

# Genetiği Değiştirilmiş Hayvanların Farmakoloji ve Toksikoloji Alanında Kullanılması

## Genetically Modified Animals in Pharmacology and Toxicology Research: Review

Ayhan FİLAZİ,<sup>a</sup>  
Leyla ÖZHANCI<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Farmakoloji ve Toksikoloji AD,  
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Ankara

Geliş Tarihi/Received: 31.03.2016  
Kabul Tarihi/Accepted: 23.05.2016

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Ayhan FİLAZİ  
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Farmakoloji ve Toksikoloji AD, Ankara,  
TÜRKİYE/TURKEY  
filazi@veterinary.ankara.edu.tr

**ÖZET** Genetik mühendislik oldukça geniş genomik değişiklikleri kapsayan bir bilim dalıdır. Başka yerden alınan yabancı bir genin aktarıldığı türde aşırı ifade edilmesini sağlamak, bir türde belli bir genin etkinliğini baskılamak veya yerini değiştirmek şeklinde elde edilen genetiği değiştirilmiş hayvanlar; hastalıkların moleküler mekanizmalarını belirlemek, yeni tedavi hedeflerini değerlendirmek ve yeni geliştirilen bileşiklerin etkinliğini ve/veya toksisitesini belirlemek amacıyla sürekli artan bir şekilde kullanılmaktadır. Bu nedenle, hastalıkları tedavi etmek ve yeni ilaç moleküllerinin geliştirilmesine yönelik olmak üzere, hastalıkları kontrol eden yeni elementlerin belirlenmesine izin veren yöntemler üzerine odaklanılmıştır. Böyle yöntemler kimyasal maddelerin hedeflerinin belirlenmesi, hedef moleküllerin analizi, sinyal yollarının ayrımı, hastalık modellerinin oluşturulması ve toksikolojik deneyler için daha anlamlı olmaktadır. Farmakoloji ve toksikoloji alanında en çok kullanılan genetiği değiştirilmiş hayvan farelerdir. Farelerin öncülük ettiği genetik değişimler sıçanlarda daha az başarılı olmasına rağmen son yıllarda çok sayıda transgenik ve knock-down sıçanın da geliştirildiği görülmektedir. Ayrıca, günümüzde kararlı genetik değişimlerin insan olmayan primatlar ile memeli olmayan hayvanlar dâhil birçok memeli hayvan türüne kadar genişlediği de belirlenmiştir. Şimdiden çok yakın bir gelecekte genetiği değiştirilmiş hayvanların kullanıldığı bazı farmakolojik/toksikolojik tarama testlerinin farmakoloji ve toksikoloji araştırmaları için vazgeçilmez araçlar olabileceği söylenebilir. Bu çalışmada, değişik tip genetiği değiştirilmiş hayvanlar ile bunların farmakoloji ve toksikoloji araştırmalarında biyolojik süreçleri açıklamadaki potansiyelleri tartışılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Hayvanlar, genetiği değiştirilmiş; biyomedikal araştırma; farmakoloji; toksikoloji

**ABSTRACT** Genetic engineering involves a large spectrum of genomic modifications. Genetically modified animals (GMAs) that either over-express a foreign gene or in which the activity of a certain gene has been removed or replaced will be used incrementally to search molecular mechanisms of disease, to estimate innovative therapeutic targets, and to test novel compounds for efficacy and/or toxicity. Thereby, a principal attention is focused on methodologies which allow the detection of new control components. Such a method was required for the identification of chemical targets, the analysis of target molecules, the distinction of signalling pathways, the creation of disease models and toxicological experiments. Mice are the most often used GMAs in pharmacology and toxicology. Genetic changes led in mice have been less successful in rats but an increasing count of transgenic and knock down rats have been improved in recent years. Likewise, constant genetic modifications have now been expanded to most mammals consisting of nonhuman primates and non-mammals. Indeed, in the immediate future some pharmacologic/toxicity screening tests that use genetically modified animals might be declared as the new "indispensable tools" for pharmacological/toxicological surveys. In this paper, various classes of GMAs and their potential to describe biological processes relevant for pharmacological/toxicological research were reviewed.

**Key Words:** Animals, genetically modified; biomedical research; pharmacology; toxicology

Genetiği değiştirilmiş hayvanlar; insanlarda çözüm bekleyen hastalıklar için hayvan modelleri oluşturarak bunları araştırmak, terapötik veya endüstriyel ürünleri üretmek, hayvansal gıda üretimini artırmak, hastalıklara direnci ve hayvan sağlığını geliştirmek ve evcil hayvan olarak yetiştirmek amacıyla geliştirilmektedir.<sup>1</sup> Bunların biyomedikal araştırma programlarına dâhil edilmesine neden olan ana fikir “Hayvanlarda genomik müdahaleye uğrayan gen fonksiyonunun aşırı şekilde uyarılması veya baskılanması, benzer genetik değişimi taşıyan insanların yanıtının da tahmin edilmesini sağlar” tezidir. Böylece canlıların kalıtsal özelliklerini değiştirerek, onlara yeni fonksiyonlar kazandırılmasına yönelik çalışmalar yapan genetik mühendisliği, son yıllarda geliştirdiği yeni hayvan modelleri aracılığıyla moleküler biyolojide devrimsel nitelikte ilerlemelere yol açmış ve özellikle hekimlik alanında yeni tedavi yaklaşımları ile ilaç moleküllerinin keşfedilmesi, valide edilmesi ve uygulanması hız kazanmıştır.<sup>2</sup>

Başlangıçtaki genetik değişimler sadece tek bir genin ilavesine veya kaldırılmasına dayanır iken, son yıllarda bir hayvanda birden fazla gene müdahale edilmeye başlanmış, böylece ksenobiyotiklerin maruziyeti sırasında kompleks etkileşimlerin değerlendirilmesine de olanak sağlanmıştır.<sup>3</sup> Hızla artan gelişmelere paralel olarak, gelecekte genetik mühendislik harikası hayvanlarla hem bilimsel araştırmalarda hem de gıda alanında çok daha fazla karşılaşılacağı öngörülmektedir.<sup>4</sup> Farmakolojide en önemli amaç; kan basıncı, bağışıklık sistemi ve zihinsel kapasite gibi karmaşık fizyolojik fonksiyonları düzenleyen moleküler kontrol elementlerinin tanımlanmasıdır. Çünkü, bu moleküler kontrol elementleri ayrıca farklı hastalıklarda potansiyel terapötik hedef konumundadır.<sup>5</sup>

Biyomedikal amaçla geliştirilen ilk transgenik hayvan, aslında 1974 yılında viral bir DNA'nın erken dönem fare embriyosuna yerleştirilmesiyle elde edilmesine rağmen, farelerin bu transgeni döllere geçirememesi nedeni ile uygulamada kullanım alanı bulamadığı bildirilmiştir.<sup>6</sup> Ancak, 1980 yılında pronükleer DNA mikroenjeksiyon yöntemi ile geliştirilen transgenik farelerin, genetik materyali ilk kez kendi döllere de aktarabildiği gösterilmiştir.<sup>7</sup>

Bunun için insanlarda hastalığa neden olduğu bilinen gen alınarak (transgen veya aktarılan gen) hayvanlara rastgele yerleştirilir. Böylece 1980 yılından itibaren mikroenjeksiyon tekniği ile üretilen ilk transgenik fareden günümüze kadar yüzlerce transgenik fare, sıçan ve zebra balığı hattının geliştirildiği bildirilmiştir.<sup>8</sup> Sonraları daha ileri tekniklerin geliştirilmesiyle, ayrıca gen inaktivasyonu (knock-out) veya daha geniş skalalı genetik değişimlerin yapılması mümkün olmuştur. Biyomedikal araştırmalarda en yaygın kullanılan hayvan modellerinin genetiği değiştirilmiş rodentler olduğu görülmektedir. Bunun nedeni; insan genomuna benzerliklerinin yanı sıra diğer türlerle karşılaştırıldıklarında kolayca bulunabilmeleri, tutulmalarının kolaylığı, biyolojik yapılarının iyi bilinmesi, daha fazla döl alınabilmesi, doğum ve östrus siklusunun kısa olması ve ucuz olmalarından kaynaklanmaktadır. Diğer yaygın kullanılan türler meyve sinekleri (*Drosophila*), ekmek mayası (*Saccharomyces cerevisiae*) ve zebra balıkları (*Danio rerio*)'dir.<sup>9</sup>

Bu modeller arasında genetiği değiştirilmiş fareler (GDF); araştırma ve geliştirmede (farmakolojide, metabolizmanın belirlenmesinde ve etkinlik testlerinde), kimyasal maddelerin güvenliği ve üreme toksikolojisi ile kanserojenite testlerinde en uzun kullanım hikâyesi olan türlerdir. Farelerin (*Mus musculus*) başını çektiği genetik değişimler, sıçanlarda (*Rattus norvegicus*) daha az başarılı olsa da son yıllarda transgenik ve knock-down sıçanların sayısında sürekli bir artış olduğu görülmektedir. Farmakoloji ve toksikoloji alanında kullanılan diğer türlerin genetik yapısının değiştirilmesinin rodentlerde uygulanan işlemlerden daha zor olduğu belirtilmektedir. Literatürlere göre genetiği değiştirilmiş tavşanların (*Oryctolagus cuniculus*), insan olmayan primatların, köpeklerin (*Canis familiaris*) ve domuzların (*Sus scrofa*) kullanımının henüz başlangıç aşamasında olduğu ve çok yakın gelecekte in vivo farmakoloji ve toksikoloji araştırmalarında kullanılmasının da büyük olasılıkla sınırlı kalacağı beklenmektedir.<sup>10-13</sup>

Genetiği değiştirilmiş hayvanlar farmakoloji alanında ilaçların moleküler hedeflerinin belirlen-

mesi, hastalıklar için yeni tedavi stratejilerinin araştırılması ve toksikoloji alanında kimyasal maddelerin toksik etkilerinin önceden belirlenmesinde yaygın kullanım alanı bulmaktadır. Konunun oldukça geniş olması nedeni ile bu çalışmada, genetik mühendislik ürünü hayvanların sadece farmakoloji ve toksikoloji alanındaki kullanımına ilişkin bilgilere yer verilmiştir.

## HAYVANLARDA GERÇEKLEŞTİRİLEN MUTASYON MODELLERİ VE KULLANILAN KAVRAMLAR

Genetik değişim veya mutasyon modeli olarak şimdiye kadar reverse genetik, ileri genetik ve insani özellikler verilmiş (humanized) modeller olmak üzere, genellikle üç sınıf genetiği değiştirilmiş hayvan sınıfı olduğu görülmektedir. Günümüzde en çok kullanılan modeller (başlıca fareler), çeşitli teknikler kullanılarak genellikle reverse genetik (geni değiştirme) yoluyla elde edilir. İleri genetik modellerinde önce fenotip belirlenerek daha sonra istenen gen spontan veya N-etil-N-nitrozüre ile indüklenir.<sup>14</sup> İnsani özellikler verilmiş modellerde ise hayvanlara insan geni çeşitli yollarla yerleştirilmektedir.<sup>15</sup>

Transgenik terimi, aynı veya farklı türden alınan bir genin hayvana rastgele yerleştirilmesiyle elde edilen genetik değişimi ifade eder. Transgenin ekspresyon yeri ve düzeyi rastgele olur. Knock-out, knock-in ve knock-down terimleri ise doğrudan genin hedeflendiğini ifade eder. Knock-out modellerinde istenen özelliğe bağlı olarak her iki allelde (homozigot) veya tek bir allelde (heterozigot) defekt oluşturma veya sadece tek bir allelin (hemizigot) tamamen kesilmesi ile sonuçta genin ekspresyonunun tam (null) veya kısmi olarak kaybı sağlanır. Knock-in modellerinde aktarılan gen daha önce belirlenen yere tam olarak yerleştirilir. Knock-down modellerinde genellikle, gen transkripsiyonunu ve protein üretimini baskılamak için mikroRNA (miRNA) veya küçük interferent RNA (siRNA) aracılığı ile RNA interferansı kullanılır. Bu tekniğin özellikle sıçanlarda protein üretiminin sıfırlanmasında başarılı sonuçlar sağladığı belirtilmiştir. İndüklenebilir veya

şartlı modeller ise transgenik veya gen hedefli modellerde embriyo ve yeni doğanların ölmesini engellemek ve doku veya hücreye özel gen ekspresyonu istendiğinde Cre/loxP ve tet gibi düzenleyici sistemler (seleksiyon markerlar) kullanılarak oluşturulur. Bu sistemleri kullanarak yapılan marker destekli seleksiyon, araştırmacıların genetiği değiştirilmiş hayvanların gen ifadesini kontrol etmesine, istenmeyen DNA sekansını silmesine veya kromozom yapısını değiştirmesine izin vermektedir.<sup>3</sup>

Genetiği değiştirilmiş rodentler, ayrıca retroviral-aracılı gen transferi, somatik hücre mutagenesi/çekirdek transferi, çinko-işaretli nükleazlar veya yukarıdaki tekniklerin hepsinin çoklu kombinasyonu kullanılarak da elde edilebilir. Fare ve sıçanlarda genetik değişimler için geniş uygulama alanı olan ve insanlarda da potansiyel gen tedavisine aday olan daha yeni araçlar ise uyuyan güzel [Sleeping Beauty (SB)] ve PiggyBac (PB) transpozon sistemleridir.<sup>16,17</sup> Sonuçta tüm bu mutasyon tipleri hayvanın genellikle protein ekspresyonunda değişikliğe veya değişik derecelerde kaybına ve böylece ya yeni bir fonksiyon kazanmasına ya da mevcut fonksiyonunun kaybına neden olur.

GDF'nin elde edilmesinde, genellikle 129 ve C57BL/6 alt ırk ile BALB/c ve FVB/N ırkı fareler kullanılır. Gen transferi yapıldıktan sonra bu türden değişimi gösteren hibridlerde stabiliteyi sağlamak için en az 10 çaprazlama yapılması gerekir. Yeterli çaprazlama yapılmadığında hayvanlarda istenmeyen patojenler ile kararsız ve yalancı-fenotipler oluşması olasılığı her zaman vardır. Hayvanlarda istenmeyen fenotipik, immünolojik ve davranış değişikliklerinin nedenleri arasında kullanılan ırk, cinsiyet, koloni çevresi (endojen barsak florası dâhil) ve eş zamanlı hastalıklar (endojen retrovirüsler ve subklinik ve klinik enfeksiyonlar) bulunduğu belirtilmiştir. İstenmeyen durumlar özellikle kanser araştırmaları için geliştirilen modellerde tümör oluşumunu da etkileyebileceğinden, genetiği değiştirilmiş hayvanlardan elde edilen sonuçların yorumlanmasında dikkat edilmelidir.<sup>18</sup>

## GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ HAYVANLARIN FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ALANINDA KULLANIMINA YÖNELİK DEĞERLENDİRMELER

Farmakoloji ve toksikoloji alanında günümüzde en fazla kullanılan genetiği değiştirilmiş hayvan farelerdir. GDF'ler farmakoloji alanında özellikle ilaç moleküllerinin keşfi, geliştirilmesi, mekanistik çalışmalar ile ilaç etkinliğinin belirlenmesinde ve ayrıca biyolojik maddeler, monoklonal antikolar, aşular ve gen terapisinin her döneminde yaygın olarak kullanılmakta olan oldukça değerli araçlar olarak görülmektedir. Ancak, aşağıdaki bölümlerde ayrıntılı bir şekilde açıklandığı gibi toksikoloji alanında özellikle iyi laboratuvar uygulamaları (GLP) sistemini uygulayan laboratuvarlarda kullanımı hâlen tartışmalıdır. İnsanları en yakın düzeyde tekrarlayan hayvanların insani özellikler verilmiş fareler (humanized mice) olduğu, ayrıca knock-out, transgenik ve şartlı transgenik hayvanların toksikoloji için en uygun modeller olabileceği ileri sürülmüştür. Bununla birlikte, GDF'lerin toksikoloji araştırmalarında kullanımını sınırlayan en önemli nedenler, yapılan mutasyonların sınırlı düzeyde kalması ve bu türden genotipik, fenotipik ve fonksiyonel karakterleri usulüne göre oluşturarak testlerde kullanılacak yeterli sayıda fareyi yetiştirmek için geçmesi gereken sürenin uzun (genellikle 1-3 yıl) olmasıdır.<sup>19</sup> Bunun yanında heterozigot mutasyonların insanlardaki bir hastalık modelini en iyi şekilde temsil ettiği bilinmesine rağmen günümüzde kolaylığı bakımından knock-out mutasyonların karakterizasyonunun genellikle homozigotlarla sınırlı kaldığı görülmektedir. Ayrıca, farelerin önceden yanlış veya eksik tanımlanmış fenotipik özelliklerinin olma olasılığı, sonradan kazanılan enfeksiyonların ortaya çıkması, birçok GDF'nin geçmişe dayalı verilerinin olmaması ile GDF'lerin kendi yabani tip kontrolleriyle çiftleşme olasılığı hesaba katıldığında toksikolojik test verilerinin oldukça dikkatli yorumlanması gerekmektedir.<sup>20</sup> Bu nedenle iki yıllık uzun süreli kanser testlerinin yerine kullanılan transgenik rodentlerde kısa süreli kanser testlerinin validasyon programlarının tamamlanması ve ICH (Teknik kılavuzların yorumlanması, uygulanması ve ilaçların ruhsatlandırılması

masısı sırasında, yeni ilaçların araştırılması ve geliştirilmesi aşamasındaki çift-test yapma ihtiyacının azaltılması amacıyla daha fazla harmonizasyon sağlamak için önerilerde bulunan Uluslararası Harmonizasyon Konferansı) tarafından kabul edildikten sonra bile bilimsel anlamda kabul edilmesi oldukça zor olmaktadır. Bununla birlikte ICH rehberi rodent türleri için özel olmasına rağmen yalnızca fareler için valide edilmiş olup karşılaştırmalı biyolojik testlerde genetiği değiştirilmiş sıçanlar P53 eksikliği hastalığı haricinde kullanılmamaktadır. Dolayısıyla, aşağıda ayrıntılı şekilde ele alınacağı üzere GDF'lerin özellikle kanser testleri için kullanımına ilişkin ABD, Kanada, Avrupa Birliği (AB) ve Japonya'da yasal düzenlemeler olmasına rağmen kullanımları hâlen tartışmalıdır.<sup>3</sup>

## GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ HAYVANLARIN IN VİVO FARMAKOLOJİ VE ETKİNLİK ÇALIŞMALARINDA KULLANIMI

GDF'lerin biyofarmasötikler ve küçük moleküllü maddelerin in vivo farmakoloji ve etkinlik çalışmalarında kullanıldığına ilişkin oldukça fazla kaynak bulunmaktadır. Ancak, GDF'lerin insanların fenotipi ile hastalıklarını etkileyen genetik yapıyı tam olarak yansıtmaması nedeni ile bunlardan elde edilen sonuçların hem yorumlanmasının hem de model seçiminin dikkatli bir şekilde yapılması gerektiği ifade edilmektedir. Verilen raporlarda GDF'de oluşturulan hastalığın insandaki benzerlikleri ve farklılıkları açıkça belirtilmeli ve yorumlama geniş etkinlik durumu yerine sadece özel benzerlikleriyle sınırlandırılmalıdır.<sup>21</sup> Günümüze kadar insanlarda görülen çeşitli kanser türleri, otoimmünite, hemostaz ve fibrinoliz, obezite/metabolik sendrom/diyabet ve nöromusküler hastalıkları tanımlamak ve bunlara ilişkin tedavi seçeneklerini geliştirmek için GDF modelleri geliştirildiği bildirilmiştir.<sup>22-26</sup> GDF'ler ve sıçanlarla ilgili son gelişmeler sırasıyla <http://www.informatics.jax.org> ile <http://rgd.mcg.edu> adresli web sitelerinden takip edilebilir.

Özellikle florasan markerlar ile işaretli genetiği değiştirilmiş rodentler, in vivo olarak hücresel düzeye kadar görüntülenebildiği için farmakolojik

değerlendirmelerde başarıyla kullanıldığı bildirilmiştir.<sup>10,27</sup> Bir veya daha fazla geni susturulmuş fareler, genin hangi dokuyu hedeflediğinin anlaşılması ve özel hastalıklara karşı kullanılacak tedavi yaklaşımlarını belirlemek için değerli araçlar olarak öne çıkmaktadır. GDF'lerin ayrıca ilaç hedefleri, reseptörleri, molekülün taşınma yolları ve metabolizmasını değerlendirmek için de kullanılabildiği belirtilmiştir.<sup>28</sup>

Bilindiği gibi ilacın etkilerinin öngörülmesi için genellikle çoklu alt-tipler olarak görülen reseptörlerin farmakolojideki rolünün bilinmesi önem taşımaktadır. Bu durumda knock-out ve knock-in hayvan modellerinin ilaç hedeflerinin değerlendirilmesinde uygun olduğu görülmektedir. Günümüze kadar yapılan araştırmalar, reseptörlerin her birinin farklı alt-tipleri olduğunu, her reseptör alt-tipinin farklı etkilere yol açtığını ve bu nedenle oldukça karmaşık fonksiyonlara sahip olduğunu ortaya koymuştur. Geliştirilen ilaçların bir reseptörün tüm alt-tipleri yerine, sadece belirli bir alt-tipine etki etmesi ve dolayısıyla farklı istenmeyen bir etkiye yol açacak diğer alt-tiplere etki etmemesi istenmektedir. Ancak, normal hayvanlarda ortamda reseptörlerin diğer alt-tipleri de bulunduğundan etkinin hangisinden kaynaklandığı her zaman bilinmemekte ve çoğu kez yanlış hedeflere yönelmesine neden olmaktadır. Bu nedenle gen inaktivasyonu veya knock-out olarak adlandırılan genetik modifikasyon ilaçları hedefin doğru olarak belirlenmesinde oldukça önemli olarak değerlendirilmektedir. Örneğin; farelerde adozin reseptör alt-tipi  $A_{2A}$ 'yı ifade eden genin inaktivasyonunun, bu tip farelerde kafeinin psikostimülan etkisini göstermediğini ve lökomotor etkinliği deprese ettiğini göstermiştir.<sup>29</sup> Bu durum adozin  $A_{2A}$  reseptör antagonistlerinin zihin açıcı olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur.  $A_{2A}$  knock-out farelerde endişenin artması ve ağrı yanıtının azalması, adozin  $A_{2A}$  reseptör agonistlerinin potansiyel endişe giderici, antagonistlerinin ise potansiyel bağımlılık yapmayan analjezikler olduğuna işaret etmiştir. Yine bu tip farelerde trombosit etkinliğinde artış görülmesi adozin  $A_{2A}$  reseptör agonistlerinin antikoagülant olarak, antagonistlerinin ise pıhtılaşma bozukluklarının tedavisinde potansiyel olarak kullanılabileceğini

göstermiştir. Son olarak, bu hayvanlarda gözlenen yüksek kan basıncı adozin  $A_{2A}$  reseptör agonistlerinin hipertansiyon tedavisinde potansiyel rolünü ortaya koymakta, antagonistlerinin ise şokun tedavisinde kullanılabileceğini göstermektedir. Böylece tek bir genin inaktivasyonu ile çeşitli hastalıkların tedavisi için ilgi çekici bir hedef belirlenmiştir.<sup>29</sup>

Diğer bir örnek üç alt-tipi bulunan  $\alpha_2$ -adrenerjik reseptörle ( $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  ve  $\alpha_{2C}$ ) ilgili olanıdır. Bu reseptörleri ifade eden genlerin inaktivasyonu, GDF'lerin ilaç hedeflerinin biyolojik ve farmakolojik rolünün anlaşılmasına nasıl katkıda bulunduğunu göstermesi açısından oldukça ilginçtir. Adrenerjik reseptör agonistlerinin başlangıçta hipertansiyon yaptığı ve daha sonra uzun süren hipotansiyona yol açtığı bilinir. Bununla beraber, reseptör alt-tiplerine seçici olarak etki eden ilaçlar, bireysel reseptör alt-tiplerinin rolünü belirlemek için yararlı olamamıştır. Ama fonksiyonel  $\alpha_{2A}$  ve  $\alpha_{2B}$  adrenerjik reseptörleri ifade eden genleri inaktive edilmiş farelerde,  $\alpha_{2A}$ -adrenerjik reseptörlerin merkezi hipotansif etkili olmasına rağmen,  $\alpha_{2B}$  adrenerjik reseptörlerin periferik hipertansif etkiden sorumlu olduğu gösterilmiştir.<sup>30,31</sup> Böylece  $\alpha_{2A}$  reseptörlere seçici agonistlerin, seçici olmayan  $\alpha_2$  agonistlerden daha güçlü bir hipotansif etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber,  $\alpha_{2A}$  adrenerjik reseptör agonistleri klonidin gibi seçici olmayan  $\alpha_2$  agonistlerinin sedatif etkilerini devam ettirmiştir.<sup>32</sup> Bazal ganglionlarda, hipokampüste ve neokortekste ifade edilen  $\alpha_{2C}$  adrenerjik reseptör alt-tipi ise bilişsel fonksiyonlarla ilişkilendirilir.  $\alpha_{2C}$  adrenerjik reseptörü inaktive edilen farelerde, izolasyon-agresyon testlerinde aşırı tepkiler, nabızda ve saldırı tepkilerinde hızlanma dikkati çekmiştir. Böylece,  $\alpha_{2C}$  adrenerjik reseptöre özel ilaçların şizofreni, dikkat eksikliği bozuklukları, post-travmatik stres ve ilacın kesilmesi semptomları gibi stres duyarlılığının artması ve duyu-motor fonksiyonlarda azalma ile ilgili bozukluklarda etkili olabileceği gösterilmiştir.<sup>33</sup> Ayrıca,  $\alpha_{2C}$  adrenerjik reseptörlerin sedasyonda ve kan basıncında çok az veya hiç rol oynamadığı anlaşıldığından, bunlara seçici olarak etkili ilaçların sedatif veya kardiyovasküler etkiler yapmadığı da ortaya konulmuştur.<sup>31,34</sup>

Bir genin inaktivasyonu fenotipde değişikliğe yol açıyor ise, o genin farmakolojik önemini açıklamak için daha ileri yaklaşımlar gereklidir. Bu görüşe dayanarak, genlerin fizyolojik fonksiyonlarını ve ifadelerini değişmeden bırakan nokta mutasyonlarının farmakoloji alanında kullanılması GABA<sub>A</sub> reseptörüyle başlamıştır. Bu reseptör klinikte endişe giderici, sedatif, antikonvülsan ve kas gevşetici olarak kullanılan benzodiazepinlerin hedefi konumundadır. Diazepam gibi klasik benzodiazepinler, GABA<sub>A</sub> reseptörünün  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -,  $\alpha 3$ - veya  $\alpha 5$ - alt ünitelerini etkiler. Bununla beraber diazepamın etkisini hangi reseptör alt-tipiyle yaptığı bilinmemektedir. Daha özel etkili bileşiklerin geliştirilmesiyle bu bilginin önemli olacağı varsayılmıştır. Böylece GABA<sub>A</sub> reseptörün  $\alpha 1$ -alt tipinin benzodiazepin bağlanma bölgesinde nokta mutasyonunu taşıyan bir fare hattı ( $\alpha^{IH101R}$  fareler) geliştirilmiştir. Bu fare hatları kullanılarak diazepamın  $\alpha 1$ -GABA<sub>A</sub> reseptöre etki etmediği gösterilmiştir. Ancak, fizyolojik nörotransmitter olan GABA'nın değişmemesi de önemlidir.<sup>35-37</sup> Bu farelerde diazepamın etkileri  $\alpha 2$ -,  $\alpha 3$ - ve  $\alpha 5$ - GABA reseptörleri aracılığıyla olmaktadır. Başlangıçtaki davranış araştırmaları, diazepamın başlıca etkilerinin  $\alpha^{IH101R}$  farelerde değişmediğini, hâlbuki diğer etkilerinin kaybolduğunu göstermiştir.<sup>5</sup> Böylece, knock-in stratejisi diazepamın farmakolojik spektrumunun incelenmesini sağlamıştır.

Bir reseptörün etkinleşmesi genellikle farklı sinyal yollarıyla farklı hücre yanıtlarının etkinleşmesine neden olur. Bu yüzden fizyolojik veya farmakolojik fonksiyonlara özgü sinyal yolağının belirlenmesi gerekir. Çoklu sinyal yolları için en ilginç örneklerden biri glukokortikoid (GK) reseptörleriyle ilgili olanıdır. Terapötik olarak GK'lerin metabolik, antiinflamatuvar ve bağışıklık sistemini baskılayıcı etkileri olduğu bilinir. Ancak, tedavi şekline bağlı olarak bu etkilerinden yalnızca bazılarının, örneğin; sadece antiinflamatuvar veya sadece bağışıklık sistemini baskılayıcı etkilerini göstermesi istenebilir. GK'lerin, GK yanıt elementlerine reseptör dimerlerinin bağlanmasıyla transaktivasyona aracılık eden çekirdekteki GK reseptörü aracılığıyla etki ettiği bilinir. Ayrıca, GK reseptör, monomerler vasıtasıyla aşırı baskıya da

aracılık eder. Bununla ilgili olarak A458T nokta mutasyonu uygulanmış farelerde, GK reseptörünün baskılayıcı fonksiyonu devam eder iken, DNA'nın bağlanmasıyla GK reseptörünün gen transkripsiyonunu etkinleştirilmesi önlenir.<sup>38</sup> Başlangıçta yapılan analizler endojen GK'lerin neden olduğu etkinleşmenin yaşamın sürmesi için gerekli olmadığını ortaya çıkarmıştır. Bununla beraber GK'lere bağımlı timositlerin apoptozu ve eritroblastların proliferasyonu reseptör fonksiyonunun etkinleşmesi aracılığıyla gerçekleşir. Yapılan değerlendirmeler, nokta mutasyonlu farelerin daha ileri analizleriyle, etkinleşme ve baskılanma yollarlarının fonksiyonel ilgisini ortaya çıkarabileceği ve özel tedavi girişimlerine izin vereceği şeklindedir. Bununla ilgili olarak, güçlü bir baskıya neden olan ama hiç veya yok denecek kadar az etkinleşmeye yol açan RU24859 gibi dissosiyasyon GK'ler geliştirilmiştir. Bu bileşikler in vivo ortamda prednizolon kadar güçlü antiinflamatuvar ve bağışıklık sistemini baskılayıcı etkinlik göstermiştir.<sup>39</sup> Sonuçta, bu türden genetiği değiştirilmiş hayvanlar kullanılarak daha kararlı etkinlik gösteren ama istenmeyen etkileri olmayan GK ilaçların da geliştirilmesi mümkün olabilecektir.

Knock-out fareler kullanılarak farklı fizyolojik fonksiyonların analiziyle bilinmeyen ilaç hedeflerinin de belirlenmesi mümkün olmaktadır. Örneğin; G proteinin  $\alpha$ -alt ünitesi G $\alpha_q$ 'dan yoksun mutant farelerde, pıhtılaşma zamanının uzadığı ve çeşitli fizyolojik trombosit etkinleştiricilerine yanıt alınmadığı rapor edilmiştir. Buna bağlı olarak, adrenal ve kollajen karışımının damar içi enjeksiyonunu takiben, mutant fareler en az 1 saat yaşatılmış iken, normal fareler her durumda 5 dk içinde ölmüştür. Böylece mutantlar in vivo trombosit aktivasyonunun neden olduğu tromboembolizme direnç kazanmıştır.<sup>40</sup> Bu çalışmalar antitrombotik tedavi için potansiyel hedef olarak trombositlerdeki G $\alpha_q$ 'nın önemli olduğunu göstermiştir.

Türe özel yapısal özellikler olması nedeni ile bir ilacın hedef noktasının etkilenmesi insan ve hayvanlarda farklı etkilerin görülmesine yol açmaktadır. Bu durumda insandaki ilaç hedefini elde etmek için, ilgili insan genini normal veya knock-out bir hayvana transfer etmek gerekir. Buna veri-

lebilecek en iyi örnek renin-anjiyotensin sistemi ile ilgili çalışmalardır. İnsan renin ve anjiyotensinojen etkileşimlerinin türe özgü olduğu bilinir ve ilgili fare proteinleriyle reaksiyona girmezler. Bu nedenle transgenik hayvanlarda insan transgen ürünlerinin özel etkileri in vivo ortamda konakçı renin-anjiyotensin sistemiyle bir etkileşim olmadan çalışılabilmektedir. Bu durumda insanlarda bulunan enzimler için özel inhibitörler geliştirilebilmektedir. Ancak, ilaç etkinliği testlerinin transgenik hayvanlarda yapılması planlandığında, birçok durumda interferensten kaçınmak için endojen genlerin çıkarılması gerekebilir.<sup>41</sup>

Fareye ait bir genin insan geniyle yer değiştirilmesi, insan hastalıklarının hayvanlarda değerlendirilmesi için ayrıca ilginç bir konudur. Örneğin; bir çalışmada fare prionu, cre-loxP aracılı gen hedefi kullanılarak insan prion geni ile değiştirilmiştir.<sup>42</sup> Prionun infektivitesi türe özel olduğundan, bu farelerin insan prion proteininin infektivite çalışmasına uygun olduğu bildirilmiştir. Diğer bir örnek fare  $\alpha$ -laktalbumin geninin çift değiştirme gen hedefi prosedürü kullanılarak eş değeri insan geniyle yer değiştirmesidir.<sup>43</sup> Bu durumda insan geninin farelerde 16 katı daha yüksek düzeylerde ifade edildiği, ama süt hacminin hafifçe artmasına rağmen sütteki laktoz konsantrasyonunun etkilenmediği gözlenmiştir. Bu yer değiştirme tekniğinin, süt kompozisyonunu değiştirmek için uygulanacak ilaç ve diğer maddelerin araştırılması için de uygun olduğu bildirilmiştir. Bu örnekler insan genlerini taşıyan genetiği değiştirilmiş hayvanların ilaç hedeflerinin tanımlanmasında ve yeni ilaçların geliştirilmesinde oldukça önemli olduğunu göstermiştir.<sup>44</sup>

Yukarıdaki olumlu örneklerle karşıt olarak, insanlardaki bazı hastalıkların hayvanlarda geliştirilemediği durumlar da vardır. Örneğin; insanlarda hipoksantin-guanin-fosforiboziltransferaz [hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (*HPRT*)] geninin inaktive olduğu durumlarda görülen ve hiperürisemi, koreoatetoz, spastisite, zekâ geriliği ve kendine zarar verme ile karakterize Lesch-Nyhan sendromu, yapılan tüm denemelere rağmen hayvanlarda oluşturulamamıştır. *HPRT* geninden yoksun bırakılan fareler beyin dopamin düzeylerinde

kolayca göze çarpmayan değişikliklerle normal ve sağlıklı bir şekilde kalmıştır.<sup>45,46</sup> Ayrıca, pürin yolagından tamamen yoksun bırakmak için hem *HPRT* hem de adenin fosforiboziltransferaz [adenine phosphoribosyltransferase (*APRT*)] geni çıkarılmış farelerin bile Lesh-Nyhan sendromuyla ilgili davranış anormallikleri göstermediği bildirilmiştir.<sup>47</sup> Bu bulgular biyokimyasal yollar, fizyolojik süreçler veya moleküler düzeyde tür farklılığının olduğunu ve bu türden hayvanlardan elde edilen bulguların insanlara uyarlanır iken mutlaka farklılıkların hesaba katılması gerektiğini göstermektedir.

## GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ HAYVANLARIN FARMAKOKİNETİK VE İLAÇ-İLAÇ ETKİLEŞMELERİNDE KULLANIMI

Özel bir gen veya allel genleri (biri anneden diğer babadan gelen gen çifti) değiştirilmiş fareler ile insani özellikler verilmiş karaciğere sahip farelerden yeni bir ilaç molekülünün keşfedildiği ve başlangıç fazlarında başarılı sonuçlar alındığı, ancak bu modellerden molekülün emilme, dağılma, metabolizma ve atılma gibi farmakokinetik parametreleri ile güvenlik çalışmalarında tartışmalı veriler elde edildiği bildirilmiştir. Özellikle ilacın metabolizması ve atılması gibi farmakokinetik parametreler ile metabolitlerinin belirlenmesi, ilaç-ilaç etkileşimleri ve konakçının ilaca olan direncinin ancak insan genlerinin transgenik olarak yerleştirilmesiyle, sitokrom P450 ve diğer ksenobiyotikler metabolize eden enzim genlerinin ve reseptörlerinin inaktivasyonu ve insan hepatositleriyle yeniden oluşturulan insani özellikler verilmiş farelerin kullanılmasıyla özel metabolik profil oluşturulan GDF'ler kullanılarak belirlenebileceği ifade edilmiştir.<sup>27,48</sup> Bu amaçla bireysel ksenobiyotik metabolize eden enzimleri veya yolları değiştirilen GDF'ler kullanışlı olmasına rağmen, bu modellerde metabolizmanın tüm öğeleri bulunmaz. Mekanistik ve güvenlik çalışmaları için çoklu komponentlerin yerleştirilmesi veya silinmesi gerekebilir. Ancak, böyle modellerin uygun karakterizasyonu hem oldukça zaman gerektirir hem de pahalıdır. Ayrıca, bu tür modellerde yabancı tipten gelen fare ortologları (iki veya daha fazla homolog gen sekansının

bulunduğu bölge) hâlen mevcudiyetini devam ettirmektedir.<sup>48</sup> Bu nedenle Faz I ve II enzimleri ile taşıyıcı proteinleri gibi insanlara ait tüm metabolik yolları içeren hepatositlerle yeniden oluşturulan fareler daha çok ilgi çeker. Ayrıca, farmakokinetik çalışmalarda farelerin boyutu numune almayı sınırlandırmasına rağmen, yine de bu türden çalışmaların sonuçlarının yorumlanmasında ve ilacın güvenliği ile toksikolojik verilere köprü olmak amacıyla değerli bilgiler sağlayabileceği ifade edilmektedir. Ayrıca, in vivo farmakolojik denemeler süresince gerçekleştirilen farmakokinetik veriler, normal ve hastalıklı durumlar arasındaki olası farklılıkların görülmesine yardımcı olabilmektedir.<sup>21</sup>

### GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ HAYVANLARIN İLAÇ GÜVENLİĞİNDE KULLANIMI

İlaç güvenliğinin değerlendirilmesinde genetiği değiştirilmiş hayvanlara fazla rağbet edilmediği görülmektedir. Bu konuda spontan veya indüklenmiş genetik mutasyonlu fare ve sıçanların ilaç güvenliğinin önceden tahmin edilmesinde yardımcı olarak kullanıldığı anlaşılmaktadır. Örneğin; QT aralığının uzaması sendromu gösteren hastalarda kullanılacak ilacın ileri kardiyovasküler testlerinin yapılması, astım modellerinde solunum güvenliğinin test edilmesi, Alzheimerlı ve amitrofik lateral sklerozlu modellerde santral sinir sisteminin değerlendirilmesi için transgenik, knock-out, knock-in ve spontan mutasyon modelleri geliştirilmiş ve başarıyla yürütülebilmektedir.<sup>26,49-51</sup>

### GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ HAYVANLARIN GENOTOKSİSİTE ÇALIŞMALARINDA KULLANIMI

*Escherichia coli* ile işaretlenmiş *lacI*, *lacZ* ve *gpt* delyayı kopyalayan birden çok genin yerleştirildiği transgenik rodentler, Avrupa'da ve ABD'de Çevre Koruma Örgütü tarafından kimyasal mutajenite testleri için kabul edilmektedir. Ancak, bunlar genellikle yalnızca ilave analizler olarak veya sadece mekanistik genotoksisite çalışmalarında kullanılmaktadır. Bu transgenik modeller in vitro testlerle karşılaştırıldığında ticari olarak bulunmaları hem zordur hem de fiyatları oldukça pahalıdır. Ayrıca,

spontan mutasyon göstererek istenen amaçları gerçekleştirilememeleri durumlarıyla sık karşılaşılmaktadır. Klastojen maddelere (kromozomlarda kırıklara neden olan maddeler) karşı genellikle duyarsızdır. Ancak, birçok organda görülen mutasyonları test edebilmek gibi üstünlüklere sahiptir.<sup>52</sup>

### GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ HAYVANLARIN BİYOLOJİK MADDELER, GEN TEDAVİSİ, AŞILAR VE İMMÜNOKSİSİTE ÇALIŞMALARINDA KULLANIMI

GDF, biyoteknolojik ürünlerin güvenliğinin belirlenmesi ve risk değerlendirmesi için kabul edilen eşsiz modeller olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca, yabani tip hayvanlarda ilacın etkinliğine yanıt alınmaması durumunda ICH dokümanı, güvenlik testleri için alternatif olarak insani özellikler verilmiş hayvan modellerini veya onların yerine geçen molekülleri desteklemektedir. Bu amaçla kullanılacak modeller, insandaki hedef fonksiyonu ifade eden özelliklerin oluşturulduğu transgenik veya knock-in hayvanlar ile yerine koyma tedavisini değerlendirmek için uygun olarak genleri silinmiş (knock-out veya knock down) modellerdir.<sup>3</sup> Ancak, biyoteknolojik ürünlerin güvenliğinin belirlenmesi ve risk değerlendirmesinde alternatif model olarak GDF'leri kullanan çalışmalara çok az rastlanmaktadır. Bunun nedeninin etkinlik sonuçlarıyla güvenlik sonuçlarının birbirinden ayrılmasının zorluğundan kaynaklandığı bildirilmiştir. Konuyla ilgili genel toksisite, genotoksisite, immünotoksisite, konakçı savunma sistemi ve üreme toksisitesini içeren yayımlanmış en kapsamlı araştırmanın huCD4 transgenik farelerde yapılmış primatize edilmiş anti-CD4 monoklonal antikorların değerlendirildiği çalışma olduğu görülmektedir.<sup>19</sup> Ayrıca, Alzheimer hastalığının erken klinik dönemlerinde kullanılan Aβ aşısının güvenliği ve risk değerlendirmesi de yine transgenik farelerde yapılmıştır.<sup>53</sup>

Gen tedavisi denemelerinde, kullanılacak maddelerin etkinliğinin belirlenmesinde genellikle indüklenmiş fare modellerinin kullanıldığı, ancak bulunabildiğinde büyük hayvanlarda oluşturulan spontan mutasyon modellerinin de etkinlik ve güvenlik testleri için kullanılabilirliği belirtilmiştir.<sup>54</sup>



Bu konuyla ilgili olarak kalıtsal tirozinemi Tip 1 hastalık oluşturulmuş bir fare modelinde, fumarilasetoasetat hidrolazın (FAH) kaybının akut karaciğer yetmezliği, böbrek tübül hasarı ve karaciğer tümörlerine neden olduğu gösterilmiştir. FAH'dan yoksun farelerde bu eksiklik ilaçla, adenovirüs veya retrovirüs aracılı gen tedavisi ile düzeltilmiştir.<sup>55-57</sup> Bu örnekler, gen tedavisinde farklı stratejilerin irdelenmesi için bu tür hayvan modellerinin oldukça kullanışlı olduğunu ifade etmektedir. Ayrıca, spontan olarak mutasyona uğratılan köpeklerde, Duchene kas distrofisi ve Leber'in konjenital amorozisi gibi hastalıklarda kullanılacak maddelerin klinik denemelerinde başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir.<sup>58,59</sup>

GDF'ler ayrıca, ileri tümör invazyonu ve metastazları için kullanılan potansiyel anti-anjiyojenik tümör tedavisi gibi pazarlama sonrası araştırmaların adresi olan mekanistik çalışmalarda da kullanılır.<sup>60</sup> Bunun dışında insani özellikler verilmiş fareler aşır, otoimmünite, transplantasyon için immünite oluşturmak, immünotoksikoloji ve ilaçların geliştirilmesi, sitokinler, kemokinler ve ilaçlarda görülen aşırı duyarlılık reaksiyonları, hematoksisite reaksiyonları ve diyabet gibi klinik endikasyonlar için başarıyla kullanılacak modeller olarak değerlendirilir.<sup>23,25,61,62</sup>

## GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ HAYVANLARIN GELİŞME VE ÜREME TOKSİKOLOJİSİ İLE JUVENİL TOKSİKOLOJİ ARAŞTIRMALARINDA KULLANIMI

Gelişme ve üreme toksikolojisi alanında GDF'lerin kullanılması uluslararası yetkili otoriteler tarafından kabul görmekte ve özellikle biyolojik maddelerle ilgili yürütülen araştırmalarda başarılı sonuçlar elde edildiği görülmektedir.<sup>63</sup> Bu amaçla kullanılan GDF'lerde genlerin silinmesi veya yeni bir genin yerleştirilmesinden sonra doğrudan veya dolaylı olarak görülen ve genellikle beklenmeyen en yaygın sonuçlar; düşük fertilitite ve doğurganlık, embriyo ölümü, perinatal mortalite ve gelişmede yetersizlik gibi sonuçlar olabilmektedir.<sup>20</sup> Bu sonuçlardan mortalite ve morbiditeyle ilgili durumlar şartlı mutasyon modelleri kullanılarak kısmen kontrol edilebilir

veya kritik dönemlerde geçici olarak ilaç veya başka terapötik müdahalelerle (immünoregülatör maddelerin kullanılması gibi) düzeltilbilir. Ancak yine de güvenlik çalışmalarında kullanılmadan önce GDF'lerin fenotipik ve fonksiyonel anormalliklerinin önce detaylı olarak karakterize edilmesi gereklidir.<sup>19</sup> Günümüze kadar IL-12p40 knock-out, IL-6 knock-out ve HuCD4 transgenik farelerin gelişme ve üreme toksikolojisi çalışmalarında başarıyla kullanıldığı belirtilmiştir.<sup>19,64-66</sup>

İyi çalışma şartlarına uygun laboratuvarlarda günümüze kadar juvenil toksikoloji araştırmalarında genetiği değiştirilmiş hayvanların kullanıldığına ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır.

## GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ HAYVANLARIN KANSER ARAŞTIRMALARINDA KULLANIMI

İnsanlardaki kanser riskinin belirlenebilmesi için fare ve sıçanlarda yapılan 2-yıl süreli çalışmaların hem pahalı hem de yetersiz olduğu ifade edilmektedir.<sup>67</sup> Tümörün oluşumunun başlama ve ilerleme mekanizması oldukça karmaşık olup, genellikle genetik, epigenetik, çevre, yaş, kansere neden olan etkenin maruziyet şekli ve biyoyararlanım gibi faktörlere bağlıdır. Ayrıca, kanser modeli için kullanılan hayvanlar genellikle tümörlerin özel spontan genetik değişimlerini sağlamak için üzerinde aşırı zaman ayırarak çalışılıp üretilen melez ırklar olup, geliştirilme süreçlerinde bağışıklık sistemlerinde mutasyonlar oluşabilmektedir. Dolayısıyla mevcut rodent modellerinin, insanların heterojen yapısı ile tür farklılıkları göz önüne alındığında, insanlarda oluşması beklenen tümör vakalarını tam olarak yansıtamadığı bildirilmiştir.<sup>68</sup>

Mevcut modellerin yetersizliği nedeni ile bunların yerini alacak genetiği değiştirilmiş hayvanların geliştirilmesi için ilk adımı multisektörel katılımlı bir organizasyon olan ABD Uluslararası Yaşam Bilimleri Enstitüsü/Sağlık ve Çevre Bilimler Enstitüsü [International Life Sciences Institute/Health and Environmental Sciences Institute (ILSI/HESI)] atmıştır. ILSI, 21 kimyasal bileşiği p53<sup>+/-</sup> knock-out, Tg.AC, rasH2, XPA ve XPA<sup>-/-</sup>/p53<sup>+/-</sup> olmak üzere 5 genetiği değiştirilmiş fare modelinde test ederek sonuçlarını yayımlamıştır.<sup>69-72</sup>

Oldukça karmaşık sonuçların elde edildiği bu modellerde ILSI/HESI'ya göre hepsinin yabancı tip rodentlerde yapılan 2-yıllık kanser testlerine alternatif olabileceği sonucuna varılmıştır. p53<sup>+/-</sup> knock-out farelerin bu amaçla kullanılabilmesi daha önce ABD Ulusal Toksikoloji Programı [National Toxicology Program (NTP)] tarafından da desteklenmiştir. Ancak NTP, Tg.AC modelinin kullanılmasını desteklemediği için bu sonuç adı geçen fareler için hâlen şüpheyle karşılanmaktadır.<sup>73</sup> Yapılan değerlendirmelere göre genel olarak kullanılan GDF modelleri pozitif ve negatif kanserojenlerin çoğunluğunun belirlenmesinde başarılı olmuş ve alışılmış 2-yıllık denemelerden daha çok özgünlük göstermiştir. Ancak insan organları için tümörün özgünlüğünün belirleyici olmadığı ve etki şekli veya doz-yanıt eğrisinde yeterli bilgi sağlayamayacağı ifade edilmiştir.<sup>67</sup> Kanser testleri için bu GDF modellerinin dezavantajları olarak bilinen insan kanserojenleri için yanlış negatif sonuç vermesi, genotoksik olmayan kanserojenleri tam olarak belirleyememesi ve bu GDF'ler için kullanılan yabancı ırkların yaşamları boyunca tümör ve tümör olmayan lezyonlarına yönelik verilerin yokluğu olarak bildirilmiştir.<sup>68</sup> Buna rağmen sıçanlardaki 2-yıllık testlerle birlikte GDF'lerde yapılan kısa süreli testlerde oldukça başarılı sonuçlar alınmış olup, bu şekildeki kombine kullanım sonucunda GDF'ler için elde edilen veriler biriktirilerek daha sonraki kullanımlar için zayıf ve güçlü tarafları ortaya konulmuştur. Aynı şekilde Avrupa Kimyasallar Ajansı ile ABD Çevre Koruma Örgütünün de GDF'lerin kanser testlerinde kullanılmasının önemini yadsımadığı, ancak şimdilik bunları 2-yıllık testlere alternatif olarak değil, yalnızca ilave bilgi sağlamak üzere kabul ettiği bildirilmiştir.<sup>74</sup>

Görüldüğü gibi iki yıllık testlerde olduğu gibi GDF modelleri de insanlardaki kanser riskini tam olarak belirleyememektedir. Ama toksikolojik testlerde genetiği değiştirilmiş hayvan kullanımı, klasik toksikolojik testlerle karşılaştırıldığında daha hızlı sonuç alma, çalışma maliyetlerinin azaltılması ve bunun için daha az hayvan kullanılması gibi avantajlara sahip olduğu belirtilmelidir. Örneğin; kanser testlerinde yabancı modellerde standart 2 yıl süren yedirme denemelerinin genetiği değiştirilmiş

hayvanlar kullanıldığında 24-26 haftada tamamlanabildiği bildirilmiştir. Böylece toksikoloji testlerinde bu tip hayvanların kullanılmasıyla tümörlerin başlaması ve gelişmesindeki mekanizmalar daha kolay anlaşılabilenekte, kansere neden olan maddelerin tümör yanıtına katkı koyan yollar ile bunların kansere neden olan dozları hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir.<sup>1</sup> Bununla birlikte, daha önce belirtilen dezavantajlarından dolayı kullanımı bugün için oldukça sınırlıdır. ABD Gıda ve İlaç İdaresine ilaç tescili için yapılan başvurularda, bu tip farelerin sınırlı bir şekilde kullanıldığı ve bu raporlarda en çok kullanılan GDF modelinin rasH2 ve daha az olarak da p53<sup>+/-</sup> tip modeller olduğu, Tg.AC ve XPA<sup>-/-</sup>p53<sup>+/-</sup> modellerinin ise sadece birkaç çalışmayla sınırlı olduğu bildirilmiştir.<sup>27,67</sup> Aynı durumun, büyük olasılıkla hayvan haklarına olan duyarlılığın fazla olması ve çeşitli etik nedenlerle AB için de söz konusu olduğu belirtilmiştir.<sup>75</sup> Ancak konuyla ilgili olarak uygun kanser modelleri geliştirme çalışmalarının ILSI/HESI, NTP ve diğer organizasyonlar tarafından araştırılması ve test edilmesine devam edilmektedir.

## SONUÇ

Tıp, biyoloji, hayvancılık gibi yaşam bilimleri içinde geniş uygulama alanı bulan genetiği değiştirilmiş hayvanlar, çok kısa bir süre içerisinde moleküler düzeydeki temel araştırmalarda karmaşık biyolojik süreçleri aydınlatmada güçlü araçlar olduğu kanıtlanmıştır. Böylece yeni bilgilerin kazandırılması, genetik şifrenin çözülmesi, fizyolojik sistemlerin genetik kodunun öğrenilmesi, genetik olarak hastalık modellerinin geliştirilmesi, yeni özellikli hayvanlar ve hayvansal ürünlerin üretilmesi konusunda gelecekte de oldukça geniş bir şekilde kullanılacağı öngörülebilmektedir. Ancak, günümüzde türlerin "tür" olma özelliğini korumak için binlerce yılda oluşturduğu üreme-çoğalma engellerini kırmak, böylece farklı türler, hatta familyalar arasında gen aktarımı yapmak olan modern biyoteknoloji, gerçekleştirdiği işlemle doğaya ve kendi orijinal türüne yabancı yeni çeşitler üretmeye-çoğaltmaya başlamıştır. Olayın etik boyutunun dışında genetiği değiştirilmiş ürünlerin ve metabolik artıklarının kısa ve uzun vadede ekosistem üzerinde

nasıl bir etki yapacağı da henüz bilinmemektedir. Bu nedenle çevreye ve gelecek nesillere olabilecek risklerin en aza indirilmesi ve bunun için gerekli biyo-güvenlik önlemlerinin alınması önemle üzerinde durulması gereken bir durumdur.

### Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması veya finansal destek bildirmemiştir.

### Yazar Katkıları

**Fikir/Kavram:** Araştırma ve/veya makalenin hipotezini veya fikrini oluşturmak; Ayhan Filazi ve Leyla Özhanç; **Tasarım:** So-

**nuçlara ulaşılmasını sağlayacak yöntemi tasarlamak:** Ayhan Filazi ve Leyla Özhanç; **Denetleme/Danışmanlık:** Araştırmanın/çalışmanın yürütülmesini organize etmek, ilerlemesini gözetmek ve sorumluluğunu almak; Ayhan Filazi ve Leyla Özhanç; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Hastaların takibi, ilgili biyolojik materyallerin toplanması, verilerin düzenlenmesi ve raporlanması, deneylerin yapılması için sorumluluk almak; Ayhan Filazi ve Leyla Özhanç; **Analiz ve/veya Yorum:** Bulguların mantıklı bir şekilde değerlendirilerek sonuçlandırılmasında sorumluluk almak; Ayhan Filazi ve Leyla Özhanç; **Kaynak Taraması:** Çalışma için gerekli kaynak taramasında sorumluluk almak; Ayhan Filazi ve Leyla Özhanç; **Makalenin Yazımı:** Çalışmanın tamamının ya da önemli bölümlerinin yazılmasında sorumluluk almak; Ayhan Filazi ve Leyla Özhanç.

## KAYNAKLAR

- Filazi A, İnce S. [Genetically modified organisms]. *Vet Hekim Der Derg* 2006;77(2):22-8.
- Bolon B. Genetically engineered animals in drug discovery and development: a maturing resource for toxicologic research. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004;95(4):154-61.
- Schuh JCL. Genetically modified animal models. In: Gad SC, ed. *Animal Models in Toxicology 3rd ed.* Boca Raton London, New York: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2015. p.935-50.
- Çorum O, Yazar E. [Transgenic animals as disease model]. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci Pharmacol Toxicol-Special Topics* 2015;1(1): 26-31.
- Rudolph U, Möhler H. Genetically modified animals in pharmacological research: future trends. *Eur J Pharmacol* 1999;375(1-3):327-37.
- Jaenisch J, Mintz B. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974;71(4):1250-4.
- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77(12): 7380-4.
- Bağış H. [Production of transgenic rodent]. Yücel O, editör. *Küçük Deneysel Hayvanlarından Rat*. 1. Baskı. Ankara: Journal of Clinical and Analytical Medicine Yayınları; 2012. p.80-5.
- Vandamme TF. Rodent models for human diseases. *Eur J Pharmacol* 2015;759:84-9.
- Murakami T, Kobayashi E. GFP-transgenic animals for in vivo imaging: rats, rabbits, and pigs. In: Hoffman RM, ed. *In Vivo Cellular Imaging Using Fluorescent Proteins: Methods and Protocols*. Vol. 872. 1sted. New York: Springer Science+Business Media; 2012. p.177-89.
- Chen Y, Niu Y, Ji W. Transgenic nonhuman primate models for human diseases: approaches and contributing factors. *J Genet Genomics* 2012;39(6):247-51.
- Hong SG, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Park JE, Kang JT, et al. Generation of red fluorescent protein transgenic dogs. *Genesis* 2009;47(5): 314-22.
- Luo Y, Kofod-Olsen E, Christensen R, Sørensen CB, Bolund L. Targeted genome editing by recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors for generating genetically modified pigs. *J Genet Genomics* 2012;39(6):269-74.
- Zheng S, Ghehman K, Shenoy S, Li C. Retake the center stage--new development of rat genetics. *J Genet Genomics* 2012;39(6):261-8.
- Hasegawa M, Kawai K, Mitsui T, Taniguchi K, Monnai M, Wakui M, et al. The reconstituted 'humanized liver' in TK-NOG mice is mature and functional. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;405(3):405-10.
- Howell VM. Sleeping beauty--a mouse model for all cancers? *Cancer Lett* 2012;317(1):1-8.
- Largaespada DA. Transposon mutagenesis in mice. In: Kühn R, Würst W, eds. *Gene Knock-out Protocols*. 2nd ed. Vol. 530. Clifton, N.J: Humana Press; 2009. p.379-90.
- Bothe GW, Bolivar VJ, Vedder MJ, Geistfeld JG. Genetic and behavioral differences among five inbred mouse strains commonly used in the production of transgenic and knockout mice. *Genes Brain Behav* 2004;3(3):149-57.
- Bugelski PJ, Herzyk DJ, Rehm S, Harmsen AG, Gore EV, Williams DM, et al. Preclinical development of keliximab, a Primatized anti-CD4 monoclonal antibody, in human CD4 transgenic mice: characterization of the model and safety studies. *Hum Exp Toxicol* 2000;19(4):230-43.
- White JK, Gerdin AK, Karp NA, Ryder E, Buljan M, Bussell JN, et al. Genome-wide generation and systematic phenotyping of knockout mice reveals new roles for many genes. *Cell* 2013;154(2):452-64.
- Politi K, Pao W. How genetically engineered mouse tumor models provide insights into human cancers. *J Clin Oncol* 2011;29(16): 2273-81.
- Roper J, Hung KE. Priceless GEMMs: genetically engineered mouse models for colorectal cancer drug development. *Trends Pharmacol Sci* 2012;33(8):449-55.
- Shultz LD, Brehm MA, Garcia-Martinez JV, Greiner DL. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nat Rev Immunol* 2012;12(11):786-98.
- Car BD, Eng VM. Special considerations in the evaluation of the hematology and hemostasis of mutant mice. *Vet Pathol* 2001;38(1):20-30.
- Greiner DL, Brehm MA, Hosur V, Harlan DM, Powers AC, Shultz LD. Humanized mice for the study of type 1 and type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1245:55-8.
- Sabbagh JJ, Kinney JW, Cummings JL. Animal systems in the development of treatments for Alzheimer's disease: challenges, methods, and implications. *Neurobiol Aging* 2013;34(1): 169-83.
- Boverhof D R, Chamberlain MP, Elcombe CR, Gonzalez FJ, Heflich RH, Hernández LG, et al. Transgenic animal models in toxicology: historical perspectives and future outlook. *Toxicol Sci* 2011;121(2):207-33.

28. Gil-Mohapel JM. Screening of therapeutic strategies for Huntington's disease in YAC128 transgenic mice. *CNS Neurosci Ther* 2012; 18(1):77-86.
29. Ledent C, Vaugeois JM, Schiffmann SN, Pedrazzini T, El Yacoubi M, Vanderhaeghen JJ, et al. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature* 1997;388(6643):674-8.
30. MacMillan LB, Hein L, Smith MS, Piascik MT, Limbird LE. Central hypotensive effects of the alpha2a-adrenergic receptor subtype. *Science* 1996;273(5276):801-3.
31. Link RE, Desai K, Hein L, Stevens ME, Chruscinski A, Bernstein D, et al. Cardiovascular regulation in mice lacking alpha2-adrenergic receptor subtypes b and c. *Science* 1996; 273(5276):803-5.
32. Lakhani PP, MacMillan LB, Guo TZ, McCool BA, Lovinger DM, Maze M, et al. Substitution of a mutant alpha2a-adrenergic receptor via "hit and run" gene targeting reveals the role of this subtype in sedative, analgesic, and anesthetic-sparing responses in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(18):9950-5.
33. Sallinen J, Haapalinna A, Viitamaa T, Kobilka BK, Scheinin M. Adrenergic alpha2C-receptors modulate the acoustic startle reflex, prepulse inhibition, and aggression in mice. *J Neurosci* 1998;18(8):3035-42.
34. Hunter JC, Fontana DJ, Hedley LR, Jasper JR, Lewis R, Link RE, et al. Assessment of the role of alpha2-adrenoceptor subtypes in the antinociceptive, sedative and hypothermic action of dexmedetomidine in transgenic mice. *Br J Pharmacol* 1997;122(7):1339-44.
35. Wieland HA, Lüddens H, Seeburg PH. A single histidine in GABAA receptors is essential for benzodiazepine agonist binding. *J Biol Chem* 1992;267(3):1426-9.
36. Kleingoor C, Wieland HA, Korpi ER, Seeburg PH, Kettenmann H. Current potentiation by diazepam but not GABA sensitivity is determined by a single histidine residue. *Neuroreport* 1993; 4(2):187-90.
37. Benson JA, Löw K, Keist R, Mohler H, Rudolph U. Pharmacology of recombinant gamma-aminobutyric acidA receptors rendered diazepam-insensitive by point-mutated alpha-subunits. *FEBS Lett* 1998;431(3):400-4.
38. Reichardt HM, Kaestner KH, Tuckermann J, Kretz O, Wessely O, Bock R, et al. DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* 1998;93(4):531-41.
39. Vayssière BM, Dupont S, Choquart A, Petit F, Garcia T, Marchandeau C, et al. Synthetic glucocorticoids that dissociate transactivation and AP-1 transrepression exhibit antiinflammatory activity in vivo. *Mol Endocrinol* 1997;11(9): 1245-55.
40. Offermanns S, Toombs CF, Hu YH, Simon MI. Defective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice. *Nature* 1997;389(6647):183-6.
41. Ganten D, Wagner J, Zeh K, Bader M, Michel JB, Paul M, et al. Species specificity of renin kinetics in transgenic rats harboring the human renin and angiotensinogen genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(16):7806-10.
42. Kitamoto T, Nakamura K, Nakao K, Shibuya S, Shin RW, Gondo Y, et al. Humanized prion protein knock-in by Cre-induced site-specific recombination in the mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;222(3):742-7.
43. Stacey A, Schnieke A, McWhir J, Cooper J, Colman A, Melton DW. Use of double-replacement gene targeting to replace the murine alpha-lactalbumin gene with its human counterpart in embryonic stem cells and mice. *Mol Cell Biol* 1994;14(2):1009-16.
44. Stacey A, Schnieke A, Kerr M, Scott A, McKee C, Cottingham I, et al. Lactation is disrupted by alpha-lactalbumin deficiency and can be restored by human alpha-lactalbumin gene replacement in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(7):2835-9.
45. Finger S, Heavens RP, Sirinathsinghji DJ, Kuehn MR, Dunnett SB. Behavioral and neurochemical evaluation of a transgenic mouse model for Lesch-Nyhan syndrome. *J Neurol Sci* 1988;86(2-3):203-13.
46. Jinnah HA, Wojcik BE, Hunt M, Narang N, Lee KY, Goldstein M, et al. Dopamine deficiency in a genetic mouse model of Lesch-Nyhan disease. *J Neurosci* 1994;14(3 Pt 1):1164-75.
47. Engle SJ, Womer DE, Davies PM, Boivin G, Sahota A, Simmonds HA, et al. HPRT-APRT deficient mice are not a model for Lesch-Nyhan syndrome. *Hum Mol Genet* 1996;5(10): 1607-10.
48. Ghanayem BI, Wang H, Sumner S. Using cytochrome P-450 gene knock-out mice to study chemical metabolism, toxicity and carcinogenicity. *Toxicol Pathol* 2000;28(6):839-50.
49. Salama G, London B. Mouse models of long QT syndrome. *J Physiol* 2007;578(Pt 1):43-53.
50. Baron RM, Choi AJ, Owen CA, Choi AM. Genetically manipulated mouse models of lung disease: potential and pitfalls. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012;302(6):L485-97.
51. Mead RJ, Bennett EJ, Kennerley AJ, Sharp P, Sunyach C, Kasher P, et al. Optimised and rapid pre-clinical screening in the SOD1(G93A) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *PLoS One* 2011;6(8):e23244.
52. Wahnschaffe U, Bitsch A, Kielhorn J, Mangelsdorf I. Mutagenicity testing with transgenic mice. Part I: Comparison with the mouse bone marrow micronucleus test. *J Carcinog* 2005; 4(1):3.
53. Elder GA, Gama Sosa MA, De Gasperi R. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med* 2010;77(1):69-81.
54. Casal M, Haskins M. Large animal models and gene therapy. *Eur J Hum Genet* 2005;14(3): 266-72.
55. Grompe M, Lindstedt S, al-Dhalimy M, Kennaway NG, Papaconstantinou J, Torres-Ramos CA, et al. Pharmacological correction of neonatal lethal hepatic dysfunction in a murine model of hereditary tyrosinemia type I. *Nat Genet* 1995;10(4):453-60.
56. Overturf K, al-Dhalimy M, Ou CN, Finegold M, Tanguay R, Lieber A, et al. Adenovirus-mediated gene therapy in a mouse model of hereditary tyrosinemia type I. *Hum Gene Ther* 1997; 8(5):513-21.
57. Overturf K, al-Dhalimy M, Manning K, Ou CN, Finegold M, Grompe M. Ex vivo hepatic gene therapy of a mouse model of Hereditary Tyrosinemia Type I. *Hum Gene Ther* 1998;9(3): 295-304.
58. Howell JM, Fletcher S, Kakulas BA, O'Hara M, Lochmuller H, Karpati G. Use of the dog model for Duchenne muscular dystrophy in gene therapy trials. *Neuromuscul Disord* 1997;7(5):325-8.
59. Narfström K, Katz ML, Bragadottir R, Seeliger M, Boulanger A, Redmond TM, et al. Functional and structural recovery of the retina after gene therapy in the RPE65 null mutation dog. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(4):1663-72.
60. Singh M, Couto SS, Forrest WF, Lima A, Cheng JH, Molina R, et al. Anti-VEGF antibody therapy does not promote metastasis in genetically engineered mouse tumour models. *J Pathol* 2012;227(4):417-30.
61. Moser R, Quesniaux V, Ryffel B. Use of transgenic animals to investigate drug hypersensitivity. *Toxicology* 2001;158(1-2):75-83.
62. Cai S, Wang H, Bailey B, Ernstberger A, Juliar BE, Sinn AL, et al. Humanized bone marrow mouse model as a preclinical tool to assess therapy-mediated hematotoxicity. *Clin Cancer Res* 2011;17(8):2195-206.
63. Bussiere JL, Martin P, Horner M, Couch J, Flaherty M, Andrews L, et al. Alternative strategies for toxicity testing of species-specific biopharmaceuticals. *Int J Toxicol* 2009;28(3):230-53.
64. Enright BP, Davila DR, Tornesi BM, Blaich G, Hoberman AM, Gallenberg LA. Developmental and reproductive toxicology studies in IL-12p40 knockout mice. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2011;92(2):102-10.
65. Sakurai T, Takai R, Bürgin H, Ishihara K, Sakamoto Y, Amano J, et al. The effects of interleukin-6 signal blockade on fertility, embryofetal development, and immunization in vivo. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2012;95(4):304-17.

66. Herzyk DJ, Bugelski PJ, Hart TK, Wier PJ. Practical aspects of including functional endpoints in developmental toxicity studies. Case study: immune function in HuCD4 transgenic mice exposed to anti-CD4 MAb in utero. *Hum Exp Toxicol* 2002;21(9-10):507-12.
67. Jacobson-Kram D, Sistare FD, Jacobs AC. Use of transgenic mice in carcinogenicity hazard assessment. *Toxicol Pathol* 2004;(32 Suppl 1):49-52.
68. Maronpot RR, Flake G, Huff J. Relevance of animal carcinogenesis findings to human cancer predictions and prevention. *Toxicol Pathol* 2004;(32 Suppl 1):40-8.
69. Storer RD, French JE, Haseman J, Hajian G, LeGrand EK, Long GG, et al. P53+/- hemizygous knockout mouse: overview of available data. *Toxicol Pathol* 2001;(29 Suppl):30-50.
70. Eastin WC, Mennear JH, Tennant RW, Stoll RE, Bransetter DG, Bucher JR, et al. Tg.AC genetically altered mouse: assay working group overview of available data. *Toxicol Pathol* 2001;(29 Suppl):60-80.
71. Usui T, Mutai M, Hisada S, Takoaka M, Soper KA, McCullough B, et al. CB6F1-rasH2 mouse: overview of available data. *Toxicol Pathol* 2001;(29 Suppl):90-108.
72. van Kreijl CF, McAnulty PA, Beems RB, Vynckier A, van Steeg H, Fransson-Steen R, et al. Xpa and Xpa/p53+/- knockout mice: overview of available data. *Toxicol Pathol* 2001;(29 Suppl):117-27.
73. Bucher JR. Update on national toxicology program (NTP) assays with genetically altered or "transgenic" mice. *Environ Health Perspect* 1998;106(10):619-21.
74. Wells MY, Williams ES. The transgenic mouse assay as an alternative test method for regulatory carcinogenicity studies--implications for REACH. *Regul Toxicol Pharmacol* 2009; 53(2):150-5.
75. Friedrich A, Olejniczak K. Evaluation of carcinogenicity studies of medicinal products for human use authorised via the European centralised procedure (1995-2009). *Regul Toxicol Pharmacol* 2011;60(2):225-48.