

TÜBERKÜLOZ ÇALIŞMALARINDA HAYVAN MODELLERİ

Doç. Dr. Murat HÖKELEK

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve
Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun

İnfeksiyon hastalıklarında hayvan modelleri uzun yıllardır kullanılmaktadır. İn vitro çalışmalardan sonraki aşamada, özellikle ilaç etkinliği ve aşı geliştirme amacıyla in vivo deneysel çalışmaların yapılması, faz çalışmalarına geçilmeden önce atlanmaması gereken bir basamaktır. Doğaldır ki bu çalışmalar mutlaka etik sınırlar içerisinde ve etik kurulların denetiminde yapılmalıdır. Diğer infeksiyonlar gibi tüberküloz için de denenmiş ve uygulamaya girmiş bazı modeller bulunmaktadır.

Bu modellerden bazıları aşı çalışmaları için geliştirilmiş, bazıları ise tedavi çalışmalarında kullanılmıştır. Modellerde en sık kullanılan hayvan faredir. Bunun dışında Guinea pig, rat, tavşan, sığır, koyun da model oluşturmada kullanılan diğer deney hayvanlarıdır.

Tüberküloz Araştırmalarında Fare Modelleri

İlaç çalışmaları:

Özellikle yeni antimikobakteryel tedavi geliştirme çalışmalarında en çok uygulanan modeller fare kullanılarak oluşturulmaktadır. Bunların en büyük

avantajı parasal açıdan fazla yük getirmeyen ve geliştirilmeye uygun modeller olmalarıdır. Bununla birlikte bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Düzey 3 biyogüvenlik kurallarına sürekli uyma zorunluluğu, personelin virulan tüberküloz suşları ile çalışabilme açısından iyi eğitilmiş olma gereği, bunların yanında kemirgenler ve insanlar arasındaki ilaç farmakokinetiği farklılığı potansiyel sorunlar arasında sayılabilir. Ancak genellikle bölünmüş dozlarla insana uygun ilaç düzeyi ayarlanabilmektedir.

Yüksek doz intravenöz *Mycobacterium tuberculosis* basili verilen fare modelinde inokulumun çoğu dalak ve karaciğerdeki fagositler tarafından alınır, yalnızca % 1-2' si akciğerlerde bulunabilir. İnfeksiyon 10-15 gün içinde dalakta ilerler ve gelişir, akut immünite oluşumu sonrası kronik hale geçer. İlaç çalışmalarında doz, ya inokulasyondan hemen sonra, ya da kronik infeksiyon aşamasına gelindiğinde verilebilir. Ancak hastadaki infeksiyon süreci düşünüldüğünde ikinci seçenek daha makul görünmektedir.

Bir diğer yaklaşımsa, izoniazid, pirazinamid ve rifampin gibi standart tedavilerin yanında, ilaç dozlarının azaltılıp çoğaltılması ve yeni antimikobakteryel ilaçların bunların yerlerine konarak denenmesidir. Bu tedavi modelinde yapılan kültürlerde artık basil

görülmeyene kadar ilaca devam edilir. Sonrasında basil kalmışsa yeniden çoğalıp çoğalmadığını anlamak için farelere kortikosteroid verilir. Bu model Cornell modeli olarak bilinmektedir. Bütün bu yaklaşımlarda, gavajla uzun süren oral ilaç alımı nedeniyle ilaç verme işlemi ustalıklı ve yavaşça yapılmalıdır. Böylece farelerin dayanıklılığı artmaktadır.

Başka bir fare modelinde 'aerosol kamerası' denen özel bir cihazla çok düşük sayıda basil içeren inokulum ile deneysel infeksiyon oluşturulabilmiştir. Bu modelde 50 basilin alınmasını izleyen yirminci günde tüberkülozun geliştiği belirlenmiştir. Bu süre içerisinde Erdman (TMCC 107) gibi düşük virülansı olan suşlarda 4-5 log, CSU93 ve W strain gibi virülan suşlarda 6-7 log gibi bir çoğalma izlenmiştir.

M. tuberculosis' ten başka, özellikle HIV ile bağlantılı tüberküloza karşı ilaç çalışmalarında *M. avium* kompleksini oluşturan basiller de kullanılmaktadır. Bu modellerde bej fare olarak adlandırılan (C57BL/6J bg/bg) suş çok uygundur. Farelerde Naturel Killer hücre eksikliği bulunmaktadır ve AIDS hastalarına benzer bir tabloya sahiptir. Aynı cinsiyetten 5-7 haftalık hayvanlar alınır ve deneyde kullanılmadan 1 hafta önce klimatizasyon için ayrı bir bölümde barındırılırlar. İnokulasyon intraperitoneal, intranasal, oral, intratekal veya intravenöz olarak verilebilir. Kemoterapötik ajanların etkinliğinin araştırıldığı çalışmalarda en çok tercih edilen yol kuyruk veninden İV verilmesidir. Her bir fareye 0,2 ml hacimde 10^7 cfu basil verilmesi uygundur. Öncesinde kuyruk 2-3 dakika süreyle ılık suda bekletilmeli ve

vazodilatasyon sağlanmalıdır. Kullanılacak olan ilaçlarla tedaviye inokulasyon sonrası 7.gün başlanır, 4 hafta ya da daha fazla devam edilir. Deneyin tamamlanmasından 2 gün sonra hayvanlar CO₂ inhalasyonu ile sakrifiye edilirler. Dalakları çıkarılır, homojenize edildikten sonra besiyerlerine ekim yapılır. 2-3 haftalık inkübasyon sonunda hücre ya da varsa basiller sayılarak ilaçların etkinliği karşılaştırılır.

Aşı çalışmaları:

Tüberkülozda aşı çalışmaları 1950' li ve 60' lı yıllarda başlamıştır ve yoğun bir şekilde günümüzde de devam etmektedir. Bu tür çalışmalarda kullanılan hayvan modelleri aşının yapısı, veriliş yolu, dozu, etkinliğinin ölçülmesi, kullanılan hayvan türleri gibi birçok açıdan değişiklik göstermektedir. Genellikle deneysel aşı çalışmalarında kullanılan toplam 5 aşı türü vardır. Bunlarda ikisi canlı (BCG ve *M.avium*), üçü ölü (H37Rv suşundan hazırlanan) aşılarıdır. Veriliş yolları intradermaldir. İnfeksiyon oluşturmada Aerosol Kamara yöntemi kullanılır. Primer lezyonun akciğerde oluşması için her hayvana 3-5 cfu virulan basil suşlarından verilmesi yeterlidir. Cevabın değerlendirilmesi ise aşının kandaki basil oranını inhibe edip etmediğinin belirlenmesiyle ölçülür. Aşı çalışmalarında "gene knockout" fareler uygun suşlardır. Ancak guinea-pig ve tavşanlar da zaman zaman kullanılmaktadır. Özellikle guinea-pigler tüberküloza çok hassas hayvanlardır. Son yıllarda rekombinant DNA aşıları üzerinde deneysel çalışmalar yoğunlaşmıştır.

Sonuç olarak deneysel hayvan modelleri tüm infeksiyon hastalıklarında

olduğu gibi, tüberküloz için de önemini korumaktadır. Özellikle direnç sorunu karşısında yeni ilaçların etkinliğinin belirlenmesinde alternatif modellerin geliştirilmesi gereksinimi ortaya çıkmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Alvarez-Freites EJ, Carter JL, Cynamon MH. In vitro and in vivo activities of gatifloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46:1022-5.
2. Andersen P, Andersen AB, Sorensen AE, Nagni S: Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol* 1995; 154:3359,
3. Baldwin S, et al: Evaluation of new vaccines against tuberculosis in the mouse and guinea pig model. *Infect Immun* 1998; 66:2951.
4. Bancroft GJ, Schreiber RD, Unanue ER: Natural immunity: A T-cell independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse. *Immunol Rev* 1991; 124:5.
5. Bange FC, Brown AM, Jacobs WR: Leucine auxotrophy restricts growth of *Mycobacterium bovis* BCG in macrophages. *Infect Immun* 1996; 64:1794.
6. Harth G, Horwitz MA. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase as a novel antibiotic strategy against tuberculosis: demonstration of efficacy in vivo. *Infect Immun* 2003; 71:456-64.
7. Hubbard RD, Flory CM, Collins FM: Immunization of mice with mycobacterial culture filtrate proteins. *Clin Exp Immunol* 1992; 87:92.
8. Huygen K, Content J, Denis O, et al: Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nat Med* 1996; 2:893.
9. Kaur D, Khuller GK. In vitro, ex-vivo and in vivo activities of ethambutol and sparfloxacin alone and in combination against mycobacteria. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 17:51-5.
10. Lenaerts AJ, Gruppo V, Brooks JV, Orme IM. Rapid in vivo screening of experimental drugs for tuberculosis using gamma interferon gene-disrupted mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:783-5.
11. Lenaerts AM, Chase SE, Cynamon MH. Evaluation of rifalazil in a combination treatment regimen as an alternative to isoniazid-rifampin therapy in a mouse tuberculosis model. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:3167-8.
12. Tomioka H, Sato K, Shimizu T, Sano C. Anti-*Mycobacterium tuberculosis* activities of new fluoroquinolones in combination with other antituberculous drugs. *J Infect* 2002; 44:160-5.
13. Yoshimatsu T, Nuermberger E, Tyagi S, Chaisson R, Bishai W, Grosset J. Bactericidal activity of increasing daily and weekly doses of moxifloxacin in murine tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:1875-9.
14. Zak O, Sande M. *Handbook of Animal Models of Infection*. Avon: Academic Press, 1999.