal model for asthma. *Curr Drug Targets*, 2008; 9:452-465.
23. Watanabe A, Hayashi H. Allergen-induced biphasic bronchoconstriction in rats. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1990; 93: 26-34.
24. Bellofiore S, Martin JG. Antigen challenge of sensitized rats increases airway responsiveness to methacholine. *J Appl Physiol*, 1988; 65:1642-1646.
25. Ewart SL, Kuperman D, Schadt E, et al. Quantitative trait loci controlling allergen-induced airway hyperresponsiveness in inbred mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000; 23:537-545.
26. McIntire JJ, Umetsu SE, Akbari O, et al. Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nat Immunol*, 2001; 2:1109-1116.
27. Herz U, Renz H, Wiedermann U. Animal models of type I allergy using recombinant allergens. *Methods*, 2004; 32:271-280.
28. Kumar RK, Herbert C, Foster PS. The "classical" ovalbumin challenge model of asthma in mice. *Curr Drug Targets*, 2008; 9:485-494.
29. Fuchs B, Braun A. Improved mouse models of allergy and allergic asthma - chances beyond ovalbumin. *Curr Drug Targets*, 2008; 9:495-502.
30. Conrad ML, Yildirim AO, Sonar SS, et al. Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. *Clin Exp Allergy*, 2009; 39:1246-1254.
31. Johnson JR, Wiley RE, Fattouh R, et al. Continuous exposure to house dust mite elicits chronic airway inflammation and structural remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004; 169:378-385.
32. Sarpong SB, Zhang LY, Kleeberger SR. A novel mouse model of experimental asthma. *Int Arch Allergy Immunol*, 2003; 132:346-354.
33. Blyth DI, Pedrick MS, Savage TJ, Hessel EM, Fattah D. Lung inflammation and epithelial changes in a murine model of atopic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996; 14:425-438.
34. Barrett EG, Rudolph K, Bowen LE, Muggenburg BA, Bice DE. Effect of inhaled ultrafine carbon particles on the allergic airway response in ragweed-sensitized dogs. *Inhal Toxicol*, 2003; 15:151-165.

35. Kurup VP, Choi H, Murali PS, Resnick A, Fink JN, Coffman RL. Role of particulate antigens of *Aspergillus* in murine eosinophilia. *Int Arch Allergy Immunol*, 1997; 112:270-278.
36. Chapoval SP, Iijima K, Marietta EV, et al. Allergic inflammatory response to short ragweed allergenic extract in HLA-DQ transgenic mice lacking CD4 gene. *J Immunol*, 2002; 168:890-899.
37. Takeda K, Gelfand EW. Mouse models of allergic diseases. *Curr Opin Immunol*, 2009; 21:660-665.
38. Fernandez-Rodriguez S, Ford WR, Broadley KJ, Kidd EJ. Establishing the phenotype in novel acute and chronic murine models of allergic asthma. *Int Immunopharmacol*, 2008; 8:756-763.
39. Temelkovski J, Hogan SP, Shepherd DP, Foster PS, Kumar RK. An improved murine model of asthma: selective airway inflammation, epithelial lesions and increased methacholine responsiveness following chronic exposure to aerosolised allergen. *Thorax*, 1998; 53:849-856.
40. Wegmann M. Animal models of chronic experimental asthma - strategies for the identification of new therapeutic targets. *J Occup Med Toxicol*, 2008; 3 Suppl 1:S4.
41. Kim CH, Ahn JH, Kim SJ, et al. Co-administration of vaccination with DNA encoding T cell epitope on the Der p and BCG inhibited airway remodeling in a murine model of chronic asthma. *J Asthma*, 2006; 43:345-353.
42. Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*, 1970; 18:723-737.
43. Groux H, O'Garra A, Bigler M, et al. A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 1997; 389:737-742.
44. Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wuthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest*, 1998; 102:98-106.
45. Akdis CA, Blaser K. IL-10-induced anergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokines: two key steps in specific immunotherapy. *Faseb J*, 1999; 13:603-609.
46. Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 2007; 119:780-791.
47. Levings MK, Gregori S, Tresoldi E, Cazzaniga S, Bonini C, Roncarolo MG. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tr cells. *Blood*, 2005; 105:1162-1169.
48. Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, et al. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med*, 2002; 195:603-616.
49. De Smedt T, Van Mechelen M, De Becker G, Urbain J, Leo O, Moser M. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol*, 1997; 27:1229-1235.
50. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med*, 2000; 192:1213-1222.
51. Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH, et al. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med*, 2002; 8:1024-1032.

52. Beier KC, Hutloff A, Dittrich AM, et al. Induction, binding specificity and function of human ICOS. *Eur J Immunol*, 2000; 30:3707-3717.
53. Witsch EJ, Peiser M, Hutloff A, et al. ICOS and CD28 reversely regulate IL-10 on re-activation of human effector T cells with mature dendritic cells. *Eur J Immunol*, 2002; 32:2680-2686.
54. Jutel M, Akdis M, Budak F, et al. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol*, 2003; 33:1205-1214.
55. Nasser SM, Ying S, Meng Q, Kay AB, Ewan PW. Interleukin-10 levels increase in cutaneous biopsies of patients undergoing wasp venom immunotherapy. *Eur J Immunol*, 2001; 31:3704-3713.
56. Punnonen J, de Waal Malefyt R, van Vlasselaer P, Gauchat JF, de Vries JE. IL-10 and viral IL-10 prevent IL-4-induced IgE synthesis by inhibiting the accessory cell function of monocytes. *J Immunol*, 1993; 151:1280-289.
57. Akdis M, Verhagen J, Taylor A, et al. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med*, 2004; 199:1567-1575.
58. Ito T, Wang YH, Duramad O, et al. OX40 ligand shuts down IL-10-producing regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006; 103:13138-13143.
59. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*, 2000; 101:455-458.
60. Godfrey VL, Wilkinson JE, Russell LB. X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse. *Am J Pathol*, 1991; 138:1379-1387.
61. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 2003; 4:330-336.
62. Lyon MF, Peters J, Glenister PH, Ball S, Wright E. The scurfy mouse mutant has previously unrecognized hematological abnormalities and resembles Wiskott-Aldrich syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990; 87:2433-2437.
63. Lin W, Truong N, Grossman WJ, et al. Allergic dysregulation and hyperimmunoglobulinemia E in Foxp3 mutant mice. *J Allergy Clin Immunol*, 2005; 116:1106-1115.
64. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol*, 2003; 4:337-342.
65. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*, 2001; 27:20-21.
66. Chatila TA, Blaeser F, Ho N, et al. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest*, 2000; 106:R75-81.
67. Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet*, 2002; 39:537-545.
68. Nieves DS, Phipps RP, Pollock SJ, et al. Dermatologic and immunologic findings in the immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome. *Arch Dermatol*, 2004; 140:466-472.
69. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 2003; 299:1057-1061.
70. Yagi H, Nomura T, Nakamura K, et al. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol*, 2004; 16:1643-1656.

71. Gavin M, Rudensky A. Control of immune homeostasis by naturally arising regulatory CD4+ T cells. *Curr Opin Immunol*, 2003; 15:690-696.
72. Sakaguchi S, Powrie F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science*, 2007; 317:627-629.
73. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol*, 2005; 6:1142-1151.
74. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*, 2005; 6:345-352.
75. Ziegler SF. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol*, 2006; 24:209-226.
76. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, et al. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell*, 2006; 126:375-387.
77. Tuovinen H, Laurinolli TT, Rossi LH, Pekkarinen PT, Mattila I, Arstila TP. Thymic production of human FOXP3(+) regulatory T cells is stable but does not correlate with peripheral FOXP3 expression. *Immunol Lett*, 2008; 117(2):146-153.
78. Tiemessen MM, Jagger AL, Evans HG, van Herwijnen MJ, John S, Taams LS. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007; 104:19446-19451.
79. Di Ianni M, Del Papa B, De Ioanni M, et al. Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Exp Hematol*, 2008; 36:309-318.
80. Lewkowich IP, Herman NS, Schleifer KW, et al. CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *J Exp Med*, 2005; 202:1549-1561.
81. Kearley J, Barker JE, Robinson DS, Lloyd CM. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J Exp Med*, 2005; 202:1539-1547.
82. Leech MD, Benson RA, De Vries A, Fitch PM, Howie SE. Resolution of Der p1-induced allergic airway inflammation is dependent on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory cells. *J Immunol*, 2007; 179:7050-7058.
83. Winkler B, Hufnagl K, Spittler A, et al. The role of Foxp3+ T cells in long-term efficacy of prophylactic and therapeutic mucosal tolerance induction in mice. *Allergy*, 2006; 61:173-180.
84. Doganci A, Sauer K, Karwot R, Finotto S. Pathological role of IL-6 in the experimental allergic bronchial asthma in mice. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2005; 28:257-270.
85. Doganci A, Eigenbrod T, Krug N, et al. The IL-6R alpha chain controls lung CD4+CD25+ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo. *J Clin Invest*, 2005; 115:313-325.
86. Finotto S, Eigenbrod T, Karwot R, et al. Local blockade of IL-6R signaling induces lung CD4+ T cell apoptosis in a murine model of asthma via regulatory T cells. *Int Immunol*, 2007; 19:685-693.
87. Mascarell L, Van Overtvelt L, Lombardi V, et al. A synthetic triacylated pseudo-dipeptide molecule promotes Th1/TReg immune responses and enhances tolerance induction via the sublingual route. *Vaccine*, 2007; 26:108-118.
88. Van Overtvelt L, Lombardi V, Razafindratsita A, et al. IL-10-inducing adjuvants enhance sublingual immunotherapy efficacy in a murine asthma model. *Int Arch Allergy Immunol*, 2008; 145:152-162.

## **DeneySEL Hayvan Modeli ve Bazı indüklenmiş Hayvan Modelleri**

**Osman YILMAZ**

**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir, Türkiye**

Tabiatta olmuş, olan ya da olması muhtemel olayların laboratuvar şartlarında kontrollü olarak ortaya konulmasına ve incelenmesine DENEYSEL ARAŞTIRMA denir. DeneySEL çalışmalar klinik öncesi veya klinik çalışmalar olarak ikiye ayrılabilir. Genel olarak hayvan modellerini fizyolojik modeller ve insan hastalıkları modelleri olarak ayırmak mümkündür (1).

Bir model, kurulan bir hipotezin açıklanması, bir oluşum süreci ve mekanizması anlamak için kurulan ya da oluşturulan düzenlemelere denir. Modeller temsil ettikleri gerçek olayların hep belli basitleştirmeler ve varsayımlar bulundurmaktadır. Bir hayvan model seçimli, deneySEL çalışma tasarımında en önemli basamaklardan biridir. Bu durum sadece canlı hayvan çalışmaları için değil aynı zamanda *in vitro* çalışmaları içinde geçerlidir. Bir hayvan modelinde karmaşık bir "biyolojik sistem" olarak tanımlanır, bu nedenle seçim sürecinde kendi özellikleri denemenin gereksinimleri ile eşleşen ve yeterince tüm çalışma süresince takip edilebilen bileşenleri içerir.

Fizyolojik modeller, outbred hayvanlar, inbred hayvanlar ve genetik tanımlanmış hayvanlar olmak üzere üç kategoride toplanabilir. Outbred hayvanlar olarak bugün kullanılan fare, sıçan, tavşan, hamster, kobay, koyun, köpek, keçi ve domuz gibi türler ve alt soyları bulunmaktadır. İnbred hayvanlar bugün en çok fare ve sıçanlar kullanılmakla beraber tavuk ve gunie pig kısmen inbred olarak kullanılmaktadır. Bunlardan başka genetik olarak tanımlanmış F1 hibritleri, koizenik ve kongenik soylar da bulunmaktadır.

İnsan hastalık modelleri ise insanda karşılaşılan ya da karşılaşılmaması muhtemel bir hastalığı patolojisini açıklamak ya da bir tedavi stratejisi geliştirmek amacıyla geliştirilmiş modellerdir. İzomorfik modeller, bu modelde etiyolojik ve fizyopatolojik proseten ziyade klinik semptomları dikkate alınmaktadır. Örneğin ratlarda streptozotosin verilerek pankreas beta hücrelerindeki lezyonun yarattığı tip I diyabet incelenmesi için kullanılmaktadır. Öte yandan homolog modelleri benzer bir etiyoloji sahip modellerdir. Burada diyabet oluşturmak için insanlarda olduğu gibi virüslerin kullanılması ve diyabet oluşturulması sözkonusudur.

İnsan hastalık modelleri; inbred soylar, poligenik modeller, monogenik modeller (obezite, diyabet, gibi tek gen ile transgenetik olarak yapılan modeller), indüklenmiş modeller (cerrahi, toksik ajan vb.) ve kombine modeller (insandaki tümörü nude mice aktarılması) olarak toplanması mümkündür (1).

Genel olarak hayvan modellerini 4 grupta toplamak mümkündür; ( 2, 3)

### **Model Tipleri**

- Spontan (kendiliğinden gelişen) modeller
- Negatif modeller
- Olası modeller
- İndüklenmiş (uyarılmış) modeller

- **Spontan (kendiliğinden gelişen) modeller**

- Genetik nedenlerle kendiliğinden gelişen ve insanlardaki hastalığa benzer patoloji ve semptomlar gösteren modellerdir. Değişik tür ve ırk hayvanlarda bu şekilde oluşan birçok hastalık vardır. Bu tip modeller hem inbred hem de randonbred soylarda gözlenebilir.
- Migaki, deneysel olarak indüklenmemiş fakat hayvanlarda doğuştan metabolik bozukluklara bağlı 206 hastalık bildirmiştir (1982).

- **Negatif modeller**

- Belirli bir hastalığın kesinlikle gelişmediği hayvan türü, ırkı veya soylarıdır.
- Belirli bir hastalık veya tepkinin şekillenmemesinin araştırılıp çözülmesi bilimsel anlamda büyük yararlar sağlar.

- **Olası modeller**

- Modele esas teşkil eden hastalık ilk önce-insanlardan ziyade-hayvanlarda görülmüş ve tanımlanmıştır.
- Daha sonra insanlarda da tanımlanabilir amacıyla çalışılan modellerdir.
- Malign epitel tümörlerindeki papilloma virüsü, lenfoproliferatif bir ajan olan Marek hastalığı virüsü.

- **İndüklenmiş (uyarılmış) modeller**

- Gerek cerrahi olarak gerekse biyolojik aktivitesi olan maddelerin hayvanlara verilmesiyle belirli bir hastalık veya bozukluk oluşturulan modellerdir.
- Oluşan patolojinin hedef organizmada görülenlere etiyolojik, patolojik ve semptomatik olarak benzemesi gerekir.
- Transgenik hayvanlar alt gruptur.

## **Hayvan Modellerinin Seçimi**

1. Çalışmayla ilgili hedefleri ve bununla ilintili beklentilerin karşılaması,
2. Tüm uygun modellerin gözden geçirilmesi,
3. En uygun hayvan modeli seçimi için çevre standartları da dahil olmak üzere gerekli nitel özellikleri kontrol etmek,
4. Türlerin kendi özellikleri dahil en uygun hayvan seçmek; standart genetik, kalite, cinsiyet ve yaş,
5. Model ile ilgili çalışmanın hedefleri herhangi bir teknik, etik, bilimsel ya da pratik sınırlamalar,
6. Uygun sağlık standart veya mikrobiyolojik durumu göz önüne almak,

7. Mikro ve makro çevre (bakım, yetiştirme, barındırma ve uygulamalar) hayvanlar ve çalışma için uygun olmalıdır.
8. Bu konuda çalışan personelin yeterince eğitim ve iş tecrübesine sahip olmalıdır (teknisyen, veteriner hekim, mühendis, lojistik destek vb. personel)
9. Tedarikçilerle sıkı işbirliği (hayvan, malzeme, ekipman, servis) çalışma sonuçları üzerinde çok etkilidir.
10. En önemlisi de bu alandaki ulusal ve uluslararası yasal düzenleme ve uygulamalara dikkat edilmelidir.

### **Seçilen Hayvan Modelinin Proje Tasarımı ile İlişkilendirilmesi**

1. Proje personeli
2. Genel proje bilgileri
3. Deney hayvanı kullanımının gerekçeleri ve seçilen türün uygunluğu
4. Hayvan sağlama ve barındırma bilgileri
5. Detay proje bilgileri
6. Anestezi ve analjezi
7. Deneylerin sonlandırılması (deney hayvanı için deneyin bitiş şekli)
8. Ötenazi
9. Deney sırasında veya sonrasında ortaya çıkabilecek biyolojik ve çevresel risk faktörleri
10. Deney hayvanında izlenecek olası sağlık parametreleri

### **Deney Hayvanlarında Standartlaşma ve Önemi**

**Tanım:** Kullanılacak hayvanların, çevresel ve deneysel koşullarının sabit olarak tutulması veya kontrol altına alınması anlamına gelir.

**Amaç:** Bir deneyden elde edilen verilerin ortalamasının, deney tekrarlandığında aynı veya yakın sonuçlar üretilebilmesini amaçlar.

**Güvenirlilik:** Aynı laboratuvarında veya diğer laboratuvarlarda yapılan aynı veya benzer çalışmalardan elde edilen veriler arasında yakınlığın artmasını ve dolayısıyla araştırma sonuçlarına duyulan güvenin artmasını sağlar.

### **Yapılan Bazı Deneysel Modeller**

- Ratlarda ekstrakorporal dolaşım,
- Ratlarda 5/6 nefrektomi, nefrektomi
- Ratlarda böbrek trasplantasyon,
- Farelerde kronik ve akut astım
- Ratlarda kontrollü ve kontrolsüz sepsis,
- Ratlarda cecal ligation pucture,
- Ratlarda migren modeli,
- Ratlarda hipoksik-iskemik ensefalopati,
- Ratlarda meme tümörü modeli,
- Ratlarda diyabet modelleri,
- Ratlarda peritonit modelleri,
- Ratlarda üreteroperitonestomi,
- Ratlarda spinal travma modelleri,



- Ratlarda spina iskemi modeli,
- Ratlarda parkinson modeli,
- Ratlarda kolit ve ülser modelleri,
- Ratlarda osteoporoz modelleri,
- Tavşanlarda nükleoplasti,
- Tavşanlarda kemik kırıkları modelleri
- Tavşanlarda hiperkolesterilemi modeli

## **Seçilmiş bazı indüklenmiş hayvan modelleri**

### **Model 1**

#### **Asfiksi, Hipoksi, İskemi, İnflamasyon**

**Yenidoğan Hastalığı:** Hipoksik İskemik Ensefalopati

**Klinik Özellikler:** Motor ve kognitif problemler, konvülsiyonlar

**Patolojik Özellikler:** Nöronal ölüm, apoptozis, NO düzeylerinde artış

**Hayvan Modeli:** Vanucci modeli (4)

**Anestezi başlangıcı:** “Anesthesia Gas Monitoring 1304, Denmark”

**Anestezi İdamesi:** Oksijen ve halotan düzeyleri anestezi gaz monitöründen izlenerek sabit tutulacaktır.

**Cerrahi işlem:** Deney hayvanlarının boyunları hiperekstansiyona getirilerek orta hattan vertikal olarak 0.5-1 cm'lik cilt, ciltaltı insizyonu yapılacaktır. Trakea bulunarak sağ kommon karotid arter mikroskop altında 6/0 ipek ile askıya alınacaktır, aynı ipek ile sağ kommon karotid arter kalıcı olarak bağlanacaktır.

**Hipoksi düzeneği:** % 8 O<sub>2</sub> karışımı 2.5 saat uygulanacaktır. Bu modelde yapılan yayınlar kaynaklarda verilmiştir (5, 6, 7, 8).

### **Model 2**

#### **Beyaz Cevher Hasarı, LPS, Miyelin, Oligodendrosit**

**Yenidoğan Hastalığı:** Periventriküler lökomalazi

**Hayvan Modeli:** İntrauterin LPS uygulanması

**Klinik Özellikler:** Serebral palsi

**Patolojik Özellikler:** Hipomiyelinizasyon

**PVL Modeli (9)**

Gebeliğinin 18. ve 19. gününde sıçanlara intraperitoneal olarak steril ve taze hazırlanmış 500 µg/kg lipopolisakkarit-LPS\* enjeksiyonu yapılır (\*LPS -Escherichia coli, serotype 055:B5, Sigma). Normal doğum gerçekleşir ve postnatal 7.günde değerlendirme yapılır. Bu modelde bazen abortlar ve yavru ölümleri gözlenebilir (10, 11).

### Model 3 (12)

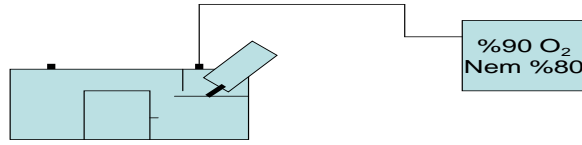
#### Prematürite, Oksijen toksisitesi, İnflamasyon

**Yenidoğan Hastalığı:** Bronkopulmoner displazi

**Hayvan Modeli:** Hiperoksik akciğer modeli

**Klinik Özellikler:** Kronik akciğer hastalığı

**Patolojik Özellikler:** Azalmış alveolarizasyon,  
anormal kapiller morfoloji,  
fibroproliferasyon



(Anesthetic Gas Monitor, Type 1304, Bruel and Kjaer, Denmark)

### Model 4 (13)

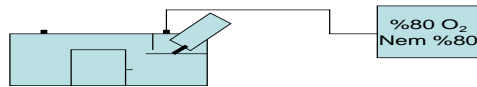
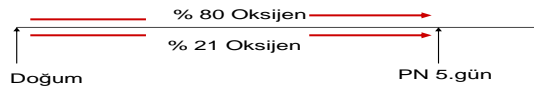
#### İmmatür beyin, Hiperoksi

**Yenidoğan Hastalığı:** Nörodejeneratif beyin Hasarı

**Hayvan Modeli:** Hiperoksik beyin hasarı

**Klinik Özellikler:** Motor ve kognitif bozukluklar

**Patolojik Özellikler:** Azalmış nöronal dansite, apoptozis



## Model 5 (14)

### İmmatür Beyin, Nörotoksisite

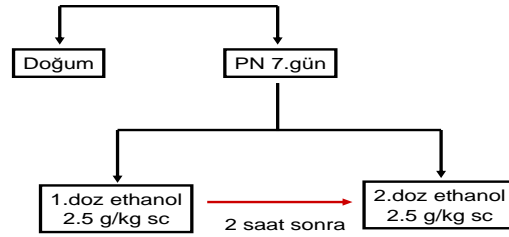
**Yenidoğan Hastalığı:** Fetal alkol sendromu

**Hayvan Modeli:** Hamilelik-etanol-C57BL6 mouse

**Klinik Özellikler:** Hiperaktivite, mental retardasyon, öğrenme güçlükleri, depresyon

**Patolojik Özellikler:** Nörotoksisite

#### Fetal Alkol Sendromu



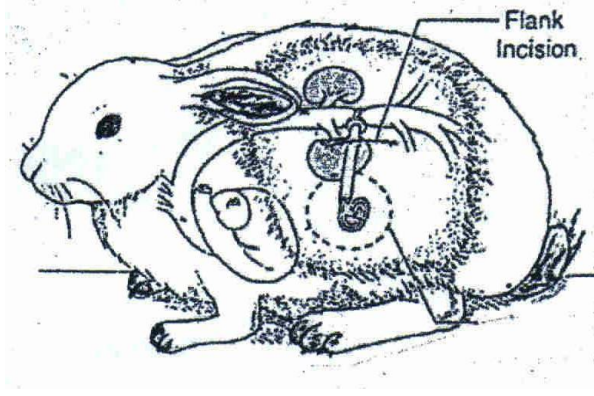
## Model 6

### Tavşan Spinal iskemi Modeli (15)

New Zealand White Rabbit araştırmadan 15 gün önce laboratuvarına getirilip ortama adapte edilir. Sol kulak venindeki 22 gauge kanülden ringer laktat infüzyon. Sağ kulak arterine MAP monitörizasyonu ve kan gazı analizleri için kanül yerleştirilir, antibiyotik ile profilaksi, spontan solunum korunarak gaz anestetik maske yardımı ile verilir ve sürekli end-tidal CO<sub>2</sub> monitörize edilir. Distal femoral arter monitörizasyonu için 22 gauge kanül sağ femoral artere yerleştirilir. Rektal vücut sıcaklığı 38.5°C'de tutulmaya çalışılır. 40 dakika süre ile oklüzyon uygulanır. Sağ femoral arter aracılığıyla izlenen arteriyel basınç trasesinin kaybolması ile oklüzyon doğrulanmalıdır.

#### Nörolojik Değerlendirme:

Drummond ve Moore kriterlerine göre yapılabilir. Paraplejik hayvanlarda mesane içeriği günde iki kez gerektiğinde manipüle edilerek boşaltılmalıdır.



## İnfrarenal aortik oklüzyonun şematik görünümü

### Model 7

#### Rat Spinal Travma Modeli

Th3 seviyesinde 53-gr kapama güçlü anevrizma klipi ile 1 dk kompresyon uygulanır.

Nörolojik değerlendirme BBB skoru takibi ile yapılır. Basso, D. M., Beattie, M. S. & Bresnahan, J. C. (1996) *Exp. Neurol.* 139,244–256. (17)

Paraplejik hayvanlarda mesane içeriği günde iki kez gerektiğinde manipüle edilerek boşaltılmalıdır

Spinal iskemi ve travma modelinde yapılan yayınlar kaynaklarda verilmiştir (15,16).

#### Kaynaklar

1. Howard B, Nevalainen T, Perretta G. The COST Manual of Laboratory Animal Care and Use: Chapter 8, First Edition CRC Press.
2. Poyraz Ö. Laboratuvar hayvanları Bilimi: Sayfa 78-88, Kardelen Ofset, Ankara.
3. İde T. Laboratuvar hayvanları Biliminin Temel İlkeleri: Sayfa; 187, Medipres Ankara, 2003.
4. Rice JE, Vannucci RC, Brierly JB. The influence of immaturity on hypoxic–ischemic brain damage in the rat. *Ann. Neurol*,1981; 9:131-141.
5. Kumral A, Ozer E, Yılmaz O, Akhisaroğlu M, Gökmen N, Duman N, Ulukuş C, Genç S, Ozkan H. Neuroprotective effect of erythropoietin on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Biol Neonate*, 2003; 83(3):224-228.
6. Kumral A, Genc S, Ozer E, Yilmaz O, Gokmen N, Koroglu TF, Duman N, Genc K, Ozkan H. Erythropoietin downregulates bax and DP5 proapoptotic gene expression in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Biol Neonate*, 2006; 89(3):205-210.
7. Abdullah Kumral, Nazan Uysal, Kazım Tugyan, Ataç Sönmez, Osman Yılmaz, Müge Kiray, Şermin Genç, Nuray Duman, Tolga Köroğlu, Hasan Özkan, Kürşat Genç. Erythropoietin improves long-term spatial memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Behavioural Brain Research*, 2004; 153:77-86.
8. Kumral A, Gonenç S, Açıkgöz O, Sönmez A, Kürşat G, Yılmaz O, Gökmen N, Duman N, Özkan H. Erythropoietin increases glutathione peroxidase enzyme activity and decreases lipid peroxidation levels in hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. *Biol Neonate*, 2005; 87(1):15-18.

9. Cai Z, Pan ZL, Pang Y, Evans OB, Rhodes PG. Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. *Pediatr. Res*, 2000; 47:64-72.
10. Koroglu TF, Yilmaz O, Ozer E, Baskin H, Gokmen N, Kumral A, Duman M, Ozkan H. Erythropoietin attenuates lipopolysaccharide-induced splenic and thymic apoptosis in rats. *Physiol Res*, 2006; 55(3):309-316.
11. Yesilirmak DC, Kumral A, Baskin H, Ergur BU, Aykan S, Genc S, Genc K, Yilmaz O, Tugyan K, Giray O, Duman N, Ozkan H. Activated protein C reduces endotoxin-induced white matter injury in the developing rat brain. *Brain Res*, 2007; 20:1164:14-23.
12. Özer E.A, Kumral A, Özer E, Yılmaz O, Duman N,Özkal S, Köroğlu T , Özkan H. Effects Erythropoietin on Hyperoxic Lung Injury in Neonatal rats. *Pediatr Res*; 2005; 58(1):38-41.
13. Yiş U, Kurul SH, Kumral A, Cilaker S, Tuğyan K, Genç S, Yılmaz O. Hyperoxic exposure leads to cell death in the developing brain. *Brain Dev*, 2008; 30(9):556-562.
14. Kumral A, Tugyan K, Gonenc S, Genc K, Genc S, Sonmez U, Yilmaz O, Duman N, Uysal N, Ozkan H. Protective effects of erythropoietin against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and oxidative stress in the developing C57BL/6 mouse brain. *Brain Res Dev Brain Res*, 2005; 160(2):146-156.
15. Celik M, Gökmen N, Erbayraktar S, Akhisaroglu M, Konakc S, Ulukus C, Genc S, Genc K, Sagiroglu E, Cerami A, Brines M. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002; 99(4):2258-2263.
16. Gorio A, Gokmen N, Erbayraktar S, Yilmaz O, Madaschi L, Cichetti C, Di Giulio AM, Vardar E, Cerami A, Brines M. Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002; 99(14):9450-9455.
17. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp. Neurol*, 1996; 139:244-256.
18. Drummond, J. C. & Moore, S. S. *Anesthesiology*, 1989; 70, 64-70.

## Primer Timosit Hücre Kültürlerinde Canlılık, ROS ve $[Ca^{+2}]_i$ Monitorizasyonu

Bayram YILMAZ<sup>1</sup> ve Süleyman SANDAL<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Malatya, Türkiye

### Konu, Literatür Bilgi ve Kapsam

Organik klorlu kirleticiler: Dünyada son 60 yılda sağlanan endüstriyel gelişmelere paralel olarak, çok sayıda kimyasal maddenin çevreye salındığı ve yaygın şekilde kirlenmeye neden olduğu bilinmektedir. Kalıcı organik kirleticiler (persistent organic pollutants) olarak adlandırılan organik klorlu bileşikler bu maddeler arasında önemli bir yer tutmaktadır (1, 2). Bu maddeler kimyasal olarak kararlı bir yapıya sahip olduklarından ve reaktif olmadıklarından dolayı doğada çok uzun yıllar boyunca kalabilmektedirler (3). Kalıcı organik kirleticilerin insan sağlığı ve çevresel ekosistem üzerine etkileri son yıllarda daha çok tartışılmaya ve yüzlerce bilimsel araştırmaya konu olmaya başlamıştır. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2001 yılında Stokholm'de düzenlediği toplantıda bu maddeler sınıflandırılmış ve yeryüzünde yaygın kalıcı kirlenmeye neden olan çok sayıda organik klorlu pestisit ve poliklorlu bifeniller (PCBler) "en toksik düzine" içine dahil edilmişlerdir (4, 5). PCB ve pestisitler lipofilik özelliklerinden dolayı canlı organizmaya girdikten sonra yağ dokusunda birikme eğilimi gösterirler (3, 6). Özellikle bu maddelerle kontamine olmuş sular, balık ve diğer hayvansal ürünlerle besin zincirine girerler.

PCB'ler, 1930'lu yıllarda endüstriyel kullanım amacıyla üretilmeye başlanan organik klorlu bileşiklerdir (3, 7). Kimyasal ve fiziksel yapı bakımından oldukça stabil (non-flammable) maddeler olduklarından, başlıca kapasitatör, trafo, hidrolik pompa, matbaa mürekkebi, boya, pestisit ve elektrik izolasyon sıvılarının yapımında (yanmayı ve enerji kaybını önlemek için) kullanıldılar (3, 6). PCB'ler, bir bifenil yapısı üzerine değişik sayıdaki (1 ile 10 arasında) klor iyonlarının farklı konfigürasyonlarda (orto, meta ve para) bağlanmasıyla meydana gelen aromatik bileşiklerdir (7). Klor iyonlarının bağlanma yeri ve sayıları nedeniyle, teorik olarak 209 farklı PCB bileşeni (congener) üretilebilir (8). Bilinen tüm kimyasal maddeler arasında doğada en kalıcı (persistent) olanlarıdır. 1977 yılından itibaren başta Amerika Birleşik Devletleri olmak üzere birçok ülkede kullanımı yasaklanmış, bazı ülkelerde de sınırlandırılmıştır (3). Ancak birçok ülkede PCB içeren endüstriyel teçhizat ve sanayi ürünleri hala kullanılmaktadır (2). Türkiye'nin de aralarında bulunduğu birçok ülkede, PCB kontaminasyon alanları bulunmaktadır. Ülkemizde PCB bileşiklerinin endüstrideki kullanım boyutu tam olarak bilinmemesine rağmen, Marmara Bölgesi, İzmir ve İzmit Körfezleri ile Türkiye'nin başka bölgelerinde de kirlenmiş alanların olduğuna dair bulgular vardır (9 - 14). Ayrıca, TEDAŞ sisteminde kullanılan birçok trafoda PCB yağı ile izolasyon yapıldığı bilinmektedir (15). Ayrıca PCB içeren bileşikler Linol, Oleokorlin ve Ormalin adı ile 1970'den 1982 yılına kadar tarımsal amaçla kullanılmış ve kirlenmeye neden olmuştur (16).

Besin zincirine girerek, insanlar da dâhil olmak üzere yeryüzündeki her canlıya taşındığı bildirilen (8) bu çevre kirletici ajanların, kanserojenik (17), immün sistemi baskılayıcı (3), hepatotoksik, endokrin bozucu (disruptor) (18), nörotoksik (19, 20) ve teratojenik etkilerinin (21) olduğu bildirilmektedir.

Poliklorlu bifenillerin  $[Ca^{+2}]_i$  homeostazisi üzerine etkileri: PCB'lerin toksik etki mekanizmalarıyla ilgili olarak birçok araştırmacının üzerinde durduğu konulardan bir tanesi  $[Ca^{+2}]_i$  homeostazisinde meydana gelen değişimler ve buna bağlı olarak gelişen olaylar dizisidir. Nishihara ve ark. (22), non-planar PCB bileşenlerinin mitokondri membran bütünlüğünü değiştirerek  $[Ca^{+2}]_i$  homeostazisini bozduğunu bildirmiştir. Nötrofiller üzerinde yapılan bir çalışmada yine non-planar PCB'lerin süper oksit anyon ( $O_2^-$ ) oluşumunda artışa sebep olduğu ve bu etkinin hücre dışı  $Ca^{+2}$ 'a ( $[Ca^{+2}]_d$ ) bağlı olduğu ileri sürülmüştür (23). Wong ve ark. da (24, 25) non-planar PCB bileşeninin (PCB 95)  $[Ca^{+2}]_i$ 'da bir artış meydana getirdiğini göstermişler ve bu artışın hücre içi endoplazmik retikulumdaki *ryanodine* duyarlı kaynaklardan  $Ca^{+2}$  salınması sebebiyle olduğunu belirtmişlerdir. *2,2'-dichlorobiphenyl*'in insan granülositlerinde  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunu,  $[Ca^{+2}]_i$  bağımlı olarak yükselttiği bildirilmiştir (26). Arocolor karışımları ve non-planar PCB'lerin membran potansiyelini depolarize edip, voltaj kapılı  $Ca^{+2}$  kanalları üzerinden  $Ca^{+2}$  girişini artırarak uterus kontraksiyonlarını uyardığı öne sürülmüştür (27, 28). Carpenter ve ark. (29), serebellar granül hücrelerinde non-planar PCBlerin  $[Ca^{+2}]_i$  seviyelerinde artış sağlayarak hücrelerin ölümüne sebep olduğunu rapor etmişlerdir. Laboratuvarımızdan yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada, PCB bileşik ve metabolitlerinin endotel hücrelerinde  $[Ca^{+2}]_i$  konsantrasyonlarını artırarak sitotoksisteye neden olduklarını göstermiş bulunmaktayız (30).

Poliklorlu bifenillerin serbest radikal oluşumu üzerine etkileri: Bazı organik klorlu çevre kirleticiler ve ağır metallerin serbest oksijen radikali (ROS) oluşturarak kanser ve otoimmünite gibi birçok kompleks hastalığın patogenezinde ve yaşlanma sürecinde rol oynayabileceği düşünülmektedir (17, 18, 31, 32, 33, 34). Oksidatif stres oluşum mekanizmasının daha iyi anlaşılması, bu hastalıkların bazılarının önlenmesi veya müdahale edilebilir hale getirilmesi bakımından önemlidir (35). Non-planar PCB'ler, nötrofillerde  $Ca^{+2}$  bağımlı nötrofil aktivitesini (Brown 1995) ve  $O_2^-$  üretimini artırmaktadır (36). Narayanan ve ark. (37), Arocolor 1242 ve *2,2',4,4'-tetrachlorobiphenyl*'in insan nötrofillerinde süper oksit dismutazı inhibe ettiğini göstermişlerdir. Ayrıca, PCB'lerin dihidroksi metabolitlerinin de ROS'u artırdığı rapor edilmiştir (38). Bazı planar PCB bileşenlerinin endotel hücrelerine zarar verdiğini ve bu etkilerin de muhtemelen oksidatif stres yoluyla tam doymamış yağ asitleri tarafından potansiyalize edildiği bildirilmiştir (39). Toborek ve ark. (40) da bazı planar PCB'lerin oksidatif stresi artırdığını ve aril hidrokarbon reseptör aktivasyonu ile endotel bariyer fonksiyonunu bozduğunu göstermişlerdir.

Poliklorlu bifenillerin membran bütünlüğü ve fluditesi üzerine etkileri: Membran fluditesi, çift katlı lipit tabaka içerisindeki fosfolipitlerin hareketleridir ve bu hareketlerin düzeni tabakada var olan yağ asidi kompozisyonları, açıl zincirlerinin doymuşluk derecesi, kolesterol konsantrasyonu ve sıcaklık gibi faktörlere bağlıdır (41). Non-planar PCB'lerin çift katlı tabakanın fluditesinde değişiklik meydana getirdiği ancak aynı durumun planar bileşenler için söz konusu olmadığı bildirilmiştir (42). Başka bir çalışmada da non-planar PCB bileşeni, membran fluditesinde artış, kolesterol/fosfolipit oranında da azalma meydana getirdiği belirtilmiştir (43). Farklı PCB karışımlarının (Aroclor) sitotoksik olan sınır konsantrasyonlarının membran fosfolipit ve nötral lipit yapısında değişiklik meydana getirerek, membran bütünlüğü ve metabolik fonksiyonlarını (44) ya da lipit kompozisyonu (45) etkileyebileceği gösterilmiştir. PCB'ler, membrandaki doymuş ve doymamış yağ asitleri arasındaki oranı değiştirebilir. Doymuşluk indeksinde meydana gelen yükselme hematoproteinlerin mobilizasyonunu sınırlarken, indeksteki azalma yükselmiş

membran fluditesi tarafından elektron transferi için redüktazlarla kontağı kolaylaştırabilir böylece serbest radikal oluşumunun tetiklenmesiyle kanserogeneizde PCB'ler önemli bir rol oynayabilirler (46). Benzer şekilde PCB'lerin membran fluditesini değıştirdiğı gösterilmiştir (47). Membran fluditesi ve hücre morfolojisinin devamlılığı arasında sıkı bir ilişkinin olduğı ve PCB'ler gibi organik klorlu bileşiklerin maddelerin bu ilişkiyi membran fluditesini değıştirerek etkilediğı düşünölmektedir (48, 49).

**Timus bezi:** T hücrelerinin gelişimi için öncelikli organ konumunda olan timus, çocuklukta ön üst *mediastinum*'un içerisinde, kalbin üzerinde yer alır. Doğumdan sonra ergenlik dönemine kadar biraz büyür ve sonra ise yavaş yavaş gerileyip, lenfositleri ve retiküler hücreleri ile birlikte yağ dokusuna dönüşür (50). Bu gerileme sebebiyle ergin bireylerde çıplak gözle timusu görmek zorlaşır. Embriyolojik olarak sağ ve solda olmak üzere iki lobdan oluşur. Büyüklükleri birbirinden farklı olan bu iki lob daha sonraki dönemlerde birbirlerine yapışır ve ortak bir kapsülle sarılırlar (51). Farede ise timus bezi insandakinden çok farklı olmayacak şekilde ventral olarak kalbin üzerinde yer alır ve yine yaşlanmayla birlikte küçölür (52).

**Amaç:** Bu çalışmada, timus bezinden primer olarak hazırlanan timosit kültürlerinde akım sitometri (flow cytometry) yöntemiyle hücre canlılığı, ROS ve  $[Ca^{+2}]_i$  düzeylerinin monitorizasyonu metodoloji ağırlıklı olarak açıklanmaktadır. Deneyler iki farklı PCB bileşiiğı (52, 77) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu bileşiklerin sitotoksik etki mekanizmasına yönelik olarak florometri yöntemiyle membran fluditesi üzerine etkileri de araştırıldı.

## **Gereç ve Yöntem**

**Deney hayvanları:** Akım sitometri ve florometri deneylerinde iki aylık 28-30 gr ağırlığındaki ICR erkek fareler (Taconic Farms Inc, Germantown, New York) kullanıldı. Tüm fareler 21°C oda ısısında, 12 saat karanlık-aydınlık periyoduna sahip ortamda musluk suyu ve standart sıçan/fare yemi ile beslendi.

**Kimyasal maddeler:** PCB 52 ve 77, Ultra Scientific (North Kingstown, RI, ABD), Propidium iodide (PI), 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) ve Fluo-3 acetoxymethyl (AM), Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, ABD), Sodium phosphate monobasic anhydrous ( $NaH_2PO_4$ ) ve dibasic anhydrous ( $Na_2HPO_4$ ), Fisher Sci. (Fair Lawn, NJ, ABD), L-Glutamine ve N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) ihtiva eden RPMI-1640 ve New Born Calf Serum (FCS), Biological Industries (İsrail), Penicillin/streptomycin Mediatech Collegro'dan (VA, ABD) temin edildi. Kullanılan diğler tüm kimyasallar Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, ABD)'dan sağlandı. PI deiyonize suda ( $dH_2O$ ) diğler problemler ve PCB'ler dimethyl sulfoxide (DMSO)'da çözüldü. DMSO'nun konsantrasyonu hiçbir deneyde % 0.2'den fazla olmadı ve tüm deney protokollerinde, PCB'ler ve kontrol grubu ile beraber DMSO'nun analizi de yapıldı.

**Timus hücrelerinin izolasyonu:** Fareler servikal dislokasyonla öldüröldükten sonra sırtüstü olarak diseksiyon tablasına sabitlendi. Göğüs kafesinin bittiğı kısımdan cerrahi bir makasla sırasıyla deri, kas dokusu, diyafram ve bilateral olarak kaburgalar kesilip timus bezinin olduğı kısma kadar gelindi. Bir pens yardımıyla timus lobları total olarak alındı ve soğutulmuş 0.01 M fosfatla tamponlanmış tuzlu su (PBS; phosphate buffered saline) bulunan petri kutusuna bırakıldı. Daha sonra timus bezi ile birlikte alınmış olan doku, kan ve diğler parçacıklar temizlenerek



içerisinde soğuk PBS bulunan başka bir petriye aktarıldı. Temizlenmiş olan timus bezi parçacıkları iki adet mikroskop lamı arasında ezilerek hücrelerin PBS içerisine geçmesi sağlandı. 0.01 M PBS solüsyonunun içeriği aşağıdaki gibi hazırlandı:

0.01 M PBS: 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 'den 200 ml, 0.2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 'den 4 800 ml karıştırıldı ve karışımın pH'sı 7.3'e ayarlandı. Karışımdan 50 ml alınıp  $\text{dH}_2\text{O}$  ile 1000 ml'ye tamamlandı ve karışımın içerisine final konsantrasyonu 0.2 M olacak şekilde NaCl ilave edildi.

Hücre canlılığı (viability), ROS ve  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  seviyelerinin belirlenmesi için akım sitometri ve membran fluditesinin tespiti için ise florometre deney protokolleri uygulandı.

### **Akım Sitometri Analizleri**

Timositlerin hazırlanması: 0.01 M PBS içerisindeki timus hücreleri (timositler) bir Thoma lamı'na alınarak hücre sayımı yapıldı. Uygun miktarda Tyrode solüsyonu ilave edilerek (148 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM HEPES, 10 mM D-glukoz ve pH 7.3) her deney tüpünde hücre sayısı  $1 \times 10^6$ 'ya ayarlandı ve analizlerinden önce süspansiyondaki hücreler aşağıdaki işlemlere tabii tutuldu.

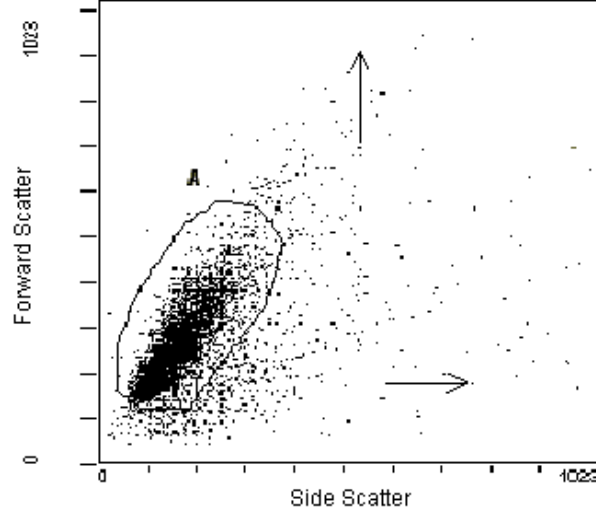
1. Hücre süspansiyonunun 2 ml'si bir falkon tüpüne diğer kısmın tamamı da başka bir falkon tüpüne alınıp, üzerine çalışma (final) konsantrasyonu 500 nM olacak şekilde 1  $\mu\text{l}$  fluo-3 AM ilave edildi ve karanlıkta  $34^\circ\text{C}$ 'de 20 dk. bekletildi.
2. İnkübasyondan sonra her iki tüp 2000 rpm devirde 5 dk. santrifüj edildi ve üst kısımdaki solüsyon uygun miktarda Tyrode solüsyonu ile değiştirildi.
3. Dikkatli şekilde tritürasyon (pipetle ayrıştırma ve karıştırma işlemi) yapılarak hücrelerin homojen olarak solüsyona dağılması sağlandı.
4. Hücre solüsyonu, 62  $\mu\text{m}$  por çapına sahip naylon filtreden geçirilerek, akım sitometri tüplerine aktarıldı.
5. İki tüp hariç (negatif kontrol ve fluo-3 AM kontrol) diğer tüplerin tamamına, final konsantrasyonu 5  $\mu\text{M}$  olacak şekilde 1  $\mu\text{l}$  PI ilave edildi ve  $34^\circ\text{C}$ 'de 5 dk. bekletildi.

Hücreler Ca bulunmayan ortamda yapılan deneylerde de aynı prosedüre tabii tutuldular. Farklı olarak sadece Ca içermeyen Tyrode solüsyonu (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM HEPES, 10 mM D-glukoz ve pH 7.3) kullanıldı.

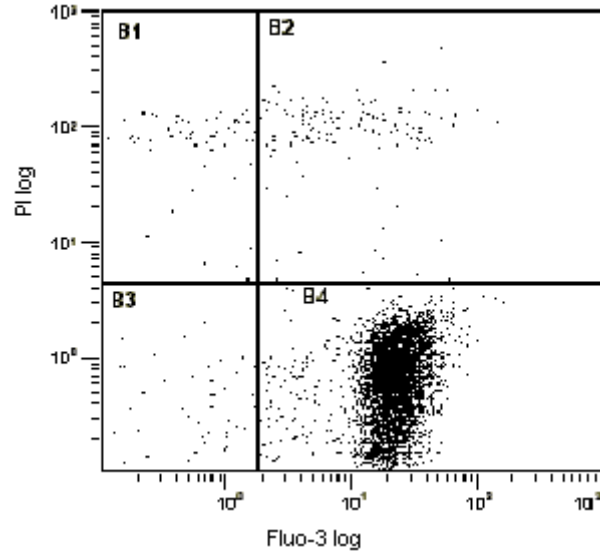
Hücre canlılığı, ROS ve  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  seviyelerinin belirlenmesi: Hücre canlılığı, ROS ve  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  seviyeleri, Center for Functional Genomics Laboratuvarında (University at Albany, NY. ABD), Coulter Epics Altra (Coulter Electronics, Sheffield, İngiltere) marka bir akım sitometre kullanılarak tayin edildi.

Akım sitometride temel prensip, lazer ışınının önünden hücrelerin bir taşıyıcı vasıtasıyla tek tek geçmelerini sağlamak ve bu esnada kullanılan prob/probların emisyon floresanının görüntülenmesi esasına dayanır. Bu şekilde hücrelerin morfolojileri hakkında bilgi elde edilebilir. Bu bilgi lazer ışınına saçıcılar (scatter) tarafından sağlanır. Akım sitometride, ileri doğru (forward) ve yan (side) olmak

üzere iki farklı lazer ışın saçıcı vardır. İleri doğru ışın saçıcı hücrelerin büyüklükleri, yan ışın saçıcı ise hücrelerin granüler yapısı hakkında bilgi sağlar. Nispeten homojen olarak belirli bir alanda görülen timosit grubu, analizler için sınırlandırıldı (gated; Şekil 1). Burada amaç, hem morfolojik hem de büyüklük olarak birbirlerine en yakın olan timositlerden sonuç elde etmektir. Hücreler, özellikleri bilinen (dalga boyları birbirinden farklı) floresan problarla uygun şekilde muamele edilirlse aynı anda birden fazla sonuç elde etmek mümkün olabilmektedir (Şekil 2).



**Şekil 1.** Analiz için sınırlandırılan (gated) alanda nispeten homojen olan canlı hücre topluluğu görülmekte. Yukarı ok yönünde daha üst kısımda kalan hücreler daha büyük, yönü sağa doğru olan oka göre daha sağda kalan hücreler de daha yoğun granüler içeriğe sahiptir.



**Şekil 2.** Hücre canlılığı ve  $[Ca^{+2}]_i$  seviyelerinin belirlenmesi için PI ve fluo-3 AM ile boyanmış olan timus hücrelerinin akım sitometri diyagramı. B1 alanında PI pozitif (ölü hücreler), B2 alanında çift pozitif (ölü ancak  $[Ca^{+2}]_i$  içeriğine sahip), B3 alanında çift negatif (hücreler canlı ancak fluo-3 AM pozitif değil) ve B4 alanında da fluo-3 AM pozitif (hücreler canlı ve  $[Ca^{+2}]_i$  içeriği de normal) hücrelerin görünümü.

Analizlere başlamadan önce akım sitometrinin kalibrasyon işlemleri yapıldı. Ölçümler esnasında tüm problemler için uyarılma (excitation) dalga boyu 488 nm idi. Emisyon dalga boyu ise fluo-3 AM için 525 nm, PI içinse 575 nm olarak seçildi.

Tüplerdeki hücrelerin canlılık oranları kontrol edilip canlılık oranı % 90'ın üzerinde olduğu durumlarda analizlere başlandı. Analizler, PCB bileşikleri ve pozitif kontrol maddelerinin ilavesini takip eden 5, 15, 30 ve 60. dakikalarda alındı ve her ölçümde 10.000 (gated) hücre sayıldı. Deneyler farklı günlerde farklı hayvanlardan elde edilen hücrelerle en az 10 kez tekrar edilip sonuçların ortalamaları alındı. Veriler Expo 32 software programı kullanılarak değerlendirildi.

Hücre canlılığı ölçümlerinde floresan prob olarak PI,  $[Ca^{+2}]_i$  seviyesinin belirlenmesi için de fluo-3 AM kullanıldı. Normalde, canlı hücrelerin plazma membranları PI'nın hücre içerisine girmesine izin vermez. Fakat hücre membran bütünlüğünde bir bozulma meydana geldiği zaman PI hücre DNA'sına bağlanır ve floresanda bir artış meydana gelir (53). Membran bütünlüğü olmayan hücrelerin verdiği floresan sağlam hücrelerin verdiği floresandan daha fazladır (54).

$[Ca^{+2}]_i$  seviyesinin belirlenebilmesi için floresan prob olarak kullanılan fluo-3 AM hücre zarından kolaylıkla geçebilmekte ve  $Ca^{+2}$ 'ye bağlandıktan sonra artmış biçimde floresan vermektedir (55).

Deneylerimizde fluo-3 AM'nin çalışıp çalışmadığından emin olmak amacıyla pozitif kontrol olarak 2  $\mu$ M ionomycin kullanıldı. Ionomycin bir kalsiyum kanal açıcıdır ve hem hücre dışı ortamdan hem de hücre içi kaynaklardan kalsiyum geçişini sağlar, böylece  $[Ca^{+2}]_i$  seviyesi maksimuma ulaşır (56). Yaptığımız deneylerdeki ionomycin ilavesinden sonra fluo-3 AM floresanında meydana gelen dramatik artış,  $[Ca^{+2}]_i$  miktarını belirlemek için fluo-3 AM'nin kullanılmasının uygun olduğunu göstermektedir.

Dihydrorhodamine 123 (DHR) hücre membranından kolaylıkla geçebilen ve hücre içi ROS oluşumunu incelemek amacıyla kullanılan bir maddedir (57). DHR normalde floresan saçma özelliğine sahip değilken, hücre içinde ROS varlığında rhodamine 123'e dönüşür ve yüksek düzeyde yeşil floresan özelliği kazanır. Rhodamine 123 hücre içerisinde (özellikle mitokondride) tutulur ve membran bütünlüğü devam ettiği sürece floresan yayabilir (58). DHR için uyarılma ve emisyon dalga boyları (sırasıyla) 500 ve 536 nm'dir. Akım sitometri deneylerinde ROS düzeylerini belirlemek amacıyla timosit hücreleri DHR ile yüklendi. Daha önce Rothe ve Valet (59) tarafından tanımlanan metot modifiye edilerek kullanıldı. Deneylerde sadece DHR, sadece PI, DHR + PI kontrol tüplerinin (timosit kültürlerinin) yanı sıra, final konsantrasyonu 8.8 mM olan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) de pozitif kontrol olarak kullanıldı.

ROS ve  $[Ca^{+2}]_i$  düzeylerinin belirlenebilmesi için kullanılan floresan problemlerin (DHR ve fluo-3 AM) emisyon dalga boyları birbirine yakın olduğundan, deneyler birbirinden farklı timosit kültürlerinde gerçekleştirildi. Hücre canlılığını takip etmek amacıyla, her iki deney setinde de PI kullanıldı (PI + fluo-3 AM ve PI + DHR).

### **Florometri ile Membran Fludite Ölçümleri**

Florometri deneylerinde kullanılacak timositler de yukarıda tanımlanan şekilde elde edildi. Hücrelerin sayımı yapıp Tyrode solüsyonu ilavesiyle hücre sayısı

$2 \times 10^6$ /ml'ye ayarlandı ve 62  $\mu\text{m}$  por  $\text{\AA}$ apına sahip naylon filtreden ge $\text{c}$ irilerek *polystyrene* t $\text{u}$ pler i $\text{c}$ erisine aktarıldı. Florometre deneyleri, Wadsworth Research Center'da (Albany, New York) "Structural and Cell Biology Laboratuvarında ışın filtrasyonuna sahip (deneylerde 390 nm olarak kullanıldı) bir Perkin-Elmer LS 50B floresan spektrofotometre kullanılarak ger $\text{c}$ ekleştireildi (60, 61). Uyarılma dalga boyu 360 nm, emisyon dalga boyu ise 430 nm olarak ayarlandı (61). T $\text{u}$ m t $\text{u}$ plere  $10^{-4}$  M DPH ilave edilerek oda ısısında karanlıkta 30 dk. ink $\text{u}$ basyona bırakıldı (62, 63). Daha sonra test ajanları t $\text{u}$ plere ilave edilerek, 5, 15 ve 30. dakikalarda kararlı durum (steady-state) floresan polarizasyon (*P*) sonu $\text{c}$ ları kaydedildi. Her veri 10  $\text{u}$ l $\text{c}$ u $\text{m}$ ' $\text{u}$ n ortalaması olarak alındı ve deneyler beş farklı g $\text{u}$ nde en az sekiz defa tekrar edildi. T $\text{u}$ m deney  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  oda ısısında ve karanlık bir ortamda ger $\text{c}$ ekleştireildi.

Membran fluditesi, membranın yapısal d $\text{u}$ zeni, membran proteinleri ve lipitlerin kısmi hareketlerini kapsayan ve tam kesinlik arz etmeyen bir kavramdır. Membran fluditesi, membranın lipit kompozisyonu, ısı ve diğ $\text{e}$ r fiziksel  $\text{u}$ zelliklere bağılıdır. PCB'ler lipofilik oldukları i $\text{c}$ in membranda  $\text{c}$ oz $\text{u}$ lebilir, fluditede ve devamında da h $\text{u}$ cre fonksiyonlarında değışikliğe sebep olabilirler. PCB'lerin membran fluditesi  $\text{u}$ zerine olan etkilerini belirlemek i $\text{c}$ in yapılan analizlerde, molek $\text{u}$ ler prob olarak DPH kullanıldı. DPH polarizasyonunda meydana gelen bir azalma, membran fluditesinde bir artış olduğu anlamına gelmektedir.

DPH membran lipit tabakası i $\text{c}$ erisine kolaylıkla yerleşebilir (64) ve floresan polarizasyonun değışmesiyle membran fluditesindeki değışiklikler belirlenebilir. Mekanizma kısaca şöyledir: Rotasyon şeklindeki hareket floresan yapan grubun polarizasyonunu etkileyen en önemli faktördür. Bu hareket i $\text{c}$ in g $\text{u}$ ç, temel olarak DPH'nin membrandaki lipitlerin hidrofobik kuyrukları ile etkileşiminden ortaya  $\text{c}$ ıkar. Molek $\text{u}$ l $\text{u}$ n uzun ekseninin ardışık re-oryantasyonu molek $\text{u}$ l $\text{u}$ n floresan polarizasyonunu yansıtır.

## Kaynaklar

1. Breivik K, Alcock R, Li YF, Bailey RE, Fiedler H, Pacyna JM. Primary sources of selected POPs: regional and global scale emission inventories. *Environ Pollut*, 2004; 128:3-16.
2. Weber R, Watson A, Forter M, Oliaei F. Persistent organic pollutants and landfills - a review of past experiences and future challenges. *Waste Manag Res*, 2011; 29:107-121.
3. Carpenter DO. Polychlorinated biphenyls (PCBs): routes of exposure and effects on human health. *Rev Environ Health*, 2006; 21:1-23.
4. Vijgen J, Abhilash PC, Li YF, Lal R, Forter M, Torres J, Singh N, Yunus M, Tian C, Sch $\text{a}$ ffer A, Weber R. Hexachlorocyclohexane (HCH) as new Stockholm Convention POPs - a global perspective on the management of Lindane and its waste isomers. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2011; 18:152-162.
5. WHO. Stockholm Convention on persistent organic pollutants. 2001; New York, NY, United Nations Environment Programme, ([http://www.pops.int/documents/convtext/convtext\\_en.pdf](http://www.pops.int/documents/convtext/convtext_en.pdf), 03.03.2011).
6. Yu HY, Guo Y, Zeng EY. Dietary intake of persistent organic pollutants and potential health risks via consumption of global aquatic products. *Environ Toxicol Chem*, 2010; 29:2135-2142.

7. Carpenter DO. Polychlorinated biphenyls and human health. *Int J Occup Med Environ Health*, 1998; 11:291-303.
8. Carpenter DO, Arcaro KF, Bush B, Niemi WD, Pang S, Vakharia DD. Human health and chemical mixtures: an overview. *Environ Health Perspect*. 1998; 106:1263-1270.
9. Aksu AE, Dogan Y, Uslu O. Assessment of Marine Pollution in Izmir Bay: Heavy Metal and Organic Compound Concentrations in Surficial Sediments. TÜBİTAK Raporu, 1997; 1-29.
10. Telli-Karakoc F, Tolu L, Henkelmann B, Klinn C, Okay O, Schramm KW. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) distributions in the Bay of Marmara sea: Izmit Bay. *Environ Pollut*, 2002; 119:383-397.
11. Aydın ME; Yıldız S, Tor A. A preliminary investigation on boron and metal concentrations of the main drainage channel in Konya-Turkey. *Environ Technol*, 2006; 27:1257-1260.
12. Okay OS, Karacik B, Başak S, Henkelmann B, Bernhöft S, Schramm KW. PCB and PCDD/F in sediments and mussels of the Istanbul strait (Turkey). *Chemosphere*, 2009; 76:159-66.
13. Çok İ, Yelken C, Durmaz E, Uner M, Sever B, Satır F. Polychlorinated biphenyl and organochlorine pesticide levels in human breast milk from the Mediterranean city Antalya, Turkey. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2011; 86:423-427.
14. Çok İ, Donmez MK, Uner M, Demirkaya E, Henkelmann B, Shen H, Kotalik J, Schramm KW. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and polychlorinated biphenyls levels in human breast milk from different regions of Turkey. *Chemosphere*, 2009; 76:1563-1571.
15. Ormanoğlu Y. PCB'li yağlar. TEDAŞ Semineri, 2002; Soma.
16. Delen N, Durmuşoğlu E, Güncan A, Güngör N, Turgut C, Burçak A. Türkiye'de pestisit kullanımı, kalıntı ve organizmalarda duyarlılık azalışı sorunları. Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongresi, 2005; Ankara, 1-21.
17. Golden R, Kimbrough R. Weight of evidence evaluation of potential human cancer risks from exposure to polychlorinated biphenyls: an update based on studies published since 2003. *Crit Rev Toxicol*, 2009; 39:299-331.
18. Tang-Péronard JL, Andersen HR, Jensen TK, Heitmann BL. Endocrine-disrupting chemicals and obesity development in humans: A review. *Obes Rev*, 2011; DOI: 10.1111/j.1467-789.
19. Ozcan M, Yilmaz B, King WM, Carpenter DO. Hippocampal long-term potentiation (LTP) is reduced by a coplanar PCB congener. *Neurotoxicology*, 2004; 25:981-988.
20. Kodavanti PR. Neurotoxicity of persistent organic pollutants: possible mode(s) of action and further considerations. *Dose Response*, 2006; 3:273-305.
21. Ahlborg UG, Becking GC, Birnbaum LS, Brouwer A, Derks HJ, Feeley M. Feeley M, Golor G, Hanberg A, Larsen JC, Liem AK, Safe SH, Schlatter C, Waern F, Younes M, Yrjanheikki E (1994). Toxic equivalency factors for dioxin-like PCBs. *Chemosphere*, 28; 1049-1067.
22. Nishihara Y, Robertson LW, Oesch F, Utsumi K. Interaction of tetrachlorobiphenyls with isolated rat liver mitochondria. *J Pharmacobiodyn*, 1985; 8:726-732.
23. Brown AP, Ganey PE. Neutrophil degranulation and superoxide production induced by polychlorinated biphenyls are calcium dependent. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1995; 131:198-205.

24. Wong PW, Pessah IN. Noncoplanar PCB 95 alters microsomal calcium transport by an immunophilin FKBP12-dependent mechanism. *Mol Pharmacol*, 1997; 51:693-702.
25. Wong PW, Brackney WR, Pessah IN. Ortho-substituted polychlorinated biphenyls alter microsomal calcium transport by direct interaction with ryanodine receptors of mammalian brain. *J Biol Chem*, 1997; 272:15145-15153.
26. Voie OA, Wiik P, Fonnum F. Ortho-substituted polychlorinated biphenyls activate respiratory burst measured as luminol-amplified chemoluminescence in human granulocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1998; 150:369-375.
27. Tsai ML, Webb RC, Loch-Caruso R. Congener-specific effects of PCBs on contractions of pregnant rat uteri. *Reprod Toxicol*, 1996; 10:21-28.
28. Bae J, Stuenkel EL, Loch-Caruso R. Stimulation of oscillatory uterine contraction by the PCB mixture Aroclor 1242 may involve increased  $[Ca^{2+}]_i$  through voltage-operated calcium channels. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1999; 155:261-272.
29. Carpenter DO, Stoner CR, Lawrence DA. Flow cytometric measurements of neuronal death triggered by PCBs. *Neurotoxicology*, 1997; 18:507-513.
30. Yilmaz B, Sandal S, Carpenter DO. PCB 9 exposure induces endothelial cell death while increasing intracellular calcium and ROS levels. *Environ Toxicol*, 2011; doi: 10.1002/tox.20676.
31. Smithwick LA, Smith A, John F, Quensen III. JA, Stack A, London L, Morris PJ. Inhibition of LPS-induced splenocyte proliferation by orthosubstituted polychlorinated biphenyl congeners. *Toxicology*, 2003; 188:319-333.
32. Datta K, Sinha S, Chattopadhyay P. Reactive oxygen species in health and disease. *Natl Med J India*, 2000; 13:304-310.
33. Beal MF. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med*, 2002; 32:797- 803.
34. Crinnion WJ. Polychlorinated biphenyls: persistent pollutants with immunological, neurological, and endocrinological consequences. *Altern Med Rev*, 2011; 16:5-13.
35. Shertzer HG, Clay CD, Genter MB, Chames MC, Schneider SN, Oakley GG, Nebert DW, Dalton TP. Uncoupling-mediated generation of reactive oxygen by halogenated aromatic hydrocarbons in mouse liver microsomes. *Free Radic Biol Med*, 2004; 36:618-631.
36. Ganey PE, Sirois JE, Denison M, Robinson JP, Roth RA. Neutrophil function after exposure to polychlorinated biphenyls *in vitro*. *Environ Health Perspect*, 1993; 101:430-434.
37. Narayanan PK, Carter WO, Ganey PE, Roth RA, Voytik-Harbin SL, Robinson JP. Impairment of human neutrophil oxidative burst by polychlorinated biphenyls: inhibition of superoxide dismutase activity. *J Leukoc Biol*, 1998; 63:216-224.
38. Oakley GG, Devanaboyina U, Robertson LW, Gupta RC. Oxidative DNA damage induced by activation of polychlorinated biphenyls (PCBs): implications for PCB-induced oxidative stress in breast cancer. *Chem Res Toxicol*, 1996; 9:1285-1292.
39. Hennig B, Slim R, Toborek M, Robertson LW. Linoleic acid amplifies polychlorinated biphenyl-mediated dysfunction of endothelial cells. *J Biochem Mol Toxicol*, 1999; 13:83-91.
40. Toborek M, Barger SW, Mattson MP, Espandiari P, Robertson LW, Hennig B. Exposure to polychlorinated biphenyls causes endothelial cell dysfunction. *J Biochem Toxicol*, 1995; 10:219-226.

41. Damjanovich S, Vámosi G, Bodnár A, Bene L. New trends in studying structure and function of biological membranes. *Acta Physiol Hung*, 2002; 89:415-425.
42. Marks GS, Reich T, Wan JK, Singer MA. Investigation of the membrane-fluidizing properties of porphyrin-inducing drugs. *Can J Physiol Pharmacol*, 1982; 60:936-941.
43. Pelissier MA, Siess MH, Lhuissier M, Grolier P, Suschetet M, Narbonne JF, Albrecht R, Robertson LW. Effect of prototypic polychlorinated biphenyls on hepatic and renal vitamin contents and on drug-metabolizing enzymes in rats fed diets containing low or high levels of retinyl palmitate. *Food Chem Toxicol*, 1992; 30:723-729.
44. Rogers CG, Heroux-Metcalf C, Iverson F. In vitro cytotoxicity of polychlorinated biphenyls (Aroclors 1016, 1242, 1254 and 1260) and their effect on phospholipid and neutral lipid composition of Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *Toxicology*, 1983; 26:113-124.
45. Dubois M, De Waziers I, Thome JP, Kremers P. P450 induction by Aroclor 1254 and 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl in cultured hepatocytes from rat, quail and man: interspecies comparison. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, 1996; 113:51-59.
46. Dhami MS, Menon M, Aliling R, Afzal M, DiFonzo CJ, Ali B, Feuer G. Effect of environmental pollutants on hepatocellular function in rats: 3-methylcholanthrene and Aroclor-1254. *Drug Metabol Drug Interact*, 1994; 11:283-299.
47. Tan Y, Chen CH, Lawrence D, Carpenter DO. Ortho-substituted PCBs kill cells by altering membrane structure. *Toxicol Sci*, 2004; 80:54-59.
48. Sandal S, Yilmaz B, Chen CH, Carpenter DO. Comparative effects of technical toxaphene, 2,5-dichloro-3-biphenylol and octabromodiphenylether on cell viability, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> levels and membrane fluidity in mouse thymocytes. *Toxicol Lett*, 2004; 151:417-428.
49. Yilmaz B, Sandal S, Chen CH, Carpenter DO. Effects of PCB 52 and PCB 77 on cell viability, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> levels and membrane fluidity in mouse thymocytes. *Toxicology*, 2006; 217:184-193.
50. Safieddine N, Keshavjee S. Anatomy of the thymus gland. *Thorac Surg Clin*, 2011; 21:191-195.
51. Ritter MA, Crispe IN. (1992). *The Thymus*. Male D (Editör). Oxford University Press, New York, USA. Sayfa: 9-10.
52. Aw D, Silva AB, Palmer DB. Is thymocyte development functional in the aged? *Aging*, 2009; 1:146-153.
53. Pozarowski P, Darzynkiewicz Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Methods Mol Biol*, 2004; 281:301-311.
54. Eray M, Matto M, Kaartinen M, Andersson L, Pelkonen J. Flow cytometric analysis of apoptotic subpopulations with a combination of annexin V-FITC, propidium iodide, and SYTO 17. *Cytometry*, 2001; 43:134-142.
55. June CH, Moore JS. Measurement of intracellular ions by flow cytometry. *Curr Protoc Immunol*, 2004; 5:Unit 5.5.
56. Tan Y. (2001). *Studies on the mechanisms of cytotoxic induced by lightly chlorinated PCBs*. Doktora Tezi. Albany, NY, USA.
57. Henderson LM, Chappell JB. Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation? *Eur J Biochem*, 1993; 217:973-980.
58. Miles AM, Bohle DS, Glassbrenner PA, Hansert B, Wink DA, Grisham MB. Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide. *J Biol Chem*, 1996; 271:40-47.

59. Rothe G, Valet, G. Flow cytometric assays of oxidative burst activity in phagocytes. *Methods Enzymol*, 1994; 233:539-548.
60. Roth LG, Chen CH. Thermodynamic elucidation of ethanol-induced interdigitation of hydrocarbon chains in phosphatidylcholine bilayer vesicles. *J Phys Chem*, 1991; 95:7955-7959.
61. Chen CH, Hoyer K, Roth LG. Thermodynamic and fluorescence studies of the underlying factors in benzyl alcohol-induced lipid interdigitated phase. *Arch Biochem Biophys*, 1996; 333:401-406.
62. Wang G, Chen CH. Thermodynamic elucidation of structural stability of deuterated biological molecules: deuterated phospholipid vesicles in H<sub>2</sub>O. *Arc Biochem Biophys*, 1993; 301:330-335.
63. Chen CH, Zuklie BM, Roth LG. Elucidation of biphasic alterations on acetylcholinesterase (AChE) activity and membrane fluidity in the structure-functional effects of tetracaine on AChE-associated membrane vesicles. *Arch Biochem Biophys*, 1998; 351:135-140.
64. Pap EH, ter Horst JJ, van Hoek A, Visser AJ. Fluorescence dynamics of diphenyl-1, 3, 5-hexatriene-labeled phospholipids in bilayer membranes. *Biophys Chem*, 1994; 48:337-351.



## Parazitolojide Hayvan Modelleri

**Ahmet ÖZBİLGİN**

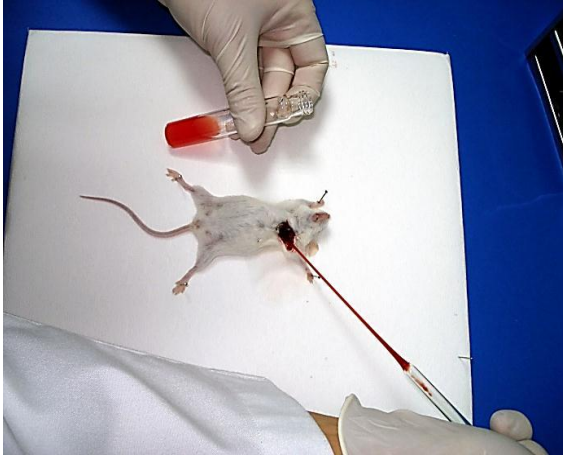
**Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji AD, Manisa, Türkiye**

### Sıtma

Günümüzde laboratuvarlarda sıtma modelleri oluşturmak için kemirgen türlerinden *Plasmodium yoelii* ve *Plasmodium berghei* yaygın olarak kullanılmaktadır.

Enfekte fareden koltuk altı veni kesilerek alınan ve enfeksiyon oranı 107 /ml *P. yoelii* olarak seyreltilen kandan her fareye 0.25 ml. ( $2,5 \times 10^7$  adet *P. yoelii*) kuyruk veninden intravenöz olarak verilmelidir. *P.berghei* ise aynı miktarda peritondan verilebilir. Enjeksiyondan sonra 2 gün ara ile, farelerin kuyruk ucu kesilerek alınan kandan yapılan preparatlarda sıtma enfeksiyon yüzdeleri saptanarak parazitemi izlenmeli ve *P. berghei*'de 7 günde *P.yoelii*'de ise 12 günde bir pasaj yapılarak suşun canlılığı sürdürülmelidir (Resim 1-16).

(Özbilgin 1992, Girginkardeşler 1997, Çeber 2005, Moll 2008, Özbilgin 2010 )



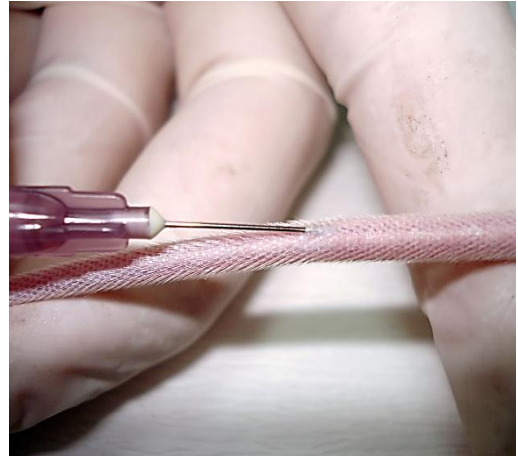
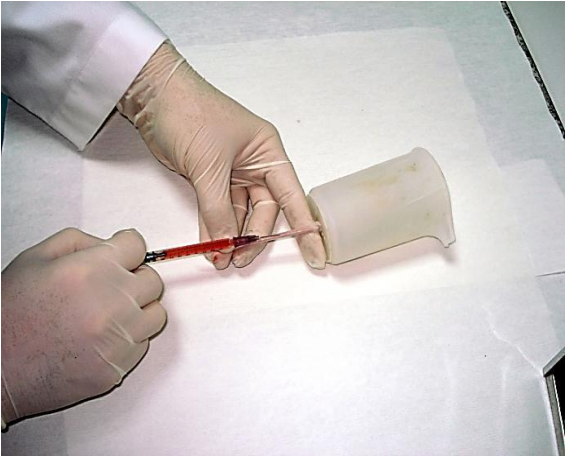
**Resim 1.** Farenin koltuk altından enfekte kanın alınması



**Resim 2.** Fare kuyruk damarının vazodilasyonu



**Resim 3-4.** İntrevenöz enfeksiyon için farenin hazırlanması.



**Resim 5-6.** *P.yoelii* nin I.V. enfeksiyonu



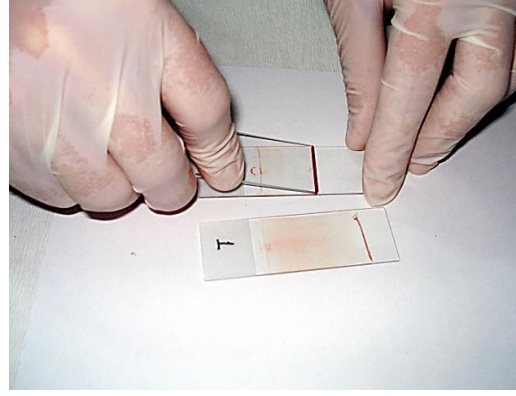
**Resim 7.** Farelere çipin takılması



**Resim 8.** Çip bilgilerinin okunması



**Resim 9.** Fareden kan alınması



**Resim 10.** Farelerin kan yaymalarının yapılması



**Resim 11.** Kan yaymalarının giemsa ile boyanması



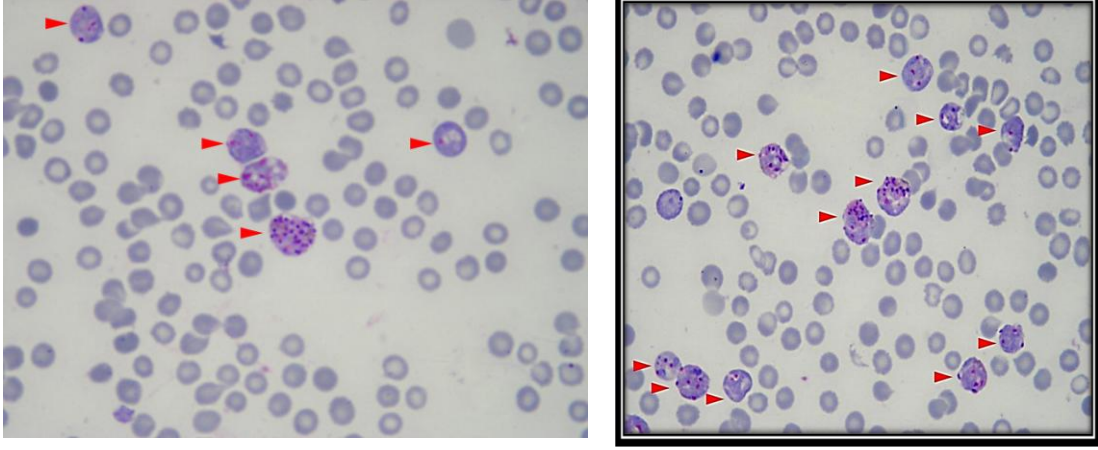
**Resim 12.** Etken maddelerin gavaja çekilmesi



**Resim 13.** Gavaj ve fare



**Resim 14.** Etken maddelerin verilmesi



**Resim 15 - 16.** Giemsa ile boyalı ince yaymada *Plasmodium*' lar

### **Leishmaniasis**

Leishmaniasis modeli oluşturmak için kullanılacak promastigotlar, 10 ml kültür sıvısının 1500 devirde 10 dakika santrifüjlenip, dipte kalan çökeltinin steril serum fizyolojik ile 3 kez yıkanması ile elde edilmektedir. Mikroskopta sayılarak promastigot süspansiyonunun son konsantrasyonu  $1 \times 10^8$  promastigot/ml olacak şekilde ayarlanmalıdır.

#### **a- Kutanöz Leishmaniasis**

Farelerin sol ayak tabanlarına, derialtına 15 µl *Leishmania tropica* promastigot solüsyonu enjekte edilmelidir. İnokülasyonun 2. haftasında ayak tabanında kızarıklık ve şişme olan farelerin lezyonlarını genişliği ve deriden yüksekliği mikrometrik ölçüm aleti ile haftalık olarak ölçülerek lezyon takip edilebilir. Sağlam doku sınırından tüberkülin enjeksiyonu ile serum fizyolojik verilip aspire edilerek alınan örneklerden NNN besiyerlerine ekim yapılarak, yayma preparat hazırlanıp Giemsa ile boyanıp incelenerek *Leishmania* amastigotlarının varlığı araştırılır.

#### **b- Visceral Leishmaniasis**

*Leishmania infantum* izolatlarının promastigot solüsyonu 15 µl intravenöz olarak farenin kuyruk veninden verilir. Farelere promastigotların verilmesinden 30 gün sonra otopsi yapılarak karaciğer ile dalakları çıkarılıp örnekler NNN besiyerlerine ekim yapılır, yayma preparat hazırlanıp Giemsa ile boyanıp incelenerek *Leishmania* amastigotlarının varlığı araştırılır.

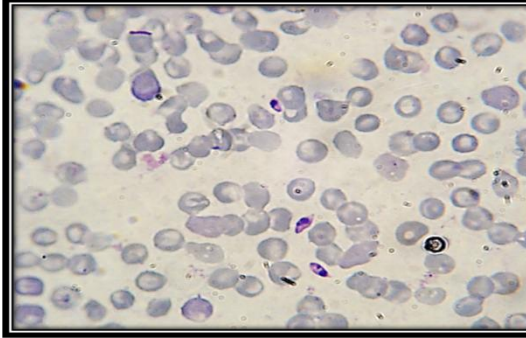
Oluşturulan bu modellerde etken madde taramaları yapılabilir (Resim 17-32) (Girginkardeşler 1997, Yardley 1999 a, Yardley 1999 b).



**Resim 17.** Şark Çıban'lı hastadan materyal alımı (Deri biyopsisi)



**Resim 18.** Visseral leishmaniasis hastasından materyal alımı (kemik iliği)



**Resim 19.** Leishmania amastigotları



**Resim 20.** Leishmania promastiğotları



**Resim 21, 22.** Fare tabanından intra dermal Leishmaniaların verilmesi



**Resim 23, 24.** Fare ayak tabanda kutanöz leishmaniasis modeli



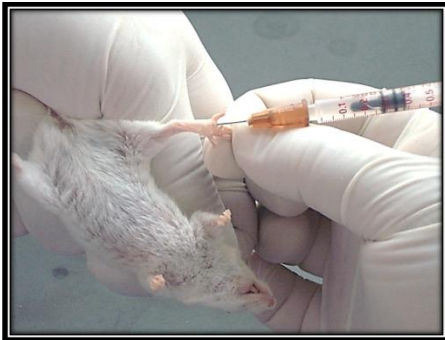
**Resim 25 - 26.** Fare tabanından örnek alımı



**Resim 27.** Visseral leishmaniasis için intra venöz enjeksiyon



**Resim 29 - 30.** Fare'de visseral leishmaniasis modeli



**Resim 31.** Ayak tabanına etken madde verilmesi



**Resim 32.** Gavaj ile mideye etken madde verilmesi

## Toxoplasmosis

Genellikle fareler kullanılır. İnfeksiyon için her 40 büyütme objektif sahasında 4-5 adet takizoit görülen süspansiyondan 22 G bir iğne ile 0.2-1.0 ml arasında peritona verilir. Her 3-4 günde bir periton sıvısı alınıp takizoitler kontrol edilip yeni pasajlar yapılmalıdır (Resim 33-40).

Çalışmalar tamamlandıktan sonra bu parazit suşları kriyoprezervasyon yapılarak saklanmaktadır (Resim 41, 42).

Sonuç olarak; etik ve bilimsel kurallara uygun olarak planlanan ve uygulanan hayvan modellerinin, parazitolojinin birçok alanına büyük katkıları olmaktadır.



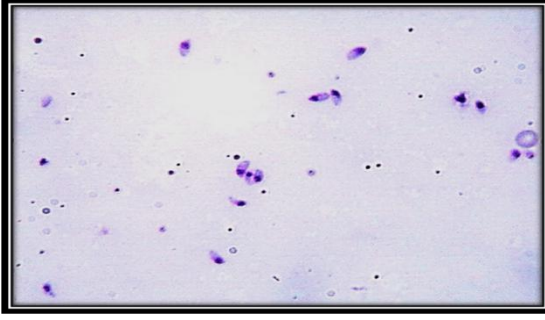
Resim 33 - 34. Fare açılması ve periton sıvısının alımı



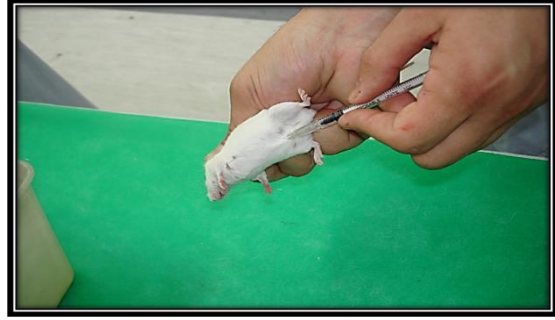
Resim 35 - 36. Fare açılması ve periton sıvısının alımı



Resim 37 - 38. Fare periton sıvısının alınması



Resim 39. *Toxoplasma gondii* trofozoitleri



Resim 40. Fare'nin intraperitoneal enjeksiyonu



Resim 41 - 42. Parazitlerin kriyoprezervasyonu

## Kaynaklar

1. Çeber K, Soran AF, Özardalı İ. Plasmodium berghei Anka suşunun Balb/c farelerde kültürü ve deneysel serebral sıtmanın araştırılması. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 2005; 29(3):154-156.
2. Değerli K, Kilimcioğlu AA, Kurt Ö, Tamay AT, Özbilgin A. Efficacy of azithromycin in a murine toxoplasmosis model, employing a Toxoplasma gondii strain from Turkey. Acta Tropica, 2003; 88:45-50.
3. Girginkardeşler N, Balcıoğlu İC, Yereli K, Özbilgin A, Özbel Y. Cutaneous Leishmaniasis Infection in Balb/c Mice Using a Leishmania tropica Strain Isolated From Turkey. J Parasitol, 2001; 87(5):1177-1178.
4. Girginkardeşler N, Balcıoğlu İC, Değerli K, Limoncu ME, Ok ÜZ, Özbilgin A. Trimetoprim-Sülfametaksazol, Eritromisin ve Klorokin farelerdeki Plasmodium yoelii enfeksiyonuna karşı *in vivo* etkilerinin karşılaştırılması. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 1997; 21(3):233-236.



5. Moll K, Jungström I, Perlman H, Scherf A, Wahlgren M. Methods in Malaria Research. Fifth Edition. Malaria Research and Reference Reagent Resource Center (MR4), American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA, 2008; 20110-2209. Chapter: Animal models, 141-146.
6. Özbilgin A, Parazitolojide Hayvan Modelleri, XXXIV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi 7-11 Kasım 2010, K.K.T.C.- Girne 84-85.
7. Özbilgin A, Kuman HA, Özcel MA. Chloroquine ile atenüe edilmiş Plasmodium berghei'nin eritrositer formları ile immünizasyon çalışmaları. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 1992; 16(1):16-23.
8. Yardley V (a), Croft SL, Animal Models of Cutaneous Leishmaniasis, Handbook of Animal Models of Infection. Ed. Zak, O. and Sande AM. Academic Pres Newyork, 1999; 775-781.
9. Yardley V (B), Croft SL, Animal Models of Visceral Leishmaniasis, Handbook of Animal Models of Infection. Ed. Zak, O. and Sande AM, Academic Pres Newyork, 1999; 783-787.

## Mikolojide Hayvan Modelleri

**Kenan DEĞERLİ**

**Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Manisa, Türkiye**

Deney hayvanları, hipotezi bilimsel kurallara göre kurulmuş araştırmalarda ve biyolojik testlerde kullanılan hayvanlardır.

Fungal enfeksiyonların araştırılmasında hayvan modellerinin kullanıldığı çalışmalar vazgeçilmezdir. *In vivo* ve *in vitro* şartlarda mantarlar farklı hareket ederek, morfolojilerini, fizyolojilerini ve bazen de antifungal etkenlere verdikleri cevabı değiştirirler. Hayvan modelleri olmadan, mikroorganizmaların insan vücudunu nasıl istila ettiklerini ve defans sistemiyle aralarında geçen olayları anlamak mümkün değildir.

Mikoloji laboratuvarlarında mantar enfeksiyonlarının virülansı, fizyopatolojisi, tanı yöntemleri, tedavi ve korunma yöntemleri, ilaç denemeleri biyokimyasal özelliklerin araştırılması immünolojik ve serolojik alanda birçok konunun aydınlatılmasında hayvan modellerinden yararlanılmaktadır.

Kanser tedavisi, organ transplantasyonu gibi immün sistemi baskılayan ve son yıllarda artan AIDS vakaları sonucu ortaya çıkan fırsatçı enfeksiyonlar ile ilgili yeni fungal ajanların geliştirilmesi, fungal genetik, yeni fungal patojenlerin tanısı, sitokin ve kemokinlerin antifungal ajanlarla kombine edilerek tedavide kullanımlarında hayvan modelleri son yıllarda önemli yer tutmaktadır (1, 2).

### Mikolojide Kullanılan Hayvan Modelleri

Maymun Modeli: İnsanlara yakın akraba canlılar oldukları için insan çalışmalarına geçmeden önceki hayvan modellerinin son basamağıdır. Ancak temini, laboratuvar bakımları oldukça güç ve maliyetleri yüksektir. Özellikle *Candida* türleri ile yapılan oral ve vaginal kandidoz modelleri için en uygun hayvan modelidir (3, 4).

Köpek Modeli: Köpeklerdeki çalışmalar özellikle blastomikoz, koksidiomikoz ve histoplazmoz modelleri üzerinde yoğunlaşmıştır (5).

Tavşan Modeli: Dermatofitozlar, invaziv aspergilloz, blastomikoz, koksidiomikoz, histoplazmoz, zikomikoz ve kandidoz modelleri üzerinde çalışmalar yapılmaktadır (3, 5, 6, 7, 8, 9).

Kobay Modeli: Dermatofitler, *Candida* türleri, aspergilloz, zigomikoz, koksidiomikoz, histoplazmoz, modelleri üzerinde çalışmalar yapılmaktadır (5, 6, 9, 10, 11).

Hamster Modeli: İntraperitoneyal yoldan infekte edilen hamsterlerde histoplazmoz, blastomikoz, sporotrikoz, penisilloz, parakoksidiomikoz gibi dimorfik ve sistemik mantar enfeksiyonları oluşturulmaktadır. Ayrıca yeni bir dimorfik mantar olarak tanımlanan *Emmonsia pasteuriana* için en iyi hayvan modelinin hamsterler olduğu belirtilmiştir (12, 13).

Sıçan Modeli: Birçok mantar enfeksiyonu modeli kolaylıkla oluşturulabilmektedir. Vajinal ve oral kandidoz, son yıllarda önemi artan *Pneumocystis carinii* için en uygun hayvan modelidir. Blastomikoz, aspergilloz, koksidiomikoz üzerinde çalışmalar yapılmaktadır (1, 3, 5, 14, 15).

Fare Modeli: En kolay bulunan, bakımı zahmetsiz olan, mikolojik çalışmalarda en çok kullanılan ve oldukça ucuz bir deney hayvanıdır. aspergilloz, sistemik kandidoz, oral kandidoz, zigomikoz, blastomikoz, koksidiomikoz, histoplazmoz üzerinde çalışmalar yapılmaktadır (3, 5, 6, 14, 16).

Tedavi çalışmaları mikolojide hayvan modellerinin en sık kullanım alanı olarak karşımıza çıkmaktadır. Hayvanlarla yapılan tedavi çalışmalarında kullanılan antifungalın sinerjik ve antagonistik etkisine, farmakokinetiğine ve canlı organizmadaki dozunun optimum olmasına dikkat edilmelidir (6). Bu alanda başta *Candida* türleri olmak üzere hemen hemen tüm mantarlar için çeşitli modeller oluşturularak çalışmalar yapılmakta, dokulardaki organizma yoğunlukları ölçülerek yeni bulunan antifungal ajanların tedavi etkinlikleri incelenmektedir (14, 17, 18, 19, 20, 21).

Başta *Candida* türleri olmak üzere çeşitli mantar patojenler için patogenez çalışmaları yapılmaktadır. Bu çalışmalarda hayvanlar her gün izlenmeli, vücut ağırlıkları ve davranışlarındaki değişiklikler kontrol edilmeli, oluşabilecek lezyonlara dikkat edilmelidir. Hayvan öldürüldükten sonra organlar makroskopik ve histopatolojik olarak incelenmeli, mikolojik yönden kültürü yapılmalıdır (6, 22, 23, 24, 25).

Mikolojide hayvan modelleri aynı zamanda aşılama ve immünoloji çalışmaları (7, 16), virülans çalışmaları (27) ve tanı çalışmalarında (26) kullanılmaktadır.

Hayvan modelleri yeni geliştirilen tanı yöntemlerinin özgüllük ve duyarlılığını ölçmede bize yardımcı olmaktadır. Bu tanı yöntemleri insanlardan alınan klinik örneklerle uygulanmadan önce deneysel olarak infekte edilmiş hayvanlardan alınan örneklerde incelenmekte ve güvenli tanı konulabilecek en düşük organizma miktarları saptanmaktadır (7).

Ayrıca hayvan modelleri değişik tip mikozlarda hangi sıra ile hangi dokularda ne yoğunlukta infektif organizma yükü olduğunu saptamada, enfeksiyon etkenine ve çeşidine göre hangi doku ve yöntemin seçilmesi gerektiği konusunda bize yol gösterici olmaktadır (7).

Polanco ve ark. (8) akut dissemine kandidoz modelini gerçekleştirdikleri bağışık sistemi tam Yeni Zellanda tavşanlarının kanında nested PCR'in *Candida albicans*'ları saptamada PCR ve lizis-santrifügasyon kan kültür yönteminden daha başarılı olduğunu bildirmişlerdir.

Hussain ve ark. (28) bir başka çalışmada invaziv kandidoz oluşturdukları fare modelinde PCR yöntemini histopatolojik incelemelerle karşılaştırmış ve PCR yönteminin duyarlılığını % 85.71 özgüllüğünü % 88.52 olarak bildirmişlerdir.

Bialek ve ark. (29) oluşturdukları fare histoplazmozisinin tanı, tedavi ve şifasının takibinde nested PCR yönteminin doku ve kan örneklerinde güvenle kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Becker ve ark. (15) aspergilloza özgül PCR ve galaktomannan seviyesinin tespiti için kullanılan ELISA yöntemlerini sıçan modelinde oluşturdukları invaziv pulmoner aspergillozda karşılaştırmışlar ve galaktomannan seviyesinin

saptanmasının invaziv pulmoner aspergillozun izleminde ve tanısında PCR yönteminden daha değerli olduğunu bildirmişlerdir.

Khan ve ark. (30) nötropenik dişi BALB/C farelerde yaptıkları çalışmada cinse özgül tek tur PCR ile türe özgül nested PCR yönteminin duyarlılığını karşılaştırmış, nested PCR yönteminin kandidiyaz ve kandidemi vakalarında kanda *Candida* türlerinin saptanmasında güvenle kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Moragues ve ark. (31) tavşanlarda oluşturdukları sistemik enfeksiyon modelinde *Candida dubliniensis* ve diğer *Candida* türlerinin, oluşan spesifik antikorlar ile ayırd edilebileceğini ve bu yöntemle *Candida dubliniensis* tanısının kolayca konulabileceğini göstermişlerdir.

Pitarch ve ark. (32) farklı duyarlılıklara sahip iki değişik fare türünde (BALB/C ve CBA/H) de oluşturdukları sistemik kandidoz modelinde *Candida albicans*'a karşı oluşan bağışık serumun iki yönlü poliakrilamid jel elektroforezini yapmış ve 31'den fazla immünreaktif protein ayırtmışlardır. Elde edilen immünreaktif proteinlerin çoğunun insan bağışık serumunda da bulunduğu belirtilen çalışmada araştırmacılar *Candida albicans* antijenlerinin tanınması ve oluşan hastalığın izleminde iki yönlü elektroforezin immunoblotting yöntemiyle kombinasyonunun kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Hurst ve ark. (7) tavşan modelinde oluşturdukları invaziv aspergilloz modelinde antijenemi ve antijenürinin duyarlı, özgül ve hızlı tanısında lateks aglütinasyon ve sandwich enzyme immunassay (SEIA) yöntemlerini enzyme immunassay (EIA) yöntemi ile karşılaştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda EIA yönteminin, invaziv aspergillozun serum ve idrardan en erken ve en yüksek duyarlılıkla tanı potansiyeline sahip olduğu belirtilmiştir.

Lowenstein ve ark. (33) allerjinin moleküler tanısında fare ve tavşanlara saflaştırılmış allerjenler vererek, RAST (radioallergosorbent test) ve ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) yöntemleriyle *Alternaria* ve *Cladosporium*'a karşı gelişen antikor titrelerindeki artışı izlemişlerdir.

Bağışıklığı baskılanmış kişilerin toplumdaki artan oranları ile her geçen gün daha sık ve ölümcül enfeksiyonlar olarak karşımıza çıkan mantar hastalıklarının özellikle erken ve doğru tanısı önem kazanmaktadır. Bu tip hastalarla çalışan hekimler yeni tedavi ve tanı yöntemlerine ihtiyaç duymakla birlikte hastalar üzerinde sınırlı olabilecek uygulamalar ve durumun ciddiyeti nedeniyle yeni tedavi ve tanı yöntemleri öncelikle hayvan modelleri üzerinde çalışılmaktadır.

Tanı amacıyla mikolojide hayvan modellerinin kullanımı ile oluşan enfeksiyonların evrelerine göre etkenin doku dağılımları ve uygun tanı yöntemi hakkında yönlendirici sonuçlar elde edilmektedir. Yeni geliştirilen antifungallerin denenmesinde yol gösterici olduğu gibi yeni tanı yöntemlerinin denenmesi, duyarlılık ve özgüllüklerinin belirlenmesinde de bizlere yardımcı olmaktadır.

Yaptığımız örnek çalışmada sıçanlara deri altından haftada iki kez 2 mg deksametazon ile immünsüpresyon uyguladık. Oluşabilecek enfeksiyonları önlemek amacıyla içme sularına litreye 500 mg olacak şekilde tetrasiklin ilave ettik. 4. haftadan itibaren 1000 mg/lt olacak şekilde tetrasiklin dozunu artırdık. Üçüncü hafta sonundan itibaren sıçanlarda *Pneumocytis carinii* enfeksiyonunun gelişimi gözlemlendi. Tedavi edilmeyen sıçanların hepsi 12. hafta sonuna kadar öldüler. İstenirse içme suyuna 2 mg/lt deksametazon katılır. İçme sularına 500 mg/lt tetrasiklin konur.

Dördüncü haftadan sonra 1000 mg/lt tetrasiklin içme suyuna, 4. haftanın sonundan 15. hafta sonuna kadar hayvanlar yaşar. Fakat % 15 oranında enfeksiyon oluşur (20 farede 3).

Güvenilir bir hayvan modelinin oluşturulması basit görünebilmekle birlikte ulaşılması son derece güçtür. Yüksek üreme, insan enfeksiyonlarına yakınlık, yapılabilme pratikliği gibi pek çok şartlar yerine getirilmelidir. Bu nedenle, pulmoner aspergilloma ve *H.capsulatum* var. *duboisii* tarafından yol açılan histoplasmosis gibi pek çok önemli fungal enfeksiyon için uygun hayvan modellerinin olmayışı şaşırtıcı değildir. Daha da önemlisi günümüzde araştırmacıların hayvan modeli çalışmaları yapmaya olan ilgilerini açıkça kaybediyor olmalarıdır. Hayvan modellerinin olmamasının, medikal araştırmalarda ve potansiyel faydalı bilgilerin klinik ortamda başarıyla uygulanmasında çok ciddi sorunlar doğuracağı unutulmamalıdır.

## Kaynaklar

1. Değerli K, Balcıoğlu C, Kilimcioğlu AA, Girginkardeşler N, Tamay TA, Özbilgin A. İmmunitesi Baskılanmış Modellerde *Pneumocystis carinii* Pnömonisi Oluşturulması ve Trimetoprim-Sülfametoksazol Profilaksisi. İnfek Derg, 2000; 14:261-266.
2. Brummer E. Animal models for fungal infections: an update. Mycopathologia, 2001; 152(1):3.
3. Yuthika HS, Lakshman PS. Experimental Oral Candidiasis in Animal Models. Clin Microbiol Rew, 2001; 398-429.
4. Steele C, Ratterree M, Fidel PL. Differential Susceptibility of Two Species of Macaques to Experimental Vaginal Candidiasis. J Infect Dis, 1999; 180:802-810.
5. Sorensen KN, Clernons KV, Stevens DA. Murine models of blastomycosis, coccidioidomycosis and histoplasmosis. Mycopathologia, 1999; 146:53-65.
6. Kamei K. Animal models of Zygomycosis - Absidia, Rhizopus, Rhizomucor and Cunninghamella. Mycopathologia, 2000; 152:5-13.
7. Hurst SF, Reyes GH, McLaughlin DW, Reiss E, Morrison CJ. Comparison of commercial latex agglutination and sandwich enzyme immunoassays with a competitive binding inhibition enzyme immunoassay for detection of antigenemia and antigenuria in a rabbit model of invasive aspergillosis. Clin Diagn Lab Immunol, 2000; 7(3):477-485.
8. Polanco A, Mellado E, Castilla C, Rodriguez-Tudela JL. Detection of *Candida albicans* in blood by PCR in a rabbit animal model of disseminated candidiasis. Diagn Microbiol Infect Dis, 1999; 34(3):177-183.
9. Svecova D. Experimental *Trichophyton rubrum* infection in animals. Epidemiol Mikrobiol Immunol, 2000; 49(2):75-79.
10. Maebashi K, Itoyama T, Uchida K, Suegara N, Yamaguchi H. A novel model of cutaneous candidiasis produced in prednisolone-treated guinea-pigs. J Med Vet Mycol, 1994; 32(5):349-359.
11. Schmidt A. Animal models of aspergillosis - also useful for vaccination strategies? Mycoses, 2002; 45(1-2):38-40.
12. Drouhet E, Huerre M. Yeast tissue phase of *Emmonsia pasteuriana* inoculated in golden hamster by intratesticular way. Mycoses, 1999; 42 (Suppl 2):11-18.

13. Finkelievich JL, Iovannitti C, Negroni R, Elias Costa MR. Experimental coccidioidomycosis in hamsters. Disease kinetics and death curve in relation to infective dose. *Mycoses*, 2000; 43(9-10):333-338.
14. Kuştimur S. Hayvan Modellerinde Candida İnfeksiyonları. Kiraz N, Kiremitçi A, Akgün Y, Ed. *Candida Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Sempozyumu (21-22 Haziran 2002, Eskişehir) Kitabı'nda 2002*; 85-91.
15. Becker MJ, de Marie S, Willemse D, Verbrugh HA, Bakker-Woudenberg IA. Quantitative galactomannan detection is superior to PCR in diagnosing and monitoring invasive pulmonary aspergillosis in an experimental rat model. *J Clin Microbiol*, 2000; 38(4):1434-1438.
16. Bernardis F, Santoni G, Boccanera M, Spreghini E, Adriani D, Morelli L, Cassone A. Local anticandidal immune responses in a rat model of vaginal infection by and protection against *Candida albicans*. *Infect Immun*, 2000; 68(6):3297-3304.
17. Guhad FA, Henrik E, Jensen, Hau J. Experimental murine mycotic mastitis: a sensitive and lenient model for studies of antifungal chemotherapy. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 1999; 26(2):125-130.
18. Arthington-Skaggs BA, Warnock DW, Morrison CJ. Quantitation of *Candida albicans* ergosterol content improves the correlation between *in vitro* antifungal susceptibility test results and *in vivo* outcome after fluconazole treatment in a murine model of invasive candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000; 44(8):2081-2085.
19. Saxena S, Bhatnagar PK, Ghosh PC, Sarma UP. Effect of amphotericin B lipid formulation on immune response in aspergillosis. *Int J Pharma*, 1999; (188)1:19-30.
20. Castro NC, Flórez PA, Molina RR. Chromoblastomycosis Murine Model and *in vitro* Test to Evaluate the Sensitivity of *Fonsecaea pedrosoi* to Ketoconazole, Itraconazole and Saperconazole. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 1996; 91(6):779-784.
21. Niwano Y, Kuzuhara N, Goto Y, Munechika Y, Kodama H, Kanai K, Yoshida M, Miyazaki T, Yamaguchi H. Efficacy of NND-502, a novel imidazole antimycotic agent, in experimental models of *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* infections. *Int J Antimicrob Agents*, 1999; 12(3):221-228.
22. Kamai Y, Kubota M, Kamai Y, Hosokawa T, Fukuoka T, Filler SG. New model of oropharyngeal candidiasis in mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001; 45(11):3195-3197.
23. Kurup VP, Grunig G. Animal models of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Mycopathologia*, 2002; 153(4):165-177.
24. Andrutis KA, Riggle PJ, Kumamoto CA, Tzipori S. Intestinal lesions associated with disseminated candidiasis in an experimental animal model. *J Clin Microbiol*, 2000; 38(6):2317-2323.
25. Gomes GM, Cisalpino PS, Taborda CP, de Camargo ZP. PCR for Diagnosis of Paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol*, 2000; 38(9):3478-3480.
26. Garcia ML, Herreras JM, Dios E, Argueso P, Almaraz A. Evaluation of lectin staining in the diagnosis of fungal keratitis in an experimental rabbit model. *Mol Vis*, 2002; 25(8):10-16.
27. Deepe GS, Romani L, Calich VL et al. Knockout mice as experimental models of virulence. *Med Mycol*, 2000; 38(1):87-98.
28. Hussain Z, Elsayed S, Fitzgerald V, Hall A. Comparison of PCR to histology for the diagnosis of invasive candidiasis in a murine model. *Scand J Infect Dis*, 2001; 33(1):51-55.

29. Bialek R, Fischer J, Feucht A, Najvar LK, Dietz K, Knobloch J, Graybill JR. Diagnosis and monitoring of murine histoplasmosis by a nested PCR assay. *J Clin Microbiol*, 2001; 39(4):1506-1509.
30. Khan ZU, Mustafa AS. Detection of *Candida* species by polymerase chain reaction (PCR) in blood samples of experimentally infected mice and patients with suspected candidemia. *Microbiol Res*, 2001; 156(1):95-102.
31. Moragues MD, Omaetxebarria MJ, Elguezabal N, Bikandi J, Quindos G, Coleman DC, Ponton J. Serological differentiation of experimentally induced *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* infections. *J Clin Microbiol*, 2001; 39(8):2999-3001.
32. Pitarch A, Diez-Orejas R, Molero G, Pardo M, Sanchez M, Gil C, Nombela C. Analysis of the serologic response to systemic *Candida albicans* infection in a murine model. *Proteomics*, 2001; 1(4):550-559.
33. Lowenstein H, Larsen JN. Progress in molecular diagnostics of allergy. *Res Immunol*, 1998; 149:253-254.

# ŞOK VE SEPSİS İLE İLGİLİ DENEYSSEL ARAŞTIRMALAR

*Tutku SOYER*

*Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye*

## Giriş

Şok, dokularda hipoksi ve metabolizmanın bozulmasına bağlı olarak ortaya çıkan dolaşım ve doku perfüzyonunda azalma olarak tanımlanmaktadır. Şokun ortaya çıkmasından birçok karışık mekanizma sorumlu tutulmaktadır. Doku perfüzyonunda bozulmaya neden olan duruma göre şok, hipovolemik, kardiyak, nörojenik ve septik olmak üzere çeşitli tiplere ayrılmıştır. Şokun neden olduğu hücrel olayların ve oluşan immün yanıtın değerlendirilmesi ve bu mekanizmaları önleyebilecek tedavi alternatiflerinin ortaya konulması için deneysel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla geçtiğimiz yıllarda şok ve özellikle septik şoka yönelik birçok deneysel model geliştirilmiş ve buradan elde edilen bilgiler kliniğe uygulanmaya çalışılmıştır. Ancak hayvan deneyleriyle elde edilen klinik değişikliklerin ve immünolojik yanıtın insanlarda görülen şok tablosunu birebir yansıtmadığı görülmektedir. Buna karşın son yirmi yıldır bu konuya ilişkin yapılan bine yakın deneysel çalışma şok ve sepsisin önlenmesine ve tedavisine ışık tutmaya çalışmaktadır.

Deney hayvanlarında oluşturulan şok ve sepsisin yöntemsel farklılıklar nedeniyle sonuçları karşılaştırılması güçtür. Bu nedenle insandakine benzer bir klinik ve immün yanıtın elde edildiği ideal bir modelin ortaya koyulmasını da zorlaştırmaktadır. Bu amaçla sık kullanılan şok ve sepsis modellerinden hemorajik şok ve septik şok modellerinin yöntem ve sonuçlarının sunulması planlanmaktadır.

## Hemorajik Şok ile İlgili Deneysel Araştırmalar

Hemorajik şok herhangi bir nedene bağlı kan hacmin kaybedilmesi ile ortaya çıkan ve dolaşım sistemi yoluyla dokuların metabolik ihtiyaçlarını karşılayabilecek yeterli perfüzyonun sağlanamadığı şok tablosudur (1). Hemorajik şokta gecikmiş immün yanıt ve bütün retiküloendotelial sistem işlevleri baskılanır (2). Klinikte hemorajik şok olabilmesi için kan hacminin % 25'inin kaybedilmesi gerekir (1). İnsanlarda ortaya çıkan hemorajik şok hipotermi, hipoksi, hipotansiyon, asidoz, kaogülopati ve doku, organ zedelenmesi ile bulgu verir (3). İnsanlarda görülen hemorajik tablosunun taklit eden ideal bir deney modeli olmamakla birlikte, hemorajik şok modelleri üç başlıkta toplanır (3). Bunlar;

1. Sabit basınçlı veya Wigger hazırlığı: Denek sabit bir basınçla daha önce belirlenen süre boyunca kanatılır.
2. Sabit hacim modeli: Belirlenen bir süre boyunca sabit bir kan hacmi dolaşımdan uzaklaştırılır. Kan basıncı değişiklikleri sabit değildir.
3. Süregelen kanama modeli: Kanama cerrahi olarak kontrol edilmez.

Klinik olarak insanlarda ortaya çıkan sepsis bulgusuna en yakın model süregelen kanama modelidir (3). Ancak bu modelde deneylerin standardizasyonu güç olduğundan sonuçları değerlendirilmede de tutarsızlıklar ortaya çıkmaktadır. Bu



nedenle en sık kullanılan yöntem sabit basınçlı Wigger hazırlığıdır. Bu yöntemin basamakları aşağıda özetlenmiştir (4).

- Genel anestezi altında 22G kateter yardımıyla femoral arterden invazif monitorizasyon yapılır.
- İnvazif monitorizasyon sayesinde ilk sistolik, diyastolik ve ortalama arter basıncı (OAB) monitorize edilir.
- Daha sonra femoral venden OAB 40 mmHg'a düşene kadar venöz kan heparinle yıkanmış enjektöre alınır.
- Toplam süre 10 dakika olup, OAB'nin 40 mmHg'nin üstüne çıkması durumunda basıncı düşürüne kadar kan alınmaya devam edilir. Deney süresi 60 dakikayı geçmemelidir.

Bu modelin çeşitli modifikasyonları birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. Bunlar arasında femoral arter yerine karotis arterin kullanılması ve OAB'nin 35 mmHg'e kadar azaltılması yer almaktadır (3). Basıncın 35 mmHg'ye düşürüldüğü modellerde kanatma süresi 5 dakika, deney süresi ise 30 dakikayı geçmemelidir. Heparinize enjektöre çekilen kanın 30 dakika sonra geri infüzyonu ise iskemi reperfüzyon modeli olarak kullanılmaktadır (5).

Diğer bir hemorajik şok modeli ise hacim kontrollü kanama yöntemidir. Bu yöntemin uygulanması için sıçan kan hacmi  $TKH = 6.12 \pm 0.3$  ml/kg olarak hesaplanır ve bu kan hacminin % 40'ı 30 dakikada kanatılarak kontrollü bir kanama oluşturulur (6). İnfüzyon setinin ters bağlanması ile 12 ml/saatte kan alınması ile oluşturulan hacim kontrollü yöntemlerde bulunmaktadır.

Hemorajik modellerinde şok oluşturulduktan sonra sıvı infüzyonu yapılması immün sistemi aktive eder. Nötrofiller ve mikrosirkülasyonunda katıldığı abartılı bir sistemik enflamatuvar yanıt oluşur. TNF $\alpha$  ve IL-6 gibi proenflamatuvar maddelerde artış gözlenmektedir (6). Hemorajik şokun geç döneminde kompleman sistemi aktivasyonu ve kapiller geçirgenlikte artış olmakta ve fagositik aktivite artmaktadır (1, 2). Sonuç olarak hemorajik şok modelleri kolay uygulanabilen ve şoka bağlı ortaya çıkan immün yanıtın araştırılmasına olanak sağlayan deneysel modellerdir.

### **Sepsis ve Septik Şok ile İlgili Modeller**

Sepsis, konak ile enfeksiyöz ajan arasındaki karışık bir seri etkileşim sonunda enflamatuvar yolların aktivasyonuna, sitokin salınımına ve koagülasyona neden olan klinik bir sendromdur (7). Septik şok ise sepsise bağlı ortaya çıkan dolaşım kollapsıdır. Sepsis izleminde ve tanısında kullanılan yöntemlerin gelişimine ve tedavi seçeneklerindeki yeniliklere rağmen halen önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir. İnsanlarda ortaya çıkan sepsis ve ona bağlı şokun fizyopatolojisinin bilinmesi yeni tedavi alternatiflerinin ortaya konulması için gereklidir. Bu amaçla birçok deneysel model ortaya konulmuştur. Ancak bu modellerin hangisinin insanlardaki sepsis tablosunu yansıttığı tartışma konusudur. Sepsis modellerinin sonuçlarını değerlendirmek için sepsiste ortaya çıkan enflamatuvar yanıtın kısaca hatırlanması gerekir. Sepsis hiperenflamatuvar ve onu takip eden hipoenflamatuvar fazları içerir (8). Bu fazlar;

- Hiperenflamatuvar faz: Sepsis doğal immüitenin aktivasyonunda artışa neden olur. Bunun sonucunda birçok enflamatuvar mediyatör ve sitokinler salınır. Burada esas olan proenflamatuvar sitokinler IL-6 ve TNF'dir. Polimikrobiyal sepsiste önemli sitokin ise IL-17'dir (8).

- Hipoenflamatuvar faz: Nötrofillerdeki sinyal yollarının ortadan kalması immünsüpresif faza neden olmakta ve lenfositler ve dendritik hücrelerde apoptosise neden olmaktadır (9, 10). Bu evrede hastalar nozokomiyal enfeksiyonlar nedeniyle kaybedilirler. Sepsis tedavisinde apoptosise önlenmesi önemli bir yer tutar (8).

Sepsis ve septik şok için tariflenen modellerin kliniğe uygunluğu oluşturdukları hiper ve hipoenflamatuvar faza göre değerlendirilir. Wichterman ve arkadaşları 1980'de ilk kez deney hayvanlarında 4 çeşit septik şok yöntemi tariflemiştir (11). Bunlar:

1. İntravenöz bakteri infüzyonu
2. Fekal veya bakteriyal süspansiyonlarla peritonit oluşturulması
3. Ekstremitelerde yumuşak doku absesi
4. Gastrointestinal sistemde bariyerlerin bozulması ile elde edilen yöntemlerdir.

Geçmiş yıllar içerisinde bu yöntemler içinde en sık kullanılanları canlı bakteri infüzyonları, endotoksin modelleri ve çekal bağlama - delme yöntemidir.

### ***Canlı bakteri infüzyonu***

İntravenöz canlı bakteri uygulaması ile sepsis benzeri tablonun oluştuğuna dair çalışmalar bulunmaktadır (11, 12). Bu amaçla en sık kullanılan mikroorganizma E.coli'dir (13). İntravenöz yoldan 10 (8-10) bakteri/kg E.coli verilmesini takiben ikinci saatte sepsisin hiperdinamik fazına benzer tablo oluşur (14). Bu modelde oluşan sepsis E.coli'ye bağlı olduğundan insanlardakine benzer polimikrobiyal sepsis oluşmaz. Canlı bakteri infüzyonunun bir diğer dezavantajı ise sepsiste bu kadar hızlı bakteriyemi olmamasıdır (13, 14).

Ahrenholz ve Simmons 1980'de  $2 \times 10^3$  organizmayı % 100 serum fizyolojik içinde periton içine uygulayarak peritonit ve ona bağlı sepsis modeli geliştirmişlerdir (15). Canlı bakterilerin feçes içine yerleştirilip batin içine koyulmasıyla da intraabdominal abse tablosu oluşturulmaya çalışılmaktadır. Tüm bu araştırmalara rağmen sepsis modeli için canlı bakteri kullanılması en sık tercih edilen model değildir.

### ***Endotoksin modelleri***

Gram (-) bakterilerin hücre duvarından elde edilen endotoksinler veya lipopolisakkaridler (LPS) birçok hücreden enflamatuvar medyatörlerin salınmasına ve sepsise yol açan olayların başlamasına neden olur. Endotoksinler ile oluşturulan modellerin hangi hayvanlarda uygulanacağı önemlidir. Çünkü kemirgenler, kedi ve köpekler endotoksin dirençlidir (13). Yüksek doz (5 mg/kg) LPS uygulanması ani kardiyopulmoner kollapsa ve erken ölüme neden olurken düşük doz (1-3 mg/kg) ise hiperdinamik yanıt ve erken kardiyak outputta artışa neden olmaktadır (13). LPS'lere bağlı değişiklikler doz ve tür bağımlıdır. LPS'in en önemli avantajları; kullanımının kolay olması, tek doz halinde veya infüzyonla verilmesi, kontrollü ve standart bir

model olmasıdır (8, 14). Ancak buna rağmen LPS verilmesi endotoksik şok için uygun bir model olmakla birlikte sepsis için ideal bir model değildir (13). LPS modelinin dezavantajları şu şekilde sıralanabilir;

1. Bu yöntemde Gr (-) sepsis oluşur, insandakine benzer polimikrobiyal bir sepsis oluşmaz.
2. LPS'ye bağlı hemodinamik değişiklikler insanlardaki sepsise benzer değildir.
3. Kemirgenler endotoksinlere dirençli iken, insanlar oldukça hassastır.
4. İşlem öncesi bakteri üretimi ve sayımı gereklidir.
5. Sitokin oluşumu endotoksin verilmesini takiben yüksek miktarda ve hızlı iken insanlarda daha yavaş ilerleyen bir süreçte olur.
6. İnsan sepsisinin aksine LPS'de glukoneogenez baskılanır ve hipoglisemi olur.
7. Dokuda ölçülen endotoksin miktarı klinikle eşgüdümlü değildir.

LPS'ler dışında eksojen bir endotoksin olan zimozan da sepsis modeli oluşturmak amacıyla kullanılmaktadır (14).

### **Çekal Bağlama ve Delme (Cecal ligation and puncture)**

İnsanlarda görülen sepsisi en iyi taklit eden hayvan modeli çekal bağlama ve delmedir (ÇBD). ÇBD'de oluşan doku hasarı çekumun nekrozu ile enfeksiyonun peritona yayılmasına ve peritonit tablosunun oluşmasına yol açar. Peritonit sonrası enterik bakteriler kan akımına transloke olup enflamatuvar yanıtın oluşmasına ve septik şok tablosunun gelişmesine neden olur (8). Çekumun bağlanma uzunluğu, delme sayısı, delme amacıyla kullanılan iğne kalınlığı gibi birçok nedene bağlı ÇBD sonrası farklı sonuçlar elde edilmektedir (17, 18). Bu nedenle yaklaşık 30 yıldır sepsis modeli olarak altın standart olarak kabul edilen bu yöntemin sonuçlarının tartışılması için standart bir modelin oluşması gerekmiştir (8). Bu amaçla 2009 yılında *Nature Protocols'da* standart bir model protokolü oluşturulmuştur (19). Burada bu protokolün basamakları özetlenmiştir (19).

- Deneyler günün aynı saatinde yapılarak sirkadyen ritime bağlı değişiklikler önlenir.
- Ketamin (80-100 mg/kg) ve Xylazine (5-15 mg/kg) ile anestezi yapılır.
- Karında cerrahi saha temizliği ve traşlama yapıldıktan sonra uzunlamasına orta hat kesisi yapılır.
- Çoğu kez çekum karında solda yerleşir. Bulunduktan sonra insizyondan çıkarılır.
- Çekum mezenteri kesilir (Bu yalnızca sıçanlarda uygulanan bir basamaktır).
- Oluşturulmak istenen sepsisin ciddiyetine göre çekum bağlanır. Çekum ile çekal valve ne kadar yakın bağlanırsa o kadar ciddi sepsis oluşmaktadır. Bunun standardize edilmesi için şu oran kullanılır;

*Çekum ucu ile bağlanan mesafe: İleoçekal valv ile çekumun bağlandığı mesafe*

Orta evre sepsiste bu oran % 50 : % 50 iken, ileri evre sepsiste bu oran % 75 : % 25'dir (19).

- Çekal delme yapılmadan önce çekum içeriği distale doğru itilir. Hava ve gaz nazikçe aspire edilir.

- Çekum tek bir yerden fareler için 21G, sıçanlar için 18G iğne ile çekumun ucu ile bağlama yerinin tam ortasından barsağın mezenterik kısmından antimezenterik kısmını boyunca delinir.

- Mezenterik ve antimezenterik kısımdan çıkan fekal içerik görüldükten sonra çekum karın içine geri bırakılıp karın kapatılır.

#### *Postoperatif izlem*

- Subkutenöz yolla 37<sup>0</sup>C sıcaklıktaki serum fizyolojik her 100 g vücut ağırlığı için 5 ml olacak şekilde verilir. Eğer sıvı resüstasyonu yapılmaz ise sepsisin hiperdinamik fazı oluşmaz. Bu nedenle sıvı tedavisi mutlaka yapılmalıdır.

- Hayvanlar işlem sonrası 12 saat gündüz 12 saat gece döngüsünde, ısı kontrollü (22<sup>0</sup> C) bir ortamda, istedikleri kadar su ve yem almalarına izin verilerek takip edilirler.

#### *ÇBD'nin avantajları;*

- Basit bir işlemdir, endotoksin üretimine gerek yoktur.

- Polimikrobiyal sepsise neden olur. En sık üretilen bakteriler; E.coli, Proteus, Enterekoklar, streptokoklar (viridans, bovis) ve Bactroides fragilistir (11). En erken 6. saate kan kültüründe üreme saptanabilir (20).

- İnsandaki sepsise benzer hem hiperdinamik hem de hipodinamik fazların ortaya çıkmasına neden olur.

- Uzamış ve zamanla artan sitokin salımı nedeniyle insanlarda görülen sepsise benzer. Perfore apandisit ve divertikülite benzer tabloya neden olur.

ÇBD'nin en önemli dezavantajı ise yöntemsel farklılıklar nedeniyle sonuçların tartışılır olmasıdır. ÇBD sonrası elde edilen bilgilerin insanlarda görülen sepsise karşılaştırılması sonuçların değerlendirilmesi için gereklidir. Tablo 1'de insan sepsisi ile ÇBD modeli karşılaştırılması yer almaktadır.

**Tablo 1. ÇBD ile insan sepsisinin karşılaştırılması**

<b>Farklılıklar</b>	<b>ÇBD modeli</b>	<b>İnsan sepsisi</b>
Yaş	Genç hayvanlar	Yenidoğanlar veya yaşlılar
Ağırlık	Eşit	Değişken
Cinsiyet	Genelde tek cinsiyet	Her iki cins
İmmun durum	Optimum	Çoğu kez suboptimal
Beslenme durumu	Eşit	Farklı

Genetik	İnbred	Heterojen
Sosyal faktörler	Çok nadir	Sık; sigara, alkol, stres
Çevre	Tanımlanmış, patojen free	Değişken
Başlangıç	Çoğu kez ani	Genellikle yavaş
Etken	Polimikrobiyal, miksed enterik bakteriler	Gram (-)'ler, Gram (+)'ler, virüs ve mantarlar
Antibiyotik kullanımı	Bazen	Çoğu kez kullanılır
Tedavi	Genellikle erken	Genellikle geç
Antikoagülan	Yüksek	Düşük tolerans
Eşlik eden hastalıklar	Nadir	Sık; hipertansiyon, diyabet, kanser, immünsüpresyon
Destek tedavi	Nadir	Sık; antibiyotikler, sıvı resüstasyonu, mekanik ventilasyon, vazopresörler

Yukarıda bahsedilen protokol uygulanarak yapılan ÇBD'den 12 saat sonra sıçanlarda ateş, piloereksiyon, güçsüzlük, azalmış motor aktivite ortaya çıkar. Mortalite genellikle 18-24 saatte ortaya çıkar (19). Orta derecede sepsiste 72 saatin sonunda farelerde % 40 mortalite ile sonuçlanır (19). Mortalite postoperatif 5-7. günlerde % 20'den fazla olmaktadır. Ciddi sepsis yapılan hayvanlarda 4. günde tüm hayvanlar kaybedilir (19).

ÇDB'de yöntemsel farklılıkların sonuçlar arasında tutarsızlık oluşturduğu ve sonuçların delme sayısı ve delme amacıyla kullanılan iğne büyüklükleri ile değiştiği bilinmektedir (21). Çift delme sonrası 24 saatin sonunda sağ kalım % 25, tek delme de ise % 70'dir (11). Delme için 18G iğne kullanımı sonrası 48 saatin sonunda sağ kalım % 30, 22G iğne ile delme sonrası aynı sürede sağ kalım % 54'dür (11).

ÇBD sonrası ortaya çıkan enflamatuvar yanıtın farklı olması sağlayan en önemli yöntemsel farklılık ise çekumun bağlanma uzunluğudur. Çekum ne kadar uzun bağlanırsa o kadar fazla IL-6 ve TNF-alfa düzeyleri o kadar fazla olur (17).

Bahsedilen tüm bu kısıtlamalara rağmen ÇBD en sık kullanılan ve sonuçlarına en sık güvenilen sepsis modelidir.

### **Çıkan Kolon Stent Peritoniti (*Colon ascendes stent peritonitis*)**

Kemirgenlerde kullanılan bir diğer polimikrobiyal sepsis modeli çıkan kolon stent peritonitidir (ÇKST) (22). Çıkan kolona cerrahi olarak yerleştirilen stent aracılığı ile sürekli intestinal bakteri kaçağı olmakta bu da polimikrobiyal sepsisle sonuçlanmaktadır.

ÇKST yaygın peritonit oluşumuna neden olurken ÇBD'nin daha çok intraabdominal abse yaptığı öne sürülmektedir. ÇBD'de en sık artışı saptanan sitokin TNF-alfa iken, ÇKST'de IL-2 ve IFN-gamma ön plandadır (22). ÇKST ile ilgili sonuçlar oldukça kısıtlı olup standart bir yöntem tarifi bulunmamaktadır. Bu nedenle de çok sık kullanılan bir yöntem değildir.

## Sonuç

Sepsis ve septik şok ile ilgili deneysel çalışmalar yöntemsel farklılıklar ve bazı kısıtlılıklar nedeniyle insanlarda oluşan sepsis ve şoku birebir karşılamamaktadır. Bu yöntemler arasında en sık başvurulan ÇBD yöntemidir. Bu yöntemle ilgili ortaya konulan protokoller hayvan modellerinden elde edilen bilgilerin standardizasyonu ve bu sonuçların insan sepsisinin sonuçlarını değerlendirmede ve sepsiste tedavi alternatiflerini ortaya koymada kullanılmaktadır. Ancak laboratuvarında elde edilen verilerin kliniğe uyarlanması yeni çalışmaları gerektirmektedir.

## Kaynaklar

1. Çelik A, Keskinöglü A, Erdener D. Hemorajik şokta fagositik aktivite. Ege Tıp Dergisi, 2000; 39(2):89-92.
2. Sori AJ, Rush BF, Lyzs TW, Smith SM, Machiedo GW. The gut as a source of sepsis after hemorrhagic shock. Am J Surgery, 1988; 155:187-192.
3. Deitch EA. Animal models of sepsis and shock: A review and lessons learned. Shock, 1998; 9:1-11.
4. Ateş S, Ateş O, Hakgüde G, Gökel E, Olguner Ç, Olguner M, Elar Z, Paksoy S, Canda Ş, Akgür FM. Hemorajik şok sonrası farklı resüstasyon sıvılarının no-reflow fenomenine etkileri. DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi, 2006; 20:21-28.
5. Kocabaş V, Büyükbaş S, Şahin DA, Başarılı MK. Hemorajik şoku izleyen iskemi-reprfüzyon hasarının karaciğer oksidan-antioksidan duruma etkisi. Selçuk Tıp Dergisi, 2009; 4:203-210.
6. Güven H, Hökelek M. Deneysel hemorajik şok modelinde hacim kontrollü pratik bir kanatma yöntemi. Ulus Travma Derg, 2003; 9:102-102.
7. Van der Poll T. Immunotherapy of sepsis. Lancet Infect Dis, 2001; 1:165-174.
8. DeJager L, Pinheiro, Dejonckheere E, Libert C. Cecal ligation and puncture: the gold standart model for polymicrobial sepsis? Trends in Microbiology, 2011; DOI:10.1016/j.tim.2011.01.001.
9. Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. Nat Rev Immunol, 2006; 6:813-822.
10. Muenzer JT. Characterization and modulation of the immunosuppressive phase of sepsis. Infect Immun, 2010; 78:1582-1592.
11. Wichtermann KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock- A review of laboratory models and a proposal. J Surg Res, 1980; 29:189-210.
12. Cryer HM, Garrison RN, Kaebnick HW, Harris PD, Flint LM. Skeletal microcirculatory responses to hyperdynamic Eschericia coli sepsis in unanesthetized rats. J Clin Invest, 1987; 122:86-90.
13. Garrido AG, Poli de Figueiredo LF, Silva MR. Experimental models of sepsis and septic shock: an overview. Acta Chir Brasileria, 2004; 19:82-88.
14. İskit AB. Sepsiste deneysel modeller. Yoğun Bakım Dergisi, 2005; 5:133-136.
15. Ahrenholz DH, Simmons RL. Fibrin in peritonitis. Benifical and adverse effects of fibrin in experimental E.coli peritonitis. Surgery, 1980; 88:41-45.

16. Fink M, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res*, 1990; 49:186-196.
17. Singleton KD, Wischmeyer PE. Distance of cecum ligation influences mortality, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 expression following cecal ligation and puncture in the rat. *Eur Surg Res*, 2003; 35:486-491.
18. Baker CC, Chaudry IH, Gaines HO, Baue AE. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. *Surgery*, 1983; 94:331-335.
19. Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nature Protocols*, 2009; 4: 31-36
20. Coria-Avila GA, Gavrilu AM, Menard S, Ismail N, Pfaus JG. Cecum location in rats and implications for intraperitoneal injections. *Lab Animal*, 2007; 36:25-30.
21. Otero-Anton E, Gonzalez-Quintela A, Lopez-Soto A, Lopez-Ben S, Llovo J, Perez LF. Cecal ligation and puncture as a model of sepsis in rat: Influence of the puncture size on mortality, bacteremia, endotoxemia and tumor necrosis factor alpha levels. *Eur Surg Res*, 2001;33:77-79.
22. Hubbard WJ, Choudry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue III lw, Bland KI, Chaudry IH. Cecal ligation and puncture. *Shock*, 2005; 24:52-57

## **Deney Hayvanlarında Yara Modelleri**

**Cemal AYGIT**

**Sağlık Bakanlığı İstanbul Bağcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi,  
Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Kliniği, İstanbul, Türkiye**

Deri epidermis ile dermis tabakalarından oluşur, kalınlığı ise vücudumuzun çeşitli bölgelerinde farklılıklar gösterir. Deri kalınlığının büyük kısmını ise dermis oluşturur (1). Yara, derinin (dokunun) bütünlüğünün bozulması durumudur. Kısmi kalınlıkta bir yanık yarasında iyileşme esas olarak epitelizasyonla olurken, yara kenarları karşılıklı gelen, insize edilmiş temiz bir yaranın iyileşmesinde esas rol kollajen oluşumuna aittir. Kenarları bir araya getirilmesi imkansız, geniş doku defekti olan yaraların iyileşmesinde ise temel süreç sekonder yara iyileşmesidir (2-4). İyileşme süreci, epidermal büyüme faktörü, keratinosit büyüme faktörü, temel fibroblast büyüme faktörü, transforme edici büyüme faktörü- $\alpha$ , trombosit derive edici büyüme faktörü gibi faktörler tarafından düzenlenir (3, 5).

### **YARA İYİLEŞMESİNDE GENEL PRENSİPLER**

#### **A. Epidermal Rejenerasyon**

Kısmi kalınlıklı deri yaralanmasında, epidermis tamamen ortadan kalkmış, dermal tabaka ise kısmen hasar görmüştür (6). Yaralanmadan birkaç saat sonra, yara kenarlarındaki keratinositlerde morfolojik değişiklikler belirgin hale gelir. Epidermal hücre katmanı kalınlaşır ve marjinal bazal hücreler defekte doğru göç ederler. Keratinositler göç etmeye başladığında, epidermal devamlılık sağlanıncaya kadar bir daha bölünmezler. Yara kenarlarının yakınındaki zonda, kıl folikülleri, ter ve yağ bezleri gibi epitelyal ekler tarafından da yeni epitelyal hücreler (epidermal keratinositler) oluşturulur (2, 4, 6). Epitel hücrelerinin göçü, denatüre olmamış hücre dışı matriks proteinlerinin, epitelyal hücrelerin plazma membranlarındaki integrin reseptörleri tarafından algılanmasına bağlıdır (6).

#### **B. İnsizyonel / Eksizyonel Yara İyileşmesi**

Yara iyileşme süreci iç içe geçen 3 evreye ayrılmıştır: Enflamasyon (reaktif faz), proliferasyon (rejeneratif faz) ve matürasyon (remodelling fazı) (2, 4, 6, 7). Bu süreç erken, orta, geç ve son evre olmak üzere dört aşama olarak da incelenebilir (3). Erken evrede, nötrofillerin hakim olduğu enflamasyon ve hemostaz gerçekleşir. Nötrofillerin yerini zamanla makrofajlar alır. Orta evrede, mezenkimal hücre proliferasyonu ve göçü, epitelizasyon ve anjiogenez meydana gelir. Geç evrede ise kollajen ve diğer matriks proteinlerinin sentezi ile yara kontraksiyonu gerçekleşir. Son evrede de yaranın yeniden şekillenmesi (remodelling) meydana gelir (3, 8). Primer yara iyileşmesi ile sonuçlanan insizyonel yaralanma ile sekonder yara iyileşmesi ile sonuçlanan eksizyonel yaralanma arasındaki en önemli fark, sekonder iyileşmede meydana gelen yara kontraksiyonudur. Hayvanlarda yara kontraksiyonu kapasitesi insanlara göre çok daha belirgindir (2, 9).

#### **C. Kıkırdak ve Tendonda Yara İyileşmesi**

Kıkırdak, hücre dışı matriksinde kondrositlerle beraber proteoglikan, kollajen ve suyun birarada bulunduğu özelleşmiş bir dokudur. Yaralanma sonrası kıkırdağın iyileşme sürecini, hücrelerin kapsülle çevrelenmiş olması ve damarsal ağ



bulundurmayan yoğun hücre dışı matriks gibi yapısal özellikleri etkiler. Kıkırdağın yaralanması perikondriyumunu uyararak çoğalmaya, eşlik eden kan invazyonu ise skar oluşumuna yardımcı olur (10, 11).

Tendon iyileşmesi de normal yara iyileşmesi basamaklarını içerir. Makrofajlar ve enflamatuvar hücreler onarım alanına akın ederken, fibrin pıhtı kesik iki uç arasını doldurur. Epitenon ve endotenon gibi ekstrinsik peritendinöz dokulardan köken alan hücreler, yaralanan bölgeye doğru göç eder ve morfolojik olarak fibroblastlara dönüşüp çoğalarak kollajen üretmeye başlarlar. Skar dokusu artmış su, DNA ve glikozaminoglikanla beraber tip I ve tip III kollajen içerir (12).

#### **D. Yanık Yarası**

Yanığı takiben yaralanmanın merkezinde nekroz oluşur, çevreye doğru şiddeti azalır. 1953 yılında Douglas Jockson'ın tarif ettiği, yanıkta "yaralanmanın 3 zonu" hala geçerlidir (1, 13). 'Koagülasyon zonu', canlı hücrelerin kalmadığı "hayalet hücreler" den oluşan yara merkezidir (1, 10). Canlı ve cansız hücrelerin birarada olduğu, kapiller vazokonstriksiyon ve iskemi ile karakterize 'staz zonu' ise daha periferdedir (1, 14). Bu ince alan 'risk zonu' olarak da tasvir edilebilir çünkü hipoperfüzyon, kuruma (dessication), ödem, enfeksiyon ve çeşitli sistemik faktörlerin etkisiyle nekroza gidebilir. En dıştaki zon ise, canlı hücreler ve lokal enflamatuvar hücrelerin sebep olduğu vazodilatasyon nedeniyle "hiperemi zonu" olarak isimlendirilir. Bu zondaki doku, enfeksiyon veya şiddetli hipoperfüzyon ile komplike olmadığı sürece tamamen iyileşir (1). Termal yaralanmanın endotelial hasarlanma, lökosit adheransı ve nötrofil aktivasyonunu içeren enflamatuvar kaskadı başlattığı bilinmektedir (15).

#### **E. Fetal Yara İyileşmesi**

Erken gestasyon dönemlerinde fetal dermal yaralanmalar, rejeneratif olarak, fibrozis ve skar dokusu oluşmadan iyileşebilir (2, 16). Skarsız iyileşen fetüs yaralarında, dermis ve epidermis normal yapı oluşacak şekilde onarılır. Kollajen matriks paterni retiküler olup, kıl folikülleri ve ter bezleri de normal olarak gelişir. Fetüsteki skarsız yara iyileşmesi fetal çevreye bağlı değildir. Fetal deri greftleri postnatal transplante edildiğinde de skarsız iyileşir. Bu yüzden amniyotik sıvı, fetal çevre ve fetal serum faktörleri skarsız iyileşmeyle bağdaştırılamaz. Skarsız iyileşme fetal dokuya ve muhtemelen deri gelişim faktörlerine bağlıdır (2). Örneğin P-selektin erişkinine göre fetüste daha az salınır. Bu da fetal yarada azalmış enflamasyon yanıtının bir açıklaması olabilir. Fetal ve erişkin doku komponentleri arasında molekül ve sitokin bazında çeşitli farklılıklar olsa da, en önemli fark, fetal yarada enflamasyonun oluşmamasıdır (16). Hem gestasyonel yaş hem de yaranın boyutu fetüsün skarsız iyileşmesinde önemlidir. Skarsız iyileşmeden skarlı iyileşmeye dönüşüm, "intermediate" onarımın meydana geldiği dereceli bir geçiş sürecidir. "Geçiş yarası", hem skarlı iyileşmenin (deri ekleri yoktur) hem de skarsız iyileşmenin (normal ekstrasellüler matrikse sahiptir) özelliklerine sahiptir. Fetal yara iyileşme biyolojisini anlamak, skar ve fibrozisi minimize etmek için klinisyenlere yardımcı olacaktır (2).

## II. YARA MODELLERİ

### A) *In vivo* hayvan modelleri Eksizyonel yara iyileşmesi modelleri

Normal bir yara iyileşmesinde altta yatan ve bu süreci kontrol eden moleküler ve hücrel mekanizmaları ortaya koymak için, değişik hayvan modelleri geliştirilmiştir. Hem sağlıklı hem de bozulmuş veya değiştirilmiş iyileşme durumları ile karakterize hayvan modelleri üzerinde, eksizyonel yara iyileşmesindeki moleküler, hücrel ve doku değişiklikleri incelenmiştir. Bozulmuş veya değiştirilmiş yara iyileşmesi durumları, genetik olarak defektli hale getirilmiş veya transgenik olan hayvanlar üzerinde çalışılır. Hayvan modelinde hemoraji, granülasyon dokusu oluşumu ve anjiogenik süreçler gibi tamir mekanizmaları ile birlikte görülen kompleks doku değişiklikleri araştırılır. Hayvan deneylerinde, kıyaslanabilirliği ve yinelenebilirliği garanti altına almak için, her bir deneyde belirli bir yaş ve ağılıktaki hayvanlar kullanılmalıdır. Yaralanmış fareler oluşturulan hasara dayanıklıdır ve anestezinin etkisi geçtikten hemen sonra hareketlenerek, temizlenme ve beslenmeye başlarlar. Yaralanmadan birkaç saat sonra yaranın üzeri ince bir kabukla örtülür ve bu kabuk onarımın ilk iki gününde daha güçlü bir hale gelir. Fareler genellikle yaralanma sonrası 1, 3, 5, 7 ve 13. günlerde, yaralı dokudan numune almak için sakrifiye edilirler. Bu günler, enflamasyon, keratinosit göçü ile proliferasyonu ve yeni stromanın oluşumunu da içeren tamir sürecinin merkezi zamanlarını yansıtır. Yara, sakrifiye edilmiş hayvandan bir makas yardımıyla çıkartılır. Burada önemli olan yara kenarlarını çevreleyen yeterli derecede doku çıkarılması ve alttaki derin dokuların da buna ilave edilmesidir. Böylece oluşan granülasyon dokusunun tamamının çıkarılması sağlanmış olur. Yara kenarları ve granülasyon dokusu tamir sürecinin merkezi olduğundan, daha sonra yapılacak olan yara kaynaklı gen ekspresyonu ve histolojik incelemeler için kritik öneme sahiptir. Yara modelleri, hem farmakolojik ajanların (enzimatik inhibitörler gibi) etkilerini hem de normal veya bozulmuş yara iyileşmesi durumlarında, rekombinant büyüme faktörlerinin etkilerini araştırmaya olanak sağlarlar (2, 3, 17).

### İnsizyonel yara iyileşmesi modelleri

Epidermin bazal hücreleri mitotik aktivite ile çoğalır ve zamanla granülasyon dokusu gelişip, kollajen fibriller ortaya çıkar. Kollajen fibriller arasında oluşan çapraz bağlar ile yara direnme gücü üçüncü ayda önemli oranda normale döner. Yara direnme gücüne ilişkin deneysel çalışmalar sıklıkla gine domuzu, sıçan ve farelerde yapılmıştır. Bu hayvan modelleri, insandaki yara iyileşmesini tam olarak karşılamaz. Hayvanlar yara enfeksiyonlarından insanlar kadar çabuk etkilenmezler ve skar oluşumu da daha azdır (2, 8). Histolojik olarak insanlarda bulunmayıp alt memelilerde bulunan gevşek areolar doku altındaki "pannikulus karnozus" kası, bölgesel cildin istemli hareketlerine ve yaranın kontraksiyonuna yardımcı olur. İnsanlarda ise alttaki yapılara uzanan deri ekleri dermal mobilizasyonu azaltır. Deneysel çalışmalarda yara kapanma oranlarını insanlardakine uyarlarken bu faktörler göz önünde tutulmalıdır (2, 8, 9).

### Reepitelizasyon modelleri

Günümüzde, yara iyileşmesi süreci makroskopik hücre biyolojisi düzeyinde çok iyi tanımlanmış olmakla beraber, moleküler düzeyde çok az bilgiye sahibiz. İyileşmeyen yaralardan alınan sıvı ve doku örneklerinin analizi, iyileşen ve

iyileşmeyen yaralar arasındaki moleküler farklılıkları ortaya koymaktadır. Karakteristik olarak, iyileşen yaralarda, iyileşmeyen yaralara oranla enflamatuvar sitokinlerin ve proteazların azaldığı ayrıca büyüme faktör düzeylerinin yüksek olduğu görülür (2, 3, 5, 6). Son zamanlarda, yanık yarası iyileşmesinde, büyüme hormonlarının kullanılmasına ilişkin tedavilerin geliştirilmesi için, kısmi kalınlıklı cilt yarası oluşturulmuş hayvan modelleri kullanılmaktadır (5, 6). Epidermal iyileşme için değişik hayvan modelleri tarif edilmiştir. Bunlar, bant ile abrazyon, kısmi kalınlıklı cilt eksizyonu, vakum yardımcı kabarcık oluşturma, haşlanma yanıkları ve kısmi kalınlıklı termal hasar oluşturma modelleridir (6).

### **Yanık yarası modelleri**

Termal yaralanma, hücrel koruma mekanizmaları, hipermetabolizma, uzamış katabolizma, organ disfonksiyonu ve immün süpresyon gibi lokal ve sistemik yanıtlarla karşımıza çıkabilir (18). Uygun bir yanık modeli şu elementleri içermelidir; yanığı oluşturmada kullanılacak aletler, ilgili aletin sıcaklık derecesi ve temas süresi, termal yaralanmayı uygulama metodu. Yanık için kullanılan herhangi bir havan modeli tekrar edilebilir ve güvenilir olmalıdır. Deneyde aynı temas süresi ve sıcaklık uygulanmalı, benzer hasar ile sonuçlanmalıdır (19).

**Lokal etkiler:** Ahlaki ve etik açılardan insan derisinin *in vivo* deneylerde kullanılması sınırlıdır. Araştırmalarda deri yanıkları üzerinde çalışmak için değişik hayvan modellerinin yanı sıra *in vitro* preparasyonlar da kullanılmıştır.

Yanık patolojisinde hücre düzeyindeki pekçok bilgi, özellikle fare ve sıçan gibi rodent modellerinden elde edilmiştir. Değişik tedavi ajanlarını değerlendirmek için kısmi kalınlıklı temas ve haşlanma yanıkları oluşturulan domuz modelleri de kullanılmıştır (5, 19). Domuz derisi, hem anatomik hem de fizyolojik olarak insan derisine benzer. İnsanlardaki yara iyileşme çalışmaları ile küçük memelilerdeki çalışmalar % 53 oranında uyum gösterirken, domuzda bu oran % 78'dir (9, 20).

**Sistemik etkiler:** Termal hasar ve sepsisteki değişmiş doku cevaplarının mekanizmalarını daha iyi anlamak için, yanık patolojisini değişik açılardan yansıtan bir modele ihtiyaç vardır. Son yıllarda termal yaralanma sonrası immün baskılama gelişimini gösteren çok sayıda araştırma yapılmıştır. Toksik oksijen metabolitlerinin sistemik enflamatuvar cevap sendromu ve yanık sonrası organ disfonksiyonu üzerindeki etkisini destekleyen pekçok deneysel ve klinik çalışma vardır (14, 15). Doğal hücrel bağışıklığın aktivasyonu, sistemik enflamatuvar cevap sendromunun proksimal medyatörleri olan pro-enflamatuvar sitokinlerin üretilip salınmasına öncülük eder (1, 18).

### **İskemik yara iyileşmesi modelleri**

Uzamış iskemi, yarada enfeksiyon, enflamasyon ve nekroza yol açar. Enfeksiyon halinde bakterilerin ortamdaki uzaklaştırılması için yara iyileşmesinin enflamasyon fazı uzayarak, yara iyileşmesi gecikir (4, 21). Diyabet, bası yarası, periferik vasküler hastalık ve venöz staz durumlarında ortaya çıkan iskemi, yara iyileşmesini bozan önemli bir etkidir (21, 22). Günümüzde kronik yara için ideal bir hayvan modeli yoktur. Deri iskemisi, sıçan sırtında hazırlanan "H" şeklinde random pattern flep (21), domuz sırtında tam kalınlıklı bipediküllü flep (20) ve sıçanlarda oluşturulmuş flep (23) modellerinde çalışılmıştır. Bir başka modelde de tavşankulağı iskemik hale getirilmiştir (21).

## **Diyabetik yara iyileşmesi modelleri**

Diabetes mellitus doku tamiri bozulmasının en önemli sebebidir (24). Bu hastalarda sadece yara gelişmesine eğilim olmayıp, yara iyileşmesi problemleri de ortaya çıkar. *In vivo* ve *in vitro* araştırmalar göstermiştir ki, hem hiperglisemi hem de glikoz oksidasyon ürünleri yara iyileşmesinin bozulmasına yol açmaktadır (25). Diyabetik yapılan ve diyabete genetik predispozisyonu olan hayvanlarda, doku tamiri modelleri geliştirilmiştir. Diabetes mellitus çok kompleks hastalıklar spektrumu olup, insandaki tüm formları temsil eden bir hayvan modeli yoktur. Değişik hayvan modellerinden hangisinin, insandaki diabetes mellitusun hangi yönüyle eşleştiğini anlayarak, planlanan çalışmaya uygun doğru modelin seçimi yapılmalıdır. Diyabette makrovasküler hastalığa ek olarak mikrovasküler yapılar da etkilenir, bu da doku beslenmesinin bozulması ile iskeminin gelişmesine sebep olarak yara iyileşmesinde gecikmeye yol açar (4, 24, 26). Aynı zamanda kapillerlerin bazal membranında da değişiklikler meydana gelerek perfüzyon problemleri ortaya çıkar (24). Bir diğer olumsuz faktör ise diabetes mellitusta ortaya çıkan nöropatidir (4, 24). His kaybı, kas zayıflamaları, azalmış terleme ve kuru cilt problemleri görülür. Son olarak diabetes mellitus, immün fonksiyonların bozulmasına, dolayısıyla da enfeksiyona yatkınlığa yol açar. Diabetes mellitus için değişik hayvan modelleri tarif edilmiştir. Genel olarak pankreası çıkarılmış, kimyasal olarak alloksan veya streptozotocin uygulanmış, genetik olarak insülin-bağımlı ve insülin-dirençli hale getirilmiş hayvan modelleri bulunmaktadır (24-26).

## **Fetal yara iyileşmesi modelleri**

Skarsız fetal yara iyileşmesi fenomenini anlamak, bir gün bize erişkindeki yara iyileşmesi işlemini değiştirip skarsız iyileşmenin yolunu açabilecektir (2, 27). Erken gestasyonel dönemde fetal yaranın skarsız bir şekilde iyileşmesi işlemini düzenleyen sitokinler araştırılmıştır. Gestasyonun 16 ve 18. günlerinde, cilt iyileşmesinde skarsız iyileşmeden skarlı iyileşmeye bir geçiş olur. Erişkin yara iyileşmesi işlemine katıldığı bilinen pekçok sitokinin, endojen gen ekspresyonu düzeyleri ölçülebilmektedir (16, 27). Erken gestasyonel süreçten mid-gestasyonel sürece kadar olan zamandaki fetal dermal yaralanmaların rodent, tavşan, koyun ve maymun gibi türler üzerinde yapılan çalışmalarında, dermal ve epitelyal dokunun hızlı bir şekilde yenilenerek fibrozis ve skar oluşumu gelişmeden, belirgin bir iyileşme kapasitesine sahip olduğu artık kabul görmektedir (16).

## **Hipertrofik skar ve keloid hayvan modelleri**

Keloid ve hipertrofik skar insanlara özgüdür ve bilinmeyen bir sebeple hayvanlarda oluşmaz (2). Bu nedenle, nude mice modellerinde hipertrofik skar gelişimi araştırılması için, sırtlarına insandan alınan kısmı kalınlıklı ve tam katlı deri greftleri transplante edilmiştir. İlginç olarak kısmı kalınlıklı deri grefti uygulanan hayvan modellerinde daha fazla skar dokusu gelişmiştir (28, 29). Hipertrofik skar, yaranın olduğu bölgede lokalizedir ve yükselmiş skar dokusu zamanla geriler (2). Keloid ise, yara kenarlarının dışına doğru büyüme eğilimindedir ve yavaş bir büyüme paternine sahip benign deri tümörleri gibi davranır. Otozomal dominant genetik predispozisyon gösterir (2, 29). Keloid dokusu transplante edilmiş atimik nude fare modelinde keloidin morfolojik paternini ve glikozaminoglikan dağılımını araştıran çalışmalar vardır (29). Hem hipertrofik skar hem de keloid artmış yara iyileşmesinin olduğu fibroproliferatif hastalıklardır (2, 28). Genelde, hem keloidde hem de hipertrofik skarda fibroblastlarda kollajen sentezi, depozisyonu ve birikimi

artmıştır. Keloid fibroblastları, hipertrofik skar fibroblastlarına göre skarı stimüle eden sinyallere daha fazla yanıt verirler. Örnek olarak; dışardan verilen TGF- $\beta$ , keloid fibroblastlarında hipertrofik skar fibroblastlarına oranla çok daha fazla artışa sebep olur. Yapılan çalışmalarda normal skar, hipertrofik skar ve keloiddeki apoptoza bakılmıştır. Normal skar ve hipertrofik skarda yara kenarlarında benzer sayıda apoptotik hücre sayısı bulunmuştur. Keloid dokusunda ise fibroblast aktivasyonunun sürmesini açıklayacak şekilde apoptotik gen ekspresyonunda azalma gösterilmiştir (2).

### **Kıkırdak ve tendonda yara iyileşmesi modelleri**

Perikondrium, kıkırdak rejenerasyonunda büyük rol oynasa da olgun kıkırdağın rejenerasyon kapasitesinin olmadığına inanılır. Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada hasar görmüş olgun olmayan kıkırdağın, derin perikondriyal hücrelerin kondrositlere dönüşmesi ve kondrositlerin mitozu ile proliferate olduğu gösterilmiştir (10). Tendon iyileşmesinde trombositten zengin plazma (PZP)'nin etkilerini araştıran bir çalışma, Yeni Zelanda beyaz tavşanları üzerinde yapılmıştır. Bu çalışmada, aşil tendonu kesilen PZP grubundaki tavşanlarda, iyileşmenin erken döneminde büyüme hormonu (IGF-1)'nin epitenon ve endotenonda lokalize olduğu gösterilmiştir (30).

### **B) *In vitro* modeller**

#### **Cilt kültürleri**

Reepitelizasyonun da dahil olduğu, kompleks iyileşme süreci esas olarak değişik *in vivo* hayvan modellerinde çalışılmıştır. Bazı deneysel sorular için, deney sistemini basitleştirilip ilgilenilen tek bir değişken izole edilmek istenebilir. Bu da en iyi *in vitro* hücre kültürü sistemi ile sağlanabilir (31, 32). Tek tip hücre kültürü ile hayvan modeli kıyaslandığında deneyin değişkenleri dramatik bir şekilde azalır. Ancak *in vitro* hücre kültürü sistemleri, *in vivo* hücrelerin yanıtlarını etkileyen diğer komponentlerden yoksundur (6). Değişik ırklardaki farklı morfolojik yapılar ve yaralanmış mikroçevrenin kompleks doğasından dolayı, insan cildinin reepitelizasyonunun değişik evreleri hakkında bilgi edinmek zordur. Bu zorlukları aşmak için deri organ kültürü modelleri geliştirilmiştir (31, 32). Hayvan modelleri oluşturmanın zor olduğu, hipertrofik skar ve keloid gibi durumlarda insan fibroblast kültürü *in vitro* olarak çalışılmıştır. Keloid dokusunda TGF- $\beta$ 1 mRNA molekül seviyelerinin normal hücrelere oranla bariz olarak artmış olduğu yapılan fibroblast kültürlerinde gösterilmiştir (33, 34).

### **Fibroblast - kollagen etkileşimleri**

Dermal defektlerin iyileşmesi, onarım alanında yeni konnektif doku matriksinin integrasyonu ve yerleşmesi ile olur. Bu da fibroblastlar ve kollajen arasında etkileşimi gerektirir (2, 35). Bu süreci daha iyi anlamak için *in vitro* modellerin kullanılması uygundur. Bu modellerden birisi de dermal fibroblast içeren kollajen kafestir. Bu çalışmalarda insan cildine benzer bir yapı oluşturulmuştur (35, 36).

### **Kaynaklar**

1. Pham TN, Gibran NS, Heimbach DM. Evaluation of the burn wound: management decisions. In: Herndon DN. Total Burn Care. 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 2007:119-125.

2. Lorenz HP, Longaker MT. Wound healing: repair biology and wound and scar treatment. In: Mathes SJ, Hentz VR. *Mathes Plastic Surgery*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders, 2006:209-255.
3. Lawrence WT. Physiology of the acute wound. *Clin Plast Surg*, 1998; 25:321-340.
4. Nwomeh BC, Yager DR, Cohen IK. Physiology of the chronic wound. *Clin Plast Surg*, 1998; 25:341-354.
5. Zakine G, Barbier V, Garcia-Filipe S, Luboinski J, Papy-Garcia D, Chachques JC, Carpentier A, Barritault D. Matrix therapy with RGTA OTR4120 improves healing time and quality in hairless rats with deep second-degree burns. *Plast Reconstr Surg*, 2011; 127:541-550.
6. Paddock HN, Schultz GS, Mast BA. Methods in reepithelialization. In: DiPietro LA, Burns AL. *Wound Healing*. New Jersey: Humana P, 2010:17-36.
7. Myers WT, Leong M, Phillips LG. Optimizing the patient for surgical treatment of the wound. *Clin Plast Surg*, 2007; 34:607-620.
8. Gamelli RL, He LK. Incisional wound healing. In: DiPietro LA, Burns AL. *Wound Healing*. New Jersey: Humana P, 2010:37-54.
9. Matsumura H, Yoshizawa N, Kimura T, Watanabe K, Gibran NS, Engrav LH. A burn wound healing model in the hairless descendant of the Mexican hairless dog. *J Burn Care and Rehabil*, 1997; 18:306-312.
10. Aygit AC, Benlier E, Top H, Yalcin O, Huseyinova G, Kanter M, Cakir B, Yurdakul E. The effects of thermal injury on immature rat ear cartilage. *J Burn Care Res*, 2010; 31:803-808.
11. Randolph MA, Yaremchuk MJ. Repair, grafting, and engineering of cartilage. In: Mathes SJ, Hentz VR. *Mathes, Plastic Surgery*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders, 2006:621-38.
12. Chang P. Repair and grafting of tendon. In: Mathes SJ, Hentz VR. *Mathes Plastic Surgery*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders, 2006; 591-603.
13. Goertz O, Vogelwohl J, Jettkant B, Daigeler A, Steinau HU, Steinstraesser L, Langer S. Burn model for in vivo investigations of microcirculatory changes. *Eplasty*, 2009; 9:120-130.
14. Cetinkale O, Konukoğlu D, Senel O, Kemerli GD, Yazar S. Modulating the function of neutrophils and lipid peroxidation by FK506 in a rat model of thermal injury. *Burns*, 1999; 25:105-112.
15. Cetinkale O, Senel O, Bulan R. The effects of antioxidant therapy on cell-mediated immunity following burn injury in an animal model. *Burns*, 1999; 25:113-118.
16. Naik-Mathuria B, Gay AN, Yu L, Hsu J, Smith CW, Olutoye OO. Fetal wound healing using a genetically modified murine model: the contribution of P-selectin. *J Pediatr Surg*, 2008; 43:675-682.
17. Frank S, Kämpfer H. Excisional wound healing. In: DiPietro LA, Burns AL. *Wound Healing*. New Jersey: Humana P, 2010; 3-15.
18. Yang Q, Berthiaume F, Androulakis IP. A quantitative model of thermal injury-induced acute inflammation. *Math Biosci*, 2011; 229:135-148.
19. Singer AJ, McClain SA. A porcine burn model. In: DiPietro LA, Burns AL. *Wound Healing*. New Jersey: Humana P, 2010; 107-119.
20. Roy S, Biswas S, Khanna S, Gordillo G, Bergdall V, Green J, Marsh CB, Gould LJ, Sen CK. Characterization of a preclinical model of chronic ischemic wound. *Physiol Genomics*, 2009; 37:211-224.
21. Sisco M, Mustoe TA. Animal models of ischemic wound healing. In: DiPietro LA, Burns AL. *Wound Healing*. New Jersey: Humana P, 2010; 55-65.

22. Plock JA, Rafatmehr N, Sinovcic D, Schnider J, Sakai H, Tsuchida E, Banic A, Erni D. Hemoglobin vesicles improve wound healing and tissue survival in critically ischemic skin in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009; 297:905-910.
23. Zhang Q, Chang Q, Cox RA, Gong X, Gould LJ. Hyperbaric oxygen attenuates apoptosis and decreases inflammation in an ischemic wound model. *J Invest Dermatol*, 2008; 128:2102-2112.
24. Greenhalgh DG. Tissue repair in models of diabetes mellitus. In: DiPietro LA, Burns AL. *Wound Healing*. New Jersey: Humana P, 2010; 181-189
25. Marrotte EJ, Chen DD, Hakim JS, Chen AF. Manganese superoxide dismutase expression in endothelial progenitor cells accelerates wound healing in diabetic mice. *J Clin Invest*, 2010; 120:4207-4219.
26. Fadini GP, Albiero M, Menegazzo L, Boscaro E, Pagnin E, Iori E, Cosma C, Lapolla A, Pengo V, Stendardo M, Agostini C, Pelicci PG, Giorgio M, Avogaro A. The redox enzyme p66Shc contributes to diabetes and ischemia-induced delay in cutaneous wound healing. *Diabetes*, 2010; 59:2306-2314.
27. Peled ZM, Warren SM, Bouletreau PJ, Longaker MT. Methods for investigating fetal tissue repair. In: DiPietro LA, Burns AL. *Wound Healing*. New Jersey: Humana P, 2010; 149-159.
28. Wang J, Ding J, Jiao H, Honardoust D, Momtazi M, Shankowsky HA, Tredget EE. Human hypertrophic scar-like nude mouse model: characterization of the molecular and cellular biology of the scar process. *Wound Repair Regen*, 2011; 19:274-285.
29. Shetlar MR, Shetlar CL, Hendricks L, Kischer CW. The use of athymic nude mice for the study of human keloids. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1985; 179:549-552.
30. Lyras DN, Kazakos K, Georgiadis G, Mazis G, Middleton R, Richards S, O'Connor D, Agrogiannis G. Does a single application of PRP alter the expression of IGF-I in the early phase of tendon healing? *J Foot Ankle Surg*, 2011. (Epub ahead of print).
31. Moll I. Human skin organ culture. In: DiPietro LA, Burns AL. *Wound Healing*. New Jersey: Humana P, 2010; 305-310.
32. Bi D, Chen FG, Zhang WJ, Zhou GD, Cui L, Liu W, Cao Y. Differentiation of human multipotent dermal fibroblasts into islet-like cell clusters. *BMC Cell Biol*, 2010; 11:46.
33. Butler PD, Ly DP, Longaker MT, Yang GP. Use of organotypic co-culture to study keloid biology. *Am J Surg*, 2008; 195:144-148.
34. Wang R, Ghahary A, Shen Q, Scott PG, Roy K, Tredget EE. Hypertrophic scar tissues and fibroblasts produce more transforming growth factor-beta1 mRNA and protein than normal skin and cells. *Wound Repair Regen*, 2000; 8:128-137.
35. Ehrlich HP. The fibroblast-populated collagen lattice. In: DiPietro LA, Burns AL. *Wound Healing*. New Jersey: Humana P, 2010; 277-291.
36. Ng W, Ikeda S. Standardized, defined serum-free culture of a human skin equivalent on fibroblast-populated collagen scaffold. *Acta Derm Venereol*, 2011. (Epub ahead of print).

## **Beyin Mikrodiyaliz ve Mikropanç Teknikleri: Monoamine Analizi için Örnek Alınması**

**Bayram YILMAZ**

**Yeditepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye**

Beyin dokusunda nörokimyasal analizler için, çok sayıda araştırmacı doku ve hücre dışı sıvı örnekleme metodu geliştirmeye çalışmaktadır. Bu amaçla başvurulan ilk metotlardan biri, beyin mikropanç tekniğidir (1). Bu metoda göre, deney hayvanında post-mortem beyin dokusu diseksiyonla hızla çıkartılarak kuru buz üzerine alınır. Dondurulmuş beyin dokusundan soğutmalı bir mikrotom yardımıyla ve Paxinos & Watson (2) rat beyin atlası rehberliğinde 500 µm kalınlığında koronal olarak kesit alınır (3). Kesitler kuru buz üzerinde soğutulmuş lamlar üzerine alınır ve araştırılması amaçlanan beyin bölgeleri, atlasla belirtilen koordinatlara göre, ucu küt özel mikropanç iğneleriyle çıkartılarak tüpler içerisine transfer edilir ve hemen sıvı azotta dondurulur. Daha sonra bu beyin örnekleri 0.1 M HCl içerisinde homojenize edilir, üst sıvı içerisindeki monoaminler (noradrenalin, dopamin, serotonin ve bunların metabolitleri) Yüksek Performans Sıvı Kromatografi – Elektrokimyasal Detektör (HPLC – ECD) yöntemiyle analiz edilir. Santrifüj sonrası tüpün dibinde kalan doku pelletinin protein içeriği spektrofotometrik olarak ölçülünerek ağırlıkları belirlenir. HPLC – ECD analizlerinde elde edilen monoamin değerleri, protein ağırlığına bölünerek bulgular pg amin/µg protein olarak hesaplanır.

Mikropanç yöntemiyle ancak post-mortem beyin dokusunda nörokimyasal analizler yapılabilmesi, araştırmacıları yeni metotların geliştirilmesine yöneltmiştir. Beyin dokusunda hücre dışı sıvı örneklemesine yönelik olarak geliştirilen en önemli metot, mikrodiyaliz'dir. Daha önce geliştirilen ve kullanılan "push-pull perfusion", mikrodiyaliz yöntemine göre daha invaziv ve kullanımı zor bir metot idi (5). Urban Ungerstedt (1991) tarafından geliştirilen mikrodiyaliz tekniği, deney hayvanları ve beyin dokusu dışında günümüzde klinikte ve diğer dokularda da uygulanan bir örnekleme metodudur (6). Beyin mikrodiyaliz yönteminde, deney hayvanı anestezisi altında stereotaksik cihaza yerleştirilir ve Paxinos & Watson beyin atlasına göre Bregma noktası referans alınarak koordinatlar belirlenir. Daha önceden hazırlanan ve suni beyin omurilik sıvısı (BOS) ile doldurulan mikrodiyaliz probu belirlenen beyin alanına yerleştirilir ve sabitlenir. Mikrodiyaliz şırıngası mikrodiyaliz pompasına yerleştirilir ve dar boru üzerinden proba BOS pompalanır (akım hızı ortalama 2 µl/min). Probun ucundaki diyaliz membranı (konsantrasyon farkı prensibine göre) BOS içerisinde uygulanan kimyasal maddenin beyin dokusuna infüzyonuna, karşılığında da dokular arası sıvıda bulunan düşük moleküler ağırlığa sahip maddelerin prob membranından dışarı geçmesine ve örneklenmesine imkan sağlar. Bu moleküller (monoaminler, amino asitler, nöropeptitler veya sitokinler) uygun yöntemlerle analiz edilirler. Örneğin, diyaliz sıvısında monoamin düzeyleri HPLC - ECD metoduyla ölçülünür (6). Beyin mikrodiyaliz tekniği, anestezisi altındaki veya bilinçli hayvanda (çeşitli davranışlar sırasında) bu moleküllerin *in vivo* örneklenme ve analiz edilmesine imkan sağlar.

Beyin mikrodiyaliz tekniğinin uygulanmasının zor ve zaman alıcı olması, ayrıca deney sırasında beyin dokusunda probun travma oluşturması gibi dezavantajları da vardır. Bu nedenle, günümüzde daha az invaziv ve beyin nörokimyası ile ilgili daha hızlı sonuç verebilen ve tekrarlanabilir yöntemler geliştirme çabaları devam



etmektedir. Voltametri metoduyla bir karbon fiber mikroelettrotun beyin dokusuna yerleştirilmesi ve doğrudan *in vivo* beyin n6rotransmitterlerinin 6l6umlmesi yapılabilmektedir (7). Bu metoda g6re, fiber mikroelettrotla belirli bir voltaj uygulandığında noradrenalin, dopamin, serotonin ve glutamat gibi n6rotransmitterler oksidasyon reaksiyonuna girmekte, elektron salıvermekte ve bu yolla akımda 6l6ümlenebilen bir değişikliğe neden olmaktadır. Voltametri'nin hızlı analize imkan sağlayan "fast-scan cyclic voltammetry" formu daha 6ok kullanılmaktadır (8).

## Kaynaklar

1. Palkovits M & Brownstein MJ. Microdissection of brain areas by the punch technique. In: Brain microdissection techniques, Edited by Cuello AC. Methods in Neurosciences, Wiley, 1983; 2:1-36.
2. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego, CA, 1998.
3. Yilmaz B, Gilmore DP. Effects of mu, kappa, and delta opioid receptor agonists and antagonists on rat hypothalamic noradrenergic neurotransmission. Brain Res Bull, 1999; 48:491-495.
4. Ungerstedt U. Microdialysis-principles and applications for studies in animals and man. J Intern Med, 1991; 230:365-373.
5. Myers RD, Adell A, Lankford MF. Simultaneous comparison of cerebral dialysis and push-pull perfusion in the brain of rats: a critical review. Neurosci Biobehav Rev, 1998; 22:371-387.
6. Kutlu S, Aydin M, Alçin E, 6zcan M, Bakos J, Jezova D and Yilmaz B. Leptin modulates noradrenaline release in the paraventricular nucleus and plasma oxytocin levels in female rats: a microdialysis study. Brain Research, 2010; 1317:87-91.
7. Jaquins-Gerstl A, Michael AC. Comparison of the brain penetration injury associated with microdialysis and voltammetry. J Neurosci Methods, 2009; 183:127-135.
8. Robinson DL, Venton BJ, Heien ML, Wightman RM. Detecting subsecond dopamine release with fast-scan cyclic voltammetry *in vivo*. Clin Chem, 2003; 49:1763-1773.

# Multipl Sklerozda Nöro-dejenerasyon ve Enflamasyon Temelli Hayvan Modelleri

*Timuçin AVŞAR<sup>1</sup>, Aksel SİVA<sup>2</sup>, Tuncay ALTUĞ<sup>3</sup> Eda Tahir TURANLI<sup>1,4</sup>*

*<sup>1</sup>İstanbul Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji, Biyoteknoloji ve Genetik Araştırma Merkezi, <sup>2</sup>İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı, <sup>3</sup>İstanbul Bilim Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, <sup>4</sup>İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul, Türkiye*

## Özet

Hayvan modelleri, birçok hastalığın etiopatogenezinin ortaya çıkartılmasında önemli yöntemlerden biridir. Multipl skleroz (MS) gibi sinir sistemi ve bağışıklık sistemini etkileyen ya da onlardan etkilenen kompleks bir hastalıkta, hayvan modelleri hastalığın mekanizmasının anlaşılmasına yardımcı olmaktadır. MS, enflamatuvar, demyelinizan ve nörodejeneratif özellikler gösteren, otoimmün olduğu düşünülen bir merkezi sinir sistemi hastalığıdır. Hastalığın klinik ve radyolojik farklı özellikler taşıyan alt tipleri vardır. MS, mekanizmasının tam olarak aydınlatılmamasının yanı sıra, kalıcı olarak iyileşme sağlayan bir tedavisi de henüz yoktur. Hastalığın mekanizmasının anlaşılmasına ve tedavi denemelerinin yapılmasına yönelik hayvan modelleri, MS'in patofizyolojisini aydınlatmada önemli bir rol oynamaktadır. Fakat MS'de görülen klinik heterojenite, hayvan modeli kurmayı ve amaca yönelik veriler toplamayı zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, MS'in farklı özelliklerini yansıtan farklı hayvan modelleri bulunmaktadır. Bu hayvan modellerini, oluşturulmaları ve sebep olduğu biyolojik süreçlere göre, i) toksik demyelinizan, ii) enflamatuvar, iii) virüs kaynaklı demyelinizan ve iv) myelin-mutant transgenik hayvan modelleri olarak dört sınıfta toplayabiliriz. Herbir hayvan modeli, MS'in patofizyolojisinde görülen bir ya da birçok özelliği taşımakta olup her bir modelin kendi içerisinde çalışılan konuya ve sorgulanan hipoteze göre avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır.

## Giriş

Multipl skleroz (MS) gibi oluşum mekanizması tam olarak anlaşılammış ve buna bağlı olarak da tedavi yöntemlerine kesin çözümler getirilememiş hastalıklarda deneysel hayvan modelleri bilimsel araştırmalara önemli ölçüde katkı sağlamaktadır. MS merkezi sinir sisteminde (MSS) bağışıklık sistemi kökenli, enflamatuvar, demyelinizan ve nörodejeneratif özellikler taşıyan bir hastalıktır. Sinir hücrelerinde myelin kılıf elemanlarına, myelin kılıf üreten hücrelere ve sonrasında onunla ilişkili birçok sinir sistemi elemanına karşı gelişen nöro-immünolojik bir sendrom olarak nitelendirilmektedir (1, 2). Hastalığın klinik tablosu, patolojik fenotiplere göre heterojenite göstermektedir (3): Tek ataklı, yineleyen ve düzelen ya da tam düzelleme göstermeyen ataklı ya da yavaşça ilerleyen ataklar şeklinde klinik alt tipleri bulunmaktadır. Öte yandan zaman içinde hastalığın ilerlemesi ve semptomların gösterdikleri değişikliklere göre bu alt tipler arası geçişler de gözlemlenebilmektedir (1, 3)

Hastalığın mekanizması ve mekanizmaya yönelik tedavi modeliteleri hala büyük oranda bilinmemektedir. Fakat iyi karakterize edilmiş çeşitli MS hayvan modelleri

bulunmaktadır. Bu modeller hastalığın patojenezinde gözlemlenen demyelinizasyon, oligodendrositlerin ölümü, aksonların ve nöronların yıkılması ya da enflamatuvar süreçleri gözlemleyebilmemize, anlayabilmemize ve o mekanizmalara yönelik tedavi seçeneklerinin test edilebilmesine olanak sağlamaktadır. Bu bağlamda, farklı etken maddeler ya da yöntemler kullanılarak, hastalıkta görülen süreçlerin gözlemlenebildiği farklı MS hayvan modelleri oluşturulabilmektedir.

## **MS Deneysel Hayvan Modelleri**

Bugüne kadar yapılan MS hayvan modeli çalışmalarının her birinde, MS'in bir ya da birkaç özelliği modellenmeye çalışılarak, oluşturulan patofizyolojiyi mümkün olduğu kadar MS benzeri bir hale getirebilmek ve MS dışı durumların modeldeki varlığından kurtulmak istenmiştir. Bu amaçla oluşturulan bütün hayvan modellerinin avantaj ve dezavantajları vardır.

Deneysel MS hayvan modelleri, modeli oluşturma yöntemi, kullanılan ajanlar ve ulaşılmak istenen amaca göre sınıflandırılabilir. Burada öncelikle literatürde var olan tüm MS modelleri, yukarıda belirtilen özelliklerine göre sınıflandırılarak özetlenmeye çalışılmıştır. Hangi durumlarda nasıl bir MS hayvan modeli seçilmesi gerektiği konusunda literatür bilgisine dayanarak bir derleme yapılmıştır. Ayrıca grubumuzun MS hayvan modellerinden birisi olan cuprizon model ile fareler üzerinde yapılan deneylerden elde edilen bulgular verilmiştir.

## **Toksik Demyelinizasyon Hayvan Modelleri**

Merkezi sinir sistemindeki (MSS) tamir mekanizmasını öğrenmenin en iyi yollarından biri de toksik demyelinizasyon modelleridir. Lysolecithin (4) ya da ethidium bromide'in [5] fare ya da sıçanlarda MSS'de beyaz maddenin, demyelinizasyon gözlemlemek istenen bölgesine enjekte edilmesi ile seçici olarak myelin kaybı gerçekleştirilebilir. Bu modelin en önemli avantajı deneylerin aynı standartlarda tekrarlanabilirliği ve istenilen alanlara yapılan enjeksiyon ile demyelinizasyonun belirlenen alanlara özgü olarak yapılabilmesidir. Fakat toksinlerin enjeksiyonu sırasında, küçük bir travmatik yara meydana gelir. Bu yara kan beyin duvarının (KBD) kısmi olarak yıkılmasına ve enflamatuvar hücrelerin enjeksiyon bölgesine göç etmesine neden olur. Bu problemi çözmek için ise, ethidium bromide enjeksiyonunu takiben, farelere ya da sıçanlara radyasyon uygulanması ile göç eden ve proliferen olan hücrelerin elimine olmasını sağlar. Fakat radyasyon dozunun ve süresinin ayarlanması ya da radyasyonun nöronlar ve diğer glial hücreler üzerindeki etkileri deneyden toplanacak verilerin özgünlüğünü etkileyecektir.

Bir diğer toksik model ise cuprizon hayvan modelidir. Bu modelde, bir bakır çöktürücü ajan olan nörotoksik cuprizon (Biscyclohexanone Oxaldihydrzone) hayvanların besinlerine belirli oranlarda katılarak, 6 - 12 haftalık diyet tabii tutulurlar (6, 7). Bu süreçte 6 - 8 hafta sonra cuprizon'un besin diyetinden çıkarılması ile *akut* demyelinizan model oluşturulurken, daha sonraki dönemde remyelinizasyon süreci takip edilebilir. Fakat cuprizon diyeti 12 - 14 hafta boyunca devam ederse bu kez demyelinizasyon *kronik* bir hal alır ve remyelinizasyon süreci tamamlanamayabilir (8, 9). Bu iki patojenez de MS'in patofizyolojisinde farklı klinik alt tiplerde gözlemlenebilmektedir. Cuprizon MS modelinin birçok özelliği, moleküler, hücresel ve dokusal seviyede incelenmiştir. Cuprizon zaman ve doz oranlarına bağlı olarak demyeline olan fiberler (10), oligodendrosit ölümü (11) ve astrositlerin reaktivasyonu (11) ve bu süreç içerisinde T hücrelerinin seviyelerindeki değişiklikler (7, 12) farklı

çalışmalarda gösterilmiştir. MSS'de cuprizone diyetinden en çok etkilenen bölge corpus callosumdur (cc) (13, 14). CC beynin iki hemisferini birbirine bağlayarak, iki hemisfer arası iletişimi sağlamaktadır (15). Bu özelliği ile çok miktarda myelin kılıf bulundurur. Yanı başında ise, myelin kılıfın oluşmasında ve olgunlaştırılmasında görevli birçok hücre grubu bulunur (16). % 0.2 cuprizone diyetine 8 hafta maruz kalan C57BL/6J farelerde, metabolik düzenin bozulması, olgun oligodendrositlerin ölümü ve buna bağlı olarak myelini oluşturan myelin basic protein (MBP), myelin associated glycoprotein (MAG) miktarlarında önemli derecede düşüş yaşanmıştır (17, 18). Yapılan diğer çalışmalarda cuprizone kaynaklı demyelinizasyona ilk tepki olarak mikroglia ve makrofajların aktivasyonu (7), ardından 1 - 2 hafta sonra reaktif astrositlerin ortaya çıkması (11) ve daha sonra cuprizone diyetinin 6 - 8 haftaları arasında ise, öncül oligodendrositlerin ve hatta olgun oligodendrositlerin lezyon bölgesinde birikmeye başlaması (10) gözlemlenmiştir. Devamında eğer cuprizone diyetten çekilmezse oligodendrosit hücrelerinin de ölüme gittiği bir süreç başlamaktadır (10).

Turanli ve ark. 2010 yılında yaptıkları çalışmada ise, 12 hafta cuprizone diyetine tabi tutulan ve daha sonra 4 haftada remyelinizasyon için gözlemlenen C57BL/6J farelerinden alınan doku ve kan örneklerinde çeşitli nörolojik ve bağışıklık sistemi hücre ve molekülleri incelenmiştir. Farelerden alınan CC kesitlerinde yapılan immünohistokimyasal analizde, 12 haftada kronik demyelinizan bir model oluşturulabildiği gözlemlenmiştir. Ayrıca bu süreçte farelerden alınan kan örneklerinde akım sitometrisi ile yapılan analizlerde, enflamatuvar ve regülatör T hücrelerinin (CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup>) miktarının demyelinizasyona paralel olarak arttığı ve remyelinizasyon sürecinde de azaldığı gözlemlenmiştir. Aynı süreçte, aktif B hücrelerinin (CD80<sup>+</sup>/CD86<sup>+</sup>) miktarı ise demyelinasyonun başlangıç sürecinde artış gösterirken daha sonraki dönemlerde sürekli düşüş göstermektedir. Bu veriler, cuprizone fare modelinde kronik demyelinizasyon sürecinde regülatör ve yardımcı T hücrelerinin aktif bir şekilde rol alırken, B hücrelerinin ise, hastalığın başlangıç aşamasında B hücrelerinin de etkili olabileceğini göstermektedir (yayınlanmamış veri).

Toksik MS modelleri, oluşturulmaları bakımından kolay, tekrarlanabilir ve standardize edilebilir modeller olmasına rağmen, modeldeki patofizyoloji halen sorgulanmaktadır. Demyelinizasyonu indükleyici ajanın uygulanmasının ardından gerçekleşen demyelinizasyonun, enflamatuvar süreçten önce gelmesi ve bir anlamda enflamatuvar süreci demyelinizasyon sürecinin tetiklemesi, bu modelin MS'i tam olarak yansıtmadığını düşündürmektedir. Fakat demyelinizasyon sürecini çalışmak ve o süreçteki patofizyolojik etkileşimleri değerlendirmek için halen en uygun yöntem toksik MS modelleridir.

## **Enflamatuvar Hayvan Modelleri**

MSS'de enflamasyon için yaygın olarak kullanılan hayvan modellerinden biri de autoimmün ensefalomyelitis (EAE) modelidir. EAE, MSS'e bir doku parçası, saflaştırılmış myelin, myelini oluşturan proteinler ya da peptitlerin enjeksiyonu ile oluşturulabilir (19). Bu proteinlerden en çok kullanılanları ise, MBP, MOG, PLP, MAG OSP vb. myelin kılıf yapısında ya da olgunlaşmasında görev alan proteinlerdir. Buna ek olarak, EAE yukarıdaki proteinlere özgül aktive T hücrelerinin farelere transferi ile de oluşturulabilir. Burada kullanılan farenin cinsi, yaşı ve genetik özellikleri kurulacak olan modelin karakteristiğine göre önem taşımaktadır (20). Uyarılma protokolü ve

farelerin genetik altyapılarına göre bu modelde enflamasyon sonrası, demyelinizasyon süreci gözlemlenebilmektedir. MOG ile uyarılmış ve farklı genetik altyapılı fareler kullanılarak, birçok MS patofizyolojisi oluşturulabilmektedir. Lewis sıçanlarında MSS'ine myelin, MBP, MOG ya da PLP enjeksiyonu ile T hücre enflamasyonunun yanısıra antikor tepkisi oluşturarak güvenli bir model kurulabilir (21). Bu model genelde MS'de immun yanıtı tedavi çalışmalarında kullanılmaktadır (22). Birkaç myelin ajanının (MBP, MOG, S-100 ve GFAP) birlikte sıçanlara enjekte edilmesi ile birlikte MSS'de birçok lezyonun da birlikte gözlemlendiği, T hücre enflamasyonunun görüldüğü bir model oluşturulabilir. Bu modelde, enflamasyon hızlı gerçekleşir ve homojen bir ilerleme gösterir (23). Anti-MOG antikorlarının enjeksiyonu ile oluşturulan EAE modelinde ise, reaktif T hücresi sızmasının yanında demyelinizasyon da gözlemlenmektedir, fakat bu demyelinizasyon yalnızca geçici bir süre için varlığını sürdürebilir ve kısa süre içerisinde remyelinizasyon gerçekleşir (24). Kongenik Lewis sıçanlarında yapılan çalışmada ise, myelin ile indüklenmiş EAE modelinde, sıçanlara rekombinant MOG peptidinin (1 - 125 arası aminoasitler) enjekte edilmesi ile MS'in bir alt tipi olan yineleyen - düzelen (RRMS) bir hastalık oluşturulmuştur (25). Daha sonra bu hayvanlardan alınan dokularda yapılan histopatoloji çalışmaları ile de RRMS ve bu model arasında histopatolojik olarak benzerlik tamamıyla ortaya konulmuştur. Ayrıca, bu model, hastalığın kronik olarak ilerlemesi, ilk olarak optik sinirlerde hasara yol açması ve aksonal hasarında gözlemlenmesi, RRMS'i modellemek için uygun bir hayvan modeli oluşturulabildiğini göstermiştir (25).

Enflamatuvar hayvan modellerinde EAE'ye ek olarak kullanılan bir diğer model seçeneği de antikorlar kullanılarak yapılan modellerdir. Bu yöntemde anti-galactocerebroside antikorları uygun tamamlayıcılar (complement) ile birlikte kullanılarak, farelere enjekte edildiğinde, antikor aracılı demyelinizan bir model kurulabilir (26, 27).

Enflamatuvar modeller, toksik demyelinizan modellerinin tersine, demyelinizasyonun enflamatuvar bir sürecin sonucu olarak ortaya çıktığı modellerdir. Bu yönüyle MS patofizyolojisini taklit edebilmesine rağmen, bu modellerde remyelinizasyonu incelemek her zaman mümkün olmamaktadır. Çünkü enflamasyon tetikleyici ajanın enjekte edilmesinden sonra T hücrelerinin reaktif ya da hiperaktif hale gelip kan beyin duvarını geçmeleri ile devam eden süreç çoğu zaman geri dönüşümü olmayan bir demyelinizasyon oluşturmaktadır. Ayrıca, çoğu EAE modelinde MS patofizyolojisinde gözlemlenen, oligodendrosit kaybı, microglia aktivasyonu vb. mekanizmalar gözlemlenmemektedir.

### **Viral Demyelinizasyon Hayvan Modelleri**

Viral yollarla tetiklenen enfeksiyon temelli MS modelleri de MS çalışmak için kullanılan hayvan modelleri arasındadır. Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) normalde farelerde enfeksiyona neden olan bir RNA virüsüdür (28). Bu patojenin bazı fare ırklarının MSS'ne intraserebral enjekte edilmesi ile farede ilk olarak akut enflamasyon temelli oligodendrosit ölümünün de gözlemlendiği demyelinizan bir hastalık tablosu gözlemlenir. TMEV ilk olarak hipokampus, striatum, korteks ve omurilikte replike olmaya başlar (28). Bu süreçte T hücrelerinin TMEV virüsü ile olan savaşı sonrasında normal şartlarda virüsün temizlenmesi gerekir. Fakat transgenik olarak CD8<sup>+</sup> hücreleri bulunmayan farelerde bu süreç kronik demyelinizasyonla sonlanan bir MS modeli oluşturmaktadır (9).

Deneyisel viral demyelinizasyon için kullanılan bir diğer virüs ise Mouse Hepatitis Virus (MHV)'dir. Intrakraniyel ya da intranasal olarak verildiğinde MHV virüsü, TMEV virüsü gibi enflamasyona bağlı demyelinizan bir hastalık tablosu oluşturmaktadır (29). Bu model genellikle MHV virüsünü yok edici ajanlar ya da hücreler kullanıldıktan sonra remyelinizasyon sürecini gözlemek için kullanılır. Çünkü MHV virüsünün sebep olduğu akut demyelinizasyon, virüsün ortadan kaldırılması ile kısa sürede remyelinizasyon sürecine geçmektedir (29). Viral yolla tetiklenen modellerde kullanılan bir diğer virüs Semliki Forest Virus (SFV)'dir. SFV virüsü intraperitonel olarak verildiğinde, MS'de kan beyin duvarının patofizyolojisini incelemek için kullanılır (30) ve Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG) ile olan yapısal benzerliğinden dolayı da demyelinizasyona yol açtığı düşünülmektedir (31).

Viral yollarla oluşturulan demyelinizan MS modelleri, toksik ve enflamatuvar hayvan modelleri gibi hastalığın bir yönünü çalışmak için seçilebilecek modellerdir. Fakat bu modeller aralarında, çalışılması en zor olan yöntemlerdir. Virüslerle çalışmanın getirdiği tehlikenin yanı sıra, enjekte edilen virüs miktarının optimizasyonu, virüsün konak hücrede çoğalmasının kontrol edilmesinde yaşanan güçlükler ve bunlara bağlı olarak yaşanan hayvan kayıpları deneylerin yapılabilirliğini zorlaştırmaktadır.

### **Genetik Myelin-Mutantları Kullanılarak Oluşturulan Modeller**

Son yıllarda, myelin proteininin yapısında bulunan ya da olumuna katkıda bulunan proteinlerin transgenik farelerde mutant hale getirilmesi ile transgenik demyelinize fare modelleri oluşturulmuştur. Bu modellerde remyelinizasyon çalışmak için ise, transgenik farelere yapılan transplantasyon çalışmaları ile, myelin kılıf üreten sistemlerinde mutasyon olan transgenik farelerde, myelin kılıf oluşturma süreçleri gözlemlenmiştir (32, 33). Transgenik myelin-mutant fareler ile yapılan çalışmalar, aslında remyelinizasyon mekanizmalarını çalışmak için kullanılan yöntemlerdir ve buna rağmen diğer yöntemlere kıyasla daha az uygundur. Çünkü MS gibi tamamıyla genetik olmadığı bilinen bir hastalıkta, hastalığın temel patofizyolojisinden direkt sorumlu genlerin model hayvanın metabolizmasından çıkarılması, hastalığı taklit etmek yerine, hastalığın oluşum sürecini taklit etmeden, sadece semptomlarını taklit etmektedir. Bu ise hastalığın oluşumuna dair mekanizmaların gözden kaçmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle, transgenik myelin mutant hayvan modelleri, demyelinize farelerde hastalığın oluşumundan ziyade, iyileşme süreci olan, remyelinizasyonu çalışmak için daha uygun bir yöntem olabilirler.

### **Sonuç**

MS, farklı klinik alt tipleri ve patofizyolojisindeki çeşitlilikler dolayısıyla kompleks bir hastalıktır. Hastalığın modellenmesi, MS'de gözlemlenen tüm patofizyolojiler için mümkün değildir. Bu nedenle farklı hayvan modelleri, farklı özellikleri göstererek hastalığın anlaşılmasında bir yol oluşturmaktadır. Yukarıda dört sınıfta özetlenen yöntemler, hastalığa ait farklı özellikleri, hayvan modellerinde oluşturmaktadır. Her bir yöntemin kendine özgü avantajları ve dezavantajları olduğundan, önemli olan çalışılacak alanda doğru hayvan ve metot seçiliminin yapılmasıdır. Bu nedenle, kurulacak olan model, çalışmanın başlangıcındaki doğru sorulmuş soruları test etmeyi başarabilmelidir.

## Kaynaklar

1. Lucchinetti C, et al., Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of Neurology*, 2000; 47:707-717.
2. Siva A, The spectrum of multiple sclerosis and treatment decisions. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 2006; 108:333-338.
3. Lublin FD, Reingold SC and National Multiple Sclerosis Society Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis\*, Defining the clinical course of multiple sclerosis: Results of an international survey. *Neurology*, 1996; 46:907-911.
4. Woodruff RH and Franklin RJM. Demyelination and remyelination of the caudal cerebellar peduncle of adult rats following stereotaxic injections of lysolecithin, ethidium bromide, and complement/anti-galactocerebroside: A comparative study. *Glia*, 1999; 25:216-228.
5. Yajima K. and Suzuki K. Demyelination and Remyelination in Rat Cns Following Ethidium Bromide Injection: 146. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 1979; 38:349.
6. Kipp M et al, The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta Neuropathologica*, 2009; 118:723-736.
7. Matsushima GK and Morell P. The Neurotoxicant, Cuprizone, as a Model to Study Demyelination and Remyelination in the Central Nervous System. *Brain Pathology*, 2001; 11:107-116.
8. Harsan LA, et al. Recovery from Chronic Demyelination by Thyroid Hormone Therapy: Myelinogenesis Induction and Assessment by Diffusion Tensor Magnetic Resonance Imaging. *The Journal of Neuroscience*, 2008; 28:14189-14201.
9. Torkildsen Ø, et al. The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurologica Scandinavica*, 2008; 117:72-76.
10. Mason JL, et al. Mature oligodendrocyte apoptosis precedes IGF-1 production and oligodendrocyte progenitor accumulation and differentiation during demyelination/remyelination. *Journal of Neuroscience Research*, 2000; 61:251-262.
11. Hiremath MM et al. Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *Journal of Neuroimmunology*, 1998; 92:38-49.
12. Remington LT, et al. Microglial Recruitment, Activation, and Proliferation in Response to Primary Demyelination. *Am J Pathol*, 2007; 170:1713-1724.
13. Sun SW et al. Noninvasive detection of cuprizone induced axonal damage and demyelination in the mouse corpus callosum. *Magnetic Resonance in Medicine*, 2006; 55:302-308.
14. Song SK et al. Demyelination increases radial diffusivity in corpus callosum of mouse brain. *Neuro Image*, 2005; 26:132-140.
15. Aboitiz F et al. Fiber composition of the human corpus callosum. *Brain Research*, 1992; 598:143-153.
16. De Lacoste MC, Kirkpatrick JB and Ross ED. Topography of the Human Corpus Callosum. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 1985; 44:578-591.
17. Morell P et al. Gene Expression in Brain during Cuprizone-Induced Demyelination and Remyelination. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 1998; 12:220-227.

18. Ludwin SK and Sternberger NH. An immunohistochemical study of myelin proteins during remyelination in the central nervous system. *Acta Neuropathologica*, 1984; 63:240-248.
19. Gold R, Hartung HP and Toyka KV. Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system. *Molecular Medicine Today*, 2000; 6:88-91.
20. Hemmer B, Archelos JJ and Hartung HP. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci*, 2002; 3:291-301.
21. Wallström E et al. Major histocompatibility complex haplotype RT1av1 is associated with relapsing/remitting experimental autoimmune encephalomyelitis. *Transplantation Proceedings*, 1997; 29:1686-1689.
22. Pender M et al. The proximal peripheral nervous system is a major site of demyelination in experimental autoimmune encephalomyelitis induced in the Lewis rat by a myelin basic protein-specific T cell clone. *Acta Neuropathologica*, 1995; 89:527-531.
23. Kojima K et al. Experimental autoimmune panencephalitis and uveoretinitis transferred to the Lewis rat by T lymphocytes specific for the S100 beta molecule, a calcium binding protein of astroglia. *The Journal of Experimental Medicine*, 1994; 180:817-829.
24. Raine CS, McFarland HF and Hohlfeld R. *Multiple sclerosis: a comprehensive text*. 2008: Saunders/Elsevier.
25. Storch MK et al. Autoimmunity to Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein in Rats Mimics the Spectrum of Multiple Sclerosis Pathology. *Brain Pathology*, 1998; 8:681-694.
26. Keirstead HS and Blakemore WE. Identification of Post-mitotic Oligodendrocytes Incapable of Remyelination within the Demyelinated Adult Spinal Cord. *Journal of Neuro pathology & Experimental Neurology*, 1997; 56:1191-1201.
27. Blakemore WF and Keirstead HS. The origin of remyelinating cells in the central nervous system. *Journal of Neuroimmunology*, 1999; 98:69-76.
28. Rodriguez M, Leibowitz JL, Lampert PW. Persistent infection of oligodendrocytes in Theiler's virus-induced encephalomyelitis. *Annals of Neurology*, 1983; 13:426-433.
29. Marten NW, Stohlman SA, Bergmann CC. MHV Infection of the CNS: Mechanisms of Immune-Mediated Control. *Viral Immunology*, 2001; 14:1-18.
30. Soilu-Hanninen M et al. Semliki Forest virus infects mouse brain endothelial cells and causes blood-brain barrier damage. *J Virol*, 1994; 68:6291-6298.
31. Mokhtarian F et al. Molecular mimicry between a viral peptide and a myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces autoimmune demyelinating disease in mice. *Journal of Neuroimmunology*, 1999; 95:43-54.
32. Yandava BD, Billingham LL, Snyder EY. "Global" cell replacement is feasible via neural stem cell transplantation: Evidence from the dysmyelinated shiverer mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999; 96:7029-7034.
33. Mitome M et al. Towards the reconstruction of central nervous system white matter using neural precursor cells. *Brain*, 2001; 124:2147-2161.

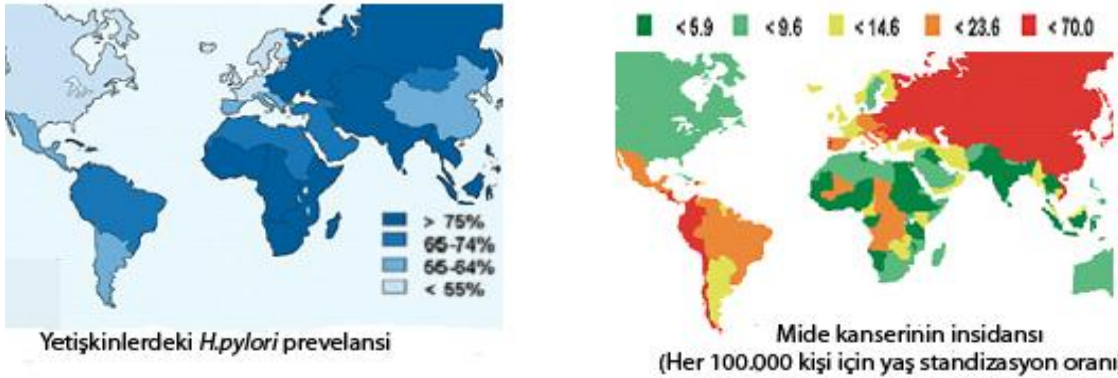


## Gastrik İmmünopatoloji Modeli ve İmmünregülasyon

Ayça SAYI YAZGAN

*İstanbul Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul, Türkiye*

Mide kanseri, dünyada ölüme yol açan kanserler sıralamasında ikinci sıradadır (1, 2). Epidemiyolojik ve deneysel çalışmalarda, mide kanserine yol açan *Helicobacter pylori* (*H.pylori*), beslenme ve hijyenin yanında önemli bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır. Bu nedenle 1994'te *H.pylori*, Dünya Sağlık örgütü tarafından Sınıf 1 karsinojen olarak deklare edilmiştir. *H.pylori*, küçük (0.5-3µm), gram negatif, spiral, kıvrımlı, hareketli bir bakteridir. Mikro-aerofilik ortamda 37 derecede ürer. *H.pylori*, ilk defa kronik gastritli bir hastanın gastrik mukozasından izole edilmiştir (3). Türkiye'de popülasyonun % 80'i *H.pylori* ile enfektedir. *H.pylori* ile enfekte tüm bireylerde asemptomatik kronik gastrit gelişirken, yaklaşık % 15-20 'sinde midenin daha ciddi hastalıkları; peptik ülser, mukozaya eşlik eden lenfoid doku lenfoması ve karsinoma gelişmektedir (4). Dünyadaki toplumlar mide kanseri riskleri ve *H.pylori* prevalansına göre farklılık gösterirler (Şekil 1).



**Şekil 1.** Dünya çapındaki yetişkinlerdeki *H.pylori* prevalansı ve mide kanserinin insidansı

Mide kanseri, histolojik olarak diffüz (infiltrate olan, az farklılaşmış, kohesif olmayan kanser hücreleri geniş fibröz stroma içinde) ve intestinal (kohesif, bezel gibi hücre grupları) alt tiplerine ayrılır (5). *H.pylori* ve bu iki tip patoloji arasında epidemiyolojik korelasyon gösterilmiştir. Örneğin intestinal tipin oluşumu sırasında gelişen pre-kanserojen lezyonlar (kronik gastrit, atrofik gastrit, intestinal metaplazi ve dizplazi) ile *H.pylori* epidemiyolojik olarak bağlantılıdır (6, 7).

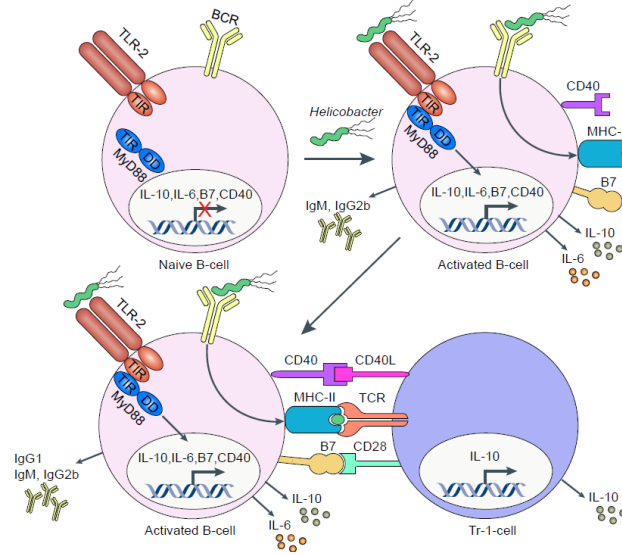
*H.pylori* enfeksiyonunun yol açtığı patogenezin bazı yönleri (bakterinin virülans faktörleri gibi) fare modelleri kullanılarak çalışılmıştır (8, 9). İnsandan izole edilen *H.pylori* izolatlarının birçoğu fareleri etkin olarak enfekte edemediği için, bu izolatlar farede yapılan birkaç pasaj sonrasında yeni konakçısına adapte hale getirilir (6). Yalnız bu adaptasyon sırasında bakteri immünojenitesini kaybeder (10). Bu nedenle, immünolojik çalışmalarda, farelerin, *H. pylori* ile aynı aileden ve farede immünolojik cevap gösteren *H.felis* ile enfekte edilmesi tercih edilmektedir. Uzun süreli *H.felis* ile enfekte olan farelerde insandakine benzer şekilde T-yardımcı 1 tipi (Th-1) immün cevap gözlemlenmektedir (11-15). Enfekte olan farelerde kronik aktif gastritten metaplaziye kadar ilerliyeabilen patolojiye rastlanmaktadır. Bunun yanısıra eğer

enfeksiyon uzun süreli olur ve fare aynı zamanda yüksek tuz diyetinde tutulursa farenin *in situ* karsinom geliştirmesi mümkündür (16, 17). Deney fare modeli çalışmalarım, C57BL/6 fare modellerinde mide pre-neoplastik değişimlerin mekanizmasını araştırmak için *H.felis*'i kullandım. *H.felis* enfeksiyon modelinde gözlemlenen en belirgin pre-neoplastik değişim, özelleşmiş hücre kaybıyla karakterize gastrik atrofi ve hemen sonrasında gelişen epitelyal hiperplazi ve intestinal metaplazi idi (18). Çalışmalarım, bu farelerin midesinde, Th-1 hücrelerinden üretilen proenflamatuvar IFN- $\gamma$  sitokininin yüksek seviyede bulunması mukozadaki *Helicobacter* kolonizasyonundaki düşüş ile doğru orantılı olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda, midedeki IFN- $\gamma$  seviyesinin yüksek olması mide patolojilerinin oluşmasındaki temel etkidir (18).

Toplumdaki enfekte bireylerin % 20'sinde görülen ve kansere kadar ilerleyebilen patolojiye rağmen, bireylerin geri kalanında kronik gastrite rağmen herhangi bir semptom görülmemesi, midede veya periferel lenf düğümlerinde enflamatuvar immün cevabı baskılayan regülatör mekanizmaların varlığına işaret eder. Bu lokal immün baskılanma *Helicobacter*'in konağın yaşam süresi boyunca temizlenememesinin nedenine açıklık getirebilir. Anti-enflamatuvar immün cevaptaki önemli hücrelerden biri doğal CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regülatör T hücreleridir (Treg) (19). Treg'lerin görevi, enfeksiyon sırasında aşırı kolateral doku hasarının oluşmasını engellemektir. Treg'lerin, *Helicobacter* enfeksiyonu sırasında dokuya infiltre olup, konak ve *Helicobacter* arasında bir denge sağlayarak bakterinin uzun süreli devamlılığını sağladığı ve dokuya karşı yıkıcı enflamasyonun oluşumunu önlediği gösterilmiştir (20).

Yakın zaman önce, fare otoimmün hastalıkları (multipl skleroz, romatoid artrit) ve kronik bağırsak enflamasyon modellerinde, immün regülatör olarak özelleşmiş Treg'lere alternatif B hücre popülasyonlarının (Breg) varlığı önerilmiştir (21-23). Ancak, Treg'lerin aksine, Breg'ler hakkındaki mevcut bilgiler oldukça sınırlıdır (24-26). Farklı fare hastalık modellerinde yapılan çalışmalarda farklı B hücre alt gruplarının regülatör fonksiyon gösterebildikleri bulunmuştur. Bunların arasında, bakteriyel lipopolisakkarit (LPS)'e cevap olarak aktive olan CD1d<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> B hücreleri (B10), CD40 stimülasyonu ile aktive olan CD21<sup>yüksek</sup> CD23<sup>+</sup> değişici (transitional) B hücreleri ve CD21<sup>+</sup> marjinal B hücreleri sayılabilir (27, 28). Farklı modellerde gösterilen bu farklı B hücre alt gruplarının ortak özelliği anti-enflamatuvar bir sitokin olan interleukin-10 (IL-10) üretmeleridir (29). Yakın zaman önce yayınlanan çalışmamızda, ilk defa bir bakteriyel enfeksiyon fare modelinde, *Helicobacter* - spesifik regülatör B hücre grubununun (*H*<sub>sps</sub>-Breg) varlığını gösterdik (30). *H*<sub>sps</sub>-Breg'lerin aktivasyonu, *Helicobacter* kaynaklı Toll-benzeri reseptör-2 (TLR-2) ligandının TLR-2 reseptörüne bağlanması ve bunun hücre içi adaptör proteini olan myeloid farklılaşma protein 88'i (MyD88) aktive etmesi sayesinde gerçekleşmektedir. TLR-2 -MyD88 yoluyla uyarılan *H*<sub>sps</sub>-Breg hücrelerinin yüzeylerinde MHC-II, CD-40 ve B7 ekspresyonları artarken, aynı zamanda IL-10 ve IL-6 salgılanmaktadır (şekil 2-soldaki aktive olan B hücresi). *H*<sub>sps</sub>-Breg'ler fonksiyonlarını, naif T hücrelerinden T regülatör-1 (Tr-1) hücrelerini uyararak sağlamaktadır. Aktive olan B hücreleri naif T hücreleriyle karşılaşınca CD40-CD40L, B7-CD28 ve MHC-II-TCR aracılıklı hücre-hücre etkileşimleri sonucu naif T hücrelerini IL-10 üreten T regülatör-1 (Tr-1) hücrelerine çevirir. Tr-1 regülatör hücre alt grubu immün baskılayıcı rolünü ürettiği IL-10 aracılığıyla gerçekleştirmektedir (31). Daha önceden yapılan çalışmalarımız, *in vivo*'da IL-10<sup>-/-</sup> (IL-10 içermeyen) farenin *H.felis* ile enfeksiyonunun farede yüksek düzeyde patoloji

oluşmasına ve buna paralel bakterinin mukozadan temizlenmesine yol açtığını göstermiştir. IL-10<sup>-/-</sup> farelere Breg ve Tr-1 hücrelerinin adoptif transfer metoduyla verilmesinin immün yanıtı baskılayarak patoloji oluşumunu önlediğini çalışmalarımız göstermiştir (30). *H*<sub>sps</sub>-Breg'lerin detaylı karakterizasyonu, *Helicobacter* bağlantılı mide hastalıklarının gelişimlerinde immünoregülasyonun rolünün anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.



**Şekil 2.** *H*<sub>sps</sub>-Breg'in *Helicobacter* TLR-2 ligandı ile aktivasyonunun yol açtığı CD40, MHC-II ve B7 ekspresyonu ve IL-10 ve IL-6 üretimleri ile *H*<sub>sps</sub>-Breg'in naif T hücrelerini Tr-1 hücrelere çevirme mekanizmasının hücre-hücre etkileşimini gerektirdiği özetlenmiştir (30).

## Kaynaklar

1. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin, 1999; 49(1):33-64.
2. Pritchard DM, Crabtree JE. Helicobacter pylori and gastric cancer. Curr Opin Gastroenterol, 2006; 22(6):620-625.
3. Steer, Howard W. The discovery of Helicobacter pylori in England in the 1970s. In Barry J. Marshall. Helicobacter pioneers: firsthand accounts from the scientists who discovered Helicobacters, 1892-1982. Oxford: Blackwell. pp. 119-29, (2002).
4. Malfertheiner P et al. Helicobacter pylori eradication has the potential to prevent gastric cancer: a state-of-the-art critique. Am J Gastroenterol, 2005; 100(9):2100-2115.
5. Lauren P. The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. Acta Pathol Microbiol Scand, 1965; 64:31-49.
6. Correa P. Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis. Am J Surg Pathol, 1995; 19(1):37-43.
7. Portal-Celhay C et al. Immune responses to Helicobacter pylori colonization: mechanisms and clinical outcomes. Clinical Science, 2006; 110:305-314.
8. Baldwin DN et al. Identification of Helicobacter pylori genes that contribute to stomach colonization. Infect Immun, 2007; 75(2):1005-1016.

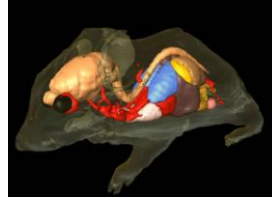
9. Lee A et al. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology*, 1997; 112(4):1386-1397.
10. Philpott DJ et al. Reduced activation of inflammatory responses in host cells by mouse-adapted *Helicobacter pylori* isolates. *Cell Microbiol*, 2002; 4(5):285-296.
11. Fox JG et al. Germ-line p53-targeted disruption inhibits *Helicobacter*-induced premalignant lesions and invasive gastric carcinoma through down-regulation of Th1 pro-inflammatory responses. *Cancer Res*, 2002; 62(3):696-702.
12. Franco AT et al. Regulation of gastric carcinogenesis by *Helicobacter pylori* virulence factors. *Cancer Res*, 2008; 68(2):379-387.
13. Hornsby MJ et al. *Helicobacter pylori* induces an antimicrobial response in rhesus macaques in a cag pathogenicity island-dependent manner. *Gastroenterology*, 2008; 134(4):1049-1057.
14. Rieder G, Merchant JL, Haas R. *Helicobacter pylori* cag-type IV secretion system facilitates corpus colonization to induce precancerous conditions in Mongolian gerbils. *Gastroenterology*, 2005; 128(5):1229-1242.
15. Sakagami T et al. Atrophic gastric changes in both *Helicobacter felis* and *Helicobacter pylori* infected mice are host dependent and separate from antral gastritis. *Gut*, 1996; 39(5):639-648.
16. Fox JG et al. *Helicobacter pylori*-associated gastric cancer in INS-GAS mice is gender specific. *Cancer Res*, 2003; 63(5):942-950.
17. Chiba T, Marusawa H, Seno H, Watanabe N. Mechanism for gastric cancer development by *Helicobacter pylori* infection, *J Gastroenterol Hepatol*, 2008; 23(8):1175-1181.
18. Sayi A, Kohler E, Hitzler I, Arnold I, Schwendener R, Rehrauer H, Müller A, The CD4+ T Cell-Mediated IFN- $\gamma$  Response to *Helicobacter* Infection Is Essential for Clearance and Determines Gastric Cancer Risk. *J Immunol*, 2009; 182(11):7085-7101.
19. Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol*, 2007; 7(11):875-888.
20. Kao JY et al. *Helicobacter pylori* immune escape is mediated by dendritic cell-induced Treg skewing and Th17 suppression in mice. *Gastroenterology*, 2010; 138(3):1046-1054.
21. Wolf SD et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J Exp Med*, 1996; 184(6):2271-2278.
22. Mizoguchi A et al. Suppressive role of B cells in chronic colitis of T cell receptor alpha mutant mice. *J Exp Med*, 1997; 186(10):1749-1756.
23. Mizoguchi E, Mizoguchi A, Preffer FI, Bhan AK. Regulatory role of mature B cells in a murine model of inflammatory bowel disease. *Int.Immunol*, 2000; 12(5):597-605.
24. Fillatreau S, Gray D, Anderton SM. Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. *Nat Rev Immunol*, 2008; 8:391-397.
25. Mauri C, Ehrenstein MR. The "short" history of regulatory B cells. *Trends Immunol*, 2008; 29:34-40.
26. Mizoguchi A, Bhan AK. A case for regulatory B cells. *J Immunol*, 2006; 176:705-710.
27. Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses, *Immunity*, 2008; 28:639-650.

28. Evans JG, Chavez-Rueda KA, Eddaoudi A, Meyer-Bahlburg A, Rawlings DJ, Ehrenstein MR, Mauri C. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J Immunol*, 2007; 178:7868-7878.
29. Gray D, Gray M. What are regulatory B cells?. *Eur J Immunol*, 2010; 40:2677-2679.
30. Sayi A, Kohler E, Toller IS, Flavell RA, Müller W, Roers A, Müller A. TLR-2-activated B cells suppress Helicobacter-induced preneoplastic gastric immunopathology by inducing T regulatory-1 cells, *J Immunol*, 2011; 186 (2):878-890.

## Diyabet ve Aterosklerozda Deneysel Modeller

Ümit ZEYBEK

*İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE), Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye*



### Ateroskleroz Çalışmaları İçin Modeller

Özellikle memeli organizmalarında gerçekleşen mekanizmalarda ortaya çıkan defektler, defektlerin sebep olduğu yolak bozuklukları, bozuklukların tamir edilebilme durumları, onarılamayan hasarlar sonucu gelişen hastalıkların tespiti önemlidir. Çünkü hastalıkların meydana gelmesinde birden fazla faktör rol almaktadır.

Bu faktörlerin hepsinin aydınlatılması ile tanı ve tedaviye yönelik yararlı bilgiler elde edilebilmektedir. Hücre yapısı ve fonksiyonu, membran transportu ve kimyasal sinyaller ile proteinler, enzimler, nükleik asitler gibi moleküllerin kimyasal ve fiziksel yapılarını ve aktivite ile fonksiyon düzenlenimlerini aydınlatma konusunda çalışılabilmektedir.

İnsan sağlığı ile ilgili iki genel deneysel uygulama tercih edilir:

- İnsan hastalık modellerine yaklaşan modeller oluşturarak insan veya primat hücreleri, dokuları ve organlarını incelemek.
- İnsan sağlık problemleri ile ilgili olan ancak primatlar veya insanların üzerinde çalışılması uygun olmayan çeşitli model sistemleri kullanmak.

Özellikle 1990'lardan itibaren The Committee on New and Emerging Models in Biomedical and Behavioral Research ve National Center for Research Resources (NCRR) kurumlarının ön planda yer aldığı araştırmalarda bu tür modellemeler önemli derecede kullanılmıştır. Biyomedikal modeller insan hastalık modellerinin hayvan modellerinden hayvana uygulanması, *in vitro* veya insan hastalık ve biyolojisi ile ilgili çalışmaları kapsayan bir gruptur

### Deney Hayvanı Modelleri

Normal biyoloji ve davranışların yanı sıra spontan ya da indüklenmiş bir patolojik durumun araştırılmasına olanak sağlayan modellerdir. Bir model en az bir biyolojik işlev yönünden insan ya da diğer hayvan türlerine benzerlik göstermelidir. Kaçınılmaz olarak, mevcut türler, tüm ihtiyaçlara cevap veremediği durumlarda özel araştırmalar için yeni deneysel model tasarımları yapılmaktadır.

*Deneysel modeller;*

Farmakoloji ve Toksikoloji modelleri

Fötal büyüme ve gelişim modelleri

Nefrolojik bozukluk modelleri  
Ksenotransplantasyon modelleri  
Sinirbilimde modeller  
Psikolojik bozukluk modelleri  
Mikolojide modeller  
İskelet hastalıkları modelleri  
Kanser araştırmalarında modeller  
Ağız hastalıklarında modeller  
Diyabetik Modeller  
Kardiyovasküler Hastalık Modelleri şeklinde genel olarak sınıflandırılabilir.

### **Doğru Model Seçimi**

Ateroskleroz araştırmaları için ideal hayvan modeli seçim kriterleri arasında; insana benzeyen kardiyovasküler anatomiye sahip olması, hemodinamik yapısı, fizyolojisi, insan hastalıklarına karakteristik benzerlikler taşıması, komplikasyonlara kısa bir zaman içinde müdahale edebilme olanağına sahip olması sayılabilir. Anjiyoplasti (damar genişletilmesi) sonrası restenoz (tekrar daralma) oluşumu modelleri, domuz ve primat gibi büyük hayvanlar ile sıçan ve tavşan gibi küçük hayvanlarda çalışma açısından önemli farklılıklar göstermektedir. Domuzda, anjiyotensin converting enzim (ACE) inhibitörü olan cilazapril ile ön tedavi uygulanması, şiddetli veya ılımlı balon hasarı sonrası karotid neointimal myoproliferasyonunun azalmasında başarısız olmuştur.

Benzer olarak, primat modelinde, cilazapril ile ACE inhibisyonu yapılmış ve endarterektomi (karotis iç katmanının aterosklerotik plağı içerecek şekilde çıkarılması), balonun yol açtığı erozyon veya vasküler sentetik greftleme işlemleri sonrası görülen hasarlı arterlerde ki intimal kalınlaşmayı azaltmamıştır. Buna karşılık, sıçanlarda, ACE inhibisyonu, karotid arterinin balon hasarı sonrası görülen neointima oluşumunu azaltmıştır.

Diğeri bazı çalışmalarda ise sıçanlarda cilazapril ön uygulamasını takiben yapılan balon hasarlarının yol açtığı düz kas hücre proliferasyonunda azalmalar saptanmıştır.

Kan basıncı düzenlenmesi, lipoprotein metabolizması veya hasarlara karşı hücresel cevap gibi araştırmalarda uğranabilecek hayvan kayıpları telafi edilebilmelidir. Ek olarak, hipertansiyon, ateroskleroz ve diğeri kardiyovasküler hastalıkları çalışabilecek iyi hayvan modellerini oluşturmada sıçan, tavşan ve domuz türleri ile sınırlı kalınmaktadır. Kolestrolle beslenmiş tavşanlar genelde insan şartlarını yanıtacak bir modeldir, ancak insanlardan aşırı derecede yüksek kolesterol düzeyi ve daha yağlı makrofajdan zengin lezyonlar geliştirirler. Büyük hayvanlar tedavilerin yeterliliğı ve gelişiminin gözlenmesi için objektif ve invazif olmayan bir şekilde kardiyovasküler hastalıkların moleküler görüntüleme çalışmalarında rahatlıkla kullanılabilirler. Görüntüleme erken teşhis ve tanısını mümkün kılar. Aterosklerozda görüntüleme çalışmaları, özellikle aterosklerotik plakların gözlenmesi için, ultrason, bilgisayarlı tomografi veya manyetik rezonans gibi çeşitli görüntüleme yöntemlerini kullanarak plak bileşiminin belirlenmesine odaklanmıştır. Moleküler görüntüleme ise lipid (okside LDL), proteaz aktivitesi, aktive olmuş endotelyum veya makrofaj gibi hücresel ve moleküler hedeflerin düzey ölçümünü yaparak yüksek riskli hassas plakları saptar.

Görüntüleme sistemlerinin birçoğu tavşan veya domuz gibi büyük hayvanlarda kullanılmasına rağmen farede de aterosklerotik lezyonu görüntülemek mümkündür. Transplant ateroskleroz çalışmaları, vasküler transplantasyonun gerçekleştirilmesi teknik olarak daha kolay olduğu için genelde sıçan, tavşan, domuz, köpek gibi büyük hayvanlarda yapılmaktadır. Farklı soylar arasında transplantasyon (allograft) yapılarak organ transplantasyonu yanında ateroskleroza benzerlik gösteren oluşumlar da elde edilir. Ayrıca iskemik/reperfüzyon yaralanmasının sinerjetik etkilerini kullanarak üretilen sıçan modelinde immün reaksiyon transplant aterosklerozunun şiddetini arttırmaktadır.

Yeşil floresan protein veya LacZ eksprese eden fareler kullanılarak kemik iliği hücrelerinin vasküler yaralanma alanlarının (lezyonların) oluşumunda rol alan vasküler progenitor hücreleri meydana getirdiği gösterilmiştir. Bu vasküler progenitor hücreler endotelial hücrelere veya düz kas hücrelerine farklılaşabilir, böylece vasküler onarım veya lezyon oluşumuna yardımcı olurlar.

Bu bulgular ışığında vasküler hastalıkları hedefleyip işleme başlama, durum bilgileri edinme, proliferasyon ve dolaşımdaki vasküler progenitor hücrelerin farklılaşması için yeni terapötik stratejilerin gelişimi için bir temel sağlayabilir. Çeşitli saf soyların (genetik olarak homojen) uygunluğu, genetik manipülasyonun kolaylığı, yüksek derecede genetik bilgiye sahip olma ve özellikle ateroskleroz için farklı fare soylarının bulunmasından dolayı, fareler genetik yaklaşımda tercih edilen deney hayvanlarıdır.

Kantitatif lokus özellikli analizlerde kromozomal harita lokusunu belirten küçük aralıkları da içeren fare genomunu kapsayan 100-200 soya özgü polimorfik belirteç kullanılır.

### **Aterosklerotik Lezyon Türleri**

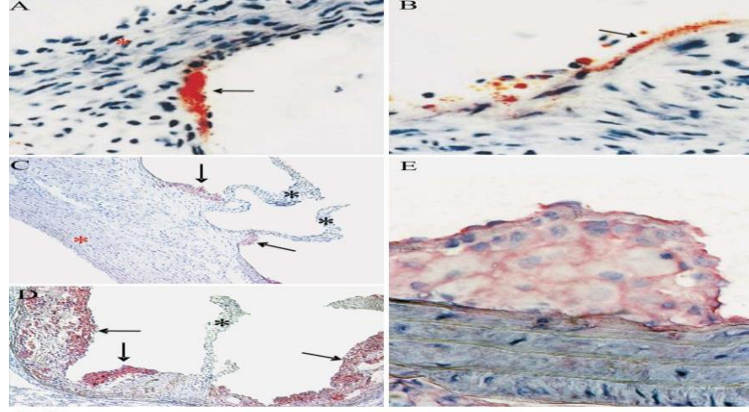
İnsanlardaki lezyon gelişimine benzer şekilde farelerin, büyük veya orta büyüklükteki elastik veya kas arterlerinin intimasında hücre dışı lipid birikimleri, matriks depolanmaları, lipid yüklü makrofajlar, enflamatuvar ve düz kas hücre oluşumları gözlenmiştir.

Lezyonlar, genellikle akım turbulanslarında veya damarların dallanma ya da bükülme noktaları gibi yerlerinde meydana gelebilir ve aort kökü, pulmoner, karotis, subklavyen, koroner ve brakiosefalik arter, aortik arkusun küçük kurvaturu, böbrek, interkostal ve iliak arterler gibi arteriyal ağaç boyunca yaygın olabilirler. Amerikan Kalp Birliği tarafından insan lezyonlarına göre yapılan sınıflandırmaları kullanarak fare lezyonları; yağ çizgileri (damarları), orta ve ileri lezyonlar olarak kategorize edilir. Kısaca yağ çizgileri lezyonları subendotelial alanın içinde bulunan lipid dolu makrofajlar ya da köpük hücrelerinin varlığı ile karakterize olabilir. Orta şiddetli özellik gösteren durumlar, kollajen lifleri gibi düz kas hücrelerinin ve hücre dışı matriks birikimleri ile ayırt edilmektedir. Gelişmiş lezyon, geniş fibrozis, damar duvarının incilmesi ve kolesterol kristalleri ile nekrotik ve kalsifiye doku varlığı gibi özelliklere sahiptir.

Farelerde aterosklerozu geliştirmek için kullanılan batı tipi ve aterojenik diyet olarak iki tip diyet bulunmaktadır. İkisi de düzenli olarak kullanılan diyetlere kıyasla daha fazla yağ ve kolesterol içerir. Batı tipi diyet sadece % 0.15 (w/w) kolesterol ve %



21 (w/w) yağ, aterojenik diyet ise % 1 (w/w) kolesterol içerir. Aterojenik diyete, diyet bileşeninde bulunmayan kolik asid eklenerek enflamasyon gelişimi tetiklenir ve böylece aterojeniklik yükselir. Örneğin C57BL/6 soyunun, C3H soyuna göre ateroskleroza yüksek elverişliliği, hiperlipidemiye endotelial hücrelerin cevabının farklı olmasıyla bağlantılı olabilir. Shi ve ark., C57BL/6 farelerin aortundan izole edilmiş endotelial hücreleri inceleyerek minimal şekilde değişmiş düşük yoğunluklu lipoproteine (LDL) cevapta enflamatuvar proteinlerin indüklemesinin önemli rol oynadığını göstermiştir. Ancak C3H farelerde çok az ya da hiç indüklenme gözlenmemektedir.

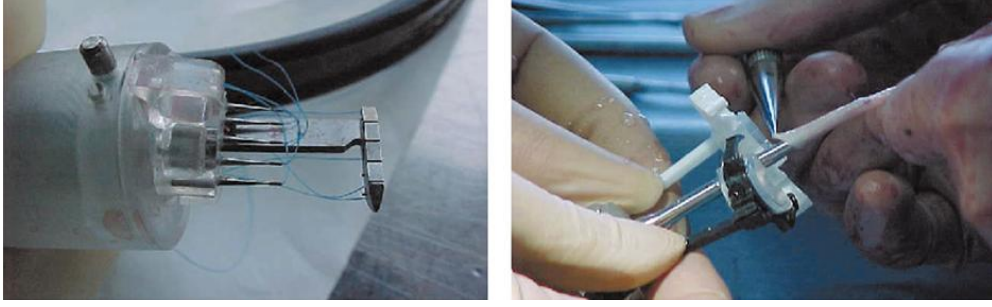


**Resim**  
Subendotelial bölgede erken lezyona sahip C57/BL soyu farelerde 24 haftalık aortik yapıyı çarpaz kesit görüntüsü (A, B: siyah ok). Aortik kökün kriyo-kesiti alınmış ve kırmızı O yapı ile lipidler boyanmıştır. 12 hafta sonra apoE-deficient farede lezyon gelişimi(C) ve 24 hafta sonra(D). Uygulamadan 8 hafta sonra aterojenik diyet, apoE-deficient farede intimaya monosit/makrofaq adezyonu ile beraber yağ lezyonlarının gelişimini indükler(E).

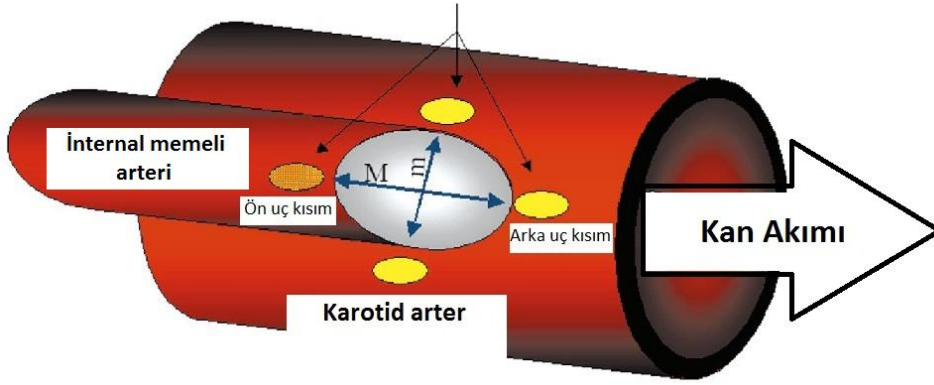
Ateroskleroza Yeni Zelanda (NZW) tavşanı en çok kullanılan model olmuştur. Tavşanlar lezyon karakterizasyonunda, ilaç müdahalelerinde, mekanik damar yaralanmalarında ve damar metabolizması çalışmalarında kullanılmıştır. Hastalığın şiddeti ve uyarılma zamanına bağlı olarak, 4 - 16 hafta arası % 0.5 - 2 kolesterol diyeti ile beslenmektedirler. Bu diyet tavşanlar tarafından iyi tolere edilebilmekte ve lezyon boyutunda belirgin değişiklikler ile beraber lezyonlar sürekli olarak ortaya çıkmaktadır. Bu ailede en çok tanınan tavşan soyu olan Watanabe Heritable HyperLipidemic (WHHL) (watanabe kalıtsal hiperlipidemi) tavşanı, yüksek kolesterole sahip tek tavşandan inbred üretim ile Watanabe tarafından geliştirilmiştir. WHHL tavşanlarının membran LDL reseptörlerinde eksik LDL katabolizması ile sonuçlanan bir bozukluk bulunmaktadır. Golden Suriye hamsteri insanlara benzer şekilde, normalde yüksek HDL-C düzeylerine sahiptir, buna karşılık diyet kolesterolü (~ 0.1 %) anlamlı derecede LDL-C seviyesini artırır ve doymuş yağlar da bu seviyeleri yükseltmektedir. Doymuş yağ ve kolesterol kombinasyonu, ateroskleroza tetiklerken, 6 haftalık uygulama sonrası insana benzer aterosklerotik lezyonlar gözlenir.

### **Makaslama Kuvveti (Shear stres) Modeli**

**Cerrahi:** boyun diseksiyonu vasıtasıyla sol common carotis arterine, damarda % 90 oranında tıkanıklık yaratacak bir perivasküler silikon kılıf yerleştirilir.



**Cerrahi işlem sonrası:** Tavşanlar 12 hafta boyunca % 1'lik hiperkolesterolemik yem ile beslenirler. Arterlerin bifurkasyon bölgeleri ve aort kavsi gibi kan akım paternlerinin değiştiği bölgelerde izlenmesi, bu bölgelerde oluşan kan akımının özelliklerinin incelenmesine yol açmıştır. Bu bölgelerde kan akımı nedeni ile oluşan **shear stress** (makaslama kuvveti)'in turbulan ya da az olmasının, ateroskleroz gelişimi ile yakından ilişkili olduğu gözlenmektedir.



İnsana benzer kardiyovasküler anatomiye sahip, spontan lezyon ve omnivor diyet tüketimi sonrası oluşan domuz modelleri ateroskleroz araştırmalarında önemli avantajlar sağlamaktadır. Aort, koroner ve serebral damarlarda belirgin şekilde bulunan lezyonların dağılımı insan lezyonlarına benzerlik gösterir. Örneğin Yucatan minyatür domuz diyetle uyarılmış ateroskleroza duyarlı ve insana benzer lezyonların gelişimine olanak sağlayan bir soydur. Bu domuzların LDL katabolizmasında oransal azalma bulunmaktadır ve kendiliğinden gelişmiş ateroskleroz sonucu plaklar arası kanama oluşmaktadır.



## Diyabet Çalışmaları İçin Modeller

### Tip1 Diabetes Mellitus modelleri

#### Kimyasal İndükleme Modelleri

*Alloksan (2, 4, 5, 6 Tetraokzoheksahidropirimidin);*

Ürik asit türevi toksik bir glukoz analogudur. Glukozla uyarılan insülin salınımını inhibe eder (Yüksek dozda  $\beta$  hücre nekrozu). Ayrıca mitokondriyal transport sistemini inhibe ederek hücre içi pH'ın yükselmesine ve hücre ölümüne de neden olur. Serbest radikal hasarı oluşturan etkisi de bulunmaktadır. Alloksanın diyabetojenik dozu 40 - 120 mg/kg'dır. *In vivo* açıdan dezavantajları, fizyolojik pH'da stabil olmaması, diyetteki şekerlerin koruyucu olabilmesi türe ve yaşa göre geniş varyasyona sahip olması ve yüksek dozda nefrotoksik etkili olması sayılabilir.

*Streptozotocin (STZ) (2-deoxy-2-([methyl(nitroso)amino]carbonyl)amino)- $\beta$ -D-glucopyranose);*

Farelerde çoklu düşük doz uygulama ile Tip 1 Diyabet oluşmaktadır. "Streptomyces achromogenes'in" metaboliti olan STZ'nin antibiyotik, antitümoral ve karsinojenik etkileri vardır. STZ pankreasın  $\beta$  hücrelerine doğrudan toksik etkilidir. Yapısındaki glukoz molekülü nedeniyle plazma membranındaki glukoreseptörlere (GLUT2) bağlanır. STZ glukozla uyarılan insülin salımını bloke eder. Sıçanlarda 50-100 mg/ kg dozlarında i.p ya da i.v yollarla uygulanabilir. Sıçanlarda yalnız tek - yüksek doz uygulanırken farelerde ek olarak çoklu düşük "subdiyabetojenik" dozlarda da uygulanabilmektedir (40 mg/kg x 5 gün veya 35 mg x 6 gün). Bu modellerde adacık hücrelerinde hücresel immün yanıtın artışı ile ağır bir mononükleer hücre infiltrasyonu-insülitis oluşturulmaktadır. STZ'in temel etki yerlerinden biri de çekirdek DNA'sıdır. STZ'in hücre içinde dekompozisyonu ile oluşan reaktif karbonyum iyonları DNA bazlarında alkilasyona neden olur. DNA tamiri izler ve bu sırada görev alan poli (ADP) riboz sentetaz hücre içindeki NAD<sup>+</sup>'ı kullandığından NAD<sup>+</sup> depoları boşalır. Oksidan özelliktedir,  $\beta$  hücrelerinde glutatyon, eritrositlerde ise SOD düzeylerini düşürür. Nefrotoksik ve hepatotoksik etkileri de mevcuttur.

*Alloksan-Streptozotocin;*

Alloksan ile daha yüksek kan şekeri düzeyleri elde edilir. Kan glukozunun STZ'e yanıtı trifazik iken Alloksan'a yanıt tetrafaziktir. Alloksan ile ketoz tablosu daha sık oluşur. STZ diyabetinde nöropati daha şiddetli seyreder. STZ ile  $\beta$  hücre rejenerasyonu ve adenom riski daha fazladır (% 5-99). "Onkogenik etki" STZ'in  $\beta$  hücre toksisitesi daha spesifiktir. Alloksan serbest radikal oluşumu ile etki gösterirken STZ DNA alkilasyonuna neden olmaktadır.

#### Spontan modeller

*BB Sıçan;*

60-120 gün arasında Tip 1 Diabetes Mellitus gelişir. Diyabetik insidans cinsiyete göre farklılık göstermez (% 80-90). Hiperglisemi, hipoinsülinemi, glikozüri, dehidratasyon, poliüri, polidipsi ve polifaji gelişir. Günlük insülin tedavisine gereksinimi, ketoasidoz riskinin yüksek olması (% 60-80) dezavantaj oluşturmaktadır. BB sıçanlarda diyabet yaklaşık 3 aylıkken başlar. BB sıçanların diğer özellikleri ise

genetik predispozisyonun varlığı ile diyabet sıklığı açısından cinsiyet farkı olmamasıdır.

*NOD fare;*

80-200 günde Tip 1 Diabetes Mellitus gelişir. Diyabet insidansı cinsiyete göre farklılık gösterir (♀ % 80-90 ve ♂ % 60). Hipoinsülinemi, glikozüri, hiperkolesterolemi, ketonüri, polidipsi, poliüri, ve polifaji gelişir. Orta derecede ketoasidoz ve insülitis gözlenir. Bir buğday proteini olan gluten BB sıçan ve NOD fare için güçlü bir diyabetojendir.

## **Tip 2 Diabetes Mellitus Modelleri**

### **Kimyasal indükleme modelleri**

*Alloksan ve Streptozotocin;*

Farelerde çoklu düşük doz STZ “subdiyabetojenik doz” uygulaması ile orta dereceli insülin yetersizliği oluşturulabilir. Düşük dozlarda verildiğinde  $\beta$  hücre kitlesinin kısmen azalmasına ve toksisitesine sebep olur. Ketoza eğilimli olmayan orta derecede bir insülin eksikliği gözlenir. Pankreas insülini normalin % 10'nun altına düştüğünde Tip 2 Diabetes Mellitus gelişir. Yaklaşık 100 mg/kg neonatal STZ uygulaması da son yıllarda sıklıkla tercih edilen bir modeldir. Diğer yandan STZ + Nikotinamid uygulaması ile orta derecede hiperglisemi ortaya çıkar.

### **Spontan Modeller**

*Db/Db Diyabetik Fare;*

Db/Db farelerin 4. kromozomunda bulunan hipotalamik leptin reseptörü geninde mutasyon gözlenmektedir. Leptine karşı reseptör cevabı oluşmaz. İnsülin direnci, hiperglisemi öncesi saptanabilir. Direnç ile beraber hipergliseminin seviyesi de yükselir. Karbohidrat monomerlerinden zengin diyet diyabetin başlangıcını hızlandırır. Adacık lezyonları ile hipergliseminin ciddiyeti artar.

*Ob/Ob Fare;*

Orta dereceli hiperglisemi ile birlikte obezite gözlenir. Yani obez-diyabetik bir modeldir. Db farelerden farklı olarak hem leptin geninde ki mutasyon 6. kromozomda bulunmakta hem de retinopati, periferik nöropati ve böbrek lezyonları görülmemektedir. Bununla birlikte hiperinsülinemi, obezite, hiperfaji ve insülin direnci ile karakterize edilirler. Nöroendokrin ve hipotalamik anomaliler de vardır.

*GK (Goto-kakizaki) Sıçan;*

Glukoz toleranssızlığı, uzun süreli ve orta derecede hiperinsülinemi ve insülin direnci bulunan bu model stabil olduğu için deneysel açıdan avantajlıdır. Bu modelde  $\beta$  hücresi glukozu tanıyamayıp ona karşı bir yanıtızlık ortaya koyar.

### **Transgenik Modeller**

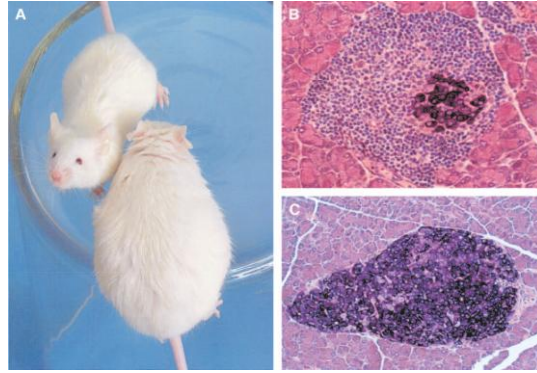
Tip 1 diyabet patogenezinin anlaşılmasında önemli katkılar sağlamaktadırlar.

*Zucker-Lepr<sup>fa</sup> sıçan;*

Kromozom 5 üzerinde otozomal resesif mutasyon gözlenir. İnsülin direnci, hiperfaji, kas atrofisi, hiperlipemi tablosu vardır. Adiposit hipertrofisi ve hiperplazisi, ile hiperkolesterolemi ve hiperinsülinemi de oluşmaktadır.

#### *Zucker fa/fa sıçan;*

Bu kategorideki esas modeldir. Bu fare insülin direnci, hiperfaji ve hiperinsülinemi modeli olarak geniş çapta araştırılmıştır. Normal değerinin 10-20 kat üzerinde plazma insülin düzeylerine sahiptirler. Kahverengi yağ dokusu termogenezinde azalma ve erken dönemde hiperfaji ve hiperinsülinemi gözlenir. Diğer önemli modellerden birisi ise obese NOD-Leprdb-5J/Lt fareidir.



(obese NOD-Leprdb-5J/Lt fare)

### **Cerrahi modeller**

#### *Parsiyel Pankreatektomi;*

Pankreasın % 90'ı çıkartılırsa orta derecede hiperglisemi oluşmaktadır. Hipotalamik lezyonlar bu modele ait önemli bulgulardır.

#### *Diyet ve Erken Malnütrisyon;*

Yüksek yağlı ve şekerli zengin diyet insülin konsantrasyonlarını arttırabilir, glukoz toleransını bozabilir.

#### *Hormonal İndüklenme;*

Deksametazon ve glukokortikoidler, insülin direncini etkileyebilir, endokrinopati ve hiperglisemiye yol açabilir.

### **Kaynaklar**

1. Xiangdong L, Yuanwu L, Hua Z, Liming R, Qiuyan L, Ning L. Animal models for the atherosclerosis research: a review. *Protein Cell*, 2011; 2(3):189-201.
2. Stephane Potteaux, Hafid Ait-Oufella, Ziad Mallat. Mouse models of atherosclerosis. In: *Drug Discovery Today: Disease Models*, 2007; 4(4):165-170.
3. Marjo MPC Donners, Sylvia Heeneman, Mat JAP Daemen. Models of atherosclerosis and transplant arteriosclerosis: the quest for the best. In: *Drug Discovery Today: Disease Models*, 2004; 1(3):257-263.
4. Qing Xiao. Genetically Manipulated Models of Atherosclerosis in Mice. In: A. F. Drew(eds). *Methods in Molecular Medicine, Atherosclerosis: Experimental Methods and Protocols* Totowa, NJ, 2001; (52):15-25.

5. Peter Carmeliet, DeÂsireÂ Collen. Transgenic mouse models in angiogenesis and cardiovascular disease. *J Pathol*, 2000; 190:387-405.
6. Langheinrich AC, Bohle RM. Atherosclerosis: humoral and cellular factors of inflammation. *Virchows Arch*, 2005; 446:101-111.
7. John R. Davies, David Izquierdo-Garcia, James HF Rudd, Nichola Figg, Hugh K. Richards, Joseph LE Bird, Franklin I Aigbirhio, Anthony P Davenport, Peter L Weissberg, Tim D Fryer, Elizabeth A Warburton. FDG-PET can distinguish inflamed from non-inflamed plaque in an animal model of atherosclerosis. *Int J Cardiovasc Imaging*, 2010;26:41-48.
8. Bocan TM, Mueller SB, Mazur MJ, Uhlendorf PD, Brown EQ, Kieft KA. The relationship between the degree of dietary-induced hypercholesterolemia in the rabbit and atherosclerotic lesion formation. *Atherosclerosis*, 1993; 102(1):9-22.
9. Kolodgie FD, Katocs AS Jr, Largis EE, Wrenn SM, Cornhill JF, Herderick EE, Lee SJ, Virmani R. Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low-level cholesterol. Methodological considerations regarding individual variability in response to dietary cholesterol and development of lesion type. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996; 16(12):1454-1464.
10. Holm P, Andersen HL, Arr e G, Stender S. Gender gap in aortic cholesterol accumulation in cholesterol-clamped rabbits: role of the endothelium and mononuclear-endothelial cell interaction. *Circulation*, 1998; 98(24):2731-2737.
11. Spagnoli LG, Orlandi A, Mauriello A, Santeusano G, de Angelis C, Lucreziotti R, Ramacci MT. Aging and atherosclerosis in the rabbit. Distribution, prevalence and morphology of atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*, 1991; 89(1):11-24.
12. Cunningham KS, Gotlieb AI. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab Invest*, 2005; 85(1):9-23.
13. Dong B, Zhang C, Feng JB, Zhao YX, Li SY, Yang YP, Dong QL, Deng BP, Zhu L, Yu QT, Liu CX, Liu B, Pan CM, Song HD, Zhang MX, Zhang Y. Overexpression of ACE2 enhances plaque stability in a rabbit model of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28(7):1270-1276.
14. Pickup JC, Williams G. *Textbook of Diabetes* 2nd ed. Volume 1. Blackwell Science Inc; 2002.
15. Bell RH, Hye RJ. *Animal Models of Diabetes Mellitus: Physiology and Pathology*. *Journal of surgical Research*, 1983; 35:433-460.
16. Watkins D, Cooperstein SJ, Fiel S. Studies on the selectivity of alloxan for the b-cells of the islets of Langerhans: effect of pH on the in vitro action of alloxan. *J Pharmacol Exp Ther*, 1979; 208:184.
17. Gonzales-Paredes B, Contreras Weber CC, Roman-Ramos R. Hypoglycemic activity of root water decoction, sesquiterpenoids, an one polysaccharide fraction from *Psacalium decompositum* in mice. *J Ethnopharmacol*, 2000; 69:207-215.
18. Dunn JS, Duffy E, Gilmour MK, Kirkpatrick J, McLetchie NG. Further observations on the effects of alloxan on the pancreatic islets. *J Physiol*, 1944; 103:233-243.
19. Desrois M, Sidell RJ, Gauguier D, King LM, Radda GK, Clarke K. Initial steps of insulin signaling and glucose transport are defective in the type 2 diabetic rat heart. *Cardiovasc Res*, 2004; 61(2):288-296.
20. Like AA, Butler L, Williams RM, Appel MC, Weringer EJ, Rossini AA. Spontaneous autoimmune Diabetes Mellitus in the BB rat. *Diabetes*, 1982; Vol 31, Suppl 1.
21. Srinivasan K and Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: An overview. *Indian J Med Res*, 2007; 125:451-472.

## Obezite ve Deneysel Model

**Aydın ÇEVİK**

***İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE)  
Deney Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Anabilim Dalı,  
İstanbul, Türkiye***

Obezite, Dünya Sağlık Örgütü(DSÖ) tarafından “Sağlığı bozacak şekilde yağ dokularında anormal veya aşırı miktarda yağ birikmesidir” şeklinde tanımlanmaktadır. Daha kapsamlı bir ifadeyle, obezite, bedenın yağ kütlesinin yağsız kütleye oranının aşırı artması ve davranışsal, hormonal ve metabolik değişikliklerle karakterize edilen kompleks, multifaktöriyel ve kronik bir hastalıktır. Obezitenin gelişiminde enerji dengesini düzenleyen nöroendokrin mekanizmalar üzerinde etkili olan çevresel ve genetik faktörlerin birbirleriyle etkileşimlerinin önemli rol oynadığı öne sürülmektedir.

Vücuda besinlerle alınan enerjinin, metabolizma ve fiziksel aktivite sonrasında harcanan enerjiden fazla olması durumunda, pozitif enerji dengesi olduğundan fazla enerji vücutta yağ olarak depolanmaktadır. Yağ dokusundaki artışın sonucu olarak vücut ağırlığı da artmaktadır. Vücut ağırlığındaki bu artış, obezite değerlendirme ölçütlerinden biri olan beden kitle indeksinde (BKİ) artışa neden olmaktadır. BKİ değeri (vücut ağırlığı/boyun karesi)  $\geq 30$  ise kişi obez olarak kabul edilmektedir.

Obezite başta tip 2 diyabet olmak üzere hipertansiyon, kalp-damar hastalıkları, kanser, dislipidemi, infertilite, polikistik over sendromu, lumbago, astım, safra kesesi hastalıkları, lumbago, uyku apnesi gibi birçok hastalığın gelişimine katkıda bulunarak insanlarda yaşam süresi ve kalitesine olumsuz etki yapmaktadır. Küreselleşme ve kentleşme süreci içerisinde beslenme alışkanlıklarının değişmesi, fiziksel aktivitenin azalması ve yüksek enerjili yiyeceklere kolay erişimle birlikte gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde prevalansı hızla artmaktadır. Dünya sağlık örgütü (DSÖ) tarafından ilk kez infeksiyon olmayan bir hastalığın hızlı ve yaygın artışını vurgulamak amacı ile “obezite pandemisi ” ifadesi kullanılmıştır.

### Hayvan Modelleri

Bir hastalığın hayvan modeli, o hastalığın patofizyolojik karakteristiklerinin tümünü ya da çoğunu temsil etmesi durumunda iyi bir model olarak nitelendirilmektedir. Patogenezi henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamayan obezitenin moleküler mekanizmalarının daha iyi anlaşılabilmesi için iyi hayvan modellerinin varlığı çok önemlidir. Obezitenin hayvan modelleri, obezitenin ortaya çıkma zamanına, kapsamına, diyabet veya insülin direncinin eşlik edip etmediğine, metabolizma değişikliklerine ve besin alımına bağlı olarak büyük ölçüde farklılık göstermektedir.

Enerji dengesini düzenleyen homeostatik mekanizmaların aydınlatılması, yüksek yağ içerikli diyetlere verilen yanıtların değerlendirilmesi, obezite tedavisine yönelik farmasötiklerin geliştirilmesi, monogenik ve poligenik mutasyonların obezite patogeneziindeki rolleri, hayvan modelleri üzerinde araştırılmaktadır. Obezite çalışmalarında en çok kullanılan hayvan modelleri, gen haritasının iyi bilinmesi ve çok sayıda transgenik, knockout, spontan mutant soylarının bulunması nedeniyle farelerdir. İnsanlarda da fare obezite genleri ile homolog genlerde ya da aynı metabolik yolda etkili genlerde mutasyonlar tanımlanmış ve hayvan modellerinde

yapılan çalışmalar sonucunda seçilen aday genlerde mutasyon çalışmaları yürütülmektedir.

### Çevresel Faktörlerle İndüklenen Obezite

Kemirgenlerde % 20 - 60 oranında yağ içeren yüksek yağlı diyetlerle beslenmeyle obezite indüklenebilmektedir. Bu amaçla, S.Dawley, Wistar albino, Long Evans sıçan soyları ve C57BL/6 fare soyu kullanılmaktadır. Kemirgenlerde hayvansal yağlar ve omega-3 ve omega-6 yağ asitleri içeren bitkisel yağlarla obez ve insülin dirençli fenotip oluşturulabilirken balık yağı ile beslenen hayvanlarda obez fenotipi gelişmemektedir. Ayrıca fenotip kadar obezitenin patogenezi de insanlardakine benzerlik göstermelidir. Bunların yanısıra, diyet alımının doğru ölçülebilmesi için bireysel kafeslerde barındırılması, gece aktif hayvanlar olmalarına dikkat edilmesi gerekmektedir. Nutrient kompozisyonu bilinen yüksek yağlı ya da yüksek yağ ve yüksek sukroz (yağdan gelen enerji % 21 - 31) içeren diyetlere alternatif olarak kullanılan kafeterya diyetinin (en az % 40 yağ) dezavantajı, nutrient kompozisyonunun kontrol edilememesi ve yetersiz protein alımına yol açabilmesidir. Obezite çalışmalarında yabani tip kemirgenler araştırmacılar tarafından daha çok tercih edilmektedir.

### Spontan mutantlar

Bazı kemirgen soylarında obez fenotiple sonuçlanan spontan mutasyonlara nadiren de olsa rastlanmaktadır. Bir pigment kontrol geni olan ve 1992 yılında Bultman ve ark. tarafından klonlanmış olan aguti, moleküler düzeyde ilk obezite genidir. Tek gen mutasyonu örneklerinden biri de 1994 yılında ob/ob farelerde keşfedilen leptin genidir. Leptin yağ dokusundan salınan ve enerji kullanımını arttıran önemli bir anaoreksigenik faktördür. Leptin geni veya reseptöründe spontan mutasyon görülen fare ve sıçan soyları yine araştırmalarda sıklıkla tercih edilirler. Karboksipeptidaz E geni (POMC ve proinsülin), Tubby geni, Yellow A<sup>vy/-</sup>, attractin geni mutasyonlarının kemirgen modelleri obeziteyle ilişkili diğer spontan mutasyon örnekleridir (Tablo 1).

**Tablo 1.** Çevresel yolla indüklenen obezite ve spontan mutantlar

Obezite Modeli	Orijin	Tip	Fenotip	Diyet
Çevresel model s/f	diyetsel	geç	insülin direnci; diyet yağ %	y.yağlı
Lep <sup>ob</sup> /Lep <sup>ob</sup> fare	spontan	erken	leptin fonksiyonu; morbid	normal
Lep <sup>db</sup> /Lep <sup>db</sup> res F	spontan	erken	leptin direnci; morbid, T2D	normal
Zucker <sup>fa/fa</sup> sıçan	spontan	erken	leptin direnci; morbid	normal
ZDF <sup>fa/fa</sup> sıçan	spontan	erken	ins ve lep direnci, T2DM	y. yağlı
Koletsy <sup>fa/fa</sup> sıçan	spontan	erken	leptin direnci; morbid, HT	normal
Tubby fare	spontan	erken	retinal dejenerasyon	normal
GH-n dwarf sıçan	spontan	geç	GH noks. bağlı obezite	y. yağlı
Yellow AA <sup>vy/-</sup> fare	spontan	geç	ins ve lep direnci, hiperfaji	normal
CPE gen mut. fare	spontan	geç	ins duy.; POMC oluş; DM	normal

### Poligenik Obezite Modelleri

Monogenik modellerin obezitenin biyolojisi hakkında önemli bilgiler sağlamasına karşın insan obezitesi poligenik karakter taşımaktadır. Bir poligenik model olan erkek



NZO farelerde tip 2 diyabet gelişmektedir. İnsandakine benzer şekilde hiperfaji, azalmış enerji tüketimi ve fiziksel aktivite obeziteye neden olmaktadır. TSOD farelerde obeziteye diyabet, hiperglisemi ve hiperinsülinemi eşlik eder. Diğer örnekler M16 (hiperfaji, hiperleptinemi ve hiperinsülinemi erken ortaya çıkan obezite), KK (insülin direnci ve tip 2DM fenotipli obez) farelerdir.

## Gen Mühendisliği Ürünü Mutantlar

### Overekspresyon modelleri

Transgenik overekspresyon yoluyla elde edilen fare modelleri insanlardaki gibi poligenik yapıdaki obezitenin patojenezi ve enerji dengesinin fizyolojik ve moleküler mekanizmaları üzerine tasarlanan çalışmalarda yararlı modeller olarak kullanılmaktadır (Tablo 2).

**Tablo 2.** Overekspresyona dayalı modeller

Ob Model -OE	Orijin	Tip	Fenotip	Diyet
CRF fare	Tg	erken	trunkal obezite; geç diyabet	normal
AGRP fare	Tg	geç	ins, lep direnci, hipf, pigment.	normal
GLUT-4 fare	Tg	erken	y.d.da glu. met; adiposit farklı.	normal
Sindropin fare	Tg	matür	hiperins;ılımlı; MCR agonist	normal
MCH fare –mel	Tg	geç	ins direnci; orta yaş ob, T2DM	y.yağlı
GH inaktiv.	Tg	A/K	GH(-) lipoliz düz.; GH met fiz.	normal
SLOB sıçan	Tg	geç	farklı bir obezite fenotipi	normal

### Gen Disrupsiyonuna Dayalı Modeller

Gen hedefleme (knockout) yoluyla ilgili reseptörlerin inaktivasyonu, obez fenotipe sahip (Melanokortin-4 Reseptör noksan, Pro-opiomelanokortin mutant, oreksin noksan, Nöropeptit-Y1 reseptör gen mutant knockout (KO) fare soylarının üretilmesine olanak sağlamaktadır. KO farelerin barındırılma koşulları (bireysel ya da grup halinde barındırılma, kafes tipi, kafes zemini, oda sıcaklığı ve çevre zenginleştirme) beslenme davranışlarını, yem alımını ve ağırlık kazanımlarını önemli ölçüde etkilediği dikkate alınmalıdır. Bu genetik modeller enerji homeostazı ve metabolizmasına ilişkin mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmaktadır (Tablo 3).

**Tablo 3.** Gen disrupsiyonuna dayalı modeller

Ob Model -dr- fare	Orijin	Tip	Fenotip	Diyet
MC4-R noksan	KO	erken	Morbid; i.d; MC4-R agonist	normal
MC3-R noksan	KO	geç	MC sist rolü; ago-anta.; i.d.	normal/y.y
POMC noksan	KO	geç	MC res ago; en denge; i.d.	normal/y.y
CART noksan	KO	geç	koka&amf en. deng. etki	y.yağlı
Oreksin ablasyon	KO	geç	narkolepsi; hipofajik ob	normal
$\beta_3$ -Adren.res. n F	KO	erken	$\beta_3$ -AR ligandl. seç & fonks.	normal
Nhlh2 n del. F	KO	geç	♂ bireylerde infertilite	normal
BAT ablasyonu	KO	erken	az. en tüketimi; i.d.; T2DM	normal
NPY-Y1-R noksan	KO	erken	hiperins.; ılımlı; NPY	normal

			agonist	
NPY-Y2-R noksan	KO	erken	hafif; nöropeptit Y2 agonist	normal
serotonin <sub>2C</sub> -R n	KO	geç	Hipf ob; orta yaş ob; hiperins	normal
PPAR- $\alpha$ -R noksan	KO	erken	Hipf (-) ob?; peroksizom aktv.	normal
ICAM-1 noksan	KO	er/geç	i. normal geç/yy erken ob	normal/yy
BombesinRS-3n	KO	geç	ılımlı; T2DM; kan basıncı $\uparrow$	normal
NIRKO IR gen. in.	KO	erken	i.d patogen.; hipertrigliser.	y.yağlı

## Kimyasal ve Cerrahi Manipülasyonlar

Nörotransmisyonu bozabilen spesifik lezyonlar mekanik olarak elektrolitik (ventromediyal hipotalamus (VMH), Paraventriküler hipotalamus (PVN), Amigdala) radyofrekansı, cerrahi kesi (hipotalamus, ortabeyin) ve kimyasal (kolşisin veya kainik asit, ibotenik asit, monosodyum glutamat ve altın tioglukoz gibi nöronal toksinler), viral (Scrapie, CDV) yollarla spesifik lezyonlar üretilebilmektedir (Tablo 4).

**Tablo 4.** Kimyasal veya cerrahi manipülasyonlar ile elde edilen modeller

Obez Model	Orijin	Tip	Fenotip	Diyet
VMH lezyon	Kim/Cer	değişken	hiperfaji; obezite,	normal
PVN lezyon	Kim/Cer	değişken	hiperfaji; insülin direnci	normal
ARC lezyon	Kim/Cer	değişken	hiperfaji; insülin direnci	normal

## Sonuç ve beklentiler

İnsanda obeziteden sorumlu tutulan tek gen mutasyonlarına nadiren rastlanmaktadır. Obezitenin çoğu kez çevresel faktörlerle poligenik faktörlerin karşılıklı etkileşimlerinin sonucunda ortaya çıktığı öne sürülmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, insandaki obezite için en uygun hayvan modelinin, bir outbred soyun bireylerinin çevrenin deneysel amaçlı manipülasyonları sonucunda yağ kazanımları olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, yağ kütlelerinde artışa yol açan spontan ve gen mühendisliği ürünü mutantların yalnızca alternatif modeller olmayıp aynı zamanda terapötik ilaçların denenmesi, düzenleyici yolların ve fizyolojik mekanizmaların incelenmesi bakımından eşsiz kaynak sağladıklarını ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak, obezite araştırmalarında kullanılan hayvan sayısını azaltmak üzere geliştirilen yeni bilgisayar modellemelerinin veya hücre kültürü çalışmalarının sayısındaki artışın, hayvanların deneysel amaçlı kullanımlarının önemini azaltmak yerine bilgilerimizi daha da zenginleştireceği öngörülmektedir.

## Kaynaklar

1. James PT, Leach R, Kalamara E, Shayeghi M. The worldwide obesity epidemic. *Obesity Research*, 2001; 9:228S-33S.
2. Catenacci VA, Hill JO, Wyatt HR. The obesity epidemic. *Clinical Chest Med*, 2009; 30:415-444.

3. Bray G, Bouchard C. Handbook of Obesity: Clinical Applications, 3rd ed. New York: Informa Healthcare, 2008.
4. Baker DH. Animal models in nutrition research. *The Journal of Nutrition*, 2008; 138:167-172.
5. Durak MS, Akbıyık F, Demirpençe E. Obezite Patojenezi. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 2007; 38:167-172.
6. Tschöp M, Heiman ML. Rodent obesity models: An overview. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 2001; 109:307-319.
7. Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutrition Research Reviews*, 2010; 23:270-299.
8. Hau J, Van Hoosier, Jr GL. Handbook of Laboratory Animal Science Animal Models, Volume II. In: Buschard K, Thon R.(eds). *Diabetic Animal Models* 2nd ed. New York: CRC Press, 2003; 157-186.
9. Fox JG, Davisson MT, Quimby FW, Barthold SW, Newcomer CE, Smith AL. The Mouse in Biomedical Research, Volume III. In: Chiu S, Fisler JS, Warden CH(eds). *Normative Biology, Husbandry, and Models*, 2nd ed. California: Elsevier Academic Press, 2007; 617-636.
10. Suckow MA, Steven SH, Weisbroth H, Franklin CL. The Laboratory Rat. In: Owens DR(eds). *Spontaneous, Surgically and Chemically Induced Models of Disease*, 2nd ed. London: Elsevier Academic Press, 2006; 711-732.
11. West DB, York B. Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: Lessons from animal models. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1998; 67(suppl): 505S–12S.
12. Speakman J, Hambly C, Mitchell S, Krol E. Animal models of obesity. *Obesity Reviews*, 2007; 8 (Suppl.1):55-61.
13. Speakman J, Hambly C, Mitchell S, Krol E. The Contribution of Animal Models to the study of obesity. *Laboratory Animals*, 2008; 00:1-20.
14. Carroll L, Voisey J, Van Daal A. Mouse models of obesity. *Clinics in Dermatology*, 2004; 22:345-349.
15. Good DJ. Using obese mouse models in research: Special considerations for IACUC members, animal care technicians and researchers, 2005; 34:30-37.
16. Das M, Gabriely I, Barzilai N. Caloric restriction, body fat and ageing in experimental models. *Obesity Reviews*, 2004; 5:13-19.
17. Shimizu H, Oh-I S, Okada S, Mori M. Leptin resistance and obesity. *Endocrine Journal*, 2007; 54:17-26.
18. Li S, Yan Zhang H, Hu CC, Lawrence F, Gallagher KE, Surapaneni A, Estrem ST, Calley JN, Varga G, Dow ER, Chen Y. Assessment of Diet-induced Obese Rats as an Obesity Model by Comparative Functional Genomics. *Obesity*, 2008; 16:811-818.
19. Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High-fat Diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity*, 2007; 15:798-808.
20. Casper RC, Sullivan EL, Tecott L. Relevance of animal models to human eating disorders and obesity. *Psychopharmacology*, 2008; 199:313-329.
21. Reed DR. Animal models of gene-nutrient interactions. *Obesity*, 2008; 16:23-27.
22. Kanasaki K, Koya D. Biology of obesity: Lessons from animal models of obesity. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011;1-11.
23. Shafrir E, Ziv E. A useful list of spontaneously arising animal models of obesity and diabetes. *American Journal of Physiology and Endocrinology and Metabolism*, 2009; 296:450-52.
24. Reuter YT. Diet-Induced models for obesity and type 2 diabetes. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 2007; 4:3-8.

25. Lyons MJ, Nagashima K, Zabriskie JB. Animal models of postinfectious obesity: Hypothesis and review. *Journal of Neurovirology*, 2002; 8:1-5.
26. Augustine KA, Rossi RM. Rodent mutant models of obesity and their correlations to human obesity. *The Anatomical Record*, 1999; 257:64-72.
27. Imai Y, Ahima RS. Rodents as genetic models of obesity. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 2005; 2:165-175.
28. Butler AA, Cone RD. Knockout models resulting in the development of obesity. *Trends in Genetics*, 2001; 17:S50-54.
29. Brockmann GA, Bevova MR. Using mouse models to dissect the genetics of obesity. *Trends in Genetics*, 2002; 18:367-376.
30. World Health Organization. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Technical Report 894, Geneva: WHO, 2000.

## Using Mice with Enhanced IL-4 Signaling to Model Food Allergy

**Hans C. OETTGEN**

**Division of Immunology, Children's Hospital and Harvard Medical School,  
Boston, MA 02115**

This project was supported by National Institutes of Health grants: NIAID R01-AI054471 and 1R21AI087666, 5T32AI007512-24, 2R01AI065617 and 1R21AI080002

### **ABSTRACT**

Food allergies are increasing in prevalence but models for analysis of mechanisms of immune sensitization and anaphylactic responses are limited. Mice, like humans, are normally tolerant of ingested antigens. As IL-4 is a critical cytokine in Th2 responses and since IL-4 receptor (IL-4R) polymorphisms have been linked to atopy, we hypothesized that mice with enhanced IL-4R signaling would generate specific IgE responses to food antigens and that they would exhibit anaphylactic reactions upon challenge. To test this hypothesis F709 mice, in which the IL-4R $\alpha$  immuno-tyrosine inhibitory motif (ITIM) motif is inactivated, were gavaged fed with ovalbumin (OVA). F709 mice exhibited increased OVA-specific IgE responses along with increased intestinal mast cell numbers and evidence of mast cell activation and systemic anaphylaxis upon enteral OVA challenge. Anaphylaxis was IgE-dependent. We conclude that augmented IL-4R $\alpha$  signaling results in increased sensitivity to food allergens and that food anaphylaxis, unlike systemic anaphylaxis, is IgE-dependent.

### **Introduction**

Food allergy has emerged as a major health issue in developed countries with an estimated prevalence of up to 6 % in children and 3 % in the adult population (1, 2). Children are typically sensitized early in life and their allergies manifest either as immediate hypersensitivity (urticaria, anaphylaxis) or as chronic inflammatory responses including atopic dermatitis and food protein-induced enteropathies. Treatments for food allergy are very limited and management generally involves counseling patients regarding lifelong avoidance of the food allergen(s).

IL-4 and IL-13, both products of activated T-helper cells are critical in sensitization to allergens and in inducing the physiologic, inflammatory and immunologic manifestations of allergic diseases (3-7). While they signal through a common receptor and are each, independently, capable of eliciting many aspects of allergic pathophysiology, separate functions have been defined for the two cytokines. IL-4 but not -13 is both necessary and sufficient for the effective induction of CD4<sup>+</sup> TH2 responses and plays a major role in IgE synthesis. However IL-13 is expressed by more cell types and is present at higher levels at sites of allergic inflammation where it appears to play a dominant role in driving aspects of allergic pathophysiology including enhanced airway responsiveness to cholinergic agonists and mucus cell metaplasia in airway epithelium (8). IL-13 but not IL-4 is necessary and sufficient for the physiologic manifestations of asthma in murine asthma models (3, 7, 9-11).

IL-4 binds to two distinct receptors (types I and II) whereas IL-13 binds and signals only via the type II receptor (12-14). The type I receptor is composed of a

cytokine-binding  $\alpha$ -chain, capable of binding IL-4 and the  $\gamma_c$  signaling chain shared by several cytokine receptors. The type II receptor, also a heterodimer, contains the same IL-4-binding IL-4R $\alpha$  chain in association with the IL-13R $\alpha$ 1 chain which recognizes IL-13. Thus the type I receptor can deliver signals in response to IL-4, and the type II receptor is triggered via both IL-4 and IL-13.

The type I and type II receptors activate distinct signaling pathways. JAK3 is activated by  $\gamma_c$  while Tyk2 and JAK2 are stimulated upon IL-13R $\alpha$ 1 engagement. The activated protein tyrosine kinases phosphorylate SH2 domains in the IL-4R $\alpha$  cytoplasmic domain which, in turn, serve as docking sites for STAT6. A second signaling intermediate, IRS-2, is also recruited to the IL-4R $\alpha$  chain following ligand binding and binds to the I4R (insulin/IL-4R) motif at Y<sup>497</sup> (15). IRS-2 is a target of phosphorylation by JAK3 and JAK2 and then, via the action of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) activates downstream signaling by the Akt and other pathways. In cells (like macrophages) expressing both type I and II IL-4 receptors, IRS-2 phosphorylation is more efficiently induced by IL-4 signaling, while in cells expressing only the type II receptor IRS-2 is not activated implicating the type I receptor chains in IRS-2 activation (16). We have shown that targeted disruption of the I4R site (Y500F) elicits an enhanced allergic phenotype (17). The homologous mutation is associated with asthma in human populations suggesting a negative regulatory function for IRS-2 signaling pathway(s) (18, 19). This negative effect could be mediated both by  $\gamma_c$ -dependent induction of genes whose products inhibit allergic inflammation including *FIZZ1* and YM-1 (a chitinase) and by suppression of genes associated with allergic inflammation (20, 21).

Reports of associations between genetic polymorphisms of cytokines and receptors in the IL4/13 axis with atopic diseases have suggested that mutation-induced alterations in IL-4/13 signaling give rise to enhanced susceptibility to allergy (18, 22-32). However the genetic data implicating these loci has been interpreted with caution since the identified polymorphisms could exist in linkage disequilibrium with pathogenic mutations in neighboring genes. Chatila and colleagues have undertaken a direct analysis of the functional consequences of alterations in IL-4R $\alpha$  structure *in vivo* by generating “knock-in” mice which harbor signaling mutations. We have previously characterized the allergic responses of these animals. Mice harboring the Y709F mutation which disrupts the immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif of IL-4R $\alpha$ , which is known to bind to negative-regulatory phosphatases including SHP-1, SHP-2 and SHIP, have markedly elevated IgE levels and increased susceptibility to allergen induced airway inflammation (33). We have recently taken advantage of the allergic phenotype of these animals to develop a novel model of food allergy which will be reviewed here (34).

## Materials and Methods

### *Animals*

Wild-type (Y709) BALB/c mice were purchased from Taconic Farms (Germantown, NY). *C.129.II4ra*<sup>F709/F709</sup> (F709) mice were bred onto a BALB/c background (ten generations). All mice were housed in a specific pathogen-free environment and were 6 to 12 weeks old. All experiments were carried out in accordance with the IACUC policies and procedures of Children’s Hospital, Boston.

### *Sensitization of mice*

For sensitization, Y709 or F709 mice were treated intragastrically (*i.g.*) with sterile PBS or 5 mg ovalbumin (OVA; Sigma) and 20 µg CT in 250 µl sterile PBS (saline) on days 0, 1, 2 and 7. This was followed by weekly sensitization with OVA and CT for 8 more weeks. In the 9<sup>th</sup> week, mice were challenged with a large dose (150 mg) of OVA. In the 9<sup>th</sup> week, mice were challenged with 150 mg OVA.

### *Measurement of anaphylaxis*

Anaphylaxis was assessed in challenged mice by measuring changes in body temperature using transponders placed subcutaneously two days prior to challenge (34).

### *ELISA's for murine mast cell protease- 1(mMCP-1), total and OVA-specific IgE*

An mMCP-1 ELISA was performed on serum samples using a kit (Moredun Scientific Ltd., Scotland). Total IgE levels as well as OVA-specific IgE were measured using sandwich ELISA's.

*Splenocyte stimulation and ELISA's for IL-4, IL-5 and IL-13* One million spleen cells were cultured in triplicate with 200 µg/ml OVA or 0.2 µg/ml CD3 and CD28 in 1ml complete RPMI 1640 with 10 % fetal calf serum. Supernatants were collected at 24, 48 and 96 hr and levels of IL-4, IL-5 and IL-13 determined by ELISA according to the manufacturer's instructions (IL-4 and IL-5 from BD Biosciences; IL-13 from R&D Systems).

## **Results**

Most established models of food allergy require parenteral priming (intraperitoneal injection of allergen with alum adjuvant) in order to induce immune responses. Even in primed mice enteral challenge does not drive the type of intense allergic responses (systemic anaphylaxis) observed in human subjects. We hypothesized that animals with an activating mutation of the IL-4R $\alpha$  chain would have an enhanced sensitivity to enteral allergen exposure (IgE and T cell responses) and would exhibit more intense reactions upon enteral allergen challenge (systemic anaphylaxis). Using ovalbumin (OVA) as an allergen, we showed that F709 mice indeed mounted stronger food allergy response and the data are reviewed here (34).

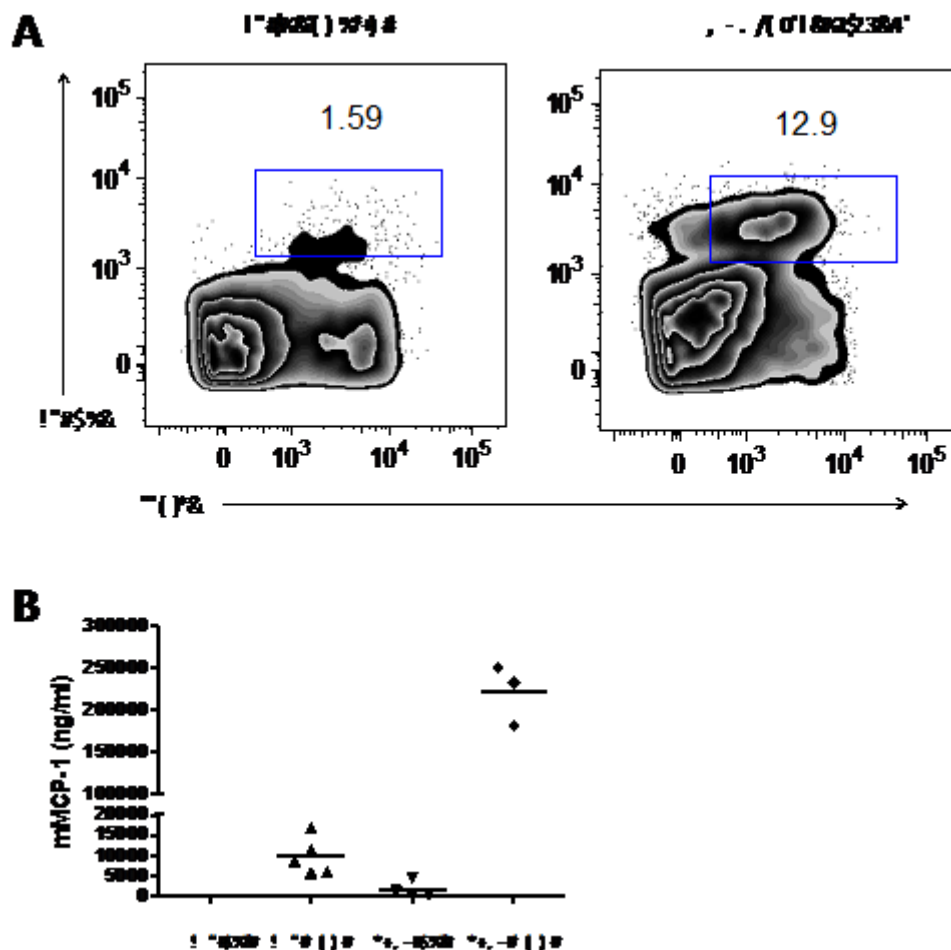
F709 mice were subjected to a murine food allergy model adapted from Knippels and colleagues in which sensitization is performed enterally in the presence of the adjuvant, cholera toxin, over a 9-week period with no intraperitoneal priming and challenge is also by gavage (**Figure 1A**) (35). In addition to having elevated IgE at baseline, the F709 animals exhibited stronger OVA-specific and total IgE responses to OVA (**Figure 1B**). OVA-specific T cell responses were also increased in the IL-4R $\alpha$  mutant mice. Splenocytes of enterally sensitized mice were stimulated with OVA and supernatants analyzed by ELISA for the presence of Th2 cytokines, IL-4, IL-5 and IL-13. While OVA-exposed wild-type (Y709) mice did mount a specific IL-5 response, allergen-specific induction of both IL-4 and IL-13 was markedly enhanced in the F709 T cells (**Figure 2**). These findings indicate that amplification of IL-4 signaling leads to increased sensitization to food antigens with elevated IgE production and specific Th2 responses.





challenge, splenocytes were harvested and cultured with OVA. Supernatant levels of IL-4, IL-5 and IL-13 were measured by ELISA.

Allergic responses to foods in humans are associated with evidence of mast cell expansion and mast cell activation, including release of the mast cell enzyme, tryptase, which can be detected in plasma following allergic reactions. We hypothesized that the enhanced anaphylactic responses of F709 mice might reflect mast cell activation and furthermore that these mice might harbor increased numbers of mast cells. In order to enumerate mast cells, collagenase digests of jejunal tissue were analyzed by flow cytometry for the presence of  $Fc\epsilon RI^+ c-kit^+$  cells (**Figure 3A**). Mast cells increased in the F709 mice from 1.59 % to 12.9 % of lineage-negative mononuclear cells, an 8-fold difference. No significant difference was seen in wild-type Y709 mice. Consistent with this increased mast cell number, we observed markedly higher release of the mast cell mediator, mouse mast cell protease-1 (mMCP-1) following enteral OVA challenge in F709 mice than in wild-type Y709 controls (**Figure 3B**).



**Figure 3.** Mast cell expansion and mediator release in F709 mice. **A.** Single cell suspensions were prepared from jejunum of OVA treated mice by collagenase digestion. Flow cytometry was performed and the fraction of  $CD45^+$  lineage ( $CD3, CD19$ ) $^-$  cells with mast cell phenotype ( $Fc\epsilon RI^+ c-kit^+$ ) determined. **B.** Plasma

levels of mouse mast cell protease-1 (mMCP-1) were measured by ELISA following OVA challenge in Y709 (WT) and F709 mice sensitized with OVA or saline (Sal).

Anaphylaxis was detected by noninvasive measurement of body temperature using subcutaneously implanted radio frequency transponders (**Figure 4A**). A rapid drop in core body temperature was induced by OVA challenge in F709 mice while wild-type (Y709) mice showed no reaction. Mice exhibiting hypothermia also displayed symptoms of anaphylaxis with decreased activity and reduced responses to physical stimulation. All F709 animals had diarrhea. In general, Y709 mice had only very mild symptoms. In order to assess the role of IgE antibodies in the reaction the responses of F709/IgE<sup>-/-</sup> and Y709/IgE<sup>-/-</sup> mice were compared (**Figure 4B**). In contrast to F709 mice capable of producing IgE, the IgE-deficient F709 animals exhibited no significant temperature drop. This finding indicates that IgE antibodies are required for the induction of anaphylaxis in this food allergy model.



**Figure 4.** Systemic anaphylaxis in F709 mice. **A.** Y709 and F709 mice were treated with OVA and CT (or CT in normal saline -NS) as indicated in the protocol of Figure 1. Immediately after challenge with 200 mg OVA via gavage, body temperatures were monitored every 5 minutes over a 60 minute period using previously implanted transponders. **B.** Y709/IgE<sup>-/-</sup> and F709/IgE<sup>-/-</sup> mice were subjected to the same protocol.

## Discussion

A number of mouse models have previously been developed for investigating food allergy (35-44). These models commonly require injection of antigen and adjuvant, prior to feeding the allergenic food in order to generate significant responses. Furthermore, it has not previously been possible to demonstrate robust systemic anaphylactic responses upon enteral challenge of mice sensitized only by ingestion. Thus the model we have developed represents a unique and powerful tool for the study of food allergy mechanisms (34).

Our findings implicate IL-4 and its receptors as central players in the regulation of immune responses to foods. Genetic variants of IL-4 and/or IL-13 and their receptors have been shown to modulate asthma risk (18, 45-47) and associations with food allergy have been observed (48, 49). Previous investigations have pointed to roles for IL-4 and IL-13 in the pathogenesis of gastrointestinal allergic responses (50-56). Our results confirm that amplification of IL-4 signaling confers a very dramatic sensitivity to food allergen (34). Mice with the F709 mutation had not only heightened immune sensitization, with both enhanced specific IgE antibodies and Th2 responses, but also increased numbers of intestinal mast cells and the ability to display intense anaphylactic responses upon enteral challenge. It is possible that increased target organ responsiveness to mast cell mediators partially accounts for the increased anaphylactic sensitivity of F709 mice. It has previously been shown that intravenous IL-4 given immediately before anaphylactic challenge results in more intense responses and greater tissue sensitivity to platelet activating factor, histamine, serotonin, and cysteinyl leukotrienes (57, 58).

The requirement for IgE antibodies demonstrated in this food allergy model contrasts with our prior observation that systemic anaphylaxis induced by *i.v.* antigen challenge in mice sensitized by *i.p.* immunization with OVA and alum can occur in the complete absence of IgE (59). In that experimental system, IgG antibodies are sufficient to mediate anaphylactic responses. The data presented here indicate that the response to enteral challenge is IgE dependent and that the presence of IgG responses is insufficient to mediate food anaphylaxis. Using the allergic diarrhea model, Osterfeld and colleagues have previously shown that reactions to food allergens in *parenterally* sensitized mice are IgE dependent (60). However, our data show for the first time that IgE is necessary for the induction of active anaphylaxis to food antigens using exclusively enteral routes for both sensitization as and challenge. In our study, neither IgE<sup>-/-</sup> mice nor F709/IgE<sup>-/-</sup> animals displayed physiologic signs of anaphylaxis upon enteral allergen challenge despite having significant anti-OVA IgG1 titers. This observation suggests that either the amount of absorbed antigen in the gut is insufficient to trigger non-IgE pathways or that mast cells, are preferentially IgE responsive. Our finding provides support for the hypothesis that anti-IgE therapy might block food allergy responses, an issue currently being evaluated in clinical trials. We believe that the F709 mice will be a valuable resource in the investigation of food allergy. We hope that the findings reviewed in this report will seed interesting studies on the mechanisms of food allergy.

## References

1. Sicherer SH, Sampson HA. 9. Food allergy. J Allergy Clin Immunol, 2006; 117:470-475.

2. Eigenmann PA, Beyer K, Wesley Burks A, Lack G, Liacouras CA, Hourihane JO, et al. New visions for food allergy: an iPAC summary and future trends. *Pediatr Allergy Immunol*, 2008; Suppl 19:26-39.
3. Grunig G, Warnock M, Wakil AE, Venkayya R, Brombacher F, Rennick DM, et al. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science*, 1998; 282:2261-2263.
4. Wills-Karp M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunol Rev*, 2004; 202:175-190.
5. Wills-Karp M, Chiaramonte M. Interleukin-13 in asthma. *Curr Opin Pulm Med*, 2003; 9:21-27.
6. Wills-Karp M, Finkelman FD. Untangling the complex web of IL-4- and IL-13-mediated signaling pathways. *Sci Signal*, 2008; 1:pe55.
7. Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science*, 1998; 282:2258-2261.
8. Huang SK, Xiao HQ, Kleine-Tebbe J, Paciotti G, Marsh DG, Lichtenstein LM, et al. IL-13 expression at the sites of allergen challenge in patients with asthma. *J Immunol*, 1995; 155:2688-2694.
9. Gavett SH, O'Hearn DJ, Karp CL, Patel EA, Schofield BH, Finkelman FD, et al. Interleukin-4 receptor blockade prevents airway responses induced by antigen challenge in mice. *Am J Physiol*, 1997; 272:L253-261.
10. Kuperman D, Schofield B, Wills-Karp M, Grusby MJ. Signal transducer and activator of transcription factor 6 (Stat6)-deficient mice are protected from antigen-induced airway hyperresponsiveness and mucus production. *J Exp Med*, 1998; 187:939-948.
11. Munitz A, Brandt EB, Mingler M, Finkelman FD, Rothenberg ME. Distinct roles for IL-13 and IL-4 via IL-13 receptor alpha1 and the type II IL-4 receptor in asthma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008; 105:7240-7245.
12. Zurawski SM, Vega F, Jr., Huyghe B, Zurawski G. Receptors for interleukin-13 and interleukin-4 are complex and share a novel component that functions in signal transduction. *EMBO J*, 1993; 12:2663-2670.
13. Keegan AD, Johnston JA, Tortolani PJ, McReynolds LJ, Kinzer C, O'Shea JJ, et al. Similarities and differences in signal transduction by interleukin 4 and interleukin 13: analysis of Janus kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995; 92:7681-7685.
14. Kelly-Welch AE, Hanson EM, Boothby MR, Keegan AD. Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps. *Science*, 2003; 300:1527-1528.
15. Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers MG, Jr., Glasheen E, et al. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature*, 1995; 377:173-177.
16. Heller NM, Qi X, Junttila IS, Shirey KA, Vogel SN, Paul WE, et al. Type I IL-4Rs selectively activate IRS-2 to induce target gene expression in macrophages. *Sci Signal*, 2008; 1:ra17.
17. Blaeser F, Bryce PJ, Ho N, Raman V, Dedeoglu F, Donaldson DD, et al. Targeted inactivation of the IL-4 receptor alpha chain I4R motif promotes allergic airway inflammation. *J Exp Med*, 2003; 198:1189-1200.
18. Hershey GK, Friedrich MF, Esswein LA, Thomas ML, Chatila TA. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. *N Engl J Med*, 1997; 337:1720-1725.
19. Kruse S, Japha T, Tedner M, Sparholt SH, Forster J, Kuehr J, et al. The polymorphisms S503P and Q576R in the interleukin-4 receptor alpha gene are

- associated with atopy and influence the signal transduction. *Immunology*, 1999; 96:365-371.
20. Finkelman FD, Yang M, Perkins C, Schleifer K, Sproles A, Santeliz J, et al. Suppressive effect of IL-4 on IL-13-induced genes in mouse lung. *J Immunol*, 2005; 174:4630-4638.
  21. Holcomb IN, Kabakoff RC, Chan B, Baker TW, Gurney A, Henzel W, et al. FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *EMBO J*, 2000; 19:4046-4055.
  22. Rosa-Rosa L, Zimmermann N, Bernstein JA, Rothenberg ME, Khurana Hershey GK. The R576 IL-4 receptor alpha allele correlates with asthma severity. *J Allergy Clin Immunol*, 1999; 104:1008-1014.
  23. Graves PE, Kabesch M, Halonen M, Holberg CJ, Baldini M, Fritzsche C, et al. A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children. *J Allergy Clin Immunol*, 2000; 105:506-513.
  24. Ober C, Leavitt SA, Tsalenko A, Howard TD, Hoki DM, Daniel R, et al. Variation in the interleukin 4-receptor alpha gene confers susceptibility to asthma and atopy in ethnically diverse populations. *Am J Hum Genet*, 2000; 66:517-526.
  25. Risma KA, Wang N, Andrews RP, Cunningham CM, Ericksen MB, Bernstein JA, et al. V75R576 IL-4 receptor alpha is associated with allergic asthma and enhanced IL-4 receptor function. *J Immunol*, 2002; 169:1604-1610.
  26. Kabesch M, Tzotcheva I, Carr D, Hofler C, Weiland SK, Fritzsche C, et al. A complete screening of the IL4 gene: novel polymorphisms and their association with asthma and IgE in childhood. *J Allergy Clin Immunol*, 2003; 112:893-898.
  27. Basehore MJ, Howard TD, Lange LA, Moore WC, Hawkins GA, Marshik PL, et al. A comprehensive evaluation of IL4 variants in ethnically diverse populations: association of total serum IgE levels and asthma in white subjects. *J Allergy Clin Immunol*, 2004; 114:80-87.
  28. Chen W, Ericksen MB, Levin LS, Khurana Hershey GK. Functional effect of the R110Q IL13 genetic variant alone and in combination with IL4RA genetic variants. *J Allergy Clin Immunol*, 2004; 114:553-560.
  29. Schedel M, Carr D, Klopp N, Woitsch B, Illig T, Stachel D, et al. A signal transducer and activator of transcription 6 haplotype influences the regulation of serum IgE levels. *J Allergy Clin Immunol*, 2004; 114:1100-1105.
  30. Battle NC, Choudhry S, Tsai HJ, Eng C, Kumar G, Beckman KB, et al. Ethnicity-specific gene-gene interaction between IL-13 and IL-4Ralpha among African Americans with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007; 175:881-887.
  31. Wenzel SE, Balzar S, Ampleford E, Hawkins GA, Busse WW, Calhoun WJ, et al. IL4R alpha mutations are associated with asthma exacerbations and mast cell/IgE expression. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007; 175:570-576.
  32. Kabesch M, Schedel M, Carr D, Woitsch B, Fritzsche C, Weiland SK, et al. IL-4/IL-13 pathway genetics strongly influence serum IgE levels and childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2006; 117:269-274.
  33. Tachdjian R, Al Khatib S, Schwinglshackl A, Kim HS, Chen A, Blasioli J, et al. In vivo regulation of the allergic response by the IL-4 receptor alpha chain immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2010; 125:1128-1136.
  34. Mathias CB, Hobson SA, Garcia-Lloret M, Lawson G, Poddighe D, Freyschmidt EJ, et al. IgE-mediated systemic anaphylaxis and impaired tolerance to food

- antigens in mice with enhanced IL-4 receptor signaling. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2011; 127:795-805.
35. van Wijk F, Hartgring S, Koppelman SJ, Pieters R, Knippels LM. Mixed antibody and T cell responses to peanut and the peanut allergens Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 and Ara h 6 in an oral sensitization model. *Clin Exp Allergy*, 2004; 34:1422-1428.
  36. Li XM, Schofield BH, Huang CK, Kleiner GI, Sampson HA. A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*, 1999; 103:206-214.
  37. Li XM, Serebrisky D, Lee SY, Huang CK, Bardina L, Schofield BH, et al. A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses. *J Allergy Clin Immunol*, 2000; 106:150-158.
  38. Kweon MN, Yamamoto M, Kajiki M, Takahashi I, Kiyono H. Systemically derived large intestinal CD4(+) Th2 cells play a central role in STAT6-mediated allergic diarrhea. *J Clin Invest*, 2000; 106:199-206.
  39. Brandt EB, Strait RT, Hershko D, Wang Q, Muntel EE, Scribner TA, et al. Mast cells are required for experimental oral allergen-induced diarrhea. *J Clin Invest*, 2003; 112:1666-1677.
  40. Sun J, Arias K, Alvarez D, Fattouh R, Walker T, Goncharova S, et al. Impact of CD40 ligand, B cells, and mast cells in peanut-induced anaphylactic responses. *J Immunol*, 2007; 179:6696-6703.
  41. Knight AK, Blazquez AB, Zhang S, Mayer L, Sampson HA, Berin MC. CD4 T cells activated in the mesenteric lymph node mediate gastrointestinal food allergy in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007; 293:G1234-1243.
  42. Proust B, Astier C, Jacquenet S, Ogier V, Magueur E, Roitel O, et al. A single oral sensitization to peanut without adjuvant leads to anaphylaxis in mice. *Int Arch Allergy Immunol*, 2008; 146:212-218.
  43. Khodoun M, Strait R, Orekov T, Hogan S, Karasuyama H, Herbert DR, et al. Peanuts can contribute to anaphylactic shock by activating complement. *J Allergy Clin Immunol*, 2009; 123:342-351.
  44. Ganeshan K, Neilsen CV, Hadsaitong A, Schleimer RP, Luo X, Bryce PJ. Impairing oral tolerance promotes allergy and anaphylaxis: a new murine food allergy model. *J Allergy Clin Immunol*, 2009; 123:231-238.
  45. Shirakawa I, Deichmann KA, Izuhara I, Mao I, Adra CN, Hopkin JM. Atopy and asthma: genetic variants of IL-4 and IL-13 signalling. *Immunol Today*, 2000; 21:60-64.
  46. Chatila TA. Interleukin-4 receptor signaling pathways in asthma pathogenesis. *Trends Mol Med*, 2004; 10:493-499.
  47. Tachdjian R, Mathias C, Al Khatib S, Bryce PJ, Kim HS, Blaeser F, et al. Pathogenicity of a disease-associated human IL-4 receptor allele in experimental asthma. *J Exp Med*, 2009.
  48. Liu X, Beaty TH, Deindl P, Huang SK, Lau S, Sommerfeld C, et al. Associations between specific serum IgE response and 6 variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: the German Multicenter Atopy Study. *J Allergy Clin Immunol*, 2004; 113:489-495.
  49. Zitnik SE, Ruschendorf F, Muller S, Sengler C, Lee YA, Griffioen RW, et al. IL13 variants are associated with total serum IgE and early sensitization to food allergens in children with atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol*, 2009.
  50. Schade RP, Van Ieperen-Van Dijk AG, Van Reijssen FC, Versluis C, Kimpen JL, Knol EF, et al. Differences in antigen-specific T-cell responses between infants

- with atopic dermatitis with and without cow's milk allergy: relevance of TH2 cytokines. *J Allergy Clin Immunol*, 2000; 106:1155-1162.
51. Beyer K, Castro R, Birnbaum A, Benkov K, Pittman N, Sampson HA. Human milk-specific mucosal lymphocytes of the gastrointestinal tract display a TH2 cytokine profile. *J Allergy Clin Immunol*, 2002; 109:707-713.
  52. Morafo V, Srivastava K, Huang CK, Kleiner G, Lee SY, Sampson HA, et al. Genetic susceptibility to food allergy is linked to differential TH2-TH1 responses in C3H/HeJ and BALB/c mice. *J Allergy Clin Immunol*, 2003; 111:1122-1128.
  53. Turcanu V, Maleki SJ, Lack G. Characterization of lymphocyte responses to peanuts in normal children, peanut-allergic children, and allergic children who acquired tolerance to peanuts. *J Clin Invest*, 2003; 111:1065-1072.
  54. Watanabe T, Katsukura H, Shirai Y, Yamori M, Chiba T, Kita T, et al. Helper CD4+ T cells for IgE response to a dietary antigen develop in the liver. *J Allergy Clin Immunol*, 2003; 111:1375-1385.
  55. Tiemessen MM, Van Ieperen-Van Dijk AG, Bruijnzeel-Koomen CA, Garssen J, Knol EF, Van Hoffen E. Cow's milk-specific T-cell reactivity of children with and without persistent cow's milk allergy: key role for IL-10. *J Allergy Clin Immunol*, 2004; 113:932-939.
  56. Scott-Taylor TH, Hourihane JB, Harper J, Strobel S. Patterns of food allergen-specific cytokine production by T lymphocytes of children with multiple allergies. *Clin Exp Allergy*, 2005; 35:1473-1480.
  57. Strait RT, Morris SC, Smiley K, Urban JF, Jr., Finkelman FD. IL-4 exacerbates anaphylaxis. *J Immunol*, 2003; 170:3835-3842.
  58. Strait R, Morrish SC, Finkelman FD. Cytokine enhancement of anaphylaxis. *Novartis Found Symp*, 2004; 257:80-91; discussion -100, 276-85.
  59. Oettgen HC, Martin TR, Wynshaw-Boris A, Deng C, Drazen JM, Leder P. Active anaphylaxis in IgE-deficient mice. *Nature*, 1994; 370:367-370.
  60. Osterfeld H, Ahrens R, Strait R, Finkelman FD, Renauld JC, Hogan SP. Differential roles for the IL-9/IL-9 receptor alpha-chain pathway in systemic and oral antigen-induced anaphylaxis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2010; 125:469-476.

## INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Turkish Journal of Immunology (Türk İmmünoloji Dergisi) (ISSN 1301-109X) accepts original articles, case reports, short communications, invited reviews and editorial papers, on condition that they have not been published elsewhere previously but in abstract form. The editors will consider for publication all suitable papers dealing directly or indirectly with immunology. The editors also encourage submission of book reviews, reports of meetings and correspondences on subjects within the scope of immunology. The official languages of the journal are Turkish and English.

All papers are subject to editorial revision for purpose of conformity to the style adopted by the journal. All rights of reproduction are reserved in respect of all papers published in this journal.

### Submission of manuscripts

All manuscripts must be submitted via the online submission system after logging on to the website [www.turkimmunoloji.dergisi.org](http://www.turkimmunoloji.dergisi.org). Authors who have any queries can contact the following addresses:

Prof. Günnur Deniz

Editor in Chief

İstanbul Üniversitesi, DETAE,

İmmünoloji Anabilim Dalı

Vakıf Gureba Cad. Şehremini, 34393, İstanbul, TÜRKİYE

[gdeniz@istanbul.edu.tr](mailto:gdeniz@istanbul.edu.tr)

Prof. H. Barbaros Oral

Managing Editor

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

İmmünoloji Bilim Dalı

16059 Nilüfer, Bursa, TÜRKİYE

[oralb@uludag.edu.tr](mailto:oralb@uludag.edu.tr)

### Online Submissions

Only online submissions are accepted for quick peer-review and to prevent delay in publication. Manuscripts can be submitted online at [www.turkimmunoloji.dergisi.org](http://www.turkimmunoloji.dergisi.org). The online system consists of four main parts: manuscript submission module (MSM), editorial module, admin module and referee module. The editorial module, admin module and referee module work on the background and will not be open to the enduser. The term module used in this document refers only to the MSM. As part of the peer-review system, authors will also receive the referee reports and can observe the current status of their manuscript(s) online. An online help is also available during the submission process.



<b>Supported formats Supported fonts Supported images Supported formats</b>	<b>Supported fonts</b>	<b>Supported images</b>
.doc or .docx (MS Office for Windows or Macintosh) .rtf (rich text format)	Arial Times Helvetica Times New Roman Courier	.bmp .jpg .jpeg .gif .tif

The module accepts the body of the manuscript as a whole document; thus, documents should be completed as a .doc or .rtf file before submission. The supported file extensions, fonts and other formats are given in Table.

All corresponding authors should be provided a password and an username after providing the information needed. After logging on the article submission system with your own password and username, please read carefully the directions of the system to provide all needed information in order not to delay the processing of the manuscript. Attach the manuscript, all figures, tables and additional documents. Please also attach the coverletter with "Assignment of Copyright and Financial Disclosure" forms, check-list of below mentioned guidelines according to the type of the manuscript. All pages are supported with help menus; if you require additional help or experience a problem, please send an email to [oralb@uludag.edu.tr](mailto:oralb@uludag.edu.tr).

### **Editorial Policies**

All manuscripts will be evaluated by the scientific board for their scientific contribution, originality and content. Authors are responsible for the accuracy of the data. The journal retains the right to make appropriate changes on the grammar and language of the manuscript. When suitable the manuscript will be send to the corresponding author for revision. The manuscript, when published, will become the property of the journal and copyright will be taken out in the name of the journal. Articles previously published in any language will not be considered for publication in the journal. Authors can not submit the manuscript for publication in another journal. All changes in the manuscript will be made after obtaining written permission of the author and the publisher. Full text of all articles can be downloaded at the website of the journal [www.turkimmunoloji.dergisi.org](http://www.turkimmunoloji.dergisi.org)

### **Preparation of Manuscripts**

The "Journal of Immunology" follows the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (International Committee of Medical Journal Editors: Br Med J 1988; 296: 401-5). Upon submission of the manuscript, authors are to indicate the type of trial/research and provide the checklist of the following guidelines when appropriate: Consort statement for randomized controlled trials (Moher D, Schultz KF, Altman D, for the CONSORT Group. The CONSORT statement revised recommendations for improving the quality of reports of parallel group randomized trials. JAMA 2001; 285: 1987-91), the QUOROM statement for meta-analysis and systemic reviews of randomized controlled trials (Moher D, Cook DJ, Eastwood S, Olkin I, Rennie D, Stroup DF. Improving the quality of reports of meta-analyses of randomized controlled trials: the QUOROM statement. Quality of Reporting of Meta-Analyses. Lancet 1999; 354: 1896-900) and the MOOSE guidelines for metaanalysis and systemic reviews of observational studies (Stroup

DF, Berlin JA, Morton SC, et al. Metaanalysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting Meta-analysis of observational Studies in Epidemiology (MOOSE) group. JAMA 2000; 283: 2008-12).

### **Human and Animal Studies**

Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human studies have been reviewed by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in an appropriate version of the 1975 Declaration of Helsinki. It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted.

Reports of animal experiments must state that the "Principles of Laboratory Animal Care" (NIH publication No. 86-23, revised 1985) were followed, as well as specific national laws where applicable. The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above mentioned requirements. The author will be held responsible for false statements or for failure to fulfill the above mentioned requirements.

In a coverletter the authors should state if any of the material in the manuscript is submitted or planned for publication elsewhere in any form including electronic media. The coverletter must contain address, telephone, fax and the e-mail address of the corresponding author.

### **Conflict of Interest**

Authors must indicate whether or not they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. They should also state that they have had full control of all primary data and that they agree to allow the Journal to review their data if requested. Therefore manuscripts should be accompanied by the "Conflict of Interest Disclosure Form." The form can be obtained from the journal webpage ([www.turkimmunoloji.dergisi.org](http://www.turkimmunoloji.dergisi.org)).

### **Copyright**

The author(s) transfer(s) the copyright to his/their article to the Turkish Journal of Immunology effective if and when the article is accepted for publication. The copyright covers the exclusive and unlimited rights to reproduce and distribute the article in any form of reproduction (printing, electronic media or any other form); it also covers translation rights for all languages and countries. For U.S. authors the copyright is transferred to the extent transferable. Manuscripts must be accompanied by the "Copyright Transfer Statement".

### **Manuscript Specifications**

The manuscript, figures and tables, prepared under "Microsoft Office Word program", double spaced on one side of A4 sized page, with margins of at least 25 mm should be submitted. Original articles should not exceed 15 pages including the tables and figures. Brief reports should not exceed 5 pages including one figure and/or maximum two tables.

#### *Title Page*

The first page should include (a) the title of the article in a concise but informative style, (b) first name, middle initial and last name of each author, (c) name of department(s) and institution(s) to which the work should be attributed, (d) name,

address, telephone and fax numbers and e-mail address of the corresponding author, (e) name and address of the author to whom requests for reprints should be addressed, (f) source(s) of support in the form of grants, equipments, drugs, etc.,(g) a short running title of no more than 40 characters.

#### *Abstract*

All manuscripts should be accompanied by a structured abstract. Word limitation is 200 words for original articles and 150 words for brief reports and case reports. The abstract should state the purpose of the study or investigation, basic procedures, methods, main findings, specific data, statistical significance and the principal conclusions.

#### *Key Words*

Below the abstract provide up to 3-6 key words or short phrases using the Medical Subject Headings List of Index Medicus. Do not use abbreviations as key words. The text of an original article should be divided into sections of Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion. Other types of articles such as case reports, reviews and perspectives will be published according to standard formats.

#### *Introduction*

State concisely the purpose and rationale for the study and cite only the most pertinent references as background.

#### *Materials and Methods*

Describe your selection of the observational or experimental subjects clearly. Identify the methods and procedures in sufficient detail to allow other investigators to reproduce the results. Give references to established methods, including statistical methods, brief modified methods, give reasons for using them and evaluate their limitations. Identify all drugs and chemicals used, including generic name(s), dose(s) and route(s) of administration. Describe statistical methods in enough detail to provide a knowledgeable reader without access to the original data to evaluate the reported results. Give details about randomization, describe treatment complications, give number of observations, specify any computer program used. When reporting experiments on human subjects indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation. Do not use patient's name, initials, or registration numbers especially, on any illustrative material.

#### *Results*

Present the detailed findings supported with statistical methods. Figures and tables should supplement, not duplicate the text; presentation of data in either one or the other will suffice. Emphasize only your important observations; do not compare your observations with those of others. Such comparisons and comments are reserved for the discussion section.

#### *Discussion*

State the importance and significance of your findings but do not repeat the details given in the Results section. Limit your opinions to those strictly indicated by the facts in your report. Compare your finding with those of others. No new data are to be presented in this section.

#### *Acknowledgements*

After the discussion section, one or more statements can be made to acknowledge (a) contributions which do not justify authorship, (b) technical help, (c) financial and material support, specifying the nature of the support.

#### *References*

Identify references in text, tables and legends by Arabic numerals in parentheses. Number references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. List all authors and/or organizations. The titles of the journals should be abbreviated according to the style used in Index Medicus. Consult List of Journals Indexed in Index Medicus. Include among the references, papers accepted but not yet published, and those submitted only, too.

#### Examples of references

##### 1. *Journal article:*

Yazıcı H, Akogan G, Yalcin B, Muftuoglu A. The high prevalence of HLA B5 in Behçet's disease. *Clin Exp Immunol*, 1977; 30:259-261.

##### 2. *Journal article, in press:*

Gudelj, L, Deniz G, Rukavina D, Johnson PM, Christmas SE. Expression of functional molecules by human CD3 decidual granular leucocyte clones. *Immunology*, 1996; (in press).

##### 3. *Journal article submitted for publication:*

Akdeniz H, Ozdemirli M, Rodgers O, El-Khatib M, Shirahama T, Ju ST: Modified apoptosis (submitted for publication).

##### 4. *Complete book:*

Mazza J (ed). *Manual of Clinical Hematology*. Boston: Little Brown and Company, 1988.

##### 5. *Chapter of book:*

Lunkens JN. Immune deficiency diseases: Inherited and acquired. In: Lee GR, L, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN, eds. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 9th ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993; 1676-1703.

##### 6. *Abstract:*

Greco C, Gandolfo GM, Alvino S, Cianciulli AM, Venturo I, Lopez M, Vitelli G, Franca AM, Ameglio F: Tumor-associated MGUS (monoclonal gammopathies of uncertain significance): differences in serum levels of IL-6 (interleukin-6) and other markers. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 1993; 408: 1397 (abstract).

##### 7. *Correspondence:*

Ozsoylu S.. Idiopathic thrombocytopenic purpura. *Acta Haematol*, (Basel) 1994; 92:55 (letter).

#### *Tables, figures and pictures*

Tables should be created in your original word-processing software or inserted in the original file from excel or another compatible software. Please ensure the table or figure created complies with the limitations mentioned in Table. Tables created as a picture file are problematic and are not advised. Figures should be embedded in the original file, but the system also requires that they be sent separately. The supported image files are given in Table. Each figure must have an accompanying legend defining abbreviations or symbols found in the figure.

#### *Units of Measurement*

Measurements should be reported in the metric system in terms of the international System of Units (SI), Consult SI Unit Conversion Guide, New England Journal of Medicine Books 1992, when necessary.

#### *Abbreviations and Symbols*

Use standard abbreviations. Avoid abbreviations in the title and abstract. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard abbreviation. Special characters not available on the keyboard can be accessed either from the insert menu (select symbol) or by selecting symbol as a font

from the font window of the formatting toolbar. Please check these characters in your original file and proofs as the softwares tend to replace these characters with others if they are unreadable.

#### *Peer Review*

Manuscripts that have passed an initial screening by the Editors are reviewed by members of the Editorial Board and/or other experts in the field. The Editors select the reviewers and make the final decision on the manuscript. Referees who review a manuscript remain unknown to the authors. Every manuscript is treated by the Editors and reviewers as privileged information, and they are instructed to exclude themselves from review of any manuscript that may involve a conflict of interest or the appearance of such.

#### **Revised Manuscripts**

Following initial peer-review, articles judged worthy of further consideration often require revisions. *Revised manuscript generally must be received within 2 months of the date on the initial decision.* Extensions must be requested from the Associate Editor at least two weeks before the 2-month revision deadline expires. *Otherwise Turkish Journal of Immunology will reject manuscripts which are not received within 2 months of the date on the initial revision decision.*

All reviewers' comments should be addressed and revisions made should be started with page and line of the text. Authors are responsible for the truth of presented data and references. The Editors have the right to withdraw or retract the paper from the scientific literature in case of proven allegations of misconduct.

A Copyright Transfer and Conflict of Interest form, signed by all authors, must also be submitted by fax to +90 224 2954149 or by e-mail (after scanning). Both forms can be found at the website [www.turkimmunoloji.dergisi.org](http://www.turkimmunoloji.dergisi.org).

#### *Proofreading*

Authors of accepted manuscripts will receive electronic page proofs directly from the printer and are responsible for proofreading and checking the entire article, including tables, figures, and references. *Page proofs must be returned within 48 hours* to avoid delays in publication.

#### *English-language editing*

All manuscripts are professionally edited by English language editor before publication.

#### *Online Early*

Turkish Journal of Immunology publishes abstracts of accepted articles online in advance of their publication in a printed issue.

#### *Reprints*

Up to 20 reprints will be supplied to the submitting author, free of charge. Additional reprints may be ordered when the paper is accepted and are subject to fee.

Society and Journal Websites:

[www.turkimmunoloji.org.tr](http://www.turkimmunoloji.org.tr) (Turkish Society of Immunology)

[www.turkimmunoloji.dergisi.org](http://www.turkimmunoloji.dergisi.org) (Turkish Journal of Immunology)

Ø Citation of published manuscripts in Turkish Journal of Immunology should be as follows:

Akkoc T, Arikan C, Ozdemir C, Bahceciler NN, Barlan IB. Mycobacterium Vaccae Immunization to Pregnant Balb/C Mice Downregulated IL-5 Cytokine Levels in Splenocyte Cultures of Offsprings, Turk. J. Immunol. 2002; 7:25-28.

Ø The Journal name should be abbreviated as "Turk J Immunol"

© All rights of the articles published in Turk J Immunol are reserved by the Turkish Society of Immunology.