



## 1. IN VITRO YÖNTEMLER

Gülay YÜZBAŞIOĞLU ÖZTÜRK<sup>1</sup>

### GİRİŞ

Bilimsel ilerlemeler, tıpta hastalıkların daha iyi teşhis ve tedavi edilmesini mümkün kılmıştır. Hayvan deneylerinin bu ilerlemeye önemli katkısı nedeni ile hayvanlar dünya genelinde biyomedikal araştırma ve geliştirme için sıklıkla kullanılmakta ve medikal alandaki gelişmeye paralel olarak araştırma için kullanılan deney hayvanı sayısı artmaktadır. Hayvan refahı ile ilgili yasalar 1960'lı yıllardan beri Avrupa ülkelerinde uygulanmaktadır. Türkiye'de 06.07.2014 tarihinde resmi gazetede yayınlanarak yürürlüğe giren Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmeliğin 14. maddesinde, "Hayvan kullanımı etik kurullarının hayvanların kullanıldığı araştırmalarda, hayvan refahı bakımından araştırmaya izin verme aşamasında göz önünde bulundurduğu 3R (replacement, reduction, refinement) prensibine yer verilmesi, deneylerde hayvan kullanımının refah bakımından ele alınması açısından oldukça önemlidir" ifadesine yer verilmiştir.

In vivo araştırmaların daha insancıl gerçekleştirilebilmesi amacı ile 1959 yılında Russell ve Burch tarafından önerilen 3R prensibi bilim çevrelerince geniş çapta kabul görmüştür. Bu prensiplerden birisi olan replacement ilkesi, "hayvan deneylerinde bilinçli canlı omurgalıların kullanımının yerini alabilecek farklı metotlar ve alternatif organizmalar kullanılması" olarak tanımlanabilir. 3R kuramında, öncelikle yerine koyma (replacement) alternatifinin uygulanabilir olup olmadığının sorgulanması gerekmektedir. Bunun için öncelikle bilgisayar programlarının araştırılması, bu olası değilse doku kültürü ya da daha düşük yaşam seviyesinde canlıdan başlayıp, en son olarak daha yüksek yaşam düzeyi olan canlıların düşünülmesi gerekmektedir.

Hayvanların deney hayvanı olarak kullanılmasının hem etik açıdan hem de uygulama açısından dezavantajları laboratuvar hayvanlarının kullanımının mümkün olduğunca sınırlandırılmasını gerektirmektedir. Günümüzde akademi ve endüstri, deneylerde hayvan kullanımından kaçınmaya ve insan biyolojisi ve hastalıklarının modellenmesini sağlayan alternatif yaklaşımların geliştirilme-

<sup>1</sup> Arş. Gör. Dr., İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Patoloji AD., gulayoz@iuc.edu.tr

mansa izin verir.

İn vitro yöntemlerin geliştirilmesinde bilim insanları organ benzeri hücre kültürlerinin tasarlanmasını başarmış olsa da birçok teknolojik sorun hala çözülmeyi beklemektedir. Bu durum, in vitro modellerin uygunluğunu geliştirmek için hücre ve doku kültüründe temel araştırmaları gerektirmektedir. Bilim insanları, in vitro tekniklerin fırsat ve avantajlarından haberdar edilmelidir. Bu nedenle, yöntemler ve kavramlar bütünü, yaşam bilimlerindeki herhangi bir eğitimin ayrılmaz bir parçası haline gelmelidir. Konunun eğitim programlarına dahil edilmesi, alternatif yöntemler üzerine Anabilim Dalları kurulması, kurslar ve programlar alternatif yöntemlerin kullanımının yaygınlaştırılmasına yol açacaktır.

## KAYNAKLAR

- Abbott, A. Biology's new dimension. *Nature* 424, 870–872 (2003). <https://doi.org/10.1038/424870a>
- Anadón, A., Martínez, M. A., Castellano, V., & Martínez-Larrañaga, M. R. (2014). The role of in vitro methods as alternatives to animals in toxicity testing. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 10(1), 67–79
- Arribas, M. C. M., & Díaz, J. A. (2011). Biobanks and use of samples of human origin for surgical research. Current regulatory framework. *Cirugía Española (English Edition)*, 89(4), 207–212.
- Artal-Sanz, M., de Jong, L., Tavernarakis, N., 2006. Caenorhabditis elegans: a versatile platform for drug discovery. *Biotech. J.* 1, 1405–1418.
- Balls, M. (2002). Future improvements: replacement in vitro methods. *ilAr Journal*, 43(Suppl\_1), S69–S73.
- Barroso J, Ahn IY, Caldeira C, Carmichael PL, Casey W, Coecke S, Curren R, Desprez B, Eskes C, Griesinger C, Guo J, Hill E, Roi AJ, Kojima H, Li J, Lim CH, Moura W, Nishikawa A, Park H, Peng S, Presgrave O, Singer T, Sohn SJ, Westmoreland C, Whelan M, Yang X, Yang Y, Zuang V. International Harmonization and Cooperation in the Validation of Alternative Methods. *Adv Exp Med Biol*. 2016; 856:343–386. doi: 10.1007/978-3-319-33826-2\_14. PMID: 27671730.
- Bartfeld, S. et al. In vitro expansion of human gastric epithelial stem cells and their responses to bacterial infection. *Gastroenterology* 148, 126–136 e126 (2015).
- Bissell, M. J. (1981). The differentiated state of normal and malignant cells or how to define a “normal” cell in culture. *Int. Rev. Cytol.* 70, 27–100. doi: 10.1016/S0074-7696(08)61130-4
- Bissell, M. J. (2017). Goodbye flat biology – time for the 3rd and the 4th dimensions. *J. Cell Sci.* 130, 3–5. doi: 10.1242/jcs.200550
- Boj, S. F. et al. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell* 160, 324–338 (2015).
- BROUTIER, L. et al. Human primary liver cancer- derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. *Nat. Med.* 23, 1424–1435 (2017).
- Caddeo, S., Boffito, M., and Sartori, S. (2017). Tissue engineering approaches in the design of healthy and pathological in vitro tissue models. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 5:40. doi: 10.3389/fbioe.2017.00040
- Dijkstra, K. K., Cattaneo, C. M., Weeber, F., Chalabi, M., van de Haar, J., Fanchi, L. F., ... & Voest, E. E. (2018). Generation of tumor-reactive T cells by co-culture of peripheral blood lymphocytes and tumor organoids. *Cell*, 174(6), 1586–1598.
- Drost, J. et al. Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue. *Nat. Protoc.* 11, 347–358 (2016).
- Drost, J., Clevers, H. Organoids in cancer research. *Nat Rev Cancer* 18, 407–418 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0007-6>
- Finking, G., Lenz, C., Wohlfrom, M., & Hanke, H. (2000). [In vitro model to investigate the effect of estrogens on neointima development after endothelial injury in the rabbit aorta][Article in German]. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*, 17(1), 11–14.
- Fitzgerald, K. A., Malhotra, M., Curtin, C. M., O'Brien, F. J., and O'Driscoll, C. M. (2015). Life in 3D is never flat: 3D models to optimise drug delivery. *J. Control. Release* 215, 39–54. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.07.020
- Fontoura, J. C., Viezzer, C., Dos Santos, F. G., Ligabue, R. A., Weinlich, R., Puga, R. D., ... & Bonorino, C. (2020). Comparison of 2D and 3D cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance. *Materials Science and Engineering: C*, 107, 110264.
- Fujii, M. et al. A colorectal tumor organoid library demonstrates progressive loss of niche factor requirements during tumorigenesis. *Cell Stem Cell* 18, 827–838 (2016).
- Gao, D. et al. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. *Cell* 159, 176–187 (2014).
- Gibot, L., Galbraith, T., Bourland, J., Rogic, A., Skobe, M., & Auger, F. A. (2017). Tissue-engineered 3D human lymphatic microvascular network for in vitro studies of lymphangiogenesis. *Nature Protocols*, 12(5), 1077–1088.
- Gilbert, L.I., 2008. Drosophila is an inclusive model for human diseases, growth and development. *Mol. Cell Endocrinol.* 293, 25–31.
- Gruber, F. P. and Hartung, T. (2004) “Alternatives to animal experimentation in basic research”, *ALTEX - Alternatives to animal experimentation*, 21(Supp), pp. 3–31.



- Graham, M. L., & Prescott, M. J. (2015). The multifactorial role of the 3Rs in shifting the harm-benefit analysis in animal models of disease. *European Journal of Pharmacology*, 759, 19-29.
- Hamburger, A. W., and Salmon, S. E. (1977). Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 197, 461-463. doi: 10.1126/science.560061
- Huang, L. et al. Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell- and patient-derived tumor organoids. *Nat. Med.* 21, 1364-1371 (2015).
- Huh, D.; Matthews, B.D.; Mammoto, A.; Montoya-Zavala, M.; Hsin, H.Y.; Ingber, D.E. Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip. *Science* 2010, 328, 1662-1668, doi:10.1126/science.1188302.
- Huh, D., Hamilton, G. A., and Ingber, D. E. (2011). From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol.* 21, 745-754. doi: 10.1016/j.tcb.2011.09.005
- Kerkut GA, and Wheal HW. (Eds.) Electrophysiology of isolated mammalian CNS preparations. Academic Press. 1981.
- Khademhosseini, A., and Langer, R. (2016). A decade of progress in tissue engineering. *Nat. Protoc.* 11, 1775-1781. doi: 10.1038/nprot.2016.123
- Kibbey, M.C. Maintenance of the EHS sarcoma and Matrigel preparation. *Journal of Tissue Culture Methods* 16, 227-230 (1994). <https://doi.org/10.1007/BF01540656>
- Kinnings, S., Liu, N., Buchmeier, N., Tonge, P., Xie, L. and Bourne, P., 2009. Drug Discovery Using Chemical Systems Biology: Repositioning the Safe Medicine Comtan to Treat Multi-Drug and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. *PLoS Computational Biology*, 5(7), p.e1000423
- Landecker, H. (2002). New times for biology: nerve cultures and the advent of cellular life in vitro. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 33(4), 667-694.
- Lv, D., Hu, Z., Lu, L., Lu, H., & Xu, X. (2017). Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery (Review). *Oncology Letters*, 14, 6999-7010. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.713>
- Nogueira, A. C., Wagner, S., Riebeling, I., & Klug, S. (1999). [The isolated normothermic hemoperfused porcine leg as model for pharmacological and toxicological investigations] [Article in German]. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*, 16(2), 90-94.
- Matthews, E. J., & Contrera, J. F. (1998). A New Highly Specific Method for Predicting the Carcinogenic Potential of Pharmaceuticals in Rodents Using Enhanced MCASEQSAR-ES Software. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 28(3), 242-264.
- McKee, C., & Chaudhry, G. R. (2017). Advances and challenges in stem cell culture. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 159, 62-77.
- Mell, J.C., Burgess, S.M., 2002. Yeast as a model genetic organism. In: Encyclopedia of Life Sciences. Mcmillan Publishers Ltd.
- Molleman A. Patch clamping: an introductory guide to patch clamp electrophysiology. Wiley, West Sussex, England. 2003.
- Okur, H. (2016). Deneysel araştırma yöntemleri. *Çocuk Cerrahisi Dergisi*, 30(1), 7-11.
- Olpe, H.-R. und Haas, H. (1985). Der Hippocampus in vitro im Dienste der Epilepsieforschung (The Hippocampus in vitro in the service of epilepsy research). *ALTEX* 2, No. 2, 5-14.
- ÖZTÜRK, H., & ABİDİN, İ. (2021). Sinirbilim Araştırmalarında Taze Beyin Kesitleri: Fizyolojik Yöntemler, Avantajları Ve Kullanım Alanları. *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 18(3), 517-528
- Przyborski, S. (2017). *Technology Platforms for 3D Cell Culture*. Wiley-Blackwell. Available online at: <https://www.wiley.com/en-gb/Technology+Platforms+for+3D+Cell+Culture:+A+User's+Guide+-p-9781118851500>
- Pujol, N., Cypowyj, S., Ziegler, K., Millet, A., Astrain, A., Goncharov, A., Jin, Y., Chisholm, A.D., Ewbank, J.J., 2008. Distinct innate immune responses to infection and wounding in the *C. elegans* epidermis. *Curr. Biol.* 18, 481-489.
- Raunio H. In silico toxicology - non-testing methods. *Front Pharmacol.* 2011;2(33):33.
- Raies AB, Bajic VB. In silico toxicology: Computational methods for the prediction of chemical toxicity. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci.* 2016;6(2):147-72.
- Ren, K.; Chen, Y.; Wu, H. New materials for microfluidics in biology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014, 25, 78- 85, doi: 10.1016/j.copbio.2013.09.004.
- Rothenfluh, A., Heberlein, U., 2002. Drugs, flies, and videotape: the effects of ethanol and cocaine on *Drosophila* locomotion. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 639-645.
- Rowe, R. G., & Daley, G. Q. (2019). Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nature Reviews Genetics*, 20(7), 377-388.
- Sachs, N. et al. A living biobank of breast cancer organoids captures disease heterogeneity. *Cell* 172, 373-386.e10 (2017).
- Sadri, F. (2002). Letter to the editors of the proceedings of a workshop on isolated perfused organs. *ALTEX* 19, 110- 111.
- Sato T, et al. (2009) Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459(7244):262-265. 10.1038/nature07935.
- Sato, T. et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* 141, 1762-1772 (2011).
- Scanu, T. et al. *Salmonella* manipulation of host signaling pathways provokes cellular transformation associated with gallbladder carcinoma. *Cell Host Microbe* 17, 763-774 (2015).
- Schwarz, R. I., and Bissell, M. J. (1977). Dependence of the differentiated state on the cellular environment: modulation of



- collagen synthesis in tendon cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 4453–4457. doi: 10.1073/pnas.74.10.4453
- Segeritz CP, Vallier L. Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. Basic Science Methods for Clinical Researchers. 2017:151–72. doi: 10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6. Epub 2017 Apr 7. PMID: PMC7149418.
- Simian, M., and Bissell, M. J. (2017). Organoids: a historical perspective of thinking in three dimensions. *J. Cell Biol.* 216, 31–40. doi: 10.1083/jcb.201610056
- Strange, K., 2007. Revisiting the Krogh principle in the post-genome era: *Caenorhabditis elegans* as a model system for integrative physiology research. *J. Exp. Biol.* 210, 1622–1631.
- Taylor, M. W., and Taylor, M. W. (2014). "A history of cell culture," in *Viruses and Man: A History of Interactions* (Cham: Springer International Publishing), 41–52. doi: 10.1007/978-3-319-07758-1\_3
- Thasler, W. E., Schlott, T., Kalkuhl, A., Plän, T., Irrgang, B., Jauch, K. W., & Weiss, T. S. (2006). Human tissue for in vitro research as an alternative to animal experiments: A charitable "honest broker" model to fulfil ethical and legal regulations and to protect research participants. *Alternatives to Laboratory Animals*, 34(4), 387–392.
- Thoma, C. R., Zimmermann, M., Agarkova, I., Kelm, J. M., & Krek, W. (2014). 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Advanced drug delivery reviews*, 69, 29–41.
- Tüfek, H., & Özkan, Ö. (2018). 4R rule in laboratory animal science. *Commagene J Biol*, 21(1), 55–60.
- Valerio LG Jr. In silico toxicology for the pharmaceutical sciences. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009 Dec 15;241(3):356–70. doi: 10.1016/j.taap.2009.08.022. Epub 2009 Aug 28. PMID: 19716836.
- van de Wetering, M. et al. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. *Cell* 161, 933–945 (2015).
- Vedani, A. (1991). [Computer-aided drug design-an alternative to animal testing in the pharmacological screening][Article in German]. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*, 8(1), 39–60.
- Verissimo, C. S. et al. Targeting mutant RAS in patient- derived colorectal cancer organoids by combinatorial drug screening. *eLife* 5, pii: e18489 (2016).
- Weeber, F. et al. Preserved genetic diversity in organoids cultured from biopsies of human colorectal cancer metastases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 112, 13308–13311 (2015).
- Wong, C.H.; Siah, K.W.; Lo, A.W. Estimation of clinical trial success rates and related parameters. *Biostatistics* 2018, 20, 273–286, doi:10.1093/biostatistics/kxx069.
- Wilson-Sanders, S.E., 2011. Invertebrate models for biomedical research, testing, and education. *ILAR J.* 52, 126–152.
- Yamamoto C, McIlwain H. Electrical activities in thin sections from the mammalian brain maintained in chemically- defined media in vitro. *J Neurochem.* 1966;13(12): 1333– 1343.
- Yin, Y. et al. Modeling rotavirus infection and antiviral therapy using primary intestinal organoids. *Antiviral Res.* 123, 120–131 (2015).