

DERLEME

Deney Hayvanları Araştırmalarında Standardizasyonun Yeri ve Önemi: Geleneksel Derleme

Aslı ÇELİK¹, Nazan BAKSİ², Mehmet Ensari GÜNELİ³

¹ Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu ve Tıp Fakültesi Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarı, İzmir.

² Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Laboratuvar Hayvanları Anabilim Dalı ve Sağlık Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi, Diyarbakır.

³ Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Tıp Fakültesi Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı, İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi, İzmir.

ÖZET

Preklinik çalışmalar, tıp bilimlerinin farklı disiplinlerdeki birçok araştırmanın temelini oluşturmaktadır. Bu çalışmaların önemli bir bölümünde yer alan deney hayvanları; biyolojik, fizyolojik ve patolojik mekanizmaları anlamak, sistem yanıtlarını incelemek ve türler arasındaki ilişkileri ortaya çıkarmak için kullanılan canlı organizmalardır. Deney hayvanları araştırmalarında standardizasyon, deneysel bulgulara etki eden biyolojik ve çevresel faktörlerin benzer olmasını ifade eder. Böylece, benzer araştırma prosedürleri sabit koşullarda bir başka laboratuvarda uygulandığında, eşdeğer ve birbirini ile karşılaştırılabilir sonuçların alınması sağlanır. Standardizasyonu etkileyen öncelikli faktörler, deney içi ve deneyler arası varyasyonların bütünü olarak değerlendirilmektedir. Bu varyasyon kaynakları ile deneyler etkilenir ve farklı bulguların ortaya çıkmasına sebep olur. Standardizasyonun asıl amacı, deneydeki varyasyonları azaltmaktır. Varyasyonların azaltılması istatistiksel olarak çalışmalarda kullanılan hayvan sayısının azaltılmasını ve hayvan refahının artmasını sağlar. Ayrıca, varyasyonların azaltılması zaman ve para israfını da önler. Standardize deneyler; tekrar edilebilirliğe, laboratuvarlar arası karşılaştırılabilirliğe ve bilimsel güvenilirliğe olanak sağlar. Araştırmanın hipotezine uygun deneysel süreç yönetiminin planlanması, prosedürlerdeki yanlılığın en aza indirilmesi, eğer varsa araştırmaya uygulanan iyileştirme tekniklerinin belirtilmesi bilimsel araştırmaların kalitesini artırır. Deney hayvanları araştırmalarında deneysel tasarımdan itibaren uygulanan standardizasyon ile nitelikli araştırmalar artar, bilimsel ilerlemeye katkı sağlar. Dolayısıyla bu derlemenin amacı, güncel paradigmlar ışığında hayvan deneylerinin standartlaştırılmasında, kullanılan deney hayvanlarının çevre, barınma, beslenme koşullarının ve uygulanan deneysel yöntemlerin sabit tutulması ile kontrol altına alınmasının önemini vurgulamak, bu konuda farkındalık yaratmak ve standardize olan ya da olmayan deneylerin hayvan refahı ve araştırma sonuçları üzerindeki etkilerini ortaya koymaktır.

Anahtar Kelimeler: Hayvan Araştırmaları. Standardizasyon. Laboratuvar Hayvanları Bilimi.

The Role and Importance of Standardization in Experiment Animals Research: Traditional Review

ABSTRACT

Preclinical studies form the basis of many research types in different medical sciences disciplines. Experimental animals are an important part of these studies; They are living model organisms used to understand biological, physiological, and pathological mechanisms, examine system responses, and reveal their relationships. Standardization of experimental animal research refers to keeping biological and environmental factors constant that may affect experimental findings. Thus, equivalent and comparable results are obtained when similar procedures are applied in another laboratory under the same constant conditions. The primary factors affecting standardization are the sum of the intra-experimental and inter-experimental variations. Experiments are affected by these sources of variation and lead to different findings. The main purpose of standardization is to reduce variations in the experiment. Reducing variations statistically minimizes the number of animals used in studies and increases animal welfare. In addition, lowering variations prevents wasted time and money. Standardized experiments enable repeatability, interlaboratory comparability, and scientific reliability. Planning the experimental process management under the research hypothesis, minimizing the bias in the procedures, and specifying the improvement techniques applied to the research, if any, increase the quality of scientific research. With the standardization applied since the experimental design in experimental animal research, qualified research increases and contributes to scientific progress. Therefore, this review aims to emphasize the importance of controlling the environment, housing, feeding conditions, and experimental methods used in the standardization of animal experiments in the light of current paradigms, to raise awareness on this issue, to determine the effects of standardized or non-standardized experiments on animal welfare and research results reveal its effects.

Keywords: Animal Research. Standardization. Laboratory Animal Science.

Geliş Tarihi: 08.Aralık.2022
Kabul Tarihi: 05.Nisan.2023

Dr. Aslı ÇELİK
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi,

Multidisipliner Deney Hayvanları
Laboratuvarı
İncialtı, İzmir
Tel: 0232 412 46 61
E-posta: asli.celik@deu.edu.tr

Yazarların ORCID Bilgileri:
Aslı ÇELİK: 0000-0002-2888-6080
Nazan BAKSİ: 0000-0002-2758-913X
Mehmet Ensari GÜNELİ: 0000-0002-0505-9824

Preklinik çalışmalar, insanlar ve hayvanlarda klinik öncesi yapılan araştırmalardır. Preklinik çalışma basamaklarından en önemlisi deney hayvanları ile yapılan in vivo araştırmalardır. Deney hayvanları laboratuvar koşulları olsun ya da olmasın, doğada bulunan tüm türleri içeren bir adlandırmadır^{1,2}. Laboratuvar hayvanları ise, laboratuvar koşullarında belirli amaçlar doğrultusunda araştırma veya eğitim için üretilen/kullanılan herhangi bir omurgalı (kemirgenler, primatlar, etçil hayvanlar, otçul hayvanlar ve sucul türler gibi) ve/veya omurgasız hayvanlar olarak tanımlanırlar. Deney hayvanları araştırmalarını içeren literatürlerde genellikle “deney hayvanları” olarak belirtilse de, çalışmalarda kullanılan hayvanların çoğunluğu “laboratuvar hayvanları”dır³. Araştırmalarda kullanılan hayvanların, biyolojik, çevresel ve deneysel koşullarının sabit tutulması ve varyasyonların kontrollünün sağlanması önemli kriterler arasındadır. Bu kriterler deney hayvanları araştırmalarında standardizasyonun temelini oluşturur. Bu derlemenin kapsamı deney hayvanlarında standardizasyonun önemini vurgulamak ve farkındalık oluşturmaya çalışmaktır.

Deney Hayvanları Araştırmalarında Standardizasyon Refah İlişkisi-3R Kuralı

Deney hayvanları araştırmalarında 3R kuralı Russell ve Burch tarafından 1959 yılında ortaya konulmuştur. Birinci R: *Replacement*: Yerine koymak (alternatif metotları seçmek), İkinci R: *Reduction*: Hayvan sayısını azaltmak, Üçüncü R: *Refinement*: Koşulları iyileştirmek (hayvan refahını gözetmek) 3R kuralını oluşturmaktadır. Birinci R kuralı ile deney hayvanları araştırmalarda alternatif yöntem sorgulanır ve alternatifini yok ise filogenetik sıralamada en alt düzeydeki laboratuvar hayvanları kullanılır. İkinci R kuralı ise istatistiksel güç analizleri ve uygun hayvan seçimi ile en az sayıda hayvan kullanım ilkesi sağlar. Ayrıca laboratuvar hayvanlarının cinsiyet, genetik, ağırlık gibi bazı özellikleri yönünden birörnek (homojen) olacak şekilde grupların oluşturulması hem hayvan sayısını hem de deney sonuçlarındaki varyasyonları azaltır. Çalışmaların standardizasyonunda belirleyici önemli bir unsur olan Üçüncü R kuralına göre ise; araştırmalarda kullanılan deney hayvanlarının refahı üst düzeyde tutulur. Bu amaçla makroçevre (deney hayvanını direkt etkilemeyen yaşam alanı özellikleri, barınma odası gibi) ve mikroçevre (deney hayvanı ile temas eden ve direk etkileyen faktörler, kafes içi gibi) koşullarının iyileştirilmesi, bakım standartlarının artırılması gerekir. Bu sayede nitelikli deney hayvanı ve deneysel çalışmalar ortaya çıkar⁴. Sonuç olarak deney hayvanları araştırmalarında standardizasyon yapılabilmesi için hayvan refahının artırılması, hayvan ile ilişkili konularda standartların belirtilmesi ve prosedürlerin 3R kuralı çerçevesinde ortaya konulması gerekir.

Standardizasyon Kavramları

Deney hayvanları araştırmalarında standardizasyon, deneysel bulgulara etki eden biyolojik, çevresel ve deneysel faktörlerin benzer/birörnek olmasını ifade eder. Standardizasyonun amacı deneyler tekrarlandığında yakın veriler elde edilmesidir. Verilerin yakın olması bilimsel açıdan sonuçlara olan güveni artırır. Bu nedenle benzer koşullar/faktörler ile araştırmalarda standardizasyon sağlanır. Araştırma standardizasyonu için deneylerde kullanılan *laboratuvar hayvanlarının da standardizasyonu* gereklidir. Laboratuvar hayvanlarının standardizasyonunda genotip ve fenotip yönünden birörnek olmasına tam standardizasyon denir. Tam standardizasyon tanımına örnek; tek yumurta ikizleri, üçüzleri ve klonlanmış hayvan gruplarıdır. Bu hayvan grupları ile yapılan araştırmalarda güvenilirlik oldukça yüksek düzeyde olup, tekrar edilmeyi en aza indirir. Ancak bu çalışmalardan elde edilen veriler doğaya genelleme yapılamayacağı için genellikle araştırmalarda tercih edilmemektedir. Laboratuvar hayvanlarının vücut ağırlığı, yaşı, altsoyu, cinsiyeti gibi bazı özellikleri yönünden birörnek olmasına ise kısmi standardizasyon denir. Çalışmaların bilimsel sonuçları kısmi standardizasyon aracılığıyla oluşturulan hayvan gruplarında yapıldığında daha genellenebilir ve güvenilirdir denebilir. Bu amaçla deney hayvanları araştırmalarında genotip, fenotip ve mikrobiyolojik konuları açısından tanımlanmış hayvanlar kullanılarak, araştırmanın standardizasyon niteliği güçlendirilir. Tam veya kısmi standardizasyon terimleri daha çok hayvanların standardizasyonunu ifade etmektedir^{5,6}. Deney hayvanları araştırmalarında zaman ve mekân fark etmeksizin karşılaştırılabilir, genellenebilir ve tutarlı bulgular elde edilmesi yalnızca hayvanların standardizasyonu ile değil aynı zamanda biyolojik, çevresel ve deneysel faktörlerin de standardizasyonu ile mümkündür. Bu faktörleri kapsayan terimler “deneyler arası” ve “deney içi” varyasyonlar ve varyasyonların kaynaklarıdır. Bu nedenle mevcut derlemede tam ve kısmi standardizasyon terimleri yerine “deneyler arası” ve “deney içi” varyasyonların standardizasyonundan bahsedilecektir. Bu varyasyonlar araştırmaların altyapısını oluşturur. Bu nedenler varyasyonlar ve varyasyon kaynakları araştırma sonuçlarının belirleyicisi olur. Deney hayvanları araştırmalarında standardizasyonunun artırılması için deneyler arası ve deney içi varyasyonları ve varyasyon kaynaklarının belirtilmesi hususlarına daha çok vurgu yapılacaktır⁷.

Standardizasyon ve Deneyler Arası/ Deney İçi Varyasyonlar

Araştırma standardizasyonu deneyler arası ve deney(ler) içi varyasyonlardan öncelikli olarak etkilenir⁸. Deneyler arası varyasyon, bağımsız olarak farklı zaman dilimlerinde, aynı veya farklı

DeneySEL Hayvan Araştırmalarında Standardizasyon

laboratuvarlarda araştırmalar gerçekleştirildiğinde elde edilen veriler arasındaki uyum derecesini ifade etmektedir. Sonuçlar arasındaki uyum ne kadar yakınsa araştırmaların tekrarlanabilirliği ve güvenilirliği o kadar yüksek olmaktadır⁹. Deney içi varyasyon ise her bir hayvandan/hayvan gruplarından elde edilen verilerin araştırma sonucundaki farklılıklarına denir. Deney içi varyasyonların azaltılması için çevrenin önemli özellikleri saptanır ve bunların deney süresince sabit tutulması amaçlanır. Bağımsız değişken (etkileyen faktör) dışında varyasyon kaynağı olmaması ve araştırmadaki her hayvana aynı prosedürlerin uygulanması deney içi varyasyonu azaltır, araştırma standardizasyonunu artırır¹⁰. Araştırma standardizasyonu sadece hayvan refahının değil, aynı zamanda istatistiksel olarak hayvan sayısının da azalmasına, zaman tasarrufuna, araştırma maliyetinin azalmasına ve deneyler arası karşılaştırılabilir olması olarak saĐlar⁷. Araştırmaların standardizasyonu için varyasyonların sabit tutulmasının yanı sıra, deneyler arası ve deney içi varyasyon kaynaklarını daha çok irdelemek gerekmektedir. Deney içi varyasyonlar ve çevresel faktörler araştırmaların bağımsız değişkenlerinin etkilendiği faktörlerdir. Araştırmaların bağımlı değişkenleri (etkilenen faktör) bağımsız değişkenlerine farklı düzeyde etki etmesi ile beklenen bulgulardan farklı çıkmaktadır. Deney hayvanları araştırma sonuçlarının bu farklılıkları deneyler arası varyasyon kaynağına neden olmakta ve araştırmaların güvenilirlik, tekrarlanabilirlik, geçerlilik gibi önemli kavramlarını etkilemektedir^{11,12}.

Standardizasyonu Etkileyen Varyasyon Kaynakları

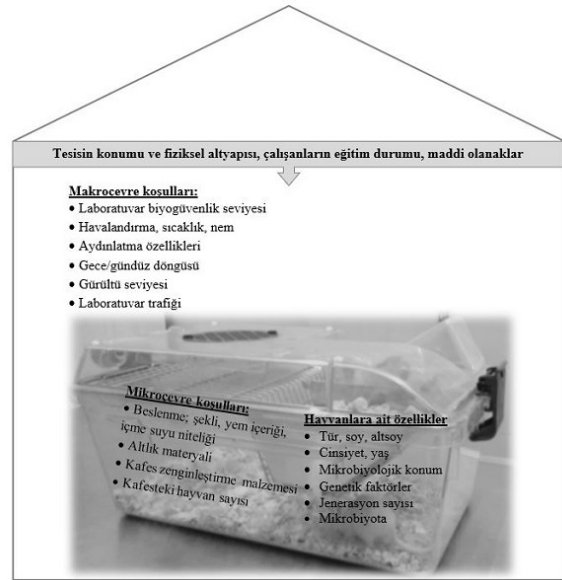
Deney hayvanları araştırmaları hipotezden itibaren bilimsel katkı sürecini tamamlayana kadar birçok basamaktan geçer. Bu süreçte deneyler arası ve deney içi varyasyonlar, varyasyon kaynaklarını oluşturur. Genel anlamda varyasyon kaynakları araştırmalarda yer alan koşullardır. Hayvan deneylerinin planlamasında varyasyonları azaltmak ve standardizasyonu sağlamak için varyasyon kaynaklarının kapsamlı bir şekilde belirtilmesi gerekmektedir. Bu hususta *The ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments)* gibi önemli bir rehber yayınlanmıřtır³. Ayrıca, Omary MB ve arkadaşlarının 2016 yılında yayınladığı “Tüm fareler aynı değildir: Hayvan araştırma verilerinin sunumunun standardizasyonu” başlıklı makalenin içeriğinde, standardizasyon kapsamı daha da daraltılmış ve etkili temel koşullar belirtilmiřtir¹³. Bu koşullar daha çok laboratuvar hayvanlarının fenotip, genotip ile beslenme şekilleri ve makro/mikro çevrelerini içeren bilgiler olup, daha nesnel bir yaklaşım sunmuşlardır. Örneğin laboratuvar hayvanlarının mikroçevresindeki bir faktör olan beslenme şekli ile ilgili “standart yem ve içme suyuna

ad-libitum (serbestçe yeme ulaşma) olarak erişimi sağlandı” şeklinde yüzeysel tanımlar standardizasyonda farklı varyasyon kaynağı oluşturmaktadır. Hayvanların farklı besleme tiplerinin sonuçları etkileyebileceği düşünüldüğünde, eksik beslenme bilgisi nedeniyle araştırmaların tekrarlanabilirliği tehlikeye atılmaktadır. Bunun önüne geçmek için yemin markası, üretici firma bilgisi ve su kalitesinin içeriği açıkça ifade edilmelidir¹⁴. Deney hayvanları tesisin yapılanması, yerleşim yeri/fiziksel altyapı, yönetim şekli, çalışanların eğitim durumu ve maddi imkanlar araştırmaların temelini oluşturan kriterlerdir. Ayrıca aşağıda belirtilen makroevre/mikroçevre koşulları ve hayvanlara ait özellikler de araştırmaların sonuçlarını etkileyen varyasyon kaynaklarıdır.

Makroevre koşulları: Laboratuvarın biyogüvenlik seviyesi, iklimlendirme koşulları (havalandırma, sıcaklık, nem), aydınlatma özellikleri, gece/gündüz döngüsü, gürültü seviyesi, laboratuvar trafiği ve personellerin/araştırmacıların niteliğidir.

Mikroçevre koşulları: Hayvanların beslenme şekli, yemlerin içeriği, suyun niteliği, altlık materyali ve değişimi, kafes zenginleştirme malzemesi, kafesteki hayvan sayısı ve hayvanların bireysel özellikleridir.

Hayvanlara ait özellikler: Tür, soy, altsoy, yaş, cinsiyet, mikrobiyolojik konumu, genetik faktörler, jenerasyon sayısı ve mikrobiyota alt başlıkları araştırmaların varyasyon kaynakları olduğu için, araştırmalarda detaylı olarak belirtilmelidir¹³ (şekil 1).



şekil 1:

Laboratuvar hayvanları ile ilgili çalışmalar için dikkate alınması ve vurgulanması gereken temel unsurlar. Deney hayvanları araştırmaları planlarken ve çalışmaları yayına gönderirken göz önünde bulundurulması gereken birkaç önemli kriteri gösterir.

Standardizasyonu Etkileyen Varyasyonların Önemi

Deneyler arasında farklı bulguların ortaya çıkması deney içi varyasyonun önemini ortaya koymaktadır¹⁵. "Tekrarlanabilirlik", karşılaştırmalı olarak, aynı araştırma sorusunda benzer sonuçlara varmak için, örneğin farklı bir zamanda ve/veya farklı bir laboratuvarında, sonuçlarının tekrarlanmasıyla ilgilidir^{10,16}. Son zamanlardaki ortaya konulan fikirler tekrarlanabilirliği üç temel kategoride ele almaktadır; yöntem, sonuç ve yapılan yorumların tekrarlanabilirliği kavramları bu bağlamda ayrı ayrı incelenmesi gereken terimlerdir¹⁷. Bu terimlerin var olmasının en önemli amacı, tekrarlanabilirliğin istatistiksel olarak genellenabilir olmasıdır. Bu sayede bilimsel genelleştirme sağlanabilmektedir¹⁸. Örneğin birbirinden bağımsız üç farklı laboratuvarlarda, farklı cinsiyetlerdeki sekiz fare altsoyunun üzerinde aynı malzemeler ve test prosedürleri uygulanmış olmasına rağmen, bu fareler arasında davranış farklılıklarında çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Yazarlar, laboratuvarların ortamındaki küçük farklılıkların, genotipin davranış üzerindeki etkileri sebebiyle kendine özgü sonuçlara yol açtığı sonucuna varmışlardır. Aynı zamanda bu farklılıkların araştırmacılar arasındaki farklılıklardan kaynaklandığını da ileri sürmüşlerdir¹⁹. Başka bir çalışmada ise araştırmacılar, farklı laboratuvarlarda aynı zamanda ve aynı laboratuvarında birkaç hafta arayla farklı zaman dilimlerinde standartlaştırılmış bir deney tasarımı uygulamışlardır. Farklı laboratuvarlarda yapılan deneylerin sonuçlarının tekrarlanabilirliği düşük iken, aynı laboratuvarında farklı zaman periyodunda yaptıkları standart deneylerde ise tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğunu saptamışlardır¹⁶. Deneylerde uygulanan homojenizasyon/heterojenizasyon koşulları deneyler arası varyasyonların ortaya çıkmasına neden olur. Bu koşullar çalışma sonuçlarını etkileyerek, bilimsel çıktılarda tekrarlanabilirliği azaltır. Sonuç olarak deney içi varyasyonların oluşması deneyler arası varyasyonlara neden olur.

Standardizasyonda Homojenizasyon (Benzerlik) /Heterojenizasyon (Farklılık) Kavramları

Homojenizasyon (benzerlik), in vivo araştırmalarda, hayvan özelliklerinin (genotip, fenotip, davranış gibi) ve çevre koşullarının (barınma, test vb.) bir örnek olmasını ifade eder. Homojenizasyon teknik tekrarların ölçüm hatasını azaltmak ve dolayısıyla çalışma sonuçlarının hem iç hem de dış geçerliliğini geliştirmek için etkili bir önlemdir. Homojenizasyon ile araştırmaların standardizasyonunun sağlandığı ve varyasyon kaynaklarının en aza indirildiği düşünülmektedir. Böylelikle hayvan sayısının azaltılmasına da olanak sağlamaktadır¹⁰. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise deney hayvanları araştırmalarında heterojenizasyon (farklılık) ile

çalışmaların zenginleştirilebileceği ifade edilmektedir. Böylelikle deney hayvanları araştırmalarının kontrollü heterojenizasyonu (sistemik heterojenizasyon) ile deneylerin tekrarlanabilirliğini azaltabileceği fikri de öne sürülmüştür¹⁵. Bu görüşe rağmen hem genetik hem de çevresel faktörler de dahil edilerek sistemik heterojenizasyon çalışma tasarımlarının deney içi karmaşıklığı arttırdığı bilinmektedir. Bundan dolayı analiz yöntemlerinin daha karmaşık hale geleceği düşüncesi de ifade edilmiştir. Ayrıca örneklem boyutunun ve maliyet girdilerinin artması ile birçok bilinmeyenle karşı karşıya kalan araştırmaların, sistemik heterojenizasyonun araştırma teşvikini azaltacağı düşünülmektedir^{8,12}. 2010 yılında Richter ve arkadaşlarının sistemik heterojenizasyon ile ilgili ortaya koyduğu sonuçların geçerliliği⁸; 2013 yılında Jonker RM ve arkadaşları tarafından araştırılmış, ancak homojenizasyon ve heterojenizasyon arasında tekrarlanabilirlik açısından saptanabilir bir fark olmadığını göstermişlerdir. Tekrarlanabilirlik için heterojenizasyonun faydalarını doğrulayan daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu belirtmişlerdir²⁰. Deneysel tasarımlarda heterojenizasyona dikkat edildiğinde fenotipik varyasyonun daha fazla olduğu ve çalışma sonuçlarının güvenilirliğinin daha düşük olduğu ifade edilmektedir²¹.

Standardizasyonda Barındırmanın Önemi

Deney hayvanları araştırmalarının standardizasyonu için çevresel faktörler oldukça önemli olup, laboratuvar hayvanları tesis tasarımına ve işleyişine dikkat edilmesi gerekir. Her laboratuvar hayvanın normal gelişim ve davranışlar sergileyebilmesi için doğal ortama en yakın laboratuvar koşullarında barındırılması gerekir. Laboratuvarlar, hayvanların doğal ortamlara uyum sağlayabilmesi açısından türe özgü mikro ve makro çevre standartları, mevzuat talimatlarına ve rehberlere göre düzenlenir^{22,23}. Laboratuvar hayvanlarında sosyal etkileşimi ve lokomotor (fiziksel-nörolojik) aktiviteyi artırmak için kafesin içerisine zenginleştirilmiş nesnelere (tırmanma ve tünel açma düzenekleri gibi) konmaktadır. Çevresel zenginleştirme deneysel bir değişken olup, uygun tanımlamanın yapılmasını gerektirir²⁴. Bunun yanı sıra hayvanların beslenme şekilleri de hayvanların fizyolojik ihtiyaçları karşılayacak şekilde besin içeriği türe özgü yemlerle *ad-libitum* olarak yapılır. Laboratuvar hayvanlarının refah düzeylerinin yüksek olması için, gerek tesis mimarisi gerekse iş akışları açısından mevzuatlarda/rehberlerde belirtildiği gibi düzenlenmelidir¹.

Standardizasyonda Mikrobiyolojik Konumun Yeri

Araştırmalarda kullanılacak hayvanların mikrobiyolojik konumları önemli olup, buna göre beslenme, bakım ve barınma koşullarının standardizasyonu sağlanır. Deney hayvanları araştırmalarında biyolojik ajanlar ve/veya toksinler ile

Deneyel Hayvan Araştırmalarında Standardizasyon

İlgili çalışmaların yürütülebilmesi için hayvan biyogüvenlik laboratuvarları (*animal biosafety level-ABSL*) kullanılır. ABSL; standart mikrobiyolojik uygulamalar, özel uygulamalar, güvenlik ekipmanları, havalandırma ve basınç farkları göz önünde bulundurularak belirlenen seviyeye uygun olarak tasarlanır. alışan, evre ve toplum sağlığı yönünden biyolojik ajanların risk değerlendirmesine göre ABSL'de biyogüvenlik seviyeleri belirlenir. Bu laboratuvarlar ABSL-1/2/3/4 olarak dört farklı seviyede sınıflandırılmaktadır. Fiziksel bariyerler laboratuvarın seviyesine göre düzenlenir. Laboratuvarların gereken bölümlerinde zorunlu akreditasyon koşulları (laboratuvar işleyişi) ilgili mevzuat ve rehberler işığında ABSL seviyesine uygun şekilde sağlanır^{1,22,23,25}. Böylece mikrobiyolojik açıdan tanımlanmış laboratuvar hayvanları üretilebilir/kullanılabilir. Hiçbir mikroorganizma taşımayan aksenik (*germfree*), patojenlerden ari (gnotobiyotik), özel patojenlerden arındırılmış (*specific pathogen free- SPF*) hayvanlar mikrobiyolojik tanımlanmış hayvanlara rnektir^{1,23,25,26}. Özel olarak üretilen bu hayvanların mikrobiyolojik konumu ile hastalıklarının (viral, bakteriyel, paraziter) kontrolleri ulusal ve uluslararası standartlarda belirlenen akredite laboratuvarlarda düzenli olarak test edilir. SPF, *germfree* gibi hayvanlara bu özellikleri tanımlayabilmek için, rutin mikrobiyolojik testlerle doğrulamış olmalıdır. Bu hayvanların bakım ve barındırma koşulları ABSL seviyesine göre uygun şekilde sürdürülmesi gerekir^{1,22,23,25-28}.

Standardizasyon ve Hayvanların Genetiği

Deneyde kullanılacak hayvanların genetik özelliği çalışmanın amacına göre belirlenmektedir^{6,29}. Çalışmalarda standardizasyon sağlanması amacıyla hayvanlardaki genetik farklılıkların en aza indirilmesi gerekir. Genetik olarak birörnek hayvanlar kullanılarak genetik standardizasyon sağlanması amalanır³⁰. Genetik çeşitliliğin sınırlandırması için uzak akrabalı yetiştiricilik (*randombred/outbred*) yerine, neredeyse genetik olarak aynı olan yakın akrabalı yetiştiricilik (*inbred*) yapılır. Yakın akraba yetiştiriciliği birörnek, transgenik, klonlanmış gibi laboratuvar hayvanlarının üretilmesiyle yapılır. Uzak akraba yetiştiriciliği ise genetik varyasyona sahip laboratuvar hayvanları ile gerçekleştirilir. Özellikle yakın akraba yetiştiriciliğinde yetiştirme depresyonu (reme depresyonu, anomaliler) gibi istenmeyen etkilerin ortaya çıkabileceği unutulmamalıdır⁵⁻⁷. Genetik standardizasyonu sağlanmış laboratuvar hayvanlarının gen-evre arasında etkileşimleri de göz önünde tutulması gerekir. Laboratuvar hayvanlarındaki gen ve evre arasındaki etkiler davranış ve fizyolojik yanıtlarda farklılık gösterebilir, bu durum çalışma sonuçlarında varyasyonlara neden olur^{6,31}.

Standardizasyon ve Verilerin Sunumu

Deney hayvanları araştırma verilerinin sunumu raporlar ile yapılır. Araştırma veri sunumunun daha iyi olması için raporların da standardizasyonu olmaktadır. Bu amaçla bir grup araştırmacı tarafından rehber niteliğinde makale yayımlanmıştır (*The ARRIVE*). Raporlarda deneylerde kullanılan yöntemler ve sonuçlar belirtilir. Araştırmaların güvenilir ve tekrarlanabilir olması için, raporların Őeffaf ve tanımlayıcı olması gerekir. Örneklem byklğu, çalışmanın başında deneyel tasarımda hesaplanarak, uygun istatistiksel yöntem kullanılarak belirlenir. Verilerin değerlendirilmesinde çalışmaya dahil edilecek veya çalışma dışı bırakılacak parametreler planlanarak çalışmaya başlanır. Hayvanlar çeşitli deney gruplarına randomize (rastgele) olarak ayrılır ve randomizasyon yöntemi belirtilir. Veriler randomize toplanarak değerlendirilir ve dışlanma kriterleri ile raporlanır. Deneyel prosedürler kr çalışılarak yürütülür ve sonuçlar kr değerlendirilir. Çalışma esnasında çıkan sorunlar veya elde edilemeyen veriler raporlanır^{3,32-35}.

The ARRIVE rehberine göre raporların standardizasyonu Őu Şekilde olmalıdır:

Başlık: Makalenin içeriği yalın bir dille kısaca tanımlanır.

zet: Literatürün sistematik zeti olup; araştırmanın hedefleri belirtilir, kullanılan hayvanın türü/ alt soyu, temel yöntemler, temel bulgular ve çalışmanın sonuçları/çıkarımı ifade edilir.

Giriş:

Literatür İçeriği: Çalışmanın nedenlerini anlamak, deneyel yaklaşımı açıklamak için yeterli bilimsel araştırmaların (nceki çalışmalara ilişkin referanslar) ortaya konulması. Kullanılan hayvan türlerinin/ modelin bilimsel hedeflere uygunluğu ve çalışmanın insan biyolojisi ile ilişkisinin açıklanması.

Amaç ve Hedefler: Çalışmanın birincil ve ikincil amaçlarını veya test edilen belirli hipotezlerin açıkça tanımlanması.

Yöntemler:

Etik Onay Belgeleri: Araştırmayı kapsayan etik izinler, hayvanların bakımı ve kullanımına ilişkin ulusal veya kurumsal yönergeler belirtilir.

Deneyel Tasarım: Her deney için, aşağıdaki bilgileri içeren kısa ayrıntılar verilir:

- Deney ve kontrol gruplarının sayısı ve tanımları.
- Hayvanların randomizasyon Őekli ve uygulanan prosedürler.
- Deneyel birim (rn. tek bir hayvan, hayvan grubu veya kafesi).
- Zaman izelgesi veya akış Őeması ile çalışma tasarımılarının nasıl gerçekleştirildiği.

DeneySEL Prosedürler: Deney ve kontrol grupları için gerçekleştirilen tüm prosedürlerin ayrıntılarının belirtilmesi gerekir:

- Prosedürün nasıl uygulandığı; ilaç formülasyonu ve dozu, uygulama yeri ve yolu, anestezi ve analjezi, cerrahi prosedür, ötenazi yöntemi. Kullanılan özel ekipmanların ve ajanların tedarikçi ayrıntıları belirtilir.
- Prosedürlerin hangi zaman aralığında yapıldığı belirtilir (gün/saat/dönem).
- Prosedürlerin nerede uygulandığı ifade edilir (kafes, laboratuvar).
- Prosedürlerin neden uygulandığı belirtilir (spesifik madde seçiminin gerekçesi, ilaç dozu ve uygulama).

Laboratuvar Hayvanları: Tür, soy, altsoy, cinsiyet, ortalama yaş ve ortalama ağırlık detayları belirtilir. Hayvanların kaynağı, uluslararası altsoy terminolojisi, genetik modifikasyon durumu (nakavt veya transgenik gibi), genotip, sağlık/bağışıklık durumu, önceki prosedürler vb. gibi bilgiler belirtilir.

Bakım ve Barındırma Koşulları:

- Laboratuvar hayvanlarının barınma özellikleri (tesis tipi, mikrobiyolojik konumu, kafes veya barınma tipi, altlık malzemesi, kafeslerdeki hayvan sayısı),
- Barınma koşulları (üreme programı, aydınlık/karanlık döngüsü, sıcaklık, yem türü, yem ve suya erişim, çevresel zenginleştirme),
- Deney öncesinde, sırasında veya sonrasında gerçekleştirilen refahla ilgili değerlendirmeler ve prosedürler detaylı olarak belirtilir.

Örneklem Boyutu: Her deneyde kullanılan toplam hayvan sayısı ve her deney grubundaki hayvan sayısı, kullanılan herhangi bir örneklem boyutu hesaplamasının ayrıntıları (güç analizi gibi), her deneyin bağımsız tekrarlarının sayısı belirtilir.

Hayvanların Deney Gruplarına Atanması: Deney gruplarının randomizasyonu veya yapıldıysa eşleştirmenin nasıl yapıldığı belirtilir.

Deney Sonuçları: Değerlendirilen birincil ve ikincil deney sonuçları açıkça tanımlanır.

İstatistiksel Yöntemler: Her analiz için kullanılan istatistiksel yöntemlerin ayrıntıları, her veri için analiz birimi (tek hayvan, hayvan grubu vb.), verilerin istatistiksel analiz varsayımlarını karşılayıp karşılamadığını değerlendirmek için kullanılan yöntemler belirtilir.

Sonuçlar:

Kayıt edilen Veriler: Her deney grubu için, tedavi veya test öncesinde hayvanların ilgili özellikleri ve sağlık durumu tablo halinde belirtilir.

Analiz Edilen Veriler: Analize dahil edilen her gruptaki hayvan sayısı belirtilir. Analize herhangi bir hayvan veya veri dahil edilmemişse nedeni yazılır.

Sonuçlar: Gerçekleştirilen her analiz için sonuçlar ayrı ayrı raporlanır. Standart hata, standart sapma veya güven aralığı detayları belirtilir.

Çalışma Sınırlılıkları: Her deney grubundaki tüm önemli olumsuz olguların ayrıntıları verilir. Olumsuz olayları azaltmak için deney protokollerinde yapılan değişiklikler açıklanır.

Tartışma:

Yorum/bilimsel çıkarımlar:

- Çalışmanın amaçları, hipotezleri, literatürdeki diğer ilgili çalışmalar dikkate alınarak sonuçlar yorumlanır.
- Olası yanlılık kaynakları, hayvan modelinin herhangi bir sınırlaması ve sonuçlarla ilişkili belirsizlik varsa belirtilip, çalışma sınırlamaları hakkında yorum yapılır.
- 3R kuralının mevcut deneyin yöntemi ve sonuçları ile ilişkisinin ortaya konması, tartışılması.

Genellenebilirlik: Çalışmanın bulgularının, insan biyolojisi ile, diğer türlerde veya sistemlerde genellenebilirliğe uygun olup olmadığı ve nasıl olduğu hakkında yorum yapılır.

Finansman: Çalışmanın destek kaynakları (numarası ile) ve destek verenin/verenlerin çalışmadaki rolleri belirtilerek açıklanır.

Standardizasyon ve Eğitim

Deney hayvanları araştırmalarının standardizasyonu sağlamak, yalnızca hayvanlara, yöntemlere, tesislere özgü standart kriterlerin gerçekleştirilmesi olmayıp, bu alanla ilgili farklı hiyerarşik düzende çalışan tüm kişilerin eğitimlerinin standardizasyonu da göz önünde bulundurulmalıdır. Bu alanda çalışan laboratuvar hayvanları tesis yöneticileri, veteriner hekimler, araştırmacılar, teknik personeller gibi profesyonellerin seviyesine uygun şekilde eğitim programları bulunmaktadır³⁶. Ulusal ve uluslararası kuruluşlar eğitim programlarının düzenlenmesinde farklı kapsamlarda ve farklı seviyelerde eğitimler vermektedir. Bu alanda eğitim sağlayıcıları daha çok üniversiteler, enstitüler, birlikler, dernekler, konseyler, araştırma kuruluşları gibi kurumlar yer almaktadır. Bu eğitim programlarından yararlanan kişilere verilen eğitimin esas amaçları; hayvanların refah seviyesinin artırılması, deney hayvanları araştırmalarında çalışacak kişilerin ilgili alanda yetkin olması, araştırma sonuçlarının güvenilirliğini arttırmaktır. Sağlık profesyonellerine verilen eğitim ile deney hayvanları araştırmalarındaki sorumluluklarının farkındalığının artması ve sonucunda tekrarlanabilir standart deney hayvanları araştırmaları elde edilir^{22,37-40}.

Sonuç

Sonuç olarak deney hayvanları araştırmalarının standardizasyonunda; genetik, mikrobiyolojik konum, beslenme, barınma, eğitim, verilerin raporlanması (kr çalışma, randomizasyon, tekraredilebilirlik, örneklem büyüklüğü ve cinsiyet) gibi parametreler önemli yer alır. Dolayısıyla deney hayvanları araştırmalarında standardizasyon tek bir alanda değil, birçok varyasyonu ve kaynaklarını göz önünde bulundurulacak araştırmaların planlanması, yürütülmesi, nihai sonuçlara ulaşılması ve yorumlanması gerekmektedir. Böylelikle bu parametrelerin Őeffaf bir Şekilde tüm protokollerle ortaya konması ile bilimsel anlamlılık ve güvenilirlik sağlanacaktır. Bu sayede araştırmalara özgü bilimsel iddiaların ve kanıtların doğruluğu arasındaki ilişkiyi daha iyi anlamaya ve araştırma çıktılarının genelleştirebilirliğini ortaya koymaya, uygulanabilirliğini arttırmaya doğru ilerleme sağlanabilir.

Etik Kurul Onay Bilgisi:

Makalemiz geleneksel derleme olup, etik kurul değerlendirmesine gerek yoktur.

Araştırmacı Katkı Beyanı:

Fikir ve tasarım: A.., N.B.; Veri toplama ve işleme: A.., N.B.; Analiz ve verilerin yorumlanması: A.., M.E.G.; Makalenin önemli bölümlerinin yazılması: A.., M.E.G.

Destek ve Teşekkür Beyanı:

Makale yazarlarının destek ve teşekkür beyanı yoktur.

ıkar atışması Beyanı:

Makale yazarlarının ıkar atışması beyanı yoktur.

Kaynaklar

1. National Research Council (US) Committee. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8. Baskı. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. PMID: 21595115.
2. Laboratory vs. Experimental Animals – CroLASA [Internet]. 2022 [Erişim tarihi: 3 Ekim 2022]. <https://www.crolasa.com/en/laboratorijske-zivotinje/>
3. Sert NP du, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, et al. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. PLOS Biol. Public Library of Science. 2020;18(7): e3000411.
4. Russell WMS, Burch RL. The Principles of Humane Experimental Technique. 1. Baskı. İngiltere: Methuen Publishing Ltd.; 1959.
5. Poyraz . Laboratuvar Hayvanları Bilimi. 1. Baskı. Ankara: Kardelen Ofset.; 2000. p. 21–40.
6. Enriquez J, Mims BMD, Trasti S, Furr KL, Grisham MB. Genomic, microbial and environmental standardization in animal experimentation limiting immunological discovery. BMC Immunol. 2020; 21:50. PMID: PMC7464063.
7. Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC, eds. İde T, çeviri editr. Laboratuvar Hayvanları Biliminin Temel İlkeleri. 1. Baskı. Ankara: zkan Matbaacılık Ltd. ŐTİ.; 2003.
8. Richter SH, Garner JP, Auer C, Kunert J, Wrbel H. Systematic variation improves reproducibility of animal experiments. Nat Methods. 2010;7(3):167–168.
9. Van der Staay FJ, Arndt SS, Nordquist RE. Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders. Behav Brain Funct. 2009;5(1):11.
10. Kafkafi N, Agassi J, Chesler EJ, Crabbe JC, Crusio WE, Eilam D, et al. Reproducibility and replicability of rodent phenotyping in preclinical studies. Neurosci Biobehav Rev. 2018; 87:218–232. PMID: PMC6071910.
11. Paylor R. Questioning standardization in science. Nat Methods. 2009; 6(4):253–254.
12. Voelkl B, Altman NS, Forsman A, Forstmeier W, Gurevitch J, Jaric I, et al. Reproducibility of animal research in light of biological variation. Nat Rev Neurosci. 2020; 21(7):384–393.
13. Omary MB, Cohen DE, El-Omar EM, Jalan R, Low MJ, Nathanson MH, et al. Not all mice are the same: Standardization of animal research data presentation. Hepatology. 2016;63(6):1752–1754.
14. Fontoura-Andrade JL, Amorim RFB de, Sousa JB de. Improving reproducibility and external validity. The role of standardization and data reporting of laboratory rat husbandry and housing. Acta Cir Bras. 2017; 32(3):251–262. PMID: 28403350.
15. Richter SH, Garner JP, Wrbel H. Environmental standardization: cure or cause of poor reproducibility in animal experiments? Nat Methods. 2009; 6(4):257–261.
16. Von Kortzfleisch VT, Karp NA, Palme R, Kaiser S, Sachser N, Richter SH. Improving reproducibility in animal research by splitting the study population into several ‘mini-experiments.’ Sci Rep. 2020;10(1):1-16.
17. Goodman SN, Fanelli D, Ioannidis JPA. What does research reproducibility mean? Sci Transl Med. American Association for the Advancement of Science; 2016; 8(341):341ps12-341ps12.
18. Kenett RS, Shmueli G. Clarifying the terminology that describes scientific reproducibility. Nat Methods. 2015; 12(8):699–699.
19. Wahlsten D, Metten P, Phillips TJ, Boehm II SL, Burkhart-Kasch S, Dorow J, et al. Different data from different labs: Lessons from studies of gene–environment interaction. J Neurobiol. 2003; 54(1):283–311.
20. Jonker RM, Guenther A, Engqvist L, Schmoll T. Does systematic variation improve the reproducibility of animal experiments?. Nat Methods. 2013; 10(5):373–373.
21. Festing MFW. Refinement and reduction through the control of variation. Altern Lab Anim ATLA. 2004; 32 Suppl 1A:259–263. PMID: 23577470.
22. Directive 2010/63/EU Of The European Parliament and of the Council of 22 September 2010 On the Protection of Animals used for Scientific Purposes. Official Journal of European Union. EU (2010).
23. DeneySEL ve diğer bilimsel amalar için kullanılan hayvanların refah ve korunmasına dair ynetmelik. Resm Gazete, Sayı: 28141 (13 Aralık 2011).
24. Burke DA, Magnuson DS, Nunn CD, Fentress KG, Wilson ML, Shum-Siu AH, et al. Use of Environmentally Enriched Housing for Rats with Spinal Cord Injury: The Need for Standardization. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2007;46(2):34–41.
25. Design Requirements Manual (DRM): Biomedical and animal research facilities design policies and guidelines. The National Institutes of Health. 2016 [Erişim tarihi: 5 Ekim 2022]. <https://orf.od.nih.gov/TechnicalResources/Pages/DesignRequirementsManual2016.aspx>
26. Barnard DE, Lewis SM, Teter BB, Thigpen JE. Open- and Closed-Formula Laboratory Animal Diets and Their Importance to Research. J Am Assoc Lab Anim Sci JAALAS. 2009; 48(6):709–713. PMID: PMC2786923

27. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes. Council of Europe, ETS No. 123. (2006).
28. Genç B. Laboratuvar Hayvanı Diyetleri ve Hayvan Besleme Bilimindeki Yeri. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Derg.* 2017;57(2):105–111.
29. Griesemer JR, Gerson EM. Of Mice and Men and Low Unit Cost. *Stud Hist Philos Sci Part C Stud Hist Philos Biol Biomed Sci.* Elsevier; 2006;37(2):363–372.
30. Lewejohann L, Zipser B, Sachser N. “Personality” in laboratory mice used for biomedical research: A way of understanding variability?. *Dev Psychobiol.* 2011;53(6):624–630.
31. Valdar W, Solberg LC, Gauguier D, Cookson WO, Rawlins JNP, Mott R, et al. Genetic and Environmental Effects on Complex Traits in Mice. *Genetics.* 2006;174(2):959–984.
32. Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Animal research: Reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol.* 2010;160(7):1577–1579.
33. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics.* 2010; 1(2):94-99. PMID: PMC2893951.
34. Van der Worp HB, Howells DW, Sena ES, Porritt MJ, Rewell S, O’Collins V, et al. Can Animal Models of Disease Reliably Inform Human Studies?. *PLOS Med.* 2010;7(3): e1000245.
35. Landis SC, Amara SG, Asadullah K, Austin CP, Blumenstein R, Bradley EW, et al. A call for transparent reporting to optimize the predictive value of preclinical research. *Nature.* 2012; 490(7419):187–191. PMID: PMC3511845.
36. Pritt S, Duffee N. Training Strategies for Animal Care Technicians and Veterinary Technical Staff. *ILAR J.* 2007;48(2):109–119.
37. Begley CG, Ioannidis JPA. Reproducibility in Science. *Circ Res.* 2015; 116(1):116–126.
38. Kennedy BW, Froeschl K. Education and Training. Weichbrod RH, Thompson GAH, Norton JN, editörler. *Management of Animal Care and Use Programs in Research, Education, and Testing.* 2. Baskı. Amerika, Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2018. p.221-265. PMID: 29787224.
39. Duffee N, Nevalainen T, Hau J. Education and training. In *Handbook of Laboratory Animal Science.* 4. Baskı. Amerika, Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2021. p. 937-948.
40. Collins FS, Tabak LA. Policy: NIH plans to enhance reproducibility. *Nature.* 2014; 505(7485):612–613.