

TEMEL DENEYSEL ARAŞTIRMA YÖNTEMLERİ NELERDİR?

Figen Deveci

Fırat Ün Tıp Fak Göğüs Hast AD

fgndeveci@yahoo.com

Sunu Planı

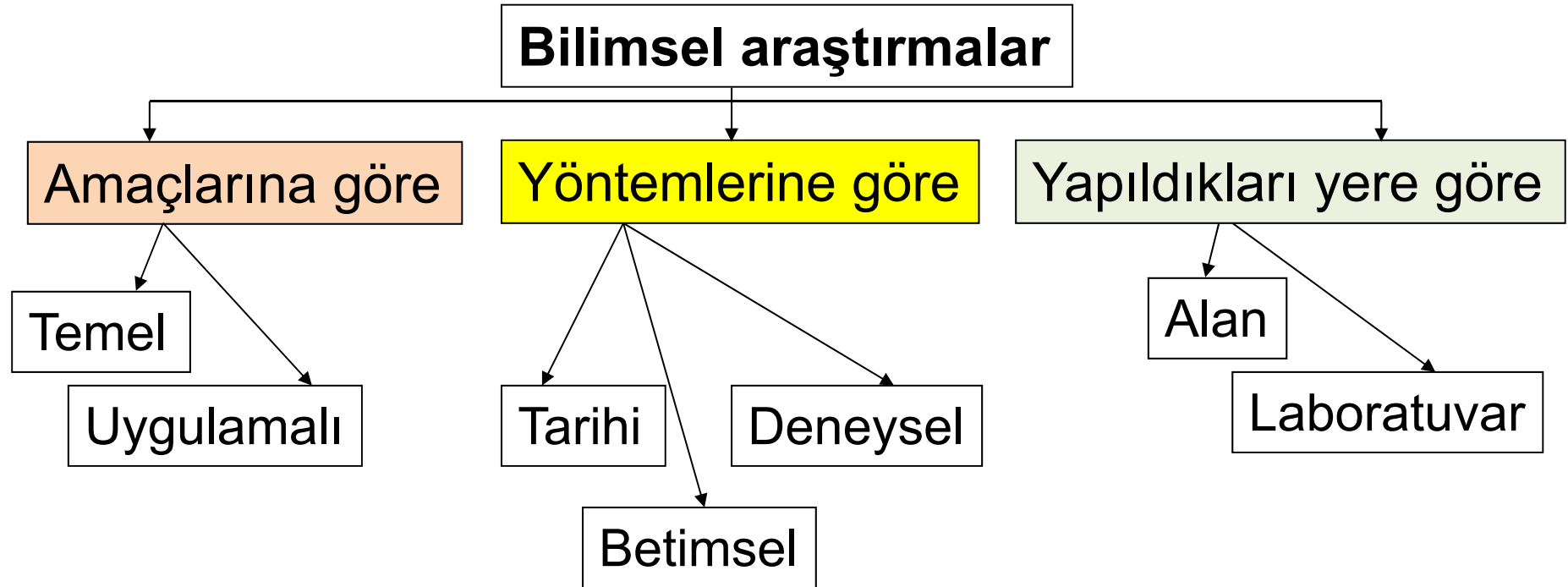
I. Araştırma yöntemlerinin sınıflanması

II. Deneysel araştırma

III. Deneysel Hayvanları üzerindeki *in-vivo* araştırmalar

IV. *In-vitro* çalışmalar

Amacına Göre	Yöntemine Göre
<ul style="list-style-type: none">• Temel Araştırmalar• Uygulamalı Araştırmalar• Laboratuvar Araştırmaları• Deneysel Araştırmalar	<ul style="list-style-type: none">• Tarihsel Araştırmalar• Tanımlayıcı Araştırmalar• Sonuç Çıkarıcı Araştırmalar



NİTELİKSEL (Qualitative)

- Niçin? Nasıl? Ne şekilde sorularına yanıt arar
- Sayısal ve ölçmeye dayalı değerlendirmeleri içermez

NİCELİKSEL (Quantitative)

- Ne kadar? Ne miktarda? Ne kadar sık, Ne kadar yaygın? sorularına yanıt arar
- Ölçüme dayalı, gruplar arası objektif ve sayısal karşılaştırmalar yapabilen

Sayısal yöntem
Gözlem ve ölçmeye dayalı
Tekrarlanabilen
Objektif

Epidemiyolojik Araştırma Tipleri

NİCELİKSEL

Nedir?

GÖZLEMSEL

Tanımlayıcı

Kişi, zaman ve yer özelliklerine göre tanımlama

- Olgu sunumu/serisi
- Kesitsel (cross-sectional)

Analitik

- Olgu-kontrol
- Kohort
- Kesitsel

Ne olur?

DENEYSEL

Hayvan Deneylei

Müdahale araştırmaları

- Profilaktik önlemler (Alan)
- Terapotik önlemler (Klinik)

METODOLOJİK

- Teşhis ve tarama yöntemlerinin geçerlilik ve güvenilirlik analizi
- Ölçüm ve gözlemlerin güvenilirliğini belirlemeye yönelik araştırmalar

Sağlık sorunlarını ve boyutlarını saptama-
Deskriptif Araştırma

Sorunların nedenlerini belirleme-
Analitik Araştırmalar

Sorunların en uygun çözümlerin saptanması-
Deneysel araştırmalar

Deneysel araştırmalar

Bir aşı ve/veya ilacın etkinliğinin değerlendirilmesi çeşitli aşamalardan geğer

1. Preklinik araştırmalar

a. **Laboratuvarda *in-vitro* deneyler**

b. **Deney hayvanları üzerinde *in-vivo* deneyler**

2. Klinik araştırmalar

a. Profilaktik önlemler (Alan)

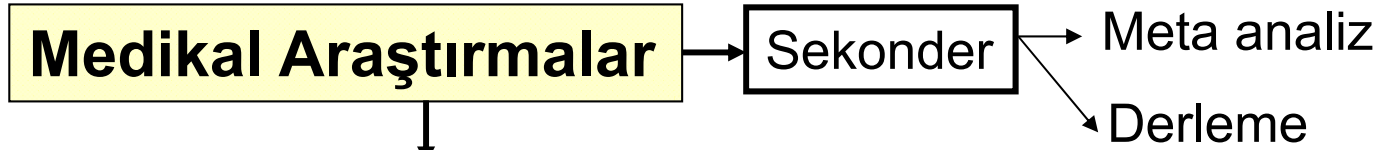
b. **Terapotik önlemler (Klinik)**

Faz I

Faz II

Faz III

Faz IV



Primer

Temel Medikal Araştırmalar

Teorik

Metod geliştirme
(fizik, kimya, biyoloji, biyometrik, psikoloji)

Analitik ölçüm

Görüntüleme

Biyometrik

Test geliştirme

Uygulamalı

Hayvan

Hücre çalışm

Genetik

Biyokimya

Materyal geliştirme

Klinik

Deneysel
(Interventional)

Klinik

Faz I

Faz II

Faz III

Faz IV

Gözlemsel

Tedavi çalışm
(müdahale olmaksızın)

Prognostik

Tanısal

İlaçlarla gözlem

Sekonder veri analizi

Olgu serisi

Olgu sunumu

Epidemiyolojik

Deneysel

Müdahale

Alan

Grup

Gözlemsel

Kohort

Prospektif

Historical

Olgu kontrol

Kesitsel

Ekolojik

Types of Study in Medical Research

Part 3 of a Series on Evaluation of Scientific Publications

Bernd Röhrig, Jean-Baptist du Prel, Daniel Wachtlin, Maria Blettner

3

(Röhrig B, et al.

Dtsch Arztebl Int 2009; 106: 262–8)

Deneysel yöntem,

Laboratuvar ya da laboratuvar dışındaki bir deney düzenlenğinde

Olaylar arasındaki sebep-sonuç ilişkilerini belirlemeyi amaçlayan ve

Araştırmacının önceden öngördüğü hipotezleri test etmeye yarayan bir araştırma yöntemi

DENEYSEL ARAŞTIRMALAR

1-Hayvan deneyleri

2-Müdahale araştırmaları

a. Profilaktik önlemlere yönelik deneysel araştırmalar
(**Alan** alışmaları)

b-Terapötik önlemlere yönelik deneysel araştırmalar
(**Klinik** alışmalar)

1. Preklinik araştırmalar

a. Laboratuarda *in-vitro* deneyler

b. Deney hayvanları üzerindeki *in-vivo* deneyler

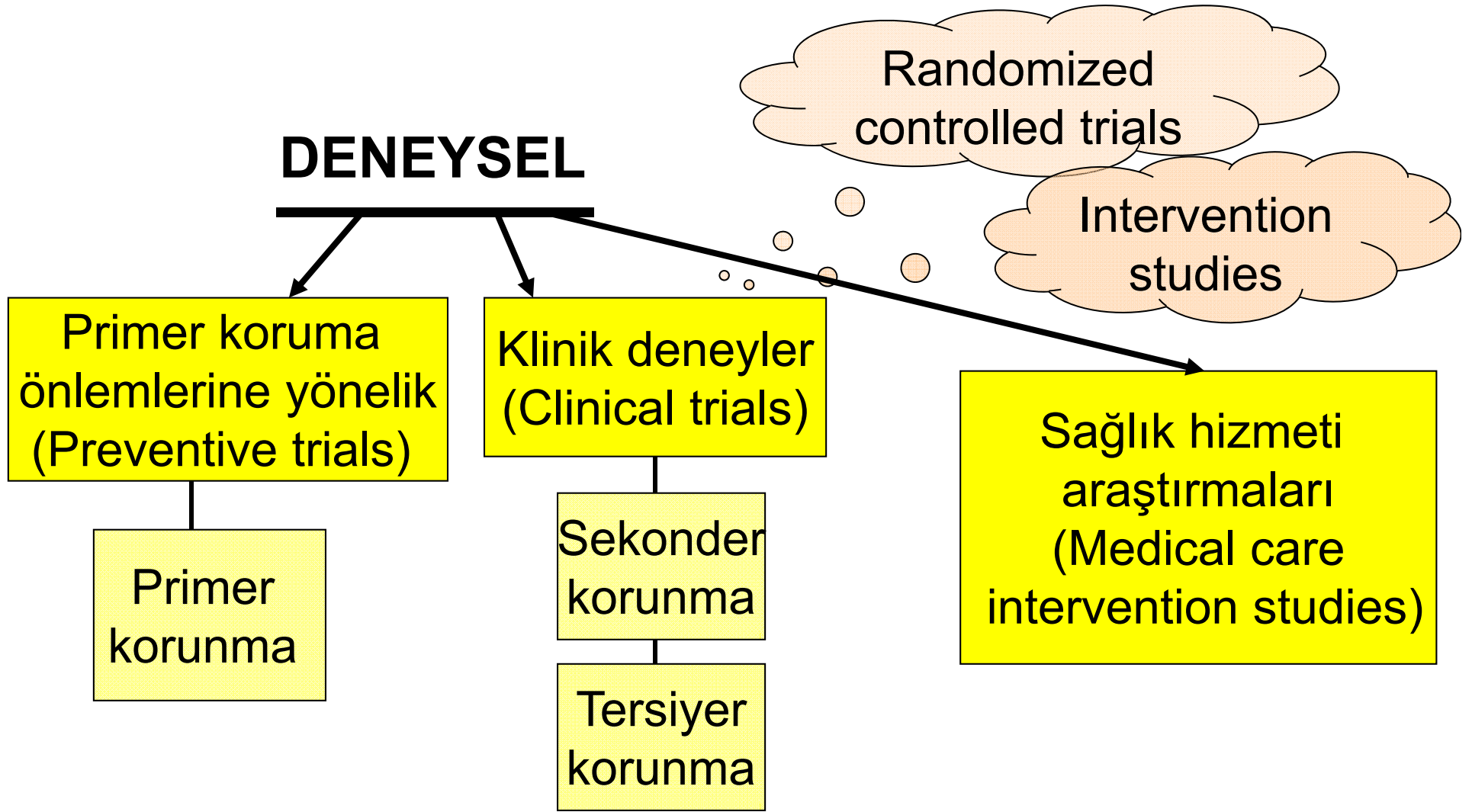
2. Klinik araştırmalar

a. Faz I klinik araştırmalar

b. Faz II klinik araştırmalar

c. Faz III klinik araştırmalar

d. Faz IV klinik araştırmalar



Deneysel araştırmalarda ilk aşamayı genellikle HAYVAN DENEYLERİ oluşturur

Deneysel araştırmalar

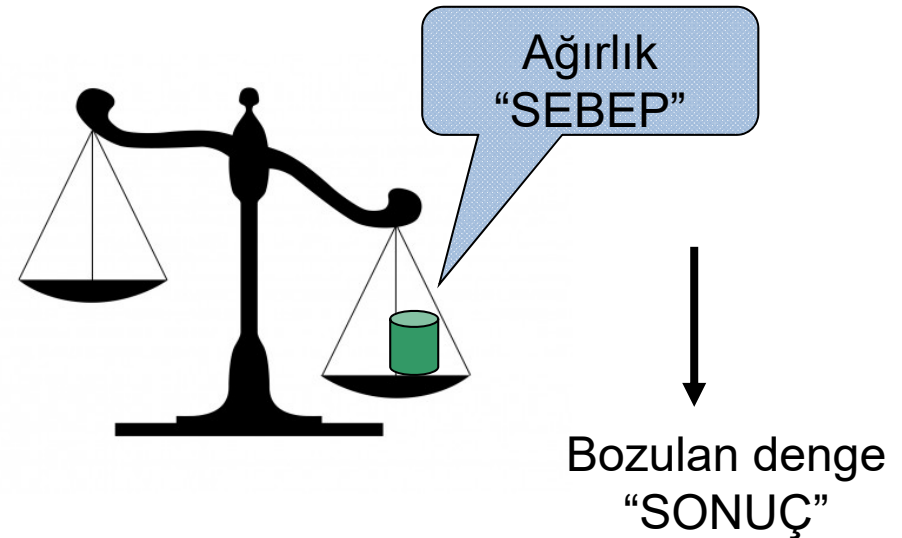
- Araştırmacı artık “gözlemci” değil “**deneyi yapan**”dır
- Müdahale oluşturulur ve sonuç değerlendirilir
 - İlaç
 - Cihaz veya yöntem
 - Önleyici stratejiler
 - Tanısal stratejiler

« **Deneysel yöntem, bilimsel bilgiyi en objektif bir biçimde elde etmeye yarayan bir araştırma yöntemidir** »

Deneysel (Müdahale) Araştırmalar

Deneysel yöntem;

- Laboratuvar ya da laboratuvar dışındaki bir deney düzeneği
- Olaylar arasındaki **sebe-sonuç** ilişkilerini belirlemeyi amaçlar
- Araştırmacının önceden öngördüğü hipotezleri test eden bir yöntem



Deneysel Araştırmalar

- Deneyin sonucunu etkileyebilecek tüm etkenler araştırmacı tarafından kontrol edilmeye çalışılır
- Bağımsız değişken manipüle edilerek bağımlı değişken üzerine etkileri incelenir
- Bu arada sonucu etkileyebilecek tüm diğer değişkenler sabit tutulur ya da randomize edilmeye çalışılır

Deneysel yöntem dendiğinde laboratuvarlar akla gelse de mümkün olan tüm evre ve ortamlarda kullanılabilen bir yöntemdir

Deneysel Araştırmaların

Avantajları

- ✓ Neden-sonuç ilişkisini gösterme imkânı verir
- ✓ Neden olduğu düşünülen olayı deneyci yaratır
- ✓ Sonuç olduğu düşünülen olayın ortaya çıkıp çıkmadığına bakılır
- ✓ Sonuçlar evrene genellenebilir
- ✓ Hafıza faktörünün etkisi en azdır

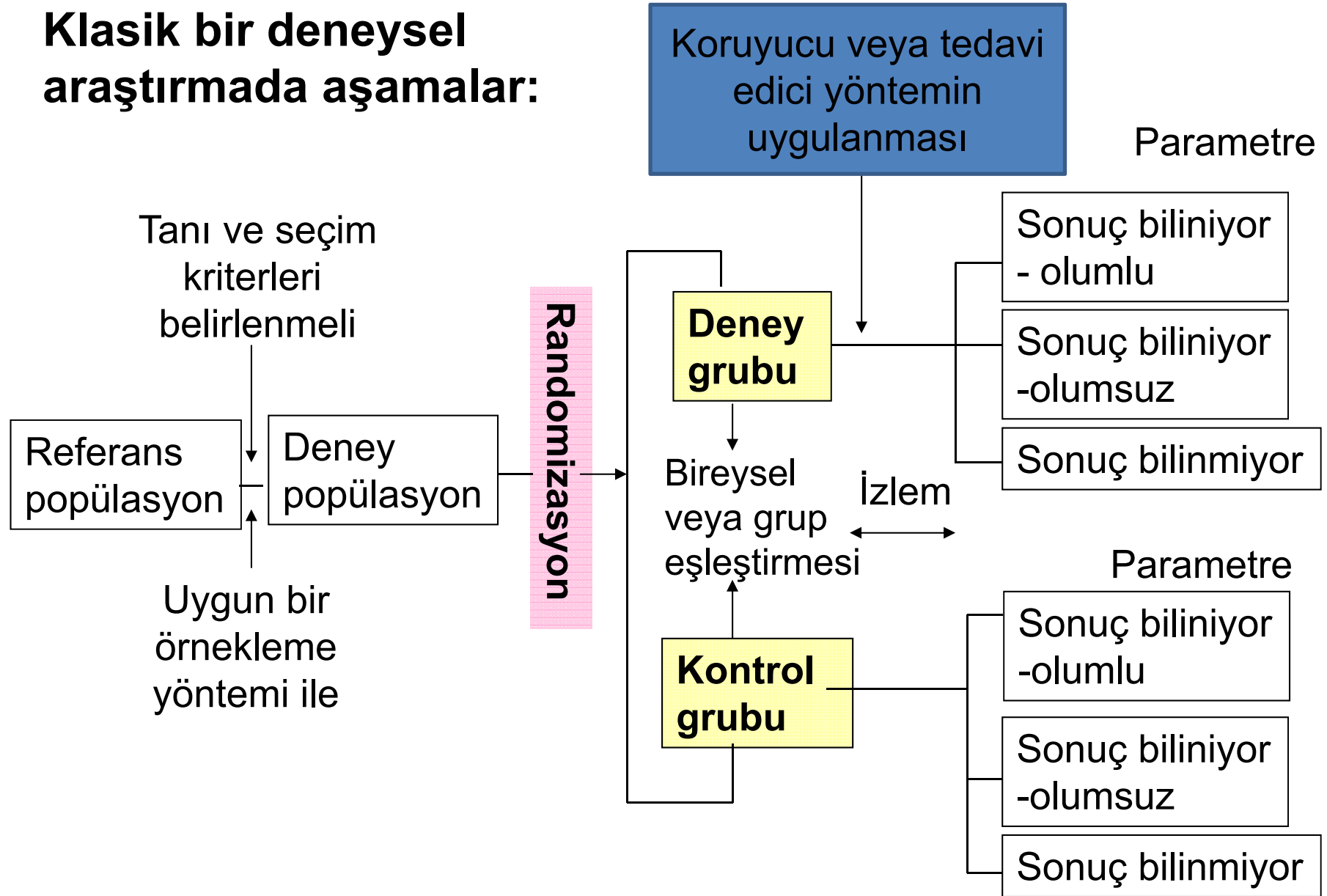
Sakıncaları

- ✓ Uzun zaman alan pahalı ve zor araştırmalar
- ✓ Bazı müdahaleler insanlar üzerinde uygulanamaz
- ✓ Sıklıkla **etik** sorunlar
 - Deney grubuna etkisi yeterince bilinmeyen bir müdahalenin yapılması
 - Kontrol grubunun tedavisiz veya korumasız bırakılması
 - Deney hayvanlarına zarar verilmesi
 - Hayvanlardan elde edilen sonuçların insanlara genellemede güçlükler

DENEYSEL YÖNTEMİN ÖZELLİKLERİ

1. İncelenen faktör (etken, tedavi yöntemi vb) araştırmacının kontrolünde. İsteddiği taktirde değiştirebilir (İlaç dozu gibi)
2. İncelenen faktör dışındaki tüm değişkenler sabit tutulabilir. Araştırılan etkenin “Neden” olup olmadığı kesin olarak saptanabilir.
3. Denekler veya yöntemler deney ve kontrol grubuna rastgele ayrılabilir (Randomizasyon).
4. Neden-sonuç (etken-hastalık) ilişkisi tam ve doğru bir biçimde saptanabilir.
5. Deney ortamı her zaman gerçek hayata uymayabilir. (Özellikle laboratuvar deneylerinde *in vitro* koşullar *in vivo* koşullara tam olarak benzemeyebilir.

Klasik bir deneysel araştırmada aşamalar:



Randomizasyon

Araştırmaya katılacakların deney ve kontrol gruplarına **tarafsız** bir biçimde ayrılmaları

Kişi özellikleri homojen olmalı
Çevre özellikleri benzer olmalı

Rastgele ayırma
“Rastgele sayılar tablosu”



Tabakalama veya bloklara ayırma

Randomize kontrollü klinik ilaç çalışmaları

Rastlantısallığın sağlanması için:

- Katılımcının hangi grupta olduğunu bilmesi engellenebilir: "tek kör"
- Uygulamayı yapan kişinin de bilmesi engellenir: "çift-kör"
- Analizi/değerlendirmeyi yapan kişi de hangi grubun deney ya da kontrol grubunda olduğunu bilmez ("üçlü-kör").

Örneklem büyüklüğünün saptanması:

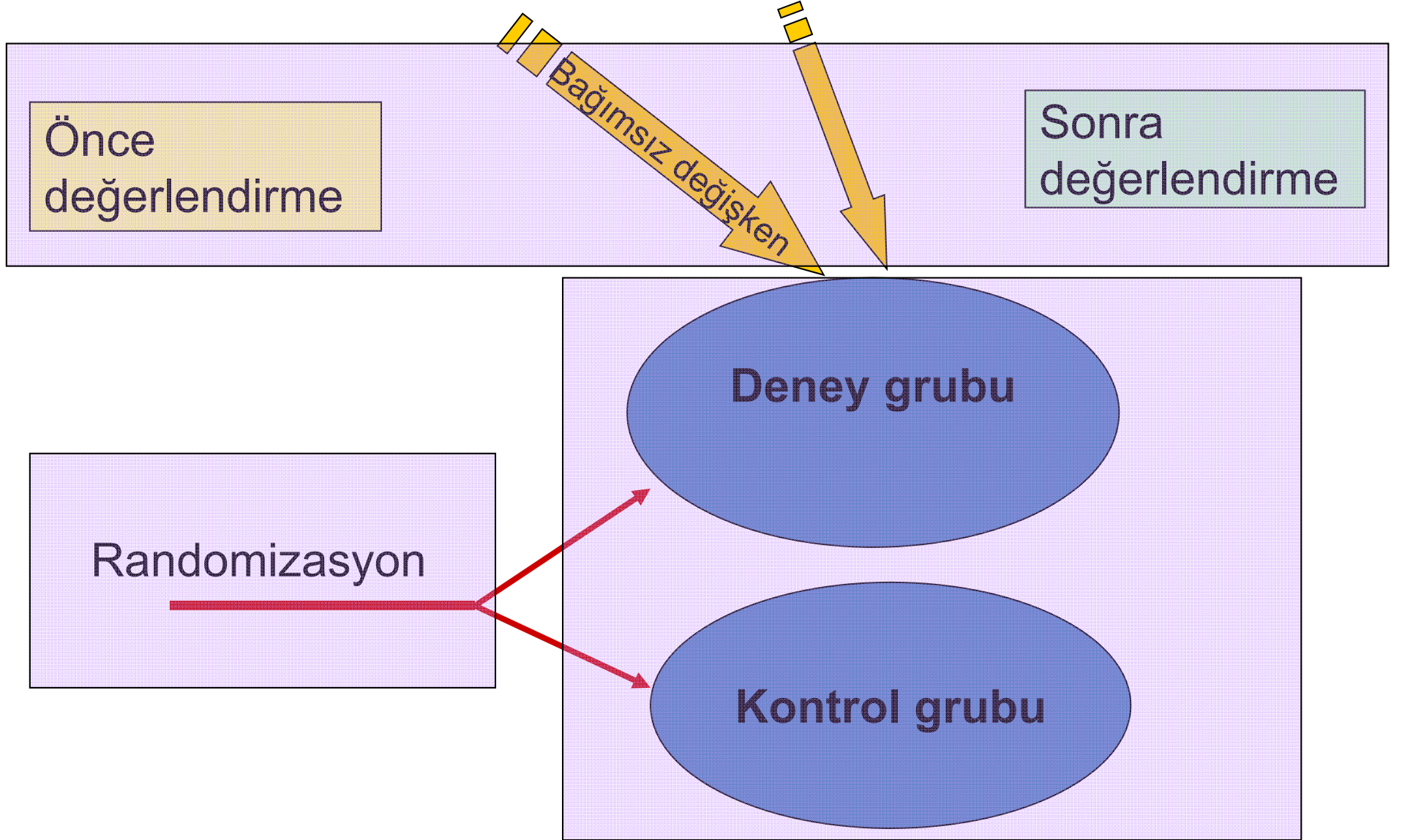
Deney ve kontrol grubunda güvenilir sonuç elde etmek için **en az kaç kişi üzerinde araştırma yapılmalı**

Genellikle daha önce yapılan çalışmaların sonuçları esas alınır

Deney ve kontrol grubunun eşit ya da yakın sayıda olması istenir

Klinikteki deneysel çalışmaların çoğu az sayıda kişi üzerinde yapılmaktadır

Deneysel Araştırma



Deneysel araştırmanın üç temel parçası vardır

Deneyin Bölümleri

Deney grubu: Bağımsız değişken uygulanan grup

Kontrol grubu: Bağımsız değişken uygulanmayan grup

Bağımsız değişken:

- Neden-sonuç ilişkisinde “**neden**” konumunda
- Bağımlı değişken üzerinde etkisi incelenen değişken
- Araştırmacı manipüle eder

Bağımlı değişken:

Neden-sonuç ilişkisinde “**sonuç**” dur

Kontrol değişkenler:

Bağımlı değişkeni etkileme olasılığı bulunan “**öteki olası nedenler**”dir.

Öntest:

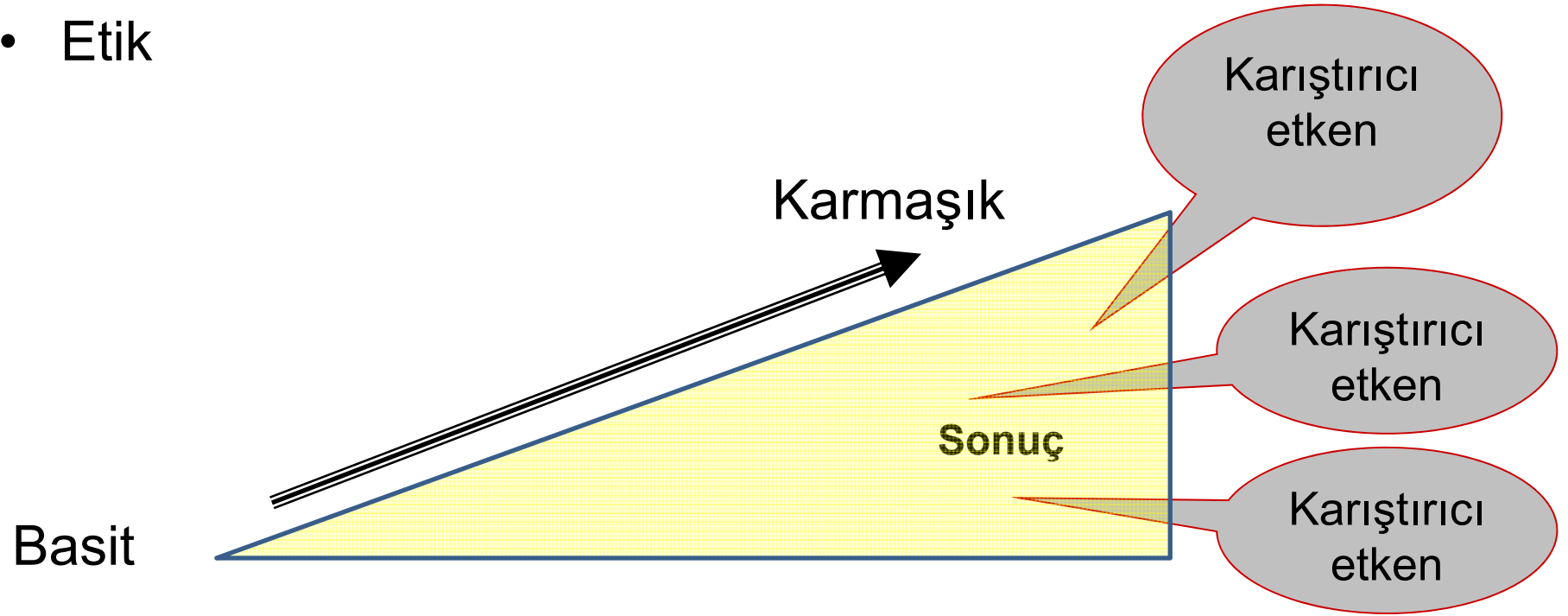
Bağımlı değişkenin müdahale edilmeden önce ölçülmesi

Sontest:

Bağımlı değişkenin müdahale edildikten sonra ölçülmesi

Bağımlı Değişken

- Ölçülebilir
- Basit ve karmaşıklıktan uzak olmalı
- Etik



Bağımsız Değişken

- Gerçek yaşamda pratik anlamı olmalı
 - Uyarıcı düzeyler arasındaki fark yeterince fazla olmalı
-

Ders süresinin birey üzerindeki yorgunluğa etkisi

45 dk

48 dk

45 dk

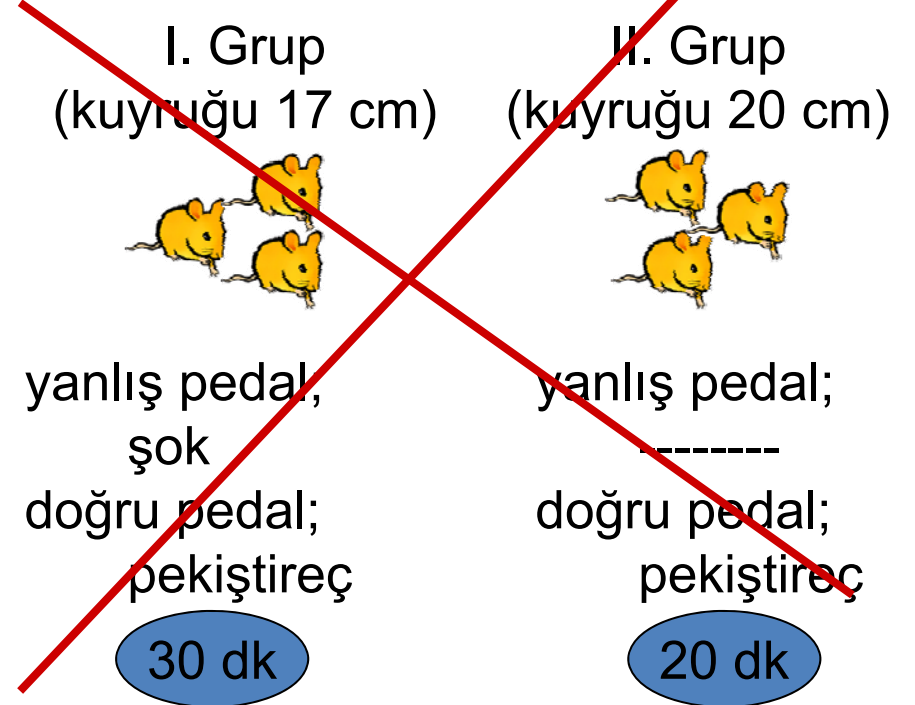
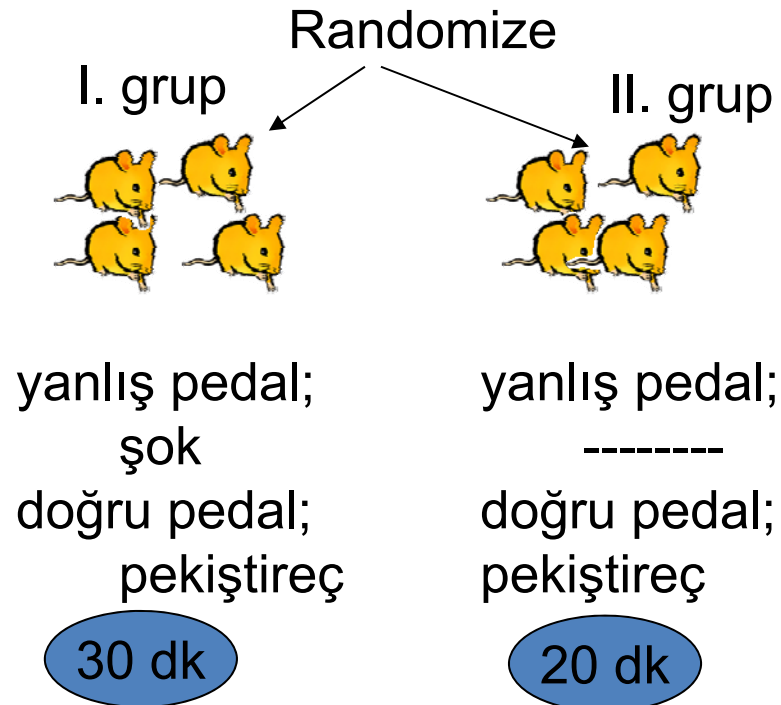
60 dk

Bir araştırmanın deneysel olabilmesi için

- Değişimleme (Bir değişkene ait en az iki farklı miktar)
- Randomizasyon sağlanmalıdır

Bu iki araştırmadan hangisi deneyseldir ?

Farelere, daire sembolü gördükleri zaman sağdaki pedala, kare sembolü gördükleri zaman soldaki pedala basmaları



Çevresel Değişkenler;

Deneğin dışında bulunan değişkenler
(İlaç miktarı, aydınlanma, ısı, nem düzeyi...)

Araştırmacı çevresel değişkenleri manipüle edebilir

Denek Değişkenleri;

Deneğin araştırmaya gelirken getirdiği özellikler
(Yaş, cinsiyet, eğitim düzeyi...)

Değişkenlerin Kontrolü: iç geçerliği artırır

Bir araştırmanın 2 temel hedefi vardır;

1. Bağımsız değişkenin etkisi hakkında gerçekçi bir sonuca ulaşmak (**İç geçerlik**)
2. Araştırmadan elde edilen bulguları evrene genelleyeabilmek (**Dış geçerlik**)
Bulguların genellenebildiği evren büyüdükçe dış geçerlilik artar

Deneysel Desen, araştırmacı tarafından geliştirilen plan
Türleri

Denenmek istenen bağımsız değişken sayısına göre

- Tek değişkenli modeller
- Çok değişkenli modeller

Denemeye katılan grup sayısı, kontrol önlemleri zaman ve sayısının dikkate alındığı

- Deneme öncesi modeller
- Yarı deneme modelleri
- Gerçek deneme modelleri

Deneme öncesi modeller;

- ✓ Tek grup sontest model
- ✓ Tek grup öntest – sontest model
- ✓ Karşılaştırmalı eşitlenmiş grup sontest modeller

Kontrol grubu yok
Gerçek deney olarak kabul edilmez
Elde edilen sonuçlar şüphelidir

Yarı deneme modelleri

- ✓ Zaman dizisi modeli
- ✓ Eşit zaman örnekleme
- ✓ Eşitlenmemiş kontrol grubu model
- ✓ Öntest sontest ayrı örnek grup model
- ✓ Rotasyon modeli

Randomizasyon yok
Bilimsel değer açısından gerçek deneme modellerinden sonra gelir

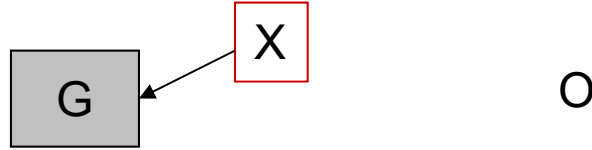
Gerçek deneme modelleri

- ✓ Öntest – sontest kontrol gruplu model
- ✓ Sontest kontrol gruplu model
- ✓ Solomon dört grup modeli

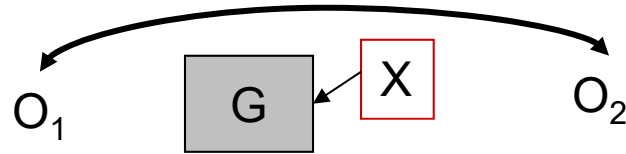
Deneme öncesi modeller;

G; grup
R; randomizasyon
X; bağımsız değişken düzeyi
O; ölçüm, gözlem

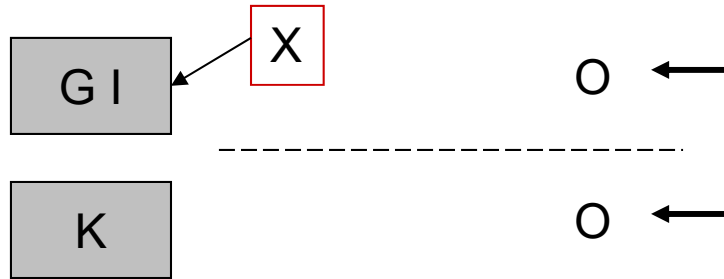
Tek grup sadece son test tasarımı



Tek grup öntest – sontest model



Statik grup karşılaştırması

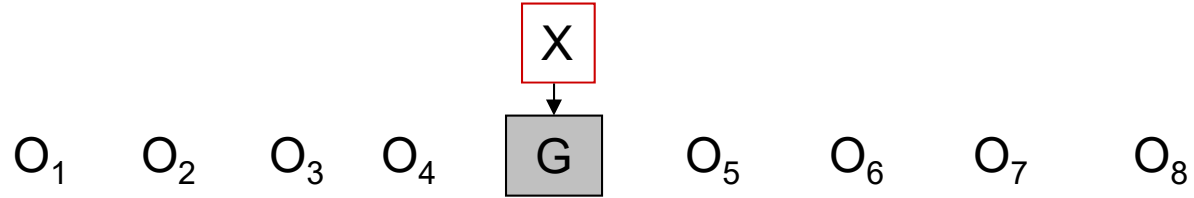


Gerçek deney olarak kabul edilmez

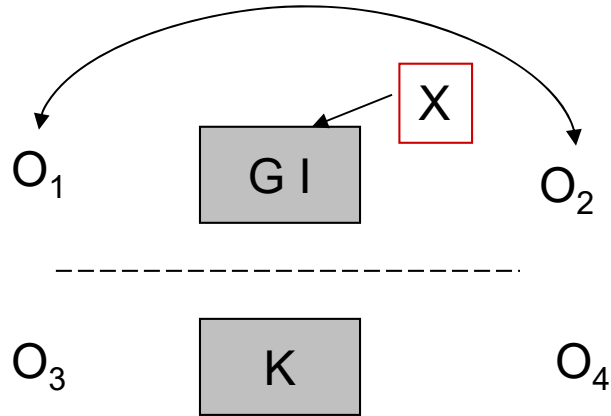
Elde edilen sonuçlar şüphelidir

Yarı deneme modelleri;

Zaman dizisi modeli



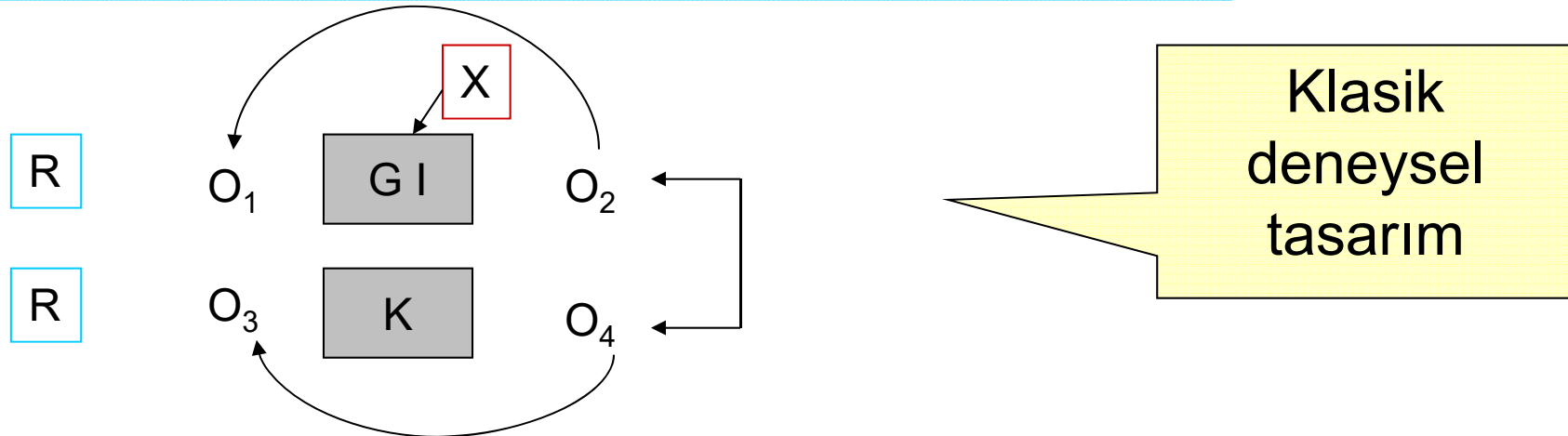
Eşitlenmemiş kontrol grubu model



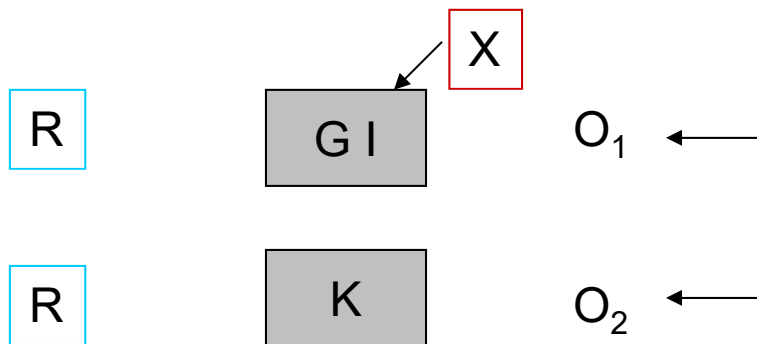
Gruplar gelişigüzel seçilir

Gerçek deneme modelleri;

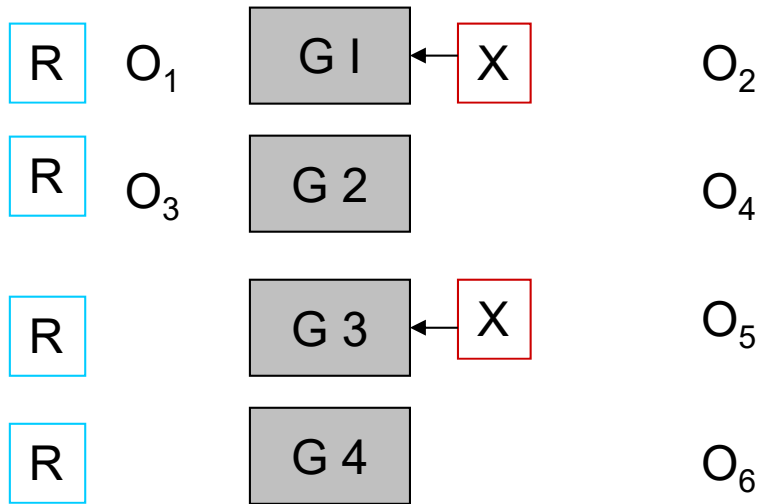
Öntest-Sontest Kontrol Grubu Model



Sontest Kontrol Grubu Model



Solomon Dört Grup Modeli



Posttest ortalama skorları karşılaştırılabilir

O_2, O_4, O_5, O_6

Pretest'in etkisi analiz edilebilir

O_4 ve O_6

Tedavinin etkisi analiz edilebilir

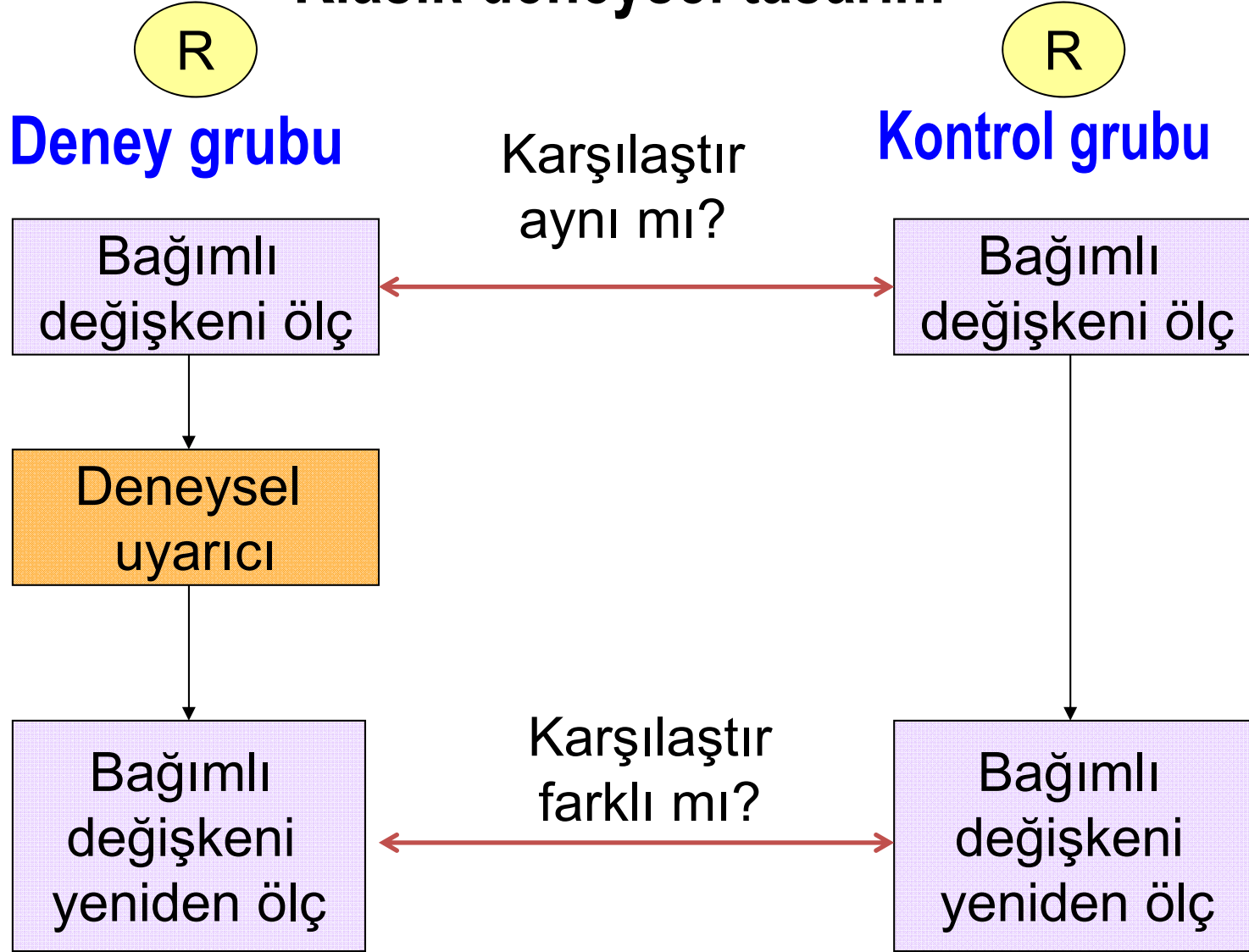
O_5 ve O_6

Maturasyon analiz edilebilir

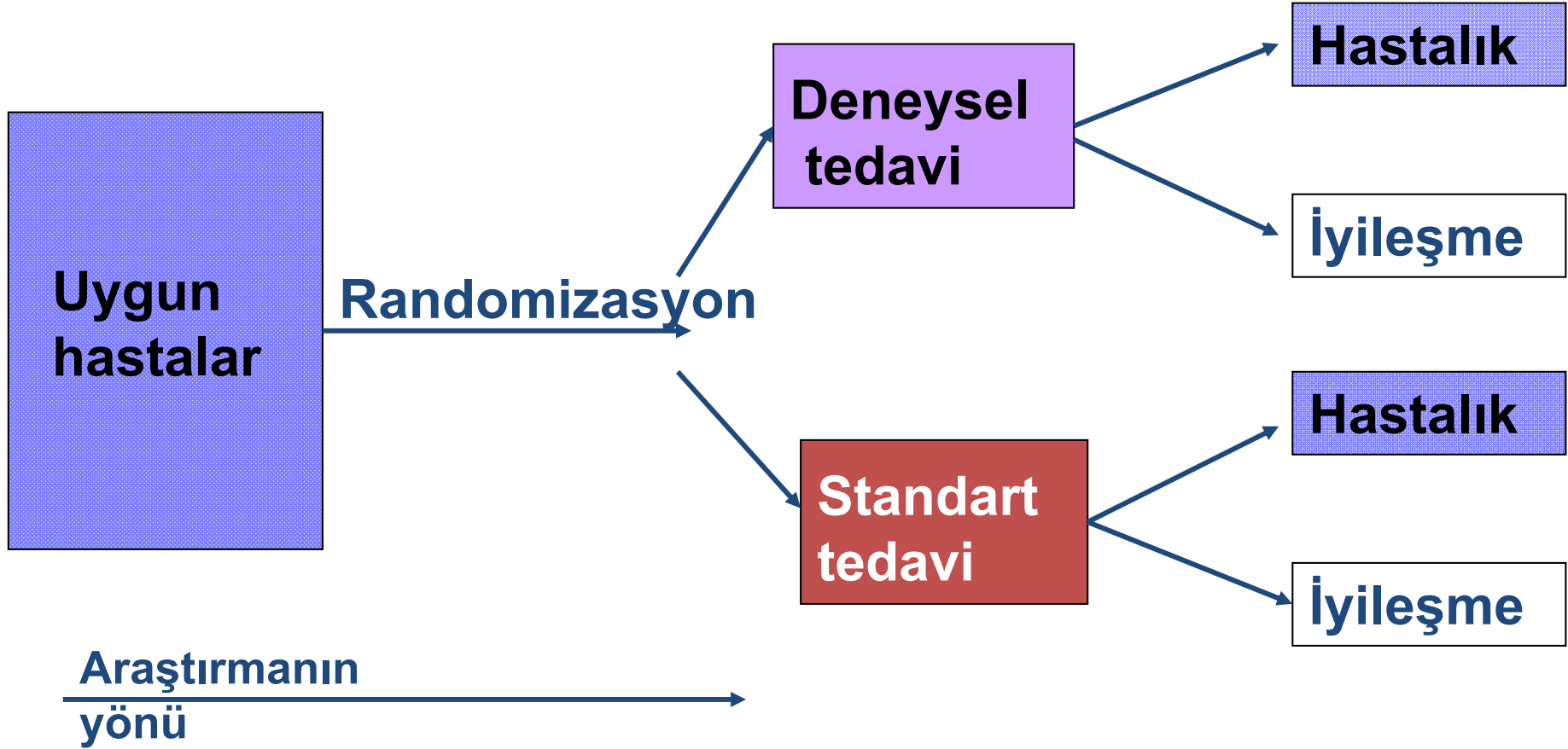
O_1, O_3 karşın O_6

Çok fazla sayıda denek gerektirir

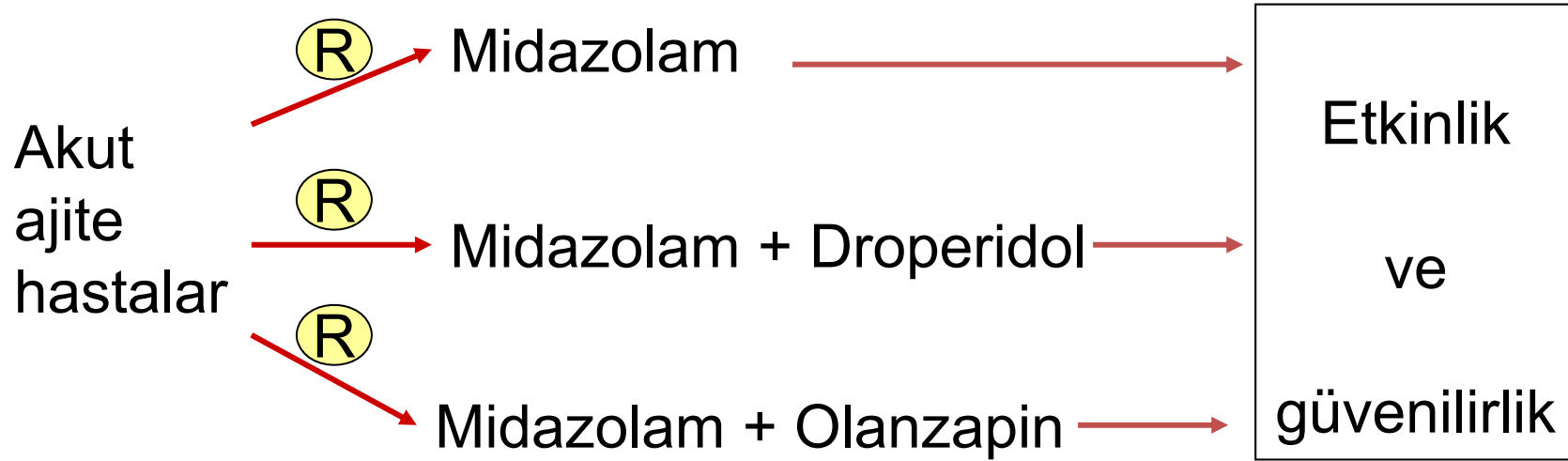
Klasik deneysel tasarım



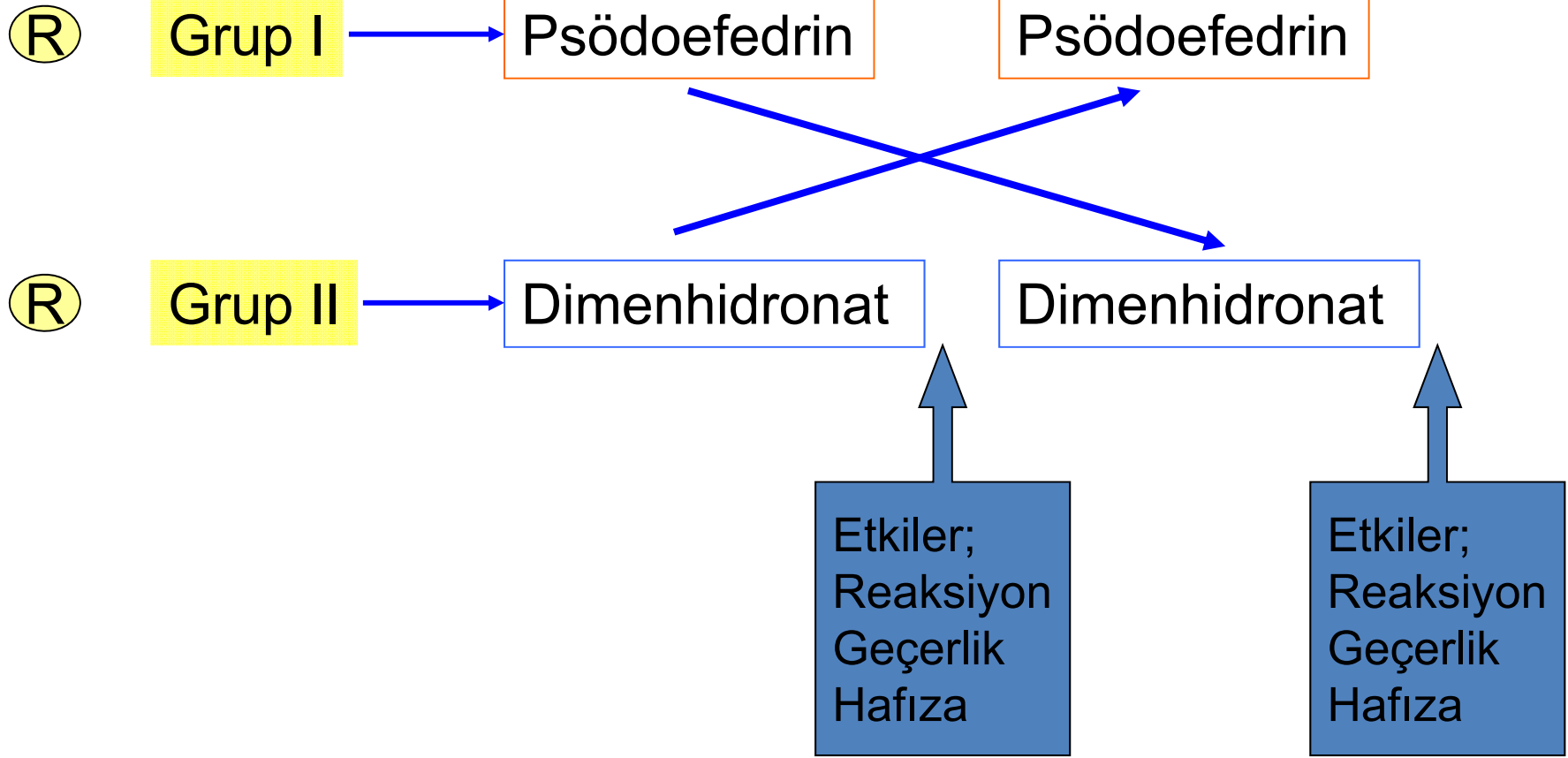
Randomize Kontrollü Deney – RCT-



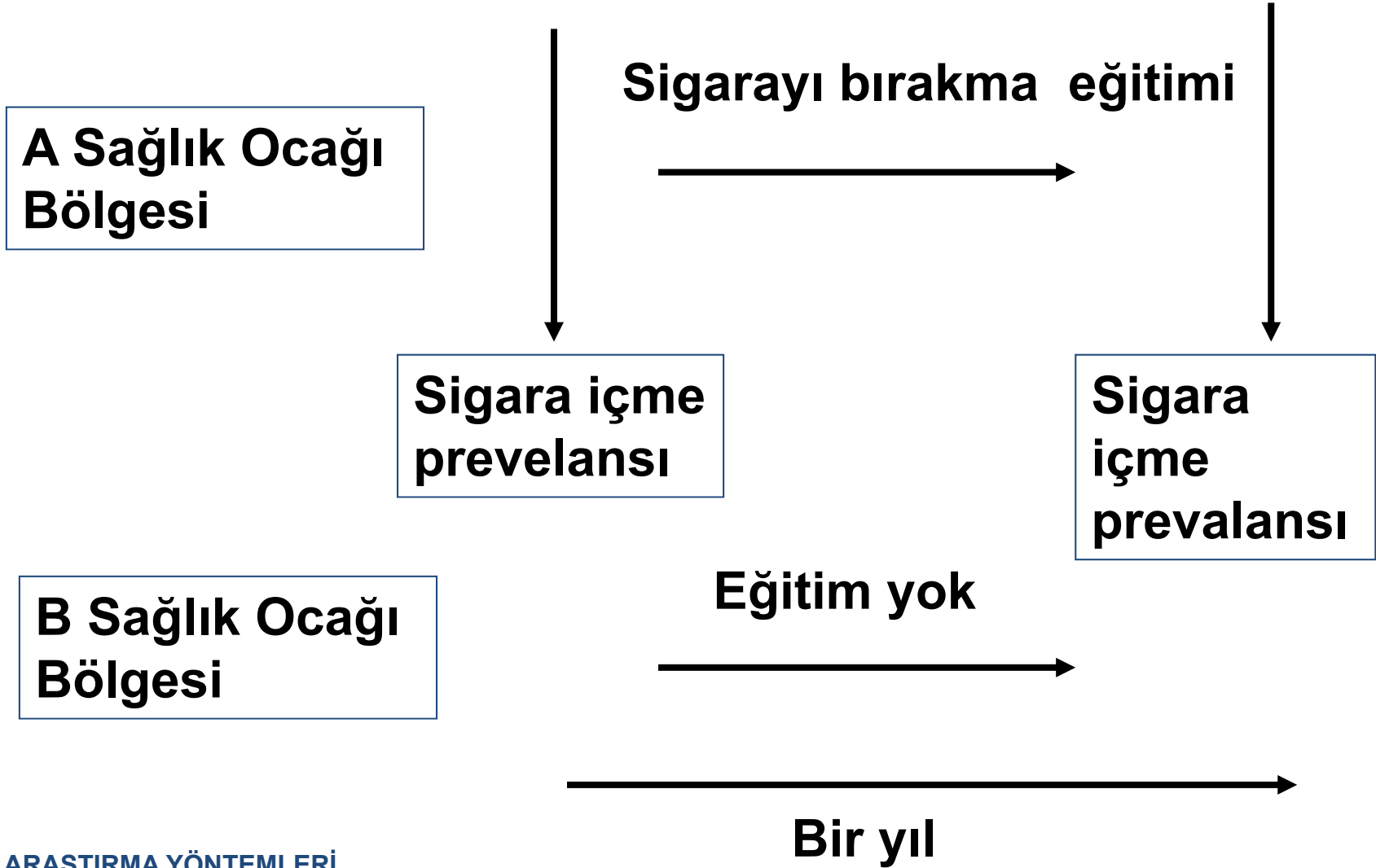
Randomize Paralel grup çalışma örneği



İki periyodlu çaprazlama çalışma örneği



Alan Deneyi



I. Klinik Araştırmalar

II. Temel Bilime Dayalı
Araştırmalar
(Preklinik Araştırmalar)

In-vivo
(Hayvan
deneyleri)

In-vitro

Hayvan Deneyleri

Deneysel hayvan araştırmaları;

Bilimsel bilgi elde etmek amacı ile omurgalı veya omurgasız hayvanlar üzerinde yapılan alışmalar



Denek hayvanlarının en sık olarak kullanıldığı alanlar;

Genetik,
Gelişim biyolojisi,
Davranış bilimleri,
Uygulamalı biyomedikal bilimler,
Transplantasyon,
İlaç araştırmaları
Eğitimsel amaçlarla,
İrksal çalışmalarda,
Savunma araştırmalarında

- Temel biyomedikal araştırmalar- % 32
- Yeni tedavi veya korunma yolları - % 29
- Hayvanların türetilmesi- % 35
- Tıp dışı ürünlerin (ev, tarım ve endüstri) güvenlik testi- %3
- Yeni tanı yöntemlerinin geliştirilmesi- % 1

Hayvan deneyleri neden önemli ?

- Hayvanların araştırmalara katkısı **%10**
- Bilimsel soruların yanıtları başka bir yöntemle bulunamazsa
- İnsanda etik olmadığı durumlar

Biyomedikal araştırmalarda hayvanlar niçin gereklidir ?

- Hayvanlar iyi bir araştırma bireyi, çünki; biyolojik olarak insanlara benzer
- İnsanlara benzer şekilde çoğu sağlık problemleri için aynı hassasiyeti gösterir
- Hayvanlar insanlara göre daha kısa yaşam süresine sahip

Hangi tip hayvanlar biyomedikal araştırmalarda kullanılır?

Rat, fare, kuşlar, tavşan, kobay, koyun, balık, kurbağa, domuz, köpek, primatlarkullanılmaktadır.

Ne kadar deney hayvanı kullanılıyor?

- Her yıl yaklaşık 17-23 milyon hayvan araştırma amaçlı kullanılıyor
-

- %95'i yetiştirilmiş rat ve fareler,
- %4.25 tavşan, kobay, koyun, balık ve kurbağa
- Sadece %0.75'i kedi, köpek ve primatlar

%97'sinde yalnızca dokuz hayvan türü kullanılır;

- | | | |
|---------------|-----------|----------|
| ◆ rat (sıçan) | ◆ tavşan | ◆ kedi |
| ◆ fare | ◆ hamster | ◆ tavuk |
| ◆ kobay | ◆ köpek | ◆ maymun |

Başarı ???

Hayvan deneyleri

Doğru metodoloji ile yapılır
İyi standardize edilirse

İnsan hastalığının modelini tam olarak karşılayabilir
Pozitif-negatif prediktif değeri yüksek olabilir



BAŞARISIZLIK !

- **Aşı geliştirme (HIV aşısı)**
- **Teratojenik**
- **Karsinojenik**
- **Nöroprotektif ilaç geliştirme**

- Hayvanlar ve insanlar farklı kompleks sistemlere sahiptir
- Genomik değişiklikler
- Epigenetik değişiklikler
- Metabolik farklılıklar
- Soy ve tür farklılıkları

- Deneysel çevre ve deney protokolündeki değişkenlik azaltılmalı
- Metodolojik kalite artırılmalı

Hayvan modelleri

- Toksikite alışmalarında
- İnsan hastalıklarının tedavisini amaçlayan biyomedikal araştırmalarda

Devam eden yaygın kullanımlarıyla birlikte genellikle oldukça öngörüsel olarak kabul edilmektedir

Araştırmacı sorumluluğu ve konuyla ilgili yaptırımlar

- **Helsinki Deklarasyonu** (18. Dünya Hekimler Kurultayı'nda (Haziran, 1964, Helsinki, Finlandiya)

- Hayvan Deneyleri İle İlgili Etik Yasa
WHO ve UNESCO'nun bilimsel ortak kuruluşu CIOMS (Council for International Organisations of Medical Sciences)

- **Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı'nın**, "Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar için Kullanılan Deneysel Hayvanlarının Korunması, Deneysel Hayvanlarının Üretim Yerleri ile Deneysel Yapacak Olan Laboratuvarların Kuruluş, Çalışma, Denetleme, Usul ve Esaslarına Dair Yönetmeliği"

- 24.06.2004 tarihli 5199 sayılı **hayvanları koruma kanununun 9. maddesinde** "deneysel hayvanları ile ilgili düzenlemeler"

- Çevre ve Orman Bakanlığı tarafından 6 Temmuz 2006, "hayvan deneyleri etik kurullarının çalışma usul ve esaslarına dair yönetmelik" (**HADMEK**) (**HADYEK**)



- **En uygun yöntem mi?**
- **Seçenekler neler olabilir?**
- **Hayvanın deney sırasında herhangi bir anda uyanık olması gerekiyor mu?**
- **Deneyin neden olduğu ağrı ya da sıkıntı azaltılabilir mi?**
- **Kullanılan hayvan sayısı azaltılabilir mi?**

3 R kuralı

R eplacement (Yerine geçirme)

R eduction (Azaltma)

R efinement (Arındırma)

R esponsibility

DENEYSEL HAYVAN MODELLERİ

4 hayvan modeli vardır

- İndüklenmiş
- Spontan
- Negatif
- Olası (Orphon) model

Doğru model ? → Temel anahtar soru iyi tanımlanmalı

Uygun laboratuvar hayvanı ? →
* Tür
* Soy
* Cinsi

Yetiştirilme özelliklerine göre laboratuvar hayvanı seçimi

- İnbred
- Outbred
- Selektif breeding
- Crossbreeding

Mikrobiyolojik Durumlarına Göre Hayvanların Sınıflandırılması

- Axenic
- Gnotobiotic
- Spesifik Patojen Free
- Monitörize
- Konvansiyonel

Deneysel bir hayvan modeli oluştururken;

1. Model insanlardaki kliniğe en iyi şekilde uyarlanabilmeli
2. Hayvanın tür, soy ve cinsi önemli. Türe ait anatomik, fizyolojik ve davranış karakterlerinin bilinmeli
3. Yeni model tanımlanması için literatür araştırması yapıp, hangi modelin mümkün ve gerçekçi olduğu belirlenmeli
4. Uygun bir istatistik çalışma yapabilmek için her grupta **yeterli sayıda** ve **en az** hayvan kullanılmalı
5. Kontrol grubu bağımlı değişken haricinde diğer tüm değişkenler tarafından deney grubu ile aynı olmalı
6. Deney bir müdahalenin etkisini araştırmak üzere planlanmışsa ise kontrol grubuna aynı anestezi ve müdahale uygulanmalı

- **Hayvan modeli her zaman orijinal durumu tam olarak temsil etmez; yani model asla prototipinin aynı değildir**
- **Modeller asla son sözü sağlamaz, ama yaklaşık bir fikir verir**

- Randomize seçim olmalı
- Dişi ve erkek sayısı eşit
- En az kompleks tür
- En az denek sayısı



Deney hayvanına dayalı bir araştırma için çalışma planı örneği:

Hipotez: Akut astımın fare modelinde anti-TNF- α (Infliximab), inflamatuvar yanıtı azaltıcı olası etkilere sahip değildir

Akut Astım Modeli:

Hayvan türü: fare

Soy: BALB/c atopik (Th₂ yanıtı daha kolay oluşturulur)

Model: SİSTEMİK İMMÜNİZASYON

Küçük hayvanlarda astım modeli için en yaygın kullanılan model OVA protokolü

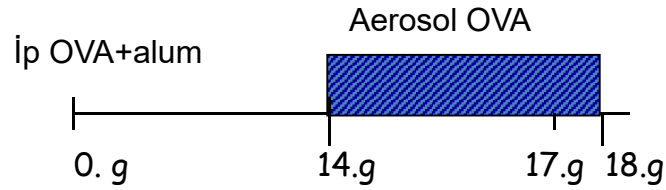
OVA (Ag) + adjuvan (genellikle alum) tek doz veya booster injeksiyonlar şeklinde ip enjeksiyonu (sistemik immünizasyon)

Genellikle 1-2 hafta olan inkubasyon periyodundan sonra

OVA ile aerosol “challenge” yapılır

Örnekler son “challenge” den 24-48 saat sonra alınır

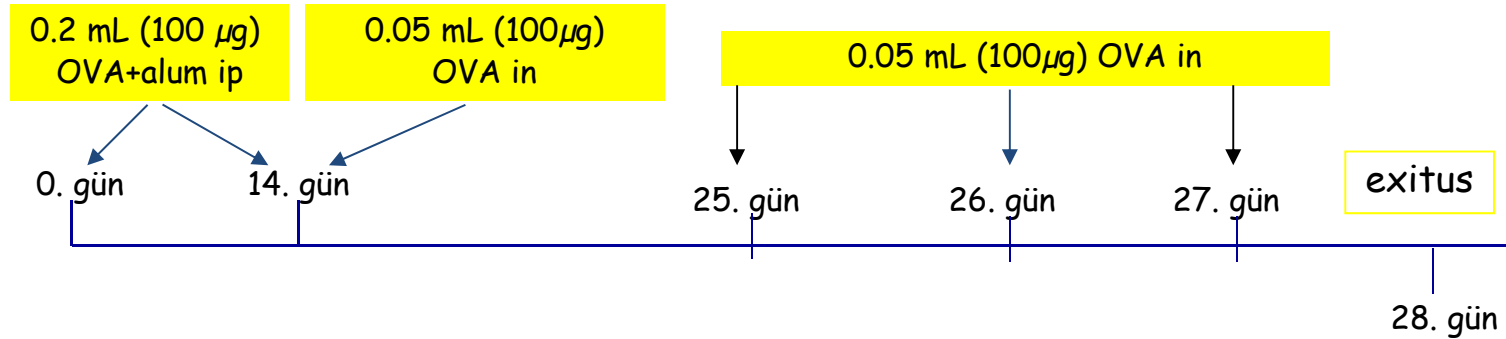
Akut astım modeli



Akut model remodelingin erken değişikliklerini oluşturur

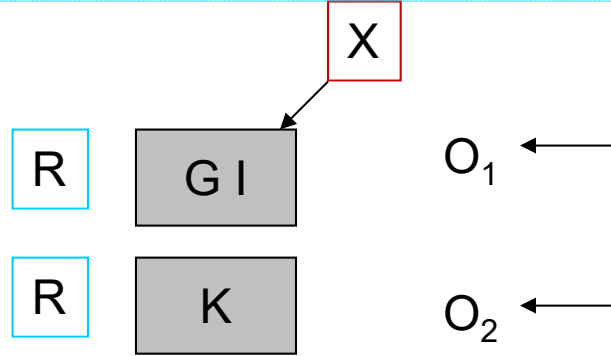
- Goblet hücre hiperplazisi
- Epitelyal kalınlaşma
- Belirgin inflamasyon
- AHR

(Locke NR. Am J Respir Cell Mol Biol 2007;36:625-32)



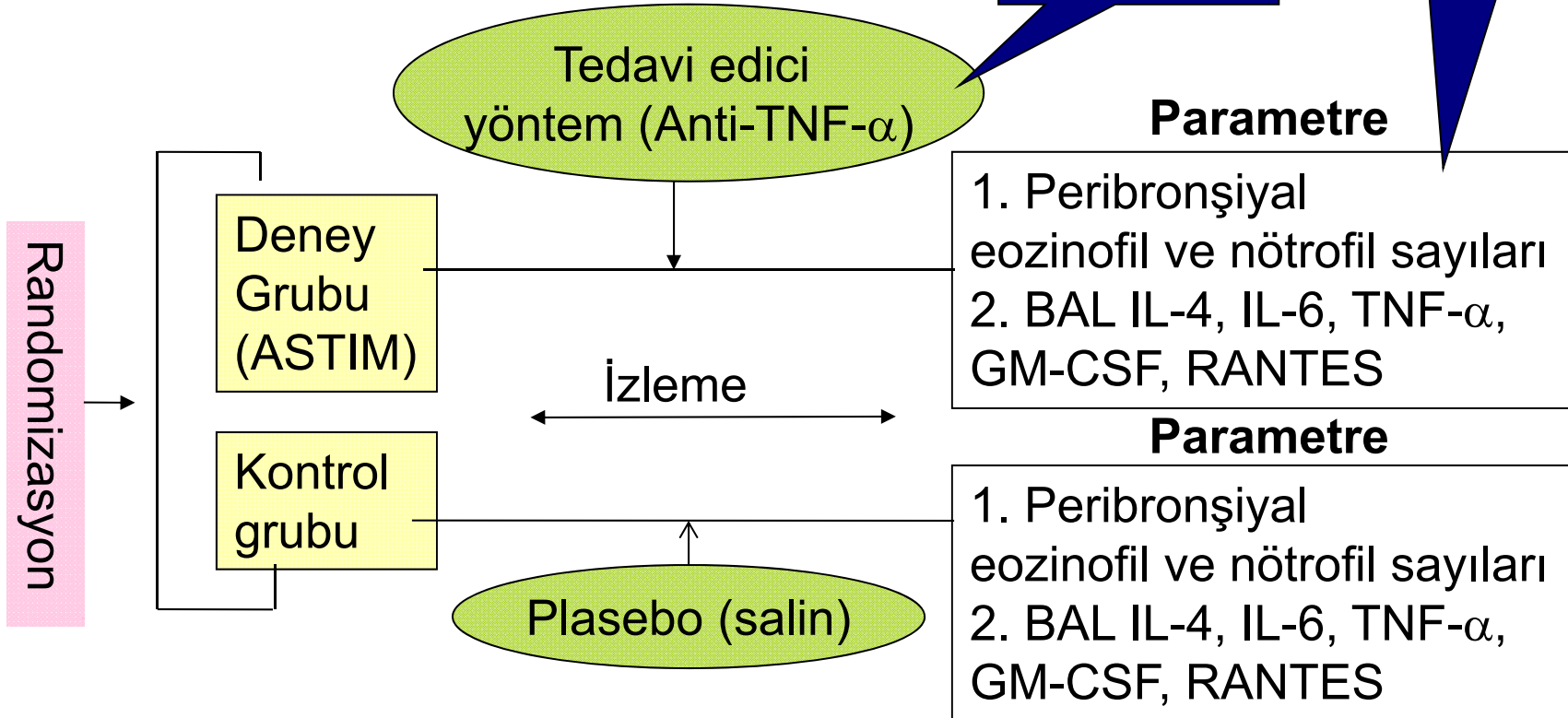
Gerçek deneme modelleri;

Sontest Kontrol Grubu Model



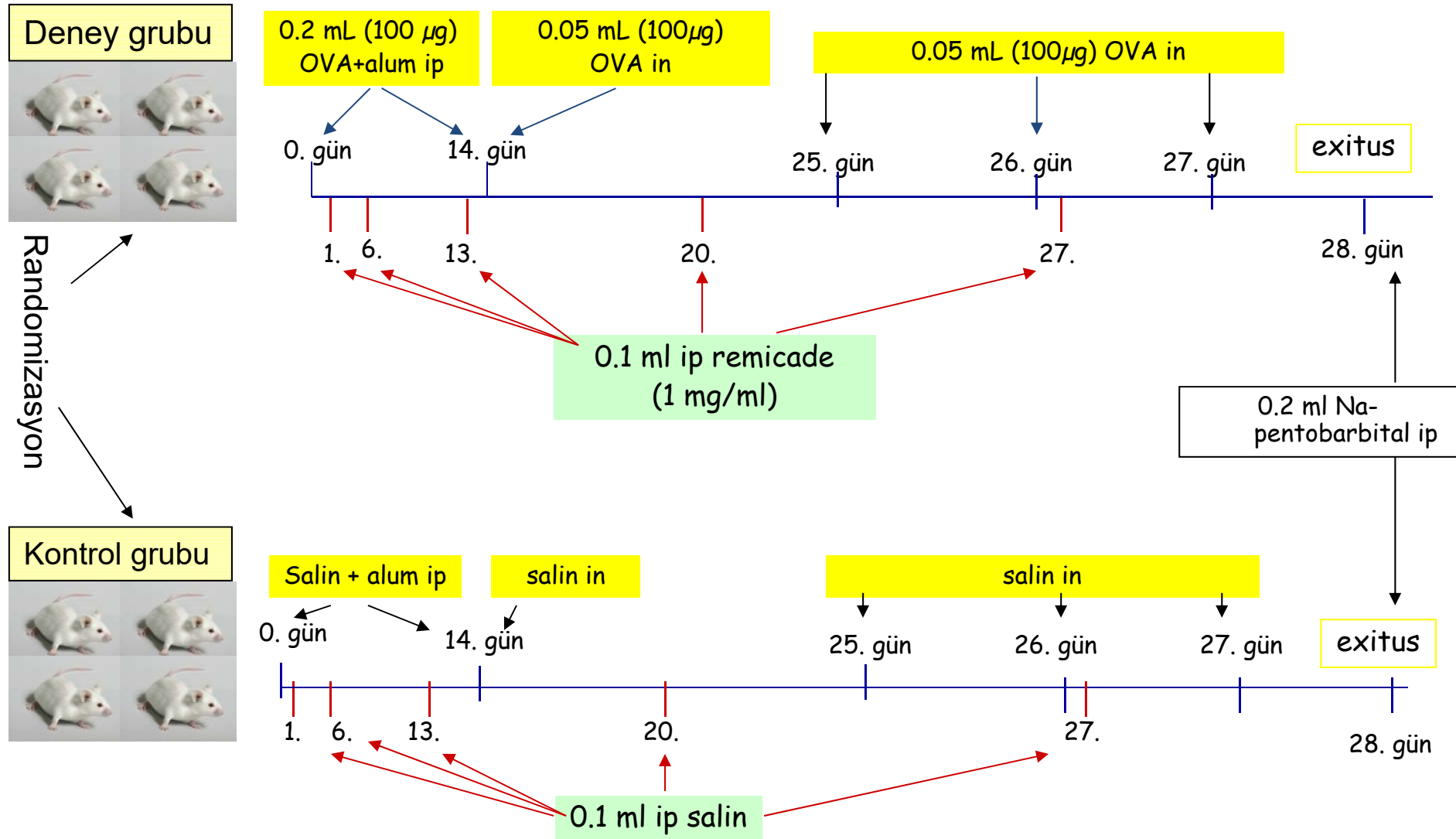
Bağımsız değişken

Bağımlı değişken



Evaluation of the anti-inflammatory effect of infliximab in a mouse model of acute asthma

FIGEN DEVECI,¹ M. HAMDI MUZ,¹ NEVIN ILHAN,² GAMZE KIRKIL,¹ TEYFIK TURGUT¹ AND NUSRET AKPOLAT³



In-vitro Teknikler

- Moleküller, hücreler ve dokular üzerinde yapılan çalışmalar
- Bunlar moleküller arasında, hücreler arasında olan etkileşimler veya organ fonksiyonları konusunda bilgiler sağlar

In vitro yöntemler **nerede** kullanılır?

In vivo koşullarda alınan bir örneğin incelemesi;

- Periferik kan, idrar, dışkı, BOS vs.
- Ekspirasyon havası, balgam, biyopsi, BAL
- Deney hayvanlarından alınan örnekler; kan, hava yolu-akciğer sıvıları, akciğer dokusu

In vitro koşullarda doku ve hücre kültürü elde edilmesi ve incelenmesi

- Periferik kan kültürleri; mono nükleer hücreler, eozinofil vs
- Hava yolu hücre kültürleri; Hücre dizileri, primer hücre kültürleri vs

In Vitro yöntemler niçin kullanılır?

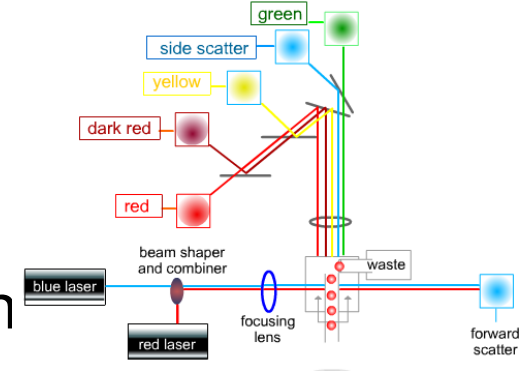
- Bir enzim, elementin direkt ölçümü; ALT, AST, Na, K vs
- Hücre fonksiyon/bütünlüğünün araştırılması; silya titreşimi, elektriksel direnç, permeabilite
- Hücrenin canlılığı;
- Anahtar bir proteinin belirlenmesi; ELISA, Western Blot
- Gen düzeyindeki bozukluk/aktivasyonunun incelenmesi: PCR, RT-PCR
- Bir protein/antijenin ekspresyonu; immüno-sito kimya
- Hücrelerin (büyüklük/eksprese ettiği belirtece göre) ayrılması/belirlenmesi; akım sitometri ('flow cytometry')

En sık kullanılan *in-vitro* yöntemler:

- Akım (Flow) sitometri
- Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)/Enzyme Immuno Assay (EIA)
- Elektroforez (“ Western blot vb)
- Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)
- DNA dizi analizi

Akım (Flow) sitometri

- Hücre veya partiküllerin akmakta olan bir akışkanın içerisindeyken karakteristiklerinin ölçülmesi
- Hücrelerin (Büyüklik/eksprese ettikleri belirteçlere göre) ayrılması/belirlenmesi
- Bir süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir
- Hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir
- Bir hücre/partikülün;
 - **İmmünotipi**
 - **DNA içeriği**
 - **Enzim aktivitesi**
 - **Hücre membran potansiyeli**
 - **Canlılığı**gibi özellikleri belirlenebilir



Akım sitometride analiz edilebilen örnekler

- Kan
- Kemik iliği
- BOS
- **BAL SIVISI**
- Eklem sıvısı
- **Plevral sıvı**
- Asit sıvısı
- Doku biyopsi örnekleri
- Parafin bloktaki dokular
- Hücre kültürlerinden hücre süspansiyonları

Akım Sitometri

- DNA (hücre siklüsü, proliferasyonu vs)
- Apoptozis çalışmalarında
- Hücre yüzey antijenlerinin belirlenmesinde (CD belirteçleri)
- Hücre içi antijenler (sitokin, mediatör vs)
- Kromozom analiz ve tespitinde
- RNA çalışmalarında
- Protein ekspresyon ve lokalizasyonunda

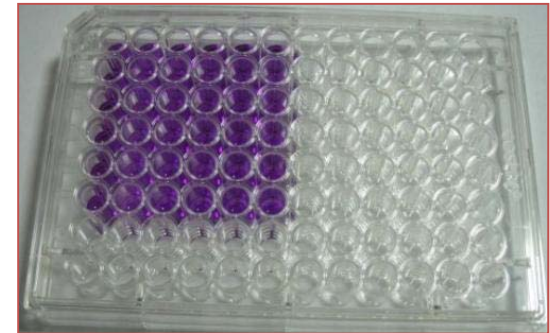
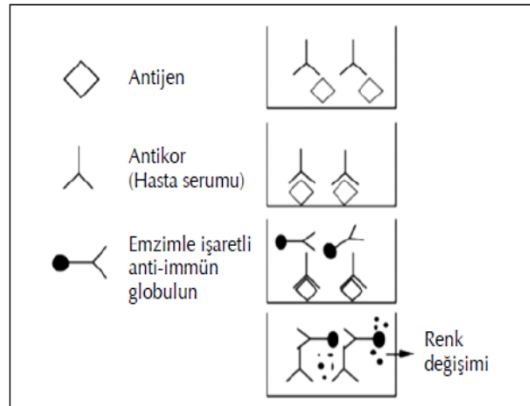
Akciğer hastalıklarının tanısında özellikle

- **BAL hücre tiplerinin belirlenmesinde**
- **Solunum yolu hücre kültürlerinde hücre siklusu ve apoptozisi belirlemede**

Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)/Enzyme Immuno Assay (EIA)

- Hedef molekölü işaretlemek için enzimlerin kullanıldığı yöntemlerdir. Avantajları:
 - Geniş tanı parametreleri ticari olarak kolayca temin edilebilir
 - Yöntem otomasyona uyarlanabilir ve böylece çok sayıda örnek kısa sürede çalışılabilir
 - Sonuçlar spektrofotometrede objektif olarak kalitatif, semikantitatif ya da kantitatif değerlendirilebilir

ELISA yöntemi ile antikor tayini



Western Blot



Solid veya bir sıvı içinde yer alan spesifik bir proteinin düzeyini belirlemek için yaygın olarak kullanılır

Poliakrilamid jelde yürütülerek ayrılan protein bantları nitroselüloz veya naylon bant üzerine transfer edilir. Daha sonra bu proteinler özgün problemlerle bağlanarak tanımlanır

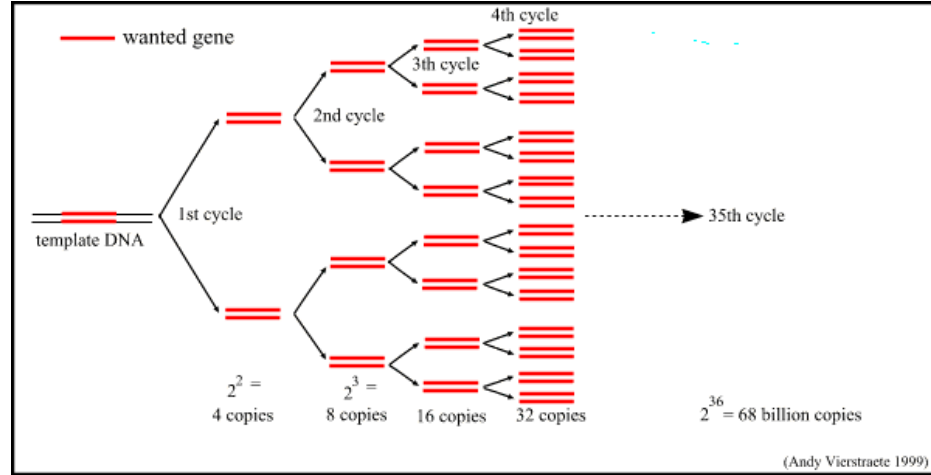
Western blot yöntemiyle elde edilen bantların yoğunluğu görüntü analiz sistemleri ile değerlendirilerek sayısal değerler halinde birbiriyle karşılaştırılabilir

Western Blot tekniği 4 adımda gerçekleştirilir:

1. Jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana aktarımı (Blotlama)
2. Nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (Blokaj)
3. Özgül antikolarla tepkime
4. Proteinlerin görüntülenmesi

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan tepkimeler



PCR 3 adımdan oluşur;

1. Denatürasyon

(İki zincirin yüksek ısıyla birbirinden ayrılması)

2. Hibridizasyon

(Sentetik dizilerin hedef DNA'ya bağlanması)

3. Polimerizasyon

(Zincirin uzaması)

PCR

“in vitro” klonlama

Genomun istenilen bölgesi milyonlarca kez çoğaltılabilir

DNA Polimeraz enzimi ile katalizlenir ve yeni DNA iplikleri sentezlenir

PCR kullanım alanları

- Kalıtsal hastalıklarda taşıyıcının ve hastanın tanısı
- Prenatal tanıda
- Klinik örneklerde patojen organizmaların saptanması
- Adli tıpta
- Onkogenezin araştırılmasında
- Klonlamada, gen ekspresyon araştırmalarında
- DNA üzerinde araştırılan bölgelerin tespitinde kullanılan tek zincirli dizilerin (probe) oluşturulmasında
- DNA dizi analizinde, büyük miktarlarda DNA örneklerinin oluşturulmasında
- Bilinmeyen dizilerin tayininde
- Geçmiş DNA'ların incelenmesinde
- İn vitro fertilizasyon yapılan tek hücrede, implantasyon öncesi genetik testlerin yapılması ve sonra inplantasyon gerçekleştirilmesi ile bebeğin normal doğmasının sağlanması.

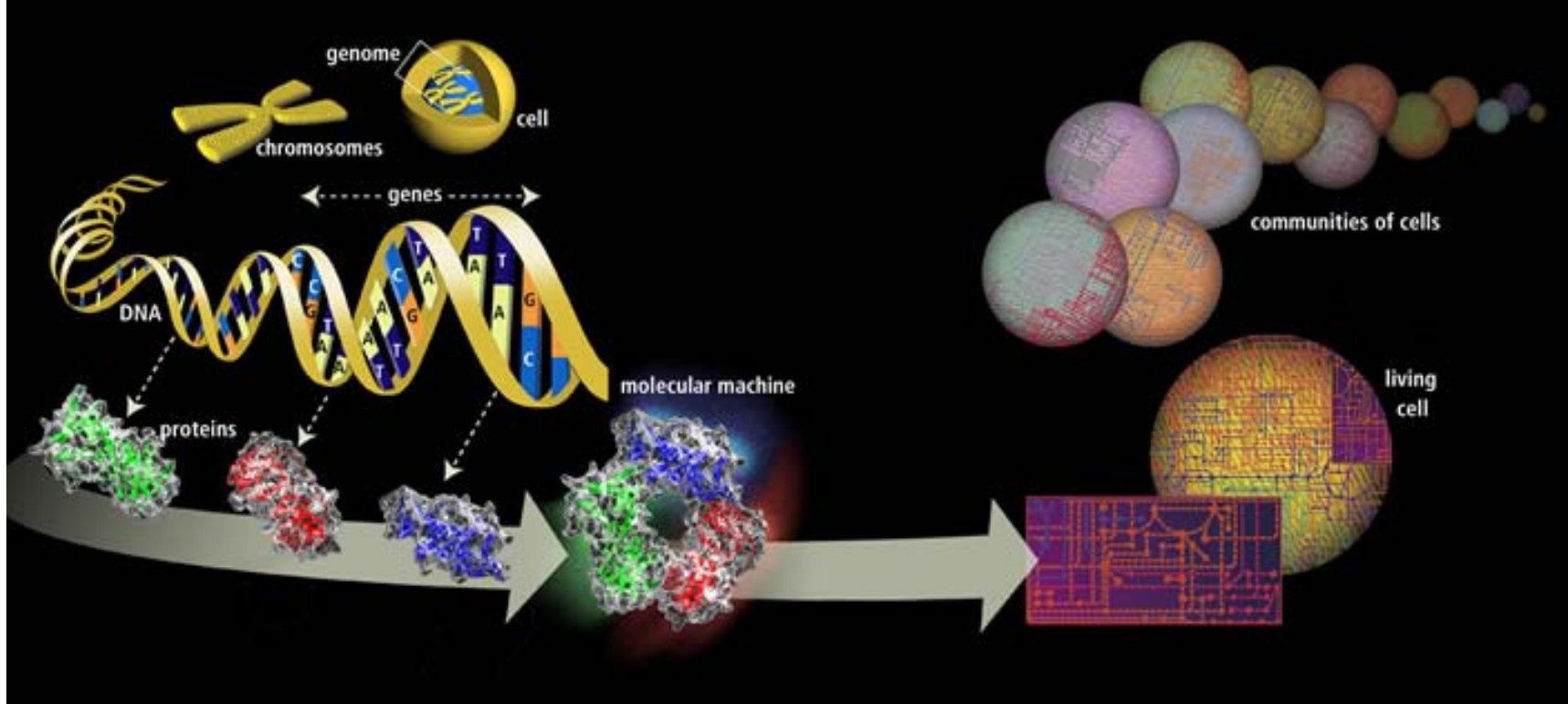
DNA dizi analizi

Bir DNA olinükleotidinde yer alan adenin (A), timin (T), sitozin (C) ve guanin (G) nükleotid bazlarının diziliminin ortaya konulmasıdır

On binlerce genin dizisi saptanabilmiştir

Gen mühendisliği ve klonlamada kullanılır

Genomic



- Bir organizmanın bütün genomunun araştırılması
- Organizmaların bütün DNA dizilerinin (sekans) tespitine dayalı çalışmalar

Proteomic

- ‘Genomic’ ile analogi yaratmak amacıyla kullanılır
- Kapsamlı olarak organizmadaki proteinlerin yapı ve fonksiyonlarının aydınlatılmasında kullanılır
- ‘Proteome’; ‘**prote**in’ ve ‘gen**ome**’ dan oluşur
- Bir organizma tarafından üretilen tüm proteinler

Hücre kültürü

In vitro koşullarda doku ve hücre kültürü elde edilmesi ve incelenmesi

- Periferik kan kültürleri; mono nükleer hücreler, eozinofil vs
- Hava yolu hücre kültürleri; Hücre dizileri, primer hücre kültürleri vs

Hücre kültürlerinin elde edilmesi:

1. Çeşitli yöntemler ile ölümsüz ('immortal') hale getirilmiş hücrelerden elde edilen ve ticari olarak temin edilebilen hücre dizileri
2. *In vivo* olarak alınan dokulardan hazırlanacak primer hücre kültürleri

Hücre Dizileri ('cell line')

Avantajları;

- Elde edilmeleri kolay
- İstendiği kadar çoğaltılabilir
- Saklanabilir, tekrar kullanılabilir
- Belli pasaj aralıkları kullanılmalı

Dezavantajları;

- Bir takım genotipik ve fenotipik özellikleri *in vivo* hücrelerden farklıdır

Hücre Dizileri ('cell line')

Normal hücreler (ölümsüz) 'immortal' hale getirilirler (viruslar, SMV40);

- BEAS-2B (Bronş epitel hücreleri)
- 16 HBE-14o- hücreleri (Bronş epitel hücreleri)

Kanserleşmiş hücreler kullanılır

- A549 hücreleri (akciğer karsinoma hücreleri)

Primer Hücreler

Avantajlar

- *In vivo* ortamdaki hücrelerle genotipik ve fenotipik benzerlik
- Çeşitli patolojilerde, hastalardan direkt olarak elde edilebilirler

Dezavantajlar

- Elde edilmeleri daha zor
- Tekrar tekrar çoğaltılıp kullanılamazlar
- Etik sorunlar

Doku - Hücre Kaynağı

- Cerrahi eksplant
 - Pnömonektomi, Lobektomi
 - Transplant akciğeri
- Biyopsi
- Fırçalama (epitel hücreler)
- Enzimatik digestion,
- Disseksiyon
- Hazır, ticari olarak

Akciğerin Primer Hücre Kültürleri

- Düz kas hücreleri
- Fibroblast kültürleri
- Alveolar epitel hücreleri
- Bronş epitel hücreleri

Teşekkürler

fgndeveci@yahoo.com