



# NÜKLEER TIP SEMİNERLERİ

*Nuclear Medicine Seminars*

TÜRKİYE NÜKLEER TIP DERNEĞİ

Turkish Society of Nuclear Medicine

Mart 2019 Cilt: 5 Sayı: 1 [www.nukleertipseminerleri.org](http://www.nukleertipseminerleri.org)



Bölüm Editörü: Gülay Durmuş Altun  
Klinik Öncesi Çalışmalarda Kullanılan Hastalık  
Modelleri ve Görüntüleme Teknikleri

# NÜKLEER TIP SEMİNERLERİ

## Nuclear Medicine Seminars



### İmtiyaz Sahibi / Association Owner

Gamze Çapa Kaya

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

### Editör / Editor

Zeynep Burak

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

### Yardımcı Editör / Associate Editor

Tamer Özülker

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nükleer Tıp Kliniği, İstanbul, Türkiye

### Editöryal Kurul / Editorial Board

Elvan Sayit Bilgi

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

Murat Fani Bozkurt

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Tevfik Fikret Çermik

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı; İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nükleer Tıp Kliniği, İstanbul, Türkiye

Hakan Demir

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Kocaeli, Türkiye

Gamze Çapa Kaya

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Zehra Özcan

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Gülün Uçmak

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı ve Ankara Dr. Abdurrahman Yurtalan Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nükleer Tıp Kliniği, Ankara, Türkiye

Doğangün Yüksel

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye

Nükleer Tıp Seminerleri Dergisi, Türkiye Nükleer Tıp Derneği'nin resmi yayın organıdır.  
The Nuclear Medicine Seminars is an official journal of the Turkish Nuclear Medicine Society.

TÜRKİYE NÜKLEER TIP DERNEĞİ  
Turkish Society of Nuclear Medicine



Galenos Yayınevi Kurucusu ve Sahibi/  
Galenos Publishing House Owner and Publisher  
Erkan Mor

Genel Yayın Koordinatörü/Publication Coordinator  
Burak Sever

Web Koordinatörleri/Web Coordinators  
Turgay Akpınar

Grafik Departmanı/Graphics Department  
Ayda Alaca  
Çiğdem Birinci  
Gülşah Özgül

Proje Koordinatörleri/Project Coordinators  
Eda Koluksa  
Hatice Balta

Zeynep Altındağ

Proje Asistanları/Project Assistants

Gamze Aksoy

Nurcan Acarçavaş

Finans Koordinatörü/Finance Coordinator

Sevinç Çakmak

Araştırma ve Geliştirme/Research and Development

Kerim Sancar Ölmez

Mert Can Köse

Yayınevi İletişim/Publisher Contact

Adres/Address: Molla Gürani Mah. Kaçamak Sk.

No: 21/1 34093 İstanbul, Türkiye

Telefon/Phone: +90 (212) 621 99 25

Faks/Fax: +90 (212) 621 99 27

E-posta/E-mail: info@galenos.com.tr/yayin@galenos.com.tr

Web: www.galenos.com.tr Yayıncı Sertifika No: 14521

Yayın Tarihi/Publication Date: Mart 2019/March 2019

E-ISSN: 2149-6447

Dört ayda bir yayımlanan süreli yayındır.

The international scientific journal is published every four months.



# NÜKLEER TIP SEMİNERLERİ

## *Nuclear Medicine Seminars*

### Amaç Kapsam

Nükleer Tıp Seminerleri Dergisi, Türkiye Nükleer Tıp Derneği'nin sürekli tıp eğitimi faaliyetleri kapsamında elektronik-dergi olarak yayınlanan, bilimsel içerikli resmi yayın organıdır. Derginin yayın dili Türkçedir. Mart, Temmuz, Kasım aylarında yılda 3 sayı olacak şekilde yayınlanmaktadır.

Nükleer Tıp Seminerleri dergisinin yayın hedefi uluslararası medikal yayıncılık standartları ve etik ilkelere uygun olarak nükleer tıp alanında görev yapan hekimlere, fizikçilere, radyofarmasistlere ve diğer sağlık profesyonellerine yönelik hakemli eğitim materyallerinin oluşturulmasıdır. Kanıta dayalı tıp literatürüne yansımış güncel bilgileri içeren Derleme, İlginç Olgular, Atlas ve Uygulama Kılavuzları gibi eğitim amaçlı yazılar ve görsel materyaller derginin içeriğini oluşturmaktadır.

Derginin yayın politikası Nükleer Tıp Seminerleri Dergisi yönergesi kapsamında Türkiye Nükleer Tıp Derneği Yönetim Kurulu tarafından atanan bir Editör ve bir Editör yardımcısından oluşan Editörler Kurulu tarafından uluslararası tıbbi yayıncılık standartları ve etik prensiplere bağlı kalınarak belirlenir ve denetlenir. Editörler Kurulu her sayı için Nükleer Tıp çalışmaları konularından bir veya iki ana başlık belirler ve içerik planlaması ve koordinasyonu için bir konuk Editör atanır. Editörler Kurulu, konuk Editör ile birlikte alt başlıkları ve yazarları planlarlar. Yazıların basım öncesi denetimi ve içerik düzenlemeleri konuk Editör ve Editörler Kurulu tarafından yapılır. Konuk Editörlerin görev ve sorumlulukları ([www.nukleertipseminerleri.org](http://www.nukleertipseminerleri.org)) internet adresinde yayınlanan Nükleer Tıp Seminerleri Dergisi yönergesi ile belirlenmiştir. Çalışma gruplarının başkan ve çekirdek üyeleri Dergi Danışmanlar Kurulu'nu oluşturmaktadır. Uygulama kılavuzları için konuk Editör atanmaz.

Reklam vermek isteyen kuruluşlar Türkiye Nükleer Tıp Derneği'ne başvurmalıdır.

#### Açık Erişim Politikası

Dergide açık erişim politikası uygulanmaktadır. Açık erişim politikası Budapest Open Access Initiative(BOAI) <http://www.budapestopenaccessinitiative.org/> kuralları esas alınarak uygulanmaktadır.

Açık Erişim, "[hakem değerlendirmesinden geçmiş bilimsel literatürün], İnternet aracılığıyla; finansal, yasal ve teknik engeller olmaksızın, serbestçe erişilebilir, okunabilir, indirilebilir, kopyalanabilir, dağıtılabilir, basılabilir, taranabilir, tam metinlere bağlantı verilebilir, dizinlenebilir, yazılıma veri olarak aktarılabilir ve her türlü yasal amaç için kullanılabilir olması"dır. Çoğaltma ve dağıtım üzerindeki tek kısıtlama yetkisi ve bu alandaki tek telif hakkı rolü; kendi çalışmalarının bütünlüğü üzerinde kontrol sahibi olabilmeleri, gerektiği gibi tanınmalarının ve alıntılanmalarının sağlanması için, yazarlara verilmelidir.

#### Baskı İzinleri

CC BY-NC-ND lisansı altında yayınlanan materyalin ticari amaçlı kullanım (satış vb.) için telif hakkı sahibi ve yazar haklarının korunması için izin gereklidir. Baskı izinleri için başvurular Editör ofisine yapılmalıdır.



# NÜKLEER TIP SEMİNERLERİ

## *Nuclear Medicine Seminars*



### About

The Nuclear Medicine Seminars is a legal scientific publication, which is published as an electronic journal in context of continuing medical education activities of the Turkish Nuclear Medicine Society. The official language is Turkish, and it is being published three times a year, in March, July, November.

The aim for publishing the Nuclear Medicine Seminars is providing peer-reviewed educational materials in conjunction with the international medical publishing standards and ethical issues, to physicians, physicists, radiopharmacists, and other health professionals working in the field of nuclear medicine. The contents of the journal are educational and visual materials, such as Reviews that incorporates the updated information based on evidence-based medicine, Interesting Cases, Atlas and Application Guidelines.

The publication policy of the journal is determined and audited by the Editorial Board that appointed by the Board of Directors of Turkish Nuclear Medicine Society, and which includes an Editor and an Assistant Editor, according to Nuclear Medicine Seminars directives and international medical publishing standards and ethical principles. The Editorial Board determines one to two main headings from the working area of Nuclear Medicine for each issue, and appoints a guest Editor for content planning and coordination. The Editorial Board plans the sub-headings and the authors, together with the guest Editor. The reviews and content revisions are conducted by the guest Editor and the Editorial Board prior to publication. The missions and the responsibilities of the guest Editors were determined by the directives of Nuclear Medicine Seminars that issued in ([www.nukleertipseminerleri.org](http://www.nukleertipseminerleri.org)) internet address. The Advisory Board of the journal includes the president and the core members of study groups. A guest Editor is not appointed for the application Guidelines.

The institutions willing to advertise should make an application to the Turkish Nuclear Medicine Society.

#### Open Access Policy

This journal provides immediate open access to its content on the principle that making research freely available to the public supports a greater global exchange of knowledge.

Open Access Policy is based on the rules of the Budapest Open Access Initiative (BOAI) <http://www.budapestopenaccessinitiative.org/>. By "open access" to peer-reviewed research literature, we mean its free availability on the public internet, permitting any users to read, download, copy, distribute, print, search, or link to the full texts of these articles, crawl them for indexing, pass them as data to software, or use them for any other lawful purpose, without financial, legal, or technical barriers other than those inseparable from gaining access to the internet itself. The only constraint on reproduction and distribution, and the only role for copyright in this domain, should be to give authors control over the integrity of their work and the right to be properly acknowledged and cited.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License.





# NÜKLEER TIP SEMİNERLERİ

## Nuclear Medicine Seminars

### Yazarlara Bilgi

Nükleer Tıp Seminerleri Dergisinde sadece Editörler Kurulu ve Konuk Editör tarafından belirlenen ve davet edilen yazarlar yayınlanır. Bu sistem dışında dergiye gönderilen yazılar değerlendirilmeye alınmaz.

#### YAZILARIN FORMATI

"Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publications (<http://www.icmje.org>)" kurallarına göre düzenlenmelidir. Yazarlar, yayın haklarının devredildiğini belirten onay belgesini (Yazarlık, Yayın Hakkı Devri, Maddi Yardım ve Teşekkür-Kabul İzin Formu) uygun biçimde doldurarak Dergi Editörüne göndermelidir. Bu formlara dergi web adresinden ([www.nukleertipseminerleri.org](http://www.nukleertipseminerleri.org)) ulaşılabilir. Bu belgenin tüm yazarlar tarafından imzalanarak dergiye gönderilmesi ile birlikte yazarlar, gönderdikleri çalışmanın başka bir dergiye yayınlanmadığı ve/veya yayınlanmak üzere incelemede olmadığı konusunda garanti vermiş, bilimsel katkı ve sorumluluklarını beyan etmiş sayılırlar. Dergide yayınlanan yazılar için herhangi bir ücret ya da karşılık ödenmez.

Yazarlar Derleme, İlginc Olgular, Atlas ve Uygulama Kılavuzları gibi yazıları derginin online yazı kabul sistemi üzerinden gönderirler ([www.nukleertipseminerleri.org](http://www.nukleertipseminerleri.org)). Yazılarının telif hakkını Nükleer Tıp Seminerleri'ne bıraktıklarını bildiren onay formunu doldurmaları gereklidir. Ayrıca yayında adı olan tüm yazarlar bilimsel katkı ve sorumluluklarını ve çıkar çatışması olmadığını bildiren toplu imza ile yayına katılmırlar.

Editörler Kurulu yayın koşullarına uymayan yazıları; düzeltmek üzere yazarına geri gönderme, biçimce düzenleme veya reddetme yetkisine sahiptir. Gönderilen yazılar, editör, editör yardımcısı konuk editörün incelemesinden geçip, gerek görüldüğü takdirde, istenen değişiklikler yazarlarca yapıldıktan sonra yayımlanır. Makaleler yayınlanmadan önce intihal programı olan iThenticate ile taranmaktadır.

Nükleer Tıp Seminerleri'nin isim hakkı ve yayınlanan içeriklerin telif hakları yazarların yazılı izinleriyle Türkiye Nükleer Tıp Derneği'ne, yazarların bilimsel ve etik sorumlulukları yazarlara aittir. Yazılar, tablolar, görseller ve diğer tüm içeriklerin kullanımı ve tıpkı basımları için Türkiye Nükleer Tıp Derneği'ne müracaat edilmelidir.

#### YAZIM KURALLARI

##### Kısaltmalar

Makalelerde kullanılan kısaltmalar uluslararası kabul görmüş şekilleriyle kullanılmalı, ilk kullanıldıkları yerde açık olarak yazılmalı ve parantez içinde kısaltılmış şekli gösterilmelidir. Örneğin, ilk geçtiği yerde, Pozitron Emisyon Tomografi (PET); biçiminde verilmelidir. İlaç adları kullanımında ilaçların jenerik adları Türkçe okunuşlarıyla yazılır. Ölçüm birimleri metrik sisteme uygun olarak verilmeli; örneğin, "mg" olarak yazılmalıdır. Nokta kullanılmalıdır; ek alırsa (!) ile ayrılmalıdır. Laboratuvar ölçümleri Uluslararası Sistem (US; Système International: SI) birimleri ile bildirilmelidir.

##### YAZIM DİLİ

Derginin yayın dili Türkçe olup, Türkçe yazılarda Türk Dil Kurumu'nun Türkçe sözlüğü veya [www.tdk.gov.tr](http://www.tdk.gov.tr) adresi esas alınmalıdır. Makalelerin ve özetlerin, dergiye gönderilmeden önce gerek duyulduğunda, gramer kuralları yönünden profesyoneller gözden geçirilmesi sağlanmalıdır. Ayrıca gönderilmiş olan makalelerdeki yazım ve dilbilgisi hataları düzeltilmektedir. Makalelerin yazım vedil bilgisi kurallarına uygunluğu yazarların sorumluluğundadır.

##### DERGİYE GÖNDERİLECEK MAKALE TÜRLERİ VE ÖZELLİKLERİ

Nükleer Tıp Seminerleri (International Committee for Medical Journal Editors: ICMJE) hazırlanan ve yeniden düzenlenmiş 5. Baskısı 1997 yılında (International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. New England Journal of Medicine, 1997; 336:309-315); kısaca "Vancouver stili" diye anılan kurallara göre düzenlenmiş yazılar yayınlanır.

Makale, PC uyumlu bilgisayarlarda Microsoft Word programı ile yazılmalıdır. Makaleler sayfanın her bir kenarından 2 cm kenar boşluğu bırakılarak ve çift satır aralıklı "arial, calibri veya times new roman" yazı formatlarından biri ile yazılmalıdır. Aksi belirtilmedikçe gönderilen yazılarla ilgili tüm yazışmalar birinci isim yazarla yapılacaktır.

##### Derleme

Derlemeler en fazla üç yazar tarafından yazılmış olmalıdır. Türkçe başlık, Türkçe özet ve Türkçe anahtar kelimeler, İngilizce başlık, İngilizce özet, İngilizce anahtar kelimeler içermelidir. Derleme türü makalelerde özet tek paragraf olacak şekilde hazırlanmalı ve 400 kelime ile sınırlı olmalıdır. Şu alt başlıklar bulunacak şekilde bulunmalıdır; Tam metin dosyası en fazla 4000 kelime olmalı, kaynak sayısı ise 70 adedi geçmemelidir.

Giriş: Derlemenin anahtarlarını içermeli ve konuyla ilgili daha önceki çalışmalardan bahsedilmelidir.

Derleme metni: Metin başlıklar ve konularla ilgili paragraflar içerir. Her bir başlık en az bir hükme ulaşmalıdır.

Sonuç: Derlemenin konusuyla ilgili çıkarımları içeren kısa bir paragraf hazırlanmalıdır. Uygunsa, sonraki araştırmalarla ilgili önerilerde bulunulur.

##### İlginc Olgular

Tanı, ayırıcı tanı, klinik değerlendirme tedaviye etki açısından özellik ve bilimsel önem taşıyan, bir ya da birden çok olgunun özelliklerini sunan ve tartışan yazılardır.

Olgu sunumları; Türkçe ve İngilizce başlık, Türkçe ve İngilizce özetler, Türkçe ve İngilizce anahtar kelimeler (en fazla 3 kelime), Ana metin, (Giriş, Olgu Sunumu ve Tartışma bölümlerini içermelidir.), Kaynaklar, Tablo/Şekil/resim bölümlerini içerir.

Ana metin alt başlıkları yazı içeriğinin gerektirdiği biçimde düzenlenir. Olgu sunumlarının Giriş ve Tartışma kısımları kısa ve öz olmalı, özet kısmı tek paragraf

olacak şekilde en fazla 150 kelime olacak şekilde hazırlanmalıdır. Bölümlendirilmiş özet hazırlanmasına gerek yoktur. Olgu sunumlarının ana metin bölümü (başlık sayfası, kaynaklar, tablo/şekil/resim hariç) 1000 kelimeyi kaynak sayısı 10'ı geçmemelidir.

##### Atlas

Tanı, ayırıcı tanı, klinik değerlendirme ve tedaviye etki açısından özellik ve önem taşıyan belirli bir konuya, lezyona veya antiteye odaklanmış güncel ve bilimsel önem taşıyan yazılardır.

Atlas sunumları; Türkçe ve İngilizce başlık, Türkçe ve İngilizce özetler, Türkçe ve İngilizce anahtar kelimeler (en fazla 3 kelime), Ana metin, (Giriş, Olgu Sunumları ve Tartışma bölümlerini içermelidir.), Kaynaklar, Tablo/şekil/resim bölümlerini içerir.

Ana metin alt başlıkları yazı içeriğinin gerektirdiği biçimde düzenlenir.

Atlasların Giriş ve Tartışma kısımları kısa ve öz olmalı, özet kısmı tek paragraf olacak şekilde en fazla 150 kelime olacak şekilde hazırlanmalıdır. Atlasların ana metin bölümü (başlık sayfası, kaynaklar, tablo/şekil/resim hariç) 2000 kelimeyi kaynak sayısı 20'ı geçmemelidir.

##### Uygulama Kılavuzu

Türkiye Nükleer Tıp Derneği çalışma grupları tarafından Nükleer Tıp görüntüleme ve tedavileri konusunda hekimlere ve sağlıkçılara yol göstermek, metodolojiyi tanımlamak, bu uygulamaların doğru ve standart bir şekilde gerçekleştirilmesini sağlamak amacıyla hazırlanır.

Çalışma grubunun her üyesi kılavuzun yazarlarından biridir. Çalışma grubunun başkanı tarafından kılavuz metninin oluşturulmasında görev verilen üyelerinin isimleri başa yazılır, diğer üyeler yazar listesinde alfabetik sıra ile yer alırlar.

Kılavuzlar "SNM/EANM Guideline for Guideline Development 6", Delbec K, Chiti A, Christian P, et al. JNM 2012;40:1-7" de tanımlanan formata göre hazırlanır. Türkçe ve İngilizce W, Türkçe ve İngilizce özetler, Türkçe ve İngilizce anahtar kelimeler (en fazla 3 kelime) tanımlanmalıdır. Ana metin; giriş, amaç, tanımlar, endikasyonlar, hasta hazırlığı, radyofarmasötik, uygulama, radyasyon güvenliği, kaynaklar, Tablo/şekil/resim bölümlerini içerir.

##### Kaynaklar

Kaynaklar ana metindeki geçiş sırasına göre numaraları ve metinde, tablolarda, tablo ya da şekil dipnotlarında parantez içinde gösterilir. Her kaynak, tüm yazar adları eklenerek sıralanabilir. Kaynak sayfa numaraları açık olarak yazılmalıdır. Kaynakların yazımında, aşağıdaki örnekler dikkate alınır. Burada örneği verilmemiş kaynakların yazım kuralları için "Ortak kurallar"a başvurulur. Dergi adları Index Medicus'taki biçime göre kısaltılır; burada bulunamayan bir dergi ise, kısaltılmadan yazılır. Dergi listesi A.B.D. Ulusal Tıp Kütüphanesi (USA-NLM; National Library of Medicine) web sitesinden (<http://www.nlm.nih.gov>) elde edilebilir.

Kaynakların ağırlıklı olarak son yıllarda yayımlanmış olanlardan seçilmesi önerilir.

Kaynakların doğruluğundan yazar(lar) sorumludur.

Dergi: Yazar A, Yazar B, Yazar C. Makalenin başlığı. Dergi adının kısaltılması 2011;4:25-27.

Kitap: Yazar A, Yazar B, Yazar C. Bölüm başlığı. In: Kitabın adı. Kaçınç baskı olduğu.

Editörler Editör A, Editör B, Editör C. Yayınlanma yeri: Yayınevi; 2011. sayfa. 25-27.

Kaynak yazımı için örnekler:

##### Dergi Yazıları:

Dergi: Soukup V, Dušková J, Peší M, et al. The prognostic value of t1 bladder cancer substaging: a single institution retrospective study. Urol Int 2014;92:150-156.

Yazar kurum ise: The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing: Safety and performance guidelines. Med J Aust 1996;164:282-284.

Ek sayı: Goodman WK, McDougle JC, Price LH. Pharmacotherapy of obsessive compulsive disorder. J Clin Psychiatry 1992;53(Suppl 14):29-37.

##### Kitaplar

Kitap yazar(lar) kişi ise: Jacobson E. The Self and the Object World. 2nd Edition. New York: International Universities Press; 1964.

Kitap yazar kurum ise: Institute of Medicine (US). Looking at the Future of the Medicaid Program. Washington: The Institute; 1992.

Kitap bölümü: Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. Laragh JH, Brenner BM, editörler. Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management içinde. 2. Baskı. New York: Raven Press; 1995; s. 465-478.

Çeviri kitap: Amerikan Psikiyatri Birliği. Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı. 4. Baskı. Koroğlu E, çev. editör. Ankara: Hekimler Yayın Birliği; 1995.

##### Şekil, Tablo ve Grafikler

Şekil ve tablo seçiminde dikkatli karar verilmelidir. Derleme ve orijinal araştırmalar için en fazla 4 adet, olgu sunumları için 2 adet şekil/tablo kabul edilecektir. Tüm resimler// "Şekil" olarak adlandırılmalı ve metin içinde numaralandırılmış olarak belirtilmelidir. Şekiller tanımlayıcı bir başlık ve açıklama içermelidir. Ana metinde bulunmayan ve şekillerde kullanılan tüm kısaltmalar, şekil açıklamalarında tanımlanmalıdır. Özelliği olan bir yazıda dörtlük daha fazla şekil/tablo olması gerekiyorsa bu durumda yazar, Editörler Kuruluna bunu bildirmelidir. Bütün tablo ve şekillere metin içinde atıf yapılmalıdır.

Her bir tablo ayrı sayfaya basılarak, metin içinde geçtiği sıraya göre numaralandırılır. Her tablonun bir başlığı bulunur ve gerektiğinde (örneğin, tabloda geçen kısaltmalar) tablo altına açıklamaları yazılır. Her bir tablo ana metne başvurma gereği doğurmayacak biçimde anlaşılır olmalıdır.

Daha önce yayımlanmış bir şekil veya tablo kullanılmak istenirse, yazarlardan çizimlerin temin edilmesi ve kaynağın tüm detaylarının bildirilmesi gereklidir. Şekil üretimi için yayınevi izni araştırması yapılacaktır. Şekil ve çizimlerin ilgili izinlerinin alınmasından yazarlar sorumludur.

# NÜKLEER TIP SEMİNERLERİ



## Intructions to Authors

## Nuclear Medicine Seminars

Only the manuscripts that determined and invited by the Editorial Board and the Guest Editor are published in Nuclear Medicine Seminars. The other manuscripts that sent to the journal out of this concept are not taken into consideration.

The format of the manuscripts should be constructed according to "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publications (<http://www.icmje.org>)" regulations. The authors should also complete a consent form properly for delivering the publication rights (Authorship, Delivery of Publication Rights, Financial Aid, and Acknowledgements-Consent Permission Form), and send the form to the journal Editor. These forms can be reached from the journal's web address ([www.nukleertipseminerleri.org](http://www.nukleertipseminerleri.org)). By signing this document, all authors guarantee that the manuscript has not been published previously and/or under assessment for publishing in a journal, and declare their scientific contribution and responsibility on the manuscript. No fee or provision is paid for the manuscripts that published in the journal. The authors send the Reviews, Interesting Cases, Atlas and Application Guidelines by the online submission system of the journal ([www.nukleertipseminerleri.org](http://www.nukleertipseminerleri.org)). They should also complete the approval form, which states that they delivered the copyrights to the Nuclear Medicine Seminars. Also, all authors must participate to the manuscript by signing for their scientific contribution and responsibilities, and they do not have conflict of interest on the manuscript.

The Editorial Board has right to organize, send back to the author, arrange the format, or refuse the manuscript in cases when the manuscript do not comply with the publication requirements. The manuscripts are published after the reviews of the Editor, Assistant Editor, and Guest Editor, and after completion of the necessary revisions, if there is any, by the authors. The manuscripts are being evaluated prior to publication by the plagiarism detection software, iThenticate.

The royalty of the Nuclear Medicine Seminars, and the copyrights of the published content that delivered by the written permissions of the authors, are belonged to Turkish Nuclear Medicine Society, and the scientific and ethical responsibilities of the manuscripts are belonged to the authors. An appeal to the Turkish Nuclear Medicine Society is necessary for using and copying of the manuscripts, tables, visual materials, and all remaining content.

### RULES FOR WRITING

#### Abbreviations

The abbreviations that used in the manuscripts should be used according to their internationally accepted styles, should be written in unabbreviated forms and should be written as abbreviated in parenthesis at the first place in manuscript. For example, Positron Emission Tomography (PET) should be used in the first mention. If the drug names are used, the generic names should be written in Turkish pronunciation. The measurement units should be in metric scales, e.g. "mg". A period should not be used, and the attachments should be separated by (). The laboratory values should be reported by International System (Système International: SI) units.

#### LANGUAGE

The publication language of the articles is Turkish, and Turkish manuscripts should be based on the Turkish Dictionary or the [www.tdk.gov.tr/web](http://www.tdk.gov.tr/web) page of the Turkish Language Society. If necessary, the manuscripts and the abstracts should be reviewed professionally for grammatical rules prior to submitting to the journal. Also, the typos and grammatical errors in the submitted manuscripts are being corrected. The appropriateness of the manuscripts to writing and grammatical rules are in responsibility of the authors.

#### ARTICLE TYPES AND PROPERTIES

Nuclear Medicine Seminars publishes the manuscripts that prepared in conjunction with the rules of International Committee for Medical Journal Editors: ICMJE, 5th edition, which was published in 1997 (International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. New England Journal of Medicine, 1997; 336:309-315), and which is called shortly as "Vancouver Style". The articles should be written in PC based computers with Microsoft Word software. There should be 2 cm of space in both sides of the page, double line-spacing, and the font should be "Arial, Calibri, or Times New Roman". All of the correspondence for the articles should be made to the first author, unless otherwise stated.

#### Reviews

The reviews should be prepared by a maximum of three authors. It should contain Turkish title, Turkish abstract, Turkish keywords, English title, English abstract, and English keywords. The abstract should be one paragraph in reviews, and should not exceed 400 words. It should consist the following sub-headings:

The full-text should be maximum 4000 words, and the number of the references should be maximum 70.

**Introduction:** It should contain the mainframe of the review, and it should mention the previous work on the subject.

**Review body:** Text should include headings and paragraphs related to the subject. Each heading should reach to a conclusion.

**Conclusion:** A brief paragraph should be prepared to include the outcomes about the subject of the review. If appropriate, it should make recommendations for the future studies.

#### Interesting Cases

These are the manuscripts that present and discuss the properties of one or more cases, which have scientific importance for diagnosis, differential diagnosis, clinical evaluation, and treatment.

**Case reports:** These include Turkish and English titles, Turkish and English abstracts, Turkish and English keywords (maximum 3 words), Main text (which contains Introduction, Case Report, and Discussion), References, and Tables/figures/images.

Sub-headings of the main text should be arranged according to the content of the manuscript.

The Introduction and Discussion sections of the case reports should be brief, and the abstract should be one paragraph with a maximum of 150 words. It is not necessary to prepare structured abstract. The main text of the case reports (excluding title page, references, tables/figures/images) should not exceed 1000 words, and number of the references should not exceed 10.

#### Atlas

These are the texts that focused on a specific issue, lesion, or entity, which has recent or scientific importance for diagnosis, differential diagnosis, clinical evaluation, and treatment.

**Atlas presentations:** These include Turkish and English titles, Turkish and English abstracts, Turkish and English keywords (maximum 3 words), Main text (which contains Introduction, Case Report, and Discussion), References, and Tables/figures/images.

Sub-headings of the main text should be arranged according to the content of the manuscript.

The Introduction and Discussion sections of the atlases should be brief, and the abstract should be one paragraph with a maximum of 150 words. The main text of the case reports (excluding title page, references, tables/figures/images) should not exceed 2000 words, and number of the references should not exceed 20.

#### Application Guideline

These are prepared by the workgroups of Turkish Nuclear Medicine Society for the physicians and health professionals for guidance, defining the methodologies, and providing accurate and standardized applications about the imaging and treatment options of Nuclear Medicine.

Each member of the workgroup is also an author of the guideline. The names of the members, who were recruited for the preparation of the guideline, are presented in first order, and the names of the remaining members are presented in alphabetical order afterwards.

The guidelines are prepared according to the format that described in "SNM/EANM Guideline for Guideline Development 6", Delbec D, Chiti A, Christian P, et al. JNMT 2012;40:1-7. They include Turkish and English titles, Turkish and English abstracts, Turkish and English keywords (maximum 3 words). Main text should contain Introduction, Aim, Definitions, Indications, Patient Preparation, Radiopharmaceuticals, Application, Radiation Safety, References, and Tables/figures/images.

#### References

References are numbered according to the order in the text, and presented in parenthesis in the text, tables, and footnotes of tables and images. Each reference may be ordered by mentioning all of the author names. The page numbers in references should be mentioned clearly. The following samples should be taken into consideration for the references. The "Common Rules" are applied for the references without samples. The names of the journals should be abbreviated according to Index Medicus; and unabbreviated names should be used for the journals which are not listed. The list of the journals can be obtained from the webpage (<http://www.nlm.nih.gov>) of the National Library of Medicine of USA.

It is recommended to choose the references from the publications in recent years.

The accuracy of the reference(s) is in the responsibility of the authors.

**Journal:** Author A, Author B, Author C. Title. Abbreviated Name of the Journal 2011;4:25-27.

**Book:** Author A, Author B, Author C. Chapter Title. In: Name of the Book. Edition Number. Editors Editor A, Editor B, Editor C. Place of Publication: Publisher; 2011. Pages. 25-27.

**Samples for references**

#### Journal Articles

**Journal:** Soukup V, Dušková J, Pešl M, et al. The prognostic value of t1 bladder cancer substaging: a single institution retrospective study. Urol Int 2014;92:150-156.

**Institution as the Author:** The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing: Safety and performance guidelines. Med J Aust 1996;164:282-284.

**Supplement:** Goodman WK, McDougle JC, Price LH. Pharmacotherapy of obsessive compulsive disorder. J Clin Psychiatry 1992;53(Suppl 14):29-37.

#### Books

**Person as the Author(s):** Jacobson E. The Self and the Object World. 2nd Edition. New York: International Universities Press; 1964.

**Institution as the Author:** Institute of Medicine (US). Looking at the Future of the Medicaid Program. Washington: The Institute; 1992.

**Book Chapter:** Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management içinde. 2. Baskı. New York: Raven Press; 1995; s. 465-478.

**Translation:** Amerikan Psikiyatri Birliği. Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı. 4. Baskı. Köroğlu E, çev. editörü. Ankara: Hekimler Yayın Birliği; 1995.

#### Figure, Table, and Illustrations

Figures and tables should be selected carefully. A maximum of 4 figures/tables should be allowed for reviews and original articles, and 2 figures/tables should be allowed for case-reports. All images should be named as "Figure" and should be cited numerically in the text. Figures should have a descriptive title and explanation. All abbreviations which are not in the main text, and only in the figures, should be defined in the figure explanations. If more than 4 figures/tables are needed in a specified manuscript, authors should inform Editorial Board about it. All tables and figures should be cited in the text.

Each table should be printed on separate pages, and numbered according to the order in the text. Each table should have a title and footnotes, if necessary (e.g. abbreviations in the tables). Each table should be exploratory enough that there should be no need to check the text.

If a previously published figure or table is going to be used, all illustrations and all details of the references should be provided by the authors. Publisher permission will be sought for the production of the figures. The required permissions for the figures and illustrations are in responsibility of the authors.

# NÜKLEER TIP SEMİNERLERİ

## Nuclear Medicine Seminars

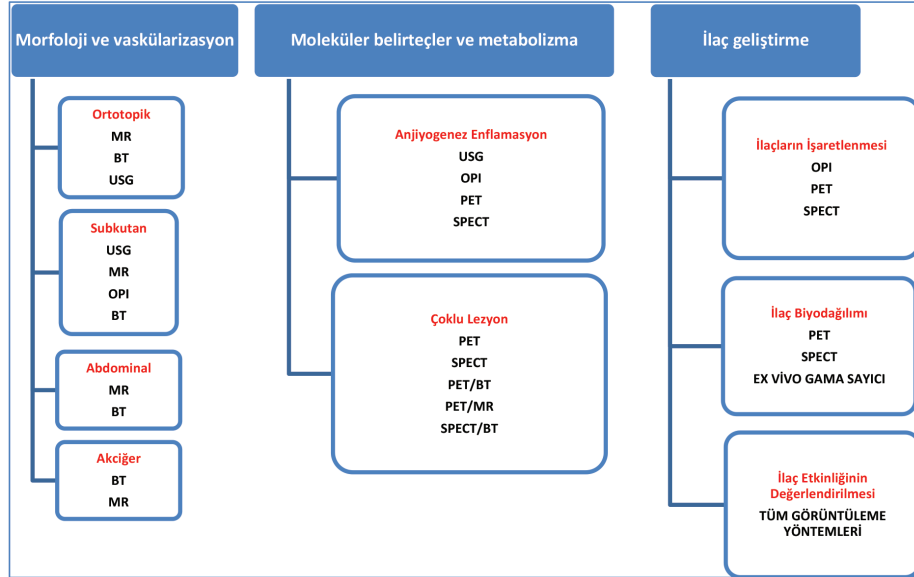
Editörden/Editorial

### Klinik Öncesi Çalışmalarda Görüntüleme Teknikleri

Deney hayvanları kullanılarak yapılan görüntüleme çalışmaları, 1950'li yıllarda bilimsel çalışmalar arasında yer almaya başlamıştır. Bu yıllarda öncelikle, farklı radyonüklid maddelerin deney hayvanlarındaki tümörlü dokuları nasıl işaretlediğine, tümörlü dokuda nasıl yerleştiğine yönelik çalışmalar yapılmıştır. 1990'lardan sonra genetiği değiştirilmiş hayvanların kullanımı da hastalıkların daha detaylı incelenebilmesine olanak sağlamaktadır. Son yıllardaki moleküler biyolojideki gelişmeler hastalıklara ve tedaviye bakışımızı değiştirmiş ve geliştirmiştir. Bu gelişmeye paralel olarak invazif olmayan görüntüleme teknolojilerinde önemli ilerleme kaydedilmiştir. Şu an kullanılan görüntüleme sistemleri doku vaskülarizasyonu, perfüzyon, metabolizma ve proliferasyondaki değişikliklerin yanı sıra, yüksek hassasiyetli dokuların moleküler hakkında fonksiyonel veri sağlamaktadır.

Klinik olarak oluşturulan bu yöntemlerin yanı sıra, görüntüleme yöntemleri, teşhis amaçlı olarak fareler ve sıçanlar gibi çok küçük hayvanlara kullanılabilecek klinik gelişmeyi göstermiştir. Görüntüleme sistemleri ile küçük hayvan görüntüleme yöntemleri, insanlarda olduğu gibi farelerde ve sıçanlarda morfolojik yapıların veya fonksiyonel, metabolik ve moleküler işlemlerin *in vivo* değerlendirilmesi mümkün olmaktadır. Yeni ilaç, tedavi protokolü veya belirteç geliştirilmesi sürecinde görüntüleme çalışması artık olmazsa olmaz yerini almıştır.

Klinik öncesi görüntüleme için araştırmacılar için bir algoritma tanımlaması en kısa şekli ile aşağıda verilmiştir. Çalışma planlaması aşamasında amaç, beklenen çıktılara ve elde var olan olanaklara yönelik olarak yöntemler yeniden değerlendirilmelidir.



MR: Manyetik rezonans, BT: Bilgisayarlı tomografi, USG: Ultrasonografi, PET: Pozitron emisyon tomografi, SPECT: Tek foton emisyon bilgisayarlı tomografi

Bu sayıda tanı ve tedavi sürelerinin geliştirilmesinde sık karşılaşılan klinik öncesi konular ve hastalık modelleri ana başlıklar şeklinde gözden geçirilmiştir. Hastalıkların tanı ve tedavisindeki yeni gelişmeler her zaman klinik öncesi basamaklardan başlamaktadır ve bu yolda çalışma grubunun her bir üyesi son derece önemlidir. Her bir hastalığın ve de tedavinin bir molekülle ilişkili olduğunu unutmamak gerekir.

Prof. Dr. Gülay Durmuş Altun

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı Edirne

# NÜKLEER TIP SEMİNERLERİ

## Nuclear Medicine Seminars



Editörden/Editorial

Değerli Meslektaşlarımız,

Tıbbi araştırma amaçlı hayvanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmaların tarihçesi 2300 yıl öncesine kadar uzanmakta. Fizyolojinin babası olarak bilinen Erasistratus M.Ö. 300 yıllarında İskenderiye’de kurduğu okulda insan ve hayvanlar üzerinde karşılaştırmalı anatomi çalışmaları yaptı. Hayvanlar üzerinde bilinen ilk deneysel çalışmaları yapan kişilerden biri ise M.S. 129-216 yıllar arasında yaşamış olan Eski Yunanlı hekim Galen’dir. Geçmişten bu yana etik düzenleme ve sınırlamalarla standardizasyonu yapılan hayvan deneyleri günümüzde biyomedikal araştırma algoritmalarının vazgeçilmez ögesi haline geldi. Geçtiğimiz yüzyıla baktığımızda bilimsel çalışmaların büyük oranda *in vitro* hücresel süreçlerin ve *ex vivo* hayvan dokularının incelemesine dayandığını görüyoruz. Son otuz yıl ise canlı hayvanların noninvazif olarak görüntülemelerini mümkün kılan yeni teknolojilerin gelişimine tanıklık etti. Görüntüleme cihazlarının minyatürlerinin yapılabilmesiyle, küçük hayvan görüntülemeleri için özelleşmiş mikro-PET, mikro-BT, mikro-MRG, mikro-SPECT cihazları kullanıma girdi. Bu yöntemler hastalık süreçlerinin patofizyolojisini noninvazif olarak izleyebilmemizi sağlamanın yanı sıra çalışma başına sakrifiye edilen deney hayvanı sayısını da azalttı.

Moleküler görüntülemenin bu heyecan verici yeni kullanım alanına duyulan ilgi, bu alanda çalışmak isteyenler için bilgilendirme gereksinimini de doğuruyor. Bu nedenle, Nükleer Tıp Seminerleri dergimizin bu sayısını klinik öncesi çalışmalarda kullanılan hastalık modelleri ve görüntüleme tekniklerine ayırılım istedik. Bu alanda öncü çalışmaları tanıdığımız Prof. Dr. Gülay Durmuş Altun hocamızın konuk editörlüğünde, alanında yetkin Nükleer Bilimler Enstitüsü ve Nükleer Tıp Hoca’ları tarafından hazırlanan bu sayı, bu çalışma alanıyla yeni tanışanlara konu hakkında fikir veren özlü bir çalışma olmanın yanı sıra, bu alanda çalışmak isteyenlerin el altında tutup başvuru kaynağı olarak kullanmak isteyeceği kadar da kapsamlı ve ayrıntılı oldu. Klinik öncesi görüntülemede kullanılmakta olan radyoizotopların ve yeni geliştirilen radyofarmasötiklerin biyomedikal uygulamaları eşliğinde tanıtıldığı bölümlerden sonra, klinik öncesi çalışmalarda kullanılan görüntüleme teknikleri ayrıntılı bir şekilde anlatıldı.

Takip eden bölümlerde, farklı onkolojik hastalık tiplerinde ve onkoloji dışındaki hastalıklardaki deneysel tümör modelleri ve görüntüleme tekniklerinden söz edildi.

Moleküler görüntülemede deneysel hayvan modelleri kullanımının, bu konuda özelleşmiş görüntüleme cihazlarının yaygınlaşmasıyla daha da artacağını düşünüyor, Nükleer Tıp Seminerleri’nin bu sayısının da bu konuda katkı sağlamasını umuyoruz.

Saygılarımla,

**Dr. Tamer Özülker**

Editör Yardımcısı

**TÜRKİYE NÜKLEER TIP DERNEĞİ**  
Turkish Society of Nuclear Medicine





# Yeni Radyofarmasötikler ve Klinik Öncesi Görüntüleme

## New Radiopharmaceuticals and Preclinical Imaging

© Türkan Ertay

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

### Öz

Nükleer tıp alanındaki gelişmeler teşhis ve tedavi alanında spesifik radyofarmasötiklerin geliştirilmesiyle doğrudan ilgilidir. Moleküler görüntüleme ve tedavinin başarısı teşhis veya tedavi edici radyofarmasötüğün ilgililenen bölgede seçici birikimine bağlıdır. Hem klinik öncesi araştırmalarda hem de klinik çalışmalarda hedefli radyoizleyicilerde spesifiteyi artırmak için büyük çaba harcanmaktadır. Yeni bir radyofarmasötik geliştirme süreci ile yeni bir ilaç geliştirme süreci arasında yönetmelikler açısından çok büyük farklılıklar yoktur ancak radyoaktiviteyle ilgili düzenlemeler gerektirir. Bir ilaç geliştirme için var olan düzenlemeler, radyofarmasötik için de vardır: Keşif ve klinik öncesi biyolojik etkinlik gösterimi, kimyasal sentez yapılabilirliği, toksikoloji çalışmaları, Faz I, II ve III klinik denemeleri. Ancak, radyoaktif elementin varlığı bazı basamakların değiştirilip hızlandırılmasını gerektirir. İlaç geliştirme süreci keşif, geliştirme, Gıda ve İlaç İdaresi incelemesi ve pazarlama onayı ve onaylanmış bir ilacın pazarlama sonrası güvenlik gözetimi, güvenliği ve etkinliğinin sağlanması arasındaki bağlantılarla ilgilidir. Keşif fazında ilacın ilerde insanda da kullanılabilirliği görüşünü kanıtlamak için hayvan modellerinde kapsamlı prelinik testler yapılır. Belirli bir biyolojik hedef veya hastalık için bir radyofarmasötik seçmek veya yeni bir radyofarmasötik geliştirmek için birkaç faktöre dikkat edilmelidir. İlk olarak, radyonüklidlerin seçimi, her biyolojik veya hastalık süreci farklı olması nedeniyle seçilecek radyonüklidin yarı ömrü ve bozunum şekli önemlidir. İkinci faktör her biyolojik veya hastalık hedefinin özgüllüğü ile ilgili olarak molekülün özellikleri radyoşaretli bileşiğin metabolizması göz önünde bulundurulur. Bu nedenle, her radyofarmasötik için sentez sonrası fizikokimyasal, radyokimyasal veya biyolojik testleri içeren kalite kontrol işlemleri gerçekleştirilir. Radyofarmasötiklerin kimyasal, fiziksel ve biyolojik özellikleri dahil olmak üzere özelliklerini

### Abstract

Advances in the field of nuclear medicine are concerned with the development of specific diagnosis and treatment radiopharmaceuticals. The success of molecular imaging and treatment depends on the selective accumulation of the diagnostic or therapeutic radiopharmaceutical in the region of interest. A great deal of effort has been made to increase the specificity of targeted radiotracers in both preclinical and clinical trials. There is no major difference between the new radiopharmaceutical development process and a new drug development process in terms of regulations. However, it requires regulations on radioactivity. Requirements for drug development are also necessary for radiopharmaceuticals: discovery and preclinical biological activity demonstration, chemical synthesis feasibility, toxicology studies, Phase I, II and III clinical trials. However, the presence of the radioactive element requires some steps to be changed and accelerated. The drug development process is concerned with the connections between discovery, development, Food and Drug Administration review, and marketing approval and post-marketing safety surveillance of an approved drug, ensuring its safety and effectiveness. Comprehensive preclinical tests are carried out in animal models to prove the human drug use in the future. Several factors should be considered to select a radiopharmaceutical for a particular biological target or disease or to develop a new radiopharmaceutical. First, the choice of radionuclides: as each biological or disease process is different, the half-life and degradation of the radionuclide to be selected are important. The second factor is the metabolism of the radio-labeled compound with respect to the specificity of each biological or disease target. Therefore, for each radiopharmaceutical, after the synthesis, quality control procedures including physicochemical, radiochemical or biological tests are carried out. In order to

### Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Prof. Dr. Türkan Ertay, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

E-posta: turkan.ertay@deu.edu.tr ORCID ID: orcid.org/0000-0003-4206-6836

©Telif Hakkı 2019 Türkiye Nükleer Tıp Derneği / Nükleer Tıp Seminerleri, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.

daha iyi anlamak için, biyolojik veya hastalık süreçleri için hedeflenen moleküllerin klinik öncesi görüntülenmesi yapılır. Farelerde ve sıçanlarda prelinik görüntüleme için kullanılan mikro tek foton emisyon bilgisayarlı tomografi/bilgisayarlı tomografi (BT), mikro pozitron emisyon tomografi  $\mu$ (PET)/BT ve  $\mu$ PET/MR görüntüleme gibi hibrid sistemler anatomik ve moleküler bilgi verir.

Son yıllarda, nükleer görüntüleme ve tedavi için radyofarmasötiklerin geliştirilmesinde artan bir ilerleme kaydedilmiştir. Belki de moleküler görüntülemedeki en sıcak konu, bir tanının ve tedavinin birleşimi olan Ga-68/Lu-177 DOTATATE/prostat spesifik membran antijeni gibi teranostiklerdir.

**Anahtar Kelimeler:** Radyofarmasötik, klinik öncesi görüntüleme, faz çalışmaları

better understand the properties of radiopharmaceuticals, including chemical, physical and biological properties, preclinical imaging of targeted molecules for biological or disease processes is performed. Combined systems such as micro single photon emission computerized tomography/computerized tomography (CT), micro positron emission tomography (PET)/CT, and microPET/magnetic resonance imaging are used for preclinical imaging in mice and rats for anatomic and molecular information. In recent years, the development of radiopharmaceuticals has been increasing in nuclear imaging and treatment. Perhaps the hottest subject in molecular imaging is theranostics, such as Ga-68 and Lu-177 DOTATATE/prostate-specific membrane antigen, a combination of diagnosis and treatment.

**Keywords:** Radiopharmaceutical, preclinical imaging, phase trials

## Giriş

Moleküler görüntüleme alanı insanlarda ve diğer canlı sistemlerinde moleküler ve hüresel seviyelerde biyolojik işlemlerin görselleştirilmesi, karakterizasyonu ve ölçümü ile bir gelişme ve yayılma sürecinde bulunmaktadır (1). Radyofarmasötiklerle moleküler görüntüleme teknolojisi ilaç geliştirme, farmakokinetik çalışmalar, klinik araştırmalar ve rutin teşhis dahil olmak üzere çok çeşitli uygulamalar için kullanılabilir (2).

Son yıllarda, nükleer görüntüleme ve tedavi için radyofarmasötiklerin geliştirilmesinde artan bir ilerleme kaydedilmiştir. Moleküler görüntüleme ve tedavinin başarısı teşhis veya tedavi edici radyofarmasötüğün ilgilenilen bölgede seçici birikimine bağlıdır. Hem klinik öncesi araştırmalarda hem de klinik çalışmalarda hedefli radyoizleyicilerde spesifiteyi artırmak için büyük çaba harcanmaktadır. Son yıllarda, lenf nodu haritalaması ve görüntü kılavuzluğunda cerrahi, kanser ve nörodejeneratif hastalıkların hedefe yönelik görüntülenmesinin yanı sıra tedavi yanıtlarını izlemek için problemler ve nöroendokrin tümörleri için peptid ile reseptör radyonüklid tedavisinde de heyecan verici gelişmeler görülmüştür.

İyi bir hedefleme amacına ek olarak, radyofarmasötiklerin tasarımı ve en iyi uygulama yönteminin seçilmesi, daha iyi bir teşhis veya tedavi sonucu için oldukça önemli ve karmaşık bir süreçtir. Örneğin, farmakokinetik, diğer moleküller arasında hedefleme verimliliğini büyük ölçüde etkileyen çok önemli bir unsurdur. Çoğu teşhis ve tedavi radyofarmasötüğü enjeksiyon yoluyla uygulanır ve biyodağılım kan

akımına ve kandan temizlenmesine dayanır. İntravenöz enjeksiyonlu radyofarmasötikler için, karaciğer ve dalak gibi organların spesifik olmayan tutulumu ve böbrek filtrasyonu, radyofarmasötiklerin hedef bölgelere ulaşmasını geciktiren bazı kısıtlamalardır (3).

## Yeni Radyofarmasötik Geliştirme

Yeni bir radyofarmasötik geliştirme süreci ile yeni bir ilaç geliştirme süreci arasında yönetmelikler açısından çok büyük farklılıklar yoktur ancak radyoaktiviteyle ilgili düzenlemeler gerektirir.

Bir ilaç geliştirme için var olan düzenlemeler, radyofarmasötik için de vardır: Keşif ve klinik öncesi biyolojik etkinlik gösterimi, kimyasal sentez yapılabilirliği, toksikoloji çalışmaları, Faz I, II ve III klinik denemeleri. Ancak, radyoaktif elementin varlığı bazı basamakların değiştirilip hızlandırılmasını gerektirir (4). Yeni radyofarmasötik formülasyonlarının geliştirilmesi, hem laboratuvarında hem de *in vivo* olarak hayvanlarda ve gönüllülerde kapsamlı çalışmaların yapılmasını gerektirir (5).

Farklı araştırmacılar tarafından binlerce radyofarmasötik geliştirildiği halde bunlardan sadece birkaçı rutin kullanıma girebilmektedir. Yeni radyofarmasötiklerin yatırımcıları tarafından kabulünde dört kriter şarttır: Pazar ve tıbbi bir ihtiyaç, yeni molekülün arkasındaki bilim ve teknolojinin kalitesi, fizibilite ve yönetmeliklere ve sınırlı rekabet ortamına uygunluk. Potansiyel yatırımcıların büyük ölçüde iyi prelinik verilerin ötesinde, ikna edici pazar kanıtları edinmeleri gerekir (6). İlaç geliştirme süreci keşif, geliştirme, Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) incelemesi ve pazarlama onayı ile onaylanmış bir

ilacın pazarlama sonrası güvenlik gözetimi, güvenliği ve etkinliğinin sağlanması arasındaki bağlantılarla ilgilidir. Keşif fazında ilacın ileride insanda da kullanılabilirliği görüşünü kanıtlamak için hayvan modellerinde kapsamlı prelinik testler yapılır. Güvenlik farmakolojisi ve toksikoloji profilleri oluşturulur ve insanda ilk çalışmalar için uygun ve güvenli bir başlangıç dozu belirlenir. İnsan için kalitesi ve uygunluğu saptanır. Araştırılan ilacın FDA incelemesi için başvurusu sunulur ve emniyetli izleme stratejileri ile birlikte araştırma için klinik çalışma protokolleri önerilir. FDA incelemesinde güvenlikle ilgili herhangi bir endişe belirtilmezse, FDA insanlarda araştırma çalışmalarının başlamasına izin verir.

Yeni bir radyofarmasötik erken klinik öncesi gelişimi sırasında, sponsorun temel amacı, ürünün insanlarda ilk kullanım için makul derecede güvenli olup olmadığını ve bileşimin ticari gelişmeyi haklı kılan farmakolojik aktiviteye sahip olup olmadığını saptamaktır. Bir ürün daha fazla gelişme için uygun bir aday olarak tanımlandığında, sponsor daha sonra sınırlı erken dönem klinik çalışmalarda kullanıldığında, ürünün insanları makul olmayan risklere maruz bırakmayacağını kanıtlamak için gerekli veri ve bilgileri toplamaya odaklanır. FDA'nın yeni ilacın geliştirilmesindeki rolü, hayvanlarda uygun farmakolojik aktivite varsa ve akut toksisite potansiyeli yoksa ilacın sponsoru (genellikle üretici veya potansiyel pazarlamacı) yeni moleküllü taradığı zaman başlar, insanlarda teşhis veya tedavi potansiyelini test etmek ister. Bu noktada, molekül Federal Gıda, İlaç ve Kozmetik Yasası uyarınca yasal statüye geçer ve ilaç düzenleme sisteminin spesifik gerekliliklerine tabi olan yeni bir ilaç haline gelir.

Amerika Birleşik Devletleri'ndeki bir ilacı satmak isteyen ilaç şirketlerinin önce onu test etmesi gerekir. İnsanlarda test edilmeden önce bir ilacın nasıl çalıştığının işe yarayıp yaramadığının ve güvenli olup olmadığının keşfedilmesi için ilaç şirketi veya sponsoru tarafından laboratuvar ve hayvan testleri gerçekleştirilir. Ardından ilaç, bir hastalığı teşhis ya da tedavi etmek için insanlarda kullanıldığında güvenli olup olmadığı araştırılır. Gerçek bir sağlık yararı sağlayıp sağlamadığını belirlemek için bir dizi teste başlanır. Şirket daha sonra bu testlerle ilacın amaçlanan kullanım için güvenli ve etkili olduğu kanıtlarını FDA'ya gönderir. Radyofarmasötik geliştirme süreci konvansiyonel ilaç geliştirme süreci ile iyi uyum sağlamasına rağmen kendi içinde bazı zorlukları ve kendine has önem arz eden durumları vardır. Örneğin; kısa ömürlü pozitron emisyon tomografi (PET) radyonüklidleri mevcut yönetmeliklerde revizyonlar ve iyileştirmeler gerektirir (7). Bir hastalığın teşhisi veya izlenmesi için

kullanılan teşhis ajanların değerlendirilmesi, diğer tıbbi ürünlerle aynı düzenleyici kural ve ilkelere tabidir. Tıbbi ürünlerin kalite açısından değerlendirilmesinde kullanılan ilkeler, farmakoloji, toksikoloji, farmakokinetik ve güvenlik tanısız ajanlara uygulanır; bununla birlikte, teşhis ajanları hastalıkları teşhis etmek ve/veya izlemek için kullanıldığından ve tedavi için kullanılmadığından, klinik gelişim programları bu amaçlara uyarlanmalıdır. Diğer tıbbi ürünlere pazarlama ruhsatı verilirken, teşhis maddelerinin kullanımına ilişkin faydalar ve riskler göz önünde bulundurulur (8).

### Radyofarmasötik Geliştirme Aşamaları

- Keşif: Hedefin belirlenmesi, bilgi biriktirme, molekül belirleme, sentez, kontrol.
- Klinik öncesi çalışmalar: Mekanizmanın kanıtlanması, tür farklılıkları, farmakodinamik, farmakokinetik, absorpsiyon, distribüsyon, metabolizma, ve atılım, güvenlilik, doz aralığı, etkinlik, klinik validasyon.
- Klinik faz çalışmaları: Faz I, II, III çalışmaları, etkinlik, güvenlik, insan farmakokinetiği, doz seçimi, biyolojik kullanılabilirliği.
- Kabul/onay/pazarlama: Faz IV, güvenlik, etkinlik, teşhis, evreleme, tedavi planlama ve izleme, prognoz, pazarlama sonrası araştırma, kıyaslamalı avantaj.

### A. Keşif

Belirli bir biyolojik hedef veya hastalık için bir radyofarmasötik seçmek veya yeni bir radyofarmasötik geliştirmek için birkaç faktöre dikkat edilmelidir. İlk olarak, radyonüklidlerin seçimi; her biyolojik veya hastalık süreci farklı olması nedeniyle seçilecek radyonüklidin yarı ömrü çok önemlidir. İkinci faktör her biyolojik veya hastalık hedefinin özgülüğü ile ilgili olarak molekülün boyutu veya yükü, afinitesi, spesifik aktivitesi, lipofilikliği, stabilitesi ve radyoaktif bileşiklerin metabolizması göz önünde bulundurulur. Bundan başka radyofarmasötikler; steril, pirojeniz, güvenli ve spesifik endikasyonlar için etkili olmalıdır. Bu nedenle, her radyofarmasötik için sentez sonrası fizikokimyasal, radyokimyasal veya biyolojik testleri içeren kalite kontrol işlemleri gerçekleştirilir.

Tanısal radyonüklidler pozitron ya da gama fotonu yayar. Her radyonüklid belirli bir bozulmaya, fiziksel yarı ömre ve kimyasal özelliklere sahiptir. Bozunma şekli ve fiziksel yarı ömür herhangi bir fizikokimyasal durumdan bağımsız, belirli bir radyonüklid için karakteristiktir ve herhangi bir yöntemle değiştirilemez. Bu nedenle, ölçülmesi gereken hedef biyolojik süreç veya hastalık için uygun bir radyonüklid seçilmelidir.

### - Radyonüklid Seçimi

Radyonüklidler beş gruba ayrılmıştır: Organik elementler (C, N ve O), bir alkali metal (Rb), halojenler (F ve I), metaller (Ga ve In) ve geçiş metaller (Cu ve Tc). Organik radyonüklidler C-11, N-13 ve O-15'tir. Bu radyonüklidlerin tümü doğal izotoplardır. Elementler, dolayısıyla C-11, N-13 veya O-15 ile işaretlenmiş radyofarmasötikler, biyokimyasal olarak doğallarından ayırt edilemez. Alkali metalik radyonüklid olan Rb-82 potasyum ile aynı özelliklere sahiptir ve PET miyokard görüntülemesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Halojen radyonüklidler, F-18, I-123, I-124, I-125 ve I-131'dir. F-18 atomu hidrojen atomu boyutuna yakındır ve onu taklit eder ve C-F-18 bağı, C-H ile benzer bir biyolojik davranış gösterir. I-123 bir gama foton yayar ve son 20 yılda I-123 bazlı tek foton emisyon bilgisayarlı tomografi (SPECT) radyofarmasötikleri geliştirilmiştir. I-125 60 günlük fiziksel yarı ömrü nedeniyle *in vitro* çalışmalarda kullanılır.

I-124, I-123 radyonüklidinin PET versiyonudur. Teorik olarak, I-123 işaretli radyofarmasötiklerin hepsi I-124 işaretli radyofarmasötikler yerine geçer. Metalik radyonüklidler Ga-67, Ga-68 ve In-111'dir. Galyum periyodik tablonun IIIA grubunda bulunmaktadır. +3 iyon formundadır ve 1,4,7-triazasiklonona-1,4,7-triasitik asit (NOTA), 1,4,7,10-tetraazasiklododekan-1,4,7,10-tetraasetik asit (DOTA) gibi bir şelatlama maddesi gereklidir. Ga-67 ve In-111 gama foton yayar ve SPECT için kullanılır. Ga-68 pozitron yayar ve PET için kullanılır. Ga-68 bir jeneratör tarafından üretilir. Geçiş metali radyonüklidler Cu-62, Cu-64, Tc-94m ve Tc-99m'dir. Tc-99m gama foton yayarak bozunurken Cu-62, Cu-64 ve Tc-94m pozitron yayar.

Metalik elementler gibi, geçiş metalleri de şelatlama maddeleri gerektirir. Metal veya geçiş metali şelatör ile bir molekül yaptıktan sonra son kimyasal yapısı şelattan etkilenen bir molekül yapı ortaya çıkar. Bu nedenle, metal veya geçiş metali ile radyoışaretlemeye, küçük moleküller yerine peptidler, proteinler veya antikorlar gibi büyük moleküller tercih edilir. Metal veya geçiş metali ile radyofarmasötik hazırlanması için her metal veya geçiş metali için uygun şelatlayıcı ajan bulunmalıdır.

### - Molekül Seçimi

Radyofarmasötiklerin moleküler görüntüleme için başlıca kullanım amacı biyolojik veya hastalık süreçlerini moleküler ve hücresel düzeyde spesifik olarak görselleştirmek veya karakterize etmektir.

Radyofarmasötiğin farmakokinetik ve farmakodinamik davranışını ve hedefe spesifikliğini korumak için gerekli yapısal gereklilikler optimize edilerek molekül tasarlanmalıdır.

Moleküler görüntüleme için radyofarmasötiklerin fizikokimyasal özelliklerini etkileyen yapısal özellikleri, radyoışaretili moleküllerin boyutu, yükü, çözünürlüğü, lipofilikliği ve spesifik aktivitesidir. Metabolizma hızı, plazma protein bağlanması ve hedef olmayan dokularda spesifik olmayan bağlanma gibi diğer faktörler de radyoışaretili moleküllerin *in vivo* olarak davranışını optimize etmek için önemlidir.

**Boyut ve Yük:** Bir radyofarmasötiğin moleküler büyüklüğü veya kütlesi, molekülün *in vivo* olarak dolaşımdan uzaklaşması ve hedefte lokalize olmasını belirleyen en önemli özelliklerinden biridir. Küçük organik moleküller veya doğal veya sentetik küçük peptidler, dolaşımdan hızla temizlenir ve hedef dokuda hızla lokalize olur, böylece çok daha yüksek hedef/hedef olmayan oranı sağlar. Buna karşılık, büyük peptidler, proteinler ve antikor gibi büyük moleküllerin kandan temizlenmesi ve hedefte lokalize olması küçük moleküllerden daha uzun zaman alır. Moleküler boyut aynı zamanda radyofarmasötiklerin *in vivo* dağılım modelini etkiler. İstenen radyofarmasötiğin moleküler ağırlık aralığı belirli bir biyolojik veya hastalık süreci araştırılmasında esastır.

Bir radyofarmasötik üzerindeki yük, çeşitli çözücülerde çözünürlüğünü belirler. Daha büyük yüklü radyofarmasötikler sulu çözeltide daha yüksek bir çözünürlüğe sahiptir. Yüksüz moleküller organikler solventlerde ve lipitlerde daha fazla çözünme eğilimindedir. Radyofarmasötiklerin yükü *in vivo* dağılım modelinin özelliklerini belirler. Çeşitli radyofarmasötik türlerin radyoışaretlemeye sonra yükü değişir. Bu durum metal veya geçiş metali ve şelatörün arasındaki reaksiyondan sonra oluşur çünkü metal veya geçiş metalinin oksidasyon durumları çeşitli olması nedeniyle azot, oksijen veya kükürt atomları içeren şelatör moleküllerin yükü radyofarmasötiğin işaretlemeye sonraki yükünü etkiler.

**Çözünürlük ve Lipofilik:** Hayvan modelinde veya insanlarda enjeksiyon yapmak için, radyofarmasötikler kanın pH'si ile uyumlu pH aralığında sulu çözeltide hazırlanmalıdır. İyonik ajanların gücü veya ozmolalitesi de ayrıca kan için uygun olmalıdır. Radyofarmasötiklerin sulu çözelti içinde çözünürlüğü yük, boyut, radyofarmasötiklerin kütlesi, şekli ve lipofilitesinden

etkilenir. Log P ile gösterilen lipofiliklik, bir molekül veya parçanın bir lipofilik ortam için afinitesini gösterir ve her bileşiğin temel bir fizikokimyasal özelliğidir. Lipofilisite aynı zamanda ilaç moleküllerinin emilimi, dağılımı ve eliminasyonunda önemli bir rol oynar. Polar bileşikler suda çözünürlük sergilerler, böbrekler tarafından hızla atılırlar yüksek ve sıklıkla yüklü bileşikler kan-beyin bariyerini (KBB) geçemezler. Genel olarak, sadece yüksüz, lipofilik moleküller KBB'den geçebilir ve beyine girebilirler.

**Spesifik Aktivite:** Genel olarak, spesifik aktivite bir elementin, molekülün veya bileşiğin birim kütlesi başına radyoaktivite miktarı olarak tanımlanmaktadır. Kütlelerin birleşik kütlelerini radyoaktif türler ve radyoaktif olmayan türleri temsil eder. Spesifik aktivite birimleri, Ci/g, Ci/mol veya Gbq/mol olarak ifade edilir. Spesifik aktivite radyofarmasötiklerin moleküler görüntüleme çalışmaları için çok önemlidir çünkü spesifik aktivite hedefe bağlı radyoaktif moleküllerin sayısının bir ölçüsüdür ve radyofarmasötik belirli bir küttelede radyoaktif bir sinyal verebilir. Verilen radyofarmasötüğün uygun bir spesifik aktivitesi, hedef hücre veya dokuda bulunan spesifik reseptörler, enzimler, proteinler gibi moleküller veya genlerin konsantrasyonuna bağlıdır. Normalde, nöroreseptör veya gen görüntüleme çalışmaları çok yüksek spesifik aktiviteye ihtiyaç duyar (2-10 Ci/ $\mu$ mol) ve enzim-mediated çalışmalar 100-1000 kat daha az spesifik aktiviteye ihtiyaç duyar.

Spesifik aktivite radyofarmasötüğün saflığı ve işaretlenen radyonüklidin yarı ömrü ile ilgilidir. Sıfır zaman noktasında başka hiçbir kimyasal madde ve radyoaktif olmayan türler içermeyen çok yüksek saf radyofarmasötik bir yarı ömür geçtikten sonra kalan radyoaktif türler radyofarmasötikte belirlenen bir kütlelerin yarısı kadar olacaktır. Hedef molekülün konsantrasyon sayısı sınırlıdır ve radyoaktif olmayan tür hedef sistemde bağlanma yerlerini işgal edecektir. Spesifik aktiviteyi arttırmak için radyo-etiketleme prosedüründen sonra mümkünse radyofarmasötik saflaştırılmalı ya da işaretleme için prekürsör miktarı azaltılmalıdır.

**Kararlılık ve Metabolizma:** Radyonüklid işaretleme kimyası ve moleküler görüntüleme konularında en önemli konu bir radyofarmasötüğün stabilitesidir. Moleküler görüntüleme için radyofarmasötikler *in vitro* ve *in vivo* olarak stabil olmalıdır. Sıcaklık, pH ve ışık, birçok bileşiğin yapısını bozar dolayısıyla radyoaktif ürünlerin hazırlanması ve saklanması için en uygun fizikokimyasal koşullar saptanmalıdır. *In vivo*, metabolik olarak ayrılmış

radyofarmasötikler istenmeyen radyoaktif biyolojik dağılıma olur ve görüntü kalitesinin bozulmasına yol açar. Bu neden, radyofarmasötik tasarımı için, radyonüklid işaretlemeyen sonra da stabil olmalı ve bozulmamış radyoaktif molekül metabolik olarak da kararlı yapısını korumalıdır.

**Protein Bağlanması:** Radyoaktif olan veya olmayan tüm ilaçlar spesifik olarak veya spesifik olmayan şekilde plazma proteinlerine, hücre zarlarına ve kanda bulunan diğer bileşenlere değişken derecelerde bağlanabilir. Protein bağlanması radyofarmasötüğün molekül yükü, pH, proteinin yapısı ve plazmada anyonların konsantrasyonu gibi bir dizi faktörden büyük ölçüde etkilenir. Protein yapısındaki hidroksil, karboksil ve amino grupların konfigürasyonları protein yapısı ve proteinin büyüklüğü radyofarmasötiklerin proteine bağlanma gücünü belirler. Metal kompleksleri metal iyonları ile proteinler yer değiştirir çünkü metal protein için daha güçlü afiniteye sahiptir. Bu işlem "trans-chelation" olarak adlandırılır ve *in vivo* metabolizmaya yol açar. Örneğin, Ga-67/68-sitrat plazmada transferrin ile Ga-67/68-transferrin kompleksini oluşturur. Protein bağlanması, radyofarmasötiklerin doku biyolojik dağılımını ve plazma klirensini ve ilgili hedef sistemde dağılımını etkiler. Bu nedenle, herhangi bir yeni radyofarmasötüğün protein bağlanması klinik kullanımdan önce belirlenir.

Nükleer tıpta radyoaktif molekülün belirli bir *in vivo* davranışını izleyebilen ve biyolojik süreç hakkında bilgi sağlayan radyofarmasötikler moleküler görüntülemenin temelini oluşturur (9).

Radyofarmasötiklerin kimyasal, fiziksel ve biyolojik özelliklerini daha iyi anlamak, biyolojik veya hastalık süreçlerini takip etmek için hedeflerin klinik öncesi moleküler görüntülenmesi yapılır (10,11).

## B. Klinik Öncesi Çalışmalar

Tanısal radyofarmasötikler için klinik öncesi özel güvenlik çalışmaları:

- Radyasyona maruz kalma ve doku emilim dozu,
- Serumda, tüm vücut ve kritik organlarda biyolojik, fiziksel ve etkin yarı ömürleri,
- Radyoaktif kütle dozunun ve bağlanmamış kısmın saptanması,
- Kütlelerin, toksik potansiyelin ve bağlanmamış herhangi bir glukozamin konjugatıyla reseptör etkileşimlerin değerlendirilmesi,

• Reseptör bağlanması ve/veya enzim inhibisyonunun sonucu olarak potansiyel farmakolojik veya fizyolojik etkilerin değerlendirilmesi,

• Son formülasyondaki tüm bileşenlerin toksisite açısından değerlendirilmesi (örneğin; yardımcı maddeler, indirgen ilaçlar, stabilizatörler, antioksidanlar, şelatörler, safsızlıklar ve artık çözücüler),

Toksisite çalışmaları son formülasyonda yapılırsa ve önemli bir toksisite bulunmazsa, tipik olarak ayrı ayrı bileşenler için değerlendirilmez (7).

Klinik öncesi faz çalışmalarının amacı potansiyel kimyasal bileşik etkinlik ve güvenilirliğinin insanlarda denenmeden önce değerlendirilmesidir. Bu çalışmalar hayvanlarda ve laboratuvar modellerinde gerçekleştirilir. Güvenilirlik çalışmalarında akut, subakut ve kronik toksisite çalışmaları, genel ve spesifik organlara olan etkileri, reproduktif toksisite testleri, mutajenisite ve karsinojenisite araştırmaları yapılır. Hayvanlarda yapılan bu çalışmalar sırasında hayvan deneyleri yerel etik kurulu kurallarına uyulması zorunludur.

Hayvanlarda yapılan deneyler arasında biyolojik testler de yer almaktadır. Bu testlerde olası ilacın farmakolojik özellikleri (farmakodinamik ve farmakokinetik) araştırılır. Bu çalışmaların tümünün "Good Laboratory Practice" (İyi Laboratuvar Uygulamaları) kılavuzuna uygun olması gerekmektedir.

Bu fazda devreye giren bir diğer çalışma da "üretim" ile ilgilidir. Teknik değerlendirme ve geliştirme de bu dönemde başlar. Kimyasal (yeni üretim metotları, degradasyon ürünleri), analitik (stabilite, kalite güvencesi), farmakolojik (formülasyon) ve ambalajlama ile ilgili geliştirilmesi gereken konular bu çalışmalarda yer alır. Teknolojik çalışmaların "Good Manufacturing Practice" (İyi Üretim Uygulamaları) kurallarına uygun olması şarttır.

Klinik öncesi faz çalışmaları sonrasında geliştirilmesine karar verilen ürünler "klinik geliştirme fazı"na geçerler. Bu dönemden önce Amerikan FDA'ya "Investigational New Drug (IND)" (Araştırılan Yeni İlaç) başvurusunun yapılması gerekir. Bu başvuruda; ürünün kimyasal yapısı ve kaynağı, üretim ile ilgili bilgiler, hayvan çalışmalarında elde edilen tüm sonuçlar, klinik plan ve protokoller, klinik çalışmaları yürütmesi düşünülen araştırmacılar ile ilgili bilgiler sunulur.

**Klinik Öncesi Görüntüleme:** Biyolojik dağılım uygun bir hayvan türünün (genellikle sıçanlar veya farelerdeki) radyofarmasötikler için fizyolojik bir dağılım testi ile belirtilen organlarda, dokularda veya vücudun diğer bölümlerinde gözlenen radyoaktivite dağılım

modeli, insanlarda beklenen biyodağılımın güvenilir bir göstergesi olabilir ve dolayısıyla amaçlanan hedefin uygun olduğunu gösterir (12,13).

Klinik öncesi görüntüleme, ilaç geliştirme gibi araştırma amaçlı hayvanlar üzerinde yapılan görüntüleme çalışmalarıdır. Klinik öncesi görüntüleme yöntemleri, hayvanlarda organ, doku, hücre ya da moleküler düzeyde değişiklikleri gözlemede araştırmacılar için uzun zamandan beri önemlidir. İnvaziv olmayan *in vivo* görüntüleme yöntemleri, hayvan modellerini bütün olarak incelemek için özellikle önemli hale gelmiştir. Genellikle fare ve sıçan türlerinde biyodağılım metabolizma atılım çalışmaları yapılabilir. Görüntüleme sistemleri temel olarak morfolojik/anatomik ve moleküler görüntüleme teknikleri olarak ayrılabilir. Yüksek frekanslı mikro-ultrason, manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ve bilgisayarlı tomografi (BT) gibi teknikler genellikle anatomik görüntüleme için kullanılırken, optik görüntüleme (floresan ve biyoluminesans), PET ve SPECT, genellikle moleküler görselleştirmeler için kullanılır. Günümüzde görüntüleme cihazları arasında BT ve MR gibi anatomik yöntemlerin avantajlarını PET ve SPECT'nin fonksiyonel görüntülemesi ile birleştiren çok modüllü sistemler bulunmaktadır. Klinik pazarda olduğu gibi, prelinik olarak da yaygın kombinasyonlar mikroSPECT/BT, mikroPET/BT ve mikroPET/MRG olarak bulunmaktadır.

### - Klinik Faz Çalışmaları

Prelinik hayvan çalışmalarında farmakoloji, bağlanma, dağılım, metabolizma ve atılım ve güvenlik profili çalışmalarından sonra klinik çalışmalar dört fazda yapılır. Tüm klinik çalışmalarda "Good Clinical Practice" (İyi Klinik Uygulamaları) kurallarına uyulması zorunludur.

**Faz I Denemeleri:** Faz I denemeleri, genellikle sağlıklı gönüllülerde, güvenliği ve dozu belirler. Amaç ürünle ilgili güvenilirlik verilerinin toplanması, sağlıklı insanda, güvenlik ve tolerans, farmakokinetik, farmakodinamik, biyoyouyulanabilirliği, biyoeşdeğerliği, ilaç etkileşimi doz aralığının saptanması gibi özelliklerin incelenmesidir. Denek sayısı 20-80 arasındadır. Bu çalışmalar ortalama 1-1,5 yılda tamamlanır. Bu fazın ana amacı "güvenlilik" verisi elde etmektir.

**Faz II Denemeleri:** Amaç; ilacın etkinliğinin hastalarda belirlenmesi, yan etki profilinin araştırılması ve doz-cevap verilerinin toplanmasıdır. Çalışmalar hedef hastalığı olan 100-300 hasta gönüllüde yapılır. Erken faz etkinlik çalışmaları, uygulanabilirlik, konseptin kanıtı, doz belirleme: 1) Klinik olarak faydalı dozun ya da radyasyon doz aralığının belirlenmesi uygulama şekli

(bolus, infüzyon), 2) farmakokinetik ve farmakodinamik soruların anlaşılması, 3) etkinliğin ilk kanıtlarını sağlama, 4) güvenlik veri tabanını artırma, 5) görüntü elde etme zamanının ve tekniğinin optimize edilmesi, 6) imajlar değerlendirilerek yeni yöntemler ve kriterler belirleme, 7) diğer ajanların değerlendirilmesiyle kritik soruların değerlendirilmesi. Bu fazdaki çalışmaların tamamlanması ortalama 2 yılı alır. Bu fazın ana amacı “etkinlik ve güvenililiktir”. En uygun ilaç uygulama yöntemi (tablet, kapsül, infüzyon, vb.) de bu fazda araştırılır.

**Faz III Denemeleri:** Amaç; ürünün klinik etkinliğinin, güvenilirliğinin ve yan etkilerinin daha geniş bir hasta popülasyonunda değerlendirilmesidir. Etkinliği ve güvenilirliğinin kesin kanıtı yüz bin olay uygulama, randomizasyon ve iki veya daha fazla bağımsız kontrol ile değerlendirilmesidir. Medikal görüntüleme ajanları için Faz III amacı; 1) erken çalışmalarla geliştirilen ilk hipotezin doğrulanması, 2) medikal görüntüleme ajanının etkinliğinin gösterilmesi, 3) medikal görüntüleme ajanının devam eden güvenliğinin gösterilmesi, 4) ajanın amaçlanan popülasyonda kullanımı ve görüntüleme için talimatların doğrulanmasıdır. Çalışmalar genellikle çok merkezli, çok uluslu, randomize ve çift kör olarak planlanır. Klinik çalışmaların bu fazının tamamlanması 3-4 yıl sürer. Bu fazın ana amacı etkinliğin kanıtlanması ve yan etkilerin izlenmesidir.

Faz III çalışmalarda yeterli veriler elde edildikten sonra ürünün ilaç olarak kullanılabilmesi için “onay” alınması gerekir. Bunun için ABD’de FDA’ya “NDA (New Drug Application)” başvurusu yapılması gerekir. Benzer başvuru Avrupa Birliği için “European Medicines Agency’ye (EMA)” yapılır. Bunlar dışında ise her ülkenin yasal olarak sorumlu olan kuruluşuna gerekli başvuruyu yaparak onay alması gerekir. Onay alınma süresi FDA’ya yapılan başvurularda ortalama 1,5 yıldır. Ürünün onayı alındıktan sonra ilaç olarak kullanımına başlanabilir. Türkiye’de ilaç başvuruları T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu’na yapılmaktadır.

Faz III denemeleri, hedeflenen hastalığı olan yeterli sayıda hasta için güvenlik ve etkinliği belirlemek için büyük, önemli denemelerdir. Güvenlik ve etkinlik yeterince kanıtlanırsa, klinik test bu aşamada durabilir ve NDA aşamasına ilerler.

**Faz IV Denemeleri:** Ürün ilaç olarak kullanılmaya başlandıktan sonra yapılan klinik çalışmalar Faz IV çalışmalar olarak kabul edilir. Bunlara genel olarak “postmarketing surveillance” (pazarlama sonrası izleme) çalışmaları adı verilir. Bu çalışmalar genellikle binlerce gönüllü ile gerçekleştirilir ve uzun yıllar sürebilir. Bu çalışmaların ana amacı “uzun süreli güvenlik”

verilerinin toplanmasıdır. Klinik çalışmalar sırasında ortaya çıkmayan yan etkiler bu araştırmalar sırasında rapor edilebilir. Bunun yanı sıra; ilaçla veya kullanıldığı hastalık ve hasta grubu ile ilgili ekonomik çalışmalar ve yaşam kalitesi çalışmaları bu fazda uygulanabilir.

Faz IV denemeleri, FDA tarafından bazen piyasa sonrası izleme çalışmaları olarak da adlandırılan bir koşul olan onay sonrası denemelerdir.

İlaç geliştirme süreci ilacın patent ömrü boyunca sürer. İlaç kullanıma girdikten sonra yeni endikasyonlarda kullanılması için yapılan çalışmalar Faz III çalışmaları olarak kabul edilir ve aynı kurallara uyularak yapılır. Yeni doz ve formülasyon geliştirilmesi de onaydan sonra araştırılabilir (14,15).

### Yeni Radyofarmasötikler

1975 yılında Amerikan FDA, tanınal radyofarmasötikler için Atom Enerjisi Komisyonu’na verilen muafiyeti kaldırmış ve bu ilaçları düzenlemeye başlamıştır. Bu değişiklik radyofarmasötiklerin kullanımının artması ve sigorta şirketleri tarafından geri ödemelerin yapılması ve bunun sonucunda da kontrollü üretim ihtiyacının artması nedeniyle olmuştur. Teşhis ilaçları da dahil olmak üzere, ilaçların güvenliği ve etkinliği olan FDA’nın onay süreci daha sonra radyofarmasötiklere de uygulandı ve geliştirilen yeni bir radyofarmasötik için IND başvurusu gerekli kılındı. Şüpheli prostat kanseri nüksü olan hastaların PET görüntülemesi için C-11-kolin enjeksiyonu için FDA onayı Eylül 2012’de verilmiştir.

C-11-kolinin güvenliği ve etkinliği toplam 98 hastayı içeren yayınlanmış 5 çalışmanın sistemik bir incelemesi ile belgelenmiştir. FDA C-11-kolin insan çalışmalarının diğer kanser türlerinde de faydalı olabileceğini gösteren önemli bir radyofarmasötik olduğunu kaydetti.

C-11-kolinin bu heyecan verici FDA onayı, iki PET görüntüleme ajanının daha onaya sunulmasına yardımcı oldu: F-18-fluciclovine (Axumin; Blue Earth Diagnostics) ve Ga-68 DOTATATE [NETSPOT; Advanced Accelerator Applications (AAA)]. F-18-fluciclovine, 1999 yılında Mark Goodman tarafından geliştirilmiştir. F-18-fluciclovine için NDA Amerika Birleşik Devletleri, İtalya ve Norveç’teki 4 klinik bölgeden sunuldu ve prospektif olarak Blue Earth Diagnostic’i tarafından analiz edildi. İlk çalışmada 105 erkekte F-18-fluciclovine taramalarının histopatoloji verileri ile, ikinci olarak 96 hastada C-11-kolin taraması ile karşılaştırıldı.

Her iki çalışma da prostat spesifik antijen seviyeleri yükselmiş prostat kanseri hastalarda görüntüleme endikasyonunu destekledi ve yeni ilaç başvurusu Mayıs 2016’da onaylandı.

Bir hafta sonra FDA, somatostatin reseptörü pozitif nöroendokrin tümörlerde Ga-68 DOTATATE PET görüntülemeyi erişkin ve pediatrik hastalarda onayladı. Ga-68 DOTATATE'nin güvenliği ve etkinliği nöroendokrin tümör nüksü olan hastalarda Ga-68 DOTATATE; BT, MRG ve histopatoloji ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Bu çalışmalar, Avrupa'da Ga-68 DOTATATE ile somatostatin reseptörü görüntülemesi üzerine 20 yılın üzerinde yayınlanan önceki geniş literatüre dayanmaktadır. Nöroendokrin tümörler, FDA tarafından 200,000 prevalansa sahip yetim bir hastalık olarak tanımlandı. Yetim ilaçlar, FDA'nın Yetim Ürünleri Geliştirme Ofisi tarafından ele alınmakta ve onay için biraz farklı bir yol izlemektedir. Bu en son 3 radyofarmasötik onayında FDA alışılmadık bir yol izlemiştir.

Bu gelişmeler moleküler görüntüleme topluluğu içinde bir heyecan yaratmıştır. Moleküler nükleer tıpta büyüyen ve uluslararası bir oyuncu olan Advanced Accelerator Applications (AAA), Ga-68 DOTATATE için yetim ilaç statüsü aldıklarını açıkladı. Yetim ilaç ataması, Ga-68-DOTATATE'nin gastro-entero-pankreatik nöroendokrin tümörlerin (GEP-NETs) tedavisinde bir teşhis maddesi olarak kullanılması için Amerikan FDA ve EMA tarafından verilmiştir. Amaç, Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'daki GEP-NET hastalarının yararı için radyofarmasötüğün hızlı bir şekilde gelişmesini desteklemektir (16,17).

Son yıllarda, yeni tanı ajanları ile birlikte umut vaat eden radyoterapötik radyofarmasötiklerin kliniğe ulaşması, [Ra-223 diklorür (Xofigo; Bayer) ve Lu-177 DOTATATE (Lutathera; AAA)] yeni ve eski şirketlerin radyofarmasötik alanına girmesi moleküler görüntüleme komitesi tarafından bir rönesans olarak görülmüştür (16). FDA tarafından onaylanan F-18-fluciclovine, şüpheli tekrarlayan prostat kanserinin tespiti için, Cu-ATSM, F-18-FMISO bölgesel hipoksiyi haritalamak için en yaygın kullanılan PET ajanıdır (18,19,20). Prostat kanseri tedavisi için PSMA alfa yayıcı Ac-225 ile işaretlenmiş, ümit verici anti-tümör aktivitesi ile kastrasyona dirençli prostat kanserini tedavi etmek için kullanılmıştır. Bir başka umut verici prostat kanseri terapötik çifti bombesin analogları, Ga-68 ve Lu-177 RM2'dir (21). Alfa partikül yayan radyonüklidlerle işaretlenmiş olan terapötik analog pentixather hematolojik malignitelere ve solid tümörlere karşı ümit verici aktivite göstermiştir. Bu görüntüleme veya tedavi ajanları ABD'de ve diğer ülkelerde çalışılmaktadır (2,22,23,24,25,26).

## Sonuç

PET görüntüleme için yeni izleyicilerin geliştirilmesinde hastalık ile ilgili biyokimyasal yolların anlaşılması hayati bir adımdır. Ayrıca, hastalığa özgü görüntüleme izleyicileri erken tanı, evreleme ve tedavinin izlenmesine olanak sağlar. Klinik öncesi görüntüleme alanında, bu izleyiciler, yeni terapötik yaklaşımların ve ilaçların geliştirilmesi için önemli işlev görür.

Son yıllarda Cu izotopları prelinik ve klinik araştırmalar için antikorlara, proteinlere, peptidlere ve nanoparçacıklara bağlanmıştır; Menkes sendromu, Wilson hastalığı, enflamasyon, tümör gelişmesi, metastaz, anjiyogenez gibi Cu metabolizmasını etkileyen patolojik durumlar ve ilaç direnci incelenmiştir. Cu-64 radyoizotop uygulamalarında yarı ömrü, radyasyon emisyonları ve şelatörlerle kararlılığı için onkolojik uygulamalarda ve non-onkolojik alanlarda umut verici olduğu gösterilmiştir.

Birçok araştırma grubu yeni ilaçların sağlık hizmeti uygulamasına girmesini sağlamak ve belirli bir hedefte ilaç tedavisinin etkinliğini klinik sonuca göre objektif olarak incelemek için biyobelirteç olarak radyofarmasötik kullanmaktadır. Bu yeni radyofarmasötiklere ve buna bağlı olarak da yeni radyofarmasötikleri geliştirmek için çalışacak bilim insanlarına ihtiyacı ortaya çıkarmaktadır.

Yeni tıbbi görüntüleme tekniklerinin geliştirilmesi, özellikle yeni dedektörlerin geliştirilmesi ve sinyal işleme elektroniği gibi PET teknolojisindeki gelişmeler, PET'nin medikal onkolojinin artan kullanımı ile ilaç metabolizması ve farmakokinetiği çalışmaları, moleküler görüntüleme için spesifik radyofarmasötiklere artan bir ihtiyacı ortaya çıkarmıştır (21).

**Finansal Destek:** Yazar tarafından finansal destek alınmadığı bildirilmiştir.

## Kaynaklar

1. Terán M, Savio E, Paolino A, Frier M. Hydrophilic and lipophilic radiopharmaceuticals as tracers in pharmaceutical development: in vitro-in vivo studies. BMC Nucl Med 2005;5:5.
2. Gutfilem B, Valentini G. Radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine: Recent Developments for SPECT and PET Studies. Bio Med Res Int 2014;2014:426892.
3. Qin Z. Recent advances of injectable radiopharmaceuticals for nuclear imaging and therapy: a new era in nuclear medicine. Materials Technology Advanced Performance Materials 2015;30:4.



4. Zimmermann RG. Why are investors not interested in my radiotracer? The industrial and regulatory constraints in the development of radiopharmaceuticals. *Nucl Med Biol* 2013;40:155-166.
5. Collins JM, Wahl RL. PET and drug R&D. Principles and Practice of Positron Emission Tomography. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins; 2002.
6. Zimmermann RG. The Oncidium Foundation: a perspective. *World J Nucl Med* 2011;10:157.
7. Harapanhalli RS. Food and Drug Administration Requirements for Testing and Approval of New Radiopharmaceuticals. *Semin Nucl Med* 2010;40:364-384.
8. <http://www.emea.europa.eu> European Medicines Agency Pre-Authorisation Evaluation of Medicines for Human Use; 2009.
9. Lee YS, Radiopharmaceuticals for Molecular Imaging. *The Open Nuclear Medicine Journal* 2010;2:178-185.
10. <http://apps.who.int/phint/en/p/docf>
11. ESSR'14/Radiopharmaceutical preclinical safety/RexFitz Gerald/25-Apr-2014
12. <http://apps.who.int/phint/en/p/docf>
13. Brodniewicz T, Gryniewicz G. Preclinical drug development. *Acta Pol Pharm* 2010;67:578-85.
14. <https://www.pfizer.com.tr/arge>
15. Clinical Research \_Phase\_Studies. <https://www.fda.gov/forpatients/approvals/drugs/ucm405622.htm>
16. Sally SW, Clarke B. Perspective on How the FDA Should Review Diagnostic Radiopharmaceuticals. *J Nucl Med* 2018;59:865-867.
17. FDA, EMA Grant Orphan Drug Status to Gallium-68 Dotatate Radiopharmaceutical. <https://www.itnonline.com/content/fda-ema-grant-orphan-drug-status-gallium-68-dotatateradiopharmaceutical>
18. Parent EE, Schuster DM. Update on 18F-Fluciclovine PET for Prostate Cancer Imaging. *Nucl Med* 2018;59:733-739.
19. Krohn KA, Link JM, Mason RP. Molecular Imaging of Hypoxia. *J Nucl Med* 2008;49:129-148.
20. Huang T, Civelek A, Zheng H, et al. (18)F-Misonidazole PET imaging hypoxia in micrometastases and macroscopic xenografts of human non-small cell lung cancer; a correlation with autoradiography and histological findings. *Am J Nucl Med Mol Imaging* 2013;3:142-153.
21. Sathekge M, Bruchertseifer F, Knoesen, et al. 225Ac-PSMA-617 in chemotherapy-naïve patients with advanced prostate cancer: a pilot study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2019;46:129-138.
22. Schottelius M, Osl T, Poschenrieder A, et al. [177Lu] pentixather: Comprehensive Preclinical Characterization of a First CXCR4-directed Endoradiotherapeutic Agent. *Theranostics* 2017;7:2350-2362.
23. No authors listed. FDA Approves 11C-Choline for PET in Prostate Cancer. *J Nucl Med* 2012;53:11.
24. No authors listed. FDA approves Emory-developed prostate cancer imaging probe, June 1, 2016. [http://news.emory.edu/stories/2016/06/fluciclovine\\_fda\\_approval/](http://news.emory.edu/stories/2016/06/fluciclovine_fda_approval/)
25. No authors listed. FDA approves new diagnostic imaging agent to detect recurrent prostate cancer, 2016.
26. <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm504524.htm>



# Nükleer Tıpta Kullanılan Radyoizotoplar ve Biyomedikal Uygulamaları

## Radioisotopes and Biomedical Applications in Nuclear Medicine

● Serap Teksöz, ● F. Zümrüt Biber Müftüler

Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü, İzmir, Türkiye

### Öz

Nükleer görüntüleme, vücudun fizyolojisini ve metabolizmasını incelemek için radyofarmasötikleri veya radyoizleyicileri kullanan tanı amaçlı bir tıbbi görüntüleme yöntemidir. Bu tanı yönteminde hastalara radyofarmasötik olarak bilinen, bileşiminde radyonüklid içeren ilaçların uygulanması sonucu vücuttan yayılan radyasyonun oluşturduğu görüntüler kullanılmaktadır. Nükleer tıp çalışmalarında kullanılan en yaygın görüntüleme türlerinden biri pozitron emisyon tomografisi (PET) diğeri ise tek foton emisyon bilgisayarlı tomografisidir (SPECT). Oluşan görüntü ile sadece fonksiyonel anormalliklerin saptanması veya tümörlerin erken görüntülenmesi gibi tanı amaçları için değil, aynı zamanda tedavi planlaması ve takibi için de yararlı bilgiler elde edilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Radyofarmasötik, SPECT, PET

### Abstract

Nuclear imaging is a diagnostic medical imaging method that uses radiopharmaceuticals or radiotracers to examine the physiology and metabolism of the body. This imaging modality is the result of radiation emitted from the body as a result of the application of radiopharmaceuticals, which are radionuclide-containing drugs, to patients. One of the most common imaging modalities in nuclear medicine studies is positron emission tomography (PET) and the other is single-photon emission computed tomography (SPECT). The produced imaging is used not only for diagnostic purposes such as detection of functional abnormalities or early imaging of tumors but also provides useful information for treatment planning and follow-up.

**Keywords:** Radiopharmaceutical, SPECT, PET

### Giriş

Nükleer tıpta kullanılan radyonüklidlerin tümü sentetik olup, reaktörde fisyon yolu ile üretilen radyonüklidler, reaktörde termal nötronlarla üretilen radyonüklidler, jeneratörden üretilen radyonüklidler ve siklotronda üretilen radyonüklidler olmak üzere farklı üretim yöntemleri bulunmaktadır (1). Tablo 1’de nükleer tıpta kullanılan bazı radyonüklidler yer almaktadır.

Bileşiminde radyonüklid içeren, tanı ve tedavi amacı için kullanılabilen ve uygulandığı zaman hastada hiçbir fizyolojik değişiklik oluşturmayan radyoaktif ilaçlar radyofarmasötik olarak tanımlanmaktadır. Radyofarmasötiklerin tasarımında radyonüklidin türü, nükleer karakteristiği, yarı ömrü, üretim yöntemleri

önemli rol oynamaktadır (2). Nükleer tıpta kullanılan moleküler görüntüleme teknolojisi optik görüntüleme ve sintigrafi gibi spesifik görüntüleme yöntemlerini içermektedir. Sintigrafinin başlıca cihazları pozitron emisyon tomografisi (PET) ve tek foton emisyonlu bilgisayarlı tomografisidir (SPECT). Bu görüntüleme yöntemleri hastalara radyofarmasötiklerin uygulanması sonucu vücutta yayılan radyasyonun oluşturduğu görüntüleri kullanılmaktadır. Elde edilen bu görüntü ile sadece fonksiyonel anormalliklerin saptanması veya tümörlerin erken görüntülenmesi gibi tanı amaçları için değil, aynı zamanda tedavi planlaması ve takibi için de yararlı bilgiler elde edilmektedir. Nükleer görüntüleme, vücudun fizyolojisini ve metabolizmasını

### Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Prof. Dr. Serap Teksöz, Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü, İzmir, Türkiye

**E-posta:** steksoz@hotmail.com **ORCID ID:** orcid.org/0000-0002-6780-5159

©Telif Hakkı 2019 Türkiye Nükleer Tıp Derneği / Nükleer Tıp Seminerleri, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.

Tablo 1. Moleküler görüntüleme radyonüklidleri (3)

Radyoizotop	Atom numarası	Yarı ömür	Bozunma türü (%)	$\gamma$ ışını enerjisi (keV)	Üretim yöntemi
C-11	6	20,4 dk	$\beta^+(100)$	511	Siklotron
N-13	7	9,96 dk	$\beta^+(100)$	511	Siklotron
O-15	8	2,03 dk	$\beta^+(100)$	511	Siklotron
F-18	9	109,8 dk	$\beta^+(97)$	511	Siklotron
Cu-62	29	9,76 dk	$\beta^+(97)$ , EC(3)	511	Siklotron
Cu-64	29	12,8 sa	$\beta^+$ veya $\beta^+$ , EC	511	Siklotron
Ga-67	31	3,3 g	EC (100)	93;184;300	Siklotron
Ga-68	31	68 dk	$\beta^+(89)$ , EC (11)	511	Jeneratör
Rb-82	37	75 sn	$\beta^+(95)$ , EC (5)	511	Jeneratör
Zr-89	40	78,4 sa	$\beta^+(23)$	900	Siklotron
Tc-94m	43	52 dk	$\beta^+(72)$ , EC (3)	511	Siklotron
Tc-99m	43	6,05 sa	IT (100)	140	Jeneratör
In-111	49	2,8 g	EC (100)	171;245	Siklotron
I-123	53	13,2 sa	EC (100)	159	Siklotron
I-124	53	4,2 g	$\beta^+(23)$ , EC (77)	511	Siklotron
I-125	53	60 g	EC (100)	35	Reaktör

dk: Dakika, sa: Saat, g: Gün, EC: Elektron yakalanması

incelemek için radyonüklitleri kullanan tanı amaçlı bir tıbbi görüntüleme yöntemidir (2,3). Bir radyofarmasötik seçmek veya spesifik bir biyolojik hedef veya hastalık için yeni bir radyofarmasötik geliştirmek için birkaç faktör göz önünde bulundurulmalıdır. İlk olarak, radyonüklid seçimi, her bir biyolojik veya hastalık sürecinin ve her bir radyonüklidin yarı ömrünün farklı olması nedeniyle çok önemlidir. Tablo 1’de listelenen radyonüklidlerin tamamı tanılma amaçları için kullanılan pozitron veya gama fotonu yayan radyonüklidlerdir. Her bir radyonüklid, kendine özgü bozunma türüne, yarı ömre, kimyasal özelliklere ve bir üretim yöntemine sahiptir. Bir radyonüklidin bozunma türü ve yarı ömrü herhangi bir fizikokimyasal durumdan bağımsızdır yani karakteristiktir ve fizikokimyasal modifikasyon gibi başka herhangi bir yöntemle değiştirilemez. Bu nedenle, biyolojik süreç veya hastalık görüntülenmesi, karakterize edilmesi veya ölçülmesi için hangi radyonüklidin uygun olduğuna karar vermelidir. İkinci faktör, molekülün boyutu veya yükü, afinite, spesifik aktivite, lipofilit, stabilite ve radyoşaretli molekülün metabolizması dahil olmak üzere, her bir biyolojik veya hastalık hedefinin özgüllüğü ile ilgilidir. Ayrıca, hasta kullanımına yönelik radyofarmasötikler, steril, pirojeniz, güvenli ve spesifik endikasyonlar için etkili olmalıdır. Bu

nedenle, sentezden sonra her bir radyofarmasötik için fizikokimyasal, radyokimyasal veya biyolojik test içeren kalite kontrol prosedürleri gerçekleştirilmelidir (3).

Günümüzde her yıl yaklaşık 12 milyon yeni kanser olgusu tespit edilmekte ve 8 ölümden birinin kanser yüzünden olduğu bilinmektedir. Yeni kanser yaklaşımlarından biri; temel bilimlerle klinik uygulamalar arasında bir köprü olan kanser görüntüleme yöntemlerinin moleküler görüntüleme yöntemleri kullanılarak geliştirilmesidir. Moleküler görüntüleme; yeni reseptör hedefli terapilerin geliştirilmesinde, reseptör hedefleme, gen terapileri ve kanser kök hücre araştırmalarında önemli bir role sahiptir (4). Kan akışı veya perfüzyon, metabolizma ve spesifik reseptörler gibi bir dizi biyokimyasal süreci hedeflemek için moleküler görüntüleme çeşitli türlerde radyofarmasötikler bulunmaktadır (Tablo 2). Her bir radyofarmasötik, her biyokimyasal veya biyolojik sürecin spesifik hedefine odaklanır. Örneğin; F-18 florodeoksiglukoz (FDG), heksokinaz enzimi hedefleyebilir ve spesifik olarak glukoz metabolizmasını *in vivo* olarak değerlendirebilir. Radyofarmasötikleri kullanarak metabolizma görüntüleme, *in vivo* olarak dokuların veya hücrelerin hiperaktivitesinin önemli bir bilgisini sağlar (3).

Tablo 2. Moleküler görüntüleme için yaygın olarak kullanılan radyofarmasötikler (3)

Biyokimyasal proses	Spesifik bağlanma	Görüntüleme ajanı	Bağlanılan organ ya da doku
Kan akışı	Basit difüzyon	Tc-99m kırmızı kan hücreleri	GI kanama, ventrikül
		I N-13 amonyak	Ventrikül
Perfüzyon	Perfüzyon	Rb-82, (O-15) su	Miyokard, beyin
		Tc-99m-MIBI, Tl-201	Miyokard
		Tc-99m-HMPAO	Beyin
		Tc-99m-MAG3 Tc-99m-DTPA Tc-99m-DMSA	Böbrek
<b>Metabolizma</b>			
Glukoz	Heksokinaz	(F-18) FDG	Tümörler, beyin, miyokardiyum
Amino asitler	Protein sentezi	(C-11) Metinonin (F-18) FMT	Tümörler
DNA sentezi	Timidin kinaz	(C-11) Thymidine (F-18) FLT	Tümörler
Lipidler	Kolin kinaz	(C-11) Choline (F-18) Choline (C-11) Acetate	Tümörler
Anjiyogenez	$\alpha$ , $\beta_3$ integrin	Ga-68-NOTA-RGD (F-18) Galacto-RGD	Tümörler
Hipoksi	Asidik pH ve indirgeyici potansiyel	(F-18) FMISO (F-18) FAZA Cu-64-ATSM	Tümörde hipoksi
Apoptoz	Fosfatidilserin	Tc-99m-Annexin-V (I-124) Annexin-V	Akciğer tümörleri
Tümör reseptörleri	Estrojen reseptörü	(F-18) Fluoroestradiol	Endometriyal kanser
	Somatostatin reseptörü	Ga-68-DOTA-TOC In-111-Octreotide Tc-99m-TOC, Tc-99m-TATE	Nöroendokrin tümörler
<b>Nöroreseptörler</b>			
Dopamin metabolizması	Aromatik amino asit dekarboksilaz	(F-18) FDOPA	Hareket bozukluğu
Dopamin reseptörü	Dopamin D2 reseptör	(C-11) Raclopride (I-123) IBZM	Hareket bozukluğu
Dopamin salınımı	Dopamin presinaptik taşıyıcı	(F-18) FP-CIT (I-123)- $\beta$ -CIT	Hareket bozukluğu
Reseptör geni görüntülenmesi	HSV1-TK	(F-18) FHBG	Gen tedavisi
	Dopamin D2 reseptör	(F-18) FESP	Gen tedavisi
	Sodyum/iyodür simporter	I-123	Gen tedavisi
Amiloid bağı	B-amiloid	(C-11) PIB	Alzheimer demans
Makrofaj	Periferel benzodiazefin reseptör	(C-11) PK11195	Nöroenflamasyon

### Radyoizotopların Biyomedikal Uygulamaları

Nükleer tıpta radyoizotopların biyomedikal uygulamaları (*in vitro*, *in vivo*) için dünyada ve ülkemizde radyoşaretli ilaç, molekül veya çok fonksiyonlu taşıyıcı sistemlerle ilgili çalışmalar giderek artmaktadır. *In vitro*; bir araştırmının organ, doku, hücre, hücresel bileşen, protein veya biyomoleküller üzerinde yapılmasıdır. *In vivo* ise bir araştırmının bütün bir organizmanın üzerinde incelenmesidir.

Son yıllarda içeriğindeki bileşenlerden dolayı çeşitli kanser türlerine ve bazı hastalıklara karşı koruyucu olarak bilinen bitki kökenli ürünlerin kullanımı gündeme gelmektedir. Moleküler görüntüleme bazı radyonüklidler, kanserli dokular tarafından seçici olan moleküller ile bu dokulara yönlendirilebilirler. Literatürde radyoşaretli bitkisel kökenli bileşiklerin sentezi ve *in vivo* ve *in vitro* yöntemlerle biyoetkinliğini değerlendirmek üzere çeşitli bitki türlerinin kök, yaprak, gövde, tohum, çiçek kısımlarından ekstraksiyon ile elde edilen biyoaktif bileşenlerin (flavonoidler, polifenolikler) uygun radyonüklidlerle radyoşaretlenerek, anti kanser özellikleri inceleyen derlemeler bulunmaktadır (5,6).

F-18 FDG ile radyoşaretlenen nan-obyoteknolojik yaklaşımlarla hazırlanmış modifiye altın nanopartiküllerin (AuNP) hücre kültürüne dayalı meme kanseri araştırmalarında kullanılması ve biyoafinitelerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Meme kanseri hücrelerinin (MCF-7) yüzeyinde aşırı miktarda metadherin (MTDH) olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada sonuç olarak FDG-18, AuNP ve Anti-MDHT'den oluşan kompleks, MCF-7 kanser hücrelerine uygulandığında AuNP'lerden ve Anti-MDHT'den kaynaklanan hücre tutulumundaki artış olduğu rapor edilmiştir (7). Güldü ve ark., bor nötron yakalama tedavisi için potansiyel ajan olabilecek bor nitrür nanotüplerin (BNNTs) kimyasal buhar biriktirme yöntemi ile sentezini gerçekleştirmişlerdir (8). Sonrasında BNNT'ler ticari bir ilaç olarak kullanılan 4-borono-L-fenalanine kıyasla I-125/131 ile yüksek verimde radyoşaretlenmesi sağlanmıştır. Hazırlanan BNNT'lerin yeni teranostik ajanların oluşumunda umut veren nan-obiokonjugatlar olabileceği rapor edilmiştir.

Grubumuz tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise sentezlenen manyetik nanoparçacıkların guanin ile konjugasyonunun ardından Tc-99m trikarbonil kuru ile radyoşaretlenmesi sağlanmıştır. Biyolojik davranışı *in vivo* ve *in vitro* olarak incelenen

radyoşaretli manyetik nanoparçacıkların tüm hücre hatlarında (A-549, NHBE, MCF-7, Caco-2) tutulumun yüksek olduğu ve manyetik alan uygulandığında ise iki kat arttığı rapor edilmiştir. Çalışmada erkek Yeni Zelanda tavşanları kullanılarak SPECT görüntüleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir (9). Bir başka çalışmada ise, hidroksiüre, Tc-99m trikarbonil kuru ile radyoşaretlenerek *in vivo* biyolojik davranışı incelenmiştir. Biyodağılım çalışması erkek Wistar albino sıçanlar üzerinde gerçekleştirilmiş ve elde edilen verilere göre ince barsak, kalın barsak, mide ve mesanede anlamlı bir tutulum sağlandığı rapor edilmiştir (10).

Alan ve ark. bifonksiyonel alkilleyici ajanlar sınıfında yer alan nitrojen mustardların önemli bir analogu olan melfalanin (L-PAM) Tc-99m ile radyoşaretlenmesi ve oluşan yeni kompleksin biyolojik etkinliğinin *in vitro* ve *in vivo* olarak incelemişlerdir (11). Tc-99m-L-PAM'nin DNA ve RNA replikasyonuna seçici bir görüntüleme ajanı gelişimine ve etkili bir radyokemoterapötik tasarlanmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Ucar ve ark., katı lipid nanoparçacıklarla oluşturulan radyoşaretli paklitaksel taşıyıcı sistemin radyofarmasötik potansiyelini *in vivo* ve *in vitro* olarak incelemişlerdir (12). Uçar ve ark., *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar sonucunda geliştirilen paklitaksel yüklü radyoşaretli katı lipid nanoparçacıkların hazırlanması kolay, folat reseptörlerine karşı spesifiteye sahip olduğu, hedefe yönelik, biyouyumlu ve terapi potansiyeline sahip bir teşhis ajanı geliştirilmesine katkı sağlayacağını bildirilmektedir (12).

### Sonuç

Dünyada ve ülkemizde radyoizotop üretimi, radyometallerin koordinasyon kimyası, canlı dokulardaki davranışlarıyla ilişkili olan metal tabanlı radyofarmasötiklerin kimyasal yapısı ile ilgili büyük adımlar atılmaktadır. Radyofarmasötik kullanılarak yapılan moleküler görüntüleme, insan hastalıklarını kompartman (bir insana veya herhangi bir canlı organizmaya uygulanan radyofarmasötüğün dağılım gösterdiği veya lokalize olabileceği biyolojik boşluklar), organ, doku ve hatta gen düzeylerinde araştırmak için büyük fırsatlar sağlamıştır. Yapılan tüm deneysel araştırmalardan alınan başarı çok disiplinli olarak fizik, kimya, biyoloji, eczacılık, mühendislik ve tıp alanlarındaki ortak çabaların bir sonucudur.

**Finansal Destek:** Yazarlar tarafından herhangi bir finansal destek alınmamıştır.

**Çıkar çatışması:** Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

### Kaynaklar

1. Ünak P. Uygulamalı Temel Radyofarmasi. İçinde: Ünak P, Durmuş Altun G, Teksöz S, Müftüler FZB, editörler. Radyasyon ve Radyoaktivite. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2017:3-32.
2. Ünak P, Teksöz S. Uygulamalı Temel Radyofarmasi. İçinde: Ünak P, Durmuş Altun G, Teksöz S, Müftüler FZB, editörler. SPECT Radyofarmasötikleri. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2017:33-70.
3. Lee YS. Radiopharmaceuticals for molecular imaging. Open Nucl Med J 2010;2:178-185.
4. Mahajan A, Goh V, Basu S, et al. Bench to bedside molecular functional imaging in translational cancer medicine: to image or to imagine? Clin Radiol 2015;70:1060-1082.
5. Muftuler FZB, Kilcar AY, Unak P. A perspective on plant origin radiolabeled compounds, their biological affinities and interaction between plant extracts with radiopharmaceuticals. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 2015;306:1-9.
6. Muftuler FZB, Unak P. A perspective on <sup>99m</sup>Tc and <sup>125</sup>/<sup>131</sup>I labeled receptor targeted compounds and their in vitro/ in vivo affinities. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 2017;314:1-6.
7. Unak G, Ozkaya F, Medine EI, et al. Gold nanoparticle probes: Design and in vitro applications in cancer cell culture. Colloids Surf B Biointerfaces 2012;90:217-226.
8. Guldu OK, Ünak P, Timur S. A novel theranostic nanobioconjugate: <sup>125</sup>/<sup>131</sup>I labeled phenylalanine conjugated boron nitride nanotubes. J Radioanal Nucl Chem 2017;311:1751-1762.
9. İçhedef Ç, Teksöz S, Ünak P, et al. Bioevaluation of <sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>-Guanine in vitro and in vivo. J Radioanal Nucl Chem 2012;292:739-743.
10. Yilmaz B, Teksoz S, Kilcar AY, et al. In vitro/in vivo evaluation of radiolabeled [(<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>](+)-hydroxyurea and fluorescein isothiocyanate-hydroxyurea. Cancer Biother Radiopharm 2016;31:14-19.
11. Alan ŞAA, İçhedef Ç, Medine E İ, et al. Preparation and in vivo-in vitro evaluation of technetium-99m-labeled melphalan as a potential imaging agent. Asian Journal of Biomaterial Research 2017;3:39-50.
12. Ucar E, Teksoz S, İçhedef C, et al. Synthesis, characterization and radiolabeling of folic acid modified nanostructured lipid carriers as a contrast agent and drug delivery system. Appl Radiat and Isot 2017;119:72-79.



# Birden Fazla Görüntüleme Sisteminde Kullanılabilen Görüntüleme Probları (Dual Modalite Problar)

## Imaging Probes Used in Multiple Imaging System (Dual Modality Probes)

Perihan Ünak

Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü, İzmir, Türkiye

### Öz

Günümüzde, kişiselleştirilmiş tıbbın ve translasyonel araştırmaya olan ilginin de artmasıyla birlikte hastalığa özgü nanoprobaların geliştirilmesi ihtiyacı doğdu ve bunun sonucu olarak da biyomedikal alanda pozitron emisyon tomografi (PET)/bilgisayarlı tomografi (BT), tek foton emisyon bilgisayarlı tomografi (SPECT)/BT veya SPECT/manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ve PET/MRG gibi birden fazla görüntülemeyi aynı anda yapan sistemlerin geliştirilmesine yol açtı. Bu sistemler aynı görüntüyü verebilecek birden fazla fonksiyonu yapabilen yeni moleküler sistemlerin veya nanoteknolojik ilaçların geliştirilmesi ihtiyacını ortaya çıkardı. Böylece farklı özelliklerin aynı sistemde birleşmesi ile hastalık ile ilgili daha iyi görüntü ve daha fazla bilgi sağlayan çok modüllü (hibrid teknolojiye MRG'yi SPECT veya PET ile birleştiren hibrid kameraların ortaya çıkışı), multimodalite görüntüleme problemlerinin geliştirilmesine olan ilgiyi arttırdı. Bunun sonucu olarak dual görüntüleme amaçlı PET/SPECT radyonüklidleri ile işaretli nanopartiküllere ilgi artmıştır. Bu konudaki en büyük zorluklar; kolay uygulanabilir, yüksek verimli radyoşaretleme stratejileri geliştirilmesi, görüntüleme stabilitesi, hastalık için erken evre hassasiyeti için artırılmış duyarlılık ve *in vivo* farmakokinetiğin optimize edilmesidir. Bu makalenin amacı birden fazla görüntüleme (dual mod) sisteminde kullanılabilen görüntüleme problemlerinin kardiyovasküler görüntüleme, akciğer teşhisi ve tümör terapisi gibi farklı sistemler için ana uygulamalarını kısaca özetlemektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Dual modalite problemler, teranostik, nanotıp

### Abstract

Nowadays, with the increasing interest in personalized medicine and translational research, the need to develop disease-specific nanoprobables has arisen, leading to the development of systems that simultaneously perform multiple imaging such as positron emission tomography (PET)/computerized tomography (CT), single photon emission computerized tomography (SPECT)/CT or SPECT/magnetic resonance imaging (MRI), and PET/MRI in the biomedical field. These systems revealed the need to develop new molecular systems or nanotechnological drugs capable of performing multiple functions that could give the same image. Thus, the emergence of hybrid cameras combining the MRI with SPECT or PET in the multi-module hybrid technology has aroused increased attention to the development of multimodality imaging probes. As a result, the need to develop disease-specific nanoprobables has arisen with the increasing interest in personalized medicine and translational research, and focus to radionuclides labeled nanoparticles of PET/SPECT has increased in the biomedical field. The biggest challenges are: the development of easy-to-use, high-throughput radiolabeling strategies to improve the imaging stability, increased sensitivity for early stage sensitivity for the disease, and the optimization of *in vivo* pharmacokinetics. The aim of this article is to briefly summarize the main applications of imaging probes that can be used in the multiple mode (dual-mode) system for different systems such as cardiovascular imaging, lung diagnosis, and tumor therapy.

**Keywords:** Dual modality probes, theranostic, nanomedicine

### Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Prof. Dr. Perihan Ünak, Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü, İzmir, Türkiye

E-posta: Perihan.unak@gmail.com ORCID ID: orcid.org/0000-0002-0172-257X

©Telif Hakkı 2019 Türkiye Nükleer Tıp Derneği / Nükleer Tıp Seminerleri, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.

## Giriş

Görüntüleme teknolojilerindeki ilerlemeler pozitron emisyon tomografi (PET)/bilgisayarlı tomografi (BT), tek foton emisyon bilgisayarlı tomografi (SPECT)/BT veya SPECT/manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ve PET/MRG gibi birden fazla görüntülemeyi aynı anda yapan sistemlerin geliştirilmesine yol açtı. Bu sistemler aynı görüntüyü verebilecek birden fazla fonksiyonu yapabilen yeni moleküler sistemlerin veya nanoteknolojik ilaçların geliştirilmesi ihtiyacını ortaya çıkardı. Böylece farklı özelliklerin aynı sistemde birleşmesi ile hastalık ile ilgili daha iyi görüntü ve daha fazla bilgi sağlayan çok modüllü (hibrid teknolojide MRG'yi SPECT veya PET ile birleştiren hibrid kameraların ortaya çıkışı), multimodalite görüntüleme problemlerinin geliştirilmesine artan ilgiyi uyandırdı.

Başlangıçtaki sorulardan biri şudur: Hibrid görüntüleme ajanları geliştirmek için hangi kimyasal sistemler uygun bir temeldir? Bu soruyu cevaplamaya yönelik herhangi bir girişimde, birleşik bir görüntüleme aracının fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin, her iki görüntüleme modalitesi için eş zamanlı olarak optimum özgülük ve kontrast elde edilmesini sağlayacak şekilde nasıl uyarlayabileceğinin ele alınması gerekmektedir. Nanoparçacıklar (NP) SPECT/MRG ve PET/MRG için çok modüllü problemler oluşturmak için çekici platformlar olarak ortaya çıkmıştır. Çok çeşitli NP yapıları farklı radyonüklidlerle işaretlenerek kullanılmıştır. Ancak radyoışartleme yapılırken parçacık yüzeyi veya NP yapısının değişmesi ve NP'lerinin işlevselliğini yitirip yitirmediğinin kontrolü gerekir. Genellikle radyonüklid işaretlemede radyonüklidin kimyasına bağlı olarak şelatlayıcılar veya prostetik gruplar kullanılır. Radyoışartlemede kullanılan bağlayıcı grupların görünüşte zararsız olsa da, yapıya eklenmesi ile nanopartiküller parçacık boyutu, şarj ve çözünürlük gibi önemli özellikler üzerinde dramatik etkileri olabilir. Buna karşılık, nanopartikülün kimyasal ve fiziksel özelliklerinde yapılan değişiklikler genellikle farmakolojik profili üzerinde de olumsuz bir etkiye sahip olabilir. Radyoaktif işaretli nanopartiküllerde esas olan, bir radyonüklidi nanopartikülün yapısını bozmadan yapıya sokulmasını kolaylaştıran alternatif kimyasal yöntemleri kullanmaktır.

Moleküler görüntüleme alanındaki ilerlemeler modifiye veya tasarlanmış moleküller kullanılarak ve uygun bir görüntüleme yaklaşımı ile birleştirilerek kişiselleştirilmiş tıbbın gelişmesi ile sonuçlanmıştır. Moleküler görüntüleme yaklaşımları, PET, SPECT, MRG, BT, ultrason (US), biyoluminesans ve floresan

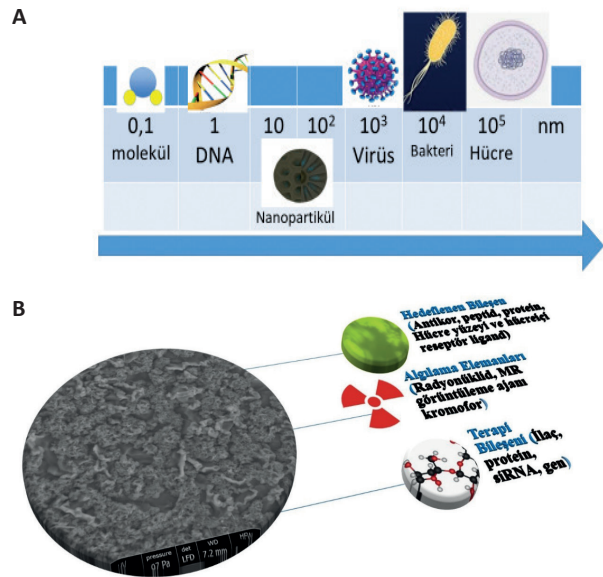
görüntüleme gibi modaliteler ve ayrıca PET/BT, SPECT/BT ve PET/MRG gibi multimodalitelerdir. Bu yaklaşımlar arasında, radyonüklid esaslı görüntüleme yöntemleri, özellikle PET, yüksek duyarlılık (pikomolar seviye) ve sınırsız doku penetrasyonu içeren avantajlar nedeniyle biyomedikal araştırmalarda özel bir odak noktası olmuştur (1,2). Moleküler görüntülemede birçok farklı molekül türü kullanılmasına rağmen, başta kanser olmak üzere çeşitli hastalıkların erken teşhisi, doğru teşhisi ve kişisel terapisi için büyük potansiyele sahip olan nanopartiküllerin kullanımı da ilgi çeken bir konudur (3). NP'ler 1 ila 100 nm arasında değişen yapılardır (Şekil 1A). NP'ler, optik, manyetik, katalitik, termodinamik ve elektrokimyasal olabilen benzersiz büyüklüklere bağlı fiziksel ve kimyasal özellikler gösterirler (4,5,6,7).

Genel olarak, biyomedikal araştırmalar için kullanılan nanopartiküller üç gruba ayrılabilir:

Kuantum noktaları, demir dahil olmak üzere inorganik nanopartiküller oksit nanopartiküller, altın nanopartiküller ve dönüştürme nanofosforları (5,6,7,8,9,10,11),

Çekirdek-kabuk dendrimerler ve hem polar hem apolar gruplar ihtiva eden amfifilik nanopartiküller gibi polimer NP'ler (12,13),

Lipozomlar ve katı lipit nanopartikülleri içeren lipit nanopartikülleri (14,15).



**Şekil 1.** A) Nanoparçacıkların boyutları, B) Hibrid görüntüleme sistemleri için oluşturulabilecek çok fonksiyonlu nanosistemlerin sematik gösterimi



Ek olarak, radyonüklid işaretli karbon nanotüpler ve nanoelmaslar (1  $\mu\text{m}$ 'den küçük boyutta elmas parçacıkları) da onkolojik uygulamalar için yaygın olarak araştırılmıştır (6,16). NP farmakokinetiği ve biyodağılımı farklı gruplarca incelenmiştir (17,18). NP tasarım esnekliği, iletim etkinliğini iyileştirmek ve boyut, yük ve yüzey modifikasyonunu değiştirerek spesifik olmayan organ alımını azaltmak için ayarlanabilir *in vivo* farmakokinetiği sağlar. Yaklaşık 100 nm'lik bir çapa sahip olan nanopartiküller, uzun süreli kan dolaşımını ve nispeten düşük bir mononükleer fagosit sistemi (MPS) alımını gösterirler (18). Makroskopik ve moleküler düzey arasında olan bu boyut ayrıca hücresele düzeyde kritik bir pozisyonu doldurur (Şekil 1A). Bu nedenle nanosistemler bazı üstün özellikler taşıyacak şekilde tasarlanabilirler. Büyüklükleri, büyük biyolojik moleküller (antikorlar, DNA) ile karşılaştırılabilir olduğundan, nanopartiküller, hem yüzeydeki hem de iç hücrelerdeki çeşitli biyomoleküller ile etkileşime girecek şekilde programlanabilirler. NP'lerin diğer önemli fizikokimyasal özellikleri zengin yüzey kimyasının çeşitli hedefleme bileşenlerine imkân vermeleri, aynı zamanda algılama elemanları ve terapötik yük için yüksek yüklenme kapasiteleri oluşturularak teranostik uygulamalar için sinerjetik etki oluşturmalarıdır (19). Şekil 1B hibride görüntüleme sistemleri için oluşturulabilecek çok fonksiyonlu nanosistemlerin farklı multimodal oluşumlarının şematik gösterimini göstermektedir.

Teranostik kelime olarak diagnostik ve terapötik kelimelerinden türetilmiş olup teşhis ve terapiyi birlikte içeren anlamındadır (20). Teranostikler kişiye özel tedavi amaçlı hasta yararına birden fazla bileşeni içerirler. Teranostiklerde teşhis ve terapiyi içeren bileşenler NP olabilir. Şimdiki sistemlerde teranostikler kuantum nokta, manyetik NP, karbon nanotüp, altın NP'ler, polimerik NP, ve silika NP esaslı olabilirler (21). Bu NP'lerden pek azı Food and Drug Administration (FDA) onayı almış ve insanda kullanılmışlardır. Indocyanine green (ICG) yakın infrared (IR) bölgesinde ışımaya veren bir floresans boyadır ve insanda indiktor kullanım için FDA onaylıdır. ICG NP'ler kanser teranostiğinde potansiyel olarak dikkat çekicidir (22). ICG, moleküler ağırlık: 774,96 g/mol bir amfifilik trikarbosiyanine boyasıdır (22).

Yükle ilgili olarak ise nötr NP'ler yavaş atılım hızına sahipken, karaciğer ve dalakta tutulum da yüklü NP'lere göre düşük olduğu rapor edilmiştir, çünkü intravenöz olarak uygulanan pozitif yüklü nanopartiküller, negatif yüklü serum proteinlerinin mevcudiyetine bağlı olarak genellikle agregatları oluştururlar (23).

Geçtiğimiz yıllarda SPECT ve PET radyonüklidleri işaretli (24,25,26,27,28,29) nanopartiküllerin moleküler görüntüleme ve ilaç uygulamalarındaki artış, yeni ilaçların keşfine ve çok sayıda klinik çalışmaya yol açmıştır (30,31,32,33). PET'in fizyolojik görüntüleme ve çözünürlükteki üstün özellikleri sebebiyle translasyonel araştırmalarda PET radyonüklidleri ile radyo işaretli nanopartiküllerin majör biyomedikal uygulamalarına odaklanıldı (34,35,36,37,38).

### PET ve SPECT Radyonüklidleri ile İşaretli Nanoparçacıkların Uygulamaları

PET ve SPECT radyonüklidleri ile işaretli nanopartiküller, nanopartiküllerin *in vivo* farmakokinetiklerini, görüntüleme kabiliyetini ve terapötik potansiyeli keşfetmeye yönelik bir araç olarak klinik öncesi hem de klinik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (27,30,39,40). Farklı fizikokimyasal özellikleri ve fonksiyonel grupları olan nanopartiküller için, belirli bir radyonüklid ile radyo işaretleme stratejisinin, optimal bir görüntüleme sonucu elde etmek için dikkatle düşünülmesi gerekmektedir. Nanopartiküller için yaygın olarak kullanılan PET ve SPECT radyonüklidlerinin özellikleri Tablo 1 ve Tablo 2'de özetlenmiştir.

Nanopartiküller için iki ana radyo işaretleme stratejisi bulunmaktadır. Birincisi NP yapının kendisini ya yüzeyde ya da çekirdekte radyoaktif hale getirmektir. Diğer yaklaşım ise NP içinde kapsüllenmiş olan yükün radyoaktif hale getirilmesidir. Her iki yaklaşım da NP'lerin radyoaktif işaretlemesi için yaygın olarak kullanılır (Tablo 3) (41).

Bununla beraber biyomedikal uygulamalar için radyo işaretli bir nanopartikül tasarlarırken, bazı temel faktörlerin göz önüne alınması gerekir. Bunlardan ilki radyo işaretlemenin bütünlüğüdür. Radyo işaretli nanopartiküllerin *in vitro* veya *in vivo* uygulamaları için, radyonüklidin kendisi NP veya yükten ziyade gözlemlenir veya tespit edilir. Böylece, NP yapı ve radyo işaretleme stratejisi, sağlam, stabil radyo işaretleme yapmak için tasarlanabilir.

Göz önünde bulundurulması gereken ikinci faktör, uygulama uyumluluğudur. Burada radyonüklidin yarı ömrünün, probun ve hedefin bağlanma kinetiği ile aynı zamanda probun *in vivo* farmakokinetiği ile uyumlu olması gerekir. Üçüncü bir faktör işaretleme verimi ve radyoaktif işaretlemenin spesifik aktivitesidir, çünkü daha fazla radyonüklid yüklenmesine izin veren iyi tasarlanmış bir nanopartikül, yüksek bağlanma verimliliği ve daha az nanoparçacık miktarı ile daha iyi görüntü

sağlamanın yanı sıra, sadece miktarları izlemek için gerekli NP yönetimini azaltabilir. Dördüncü faktör, insan uygulamaları için Amerikan FDA onayı nanopartiküllerin klinik potansiyelini araştırmak için gerekli olacaktır. Örneğin; PET görüntüleme için daha iyi Cu-64 radyoışaretleme stabilitesi gösteren şelatörler olmasına rağmen, (42) DOTA (1,4,7,10-tetraazasikododekan-1, 4,7,10-tetraasetik asit), hala en çok kullanılan şelatlayıcıdır. Mevcut görüntüleme yöntemlerinden PET, yüksek hassasiyet ve kantitatif saptama nedeniyle altın

nanopartiküllerin biyodağılımını izlemek için en çok kullanılan tekniktir. Cu-64-radyoışaretleli bir altın nanopartiküllerinin yakın tarihli bir çalışması, sadece PET görüntüleme için değil, aynı zamanda bir terapötik ajan olarak da potansiyel olduğunu gösteren, net tümör alımı gösterdi (42).

Polimer nanopartiküller de sentetik kimyanın çok yönlülüğüne bağlı olarak çeşitli radyoışaretleme stratejileri kullanılarak biyomedikal görüntüleme uygulamaları için yaygın olarak kullanılmaktadır.

**Tablo 1. Dual modalite görüntülemede kullanılan PET radyonüklidlerinin bozunma ve hazırlanma özellikleri**

Radyonüklid	Yarı ömür	Pozitron bozunma oranı	Ortalama pozitron enerjisi (keV)	Salınan foton enerjileri	Üretim şekli
Ga-68	67,7 dk	$\beta$ (%89) EC (11)	829	511 (178,3)	Ge-68/Ga-68 jeneratör
F-18	109,7 dk	$\beta$ (96,7) EC (0,1)	245	511 (193,5)	O-18 (p, n) F-18
Cu-64	12,7 sa	$\beta$ (17) EC (44)	278	511 (45,8)	Ni-64 (p, n) Cu-64
Br-76	16,2 sa	$\beta$ (55) EC (45)	1180	511 (109); 559 (74) 657 (15,9);	Se-76 (d, 2n) Br-76
Y-86	14,7 sa	$\beta$ (33) EC (66)	664	511 (63,9); 1077 (82,5)	Sr-86 (p, n) Y-86
Zr-89	3,3 g	$\beta$ (23) EC (77)	897	909 (100)	Y-89 (p, n) Zr-89
I-124	4,18 g	$\beta$ (23) EC (77)	820	511 (46);603 (62,9) 723 (10,3)	Te-124 (p, n) I-124 Te-124 (d, 2n) I-124
Sc-44	3,97 sa	$\beta$ (95) EC (5)	632 keV	1157 1499	Ti-44/Sc-44 jeneratör Ca-44 (p, n) Sc-44
Ti-45	3,09 h	$\beta$ +(86), EC(14)	439 keV	720	Sc-45 (p, n) Ti-45

PET: Pozitron emisyon tomografi, EC: Elektron yakalanması, dk: Dakika, sa: Saat, g: Gün, h: Hafta

**Tablo 2. Dual modalite görüntülemede kullanılan SPECT radyonüklidlerinin bozunma ve hazırlanma özellikleri**

Radyonüklid	Emisyon türü	Yarı ömür	Emak (keV)	Üretim türü
Tc-99m	$\gamma$	6,0 sa	140	Mo-99/Yc-99m jeneratör
Tl-201	$\gamma$	73 sa	70-80;135;167	Siklotron
Ga-67	$\gamma$	78 sa	93,5;184,5;296;388	Siklotron
In-111	$\gamma$	67,2 sa	171,245	Siklotron
I-123	$\gamma$	13,2 sa	159	Siklotron
I-131	$\gamma$ (%81,2), $\beta$	8,0 g	284,364, 637	Siklotron reaktör

SPECT: Tek foton emisyon bilgisayarlı tomografi, sa: Saat, g: Gün

Polimer nanopartiküllerin yapısal tasarımı ve *in vivo* PET görüntülemesi, çeşitli araştırmacılar tarafından ayrıntılı olarak gözden geçirilmiştir (25). Lipozom nanopartikülleri 40 yıl önce ilk keşiflerinden bu yana çeşitli muhtemel bileşimler ve modifikasyonlarla ilaç uygulamalarında taşıyıcı olarak kullanılmıştır (14,43). Lipozomların hem tanı hem de tedavi için nanotaşıyıcılar olarak kullanımında önemli ilerlemeler sağlanmıştır. Radyoaktif lipozomların üretilmesi için çok çeşitli radyonüklitler ve işaretleme stratejileri üzerinde çalışılmış ve bunlar çeşitli raporlarda tartışılmıştır. Silika NP'leri de iyi bilinen biyouyumlulukları nedeniyle çeşitli biyomedikal uygulamalar için araştırılmıştır (44,45). F-18 işaretli poröz silika NP'lerin oral yoldan verildikten sonra, mide barsak yolu boyunca bozulmadan ve deri altı birikimi olmadan gastrointestinal sistemi geçtiği gösterilmiştir. İntravenöz enjeksiyon ile hızlı bir mononükleer fagosit sistemi atılımı profili doğrulandı. Sonuçlar silika nanopartiküllerin, *in vivo* stabilite, düşük sitotoksikite ve immünojenik olmayan profillerin oral ilaç verme potansiyelini gösteren

mükemmel nanosistemler olduğunu göstermiştir (44). Başka bir çalışmada, I-124 ve yakın kızıl ötesi boya DY776 ile işaretlenerek organik olarak modifiye edilmiş bir silika NP, hepatobiliyer atılım yoluyla *in vivo* olarak hiçbir toksisite göstermemiştir (45). Son zamanlarda, nanoelmas yapılar da ilaç moleküllerine biyouyumlu taşıyıcılar olarak umut verici biyomateryaller olarak önerilmiştir (46). F-18 radyoaktif nanoelmas yapılar yüksek akciğer, karaciğer ve dalak tutulumu ve üriner sistem atımı gösterdi (47). Nanoteknoloji araştırma ve geliştirmelere Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün artan desteği ile nanotıp araştırmalarında ilerlemeler beklenmektedir (48).

Ek olarak, poli (laktid-ko-glikolid) bazlı biyobozunur nanopartiküllerin potansiyeli, FDA'nın insan kullanımı için onaylanmasından dolayı PET görüntüleme için de değerlendirilmiştir (60). Demir oksit NP'leri PET/MRG kontrastajani olarak çeşitli radyonüklitlerle işaretlenerek kardiyovasküler görüntüleme için önerilmiştir. Dekstran kaplama ve dietilentriaminpentaasetik asit konjugasyonu

**Tablo 3. Nanoparçacıkların PET ve SPECT radyonüklitleri ile radyoaktiflenme yöntemleri**

Nanoparçacık	Radyonüklid	İşaretlenme şekli	Kaynaklar
Kuantum nokta	F-18 Cu-64 Tc-99m I-125/131	Nükleofilik sübtitüsyon DOTA Direkt işaretleme Iodogen	(49) (50) (4) (5)
Demiroksit nanoparçacık	F-18 Tc-99m I-131 I-124 Cu-64 Ga-68	Nükleofilik sübtitüsyon Direkt Iodogen Tirozin NOTA Direkt işaretleme	(49) (50) (51) (52) (45) (53)
Altın nanoparçacık	F-18 Cu-64	Nükleofilik sübtitüsyon DOTA	(8) (54)
Nanotüp	I-125/131 Cu-64 Zr-89 Y-86	Iodogen DOTA Desferrioxamine B DOTA	(16) (55) (55) (56)
Solid lipid nanoparçacık	F-18 Tc-99m	Enkapsülasyon CO kor	(56) (14)
Lipozom	F-18 Ga-68 Cu-64	Enkapsülasyon DTPA BAT	(57) (56) (58)
Polimer bazlı nanoparçacıklar	Cu I-125	DOTA Iodogen	(59) (15)

PET: Pozitron emisyon tomografi, SPECT: Tek foton emisyon bilgisayarlı tomografi

gibi karbonhidratlar ile, Cu-64 radyoişaretli demir oksit NP (Cu-64-TNP), bir apolipoprotein E eksikliği (apoE -/-) anevrizma fare modelinde hedefe yönelik olarak kullanılmıştır (60).

Yüksek spesifik aktiviteli radyonüklid işaretli demiroksit NP'leri ( $3,7 \times 10^8$  Bq/mg Fe nanopartikül), klinik onkoloji çalışmalarında (2,6 mg Fe/kg vücut ağırlığı) çeşitli organlarda NP birikimini diğer yöntemlerde (1,5 mg Fe/kg vücut ağırlığı) kullanılandan daha düşük doz uygulamasına olanak sağlamıştır. Cu-64-TNP'nin *in vivo* biyolojik dağılımı yeterli kan dolaşımını ( $t_{1/2} \geq 4$  saat) ve karaciğer ve barsakta majör birikimi gösterdi. PET/BT görüntüleme, torakal aortta Cu-64-TNP'nin lokalizasyonunu, radyoaktif işaretli nanopartikülün klinik translatabilitesine işaret eden,  $5,1 \pm 0,9$ 'luk bir hedef-arka plan oranına sahip olduğunu gösterdi. Ayrıca, geniş kullanılabilirliği, duyarlılığı ve kovalent radyoaktif işaretlemede yaygınlığı nedeniyle F-18 ile de işaretli demir oksit NP'ler [(F-18- cross linked iron oxide (CLIO))] geliştirilmiştir (53,56). Hızlı [F-18] tıklama (click) florlanması ile yüksek radyoişaretleme verimliliği ve spesifik aktiviteye ulaşıldı ( $6,8 \pm 0,8$ )  $\times 10^8$  Bq/mg Fe NP). *In vivo* farmakokinetik çalışmalar, Cu-64-TNP'ye benzer kan tutulumu gösterdi. ApoE-/- anevrizmalar fare modelinde, PET görüntüleme fagositik hücreler tarafından tutulum kolaylığının, anevrizmalarda doğal tip aorta göre önemli ölçüde daha yüksek izleyici birikimi sağladığını göstermiştir.

## Sonuç

Farklı görüntüleme modaliteleri olan çok modüllü nanopartiküller çeşitli hastalıklarda tanı ve tedavi potansiyeli için tasarlanmış ve araştırılmıştır. Bu derlemede sunulan örnekler, kardiyovasküler, pulmoner ve tümör görüntüleme için PET izotoplarının yanı sıra farmakokinetik değerlendirme için işaretlenmiş nanopartiküllere odaklanmaktadır. Şimdiye kadar, nanoparçacık yapılar kullanılarak *in vitro* izleme ve *in vivo* görüntüleme ile bilgi sağlamada önemli ilerlemeler kaydedilmiştir.

Bununla birlikte PET görüntüleme kullanarak hastalıkların daha erken dönemde tespiti ve böylece daha etkin tedavi sağlanabilmesi ve kişiselleştirilmiş tıp için onaylanmış biyo-uyumlu ve biyo-bozunabilir nanoparçacıkların geliştirilmesini sağlamak için daha fazla çaba harcanması gerekecektir.

**Finansal Destek:** Yazar tarafından finansal destek alınmadığı bildirilmiştir.

## Kaynaklar

1. Liu Y, Welch MJ. Nanoparticles labeled with positron emitting nuclides: advantages, methods, and applications. *Bioconjug Chem* 2012;23:671-682.
2. Hagooley A, Rossin R, Welch MJ. Small molecule receptors as imaging targets. *Handb Exp Pharmacol* 2008;93-129.
3. Gunasekera UA, Pankhurst QA, Douek M. Imaging applications of nanotechnology in cancer. *Target Oncol* 2009;4:169-181.
4. Moharrami P, Unak P, Guldu OK, et al. Multifunctional molecular imaging probes for estrogen receptors:  $^{99m}\text{Tc}$  labeled diethylstilbestrol (DES) conjugated, cuinp quantum dot nanoparticles (DESCIP). *J Radioanal Nucl Chem* 2017;314:2609-2620.
5. Akça Ö, Ünak P, Medine Eİ, et al. Radioiodine Labelled CdSe/CdS Quantum Dots: Lectin targeted dual probes. *Radiochim Acta* 2014;102:849-859.
6. Yüksel M, Çolak D, Akın M, et al. Nonionic, water self-dispersible "hairy-rod" poly(p-phenylene)-g-poly(ethylene glycol) copolymer/carbon nanotube conjugates for targeted cell imaging. *Biomacromolecules* 2012;13:2680-2691.
7. Sanvicens N, Marco MP. Multifunctional nanoparticles--properties and prospects for their use in human medicine. *Trends Biotechnol* 2008;26:425-433.
8. Unak G, Timur S, Toksoz F, Medine EI, et al. Gold nanoparticle probes: Design and in vitro applications in cancer cell culture. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2012;90:217-226.
9. Subramanian M, Pearce G, Guldu O K, et al. A pilot study into the use of FDG-mNP as an alternative approach in neuroblastoma cell hyperthermia. *IEEE Trans Nanobioscience* 2016;15:517-525.
10. Aras O, Pearce G, Watkins AJ, et al. An in-vivo pilot study into the effects of FDG-mNP in cancer in mice. *Plos One* 2018;13:0202482.
11. Watkins AJ, Pearce G, Unak P, et al. Tissue morphology and gene expression characterisation of transplantable adenocarcinoma bearing mice exposed to fluorodeoxyglucose-conjugated magnetic nanoparticles. *J Biomed Nanotechnol* 2018;14:1979-1991.
12. Barlas BF, Demir B, Guler E, et al. Multimodal theranostic assemblies: double encapsulation of protoporphyrine-IX/Gd $^{3+}$  in niosomes. *RSC Advances* 2016;6:30217-30225.
13. Ozada C, Tekin V, Barlas FB, Timur S, Unak P. Encapsulation Of Protoporphyrin-IX/Manganese Oxide In Niosomes As Theranostic, 4th Edition. *International Symposium on Composite Materials*. İzmir: KOMPEGE;2018. p. 360-368.
14. Ucar E, Teksoz S, Ichedef C, et al. Synthesis, characterization and radiolabeling of folic acid modified nanostructured lipid carriers as a contrast agent and drug delivery system. *Appl Radiat Isotop* 2017;9:72-79.
15. Colak DG, Cianga I, Odaci Demirkol D, et al. The synthesis and targeting of PPP-type copolymers to breast cancer cells: multifunctional platforms for imaging and diagnosis. *J Mater Chem* 2012;22:9293-9300.

16. Guldu OK, Unak P, Timur S. A novel theranostic nanobioconjugate: <sup>125</sup>I/<sup>131</sup>I labeled phenylalanine conjugated boron nitride nanotubes. *J Radioanal Nucl Chem* 2017;311:1751-1762.
17. Khlebtsov N, Dykman L. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies. *Chem Soc Rev* 2011;40:1647-1671.
18. Li SD, Huang L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Mol Pharm* 2008;5:496-504.
19. Cormode DP, Skajaa T, Fayad ZA, Mulder WJ. Nanotechnology in medical imaging: probe design and applications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:992-1000.
20. Xie H, Wang ZJ, Bao A, Goins B, Phillips WT. In vivo PET imaging and biodistribution of radiolabeled gold nanoshells in rats with tumor xenografts. *Int J Pharm* 2010;395:324-330.
21. Jokerst JV, Lobovkina T, Zare RN, Gambhir SS. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine (Lond)* 2011;6:715-728.
22. Kuo WS, Chang YT, Cho KC, Chiu KC, Lien CH, Yeh CS, Chen SJ. Gold nanomaterials conjugated with indocyanine green for dual-modality photodynamic and photothermal therapy. *Biomaterials* 2012;33:3270-3278.
23. Zhang JS, Liu F, Huang L. Implications of pharmacokinetic behavior of lipoplex for its inflammatory toxicity. *Adv Drug Delivery Rev* 2005;57:689-698.
24. Jarzyna PA, Gianella A, Skajaa T, et al. Multifunctional imaging nanoprobe. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2010;2:138-150.
25. Welch MJ, Hawker CJ, Wooley KL. The advantages of nanoparticles for PET. *J Nucl Med* 2009;50:1743-1746.
26. Minchin RF, Martin DJ. Nanoparticles for molecular imaging--an overview. *Endocrinology* 2010;151: 474-481.
27. Loudos G, Kagadis GC, Psimadas D. Current status and future perspectives of in vivo small animal imaging using radiolabeled nanoparticles. *Eur J Radiol* 2010;78:287-295.
28. Hong H, Zhang Y, Sun J, Cai W. Molecular imaging and therapy of cancer with radiolabeled nanoparticles. *Nano Today* 2009;4:399-413.
29. Gomes CM, Abrunhosa AJ, Ramos P, Pauwels EK. Molecular imaging with SPECT as a tool for drug development. *Adv Drug Deliv Rev* 2011;63:547-554.
30. Heidel JD, Davis ME. Clinical developments in nanotechnology for cancer therapy. *Pharm Res* 2011;28:187-199.
31. Schluep T, Hwang J, Hildebrandt IJ, et al. Pharmacokinetics and tumor dynamics of the nanoparticle IT-101 from PET imaging and tumor histological measurements. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:11394-11399.
32. Benezra M, Penate-Medina O, Zanzonico PB, et al. Multimodal silica nanoparticles are effective cancer-targeted probes in a model of human melanoma. *J Clin Invest* 2011;121:2768-2780.
33. Ray P. The pivotal role of multimodality reporter sensors in drug discovery: from cell based assays to real time molecular imaging. *Curr Pharm Biotechnol* 2011;12:539-546.
34. Glaus C, Rossin R, Welch MJ, Bao G. In vivo evaluation of (<sup>64</sup>Cu)-labeled magnetic nanoparticles as a dual modality PET/MR imaging agent. *Bioconjug Chem* 2010;21:715-722.
35. Almutairi A, Rossin R, Shokeen M, et al. Biodegradable dendritic positron-emitting nanoprobe for the noninvasive imaging of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:685-690.
36. Rossin R, Muro S, Welch MJ, Muzykantor VR, Schuster DP. In vivo imaging of <sup>64</sup>Cu-labeled polymer nanoparticles targeted to the lung endothelium. *J Nucl Med* 2008;49:103-111.
37. Liu Y, Ibricevic A, Cohen JA, et al. Impact of hydrogel nanoparticle size and functionalization on in vivo behavior for lung imaging and therapeutics. *Mol Pharm* 2009;6:1891-1902.
38. Tang L. Radionuclide production and yields at Washington University School of Medicine. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2008;52:121-133.
39. Hamoudeh M, Kamleh MA, Diab R, Fessi H. Radionuclides delivery systems for nuclear imaging and radiotherapy of cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:1329-1346.
40. Shokeen M, Fetting NM, Rossin R. Synthesis, in vitro and in vivo evaluation of radiolabeled nanoparticles. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2008;52:267-277.
41. Kagadis GC, Loudos G, Katsanos K, Langer SG, Nikiforidis GC. In vivo small animal imaging: current status and future prospects. *Med Phys* 2010;37:6421-6442.
42. Anderson CJ, Ferdani R. Copper-64 radiopharmaceuticals for PET imaging of cancer: advances in preclinical and clinical research. *Cancer Biother Radiopharm* 2009;24:379-393.
43. Gregoriadis G, Ryman BE. Liposomes as carriers of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases. *Biochem J* 1971;124:58.
44. Bimbo LM, Sarparanta M, Santos HA, et al. Biocompatibility of thermally hydrocarbonized porous silicon nanoparticles and their biodistribution in rats. *ACS Nano* 2010;4:3023-3032.
45. Kumar R, Roy I, Ohulchanskyy TY, et al. In vivo biodistribution and clearance studies using multimodal organically modified silica nanoparticles. *ACS Nano* 2010;4:699-708.
46. Martin R, Menchon C, Apostolova N, et al. Nano-jewels in biology. Gold and platinum on diamond nanoparticles as antioxidant systems against cellular oxidative stress. *ACS Nano* 2010;4:6957-6965.
47. Rojas S, Gispert JD, Martin R, et al. Biodistribution of amino-functionalized diamond nanoparticles. In vivo studies based on <sup>18</sup>F radionuclide emission. *ACS Nano* 2011;5:5552-5559.
48. Buxton DB. Nanotechnology research support at the national heart, lung, and blood institute. *Circ Res* 2011;109:250-254.

49. Özkaya F, Unak P, Medine EI, Sakarya S, Unak G, Timur S. 18FDG Conjugated Magnetic Nanoparticle Probes: Synthesis and In Vitro Investigation on MCF7 Breast Cancer Cells. *J Radioanal Nucl Chem* 2013;295: 1789-1796.
50. Yılmaz T, Unak P, Muftuler FZB, Medine EI, Ichedef C, Kılcar AY. Magnetic Nanoparticle-Conjugated and Radioiodinated-DESG: In vitro and in vivo efficiency investigation. *J Radioanal Nucl Chem* 2015;303:63-69.
51. Bekis R, Medine I, Dagdeviren K, Ertay T, Unak P. A new agent for sentinel lymph node detection: Preliminary Results. *J Radioanal Nucl Chem* 2011;290:277-282.
52. Choi JS, Park JC, Nah H, et al. A hybrid nanoparticle probe for dual-modality positron emission tomography and magnetic resonance imaging. *Angew Chem Int Ed Engl* 2008;47:6259-6262.
53. Stelter L, Pinkernelle JG, Michel R, et al. Modification of aminosilanized superparamagnetic nanoparticles: feasibility of multimodal detection using 3T MRI, small animal PET, and fluorescence imaging. *Mol Imaging Biol* 2010;12:25-34.
54. Chen J, Glaus C, Laforest R, et al. Gold nanocages as photothermal transducers for cancer treatment. *Small* 2010;6:811-817.
55. Ruggiero A, Villa CH, Holland JP, et al. Imaging and treating tumor vasculature with targeted radiolabeled carbon nanotubes. *Int J Nanomedicine* 2010;5:783-802.
56. Marik J, Tartis MS, Zhang H, et al. Long-circulating liposomes radiolabeled with [18F]fluorodipalmitin ([18F]FDP). *Nucl Med Biol* 2007;34:165-171.
57. Oku N, Yamashita M, Katayama Y, et al. PET imaging of brain cancer with positron emitter-labeled liposomes. *Int J Pharm* 2011;403:170-177.
58. Andreozzi E, Seo JW, Ferrara K, Louie A. Novel method to label solid lipid nanoparticles with (64)Cu for positron emission tomography imaging. *Bioconjugate Chem* 2011;22:808-818.
59. Fukukawa K, Rossin R, Hagooly A, et al. Synthesis and characterization of core-shell star copolymers for in vivo PET imaging applications. *Biomacromolecules* 2008;9:1329-1339.
60. Courant T, Roullin VG, Cadiou C, et al. Development and physicochemical characterization of copper complexes-loaded PLGA nanoparticles. *Int J Pharm* 2009;379:226-234.



# Klinik Öncesi Çalışmalarda Kullanılan Görüntüleme Teknikleri

## Imaging Modalities Used in Preclinical Studies

© Seyhan Karaçavuş

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nükleer Tıp Kliniği, Kayseri, Türkiye

### Öz

Görüntüleme yöntemleri uzun zamandır klinik ve klinik öncesi pratikte ya da ilaç geliştirme çalışmalarında vazgeçilmez bir araç olmuştur. Küçük deney hayvanlarının *in vivo* görüntülemesi, biyomedikal araştırmaların kritik bir parçası olarak giderek önem kazanmaktadır. Bu uygulamalar için en çok kullanılan yöntemlerden bazıları, nükleer tıp teknikleri, [özellikle pozitron emisyon tomografi (PET), tek foton emisyon bilgisayarlı tomografi (SPECT)], bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans görüntülemedir (MRG). Her modalitenin kendine özgü güçlü yönleri ve sınırlamaları vardır ve hangi görüntüleme modalitesinin seçileceği, ilgilenilen parametreye bağlı olacaktır. Son zamanlarda, her bir görüntüleme yönteminin sınırlamalarının üstesinden gelmeyi amaçlayan, patofizyolojik süreç hakkında tamamlayıcı bilgi vermek üzere tasarlanmış multimodalite cihazlar popülerlik kazanmıştır. MikroBT veya mikroMRG gibi yüksek çözünürlüklü modalitelerin, mikroPET veya mikroSPECT gibi fonksiyonel bilgiler sağlayan oldukça hassas tekniklerle kombinasyonu, enfeksiyon, onkoloji, kardiyoloji ve nöroloji gibi alanların araştırma ufğunu genişletmeye devam edecektir. Bu araştırmalar, sadece hastalığın altta yatan mekanizmalarının anlaşılmasına değil, aynı zamanda yeni kimyasal oluşumların değerlendirilmesi ve aday ilaçların geliştirilmesine de etkili ve benzersiz katkılar sağlayacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Klinik öncesi, görüntüleme yöntemleri, *in vivo*

### Abstract

Imaging modalities have long been indispensable tool in clinical and preclinical practice or drug development. Increasingly, *in vivo* imaging of small laboratory animals has gained importance as a critical component of preclinical biomedical research as well. The most used modalities for small-animal *in vivo* imaging applications are based on nuclear medicine techniques (especially, positron emission tomography [PET] and single photon emission computed tomography [SPECT]), computed tomography (CT), and magnetic resonance imaging (MRI). Each modality has intrinsic strengths and limitations, and the choice of the imaging modality depends on the parameter of interest. Recently, aiming to overcome the limitations of each imaging modality, multimodality devices designed to provide complementary information upon the pathophysiological process under study have emerged popularity. The combination of high-resolution modalities, like microCT or microMRI, with highly sensitive techniques providing functional information, such as microPET or microSPECT, will continue to broaden the horizons of research in such areas as infection, oncology, cardiology, and neurology, contributing not only to the understanding of the underlying mechanisms of disease but also providing efficient and unique tools for evaluating new chemical entities and development of candidate drugs.

**Keywords:** Preclinical, imaging modalities, *in vivo*

### Hangi Modalite?

Deney hayvanlarının noninvaziv görüntülenmesinde hedeflenen amaçlar doğrultusunda farklı modaliteler kullanılmaktadır. En uygun yöntemin seçilmesinde

ilgilenilen parametre yani boyut, fonksiyon, istenilen uzaysal ve temporal rezolüsyon ve sensitivite, dinamik veriye ihtiyaç, tüm vücut/bölgesel veri gerekliliği, çekim süresi, penetrasyon derinliği, kantitatif veriye ihtiyaç, çoklu/tekrarlayan çalışmaya ihtiyaç, birden

### Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Doç. Dr. Seyhan Karaçavuş, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nükleer Tıp Kliniği, Kayseri, Türkiye

**E-posta:** seyhan.karacavus@sbu.edu.tr **ORCID ID:** orcid.org/0000-0002-0651-6441

©Telif Hakkı 2019 Türkiye Nükleer Tıp Derneği / Nükleer Tıp Seminerleri, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.

fazla hedefi aynı anda görüntüleme, hayvan türü ve maliyet gibi unsurlar etkilidir (1). Her bir yöntemin kendine özgü avantaj ve dezavantajları mevcut olmakla birlikte iyonizan radyasyona maruziyet, çözünürlük, görüntüleme derinliği, kontrast ajanların kullanılabilirliği, moleküler işaretleme imkanı gibi parametreler tercih edilmelerindeki en önemli etkenlerdir (Tablo 1) (2).

Lezyon boyutu tayini için bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRG) en uygun modaliteler olup tüm hayvanı kolaylıkla tarayabilen hatta birden fazla hayvanı aynı anda tarayabilen sistemler sunmaktadırlar (3). BT'de radyasyona maruziyet söz konusu olmasına rağmen, MRG'ye göre özel mikroBT tarayıcılar yardımıyla düşük çözünürlükte ve daha kısa zamanda tarama yapma avantajı mevcuttur. Diğer yandan MRG, farklı sekanslar yardımıyla sağladığı mükemmel yumuşak doku kontrastı sayesinde doku ödemi ve nekrozu gibi detayları gösterme avantajına sahiptir (4). Akciğer lezyonları dışında küçük boyutlu lezyonları göstermede yüksek çözünürlüğe sahip olan MRG, tercih edilmesi gereken yöntemdir. İskelet sistemi, damarlar ve organların morfolojilerinin ve patolojilerinin (kalsifikasyonlar, yağ miktarı, anomaliler vb.) eş zamanlı incelenmesinde mikroBT ve mikroMRG her ikisi de kullanılabilir (3).

Klinik çalışmalar hastalığın prognozunu tayin etmede lezyon boyutunun yanında morfolojik ve fonksiyonel bilgilerin de gerekli olduğunu göstermiştir (1,2,3). Metabolizma, doku perfüzyonu, damarların yapısı, hücrel içerikler vb. hakkında moleküler ve fonksiyonel bilgiler edinilmesi tanı ve tedavide oldukça önem arz etmektedir. Bu bağlamda, tek foton emisyon bilgisayarlı tomografisi (SPECT) ve pozitron emisyon

tomografisi (PET), hastalığın başlangıç sürecindeki moleküler ve biyolojik etkileşimlerin açıklanması, tümör metabolizması, tedavi yanıtı monitörizasyonu, ilaç geliştirme, biyodağılım, reseptör etkileşimleri, hedefe bağlanma kinetiğinin değerlendirilmesi vb. fonksiyonel durumların araştırıldığı çalışmalar için ideal yöntemlerdir (3). Diğer yöntemler ile karşılaştırıldığında oldukça yüksek hassasiyete sahip sistemlerdir. Kullanılan radyoaktif işaretleyiciler kontrast maddelere göre hücrenin biyomoleküler yapısını ve özelliklerini daha az etkilemekte ve mutlak miktar tayinine olanak sağlamaktadır (1). MikroSPECT ve mikroPET, birbirlerine göre farklı avantaj ve dezavantajlara sahip modaliteler olmalarından dolayı uygulama alanına göre tercih edilmektedirler (1,3). Bununla birlikte pahalı alt yapı, özellikli personel eğitimi ve radyoaktif işaretleyici gerekliliği bu modaliteler için dezavantaj oluşturmaktadır.

Tüm bu bilgiler doğrultusunda, patolojik sürecin ortaya çıkarılmasında anatomik, morfolojik ve fonksiyonel mekanizmaların anlaşılmasındaki gereksinimler, farklı modalitelerin birlikte kullanılması ihtiyacını doğurmuştur. Gelişen teknolojiye paralel olarak hibrid görüntüleme yöntemleri oldukça popüler olmaya başlamıştır. MikroSPECT/MikroBT, MikroPET/MikroBT, MikroSPECT/Mikro MRG ve MikroPET dedektörü eklenebilen MikroMRG gibi hibrid tarayıcılar, deney hayvanları araştırmalarında ve görüntülemesinde tercih edilmektedirler (4,5,6).

### Emisyon Tomografisi: SPECT ve PET

Emisyon tomografisi, anatomik bilgiden ziyade, spesifik radyofarmasötikler kullanılarak hücre

**Tablo 1. Klinik öncesi görüntüleme sistemlerinin temel karakteristikleri**

	Radysayon türü	En iyi rezolüsyon	Moleküler/kontrast ajan	Avantaj	Sınırlamalar
SPECT	İyonizan ( $\gamma$ )	0,25 mm	$\gamma$ ışını yayıcı ajanlarla işaretli bileşikler	Uzun yarı ömürlü, spesifik aktiviteli radyonüklidler, yüksek rezolüsyon	PET'e göre düşük sensitivite, büyük moleküler ajanlar
PET	İyonizan ( $\beta+$ , $\gamma$ )	0,7 mm	Pozitron yayıcı ajanlarla işaretli bileşikler	Yüksek sensitivite, doğru nicel, moleküler ve fonksiyonel bilgi	Kısa yarı ömürlü ajanlar, sınırlı uzaysal rezolüsyon
BT	İyonizan (X-ışını)	10 mm	Radyopak kontrast maddeler	Yüksek uzaysal rezolüsyon, akciğer ve kemik görüntüleme	Kötü yumuşak doku kontrastı, radyasyon maruziyeti
MRG	Noniyonizan (elektromanyetik)	25 mm	Paramanyetik şelatörler (gadolinium, superparamanyetik demir oksit nanopartiküller)	Yüksek rezolüsyon, yüksek yumuşak doku kontrastı, anatomik ve moleküler bilgi	Düşük sensitivite, uzun görüntüleme süresi, anestezi gerekliliği

SPECT: Tek foton emisyon tomografisi,  $\gamma$ : Gama,  $\beta+$ : Beta pozitif, PET: Pozitron emisyon tomografisi, BT: Bilgisayarlı tomografi, MRG: Manyetik rezonans görüntüleme



metabolizması/çoğalması, enzim reaksiyonları, ligand-reseptör etkileşimleri gibi pek çok moleküler, metabolik ve fonksiyonel olayların *in vivo* olarak incelenmesine imkan tanıyan noninvaziv bir modalitedir. SPECT ve PET hastalıkların temelinin araştırılmasında ve potansiyel tedavi metodlarının geliştirilmesinde kullanılan güçlü modalitelerdir. Nörolojiden, onkoloji ve kardiyolojiye kadar geniş bir uygulama alanları vardır.

Elementlerin çok düşük konsantrasyonlarını (pikomolar düzey) tespit edebilmeleri nedeniyle, moleküler görüntüleme için en uygun yöntemlerdir. Bu sistemlerle görüntüleme radyoaktif işaretleyiciler kullanılmaktadır. Bu işaretleyicilerin bir kısmı biyoaktif molekül ve ilaçları oluşturan temel elementlerin radyoizotopu iken (C-11, O-15 vb.) bir kısmı da hücre içinde çeşitli mekanizmalara katılabilen yapısal olmayan elementlerin izotopudur (F-18, I-123, Tc-99m vb.) (7). Radyoizotoplardan yayılan gama ışınları bu sistemler tarafından algılanıp, organizma içerisindeki dağılımları belirlenerek üç farklı uzaysal düzlemde görüntüler elde edilmektedir. Parsiyel volüm etkisi ve saçılma nedeniyle istenilen görüntü kontrastını elde etmek amacıyla dokunun gramı başına verilecek doz insanlarda kullanılan dozun yaklaşık 20 katı kadar olmalıdır (8). Bununla birlikte vücut kütlesine uygulanabilecek miktar ve maksimum enjeksiyon volümü sınırlıdır (9).

Ayrıca bu modalitelerde dinamik görüntüleme ile radyoaktif işaretli molekülün zaman içinde tümör vb. hücrelere alımı ya da dolaşımdan temizlenmesi ölçülebilir. Bu veriler ve kompartmantal modelleme ile işaretli moleküllerin kinetiği ve hücresel uptake oranları elde edilebilir ve perfüzyon (arterial faz) karakteristikleri incelenebilir. Radyoligandların spesifik dağılımı hakkında, ilgi alanları kullanılarak kantitatif veya semikantitatif veriler elde edilebilir. Bu işlemler aynı ve farklı şartlar altında tekrar edilebilir ve fizyolojik değişimler veya farmakolojik müdahaleler sonrası değişimleri incelenebilir.

### MikroSPECT

SPECT radyonüklidlerden yayılan gama ışınlarını direk olarak algılayıp görüntüye çeviren bir sistemdir. Farklı isotoplardan yayılan farklı enerjiye sahip gama ışınlarını aynı anda görüntüleme kapasitesine sahip olmasından dolayı eşzamanlı gelişen hücresel ve moleküler olayların incelenmesine de imkan tanır (10). SPECT'in temel komponenti olan gama kamera sistemi, kolimatör, sintilasyon kristali, foton çoğaltıcı tüpler ve toplanan ışınların görüntüye çevrildiği

sistem bilgisayarından oluşmaktadır. Konvansiyonel sistemlerde iki boyutlu olarak elde edilen planar görüntülere karşılık, SPECT sistemlerinde gama kameraların obje etrafında dönerek çeşitli açılardan aldığı görüntülerden üç boyutlu tomografik görüntüler elde edilmesi mümkün olmaktadır (11).

Klinik öncesi mikroSPECT sistemlerinde yarı iletken dedektörler, yüksek rezolüsyonlu bölünmüş kristallerin olduğu dedektörler, pozisyon duyarlı foton çoğaltıcı tüpler ve çoklu iğne uçlu (multi pinhole) kolimatörlerin kullanılması ile oldukça iyi çözünürlük (<1 mm) sağlanabilmektedir (12). Pek çok mikroSPECT sistemindeki temel bileşenlerden birisi multipinhole (çoklu iğne uçlu) kolimatörlerdir. Düşük sensitivite fakat yüksek çözünürlük sağlayan pinhole kolimatörlerin çapına bağlı olarak <math>10^{-10}</math> molar moleküllerin tespiti yapılabilmekte ve milimetrik veya submilimetrik düzeyde (0,3-0,7 mm) çözünürlük elde edilebilmektedir (13).

Pinhole kolimatörlerde elde edilen görüntünün kalitesi, kolimatör ucu açıklığının çapına, kolimatörün geometrik yapısına ve görüntülenecek materyalin kolimatöre olan uzaklığına bağlıdır. Kolimatör duvarlarının açısı, kolimatör materyalinin atenüasyon katsayısı ve pinhole çapı ideal açıklığı belirler. Difilippo kendilerinin dizayn ettikleri, gama kamera dedektörlerine horizontal-lineer yerleştirilen, hayvan yatağının içerisine girebildiği, 22 adet pinhole açıklığı (0,9 mm) içeren silindir şeklinde (53 mm çapında, 280 mm uzunluk ve 9 mm kalınlık), kendi ekseninde dönebilen bir kolimatörle yaptıkları fantom çalışmasında klinik gama kamerada 0,6 mm rezolüsyon elde etmişlerdir (14). Daha sonraları pinhole geometride küçük pinhole açıklığı ile rezolüsyon artışı elde edilirken azalan dedektör verimliliğini artırmak için her birinde pinhole kolimatör takılı çok sayıda, sirküler tarzda dedektörlerin kullanıldığı üst üste gelmeyen (non-overlapping) sistemler geliştirilmiştir (U-SPECT-An Ultra-High-Resolution Device for Molecular Small-Animal Imaging, FastSPECT II) (15). Çoklu pinhole dedektörlerin kullanıldığı sistemlerin geliştirilmesi ile birlikte sadece uzaysal çözünürlükte değil sensitivite ve işlem süresinde de iyileştirmeler meydana gelmiştir.

Bunların yanında yeni kristal materyallerinin [thallium (Tl) - cesium iodide (CsI), sodium (Na) - CsI vb.] kullanıma girmesi, ışık çıkışında ve sistem çözünürlüğünde artış ve konumsal duyarlı foton çoğaltıcı tüplerin kullanımı, sadece sensitivitenin artışına değil görüntüleme boyutunun artışına ve maliyet azalmasına da yol açmıştır. Bazı yarı iletken malzemeler cadmium zinc telluride ve silikon gibi gama ışınlarını direkt olarak

elektrik sinyallerine dönüştürmektedir. Bu dedektörler mükemmel uzaysal rezolüsyon (0,3 mm) ve özellikle düşük enerjili radyonüklidler ve dual izotop uygulamaları için iyi bir enerji rezolüsyonu sağlamaktadır (4,16). Pek çok mikroSPECT cihazında pinhole dedektör kullanılmasına rağmen daha büyük görüntü alanı ve yüksek çözünürlük sağlayan paralel kolimatörlü sistemlerin geliştirilmesi için çalışmalar sürmektedir. CsI (Na) kristalinin kullanıldığı bölünmüş dedektör kullanılan çift başlı gama kamera HiReSPECT cihazı bunlardan birisidir (17). Ayrıca kullanılan rekonstrüksiyon metodları da görüntü kalitesi üzerine etkilidir. İteratif rekonstrüksiyon, hem klinik hem de prelinik SPECT cihazlarında en çok tercih edilen yöntemdir. Yüksek iterasyonlarda daha iyi görüntü kontrastı ve rezolüsyonu elde edilebilmektedir (1,2).

Tek foton yayan radyoizotoplar, hormonlar, antikorlar ve peptidler gibi pek çok endojen biyomolekülleri işaretlemek için oldukça uygundur (18). Bu biyomoleküller görece büyüktürler ve dokuya geçişleri ve kan klirensleri düşüktür. Bu nedenle gözlem süresini uzun tutmak amacıyla daha uzun yarı ömürlü, kimyasal olarak stabil ve spesifik enerjiye sahip radyonüklidler ile işaretleme tercih edilmektedir.

### MikroPET

PET pozitron bozunması sonucu, birbirine 180° zıt yönde hareket eden yüksek enerjili (511 keV) gama ışınlarının, dedektörde bulunan kristaller tarafından ışık sinyallerine dönüştürülerek kristalin arkasında yer alan ve konum belirleme özelliğine sahip PMT'lerin vasıtasıyla çoğaltılıp elektrik sinyalleri haline getirilmesi ve sistem bilgisayarı tarafından da çeşitli rekonstrüksiyon işlemleri sonucunda üç boyutlu görüntüler elde edilmesi mantığına dayanmaktadır (19).

İdeal bir klinik öncesi PET tarayıcısının karakteristikleri; submilimetre düzeyinde uzaysal rezolüsyon, yüksek sensitivite, görüntülenecek hayvana göre yeterli dedektör çapı, iyi bir temporal rezolüsyon ve çoklu görüntüleme sistemlerine uyabilirlik olarak sıralanabilir (20). Bu sistemin performansını belirleyen en önemli etkenler kristallerin yapısı ve dedektörlerin dizaynidir. MikroPET dedektörleri, lutesyum ortosilikat, lutesyum-yitrium ortosilikat veya gadolinyum ortosilikat gibi daha fazla ışık üretimi yapabilen, daha sensitive, yüksek çözünürlük sağlayan (0,7 mm) ve hızlı inorganik kristallerden üretilmektedir (21,22). Sistem kristalinin foton durdurma gücü, dedeksiyon kapasitesi ve sintilasyon verimine göre çözünürlük ve görüntüleme

kalitesi değişmektedir. Dedektörlerin de halka şeklinde dizayn edilmiş olması tercih edilmektedir. Fakat PET sistemlerinde kolimatör bulunmaması, pozitron erişim mesafesi, lineer olmayan ve tesadüfi fotonların dedeksiyonu gibi sistemsel nedenlerden dolayı uzaysal rezolüsyon SPECT sistemlerindeki kadar (0,3 mm) olamamaktadır (23).

MikroPET sistemlerinde uzaysal çözünürlüğün artırılabilmesi amacıyla kristal yapısı elementinin uzun ve ince yapıda yani küçük hacimlerde olması (~1 mm<sup>3</sup>), kristaller arasındaki boşluğun azalması (packing fraction) ve böylece görüş alanındaki [Field of View (FOV)] kristal sayısının artması sağlanmaya çalışılmaktadır. Kristal boyunun fazla uzun olması da etkileşim derinliği ve uzaklık hatası olarak bilinen uzaysal çözünürlüğü azaltan bir etkiye yol açabilir. Bu durumu ortadan kaldırmak için de küçük kristal kullanımı veya kristal içindeki etkileşim derinliğinin ölçülmesi yapılabilir (24,25,26). Böylece mutlak duyarlılık olarak bilinen, verilen radyoaktivitenin cihaz tarafından toplanma verimliliği yani cihaz görüş alanındaki birim radyoaktivite başına sayım hızı (cps/Bq) artırılmış olur. Bilindiği üzere bir sistemin kısa zaman aralığında çok sayım elde etmesi yüksek saptama verimliliğine ya da yüksek duyarlığa sahip olduğunu göstermektedir.

En yaygın olarak kullanılan radyoizotop, yarı ömrü diğerlerine göre nispeten uzun olan flor-18 (F-18)'dir. Özellikle onkolojik çalışmalarda tercih edilen PET radyofarmasötikleri, malign hücrelerdeki artmış glikoz kullanımı, reseptör ekspresyonu, DNA sentezi ve aminoasit kullanımı gibi farklılıkların tespitine yönelik olarak geliştirilmiştir (27). Kullanılan radyoizotopların yarı ömürleri SPECT ajanlarına göre daha kısadır. Görüntülerin yorumlanmasında radyofarmasötiklerin normal biyodağılımı dışındaki zemin aktiviteye oranla artmış birikim gösterdiği odaklar değerlendirilmektedir. PET'in sağladığı en önemli avantajlardan birisi de bu birikim odaklarındaki aktivitenin sayısallaştırılabilmesidir (28). Belirlenen odakların maksimum aktivite tutulumu yoğunluğu, vücuttaki ortalama aktiviteye oranlanarak maksimum standardize edilmiş uptake değeri (SUV<sub>max</sub>) adı verilen semikantitatif bir değer elde edilir. **SUV<sub>max</sub>: Seçilen alandaki ortalama aktivite (mCi/mL)/Enjekte edilen doz (mCi)/vücut ağırlığı (kg)**. Bu değeri plazma glukoz düzeyi, radyofarmasötik enjeksiyonundan sonra geçen süre, vücut ağırlığı veya vücut yüzey ölçümü, belirlenen alanın büyüklüğü, tarayıcı sistemin rezolüsyonu, rekonstrüksiyon ve atenüasyon düzeltmenin tipi gibi faktörler etkiler (29,30).

## MikroBT

BT X ışınlarının dokulardan geçişi sırasında zayıflaması özelliğinden faydalanılarak volüm elementi vokselde elde edilen veriler yardımıyla kesitsel ve üç boyutlu görüntüler elde edilen bir yöntemdir (31). Tipik bir BT sistemi, incelenecek obje etrafında dönebilen bir X ışını tüpü ve karşısına yerleştirilmiş iki boyutlu dedektörden oluşmaktadır. X ışınının zayıflaması doku dansitesine ve ilgili vokseldeki elementin atom numarasına bağlıdır. Yüksek atom numaralı ve yüksek dansiteli dokular (örneğin; kemik) keskin kontrastlı mükemmel görüntüler verirken, düşük dansiteli dokular kötü bir görüntü vereceği için ayırıcı tanıda kontrast ajanlar kullanmayı gerektirebilmektedir (31,32).

Klinik öncesi görüntülemelerde kullanılan mikroBT sistemlerinde maksimum uzaysal rezolüsyona ulaşmak ve sinyal/gürültü oranını optimize etmek için bazı düzenlemeler yapılmıştır. X ışını tüpleri modifiye edilerek, "mikro odak" olarak adlandırılan çok küçük odaklı tüpler kullanılır (33). Ayrıca 1 µm veya daha küçük voksel boyutları ile çok yüksek çözünürlükte (10 µm) üç boyutlu görüntüler üretmek için, dokuların X ışını zayıflatma özelliklerindeki farklılıkları kullanan MicroBT, çok küçük bir objeyi, mikro odaklı X ışınları kullanarak ve yüksek çözünürlüklü bir dedektör ile birleştirerek iyi bir görüntü elde etmesiyle klasik BT'den farklıdır. *In vivo* mikroBT sistemlerinde incelenecek canlı organizma dönen bir tarayıcı içinde sabit kalırken, *in vitro* mikroBT sistemlerde bir aparata yerleştirilen materyalin kendisi dönmektedir (34). *In vitro* tarayıcılarda çok yüksek kontrast ve çok yüksek çözünürlük (5-50 µm) elde etme imkanı bulunmaktadır. Bunun için X-ray kaynağının ölçüsü de çok küçük olmalıdır. Taranacak numune tarama boyunca 360 döndürülür. Tarama süresi 10-300 dk. sürebilir. Mikro-odaklı X ışını tüplerinin düşük güç seviyelerinden dolayı tarama zamanı uzundur. Verilen ve akümüle olan radyasyon dozuna dikkat edilmelidir. Farelerde LD<sub>50/30</sub> dozunun 5-7,6 Gy arasında değiştiği bildirilmiştir (9).

Radyasyon dozu ve yumuşak dokulardaki düşük kontrast BT'nin dezavantajlarıdır. Bununla birlikte yeni geliştirilen veri toplama ve rekonstrüksiyon metodlarındaki ilerlemeler sayesinde mikroBT'nin görüntüleme kalitesi de artmaya devam etmektedir (35). MikroBT sistemlerinde en yaygın kullanılan rekonstrüksiyon algoritmi Filtered Back Projection'dur (FBP). İnce uzun çizgiler ve gölgelenme gibi FBP rekonstrüksiyonundan oluşan düzensiz-açısız dağılıma sahip artefaktlar, toplam varyasyon (TV) minimizasyonu

ve eş zamanlı cebirsel rekonstrüksiyon tekniği (SART) kullanılarak görüntü kalitesi iyileştirilebilir. SART-TV özellikle kardiyolojik çalışmalar için 4D-kardiyak mikroBT sistemlerde kullanılmaktadır (36).

MikroBT'nin yumuşak dokulardaki moleküler ve fonksiyonel bilgi sağlama kapasitesini artırmak amacıyla kontrast maddeler de kullanılmaktadır. Düşük molekül ağırlıklı ve kan havuzu görüntülemelerde kullanılan vasküler ajanlar, iyotlu lipozomal ajanlar ve nanopartiküler kontrastlı ajanlar sayesinde moleküler görüntülemeye BT'nin kapıları açılmaya başlamıştır (37). Özellikle spektral mikroBT için nanopartiküler hedefe özel ajanların geliştirilmesi önemlidir.

## MikroMRG

Üç boyutlu görüntülemeye dayalı manyetik rezonans görüntüleme (MRG), kuantum fiziğinin tıp alanındaki en yenilikçi, çok yönlü ve kullanışlı bir modalitesidir. Yumuşak dokuda iyonize radyasyon vermeden yüksek kontrastlı tüm vücut *in vivo* görüntüleme sağlayabilmektedir. 1,5-3 Tesla MRG tarayıcıları tavşan gibi hayvanları görüntülemek için kullanılmakla birlikte mikroMRG sistemlerinde 4,7 ve üzeri tesla mikroMRG sistemleri ile yüksek rezolüsyonlu (25 µm) mükemmel yumuşak doku görüntülemesi sağlanabilmektedir (38).

MRG görüntüleme, eksternal bir manyetik alanda özellikle hidrojen atomlarındaki protonların spin hareketlerinin radyofrekans (RF) impulsları ile değişimine dayalı bir modalitedir. T1 ve T2 fazları vardır. MikroMRG sistemlerde ince anatomik detayları görmek amacıyla daha iyi bir çözünürlük ve yüksek sinyal/gürültü (SNR) oranı sağlamak için daha güçlü homojen bir manyetik alan (en az 4,7 tesla, ideali 7 tesla ve üzeri), özelleştirilmiş koiller ve RF zincirleri dizayn edilmiştir (2). Klinik MRG'de voksel boyutu 1,5×1,5×10 mm<sup>3</sup> ve hacim 23 mL iken, micro MRG'de 100×100×500 mm<sup>3</sup> ile voksel boyutu 3000 kez daha küçüktür ve hacim 5 nL'dir. MikroMRG'de 21 teslaya kadar çıkabilen güçlü manyetik alanda süper iletkenlik için gereken soğutma sıvı helyum yerine kriyojen manyetik sistemler ile sağlanmaktadır (2). Manyetik alanın gücü arttıkça ve coil (bobin) boyutu azaldıkça SNR artmaktadır. Ayrıca işlem süresinin uzaması da görüntü kalitesinde iyileşme sağlamakla birlikte hareket artefaktlarına yol açabilmektedir ve bu durum da anestezi gerekliliğini beraberinde getirmektedir. Magnetin çapı 16-30 cm çapında olmakla birlikte RF ve gradyan bobinleri yerleştirildikten sonra kalan açıklık 5-15 cm civarındadır.

Manyetik mikro çevreyi değiştirerek daha yüksek hedef doku kontrastı sağlayan, MRG kontrast ajanları yani paramanyetik şelatörler de (gadolinium-T1, manganez-T2, süperoksit paramanyetik demir oksit-T2) kullanılmaktadır (2). Ayrıca analiz tekniklerinde de bazı modifikasyonlar yapılmış ve özel yöntemler geliştirilmiştir. Hemoglobin konsantrasyonunun ölçümü aracılığı ile kanın oksijenizasyonunu değerlendiren ve böylece beyindeki aktive alanları gösterebilen Fonksiyonel MRG, dokulardaki protonların hareketlerini tespit ederek doku difüzyon kapasitesini değerlendiren difüzyon MRG, dokulardaki kimyasallar ve metabolitlerin konsantrasyonlarının tespitine dayalı MRG spektroskopisi bu yöntemlerdendir (2,3). Böylece yüksek çözünürlükte dokuların içeriği, perfüzyonu, oksijenizasyonu ve metabolizması hakkında tek seansta radyasyon maruziyeti olmaksızın bilgi edinilebilmektedir. MicroMRG klinik öncesi kardiyolojik ve onkolojik araştırmaların önemli bir parçasıdır. Ayrıca tendon, kıkırdak, ligamentler gibi kas-iskelet sistemi dokularının değerlendirilmesinde de oldukça başarılıdır. Fakat gerçek zamanlı kan akımı çalışmaları için uygun değildir.

### Hibrid Sistemler

BT ve MRG'nin SPECT ve PET sistemlerine eklenmesi hem anatomik referans hem de atenüasyon düzeltme sağlar. Eş zamanlı veya sıralı veri toplama işlemleri gerçekleştirilir. Multi-pinhol kolimatörlerin ve yüksek çözünürlüklü dedektörlerin kullanılmasıyla moleküler düzeyde bilgi ve submilimetrik boyutta yüksek çözünürlük sağlayan SPECT ve PET sistemlerine anatomik bilgi veren BT ve MRG'nin eklenmesi ile ortaya çıkan PET/BT, PET/MRG, SPECT/BT ve SPECT/MRG sistemleri özellikle küçük boyutlu nesnelerin görüntülenmesinde avantaj sağlamaktadır. Bazı sistemlerde bir üçüncü modalite de PET/SPECT/BT bulunmaktadır. Açıklığın 17 cm olduğu bu sistemde alt sistemler ortak bir portalda birleştirilmiştir (5).

Sonzamanlarda popüler olmaya başlayan mikroSPECT/mikroMRG sistemlerinde MRG'nin mükemmel yumuşak doku kontrastı ile SPECT'in yüksek rezolüsyonunun bir araya getirilmesi ile daha uzun süreli gözlem imkanı ve onkolojik, immünolojik ve ilaç geliştirme çalışmalarında yeni birtakım yöntemler kullanılmasına imkan bulunmuştur. (6,39). Yüksek rezolüsyon avantajından faydalanabilmek amacıyla PET dedektörü eklenebilen, silikon PMT'lerin kullanıldığı SiPM-MRG/PET (hyperion-IID-a digital-SiPM-based MRG-compatible PET insert) sistemi de hem anatomik hem fonksiyonel bilginin daha

detaylı elde edilmesi amacıyla geliştirilen bir modalitedir (40).

Bu gelişmelere paralel olarak da araştırmalar, floresan veya radyonüklidlerle işaretli, lipid kaplı ajanlar gibi multisistem görüntüleme ajanları geliştirmeye odaklanmıştır (41).

**Finansal Destek:** Makalenin hazırlanmasında finansal destek alınmamıştır.

### Kaynaklar

1. Rowland DJ, Cherry SR. Small-animal preclinical nuclear medicine instrumentation and methodology. *Semin Nucl Med* 2008;38:209-222.
2. Lauber DT, Fülöp A, Kovács T, et al. State of the art in vivo imaging techniques for laboratory animals. *Lab Anim* 2017;51:465-478.
3. Fabian Kiessling, Bernd J. Pichler. Imaging Modalities and Probes. In: *Small Animal Imaging*. New York: Springer; 2011:119-293.
4. Franc BL, Acton PD, Mari C, et al. Small-animal SPECT and SPECT/CT: important tools for preclinical investigation. *J Nucl Med* 2008;49:1651-1663.
5. Sánchez F, Orero A, Soriano A, et al. ALBIRA: A small animal PET/SPECT/CT imaging system. *Med Phys* 2013;40:051906.
6. Goetz C, Breton E, Choquet P, et al. SPECT low-field MRI system for small-animal imaging. *J Nucl Med* 2008;49:88-93.
7. Imam SK. Molecular nuclear imaging: the radiopharmaceuticals (review). *Cancer Biother Radiopharm* 2005;20:163-172.
8. Ritman EL. Current status of developments and applications of micro-CT. *Annu Rev Biomed Eng*. 2011;13:531-52.
9. Carlson SK. Small animal absorbed radiation dose from serial micro-computed tomography imaging. *Mol Imaging Biol* 2007;9:78-82.
10. Esquinas PL, Rodríguez-Rodríguez C, Esposito TVF, et al. Dual SPECT imaging of <sup>111</sup>In and <sup>67</sup>Ga to simultaneously determine in vivo the pharmacokinetics of different radiopharmaceuticals: a quantitative tool in pre-clinical research. *Phys Med Biol* 2018;63:235029.
11. Peterson TE, Furenlid LR. SPECT detectors: the Anger Camera and beyond. *Phys Med Biol* 2011;56:145-182.
12. Golestani R, Wu C, Tio RA, et al. Small-animal SPECT and SPECT/CT: application in cardiovascular research. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010;37:1766-1777.
13. Cunha L, Horvath I, Ferreira S, et al. Preclinical Imaging: an Essential Ally in Modern Biosciences Lídia Cunha. *Mol Diagn Ther* 2014;18:153-173.
14. Difilippo FP. Design and performance of a multi-pinhole collimation device for small animal imaging with clinical SPECT and SPECT-CT scanners. *Phys Med Biol* 2008;53:4185-4201.

15. van der Have F, Vastenhouw B, Ramakers RM, et al. U-SPECT-II: An Ultra-High-Resolution Device for Molecular Small-Animal Imaging. *J Nucl Med*. 2009;50:599-605.
16. Kim H, Furenlid LR, Crawford M, et al. SemiSPECT: a small-animal single-photon emission computed tomography (SPECT) imager based on eight cadmium zinc telluride (CZT) detector arrays. *Med Phys* 2006;33:465-474.
17. S. Sajedi, N. Zeraatkar, V. Moji, et al. Design and development of a high resolution animal SPECT scanner dedicated for rat and mouse imaging *Nucl Instrum Methods Phys Res A* 2014;741:169-176.
18. Khalil MM, Tremoleda JL, Bayomy TB, et al. Molecular SPECT Imaging: An Overview. *Int J Mol Imaging* 2011:796025.
19. Fahey FH. PET instrumentation. *Radiol Clin North Am* 2001;39:919-929.
20. Cutler PD, Cherry SR, Hoffman EJ, et al. Design features and performance of a PET system for animal research. *J Nucl Med* 1992;33:595-604.
21. Schnockel U, Hermann S, Stegger L, et al. Small-animal PET: a promising, noninvasive tool in pre-clinical research. *Eur J Pharm Biopharm* 2010;74:50-54.
22. Tai YC, Laforest R. Instrumentation aspects of animal PET. *Annu Rev Biomed Eng* 2005;7:255-285
23. Yao R, Lecomte R, Crawford ES. Small-animal PET: what is it, and why do we need it? *J Nucl Med Technol* 2012;40:157-165.
24. Herschman HR. Micro-PET imaging and small animal models of disease. *Curr Opin Immunol*. 2003;15:378-384.
25. Vaska P1, Rubins DJ, Alexoff DL, et al. Quantitative imaging with the micro-PET small-animal PET tomograph. *Int Rev Neurobiol* 2006;73:191-218.
26. Myers R, Hume S. Small animal PET. *Eur Neuropsychopharmacol* 2002;12:545-555.
27. Delbeke D. Oncological applications of FDG PET imaging: Brain tumors, colorectal cancer, lymphoma, and melanoma. *J Nucl Med* 1999;40:591-603.
28. Vaska P, Rubins DJ, Alexoff DL, et al. Quantitative imaging with the micro-PET small-animal PET tomograph. *Int Rev Neurobiol* 2006;73:191-218.
29. Schoder H, Erdi YE, Chao K, et al. Clinical implications of different image reconstruction parameters of interpretation of whole-body PET studies in cancer patients. *J Nucl Med*. 2004;45:559-566.
30. Shalom RB, Valdivia AY, Blaufox MD. PET imaging in oncology. *Sem Nucl Med* 2000;30:150-185.
31. Clark DP1, Badea CT. Micro-CT of rodents: state-of-the-art and future perspectives. *Phys Med* 2014;30:619-634.
32. Hedgire SS, Baliyan V, Ghoshhajra BB, et al. Recent advances in cardiac computed tomography dose reduction strategies: a review of scientific evidence and technical developments. *J Med Imaging* 2017;4:031211.
33. Paulus MJ, Gleason SS, Kennel SJ, et al. High resolution X-ray computed tomography: an emerging tool for small animal cancer research. *Neoplasia* 2000;2:62-70.
34. Boerckel JD, Mason DE, McDermott AM, et al. Microcomputed tomography: approaches and applications in bioengineering. *Stem Cell Res Ther* 2014;5:144-149.
35. Geyer LL, Schoepf UJ, Meinel FG et al. State of the art: iterative CT reconstruction techniques. *Radiology* 2015;27:339-357.
36. Ritschl L1, Sawall S, Knaup M, et al. Iterative 4D cardiac micro-CT image reconstruction using an adaptive spatio-temporal sparsity prior. *Phys Med Biol* 2012;57:1517-1525.
37. Ren L1, Ghani MU, Wu D. The impact of spectral filtration on image quality in micro-CT system. *J Appl Clin Med Phys* 2016;17:301-315.
38. Louisa Bokacheva, Ellen Ackerstaff, H. Carl LeKaye, et al. High field small animal magnetic resonance oncology studies. *Phys Med Biol* 2014;59:65-127.
39. Hutton BF, Occhipinti M, Kuehne A, et al. Development of clinical simultaneous SPECT/MRI. *Br J Radiol* 2016;20160690.
40. Stortz G, Thiessen JD, Bishop D. Performance of a PET insert for high-resolution small-animal PET/MRI at 7 Tesla. *J Nucl Med* 2018;59:536-542.
41. Tartis MS, Kruse DE, Zheng H, Zhang H, Kheirloom A, Marik J, et al. Dynamic microPET imaging of ultrasound contrast agents and lipid delivery. *J Controlled Release* 2008;131:160-166.



# Meme Kanseri Modelleri

## Breast Cancer Models

● Funda Üstün

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

### Öz

Meme kanseri, kadınlarda kanser sıklığında birinci sırada yer alır. Meme kanseri hastalarının %11,5'i uzak evrede ve mortalite primer hastalıktan ziyade metastazlara bağlıdır. Deneysel meme kanseri tümör modelleri kanser patogenezi, neoplastik sürecin başlaması ve ilerleme sürecini incelemede geçerliliği kanıtlanmış yöntemlerdir. Meme kanseri araştırmaları için hayvan modellerinin geliştirilmesi son yüzyıldadır. Meme kanserinde kullanılan görüntüleme yöntemleri tümör lokalizasyonu, tümör kitlesinin kantifikasyonu, gen ve proteinlerin görüntülenmesi, tümör mikroçevresinin değerlendirilmesi, tümör hücre proliferasyon ve metabolizmasını değerlendirme ve tedavi yanıt değerlendirme amaçlarından herhangi biri için kullanılır. İnsan meme kanseri genetik ve fenotip açısından heterojen bir hastalık grubu olduğundan; tek bir modelin meme kanseri biyolojisinin tüm yönlerini yeterince ele alması mümkün değildir. Her bir modelin birbirine göre avantaj ve dezavantajlarının var olduğu düşünülerek, çalışmanın tezini doğrulamada amaca en uygun model seçilmelidir.

**Anahtar Kelimeler:** Meme kanseri, klinik öncesi görüntüleme, tümör modelleri

### Abstract

Breast cancer is the most common cancer in women. 11.5% of breast cancer patients are at distant stage and mortality is due to metastases rather than primary disease. Experimental breast cancer tumor models are validated methods to examine the pathogenesis of cancer, the onset of the neoplastic process, and progression. The development of animal models for breast cancer research has been conducted in the last century. Imaging methods in breast cancer are used for tumor localization, quantification of tumor mass, imaging of genes and proteins, evaluation of tumor microenvironment, evaluation of tumor cell proliferation and metabolism, and treatment response evaluation. Since human breast cancer is a heterogeneous group of diseases in terms of genetics and phenotype, it is not possible for a single model to adequately address all aspects of breast cancer biology. Considering that each model has advantages and disadvantages compared to each other, the most suitable model should be chosen in order to verify the thesis of the study.

**Keywords:** Breast cancer, preclinical imaging, tumor models

### Giriş

Meme kanseri, kadınlarda kanser sıklığında birinci sırada yer alır. Kanser tanısı alan her 4 kadından biri meme kanseridir. Ülkemizde meme kanseri tanısı alan kadınların %44,5'i 50-69 yaş ve %40,6'sı ise 25-49 yaş aralığında yer almaktadır (1). Meme kanseri hastalarının evreleri incelendiğinde; vakaların %11,5'i uzak evrede (1). Mortalite primer hastalıktan ziyade metastazlara bağlıdır ve günümüzde insidansı artmaktadır.

Meme kanserinin önlenmesi ve tedavisi ile ilgili zorlukları içeren çalışmalar olmakla birlikte, klinik

öncesi bu çalışmaları kliniğe uygulamak bazen zor olabilmektedir. Bu durum diğer kanser tiplerinden farklı olarak meme kanserinin kendi doğasından kaynaklanmaktadır. Meme kanseri farklı fenotip ve moleküler görüntü sergileyen heterojen bir hastalık grubudur. Meme kanseri reseptör sonucu ile [östrojen (ER) ve progesteron (PR) hormon reseptörleri, HER-2 (human epidermal growth factor receptor 2)] tedavi protokolü belirlenir. Luminal A; ER ve PR reseptörleri pozitif/sergileyen hastaları, Luminal B; ER ve PR reseptörleri pozitif/sergileyen ve Luminal A'ya göre yüksek histolojik derecede olan veya triple negatif (ER,

### Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Prof. Dr. Funda Üstün, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

**E-posta:** fund austun@trakya.edu.tr **ORCID ID:** orcid.org/0000-0002-3250-1032

©Telif Hakkı 2019 Türkiye Nükleer Tıp Derneği / Nükleer Tıp Seminerleri, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.

PR ve HER-2 negatif/sergilemeyen) grubu içerir. Bu alt gruplar beklenen yaşam, metastaz şekli ve tedavi yanıtını içeren hastalığın klinik davranışını öngörmemizi sağlar. Bu veriler çerçevesinde klinik öncesi çalışma için uygun model seçilmelidir.

DeneySEL meme kanseri tümör modelleri kanser patogenezi, neoplastik sürecin başlaması ve ilerleme sürecini incelemede işlevselliği kanıtlanmış yöntemlerdir. Kanser gelişimindeki risk faktörlerinin belirlenmesi, hastalığın metastazlarının gelişimi, genetik özelliklerini değerlendirmek ve daha iyi anlayabilmek için klinik öncesi, klinik ve ileri çalışmalar gereklidir. Bu çalışmalar sayesinde insanlardan direkt edinmeyeceğimiz bilgiler de sağlanabilir. Bu çalışmalar hastalığın başlangıcını ve ilerlemesini değerlendirmede kullanılmakta, çeşitli deneysel maddelerin ya da ilaçların antineoplastik aktivitesi ve toksisitesini anlamamızı sağlarlar. Bu çalışmalar *in vitro* çalışmalar ile *in vivo* insan çalışmaları arasında köprü kurarlar.

Kanser hakkındaki araştırmalarda özellikle ilaç araştırmalarında kullanılmak üzere 1970'lerde kanser hücre hatları geliştirilmiştir. Ancak zamanla bu hücre gruplarının heterojen özelliğinin kaybı, aynı hücre serileri olmasına rağmen genetik sunumlarının farklı olması ve yeni geliştirilen ilaçlarda %90'dan yüksek oranda yetersizlikle sonuçlanan klinik çalışmalarla yüksek oranda uyumsuz sonuçlar elde edilmesi gibi önemli dezavantajları içerirler (2).

Meme kanseri araştırmaları için hayvan modellerinin geliştirilmesi son yüzyıldadır. İlk olarak spontane meme tümörlerinin biyolojik ve karakteristik özelliklerini içeren seçilmiş fare tümör modelleri geliştirilmiştir. Bunu kimyasal karsinogenez maruziyetine bağlı gelişen sıçan meme tümör modelleri takip etmiştir. Bu modeller genetik, viral ve çevresel faktörleri içeren meme kanser etiyolojisinin araştırılmasında, hormonal ve immünolojik faktörlere bağlı hastalık progresyonu hakkında bilgi edinilmesinde ve hastalığı önleme ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde kullanılmıştır. 1960 yıllarına gelindiğinde immün yetersiz farelerin gelişimi insan meme kanserinde ksenograft modellere kapı açmıştır. Günümüzde "transgenic" ve "knockout" teknolojiler ile meme kanseri modellerindeki gelişmeler; özel genetik değişimli fare modellerine olanak sağlamıştır (3).

Küçük deney hayvanı ile elde edilen çalışmalar noninvaziv bir şekilde biyolojik verilerin eldesi ve *in vivo* fonksiyonel değerlendirmeyi normal ve tümör dokusu bazında sayısal veriler ile sağlar. Noninvaziv özelliği nedeniyle longitudinal çalışmalara izin verir. Böylece hastalığın doğal gelişim süreci, ilerlemesi ve

tedavi etkinliği takip edilir. Deney hayvanlarının her biri biyolojik olarak diğerinden farklı olduğu için, her biri kendi açısından kontrol grubu olarak kabul edilebilir. Bu nedenle çalışılan hayvan sayısı en alt sayıda tutulabilir.

Klinik öncesi farelerde meme kanser modelinin avantaj ve dezavantajları şöyle sıralanabilir (4):

#### **Avantajları;**

- Deney hayvanları (fare ve sıçan) küçük boyutlu oldukları için saklama alanı ve maliyet daha düşüktür.
- Bu küçük boyut nedeniyle kolay manipülasyon yapılır.
- Hızlı çoğalırlar ve büyürler, koloni takibi ve nispeten uzun olan (~3 yıl) yaşam süresi boyunca takibi yapılır.
- Farenin genetik tam dizisi ve karakterizasyonu mümkündür, genomun manipülasyonu nispeten kolaydır.
- Fare ve diğer kemirgenlerin fizyolojisi insanlara çok benzer, dolayısıyla ilaç metabolizması, farmakokinetiği ve toksisite çalışmalarında yaygın şekilde kullanılırlar.

#### **Dezavantajları;**

- Boyutları küçük olması görüntüleme çalışmalarında özellikle tümör boyutu sistem rezolüsyonunun altında olduğunda, kısıtlılığa neden olur.
- Fareler insanlara göre çok daha hızlı metabolik hız sergilerler, kullanılan ilaç ve moleküllerde bu durum göz önüne alınmalıdır.
- İnbred fare suşlarında değiştirilmiş telomer uzunluğu mevcuttur.
- Kanser başlangıcı, doğal oluşan sürece göre zaman dilimi daha farklıdır.

İnsan meme kanseri genetik ve fenotip açısından heterojen bir hastalık grubu olduğundan; geliştirilen bu modeller insan meme kanserinin gelişimi, ilerlemesi ve hastalığın davranışının sadece küçük bir bölümünü yansıtabilir. Örneğin; kimyasal karsinogenler ile gelişen modeller insan kanser etiyolojisini taklit etmez iken, transgenic modellerde (deney hayvanına yerleştirilen ve başarılı bir şekilde döllere geçirilebilen klonlanmış gen içeren modeller olup; hastalığa hormonların etkisi ve kemoteropötiklerin yanıtını değerlendirerek hastalık patogenezi incelmeye olanak tanıyan modellerdir) de hastalığın doğal gelişim süreci ortadan kalkar. Bu modeller gen değişimlerinin kanser gelişimini nasıl etkileyebileceğini göstermelerine rağmen, bir kadının geçtiği uzun klinik öncesi dönemde ortaya çıkan 'normal' olgunlaşma, endokrinolojik değişim ve çevresel maruziyet koşulları altında bunun nasıl oluştuğunu yansıtmaz.

İdeal meme kanser tümör modelin özellikleri şöyle sıralanabilir (3):

- İnsan meme tümöründeki heterojenite ve histopatolojik spektrumu yansıtmalıdır.
- Meme tümörünün doğal gelişim sürecini yansıtmalıdır.
- Hüresel ve moleküler düzeydeki süreci taklit etmelidir.
- Tüm bunları kabul edilebilir seviyede deneysel olarak kolay ve en ucuz maliyetle başarmalıdır.

Klinik öncesi bir çalışmada en kritik nokta hangi modelin insan hastalığını-bu konuda olduğu gibi meme kanserini en doğru şekilde yansıttığıdır. Modelin seçimi araştırmanın amacına uygun olmalıdır. Ancak bu her zaman beklentiyi tam karşılayamayabilir. Her bir modelin güçlü ya da zayıf yanları vardır. Araştırmacının maliyeti, mevcut koşullar, zaman kısıtlamaları ve/veya deneyim/uzmanlık/tercih, sorunun modele değil modele uygulandığı alt-modelin seçimine yol açabilir.

## Klinik Öncesi Kanser Çalışmalarında Kullanılan Modeller

Klinik öncesi çalışmalarda kullanılan tümör modelleri dört ana grupta sınıflanabilir (5):

### 1. Spontane ve Çevresel Karsinogenez Modelleri

Bu modeller ultraviyole, kimyasal, onkogen ve viral enfeksiyon ile oluşturulurlar.

Kadın meme dokusu radyasyona çok hassastır. X-ışını (0,2 Gy ile) ya da nötronlar (lineer doz etkisi ile) ile meme dokusuna subletal dozda uygulama ile genelde bir yıl içinde meme tümörü geliştiği gösterilmiştir (6). Sıçanlarda bu konuda yapılmış çalışmalar vardır. Fraksiyone ya da tek doz olarak uygulanabilir. Hormon durumu (ooferektomi olması koruyucu faktör ya da ER kullanımı tümör gelişimini arttırıcı) bu grupta tümör gelişimine etkili olduğu unutulmamalıdır.

### 2. Transplantasyon Modelleri

**a. Ksenojenik modeller:** Farklı tür ve farklı genetik içeren canlılar arasında geliştirilen modeller olup; insan kanser hücre veya dokusunun deney hayvanlarına nakli ile oluşturulurlar. Ksenograftlar; insan kökenlidir, ancak transformedir. Dolayısıyla hastalığın başlangıcını değerlendirmede kullanılamazlar.

İnsan kanser hücrelerinden faydalanılarak üretilen ksenograft modeller en basit ve en sık kullanılan modellerdir (4). Özellikle klinik öncesi ilaç çalışmaları, immün sistemi baskılı farelerin subkütan sırtına ekilen bu modellerde çalışılır. Avantajları; teknik olarak kolay, tüm moleküler alt tipleri yansıtabilen yapıda, tam

olmasa bile insan tümörlerinin ortamını da yansıtabilen yapıda, hızlı tümör gelişimi sergileyen tümörlerdir (4). Dezavantajları; immün sistemi baskılanmış fare gerektirir, dolayısıyla kanser gelişiminde ve tedavi yanıtında önemli yeri olan immün sistemin varlığı göz ardı edilir. Subkütan uygulandığı için organa özel tümör çevresi yetersizdir. İnsan tümör hücresi ve farenin stroması arasındaki tür uyumsuzluğu olabilir. Klinik olgularda tümörde heterojenite olmasına rağmen bu grupta aşırı bir homojen tümör mevcuttur (4). Bu tümör modeline örnek Ehrlich asit tümör modelidir (7,8).

İnsan hücre hattından üretilen bu tümörlerin dezavantajlarını ortadan kaldırmak için hasta derive tümör modelleri geliştirilmiştir. Bu modelde ksenograftlar; primer olarak insandan cerrahi olarak çıkarılan tümör dokusu parçalara ayrılır, immün sistemi baskılanmış fareye implante edilir. Diğer bir yöntemde ise enjeksiyon için gerekli hücre süspansiyonu, periton ya da plevral sıvıdan elde edilir. Bu uygulama tümör ve konakçı doku arasındaki immünolojik, endokrin ve tümör-stromayı da içeren çeşitli önemli etkileşimlerin incelenmesine olanak sağlar. Konakçının mikroçevresi tümör gen sunumu ve mikrovasküler fonksiyonlarının önemli bir belirleyicisidir. Böylece ortotopik meme tümörleri klinik olarak değerli bilgiler sağlarlar. Elde edilen ksenograftın devamlılığı için her iki grup da kullanılır. Deneysel çalışmalar için erken pasaj tümörlerinin bir canlı banka örneğini oluşturmak için birinci ya da ikinci pasaj sonrası erken pasaj tümörlerini dondurmak büyük önem taşır. Günümüzde bu modelin başarısını arttırmak için ortotopik implantasyon, ER replasmanı, immün sistemi baskılı fare kullanımı, ortama matrigel/mezenkimal kök hücre ilavesi gibi çalışmalar yapılmaktadır (2). Eski uygulamalarda meme tümörleri sıklıkla deri altından implante edilmiştir, ancak inguinal meme yağ yastığına ortotopik implantasyon optimaldir, çünkü bu uygulama meme tümörü stromal mikroçevresi ortamını daha uygun oranda sağlamaktadır. Ayrıca ortotopik tümörlerin vaskülarizasyonu subkütan olanlara göre belirgin oranda yüksektir.

İnsan derive meme ksenograftlar primer malignitenin gen ve moleküler özelliklerini sergiler. Bu tümör modeli klonal evrim ve metastazı sorgulamak, tedavi çalışmaları, ilaç rezistansını değerlendirme ve meme kanseri kök hücre karakterizasyonunu belirleme çalışmalarında kullanılır. En güçlü özelliği insan meme tümörünü daha doğru bir şekilde yansıtabildiği için genetik çeşitlilik ve heterojeniteye sahip olmasıdır (4). Diğer avantajları; çeşitli kanser alt tiplerini içerir, tümörün nakledildiği doku ile kanlanması ve enflamasyon sürecini de içermesi ve metastaz modelini



sağlaması, karşılaştırmalı çalışmalarda tümörün kolay sorgulanmasına izin verir. Özellikle ilaç çalışmaları için ideal yöntemdir. Dezavantajları ise; immün sistemi baskılı hayvan gerektirir. Tümör implantasyonu cerrahi prosedür gerektirir; invazivdir ve beceri gerektirir. Türler arasındaki farklar mevcuttur. Tümör modelinin gelişimi zaman gerektirir. Alt yapı, personel ve maliyet de önemli faktörlerdir (4). Birkaç pasaj boyunca aynı özellikler devam eder, ancak pasaj, daha yüksek proliferatif indeks ile daha agresif bir tipin ortaya çıkmasına yol açabilir (2).

Bu grupta yer alan diğer bir model de ksenograftların metastatik grubudur. Tanı anında meme kanserli hastaların yaklaşık %5'i metastatiktir. Meme kanseri en sık kemik (%65, tek ya da multipl) olmak üzere, akciğer (%30), karaciğer (%26), ve beyin (%8) (özellikle triple negatif ve HER-2 pozitif grubunda) metastazı yapar (9). Çoklu organ metastazı sıklıkla kemik ve akciğer kombinasyonu olmak üzere %30'dan fazla olguda karşılaşırlar ve kötü prognoz göstergesidir (9).

Tümör büyümesi ve metastaz çalışmaları için immün yetersiz, genelde atimik ya da nude fare kullanılır (10). Bunlar tam olarak insanlardaki metastazı yansıtmazlar. Hem sıçan hem de farelerde pek çok metastatik model mevcuttur. Genel olarak, bu modeller, biri yüksek metastatik olan ve diğeri olmayan eşleştirilmiş alt popülasyonlardan oluşur, fakat metastatik olmayan varyantların metastatik başarısızlık mekanizmaları belirsizdir. Metastatik süreç, uzak metastazlar kurulmadan önce kanser hücreleri tarafından gerçekleştirilmesi gereken bir dizi adımdır (invazyon, intravazasyon, transport, arrest, ekstrasvazasyon ve büyüme) (3). Metastatik süreç hücrelerin doku invazyon yeteneği, dolaşımında yaşam süresi, ekstrasvazasyonu ve sekonder organ parankimi içinde tutunabilme özelliklerini içermesi ile mümkündür (11). Bu süreçte metastatik tümör hücreleri ile konakçı arasında pek çok etkileşim meydana gelir. Deneysel çalışmalar bu etkileşimleri tespit etmekte ve metastaz önleyici tedavinin bu süreçteki etkilerini gözlemlemede kullanılabilir. Bu modeller metastatik sürecin farklı basamaklarını modellemek için geliştirilmiştir. Bu metastazlar akciğer ve lenf nodu, az kısmı da kemik, beyin ve karaciğerdir (11).

Deneysel metastaz modellerinde tümör hücreleri direkt sistemik dolaşıma uygulanır. Uygulanan damar lokalizasyonuna göre metastaz gelişir. Örneğin; farede kuyruk venine enjeksiyon akciğer, dalak içi veya portal vene uygulama karaciğer, direkt veya karotis içine enjeksiyon ile beyin, tibia veya femura direkt enjeksiyonu ile kemik metastazı ve intrakardiyak uygulama (daha yaygın kullanılan ve hızla sonuçlanan) kemik ve kemik

iliği metastazına yol açar (10,12). Avantajları; hızlı gelişir ve metastazın biyolojisi bilinir. Uygulanan hücre sayısı bilinir. Metastaz için direkt uygulamalar ektravaze kanser hücrelerinin kemikte yerleşiminin final evresini gösterir, metastazın erken dönemleri, ilk evreleri hakkında bilgi vermez.

Kemik metastazlarının gelişimi için uygulanan bu yöntemlerin sınırlamaları; graft rejeksiyonundan kaçınmak için immün sistemi baskılı hayvan gereklidir. Humanized mice tercih edilmelidir. İnsan ksenograft ile kemik metastazı modellerinde insan fetal ya da erişkin kemik parçaları immün sistemi baskılı farenin böğürüne implante edilir. Deney hayvanı ile dokuların ilk etkileşimine izin verir. Ancak malign doku bulunması, verici ilişkili değişkenler, fonksiyonel ve canlı doku varlığını sağlayabilme gibi koşullara dikkat edilmelidir. Bu nedenle dezavantajları olmasına rağmen implant geliştirme çabaları mevcuttur.

**b. Singenik modeller:** Aynı tür ve aynı genetiği içeren canlılar arasında uygulanır. İnsandan immün sistemi baskılı farelere yani farklı türe nakil uygulamasının dezavantajlarını ortadan kaldırmak amacıyla geliştirilmiş modellerdir. Sağlam immün sistem ve aynı türde çalışılmasının avantajlarını içerir. Avantajları; nakledilen doku, tümör mikroçevre, ve alıcı aynı türdür. Bu durum özellikle tümör ve alıcı doku arasındaki yakın etkileşimin değerlendirileceği durumlarda önem taşır. Ancak deney hayvanının genetik yapısı insanlardan farklıdır. Ayrıca türler arası farklılıklardan dolayı, insanlardaki mutasyonlardan farklılıklar sergileyebilirler (12). Fare tümör hücre hatları sınırlı sayıdadır, küçük moleküllü terapiler bu modellerde yeterince değerlendirilebilmesine rağmen, antikor görüntüleme ajanlarının ve terapilerinin tür spesifitesi singenik model sistemlerinde değerlendirmelerini engellemektedir (4).

### 3. Kimyasal Maddelerle Oluşan Kanser Modelleri-Ksenobiyotikler

Örneğin; 12-dimethylbenz(a)-anthracene (DMBA) ya da N-methylnitrosourea ile oluşturulabilen modellerdir. Kimyasallara bağlı karsinogen sürecini değerlendirme ve sürecin takibinde faydalıdır. Hangi kimyasalın seçim yapılacağı önem taşır. Tümör histolojisi, tümör hücre sayısı, latent dönem uygulanan kimyasal maddenin dozundan etkilenir (6). Ayrıca çalışılan hayvanın yaşı, diyetindeki yağ içeriği, hayvanın endokrin durumu (örneğin; ooferektomi halindeki hormon düzeylerindeki değişim), hormon düzeylerine etkili ilaçların kullanımı ve genetik faktörler kimyasal karsinogenez gelişiminde ilave etkili maddeler olup; mutlak göz önünde bulundurulmalıdır



Nükleer tıpta kullanılan yöntemler tümör derinliğinden önemsiz derecede etkilenir; çünkü gama ışınlar faredede minimal absorbe olur. Ancak optik görüntüleme daha az hassastır.

Subkütan tümör değerlendirilmede kolay, güvenilir, noninvaziv ve radyasyon içermeyen bir yöntem olan USG'de kullanılabilir. USG ayrıca derin yerleşimli tümör boyutu takibinde MRG ve BT'ye göre tercih edilebilir. BT'nin yüksek uzaysal rezolüsyonuna rağmen doku kontrastı düşüktür. Subkütan ve ortotopik tümörleri göstermesi zordur. Kontrast kullanımı gerektirir. Ancak kontrast maddeler küçük deney hayvanında tümör modelinde yeterince birikecek kadar dolaşmayabilir. Bu nedenle yüksek volüm uygulamak gerektirir, ancak bu da hayvan tarafından tolere edilemeyebilir. BT özellikle akciğer ve kemikteki tümörleri değerlendirmede kullanılır.

Çalışma planlanırken deney hayvanında X-ışınına bağlı maruziyeti mutlaka göz önüne alınmalıdır. Bu durum özellikle boylamsal çalışmalarda, tümör boyutuna ve deney hayvanının sağlık durumuna olası etkileri nedeniyle unutulmamalıdır.

MRG; tümör evreleme ve gözlemede ideal yöntemdir. Tümör lokalizasyonu, büyüklüğü ve metastaz varlığını değerlendirmede kullanılır. Yüksek rezolüsyona sahip, iyonizan radyasyon kullanmaksızın yüksek yumuşak doku kontrastı veren yöntemdir. Kullanılan kontrast ajanlar ile işaretli hücrelerin görüntülenmesini sağlar.

- Gen ve proteinlerin görüntülenmesi

Gen görüntüleme optik görüntüleme, MRG, USG ve BT'nin yeri yoktur. Deney hayvanları ile gen görüntüleme PET ile tespit edebilmek için yaklaşık 100,000-1 milyon hücre gereklidir. Nükleer tıp yöntemleri doku derinliğinden bağımsız olarak üç boyutlu ve kantitatif sonuçlar verir. Ancak kullanılan çoğu radyofarmasötik yarı ömrü kısadır ve pahalıdır. PET görüntüleme antikör işaretlemeye I-124 (yarı ömür: 4,18 gün) ve zirkonyum-89 (3,27 gün), Cu-64 (0,53 gün) ve F-18 (110 dk) radyoizotopları kullanılmaktadır. HER-2'de işaretlenerek başarılı bir şekilde görüntülenebilmektedir. F-18 fluoroestradiol ER reseptör alfaya bağlanarak noninvaziv bir şekilde PET ile görüntülemeyi sağlar.

Klinik öncesi çalışmalarda reseptör görüntüleme ne kadar madde gönderildiği bilinmelidir. İşaretlenmemiş kimyasal kısmın miktarı önemlidir, çünkü bu bölüm reseptörleri bloke eder. Bu da görüntü kontrast ve lezyon tespitini kısıtlar, ve kantitatif verilerde hatalara

neden olur. Bu nedenle spesifik aktivite (enjekte edilen radyoaktiviteye göre radyoaktivite miktarı/mol) bilinmesi önemlidir. Özellikle yarı ömrü kısa olan radyoizotoplarda spesifik aktivitenin hızla azaldığı unutulmamalıdır.

- Tümör mikroçevre değerlendirme: Kanser hücrelerinin büyüme hızı, invazyon yeteneği ve metastaz yapabilirliğini etkileyen önemli bir faktör tümör çevresidir. Bunun noninvaziv şekilde değerlendirilmesi önem taşımaktadır. Bunu değerlendiren parametreler perfüzyon, vasküler permeabilite, oksijen basıncı ve pH'tır.

Intravasküler boyanmayı kullanarak fraksiyonel vasküler volüm optik görüntüleme yöntemi olan floresan tomografi ile değerlendirilir.

USG, tümör kanlanması gösteren değerli bir yöntemdir. Bu amaçla Doppler'den faydalanılır.

Tümördeki fonksiyonel vasküler parametreler dinamik kontrast BT ile değerlendirilebilir.

MRG tümör mikroçevresini pek çok parametre ile değerlendirir.

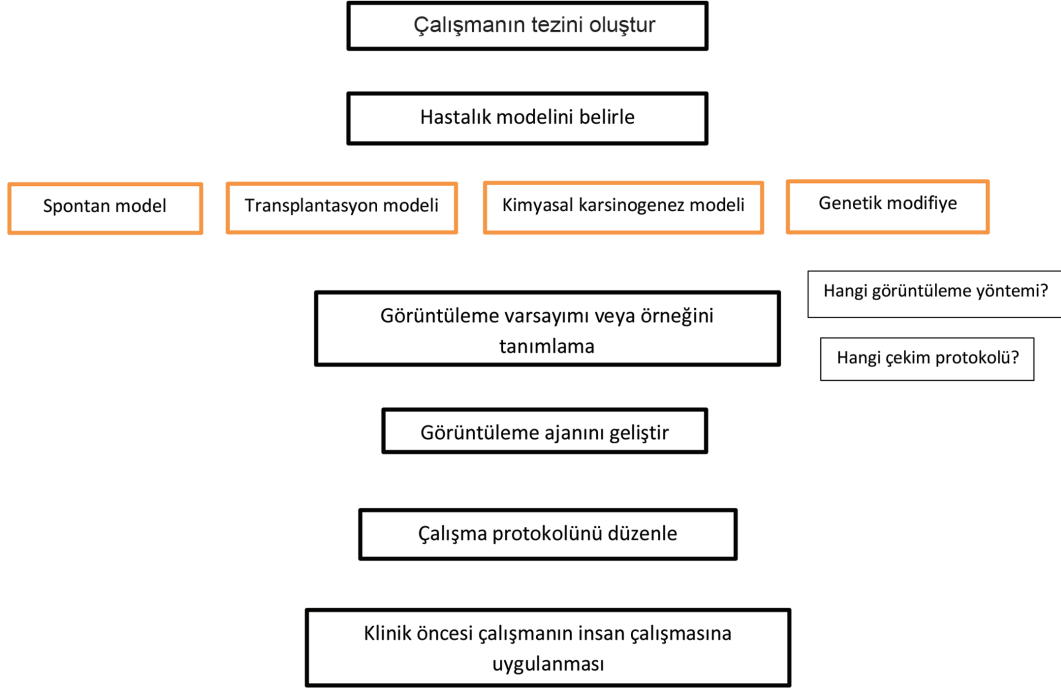
PET ile tümör hipoksisini değerlendiren pek çok radyofarmasötik vardır.

- Tümör hücre proliferasyon ve metabolizmasını değerlendirme: Optik görüntüleme, MRG spektroskopisi ve nükleer tıp yöntemleri ile yapılır. Radyoaktif madde ile işaretli timidin hücre proliferasyonunun gösterilmesini sağlayan nükleer tıp yöntemidir.
- Tedavi yanıtının takibi: PET görüntülemenin temel kullanımı tümör ilerlemesinin takibi ve tedavi yanıtı değerlendirilmedir.

### **Klinik Öncesi Meme Kanseri Modelinde Hangi Yöntem Tercih Edilir, Uygun Yöntem Nasıl Seçilir?**

Meme kanseri modeli ile bir çalışma planladığınızda göz önünde bulundurmanız gereken aşamalar Grafik 1'de sunulmuştur.

Meme kanseri ile ilgili bir çalışma planlandığında hangi konuda hipotez ortaya koydu iseniz, bunu destekleyecek biyokimyasal parametreleri, bunlarda ortaya çıkacak değişiklikler belirlenir. Bu amaçla görüntüleme yöntemi, elde edilecek parametreler belirlenir. Bu belirlemede mutlak cihazların teknik performansları göz önünde tutulmalıdır. Elde edilen biyokimyasal ve görüntüleme parametreleri arasındaki ilişkiler değerlendirilir. Bu verilerin kullanılabilirliği gözden geçirilir. Gerekli istatistiksel analizler yapılır.



**Grafik 1.** Meme kanserinde klinik öncesi çalışmalarda planlama diyagramı

Görüntüleme protokolünü oluşturmak için tümör tipi, tümörün lokalizasyonu, çalışmada kullanılması planlanan ilacın farmakokinetiği, çalışmanın zamanı gibi faktörler ile kullanılan türdeki tümör büyüme hızı, türler arası enzim farklılıkları, yarışan substratların düzeyi gibi çalışılan hayvan ile ilgili faktörler de mutlak düşünülmelidir. Bu sıralanan faktörlere bağlı olarak bu çalışmaları insan çalışmalarına dönüştürürken de dikkatli olunmalıdır.

Klinik öncesi çalışmalarda deney hayvanında yapılan çalışmalarda noninvaziv farklı görüntüleme yöntemleri vardır. Her bir yöntemin birbirine göre güçlü yanları ile sınırlamaları mevcuttur. Hangi yöntemin seçileceği şu faktörlere bağlıdır:

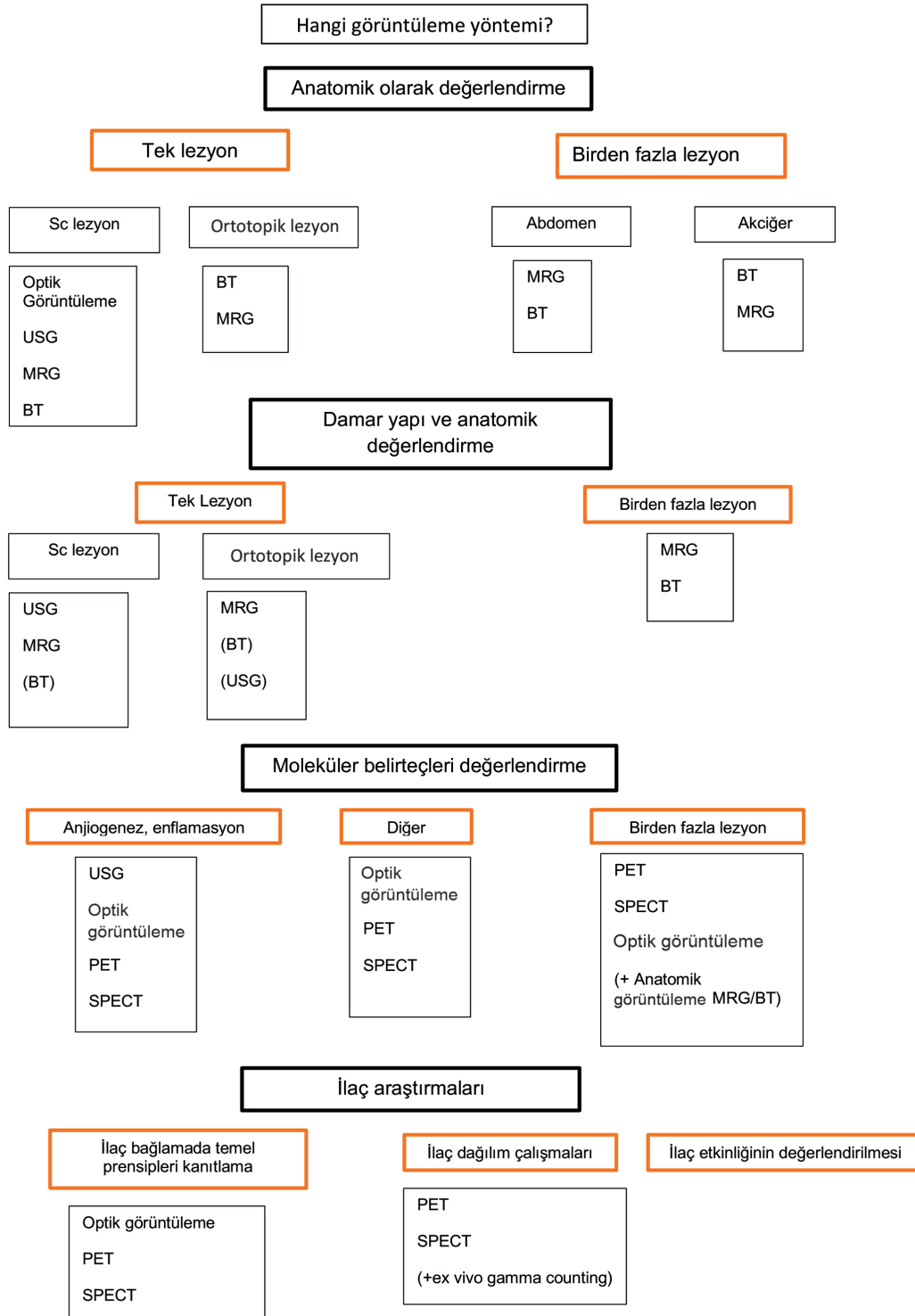
- Çalışma yürütücülerinin deneyimi,
- Mevcut koşullar, cihazlar (çalışma protokolüne göre temelde değerlendirilecek parametreye en uygun olan),
- Maliyet,
- Çalışmada kullanılan hayvan başına görüntüleme süresi,
- Hangi parametrenin değerlendirileceği (örneğin; lezyon boyutunu tespit ya da tümör dokusunun kanlanması gibi).

Grafik 2’de hangi amaca ulaşmak isteniyor ise hangi görüntüleme yönteminin öncelikle tercih edileceği gösterilmektedir.

USG; maliyeti düşük, kısa sürede sonuç veren ve laboratuvar koşullarında dahi uygulanabilen yöntemdir. Ancak kullanıcının performansına bağlıdır. Tüm vücut görüntüleme, gerekirse yapılabile bile, olanak tanımaz.

BT, MRG anatomik görüntüleme sağlar ve tüm vücut görüntülemeye olanak verirler. Görüntü alanı geniş olduğundan aynı anda birden fazla hayvanın görüntülenmesine olanak sağlar. Parsiyel volüm etkisi küçük boyutlu tümörlerde MRG, BT ve SPECT’te sorun oluşturabilir. Görüntüleme parametreleri buna göre ayarlanmalıdır. Akciğer hariç vücudun diğer alanlarındaki küçük tümörlerde MRG tercih edilmelidir. Metabolizma değerlendirmede MRG spektroskopisi, damar morfolojisi ve doku perfüzyonu özel anjiyografi yöntemleri ve hücre dansitesi difüzyon ağırlıklı MRG ile değerlendirilir.

Moleküler görüntüleme ise noninvaziv bir şekilde hücresel ve fizyolojik süreçlerin gözlemlenmesini ve kantifiye edilmesini sağlar. Tümörde tedaviden sonra saatler-günler içinde değişiklikler meydana gelir. Bu değişiklikler anatomik değişikliklerden öncedir.



**Grafik 2.** Hangi tümör modelinde hangi görüntüleme yönteminin tercih edileceği sunulmuştur (15)

USG: Ultrasonografi, MRG: Manyetik rezonans görüntüleme, BT: Bilgisayarlı tomografi, PET: Pozitron emisyon tomografi, SPECT: Tek foton emisyon bilgisayarlı tomografi

Dolayısıyla tedavi etkinliğini değerlendirmede moleküler görüntüleme yöntemleri tercih edilmelidir.

Optik görüntüleme uygulama yolu (IV/IP) ve enjeksiyondan sonra geçen süreye bağlı olarak tümör dokusundaki floresan tutulum miktarını değerlendiren yöntemdir. Uygulanan floresan miktarı da ölçülen sinyal düzeyine etki eder. Bu nedenle dozu belirlemek ve görüntüleme zamanını belirlemek için ön çalışma gereklidir. Hayvanın pozisyonlaması da sinyal kaybını en az düzeye indirmek için göz önüne alınmalıdır.

Nükleer tıpta kullanılacak görüntüleme protokolü çalışılan hayvanın modeli ve kullanılan radyofarmasötiğe bağlıdır. Nükleer tıpta kullanılan maddelerin hayvanın vücudundaki dağılımı, tümör dokusunda tutulumu anestezi ve hayvan hazırlığından etkilenebilir. Örneğin; ketamin/xylazin farede belirgin hiperglisemiye neden olur. Bu durum örneğin florodeoksiglukoz (FDG) dağılımına etki eder. Bu nedenle FDG enjeksiyondan önce 30 dk boyunca hayvan kontrollü ısı ortamında tutulmalıdır. Ayrıca anestezi yapılmadan FDG uygulandığında iskelet kas tutulumu artar. Gecelik açlık FDG'nin tümörde tutulumunu arttırır, ve özellikle yinelenen çekim yapılacak farelerde önemli oranda kilo kaybına neden olur. FDG kuyruk veninden uygulanabilir. Ancak IP uygulamada da hızla absorbe olur.

Nükleer tıp görüntülemeleri statik ve dinamik olarak yapılır.

Statik görüntüleme; görüntülemenin bir anı esnasındaki radyoaktivitenin dağılımını sunar. Görüntülemenin bu anı tümör dokusunda en üst ve plato düzeyindeki tutulum ile çevre dokularda en az düzeyde tutulumun olduğu zamandır. Eğer kullanılan radyoaktif maddenin tümör dokusunda tutulumu görüntüleme zamanında plato yapmaz ise çalışılan hayvanlar arasında ölçülen tutulum değerleri arasında farklılık oluşmaması için her bir hayvanın görüntülemeleri aynı zamanda yapılmalıdır.

Dinamik görüntüleme; radyoaktivitenin enjeksiyonundan hemen sonra başlayarak 1-2 saat süresince (çalışmanın özelliğine göre) ardışık görüntüler elde edilmesi temeline dayanır. Zaman içinde maddenin tümör dokusunda tutulan miktarını, dolaşımdan temizlenme sürecini ölçer. Bu veriler kullanılarak kompartman modeli ya da diğer kinetik modeller ile tümör tutulum değerleri hesaplanır. Tutulum değerlerinin aksine tutulum oranı zamana bağlı değildir. Dinamik görüntüleme statik görüntülemeye göre zaman alıcıdır. Örneğin; F-18 FDG ile farede statik görüntüleme 5-10 dk

olup; dinamik görüntüleme 40-60 dk gerektirir. Bu uzun süreye bağlı olarak dinamik görüntüleme hayvan için daha çok strese neden olur. Ayrıca dinamik görüntüleme deneyim ve matematik bilgisi gerektirir.

## Sonuç

1984'ten beri, meme kanserinde genetik patolojileri değerlendirmede klinik öncesi 100'den fazla model geliştirilmiştir.

Klinik öncesi çalışmalarda onkolojide hastalıkların gelişimi, evrelemesi ve tedaviye yanıtı değerlendirmede görüntüleme yöntemleri kapsamlı olarak kullanılmaktadır. Metastazların nasıl meydana geldiği, progresyonu, tümör dokusunun mikroçevresi (kanlanması, vasküler geçirgenliği) gibi faktörler değerlendirilebilir ve bu sayede yeni tanıl ve tedavideki ajanlar geliştirilebilir. Biyodistribüsyon çalışmaları sayesinde daha az deney hayvanı kullanımı sağlanmaktadır. En kritik konu, genellikle kullanılan modelin insan hastalığını doğru bir şekilde yansıtmayı yansıtmadığıdır. Her bir modelin birbirine göre avantaj ve dezavantajlarının var olduğu düşünülerek, çalışmanın tezini doğrulamada amaca en uygun model seçilmelidir. Meme kanseri yapısı gereği birbirinden farklı özellikler sergilediği için, tek bir modelin meme kanseri biyolojisinin tüm yönlerini yeterince ele alması tamamen mümkün değildir. Bununla birlikte, belirli bir biyolojik özellik için, en uygun olan bir model mevcuttur. Tek bir modelin kullanılmasının uygun olup olmadığı, sorunun niteliğine, modelin (ler) uygunluğuna ve özelliklerine ve araştırmacının arayışına bağlı olacaktır.

**Finansal Destek:** Bu makalenin hazırlanmasında finansal destek alınmamıştır.

## Kaynaklar

1. Kara F, İlter E, Keskinçilic B. Türkiye kanser istatistikleri 2015. Ankara: Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Sağlık Bakanlığı; 2018.
2. Whittle JR, Lewis MT, Lindeman GJ, Visvader JE. Patient-derived xenograft models of breast cancer and their predictive power. *Breast Cancer Res* 2015;17:17.
3. Heppner GH, Miller FR, Shekhar PM. Nontransgenic models of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2000;2:331-334.
4. Manning HC, Buck JR, Cook RS. Mouse models of breast cancer: platforms for discovering precision imaging diagnostics and future cancer medicine. *J Nucl Med* 2016;57:60-68.
5. Clarke R. Animal models of breast cancer: their diversity and role in biomedical research. *Breast Cancer Res Treat* 1996;39:1-6.

6. Russo J, Russo IH. Experimentally induced mammary tumors in rats. *Breast Cancer Res Treat* 1996;39:7-20.
7. Ustun F, Durmus-Altun G, Altaner S, Tuncbilek N, Uzal C, Berkarda S. Evaluation of morphine effect on tumour angiogenesis in mouse breast tumour model, EATC. *Med Oncol* 2011;28:1264-1272.
8. Ustun F, Durmus-Altun G, Cukur Z, Altaner S, Berkarda S. Glucose-induced alteration of accumulation of organotechnetium complexes accumulation in Pgp-negative tumor-bearing mice. *Cancer Biother Radiopharm* 2009;24:333-338.
9. Chen MT, Sun HF, Zhao Y, et al. Comparison of patterns and prognosis among distant metastatic breast cancer patients by age groups: a SEER population-based analysis. *Sci Rep* 2017;7:9254.
10. Price JE. Metastasis from human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 1996;39:93-102.
11. Sierra A. Animal models of breast cancer for the study of pathogenesis and therapeutic insights. *Clin Transl Oncol* 2009;11:721-727.
12. Khanna C, Hunter K. Modeling metastasis in vivo. *Carcinogenesis* 2005;26:513-523.
13. Kiessling F, Pichler BJ. *Small Animal Imaging Basics and Practical Guide*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2011. p. 543-564.
14. Zanzonico P. Noninvasive Imaging for Supporting Basic Research. In: Kiessling F, Pichler BJ, editors. *Small Animal Imaging Basics and Practical Guide*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2011. p. 3-16.
15. Kiessling F, Pichler BJ, Hauff P. How to Choose the Right Imaging Modality. In: Kiessling F, Pichler BJ, editors. *Small Animal Imaging Basics and Practical Guide*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2011. p. 119-124.



# Akciğer Kanseri Deneysel Modelleri

## Experimental Animal Models for Lung Cancer

© Cengiz Üstüner<sup>1</sup>, © Emre Entok<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye

<sup>2</sup>Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye

### Öz

Akciğer kanseri, en sık ölüme sebep olan kanser türüdür. Hem küçük hücreli dışı akciğer kanseri hem de küçük hücreli akciğer kanseri biyolojisinin incelenmesi ve yeni terapötik stratejilerin karakterize edilmesi için klinik olarak daha uygun sistemlere ihtiyaç vardır. Bu amaçla, hayvan modelleri hem insan akciğer tümörlerinde bulunan genetik değişiklikleri hem de histolojik özelliklerini taklit etmelidir. Halen, çeşitli akciğer modelleri, deneysel akciğer kanseri araştırmaları için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar kimyasal olarak indüklenmiş akciğer tümörlerini, transgenik fare modellerini ve insan tümör ksenograftlarını içerir.

Bu makale, insan akciğer kanseri modellerinin tekrarlanabilir, ucuz ve gerçekleştirilebilir kolay hayvan ya da ortotopik ksenograft modellerini gözden geçirmek amacı için hazırlandı. Akciğer kanseri ksenograft modellerinin, transgenik hayvan modellerinin, singenik modellerin ve kimyasal akciğer tümör oluşumu modellerinin karakteristik özelliklerini ve bunların avantajlarını ve dezavantajlarını kısaca tanımlayacağız.

**Anahtar Kelimeler:** Akciğer kanseri, kanser modelleri, tedavi ajanları

### Abstract

Lung cancer is the most lethal type of cancer after initial diagnosis. Clinically more suitable systems are needed for examination of both non-small cell lung cancer and small cell lung cancer biology and for characterizing new therapeutic strategies. For this purpose, animal models should mimic both genetic changes and histological features found in human lung tumors. Currently, various lung models are widely used for experimental lung cancer research. These include chemically induced lung tumors, transgenic mouse models, and human tumor xenografts.

This study was prepared to review the reproducible, inexpensive, and feasible easy animal or orthotopic xenograft models of human lung cancer models. We will briefly describe the characteristic features of lung cancer xenograft models, transgenic animal models, syngeneic models, and chemically induced lung tumor formation model as well as their advantages and disadvantages.

**Keywords:** Lung cancer, cancer models, therapy agents

### Giriş

Akciğer kanseri, hem erkekler hem de kadınlarda kansere bağlı ölüm nedenleri arasında birinci sıradadır (1). Akciğer kanserine bağlı ölümlerin çoğunluğu tütün kullanıma bağlı iken (%85), geri kalan oranda ise radon, asbest, silika, polisiklik hidrokarbon, ağır metaller ve hava kirliliği gibi çevresel veya mesleki ajanlara maruz kalma neden olarak görülmektedir (2). Günümüzde tıbbi tedavi (kemoterapi) yöntemleriyle akciğer kanseri hastasının ortalama 5 yıllık sağkalım süresi %16

oranındadır (3). Yeni, etkili tedavilerin geliştirilmesi ve uygulanabilmesi için kolay uygulanabilir deneysel fare modellerinin olması gerekmektedir. Bu modellerde ideal olarak, insandaki akciğer tümörögenез, proliferasyon, anjiyogenez ve metastaz iyi taklit edilmiş olmalıdır. Bu durum tedavinin yanı sıra, akciğer kanserinin etiolojisini araştırmada ve tanıda da faydalı olacaktır.

Akciğer kanseri küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) ve küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) olmak üzere 2 ana grupta sınıflandırılır (4). KHDAK bütün akciğer

### Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Prof. Dr. Emre Entok, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye

E-posta: eentok@yahoo.com ORCID ID: orcid.org/0000-0002-6164-636

©Telif Hakkı 2019 Türkiye Nükleer Tıp Derneği / Nükleer Tıp Seminerleri, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.



kanser olgularının %80'nini oluşturur ve adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom, adenoskuamöz karsinom, büyük hücreli karsinom ve sarkomatoid karsinom gibi morfolojilerine göre alt gruplara ayrılır (4). Murin akciğer tümörleri, insan tümörlerinde gözlenenlere benzer morfoloji, histopatoloji ve moleküler anomalileri taşır. Murin modellerinde gözlenen tümörlerin çoğu, belirgin sınırları olan ve iyi farklılaşmış hücrelerden oluşan iyi huylu pulmoner adenomlardır. Adenomlar insanlarda nadiren görülmekle birlikte, büyük olasılıkla asemptomatik oldukları ve sıklıkla teşhis edilmedikleri için, murin adenomları, hava yolu tip II hücrelerinden türetilen küçük hücreli olmayan akciğer adenokarsinomuna histolojik benzerlik göstermektedir. Murin adenomları öncül olarak kabul edilir (5).

Akciğer kanseri biyolojisinin tüm spektrumunu güvenilir bir şekilde yeniden yakalayan tek bir model sistemi mevcut değildir. Böyle karmaşık bir hastalığı doğru bir şekilde araştırmak için hastalığın çeşitli yönlerini doğru şekilde yansıtan farklı modeller gereklidir. Bu fare veya sıçan modellerinde tümörün oluşup oluşmadığını belirlemek için moleküler görüntüleme yöntemlerine [pozitron emisyon tomografi (PET)/bilgisayarlı tomografi (BT)] ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada çeşitli akciğer kanseri modelleri, bu modellerin karakteristik özellikleri ve avantaj ve dezavantajlarından bahsedeceğiz.

## Deneysel Hayvan Modelleri

### 1) Ksenograft Modeli

Bu modelde tümör hücreleri orijin organın bir bölgesine nakledilir. Bu organa spesifik alan tümör hücrelerinin büyüme ve gelişmesi için optimal bir çevredir. Pahalı ve alışılmamış olan bu model akciğer kanseri gibi durumlarda, organ bölgesine spesifik sitotoksik ajanların etkilerini *in vivo* değerlendirmede kullanılmaktadır. Şu anda nude farelerle yapılan renal hücre karsinomu, pankreatik karsinom, beyin tümörleri, prostat, kolon ve akciğer kanserleri potansiyel ortotopik model kullanım alanlarıdır (6). Akciğer kanserinde, süspanse haldeki tümör hücreleri anestezi altındaki hayvanın sağ akciğerinin sağ bronş sapına doğrudan inoküle edilir (7). Tümör oluşumu hayvan sakrifiye edilerek değerlendirilebilir. Tümör büyümesine histolojik inceleme yapılır veya yayılmamış tümörün durumu moleküler görüntüleme yöntemleri ile değerlendirilebilir.

Aktarılan hücrelerin tipine ve sayısına bağlı olarak hücrelerin çoğalması için 1-8 hafta büyüme periyodu

için gereklidir. Ksenograft modelleri daha çok tümör hücrelerinin tedaviye verdiği yanıtı incelemek için kullanılır. Optimum aktarılması gereken hücre sayısı  $10^6$ - $10^7$  arasında olup, tümör gelişimi aktarılan hücrelerin tipine, boyutuna, yoğunluğuna ve büyüme faktörlerinin kullanılmasına bağlı olarak değişiklik gösterir (8). Bu modelde aktarılan tümörün kaynağı kanser hücre dizisi olabildiği gibi, ortotopik olarak insan akciğer kanserinden tümör dokusunun alınarak aktarılması da olabilir.

Adenokarsinoma oluşturmak için en yaygın kullanılan hücre dizileri A549, H1975, HCC4006 ve HCC827'dir (9,10,11,12). Karsinomlar için NCI-H1299 (13,14), büyük hücreli karsinomlar için NCI-H460 (15,16,17) ve skuamöz hücreli karsinomlar için NCI-H226 (17) hücre hatları en yaygın kullanılan dizilerdir. NCI-H460, atimik nude farelere aktarıldığında, az miktarda hücrenin yeterli olması, daha kısa sürede çoğalması ve %0 reddedilmesi nedeniyle diğer hücre hatlarına göre avantaja sahiptir (10,18). NCI-H226 ve NCI-H1299 hücre hatlarının istenilen tümör boyutuna gelmesi için 4 hafta gerekmesi ve tümör hücrelerinin kabulünün %45-100 oranında olması nedeniyle kullanımı kısıtlıdır (12,13,18,19). KHAK modelleri oluşturmak için NCI-H69 ve DMS-53 hücre hatları kullanılıyor olmasına karşın, bu hücre hatlarının süspansiyonda büyümelerinden dolayı kesin hücre sayısını belirlemesi zor olduğundan, tümörün kabulü ve büyüme oranları oldukça değişiklik göstermektedir (20,21).

### A) Ortotopik Ksenograft Modeli

Tümör ortotopik modeli, doğrudan perkütan yolla intratorasik implantasyondur. Plevral alan, karın duvarı çevresi veya akciğer parankimasının dışında implante edilen süspansiyonun %30'unun kaçma ihtimali bu modelin dezavantajıdır (22). İntratorasik implantasyona göre intrabronşiyal uygulamada, tümöre bağlı ölüm oranı daha yüksektir.

Bu model kişiye özgü tedavinin geliştirilebilmesi için oldukça etkilidir (23,24,25). Dong ve ark.'nın yaptığı çalışmada (25), 32 adet KHDAK örnekleri obez olmayan diyabetik bağışıklık sistemi bastırılmış farelerin renal kapsüllerine aktarılmış ve tümör gelişimi sisplatin, dosetaksel ve gemsitabin ile değerlendirilmiştir. Tümörün kabul edilme oranı %90 olup ve sonuçlar 6-8 haftada değerlendirilebilme aşamasına gelmiştir. Hastalarda metastaz ile farelerdeki sonuçlar birbiriyle uyumlu şekilde bulunmuştur. Yine başka bir çalışmada Onn ve ark. insan akciğer adenokarsinom (PC14PE6), bronşiyal alveoler karsinom (NCI-H358), skuamöz

hücreli karsinom (NCI-H226), az farklılaşmış küçük hücreli dışı akciğer kanseri (NCI-H1299 ve A549)-H69) Matrigel'deki hücreler çıplak farelerin sol akciğerlerine perkütan olarak enjekte etmiş ve farklı akciğer kanseri tümörlerinin büyüme paternini incelemiştir (26). İnsan primer akciğer kanseri için gözlemlendiği gibi, tümörler tek bir hastalık odağından oluşmuş ve akciğer kanserinin hem akciğerlerde hem de metastazda intratorasik lenf nodlarına yayılması ile karakterize yaygın ve ölümcül bir torasik sürece ilerlemiştir. Bununla birlikte, aynı hücreler akciğere ortotopik olarak implante edildiğinde, sadece tümör dokusunun immünohistokimyasal analizi, interleukin 8, bazik fibroblast büyüme faktörü ve vasküler endotel büyüme faktörü/vasküler geçirgenlik faktörünün proanjyogenik faktörlerinin ekspresyonunda artış olduğunu ortaya koymuşlardır.

Tümörün gelişebilmesi için, mikroçevrenin önemi uzun zamandır bilinmektedir. Bu nedenle ilaç tedavisinin değerlendirilebilmesi için, mikroçevrenin murin modellerde taklit edilmesi gerekmektedir. Bu sebeple ortotopik ksenograft modelleri, tümör hücresinin geliştiği organa aktarılmasından dolayı mikroçevre açısından en uygun modeldir. Bu nedenle bu model diğer modellere göre çeşitli avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Öncelikle insan tümör dokusundan alınan hücreler kullanıldığı için, insan tümör hücrelerinin kompleksliğini *in vivo* da en iyi yansıtan modeldir. Bu nedenle kişisel moleküler tedavide kullanımı uygundur. Kanser tedavilerinde birden fazla ilaç kullanıldığı için, ilaçlara verilen tepki, toksisite, mikroçevrenin cevabı gibi konularda araştırma için de uygun modeldir. Bu modelin dezavantajı insan tümör hücresinin konak tarafından reddedilmemesi için bağışıklık sistemi baskılanmış murin kullanılmasıdır. Bu nedenle etkin bağışıklık sisteme sahip canlıların tümör dokusuna verdiği tepki göz ardı edilmiş olmaktadır. Diğer dezavantajları ise zaman ve endobronşiyal transferi yapabilecek nitelikte donanımlı personele gereksinim duyulmasıdır.

## B) Dolaşan Tümör Hücrelerinin Aktarıldığı Ksenograft (CDX)

Ortotopik ksenograftlarda hastadan biyopsi alınması gerekmektedir ve biyopsi genellikle KHDAK hastalarından alınmakta olup, KHAK'de nadiren cerrahi gereksinimi olması nedeniyle biyopsi alınmadan daha çok görüntüleme yöntemleriyle konulmaktadır. Aynı zamanda girişimsel bir yöntem olduğu için, riskli bir yöntemdir. Kanserli hastaların kan dolaşımında dolaşan tümör hücrelerinin (CTC) ve dolaşan kanser DNA'sının

(ctDNA) hastanın kanından izole ederek immün sistemi bastırılmış fareye aktarıldığında bu hücrelerin tümörojenik olduğunu (CDX) Hodgkinson ve ark. göstermiştir (27). Bu çalışmada ksenograftın profil olarak hastanın tümör dokusuna benzediği ve kemoterapiye verilen cevabın hastanın verdiği cevaba da benzediği gösterilmiştir. Bu nedenle CDX modelinin tümör biyopsisi yerine kullanılabilmesi öngörülmektedir.

Bu yöntemin avantajı, girişimsel işlem olmadığı için hastaya zarar verme potansiyeli yoktur. Kandan basit bir işlemle alınabildiği için hastadan farklı zamanlarda alınarak tekrar edilebilir ve ayrıca tümörün gelişimsel aşaması da değerlendirilebilir. Biyopsinin nereden alındığına bağlı olarak tüm tümör dokusunun heterojenitesi sağlanmazken, CTC'ler heterojeniteyi daha iyi sağlamaktadır. Dezavantajı olarak, KHDAK tipinin bu yöntemle oluşturulmasının daha zor olması, bunun da nedeni, serbest dolaşan DNA'ların KHDAK'de KHAK'sine kıyasla çok daha az miktarda bulunmasıdır (28,29).

## 2) Singenik Model

Bu modelde, singenik murin modelleri, immünojenik açıdan uyumlu kanser hücrelerinin immünojenik uyumlu farelere enjeksiyon yoluyla gerçekleştirilir. Bu modelin oluşturulması oldukça zor ve kısıtlıdır. Bugüne kadar oluşturulmuş singenik tek model Lewis akciğer karsinomasıdır (LAK). LAK hücre dizisi oldukça tümörojeniktir ve özellikle metastaz çalışmalarında kullanılmaktadır (30). İlk defa 1951 yılında C57BL/6 soyu bir farenin akciğerinde spontane olarak bulunmuştur. İki ayrı enjeksiyon yoluyla farelere uygulanabilmektedir;

a) En çok tercih edilen metotta 1x10<sup>6</sup>/0,2 mL doz kuyruk veninden intravenöz yolla uygulanır. 5. güne doğru tümör oluşumu şekillenir. Fareler tedavi edilmezler ise ortalama sağkalım süreleri 20-25 gündür.

b) LAK'si yine 1x10<sup>6</sup>/0,2 mL dozda bu sefer sırt bölgesine uygulayarak solid form elde edilir. Bu modelde hayvanların sağkalım süreleri 19 ile 36 gün arasında gerçekleşir.

Bu modelin avantajı, enjekte edilen hücrelerin murin sistemle immün olarak uyumlu olması ve bu nedenle mikroçevreyi diğer modellere göre daha iyi yansımasıdır.

## 3) Transgenik ve Koşullu Transgenik Modeller

Genetiği değiştirilmiş modeller spontane neoplastik büyümeyi uyarmak için kullanılan modellerdir. Transgenik fareler DNA'nın zigotun pronükleusuna mikroenjeksiyonla aktarılması ile sağlanır. Bu yöntemle, tümör oluşumu sadece akciğerde, akciğerle birlikte diğer

dokularda veya akciğer dokusu dışındaki dokularda da sağlanır. Transgenik fareler, genetik anormalliklerin kanser oluşumu ve gelişimini araştırmak için önem arz etmektedir.

Akciğer için ilk kullanılan viral onkogen Simian virus T antijenidir (TAg). TAg akciğer kanserinde mutasyona uğradığı gösterilmiş Rb ve p53'e bağlanır ve inaktive eder (31). Akciğere özgü promotörlardan Clara hücre salgılaması proteini (CCSP) transgenik hale getirildiğinde murinlerde adenokarsinomanın geliştiği gösterilmiştir (32,33). Bu modelde fareler çok hızlı bir şekilde multifokal bronşiyololar neoplaziler geliştirdiler ve dört yaşından önce öldüler, bu nedenle bu yöntemde karsinogenezin erken aşamalarının araştırılması zordur. Pulmoner adenokarsinoma oluşturulması için alternatif bir model TAg transkripsiyonunun sıçan akciğerine özgü olan Calbindin D9K (CaBP9K) promotörünün 1011 baz çifti DNA parçasının uyarılmasıdır (34). Bu modelde tümör gelişimi daha yavaştır, hayvan yaklaşık 1 yıl yaşamakta ve bu da karsinogenezin erken aşamalarının incelenmesine olanak sağlamaktadır.

Başka bir transgenik akciğer kanseri oluşturma modeli, insan achaete-scute homologu-1 (hASH1) modelidir ve bunda insan transkripsiyon faktörünün akciğer spesifik Clara hücre 10kDa salgı proteininin (CC10) füzyonuyla sağlanır. Achaete-scute fetal gelişim sırasında nöral farklılaşmayı sağlayan bir transkripsiyon faktörüdür. Nöroendokrin özelliği KHAK'nin ve bazı KHDAK'nin tipik özelliğidir ve bu modelin geliştirilmesindeki asıl amaç, nöroendokrin olmayan havayolu epitel hücrelerinde normalde sentezlenmeyen achaete-scute'un sürekli sentezlenmesinin etkisinin araştırılmasıdır ve hiperplazi gelişimi ve bronşiyoloalveolar metaplazi gözlemlenmiştir (35,36).

Çeşitli onkogenlerin, kalsitonin gen ilişkili peptid (CGRP), SP-C ve CC10 gibi akciğere özgü promotörlarla füzyonuyla da yine transgenik modeller oluşturulmuştur. CGRP-Ha-Ras transgenik fareler pulmoner nöroendokrin hücre farklılaşmasını uyararak GTPaz aktif bir halini aşırı ifade ederler (37). CGRP promotörü bu füzyon proteininin sadece nöroendokrin ve nöral hücrelerde ifade edilmesini sağlar. Yapılan bir çalışmada bu transgenik farenin Clara hücrelerinin ve pulmoner nöroendokrin hücrelerinin hiperplazisi ile birlikte nöroendokrin olmayan primer akciğer kanserleri geliştirdiğini göstermişlerdir (38).

Raf kinaz bir protoonkogen olup Raf aracılığıyla aktifleşmektedir ve Raf'ın Ras'la bağlantısını sağlayan amino grup ucunda bir mutasyon oluşması Raf'ın sürekli olarak aktif hale gelmesine ve bu da hücre kültüründe

hücrelerin farklılaşmasını sağladığı gösterilmiştir (39,40). İnsan akciğer kanseri hatlarında ve biyopsilerde Raf'ın aşırı ifade edildiği belirlenmiş ve bu da Raf'ın karsinogenezle alakalı olabileceğini göstermiştir (41). Bunu araştırmak amacıyla SP-C promotörünün kontrolünde c-Raf ifade eden transgenik fare modeli oluşturulmuştur. Bu transgenik farelerin yarısında gecikmiş tümör oluşumuyla adenokarsinomlar oluşmuş ve bu da tümör gelişimi için ikincil mutasyonlarında olması gerektiğini göstermiştir (42). Başka bir çalışmada yine hücre döngüsünde rol alan c-myc protoonkogeninin transgenik modelinde bronşiyoloalveolar adenokarsinomlar belirlenmiştir (43,44). Bir tirozin kinaz reseptörü olan RON'un SP-C promotörü ile füzyonunda adenoma ve adenokarsinomlar belirlenmiştir (45).

Transgenik hayvan modelinin bir başka alternatifi de koşullu transgenik modellerdir. Bu modellerde ifade edilmesi istenilen gen dışarıdan ligand verildiğinde aktifleşen bir düzenleyici genin kontrolünde yer alır. Bu şekilde istenilen gen, istenilen zaman ve istenilen dokuda ifade edilir (46,47,48,49). Farelerde farklı primer koşullu bitransgenik uyarılan sistemler vardır. Bunlardan birincisi revers tetrasiklin transaktivatör (rtTA) uyarılabilir sistemdir. Bu sistemde rtTA ifadesi dokuya özgü bir promotör füzyonuyla sağlanır ve ifade edilmesi istenen hedef gen tetrasikline duyarlı promotör ile birleştirilir ve ortama tetrasiklin veya türevi verildiğinde istenilen genin ifade edilmesi sağlanmış olur (46,48,50). Bu yöntemle en çok çalışılan genler K-Ras, EGFR ve FGF7 olup, doksisisiklin ortamdan uzaklaştırıldığında, K-ras modellerinde, tümörün yok olduğu gösterilmiştir bu da K-Ras onkogenin hem tümörün ilk gelişim aşamasında hem de tümörün kalıcılığındaki önemini göstermektedir (49). Bu sistemin dezavantajı K-ras ve FGF-7 modellerinde insan adenokarsinomlardan farklı olarak metastaz kapasitesi daha düşüktür (49,50). EGFR modelinde ise gelişimin erken evrelerinde metastaz gözükmekte bu da canlının ölümüne neden olarak kanserin erken gelişim evrelerinin incelenmesine olanak sağlamamaktadır (46,48).

rtTA sistemine alternatif bir diğer koşullu transgenik hayvan modeli Cre/loxP sistemidir. Bu sistemle endojenik genlerin knock-out olması sağlanabildiği gibi, canlıya ekzojen genlerin de aktarılması mümkündür. Geleneksel knock-out sistemler üzerine avantajı, genin istenilen zaman ve istenilen dokuda knock-out olması sağlanarak, embriyo aşamasında ölmesinin önüne geçilmesidir. KHAK modelleme için en uygun yöntem *Trp53* geninin tek başına veya pRb ile birlikte Cre/loxP sistemiyle knock-out edilmesidir. Bu hücrelerdeki metastaz yeteneği insandakine oldukça benzerdir ve de KHAK

hücrelerinin karakteristik özelliği olan nöroendokrin özellikleri de gösterir. Bu modelin dezavantajı ise oldukça invazif olduğundan erken farklılaşma aşamalarının incelenememesidir (51). Bu sistemle oluşturulan bir diğer oldukça favori olan model ise Lkb1:LSLK-RasG12D' dir ve insan metastazına oldukça benzer adenokarsinomlar ve skuamöz hücre karsinomları gelişir (52).

#### 4) Deneysel Kimyasal Akciğer Kanseri

Fare, akciğer kanseri incelemesi için temel hayvan modelidir. Farelerin insan akciğer kanseri için model olarak yaygın olarak benimsenmesi, genetik çeşitliliğin genişliği, genetik manipülasyon kolaylığı ve akciğer hastalığını moleküler ve histolojik benzerliklerle indükleyebilme yeteneğinin uzun süredir kullanımının bir sonucudur. Fare akciğer kanseri modelleri günümüzde sıklıkla klinik öncesi tedavi ve önleme testlerinde kullanılmaktadır. Aktive edilmiş onkogenlerin ekspresyonu (örneğin; Kras) veya inaktive tümör supresör genlerinin (örneğin; P53) gibi insan tümörlerinde bulunan spesifik genetik lezyonları kopyalayan mühendislik modelleri sıklıkla akciğer kanserinin oluşumunu araştırmak için kullanılır. Ek olarak, insan akciğer tümörlerinin genetik karmaşıklığını başarılı bir şekilde ele almak için kansere yatkınlığı olan fare soylarını kullanan kimyasal kanserojen kaynaklı modeller kullanılmıştır. İnsanlarda, karmaşık kimyasal karışımlar, özellikle sigara dumanı, akciğer kanserinin baskın başlatıcısıdır. Sigara içmek insan akciğer kanserinin birincil nedeni olduğundan, bireysel sigara dumanı kanserojenleri sıklıkla farelerde akciğer tümörlerini uyarmak için kullanılır. Bu genellikle polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) ve nitrosamin sınıfının kanserojenlerinin intraperitoneal veya diyet uygulamasıyla gerçekleştirilir (53,54,55,56). PAH'ler büyük ölçüde tütünün yanması sırasında üretilirken, nitrozaminler yanmamış tütünde zaten bulunur ve tütün sertleştirme işleminin bir sonucu olarak oluşur. Benzo (a) piren [B (a) P], bir PAH ve nitrozaminler, 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-bütanon (NNK) ve N'-nitrosornikotin (NNN), farelerde akciğer adenomları ve adenokarsinomların güçlü indükleyicileridir. Bu kimyasallar, DNA ile reaksiyona giren ve katkı maddeleri oluşturan elektrofilik bileşiklerde metabolik aktivasyon gerektiren pro-kanserojenlerdir. Daha sonra tamir başarısızlığı veya yanlış onarım genetik mutasyonlarla sonuçlanır. Sitokrom P450 enzimleri, B (a) P ve NNK'nin biyolojik olarak aktiveleştirilmesinde merkezidir ve doku ifadesinde ve kimyasal spesifiklikte farklılıklar gösteren çeşitli CYP genleri tarafından kodlanır (57). P450'ler

ayrıca kendiliğinden aldehitlere ve diazonyum iyonlarına ayıran NNK'nin a-hidroksilasyonunu katalize eder, ardından 6-metil-guanin eklentileri oluşturur (58). P450 enzimleri en çok karaciğerde eksprese edilir, fakat aynı zamanda akciğerin periferik ve bronş epitelinde de bulunur.

A/J ve SWR gibi yerleşik fare soylarında, spontane akciğer tümörü gelişimi insidansı yüksektir. A/J soyma fareler 24 ay sonra kabaca %80-100 oranında spontane akciğer tümörü insidansına sahiptir ve tümörler sıklıkla ilk 6 ay içinde tespit edilir (53,59). Bu suşlar ayrıca kanserojen kaynaklı akciğer tümörlerine karşı çok hassastır. C57BL6/J, C3H/J ve DBA gibi diğer suşlar kanserojen kaynaklı akciğer tümörlerine karşı çok dirençli iken, O20 ve BALB/c gibi suşlar orta duyarlılığa sahiptir. A/J suşu fareler, kanserojen etil karbamat (üretan) ile tedaviden 14-16 hafta sonra akciğerde yaklaşık 25 tümör geliştirirken, C57BL/6J suşu akciğerde ortalama 1 tümörden daha az gelişir (53,55,60,61,62). Bu suşa bağlı farklılıklar, birçok araştırma grubunun hem kanserojen kaynaklı hem de spontane akciğer tümörü gelişimi ile ilişkili genetik duyarlılık lokuslarını haritalamasına izin vermiştir (63,64).

Bu modellerden, üretan ile indüklenen akciğer tümörü oluşum modelinin birçok avantajı vardır. Üretanın periton içi verilmesinin güvenilir bir şekilde tekrarlanabileceği gösterilmiştir ve daha sonra kanserogenez zamana bağlı bir şekilde gelişir. Kanserogenezi, insan akciğer kanserinin karakteristik özelliği olan sıralı genetik değişikliklere cevap olarak hiperplaziden adenoma ve sonra adenokarsinomlara ilerler (65). Bu genetik değişikliklerden K-Ras ve p53, üretan kaynaklı model ile ilişkili en belirgin mutasyonlardır (65,66). Benzo(a)piren ile indüklenen sistem aynı zamanda farelerde adenomu da modeller, ancak bağımsız deneylerde oldukça değişken büyüme düzenleri ile sonuçlandırdığı gösterilmiştir (67). N-nitroso-metil-biskloroetilüre ve N-nitroso-trischloroethylurea (NTCU) gibi N-Nitrosobis- (2-kloroetil) ürelerin, Cr:NIH(S) farelerine topikal uygulamada hiperplazi, displazi ve metaplazi büyümesini indüklediği gösterilmiştir (68). 3-Metilkolantren, dietilnitrosamin, etilnitrosoüre ve dimetilhidrazinin, A/J farelerinde tekrarlanabilir adenom büyümesini indüklediği gösterilmiştir (69). Her ne kadar bu modeller, kanserojen tatbikatı yoluyla karsinogenezi araştırmacının kontrol etmesinin avantajını sağlasa da, sonuçlarda tutarsızlıklara yol açan uygulama tekniğindeki değişkenlikler gibi, bu modellerle ilişkili birçok dezavantaj da vardır.

## Sonuç

Günümüzde insan tümörlerinin araştırılması için en yaygın kullanılan yöntem ksenograftlar olarak yer almaktadır. Bu yöntemlerden sonuç olarak en güçlüsü genetik olarak modifiye edilmiş modeller olsa da bu modellerin oluşturulmasının zorluğu, pahalı olması ve çok zaman alması nedeniyle pek tercih edilmemektedir. Bu hayvan modellerinin araştırmacılara daha rahat ulaştırılması, akciğer kanserinin tanı ve tedavisi hakkında çalışmaların daha efektif olmasını sağlayacaktır. Bu çalışmada en yaygın kullanılan modellerden bahsedildi fakat bu modeller dışında kısa ilmek RNA (shRNA), RNA interferans gibi RNA çeşitleri kullanılarak ekspresyonun bloke edildiği modellerde yavaş yavaş literatürde yerini bulmaktadır. shRNA kullanılarak oluşturulan bir model p19ARF olup, bu modellerde akciğer adenokarsinoma gözlemlenmiş ve terapötik olarak kullanılmıştır (70).

Çok çeşitli hayvan modellerinin olması, hepsinin farklı özelliklerinin olması nedeniyle model yapılacak çalışmanın amacına bağlı olarak seçilebilir. Örneğin; tedaviye karşı yanıtın kısa sürede araştırılmasında ksenograft modelleri en uygundur. Ksenograftların en yaygın kullanılan yöntem olmasında sonuçların 4-8 haftada elde edilebiliyor olmasıdır. Fakat ksenograftların kullanılması klinik aşamada hüsrana neden olabilmektedir. Yapılan çalışmalarda erlotinib ve BIBW2992'nin CCSP-rtTA; Tet-O7-EGFRL858R modelinde *in vivo* olarak dramatik şekile tümör gerilemesiyle sonuçlanırken, BIBW2992 için Faz I klinik deneyleri, hastalarda önemli bir kısmı ya da tam tepki vermemiştir (41,71,72,73,74).

Singenik modelde ise klinik ve modelde yapılan çalışmalar daha uyumlu bulunmuştur. Navelbin ve karboplatinin etkileri, LLC arka plan tümörlü C57BL farelerinde değerlendirildiğinde, *in vivo* olarak, IV navelbin uygulama yüzde 72,7 oranında tümör gerilemesi ile sonuçlanmıştır (75). Alternatif olarak, paklitaksel ile kombinasyon halinde IV karboplatin uygulaması, deney popülasyonunun %30-50'sinde uzun süreli hayatta kalma ile sonuçlanmıştır. Ortanca sağkalım 34 haftaya uzatıldığı için prelinik navelbin sonuçlarının klinik çalışmalara çevrilebilir olduğu gösterilmiştir (76). Ayrıca karboplatin paklitaksel kombinasyon tedavisinin klinik çalışmalarda etkili olduğu, medyan sağkalımın hastalarda 10,3 aya kadar uzatıldığı ve ayrıca LLC modelinin seçilmiş tedavilerin klinik yararını öngörmeye değerli bir araç olduğunu öne sürdüğü gösterilmiştir.

Hayvan modellerinin kullanılması ile ilgili çeşitli dikkat edilmesi gereken konular bulunmaktadır. İnsan ile murinler arasındaki biyolojik farklılıklar, hatta aynı türdeki canlılarda P450 sistemindeki farklılıklardan

dolayı hem tümör gelişiminde hem de tümöre karşı tedavide farklı sonuçların alınmasına neden olmaktadır. Bazen farede kanser tedavisi için etkili olan bir ilaç insanda herhangi bir sonuç vermemektedir. Bu da genelde iki canlıda hedef alınan proteinlerin birbirinin aynı olmayıp homoloğu olması neden iledir (77,78,79). Yapılan bir çalışmada insan P450 2A13 geninin fareye aktarıldığında, insan geninin sigara dumanında bulunan karsinojenik kimyasalları daha etkili bir şekilde aktive edildiği gösterilmiştir (80).

Özet olarak insan akciğer kanserinin etiyolojisini anlamak ve uygun tedavi yöntemlerini belirlemek amacıyla çeşitli murin deney modelleri bulunmaktadır. Fakat hiçbir model insan akciğer kanserinin *in vivo* olarak bütün karakteristik özelliklerini tamamıyla kapsayacak özelliklere sahip değildir. Her modelin avantajları ve dezavantajları mevcuttur. Yöntem seçiminde hangi kanser tipinin araştırılacağı, hangi hücre tipine bakılacağı, genetik anormalliklerin olup olmadığı, o kanser dokusunun belli bir gelişimsel zamana ve dokuya özgü olup olmadığına, hedef bir genin uzaysal ve zamansal ifadesinin kontrolü yapılıp yapılmayacağına, tümörün mikroçevresine ve metastaz potansiyeli gibi faktörler göz önünde bulundurulmalıdır. Fare modellerinin kullanımıyla elde edilen sonuçlar, akciğer kanseri için yeni fare modellerinin geliştirilmesindeki ilerlemeler, akciğer kanserinin etiyolojisi ve tedavileri hakkında çok fazla bilgi sağlamaktadır.

**Finansal Destek:** Bu makalenin hazırlanmasında finansal destek alınmamıştır.

**Çıkar çatışması:** Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

## Kaynaklar

1. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc* 2008;83:5874-594.
2. Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y, Brambilla E. *Histological typing of lung and Pleural Tumours*. Berlin: Springer Verlag; 1999.
3. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. *Cancer statistics, 2013*. *CA Cancer J Clin* 2013;63:11-30.
4. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society: international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma: executive summary. *Proc Am Thorac Soc* 2011;8:381-385.
5. Vikis HG, Rymaszewski AL, Tichelaar JW. Mouse models of chemically-induced lung carcinogenesis. *Front Biosci (Elite Ed)* 2013;5:939-946.

6. Howard RB, Chu H, Zeligman BE. Irradiated nude rat model for orthotopic human lung cancers. *Cancer Res* 1991;51:3274-3280.
7. Hastings RH, Burton DW, Quintana RA, Biederman E, Gujral A, Deftos LJ. Parathyroid hormone-related protein regulates the growth of orthotopic human lung tumors in athymic mice. *Cancer* 2001;92:1402-1410.
8. Kellar A, Egan C, Morris D. Preclinical murine models for lung cancer: clinical trial applications. *Biomed Res Int* 2015;2015:621324.
9. Memon AA, Jakobsen S, Dagnaes-Hansen F, Sorensen BS, Keiding S, Nexø E. Positron emission tomography (PET) imaging with [11C]-labeled erlotinib: a micro-PET study on mice with lung tumor xenografts. *Cancer Res* 2009;69:873-878.
10. Steiner P, Joynes C, Bassi R, et al. Tumor growth inhibition with cetuximab and chemotherapy in non-small cell lung cancer xenografts expressing wild-type and mutated epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 2007;13:1540-1551.
11. Sakuma Y, Matsukuma S, Nakamura Y, et al. Enhanced autophagy is required for survival in EGFR-independent EGFR-mutant lung adenocarcinoma cells. *Lab Invest* 2013;93:1137-1146.
12. Akhtar S, Meeran SM, Katiyar N, Katiyar SK. Grape seed proanthocyanidins inhibit the growth of human nonsmall cell lung cancer xenografts by targeting insulin-like growth factor binding protein-3, tumor cell proliferation, and angiogenic factors. *Clin Cancer Res* 2009;15:821-831.
13. Chen MF, Chen WC, Wu CT, et al. p53 status is a major determinant of effects of decreasing peroxiredoxin I expression on tumor growth and response of lung cancer cells to treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;66:1461-1472.
14. Wang H, Li M, Rinehart JJ, Zhang R. Pretreatment with dexamethasone increases antitumor activity of carboplatin and gemcitabine in mice bearing human cancer xenografts: in vivo activity, pharmacokinetics, and clinical implications for cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2004;10:1633-1644.
15. McLemore TL, Liu MC, Blacker PC, et al. Novel intrapulmonary model for orthotopic propagation of human lung cancers in athymic nude mice. *Cancer Res* 1987;47:5132-5140.
16. Carter CA, Chen C, Brink C, et al. Sorafenib is efficacious and tolerated in combination with cytotoxic or cytostatic agents in preclinical models of human non-small cell lung carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007;59:183-195.
17. Feng Z, Zhao G, Yu L, Gough D, Howell SB. Preclinical efficacy studies of a novel nanoparticle-based formulation of paclitaxel that out-performs Abraxane. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010;65:923-930.
18. Yamori T, Sato S, Chikazawa H, Kadota T. Anti-tumor efficacy of paclitaxel against human lung cancer xenografts. *Jpn J Cancer Res* 1997;88:1205-1210.
19. Qin M, Chen S, Yu T, Escudero B, Sharma S, Batra RK. Coxsackievirus adenovirus receptor expression predicts the efficiency of adenoviral gene transfer into non-small cell lung cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 2003;9:4992-4999.
20. Pettengill OS, Sorenson GD, Wurster-Hill DH, et al. Isolation and growth characteristics of continuous cell lines from small-cell carcinoma of the lung. *Cancer* 1980;45:906-918.
21. Taylor JE, Bogden AE, Moreau JP, Coy DH. In vitro and in vivo inhibition of human small cell lung carcinoma (NCI-H69) growth by a somatostatin analogue. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;153:81-86.
22. McLemore TL, Eggleston JC, Shoemaker RH, et al. Comparison of intrapulmonary, percutaneous intrathoracic, and subcutaneous models for the propagation of human pulmonary and nonpulmonary cancer cell lines in athymic nude mice. *Cancer Res* 1988;48:2880-2886.
23. Fichtner I, Rolff J, Soong R, et al. Establishment of patient-derived non-small cell lung cancer xenografts as models for the identification of predictive biomarkers. *Clin Cancer Res* 2008;14:6456-6468.
24. Merk J, Rolff J, Becker M, Leschber G, Fichtner I. Patient-derived xenografts of non-small-cell lung cancer: a pre-clinical model to evaluate adjuvant chemotherapy? *Eur J Cardiothorac Surg* 2009;36:454-459.
25. Dong X, Guan J, English JC, et al. Patient-derived first generation xenografts of non small cell lung cancers: promising tools for predicting drug responses for personalized chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2010;16:1442-1451.
26. Onn A, Isobe T, Itasaka S, et al. Development of an orthotopic model to study the biology and therapy of primary human lung cancer in nude mice. *Clin Cancer Res* 2003;9:5532-5539.
27. Hodgkinson CL, Morrow CJ, Li Y, et al. Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small cell lung cancer. *Nat Med* 2014;20:897-903.
28. Krebs MG, Sloane R, Priest L, et al. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:1556-1563.
29. Hou JM, Krebs MG, Lancashire L, et al. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2012;30:525-532.
30. Sakai Y, Sasahira T, Ohmori H, Yoshida K, Kuniyasu H. Conjugated linoleic acid reduced metastasized LL2 tumors in mouse peritoneum. *Virchows Arch* 2006;449:341-347.
31. Virmani AK, Gazdar AF. Tumor suppressor genes in lung cancer. *Methods Mol Biol* 2003;222:97-115.
32. DeMayo FJ, Finegold MJ, Hansen TN, Stanley LA, Smith B, Bullock DW. Expression of SV40 T antigen under control of rabbit uteroglobin promoter in transgenic mice. *Am J Physiol* 1991;261:70-76.
33. Wikenheiser KA, Clark JC, Linnoila RI, Stahlman MT, Whitsett JA. Simian virus 40 large T antigen directed by transcriptional elements of the human surfactant protein

- C gene produces pulmonary adenocarcinomas in transgenic mice. *Cancer Res* 1992;52:5342-5352.
34. Raben D, Bianco C, Damiano V, et al. Antitumor activity of ZD6126, a novel vascular-targeting agent, is enhanced when combined with ZD1839, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, and potentiates the effects of radiation in a human non-small cell lung cancer xenograft model. *Mol Cancer Ther* 2004;3:977-983.
  35. Linnoila RI, Sahu A, Miki M, Ball DW, DeMayo FJ. Morphometric analysis of CC10-hASH1 transgenic mouse lung: a model for bronchiolization of alveoli and neuroendocrine carcinoma. *Exp Lung Res* 2000;26:595-615.
  36. Linnoila RI, Zhao B, DeMayo JL, et al. Constitutive achaete-scute homologue-1 promotes airway dysplasia and lung neuroendocrine tumors in transgenic mice. *Cancer Res* 2000;60:4005-4009.
  37. Mabry M, Nakagawa T, Baylin S, Pettengill O, Sorenson G, Nelkin B. Insertion of the v-Ha-ras oncogene induces differentiation of calcitonin-producing human small cell lung cancer. *J Clin Invest* 1989;84:194-199.
  38. Sunday ME, Haley KJ, Sikorski K, et al. Calcitonin driven v-Ha-ras induces multilineage pulmonary epithelial hyperplasias and neoplasms. *Oncogene* 1999;18:4336-4347.
  39. Stanton VP Jr, Nichols DW, Laudano AP, Cooper GM. Definition of the human raf amino-terminal regulatory region by deletion mutagenesis. *Mol Cell Biol* 1989;9:639-647.
  40. Heidecker G, Huleihel M, Cleveland JL, et al. Mutational activation of c-raf-1 and definition of the minimal transforming sequence. *Mol Cell Biol* 1990;10:2503-2512.
  41. Rapp UR, Huleihel M, Pawson T, et al. Role of raf oncogenes in lung carcinogenesis. *Lung Cancer* 1988;4:162-167.
  42. Kerkhoff E, Fedorov LM, Siefken R, Walter AO, Papadopoulos T, Rapp UR. Lung-targeted expression of the c-Raf-1 kinase in transgenic mice exposes a novel oncogenic character of the wild-type protein. *Cell Growth Differ* 2000;11:185-190.
  43. Broers JL, Viallet J, Jensen SM, et al. Expression of c-myc in progenitor cells of the bronchopulmonary epithelium and in a large number of non-small cell lung cancers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;9:33-43.
  44. Lorenz J, Friedberg T, Paulus R, Oesch F, Ferlinz R. Oncogene overexpression in non-small-cell lung cancer tissue: prevalence and clinicopathological significance. *Clin Invest* 1994;72:156-163.
  45. Chen YQ, Zhou YQ, Fu LH, Wang D, Wang MH. Multiple pulmonary adenomas in the lung of transgenic mice overexpressing the RON receptor tyrosine kinase. *Recepteur d'origine nantais. Carcinogenesis* 2002;23:1811-1819.
  46. Perl AK, Tichelaar JW, Whitsett JA. Conditional gene expression in the respiratory epithelium of the Mouse. *Transgenic Res* 2002;11:21-29.
  47. Politi K, Fan PD, Shen R, Zakowski M, Varmus H. Erlotinib resistance in mouse models of epidermal growth factor receptor-induced lung adenocarcinoma. *Dis Model Mech* 2010;3:111-119.
  48. Politi K, Zakowski MF, Fan PD, Schonfeld EA, Pao W, Varmus HE. Lung adenocarcinomas induced in mice by mutant EGF receptors found in human lung cancers respond to a tyrosine kinase inhibitor or to down-regulation of the receptors. *Genes Dev* 2006;20:1496-1510.
  49. Fisher GH, Wellen SL, Klimstra D, et al. Induction and apoptotic regression of lung adenocarcinomas by regulation of a K-Ras transgene in the presence and absence of tumor suppressor genes. *Genes Dev* 2001;15:3249-3262.
  50. Tichelaar JW, Lu W, Whitsett JA. Conditional expression of fibroblast growth factor-7 in the developing and mature lung. *J Biol Chem* 2000;275:11858-11864.
  51. Politi K, Fan PD, Shen R, Zakowski M, Varmus H. Erlotinib resistance in mouse models of epidermal growth factor receptor-induced lung adenocarcinoma. *Dis Model Mech* 2010;3:111-119.
  52. Ji H, Ramsey MR, Hayes DN, et al. LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. *Nature* 2007;448:807-810.
  53. Shimkin MB, Stoner GD. Lung tumors in mice: application to carcinogenesis bioassay. *Adv Cancer Res* 1975;21:1-58.
  54. Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:733-744.
  55. Malkinson AM. The genetic basis of susceptibility to lung tumors in mice. *Toxicology* 1989;54: 241-271.
  56. Malkinson AM. Primary lung tumors in mice: an experimentally manipulable model of human adenocarcinoma. *Cancer Res* 1992;52(Suppl 9):2670-2676.
  57. Anttila S, Raunio H, Hakkola J. Cytochrome P450-mediated pulmonary metabolism of carcinogens: regulation and cross-talk in lung carcinogenesis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011;44:583-590.
  58. Hecht SS. DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamines. *Mutat Res* 1999;424:127-142.
  59. Manenti G, Dragani TA. Pas1 haplotype-dependent genetic predisposition to lung tumorigenesis in rodents: a meta-analysis. *Carcinogenesis* 2005;26:875-882.
  60. Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene* 2002;21:7435-7451.
  61. Malkinson AM, Beer DS. Major effect on susceptibility to urethan-induced pulmonary adenoma by a single gene in BALB/cBy mice. *J Natl Cancer Inst* 1983;70:931-936.
  62. Wakamatsu N, Devereux TR, Hong HH, Sills RC. Overview of the molecular carcinogenesis of mouse lung tumor models of human lung cancer. *Toxicol Pathol* 2007;35:75-80.
  63. Demant P. Cancer susceptibility in the mouse: genetics, biology and implications for human cancer. *Nat Rev Genet* 2003;4:721-734.
  64. Liu P, Wang Y, Vikis H, et al. Candidate lung tumor susceptibility genes identified through whole-genome association analyses in inbred mice. *Nature Genet* 2006;38:888-895.

65. Ohno J, Horio Y, Sekido Y, et al. Telomerase activation and p53 mutations in urethane-induced A/J mouse lung tumor development. *Carcinogenesis* 2001;22:751-756.
66. Horio Y, Chen A, Rice P, Roth JA, Malkinson AM, Schrupp DS. Ki-ras and p53 mutations are early and late events, respectively, in urethane-induced pulmonary carcinogenesis in A/J mice. *Mol Carcinog* 1996;17:217-223.
67. Gunning WT, Kramer PM, Lubet RA, et al. Chemoprevention of benzo(a)pyrene induced lung tumors in mice by the farnesyltransferase inhibitor R115777. *Clin Cancer Res* 2003;9:1927-1930.
68. Rehm S, Lijinsky W, Singh G, Katyal SL. Mouse bronchiolar cell carcinogenesis. Histologic characterization and expression of Clara cell antigen in lesions induced by N-nitrosobis-(2-chloroethyl) ureas. *Am J Pathol* 1991;139:413-422.
69. Stoner GD, Greisiger EA, Schut HA, et al. A comparison of the lung adenoma response in strain A/J mice after intraperitoneal and oral administration of carcinogens. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984;72:313-323.
70. Premisrut PK, Dow LE, Kim SY, et al. A rapid and scalable system for studying gene function in mice using conditional RNA interference. *Cell* 2011;145:145-158.
71. Memon AA, Jakobsen S, Dagnaes-Hansen F, Sorensen BS, Keiding S, Nexø E. Positron emission tomography (PET) imaging with [<sup>11</sup>C]-labeled erlotinib: a micro-PET study on mice with lung tumor xenografts. *Cancer Res* 2009;69:873-879.
72. Li D, Ambrogio L, Shimamura T, et al. BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene* 2008;27:4702-4711.
73. Perez-Soler R. The role of erlotinib (Tarceva, OSI 774) in the treatment of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:4238-4240.
74. Eskens FA, Mom CH, Planting AS, et al. A phase I dose escalation study of BIBW 2992, an irreversible dual inhibitor of epidermal growth factor receptor 1 (EGFR) and 2 (HER2) tyrosine kinase in a 2-week on, 2-week off schedule in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer* 2008;98:80-85.
75. Marty M, Fumoleau P, Adenis A, et al. Oral vinorelbine pharmacokinetics and absolute bioavailability study in patients with solid tumors. *Ann Oncol* 2001;12:1643-1649.
76. Papageorgiou A, Stravrovavdi P, Sahnazidou D, Natsis K, Chrysogelou E, Toliou T. Effect of Navelbine on inhibition of tumor growth, cellular differentiation and estrogen receptor status on Lewis lung carcinoma. *Chemotherapy* 2000;46:188-194.
77. Kohl NE, Omer CA, Conner MW, et al. Inhibition of farnesyltransferase induces regression of mammary and salivary carcinomas in ras transgenic mice. *Nat Med* 1995;1:792-797.
78. Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;49:4682-4689.
79. Lerner EC, Qian Y, Hamilton AD, Sebt SM. Disruption of oncogenic K-Ras4B processing and signaling by a potent geranylgeranyltransferase I inhibitor. *J Biol Chem* 1995;270:26770-26773.
80. Megaraj V, Zhou X, Xie F, Liu Z, Yang W, Ding X. Role of CYP2A13 in the bioactivation and lung tumorigenicity of the tobacco-specific lung procarcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone: in vivo studies using a CYP2A13-humanized mouse model. *Carcinogenesis* 2014;35:131-137.





# Klinik Öncesi Çalışmalarda Kullanılan Prostat ve Kolon Kanseri Modelleri ve Görüntüleme Teknikleri

## Preclinical Models and Imaging Techniques for Studing Prostate and Colorectal Cancers

© Alper Özgür Karaçalıoğlu

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Ankara Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nükleer Tıp Kliniği, Ankara, Türkiye

### Öz

Tüm kanser tiplerinde olduğu gibi, prostat ve kolorektal kanserlerin oluşma gelişme ve metastaz aşamalarında, tümör hücrelerinin, kendi aralarında, çevre stromadaki normal diğer hücreler ile ilişkilerinin anlaşılması, immün yanıt karşısındaki tutumları ile gen ve sinyal yollarında meydana gelen değişikliklerinin anlaşılması çok önemlidir. Bu nedenle deneysel araştırmalar için, tümör hücre serilerinin oluşturulması, laboratuvar ortamında dokuların oluşturulması, hayvan veya insan tümör hücre veya dokularının enjeksiyon ya da implantasyon yolu ile bilimin sessiz kahramanları olan deney hayvanlarında tümör modellerinin oluşturulması ve bunların moleküler görüntülenmesi çok önemlidir. Ancak bu şekilde bu hastalıkların etkili bir tedavisi bulunabilir ya da daha oluşmadan önlenir hale gelir.

**Anahtar Kelimeler:** Prostat kanseri, kolon kanseri, klinik öncesi görüntüleme

### Abstract

As with all cancer types, the initiation, development, and metastatic stages of prostate and colorectal cancers, are very important to understand the relationship between tumor cells and normal cells in the stroma, the changes in gene and signaling pathways, as well as their behavior towards the immune response. Therefore, for experimental research, the formation of tumor cell lines, the formation of tissues in the laboratory environment, and the formation of tumor models via injection or implantation of animal or human tumor cells or tissues in experimental animals, which are the silent heroes of science, and their molecular imaging are very important. Only in this way can there be an effective treatment of these diseases, or they can be prevented before they occur.

**Keywords:** Prostate cancer, colon cancer, preclinical imaging

### Prostat Kanseri

Değişik moleküler özellikler, ilaç yanıtı ve direnç mekanizmaları gösteren çok evreli progresif bir hastalıktır. Hormona duyarlı ve dirençli evre olmak üzere başlıca iki evreye ayrılır ve her iki evrede de metastaz gelişebilir. Prostat kanseri başlangıcında phosphatase and tensin homolog inaktivasyonu ve TMPRSS2-ERG arasında somatik gen birleşmeleri saptanırken, hastalık ilerlerken ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz/mitojenle aktiveleştirilen protein kinazı yolak mutasyonları

ve metastatik süreçlerde EZH2 artışları izlenir. Geç dönemlerde ise hormon yolağını hedef almış ilaçlara karşı, %25'inde *de novo* diğerlerinde ise sonradan olmak üzere tedavi direnci ortaya çıkar.

### Klinik Öncesi Modeller

Prostat kanser hücrelerini üretmek, kültürde seri oluşturmak ve aşlamak zordur. Prostat kanser araştırmalarında etkili ksenograft tümör modelleri mevcut olup en sık kullanılan hücre kültürleri PC-3, DU-

### Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Doç. Dr. Alper Özgür Karaçalıoğlu, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Ankara Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nükleer Tıp Kliniği, Ankara, Türkiye

**E-posta:** aokaracali@yahoo.com **ORCID ID:** orcid.org/0000-0003-2683-804X

©Telif Hakkı 2019 Türkiye Nükleer Tıp Derneği / Nükleer Tıp Seminerleri, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.

145 [(prostat spesifik antijen (PSA) içermez)] ve LNCaP (fonksiyone androjen reseptörü içeren mutasyon) ile kodlanmıştır.

Hasta kökenli ksenograftlar, hasta tümörlerinden elde edilir. Tümörün klinik genotip ve fenotipini daha iyi yansıtır. Taze ya da dondurularak ya da fikse edilerek daha sonra analiz edilebilir. Bunlar örneğin; alındığı zamana ilişkin genomik bilgi sağlarlar. Hasta kökenli prostat kanser modelleri genelde üç grup altında incelenirler ve primer tümör ya da metastazlarından elde edilebilir. Kanser dokuları keserek küçük parçalara ayrılır ve doku kesitleri hazırlanır. Her modelin olumlu ve olumsuz yönleri vardır ve hiçbiri tek başına ideal değildir.

**a) Hasta kökenli ksenograftlar (PDX):** Destekleyici tümör mezankimi içerir. Zaman alıcı ve zahmetli olsa da diğer tümör hücre serilerine göre üretim verimi fazladır. Klinik öncesi deneyler, köken aldığı tümörü doğru yansıttığı için altın standarttır. Tümörün her evresinden zor olsa da elde edilebilir ve o evre için bilgi sağlarlar. Genelde prostatektomi materyalinden elde edildikleri için latent tümör hakkında bilgi verirler. Olumlu yönleri, doku mimarisi sağlam kalır, androjen reseptör yolağı da dahil olmak üzere endokrin sistem sağlam kalır, hastalık seyrinin her safhasından elde edilebilir ve 1 yıl gibi uzun bir sürede fonksiyonel değerlendirmeler yapılabilir. Olumsuz yönleri ise, sayısal değerlendirmeler sınırlı olup oldukça karışıktır. Fare modelinin immün sistemi eksiktir.

**b) Hasta kökenli explantlar (PDE):** Prostat dokuları genetik mühendislikle üretilmiş jelatin süngerler üzerinde, yarı kültür ortamına batırılmış şekilde büyütülür. Bu jelatin süngerler, doğal orijinal doku mimarisinin korunup mikroçevredeki hücre-hücre etkileşimlerini bozmadan prostat hücrelerinin kültürünü kolaylaştırır. Androjen reseptör sinyal yolağı korunur ve bu kültürler hormon duyarlı olup kültürde PSA proteini saptanır (1). Olumlu yönleri, doku mimarisi sağlam kalır, androjen yolağı sağlam kalır ve fonksiyonel değerlendirmeler kısa bir sürede yapılabilir. Olumsuz yönleri, orijinal dokudaki immün sistem hücrelerde kısıtlıdır ve doku kültürde 7 gün canlı kalabildiğinden uzun vadeli fonksiyonel çalışmalar yapılamaz.

**c) Hasta kökenli sferoidler, prostasferler ve organoidler (PDO):** Üç boyutlu kültürde ayrı hücreler olarak büyür. Organoidler daha yeni teknolojilerdir. Tek tabaka kültür yerine, üç boyutlu kültür ortamlarına yerleştirilen ekstraselüler matriks sayesinde hasta kökenli hücre serileri elde edilebilir. Böylece hücre bütünlüğü ve farklanması korunarak hücre ömürleri uzatılır. Organoidlerin olumlu yönleri, hücreler sonsuz

sayıda genişletilebilir, ilaç cevabı iyi değerlendirilir, sayısal değerlendirmeler kolay ve hızlıdır ve uzun dönem fonksiyonel çalışmalar için PDX graft olarak yeniden hazırlanabilirler. Olumsuz yönleri ise, stroma ve immün sistem etkisi eksiktir ve günümüzde sadece agresif prostat hücre kültürleri hazırlanabilmektedir. Üç boyutlu yapı desteklerinin olumlu yönleri, stroma ve immün sistem etkilerine ilaveten karışık hücre-hücre etkileşimlerine izin verir, biyolojik materyallerden üretilebilir ve confocal görüntüleme üç boyutlu analize ve hücresel etkileşimlerin değerlendirilmesine izin verir. Olumsuz yönleri ise, pahalı ve sınırlı biyomühendislik becerileri ve malzemeleri gerektirmesidir.

İlk taze örneklerle ilave olarak PDE ve PDO deneyleri PDX kökenli dokular üzerinde yapılabilir ve PDO örnekleri farelere enjekte edilebilir ve bunlar PDX olarak büyüyüp daha sonra incelenebilir.

Transgenik fare modellerinde (PSA-Cre-ERT2/PTEN fare dizisi), genetik yapısı değiştirilmiş fareler kullanılır. Prostat kanserinde Ras, Myc, p53 ve PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) gibi özel biyolojik belirteçler tanımlanmıştır. Primer prostat kanserlerinin %10'unda, metastatik kanserlerin ise %65'inde, mutasyon, transkripsiyonel represyon veya silinme gibi nedenlerden ötürü hücre fonksiyonlarını etkileyen PI3K/Akt yolağını kontrol eden PTEN down regülasyonu tanımlanmıştır (2) ve kötü prognoz ile ilişkilidir (3). Bu genetik değişikliklerin onkogenез üzerindeki etkileri *in vitro* model eksikliği nedeniyle tam olarak anlaşılabilmiştir. Bu nedenle PSA-Cre-ERT2/PTEN transgenik fare modeli geliştirilmiş olup PTEN'nin insan prostat kanserlerinde ilerlemeyi neredeyse iki kat arttırdığı gösterilmiştir (4). Bu transgenik fare sayesinde, prostat kanserinin başlangıç ve ilerleme süreçleri daha iyi anlaşılabilir hale gelecek görünmektedir.

Transgenik fare modellerinde (PSA-Cre-ERT2/PTEN fare dizisi), genetik yapısı değiştirilmiş fareler kullanılır. Prostat kanserinden ölüm sebebi genelde en sık kemik metastazı (5) olup bu durumun fareden modellenmesi, neden bu tümörün kemik metastazı yaptığı ve osteoblastik yanıt oluşturduğu anlaşılmadığından, güçtür. Bu tümörün tedavisindeki güçlük sadece tümör hücrelerinden değil bu hücrelerin kendi mikroçevresindeki diğer hücreler ile olan, büyüme faktörleri, sitokinler, hücre dışı matriks gibi ilişkilerinden de kaynaklanmaktadır ve bu durum anjiyogenez, invazyon ve metastaz ile sonuçlanır (6). Bu mikroçevre etkileşimlerini araştırmak üzere bir takım preklinik transgenik fare modelleri ve daha az ortotopik ksenografting fare modelleri mevcuttur (7). İmmün

yetmezliği olan farelerin prostat glandına insan prostat kanserinin ortotopik implantasyonu, prostat kanseri araştırmalarında hayati öneme sahiptir. Bu modeller sayesinde, metastazdan sorumlu bazı genlerin biyolojik fonksiyonlarını araştırmak mümkün olmuştur (8). Yine bu modeller, lenf nodu metastazı ve tümör çoğalması üzerine yeni deneysel ilaçların tedavi edici etkilerini araştırmak için ideal çalışma ortamı sağlarlar. Transgenik fare modellerin tersine bu modeller, orijinal tümörlerin büyüme ve histopatolojik özelliklerini koruduğu için değişik moleküler ve genetik olarak değiştirilmiş tümör hücrelerinin tümör mikroçevre etkileşimlerini araştırmak için faydalıdır (9). Ektopik deri altı tümör modellerine göre bu OX modeller, tümör hücrelerinin fenotipini etkileyen tümör mikroçevresini daha iyi oluştururlar. Böylece, prostat kanserinin araştırılmasında, insan prostat kanseri fare AP-OX modelleri transgenik fare modellerini tamamlayıcı bir rol oynarlar.

### **NHPrE1- ve BHPrE1-Temelli Doku Rekombinasyon Ksenografting Model**

Prostat kök ve progenitör hücrelerinin kendini yenileme ve çoklu farklanmasını anlamak, kanserin başlama ve ilerleme mekanizmalarını araştırmak açısından çok önemli olsa da bu hücrelerin fonksiyonlarını değerlendirecek stabil benign hücre dizileri yeterli değildir. Doku rekombinasyon tekniği ise, prostatın fonksiyonel yeniden yapılanmasını çalışmak için ideal bir yöntemdir. BPH-1'i içeren ölümsüz insan prostat epitel hücre serilerinin insan prostatik dokularının fonksiyonlarını önemli kısımlarını gösterdiği saptanmıştır (10). BPH-1'in, doku rekombinantlarında sıklıkla skuamöz farklılaşma göstermesi önemli bir dezavantajdır. Bunun için progenitör hücreleri yansıtacak NHPrE1 ve intermediate epitel hücreleri yansıtacak BHPrE1 hücre serileri geliştirilmiştir (11). Yine, insan prostat epitelyal kök hücrelerinin, "rat"ın embriyonik ürogenital sinüs membranı ile rekombinasyonu sonrasında *in vivo* koşullarda kök hücre özelliklerini değerlendirme şansı doğmuştur.

NHPrE1- ve BHPrE1-temelli doku rekombinasyon ksenografting modelinde genetik mühendislikten yararlanılır. Prostat kanseri araştırmaları için mevcut hücre serilerinin sayısını arttırmak zordur. Nedeni tümör hücrelerinin *in vitro* koşullarda uzun süre hayatta kalamamasıdır. Bu nedenle yetişkin kök ve progenitör hücreler stroma içermeyen üç boyutlu matrikse yerleştirilir ve kendi başlarına organize olmaları sağlanır. Böylece bu üç boyutlu kültürlerde, kök ve progenitör

hücrelerin hayatta kalması, farklılaşması ve çoğalması sağlanır (12). Bu organoidler, doğal epitelin biyolojik karakteristiklerinin geleneksel hücre dizilerinden daha iyi sağlarlar. Organoidler normal prostat epitel ya da kanser hücrelerinden oluşturulabilir. Lumen ve bazal hücreleri içeren adenoid yapı oluştururlar, genişleyebilirler ve androjen reseptörü içerirler. Organoidler genetik olarak stabil olup kontrol edilebilirler. Organoid kültürün bir dezavantajı, normal doku ya da erken tümörlere oranla ilerlemiş kanserlerin kültür koşulları ve azalmış epitelyal bütünlük nedeniyle daha kötü büyümesidir. Oysa erken tümörlerden hazırlanan organoidlerde başarı oranı diğer hücre dizilerinden ya da hasta kökenli ksenograftlardan daha başarılıdır (13).

Hasta kökenli ksenograft modelde, prostat kanser dokulara farelere implante edilir. İlaç deneyleri için klinik öncesi modeller genelde prostat kanseri hücre dizisinin immün yetmezlikli fare enjeksiyonu üzerine kuruludur. Ancak hücre dizilerinin *in vitro* koşullarda uzun süre kültürde bekletilmesi, klinik ile ilişkili heterojenitenin kaybolmasına ve hücre tiplerinin homojen olmasına neden olmaktadır (14). Ayrıca hücre dizisinden hazırlanan ksenograftlar, orijinal prostat kanserlerinin nadiren yapısal mimarisini gösterdiğinden kanser hücrelerinin tümör mikroçevresini oluşturamaz. Oysa teoride, prostat kanserli olgulardan alınan tümör parçalarının immün yetmezlikli farenin böbrek kapsülü altına doğrudan transplante edilmesi ile bu sorun aşılmış olur (15). Bu modeller ile prostat kanserlerinde, anjiyogenez, kastrasyona dirençli kök hücrelerin tanımlanması, anti-androjen tedavilerinin etkileri, hücrelerin birbirleri ile ve kemikteki çevre doku ile etkileşimleri araştırılabilir. Mikroskobik düzeyde bu modeller orijinal tümörün stromal komponentlerini ve yapısal mimarisini içerir (16). Yine orijinal tümörün gen ekspresyonunu içeren moleküler karakteristiklerini yansıtır. Başlangıçtaki yüksek ilaç taramaları nedeniyle bu modeller *in vitro* kültürler için uygun değildir. Ancak ksenograftlar ile hücre dizileri arasındaki bu boşluk organoid kültürler ile doldurulmuştur. En önemli dezavantajı, insan immünitesinin fareden olmaması nedeniyle tümör konak arasındaki etkileşimi tam olarak yansıtamamasıdır. Aynı hastanın kemik iliği kök hücrelerinden oluşan immün sistemin fareler prostat kanseri ile beraber transplante edilmesi bir çözüm olabilir. Yine fareye enjekte edilen tümörlerin saptanabilir boyuta gelmesi için 4-8 hafta gibi bir bekleme süresinin olması da diğer bir problemdir. Transplantasyon bölgesinin kötü vaskülarizasyonu da bu modellerin oluşturulma başarısını azaltmaktadır.

### Kolorektal Kanselerler

Kolorektal kanselerler, insanda görülen üçüncü en sık kanserdir. Kromozomal karasızlık bu kanselerlerin karsinogenezinde önemli rol oynar. Prostat kanserinde olduğu gibi bu tümörlerin araştırılmasında yaygın olarak hücre, doku kültürleri ve hayvan deneyleri ve *in vivo* görüntüleme kullanılmaktadır.

*In vitro* modeller, hücre dizilerinden oluşur. İlaç keşifleri her tümörde olduğu gibi önce insan ve fare hücre dizilerinde başlar. Bu iki boyutlu kültürle üç boyutlu organoid sistemler de eklenmiştir.

İnsan hücre dizilerine bakıldığında, 1951'de HeLa servikal kanser dizisi elde edildiğinden beri hücre dizileri tümörlerde sinyal yollarını araştırmak için önemli rol oynamıştır. Çıkarılan primer tümör hücrelere ayrılır ve plastik küçük kaplarda uygun besi yerinde kültüre bırakılır ve genomik olarak karakterize edilir. Aynı klondan oluşan bir topluluktur. Ucuz, pratik ve çabuk sonuç veren bir yöntemdir. Hücre dizileri genetik olarak değiştirilebilir. Klonal olduğu için orijinal tümörden farklılık gösterebilir. Hücre dizileri hedefe yönelik tedavi direncinden sorumlu insan kanselerlerinin fonksiyonel ve genetik heterojenitesini yansıtmazlar (17). Hücre dizileri arasında karşılıklı kontaminasyon olabilir. Yine bireysel hasta tümörlerinden hücre dizisi oluşturmak zordur ve tümörün köken aldığı normal dokudan hücre serisi oluşturmak bir problemdir.

Fare hücre dizileri de tümör araştırmalarında yaygın olarak kullanılır. Tümörün köken aldığı normal dokudan hücre serisi oluşturmak bir problemdir. Kolorektal kanser hücre dizileri fareden de elde edilebilir. Yaygın kullanılan iki tanesi, MC38 adenokarsinoma hücre dizisi (C57BL/6 faresinden elde edilir) ve CT26'dır (BALB/c faresinden elde edilir) (18,19). Kolay temin edilir, kolay kültürde ürer ve benzer genetik yapılı immün sistemi sağlam farelere cilt altı enjekte edilir. İnsan hücre dizilerine oranla fare kaynaklı hücre dizileri azdır. Daha az görülen mutasyon tiplerini içeren fare hücre dizileri mevcut değildir ve fare hücre dizileri, insan hücre dizileri kadar fonksiyonel ve genetik olarak karakterize değildir.

Fare organoidleri üç boyutlu doku kültürlerinde hazırlanır. Geleneksel tek tabaka hücre dizilerinin temel sorunu, normal barsak hücrelerinin kültüre edilememesidir. Bu nedenle kendini yenileyen kök hücre ve komşu Paneth hücrelerini içeren fare intestinal kriпти özel besiyeri içeren üç boyutlu kültür modelinde (kollajen matrisi içerir) üretilmektedir. Böylece kök hücre ve farklılaşmış hücre tiplerini içeren küçük barsaklar ya da organoidler sentezlenebilmekte ve 1,5 yıl süreyle kültüre edilebilmektedir (20).

İnsan organoidleri de fare organoidleri gibi üç boyutlu doku kültürlerinde hazırlanır. İnsan kolon barsak organoidleri, cerrahi rezeksiyonlardan, kolonoskopi örneklerinden ve hatta EphB2+ kök hücrelerinden hazırlanabilmektedir. Tümör örneklerinden organoid oluşturma oranı %90 civarındadır ve yine normal kolorektal doku organoidleri de üretilebilir. Organoidler tümör heterojenitesini göstermek için tümörün değişik bölgelerinden ya da metastazlarından hazırlanabilir.

### *In vivo* Transplant Modelleri

*In vivo* modeller ki en yaygın fare ksenograftıdır, tümör mikroçevresini, konak immün sisteminin yanıtını ve tedaviye tümör yanıtında anjiyogenez değerlendirmek için gereklidir. Hasta kökenli ksenograftlar ve ortotopik transplant modelleri de geliştirilmiştir.

Hücre dizisi ksenograftları yönteminde tümör hücreleri deney hayvanlarına enjekte edilir. İnsan kolorektal kanser hücrelerinin, immün yetmezlikli (atimik, şiddetli kombine immün yetmezlikli) farelerin deri altına enjeksiyonu sonrasında tümör burada büyür. En büyük sorun enjekte edilen tümör dizisinin insanlardaki orijinal tümörler gibi heterojenite gösterememesidir. Yine enjekte edilen farelerin immün yetmezlikli olması, tümör oluşumunda konak immün sistem yanıtının değerlendirilmesine izin vermez. Türler arası farklılık nedeniyle kanser hücreleri ile stromal hücreler arası etkileşimler değerlendirilemez. Yine tümör hücrelerinin enjekte edildiği deri altı, mikroçevre olarak intestinal sistemden çok farklıdır. Son olarak enjekte edilen kolorektal kanser tümör hücreleri, enjekte edildikleri yerde insan kanserinin histolojik özelliklerini göstermez. Bu nedenle ilaç yanıtları ksenograft modeller ile klinik uygulamalar arası farklılık göstermektedir (21). Bu sorunların bir kısmının üstesinden gelmek için transplant modelleri geliştirilmiştir.

Hasta kökenli ksenograftlarda ise tümör dokuları deney hayvanlarına nakledilir. Hastadan alınan kolorektal kanser parçaları immün yetmezlikli farelere implante edilir. Büyüyen tümör çıkarılıp bir başka fareye implante edilir. Böylece deney için gerekli fare sayısına ulaşıncaya kadar işlem tekrarlanır. Bu durumda tümör hücreleri ile birlikte tümör stroması da gelişir ve kanser hücresi ile çevre stroma arası etkileşimler de değerlendirilebilir hale gelir. Çünkü primer tümörün vaskülaritesi, yapısal mimarisi ve histolojisi korunur. Monoklonal ksenograftlara göre, bunlarda hücresel ve moleküler heterojenite daha belirgindir ve geleneksel ksenograftlara göre tedaviye klinik yanıt daha iyi

öngörülebilir (22). Her ne kadar bu yöntemle tümör geliştirme başarı oranı %70 olsa da kişiselleştirilmiş kanser tedavisi planlanmasında en önemli metotlardan biridir. Böylece tedavi rejimi belirlenmemiş değişik mutasyonların neden olduğu kanserler ile tedavi direnci gelişenlerde hasta bakımı açısından önemli bilgi sağlarlar. Bu yöntemin de bazı dezavantajları vardır. Geleneksel ksenograftlar gibi hasta kökenli ksenograftlar da immün yetmezlikli farelere implante edildiğinden tümör konak immün sistem arası etkileşimler değerlendirilemez. Başlangıçta implante edilen tümör kendi stromasını oluştururken zamanla fare stroması daha belirgin hale gelir. Yine tümör ekimi ve potansiyel tedavi taraması 6 veya daha fazla ay gerektirir.

Orthotopic Transplant Modellerinde ise tümör dokuları deney hayvanlarının prostat glandına uygulanır. Geleneksel ya da hasta kökenli ksenograftların deri altına implante edilmesi, deri altı yağlı dokunun mikroçevresinin kolonunkinden belirgin farklı olması nedeniyle büyük bir dezavantajdır. Bu nedenle ksenograftların doğrudan çekum serozasına enjekte edilmesi ile ortotopik ksenograft transplant modelleri de geliştirilmiştir. Böylece primer tümör ve lenf nodu karaciğer ya da akciğer metastazları değerlendirilebilir. Kolonoskopi ile tümör büyümesi ve tedavi yanıtı seri biyopsiler ile değerlendirilebilir. İntestinal organoidler de kolona transplante edilebilir. Ek bilgi olarak farelerde kanser, karsinogenler ya da genetik mühendislikle oluşturulabilir.

### Görüntüleme Teknikleri

Onkolojide girişimsel olmadan *in vivo* görüntüleme, primer tümörün kütlesi/hacmi, metastazların yeri ve sayısı, glukoz, protein ve yağ asit metabolizması, hücre çoğalması, gen ekspresyonu, membran antijen ekspresyonu, tümör anjiyogenezi, hipoksi ve apoptozis konuları üzerine yoğunlaşmıştır (23). Küçük hayvan görüntüleme, hastalığın başından ilerlemesine ve tedavi yanıtının değerlendirilmesine kadar hastalığın tüm evrelerinin değerlendirilmesini mümkün kılar. Yine biyolojik sistemlerde oluşan, immünolojik, hormonal, besinsel değişkenlerden etkilenen karışık biyokimyasal ve fizyolojik süreçlerin araştırılması ancak canlı hayvanlarda mümkün olur. Bu araştırmaları *ex vivo* hücre ve doku kültürlerinde araştırmak mümkün değildir. Görüntüleme tekniklerinin en büyük avantajı ise her hayvan kendi kontrol grubunu oluşturduğundan bir çalışma için gerekli hayvan sayısını azaltır ve biyolojik değişkenliği azaltır. Yine hayvan diseksiyonu, kesit alma gibi invazif, zaman alan işlemlere gerek kalmaz. Ayrıca hayvan görüntüleme

ile elde edilen bilgi, uygun klinik ortamda insan için yorumlanabilir (24).

Genomik, proteomik ve nanoteknolojileri değerlendirmek için farklı görüntüleme metotları arasında, pozitron emisyon tomografi ve "tek foton emisyon bilgisayarlı tomografi", optik görüntüleme, bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans görüntüleme, manyetik rezonans spektroskopisi görüntüleme ve ultrasonografi sayılabilir (25). Farklı çalışma prensiplerini kullanan bu görüntüleme yöntemleri genelde preklinik koşullarda laboratuvar hayvanlarını görüntüleme için kullanılır. Hücre ve doku düzeyindeki görüntülemelerde ise mikroskobik ve makroskobik otoradyografi tercih edilir.

Mikroskobik otoradyografi ile hücre dizileri ve doku kesitlerindeki radyonüklid işaretli moleküler problemlerin görüntülenmesi yapılır. Hücre düzeyinde ve hücre altı düzeylerde biyodağılım çalışmalarını değerlendirmek için yapılan bir görüntüleme yöntemidir. Her ne kadar mikroautoradyografinin oldukça farklı yapıma yöntemleri olsa da genel olarak temel prensipler aşağıda anlatıldığı gibidir. Bu yöntemde, biyodağılımı çalışılacak radyoaktif işaretli (H-3, C-14, S-35 ve I-125) molekül deney hayvanlarına enjekte edilir. Belirli bir süre sonra denek sakrifiye edilir ve denekten alınan doku parçaları diseke edildikten sonra sıvı nitrojen, kuru buz veya hexane kuru buzunda çok çabuk dondurulur. Dondurmadaki amaç, biyodağılımı araştırılacak molekülün biyolojik sıvılar içinde yer değiştirmesini önlemektir. Dondurulmuş örneklerden, -20 derecede çalışan ve 5-10 mikrometrelik kesitler alabilen kriomikrotom ile örnekler alınır. Radyoaktif işaretli biyolojik molekül içeren doku kesitlerin fotoğrafik emülsiyon ile kaplanmasında birkaç teknik vardır. İlki, mikroskobik lam önce fotoğrafik emülsiyona batırılıp çıkarılır ve havada kurutulur. Örnek daha sonra üzerine yerleştirilir. İkincisinde ise örnek lama konur ve fotoğrafik emülsiyona batırılıp örnek emülsiyon ile kaplanır. Son yöntem olarak kurutulmuş çok ince bir film tabakası lama yerleştirilmiş örneğin üstüne konur. Genelde emülsiyon kalınlığı 3-10 mikrometre olup emülsiyon içindeki oluşan gümüş tanelerinin boyutu ise 0,2-0,5 mikrometredir. Hangi metot kullanılıyor olursa olsun amaç örnek ile emülsiyon arasında en yakın teması sağlamaktır. Daha sonra bu kesitler ışık geçirmez kutu içinde derin dondurucuda inkübasyona bırakılır. İnkübasyonun amacı, biyolojik molekülün sahip olduğu çok düşük düzeydeki radyasyon ile fotoğrafik katmanın etkileşmesi için yeterli sürenin verilmesidir. Radyoaktif işaretli molekülün gelen radyasyon kendine en yakın gümüş halid kristallerinde

oluşturduğu yapısal değişiklik kimyasal reaksiyonlar sonrası siyah bir nokta daha doğrusu bir noktalar dizisi oluşturur. Çünkü radyoaktif işaretli molekülden gelen ve genelde en yaygın kullanılan beta radyasyonu sahip olduğu kinetik enerji nedeni ile fotoğrafik emülsiyonda birden fazla gümüş halid kristalinde değişiklik yaptığı için emülsiyonda yol aldığı mesafe ve bu mesafe içinde etkileştiği kristaller tek bir noktadan ziyade noktalar serisi olarak izlenir. Böylece biyodağılımı araştırılacak molekülün hücrenin hangi bileşeninde biriktiği mikroskopta izlenen siyah noktalar sayesinde kolayca belirlenir. İnkübasyon sonrası fotoğrafik emülsiyon kimyasal reaksiyonlardan geçirilip ışık mikroskobu ile incelenmeye alınır. Böylece biyodağılımı araştırılacak radyoaktif işaretli molekülün hangi dokularda birikim gösterdiği ışık mikroskopunda izlenen siyah noktalar sayesinde kolayca anlaşılır. Örnek istenirse histopatolojik boyalar ile de immünohistokimyasal olarak boyanabilir.

Mikrootoradyografide diğer bir teknik ise biyodağılımı çalışılacak molekül uygun radyoaktif ajan ile işaretlendikten sonra, işaretli bileşik hücre kültürüne konur. Belirli bir inkübasyon sonrası hücre kültüründeki hücreler lama yayılıp fikse edilir. Daha sonra bu hücreler fotoğrafik bir emülsiyon ile kaplanıp bir süre soğukta inkübasyona bırakılır. Bu süre kullanılan radyoaktif ajana, biyodağılımı çalışılacak moleküle ve kullanılan donanımına göre değişkenlik gösterir. İnkübasyon süresi sonrası fotoğrafik emülsiyon ile kaplı lam aynı ticari fotoğrafıcılıkta olduğu gibi kimyasal “developing” ve “fixation” işlemlerinden geçirilir. Daha sonra örnekler ışık mikroskobu ya da gerekli alt yapı hazırlanır ise elektron mikroskobu altında incelenir.

Radyonüklid işaretli moleküler problemlerin biyodağılım çalışmaları hayvanlarda makroskobik otoradyografi ile değerlendirilir. Orijinal teknikte fotoğrafik emülsiyonlar kullanılsa da bugün tüm vücut otoradyografiler, yüksek uzaysal rezolüsyon sağlayan, dokulardan doğru, sayısal ve görsel bilgi sağlayan otoradyoluminografi tekniği ile yapılmaktadır. Duyarlılığı ve rezolüsyonu makroskobik otoradyografiye göre düşüktür. Genelde fare ile maymun arasında değişen büyüklüklerdeki deney hayvanlarında biyodağılım çalışmalarını araştırmak için yapılır. Tüm vücut otoradyografi de denebilir. Bunun için biyodağılım çalışması yapılacak biyolojik molekül uygun bir radyoaktif ajan ile işaretlenir. İşaretli bileşik deney hayvanına enjekte edildikten sonra biyolojik molekülün araştırılan kinetik zamanı gelince deney hayvanı sakrifiye edilir. Sonra denek bedeni hexane

kuru buz banyosunda 5-15 dakika süre ile dondurulur. Denekleri çabucak dondurulmasındaki amaç, biyolojik molekülün vücut sıvıları içinde yer değiştirmesinin ya da işlem süresince bağlandığı yerlerden ayrılmasını engellemektir. Farklı sayıda denekler farklı zaman dilimlerinde sakrifiye edilerek bu çalışma birkaç aşamada yapılırsa, biyodağılımı araştırılacak molekülün konsantrasyon zaman eğrileri elde edilebilir. Sonra denek sıvı karboksimetil selüloz isimli özel bir karışımın içine yatırılarak tekrar dondurulur. Soğuk koşullar korunarak mikrotom adı verilen özel kesiciler kullanılarak denekten istenilen kalınlıkta doku örnekleri ki, genelde 20-50 mikrometre kalınlığındadır, alınır. Alınan örnekler fotoğrafik emülsiyon kaplı filmin üstüne yatırılıp derin dondurucuda inkübasyona bırakılır. Bu inkübasyon süresi birkaç hafta-ay arasında değişir. İnkübasyon süresi sonrası film kimyasal reaksiyona maruz bırakılır ve filmler banyo edildikten sonra değerlendirmeye alınır. Sayısal değerlendirme yapmak için önceden konsantrasyonları belirlenmiş radyoaktif normal örnekler hazırlanıp doku ile birlikte çalışma başında filme konulur. Böylece film incelenirken bu konsantrasyonu bilinen normaller temel alınarak yarı sayısal biyodağılım bilgilerine ulaşılmış olur. Makrootoradyografide sayısal değerlendirme için her zaman fotoğrafik emülsiyon kaplı filmler kullanılmaz. Bunun için özel olarak tasarlanmış otomatik cihazlar da kullanılabilir. Genelde bu cihazların gaz karışımı içeren deteksiyon bölmeleri mevcuttur. Kriyomikrotom ile kesitleri alınmış denek özel kasetlere konularak sistemin gaz dedektörü içine yerleştirilir. Elde edilen dijital görüntü özel yazılımlar sayesinde daha güvenilir bir şekilde analiz edilerek daha doğru biyokinetik sonuçlara ulaşılır. Sayısal değerlendirme yapabilmenin diğer bir yolu ise, dehidrate edilmiş denek, fosfor görüntüleme plakasına radyoaktif kalibrasyon standartları ile birlikte, yatırılarak otoradyoluminografi yapmaktır. Bunun için fosfor görüntüleyen ekranlar kullanılır, çünkü daha kısa sürede sayısal sonuçlar veren nispeten yeni teknolojidir. Radyoaktif sinyal ekrandaki floransı aktive ederek gizli bir görüntü oluşturur. Radyasyonun yoğunluğu doğrusal olarak işaretlenme yoğunluğunda artışa yol açar. Bu da sayısal değerlendirmeyi kolaylaştırır. İnkübasyon süresi otoradyoluminografide genelde 4-7 gündür. Fosfor görüntüleme plakaları daha sonra fosfor görüntüleme cihazında görüntülenerek dijital görüntüler elde edilir.

Prostat kanserinin yönetiminde, risk sınıflaması, tedavi seçimi, tedavi yanıtını değerlendirme ve prognoz tayini için kullanılan teknikler ideal değildir. Moleküler görüntüleme ise tümör biyolojisine ışık

tutan yöntem olduğundan giderek yaygınlaşmaktadır. Prostat kanserinde moleküler görüntüleme, malign ve malign olmayan dokularda birbirlerinden farklı olduğu için, hücre metabolizmasının görüntülenmesi esasına dayanır. Kolin, asetat glukoz, amino asitler, amino asit analogları (leucine, methionine, tryptophan gibi) ve nükleotidler bu tümörün görüntülenmesinde kullanılan metabolik işaretli substratlardır. Özgül olmadıkları için enflamatuvar yanıtlarda, bazı benign lezyonlarda ve prostat dışı malignitelere de tutulum gösterebilirler.

### Kolin

Ökaryotik hücrelerin membranlarının yapısal elemanlarından sfingomiyelin ve fosfatidil kolinin hidrofilik kısımlarında bulunduğundan hücre büyümesi için gerekli bir yapı taşıdır. Yine metiyonin sentezine girer ve asetilkolin sentezi için gereklidir. Hidrofilik pozitif yükü nedeniyle hücreye bir taşıyıcı ile alınır. Meme, prostat, akciğer ve kolorektal kanserlerde kolin kinaz aktivitesi artmıştır (26). Prostat kanserinde kolin tutulumu androjen varlığına duyarlı iken anoksik koşullarda tutulumu azalır (27). C-11 işaretli kolin, F-18 işaretli kolin ve F-18 işaretli floretikolin olmak üzere prostat kanseri görüntülenmesinde üç formu vardır. Pankreas, karaciğer, böbrekler, lakrimal ve tükürük bezlerinde yüksek oranda tutulum gösterirken barsak ve kemik iliğinde değişik oranda tutulum gösterebilir. F-18 kolin intravenöz uygulama sonrası 5 dakika içinde kandan temizlenir ve renal yolla atılır. Üriner atılım nedeniyle, enjeksiyondan 2 ve 30 dakika sonra olmak üzere iki kez görüntüleme yapılır ve zamanla artış malign, azalma ise benign prosesleri düşündürür. Yeni tanı almış olgularda evreleme amacı ile kullanılsa da orta ve yüksek riskli olgularda pelvik lenf nodu saptanmasında duyarlılığı %49, özgüllüğü ise %95 olarak hesaplanmıştır (28). Rekürrenlerde ise prostat yatağındaki nüksleri saptamada duyarlılığı %75, özgüllüğü %82, lenf nodlarındaki metastazların gösterilmesinde ise duyarlılığı %100, özgüllüğü %92 olarak rapor edilmiştir (29). Literatürde, kolorektal kanser ve metastazlarının da F-18 işaretli kolin ile görüntülediği vaka bildirileri mevcuttur.

### Asetat

Basit ama enerji metabolizmasının temel organik bir anyonudur (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>). Ayrıca yağ asitlerinin sentezinde ortak yapı taşıdır. Membran taşıyıcıları ile hücreye alındıktan sonra asetil koenzim A'ya dönüştürülüp enerji metabolizmasına (krebs siklusu) girer. Yine asetil koenzim A ve metaboliti malonil koenzim A, yağ asitlerinin

sentezinde rol alır ve hücre membranındaki fosfolipit ve glikolipitlerin yapısına girer. Kolesterol biyosentezinin de temel bileşenidir. Prostat kanserinde de artmış yağ asit sentezinin temel bileşeni olarak tutulumu artar ve bu artış androjenden bağımsızdır (30,31). Fizyolojik biyodağılımı, kalp, karaciğer, böbrekler, tükürük bezleri, pankreas, dalak, ince barsak, kemik iliği ve iskelet kası şeklindedir. C-11 ve F-18 işaretli asetat olmak üzere iki formu da mevcuttur ve enjeksiyondan 5 ile 15 dakika arasında görüntüleme yapılır. C-11 işaretli asetat karbondioksit dönüştürülüp akciğerlerden atılırken, F-18 asetat üriner yolla atılır. Prostat kanserine özgül olmayıp, benign tümörler, enflamasyon ve diğer kanserler gibi hipermetabolik dokularda da tutulum gösterir. Prostat hiperplazisinde de tutulum gösterdiği için tanıda, düşük PSA düzeylerinde tutulum düzeyi yeterli olmadığından erken rekürrenslerin saptanmasında kullanımı sınırlıdır (32).

### Glukoz

F-18 işaretli formu (FDG) bir glukoz analogu olup aynı glukoz gibi davranır. Transmembran proteinleri ile taşınır ve heksokinaz ile fosforlanır ama metabolize olmaz. Prostat kanserinde FDG tutulumu tümörün diferansiyasyonuna, tümörün androjen bağımlılığına ve tümör hipoksisine bağımlıdır (33). Prostat kanserinde düşük tutulum göstermesi, normal ve anormal prostat dokusunda tutulumu yönünden belirgin örtüşme olması nedeniyle yeni tanı ve lokal evrelemede kullanımı sınırlıdır. Biyokimyasal nüks olgularında ise FDG'nin duyarlılığı, kolin ve asetata oranla düşüktür (34). Kastrasyona dirençli prostat kanserli olgularda prognoz tayini yönünden faydalı olacak gibi görünmektedir. Kolorektal kanserlerin tanı evreleme, tedavi yanıtı değerlendirme ve nükslerin saptanmasında F-18 işaretli deoksiglukozun başlıca tercih edilen görüntüleme ajanıdır.

### Lözin

Esansiyel bir aminoasittir. Messenger RNA translasyonunu, ribozomlarda sentezi, otofajiyi ve hücre metabolizmasını kontrol eden rapamisin (mTOR) aktivatörüdür. Prostat kanserinde bu yolak bozulur ve tümörün androjen bağımsızlığına ve progresyonuna neden olur (35). L-lözin membran taşıyıcıları inhibe edilirse prostat kanserinde spontane gerileme izlenir. Anti-1-amino-3-[18F]Fluorocyclobutane-1-Carboxylic Acid (Anti-[18F] FACBC) işaretli sentetik lözin analogudur. Yoğun karaciğer ve pankreas, daha az yoğun tükürük

bezleri, hipofiz, barsak ve kemik iliğinde tutulum görülür. Kaslarda metabolize olduğu için zamanla kas tutulumu artar ve üriner atılım minimaldir. Enjeksiyondan 3 dakika sonra görüntülemeye başlanılır. Prostat kanserine özgül olmayıp, benign prostat hiperplazisinde, enflamasyonda ve benign tümörlerde de tutulum gösterebilir.

### Metiyonin

Memeli hücrelerinin normal büyüme ve gelişmesi için gerekli, sülfür içeren ve metabolitleri biyokimyasal süreçlerde majör metil vericisi olan esansiyel bir aminoasittir. Protein ve glutatyon sentezine katılır. C-11 methionin prostat kanserinin görüntülenmesinde kullanılan formudur (36). İntravenöz olarak enjekte edildikten sonra kandan hızla kaybolur ve pankreas, karaciğer, tükürük bezleri, tonsiller, kemik iliği, testis ve miyokardiyumda fizyolojik olarak tutulur. Üriner atılımı yoktur.

### Triptofan

5-Hidroksitriptamin prokürsörü olup esansiyel bir amino asittir ve protein sentezine de katılır. Normal prostat glandında serotonin içeren nöroendokrin hücreler bulunur. Yüksek dereceli prostat kanserlerinde de bu hücreler bulunur ve kastrasyona dirençli formlarda ise çok yüksek oranda saptanırlar (37). C-11 serotonin'in kastrasyona dirençli metastatik prostat kanserinde bütün metastatik odaklarda tutulum gösterdiği rapor edilmiştir (38).

Ayrıca nükleik asitlerin temel yapı taşı olan nükleozidlerden F-18 florotimidin değişik kanserlerin görüntülenmesinde değeri araştırılsa da prostat kanserinin görüntülenmesinde kullanılmamıştır. Ancak bir analogu olan, F-18-fluoro-methyl-arabinofuranosyl-uracil (FMAU), prostat kanserinde kullanılmıştır (39). Florotimidine oranla kemik iliği tutulumu ve üriner atılımı daha azdır.

Prostat hücrelerinin çoğalmasını sağlayan androjenler prostat kanserinin de patogenezinde rol oynar. Prostat kanserinin her evresinde hatta kastrasyona dirençli tiplerinde bile androjen reseptörlerinin sayısı artar. 5a-dihydrotestosterone'un yapısal analogu 18F-Dihydrotestosterone (FDHT) intravenöz olarak uygulandıktan sonra normal testosteron ile yarışarak seks hormonu bağlayan globüline bağlanır ve hücre membranlarından difüze olup sitozolik reseptörlerine bağlanır ve çekirdekteki hedefine gider. Yarı ömrü 1-2 saat olup karaciğer ve renal yolla atılır. Pankreas, adrenaller, ince barsak ve kemik iliğinde de düşük düzeyde tutulum gösterir. Bu ajan en iyi halle androjen reseptör düzeyini

tüm vücut düzeyinde göstermede ve kastrasyona dirençli olgularda prognoz tayini gibi konularında faydalı gibi görünmektedir (40).

### Prostata Özgü Membran Antijeni (Glutamate Carboxypeptidase II) (PSMA)

Prostat epitel hücreleri (diğer dokulara oranla 100-1000 kat fazla), ince barsak, renal tubuler hücreler, çölyak gangliyon ve tükürük bezlerinde bulunan bir transmembran glikoproteindir. Androjenler prostat glandındaki PSMA düzeyini azaltsa da kastrasyona dirençli olgularda düzeyleri çok yüksektir (41). Bu reseptöre ligand bağlandığında, ligand ile birlikte reseptör internalize olur ve endozomal geri dönüşüm sisteminin bir parçası olur. Bu özellik, prostat kanseri görüntüleme ve tedavisinde çok önemlidir. Bu reseptörün hücre dışı kısmına bağlanan antikor (J591) ve diğer enzim inhibitörleri ve diğer ligandlar Zr-89 ve Ga-68 gibi radyonüklidler ile işaretlenerek primer tümör görüntülenmesinde ve tedavi sonrası biyokimyasal nükslerde metastatik odakların gösterilmesinde faydalı bilgiler sağlamaktadır.

### Gastrin Salgılayan Peptid Reseptörü

Normal prostat glandında nadir bulunan bu reseptör diğer bazı tümörlerde olduğu gibi prostat kanserlerinin tümör hücre membranlarında da sayısı artar. Bu reseptör agonistleri bağlandıktan sonra hücre içine alınırken, antagonistler membran reseptörüne bağlı olarak kalmaktadır. Bu ajanlar Ga-68, F-18, Cu-64, In-111 ve Lu-177 gibi birçok radyonüklid ile bağlanabilmektedirler. 64Cu-CB-TE2AAR0 kodlu gastrin salgılayan reseptör antagonisti ajanlar ile yapılan klinik görüntülemelerde, ajanın çok çabuk kandan temizlendiği ve üriner yolla atıldığı saptanmıştır. Pankreasta belirgin, karaciğer, kolon ve dalakta ise daha düşük düzeyde fizyolojik tutulum göstermektedir (42).

Kolorektal kanserlerde, araştırma amaçlı yukarıdaki metabolik problemlerin da, prostat kanserinde olduğu gibi görüntüleme değerleri vardır ve kullanılabilir. Literatürde serilerden ziyade olgu sunumu tarzında olgular bildirilmiştir.

Sonuç olarak, "Hayatta en gerçek yol gösterici ilimdir ve bilimdir. Bunların dışında yol gösterici aramak cahilliktir (M. Kemal ATATÜRK)".

**Finansal Destek:** Yazar tarafından finansal destek alınmadığı bildirilmiştir.



## Kaynaklar

- Centenera MM, Raj GV, Knudsen KE, Tilley WD, Butler LM. Ex vivo culture of human prostate tissue and drug development. *Nat Rev Urol* 2013;10:483-487.
- Yoshimoto M, Cutz JC, Nuin PA, et al. Interphase FISH analysis of PTEN in histologic sections shows genomic deletions in 68% of primary prostate cancer and 23% of high-grade prostatic intra-epithelial neoplasias. *Cancer Genet Cytogenet* 2006;169:128-137.
- Cuzick J, Yang ZH, Fisher G, et al. Prognostic value of PTEN loss in men with conservatively managed localised prostate cancer. *Br J Cancer* 2013;108:2582-2589.
- Huang Y, Cheng C, Zhang C, et al. Advances in prostate cancer research models: From transgenic mice to tumor xenografting models. *Asian J Urol* 2016;3:64-74.
- Coleman RE. Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clin Cancer Res* 2006;12:6243-6249.
- Corn PG. The tumor microenvironment in prostate cancer: elucidating molecular pathways for therapy development. *Cancer Manag Res* 2012;4:183-193.
- Park SI, Kim SJ, McCauley LK, Gallick GE. Pre-clinical Mouse models of human prostate cancer and their utility in drug discovery. *Curr Protoc Pharmacol* 2010.
- Hafeez BB, Zhong W, Fischer JW, et al. Plumbagin, a medicinal plant (*Plumbago zeylanica*)-derived 1,4-naphthoquinone, inhibits growth and metastasis of human prostate cancer PC-3M-luciferase cells in an orthotopic xenograft mouse model. *Mol Oncol* 2013;7:428-439.
- Park SI, Zhang J, Phillips KA, et al. Targeting SRC family kinases inhibits growth and lymph node metastases of prostate cancer in an orthotopic nude mouse model. *Cancer Res* 2008;68:3323-3333.
- Hayward SW, Dahiya R, Cunha GR, Bartek J, Deshpande N, Narayan P. Establishment and characterization of an immortalized but non-transformed human prostate epithelial cell line: BPH-1. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1995;31:14-24.
- Jiang M, Strand DW, Fernandez S, et al. Functional remodeling for benign human prostatic tissues in vivo by spontaneously immortalized progenitor and intermediate cells. *Stem Cells* 2010;28:344-356.
- Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* 2014;345:124-125.
- Sachs N, Clevers H. Organoid cultures for the analysis of cancer phenotypes. *Curr Opin Genet Dev* 2014;24:68-73.
- Lin D, Wyatt AW, Xue H, et al. High fidelity patient-derived xenografts for accelerating prostate cancer discovery and drug development. *Cancer Res* 2014;74:1272-1283.
- Choi SY, Lin D, Gout PW, Collins CC, Xu Y, Wang Y. Lessons from patient-derived xenografts for better in vitro modeling of human cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 2014;79:222-237.
- Garber K. From human to mouse and back: 'tumorgraft' models surge in popularity. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:6-8.
- Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;366:883-892.
- Corbett TH, Griswold DP Jr, Roberts BJ, et al. Tumor induction relationships in development of transplantable cancers of the colon in mice for chemotherapy assays, with a note on carcinogen structure. *Cancer Res* 1975;35:2434-2439.
- Brattain MG, Strobel-Stevens J, Fine D, et al. Establishment of mouse colonic carcinoma cell lines with different metastatic properties. *Cancer Res* 1980;40:2142-2126.
- Sato T, Stange DE, Ferrante M, et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* 2011;141:1762-1772.
- Voskoglou-Nomikos T, Pater JL, Seymour L. Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models. *Clin Cancer Res* 2003;9:4227-4239.
- Hidalgo M, Bruckheimer E, Rajeshkumar NV, et al. A pilot clinical study of treatment guided by personalized tumorgrafts in patients with advanced cancer. *Mol Cancer Ther* 2011;10:1311-1316.
- Cunha L1, Horvath I, Ferreira S, et al. Preclinical imaging: an essential ally in modern biosciences. *Mol Diagn Ther* 2014;18:153-173.
- Weissleder R, Mahmood U. Molecular imaging. *Radiology* 2001;219:316-333.
- Grassi R, Lagalla R, Rotondo A. Genomics, proteomics, MEMS and SAIF: which role for diagnostic imaging? *Radiol Med* 2008;113:775-778.
- Ramírez de Molina A, Gutiérrez R, Ramos MA, et al. Increased choline kinase activity in human breast carcinomas: clinical evidence for a potential novel antitumor strategy. *Oncogene* 2002;21:4317-4322.
- Hara T, Bansal A, DeGrado TR. Effect of hypoxia on the uptake of [methyl-3H]choline, [1-14C] acetate and [18F] FDG in cultured prostate cancer cells. *Nucl Med Biol* 2006;33:977-984.
- Evangelista L, Guttilla A, Zattoni F, Muzzio PC, Zattoni F. Utility of choline positron emission tomography/computed tomography for lymph node involvement identification in intermediate- to high-risk prostate cancer: a systematic literature review and meta-analysis. *Eur Urol* 2013;63:1040-1048.
- Evangelista L, Zattoni F, Guttilla A, et al. Choline PET or PET/CT and biochemical relapse of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Nucl Med* 2013;38:305-314.
- Vävere AL, Kridel SJ, Wheeler FB, Lewis JS. 1-11C-Acetate as a PET radiopharmaceutical for imaging fatty acid synthase expression in prostate cancer. *J Nucl Med* 2008;49:327-334.
- Emonds KM, Swinnen JV, Lerut E, Koole M, Mortelmans L, Mottaghy FM. Evaluation of androgen-induced effects on

- the uptake of [18F]FDG, [11C]choline and [11C]acetate in an androgen-sensitive and androgen-independent prostate cancer xenograft model. *EJNMMI Res* 2013;3:31.
32. Mohsen B, Giorgio T, Rasoul ZS, et al. Application of C-11-acetate positron-emission tomography (PET) imaging in prostate cancer: systematic review and meta-analysis of the literature. *BJU Int* 2013;112:1062-1072.
  33. Wibmer AG, Burger IA, Sala E, Hricak H, Weber WA, Vargas HA. Molecular Imaging of Prostate Cancer. *Radiographics* 2016;36:142-159.
  34. Yu CY, Desai B, Ji L, Groshen S, Jadvar H. Comparative performance of PET tracers in biochemical recurrence of prostate cancer: a critical analysis of literature. *Am J Nucl Med Mol Imaging* 2014;4:580-601.
  35. Burgio SL, Fabbri F, Seymour IJ, Zoli W, Amadori D, De Giorgi U. Perspectives on mTOR inhibitors for castration-refractory prostate cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2012;12:940-949.
  36. Nuñez R, Macapinlac HA, Yeung HW, et al. Combined 18F-FDG and 11C-methionine PET scans in patients with newly progressive metastatic prostate cancer. *J Nucl Med* 2002;43:46-55.
  37. Puccetti L, Supuran CT, Fasolo PP, et al. Skewing towards neuroendocrine phenotype in high grade or high stage androgen-responsive primary prostate cancer. *Eur Urol* 2005;48:215-221.
  38. Kälkner KM, Ginman C, Nilsson S, et al. Positron emission tomography (PET) with 11C-5-hydroxytryptophan (5-HTP) in patients with metastatic hormone-refractory prostatic adenocarcinoma. *Nucl Med Biol* 1997;24:319-325.
  39. Tehrani OS, Muzik O, Heilbrun LK, et al. Tumor imaging using 1-(2'-deoxy-2'-18F-fluoro-b-d-arabinofuranosyl) thymine and PET. *J Nucl Med* 2007;48:1436-1441.
  40. Vargas HA, Wassberg C, Fox JJ, et al. Bone metastases in castration-resistant prostate cancer: associations between morphologic CT patterns, glycolytic activity, and androgen receptor expression on PET and overall survival. *Radiology* 2014;271:220-229.
  41. Ross JS, Sheehan CE, Fisher HA, et al. Correlation of primary tumor prostate-specific membrane antigen expression with disease recurrence in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:6357-6362.
  42. Gornik G, Mansi R, Abiraj K, et al. Evaluation of the GRPR radioantagonist Cu-64-CB-TE2A-AR-06 in mice and men [abstr]. *J Nucl Med* 2011;52(Suppl 1):22.



# Klinik Öncesi Çalışmalarda Kullanılan Enfeksiyon Modelleri ve Görüntüleme Teknikleri

## Infection Models and Imaging Techniques Used in Preclinical Studies

© Aziz Gültekin<sup>1</sup>, © Funda Üstün<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye

<sup>2</sup>Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

### Öz

Enfeksiyon hastalıkları gelişmekte olan ülkelerde ölümlerin birinci nedenidir. Enfeksiyonun fizyopatolojisinin anlaşılması, doğru şekilde tedavi edilmesi ve tedavinin etkinliğinin değerlendirilebilmesi için küçük deney hayvanlarıyla prelinik çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalarda oluşturulan çeşitli enfeksiyon modelleri uygun yöntemlerle görüntülenmektedir. Enfeksiyon hastalıkları araştırmalarında moleküler görüntüleme yöntemleri anatomik görüntüleme yöntemleri ile birlikte sıklıkla kullanılmaktadır. Küçük hayvan modellerinin enfeksiyon görüntülemesinde özellikle anatomik ve fonksiyonel görüntülemeyi birlikte sunan hibrid görüntüleme yöntemleri tek foton emisyon bilgisayarlı tomografi/bilgisayarlı tomografi (SPECT/BT), pozitron emisyon tomografi/bilgisayarlı tomografi (PET/BT), PET/manyetik rezonans görüntüleme sıklıkla kullanılmış, bunun yanında, biyoluminesans görüntüleme de kullanılmıştır. Anatomik görüntüleme yöntemleri genellikle enfeksiyona sekonder olarak ortaya çıkan morfolojik değişiklikleri gösterdiğinden, fizyopatolojik süreci izlemede yetersizdir. Son yıllarda gerek görüntüleme teknolojisindeki gelişmeler, gerekse moleküler görüntüleme kullanılan yeni radyoaktif işaretli moleküllerin keşfi, enfeksiyon görüntülemesinde yeni ufuklar açmıştır. Bu gelişmeler ileride etkene yönelik kişiselleştirilmiş tedavileri gündeme getirecek, tedavi süreçleri de görüntüleme yöntemleri ile takip edilebilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** Küçük deney hayvanları görüntüleme, deneysel enfeksiyon modelleri, enfeksiyonda moleküler görüntüleme yöntemleri

### Abstract

Infectious diseases are the leading cause of death in developing countries. Preclinical studies are carried out with small experimental animals in order to understand the pathophysiology of the infection, to treat it correctly, and to evaluate the effectiveness of the treatment. In these studies, various infection models are created and displayed by appropriate methods. Molecular imaging methods used in research of infectious diseases, are frequently used together with anatomical imaging methods. Hybrid imaging methods single photon emission computerized tomography/computerized tomography (SPECT/CT), positron emission tomography/computerized tomography (PET/CT), PET/magnetic resonance imaging have been used frequently in small animal models, especially to present anatomical and functional imaging. In addition, bioluminescence imaging was also used. Anatomic imaging modalities are generally insufficient to follow the pathophysiological process as they show morphological changes secondary to infection. Recent advances in imaging technology and the discovery of new radiolabelled molecules used in molecular imaging have opened up new horizons for infection imaging. These developments will bring forth personalized treatments against the infectious agent in the future and the treatment processes can be followed up with imaging methods.

**Keywords:** Imaging of small experimental animals, experimental models of infection, molecular imaging methods in infection

### Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Dr. Aziz Gültekin, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye

**E-posta:** agultekin@pau.edu.tr **ORCID ID:** orcid.org/0000-0002-0311-8077

©Telif Hakkı 2019 Türkiye Nükleer Tıp Derneği / Nükleer Tıp Seminerleri, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.

## Giriş

Enfeksiyon hastalıkları gelişmekte olan ülkelerde ölümlerin birinci, dünya çapında ölümlerin önde gelen ikinci nedenidir. Enfeksiyonları etkili bir şekilde tedavi etmek için, patojenik mikroorganizmaların konakçı bağışıklık sistemi ile nasıl etkileştiğinin anlaşılması zorunludur (1,2). Küçük hayvan görüntülemesi, bulaşıcı hastalıkların klinik öncesi çalışmaları için önemli bir araştırma aracı haline gelmiştir. Çünkü bu yöntemler diğer uygulamalara göre noninvazivdir ve hayvanların kendisinin kontrol olarak kullanılması, kullanılacak hayvan sayısını azaltmaktadır. Deney hayvanları ile yapılacak boylamsal (longitudinal) çalışmalar (bir örneklemeden belirlenmiş zaman aralıklarında en az iki defa veri toplayarak yürütülen çalışmalar; nükleer tıptaki geç faz görüntülemeleri); aynı hayvanın seri ve ardışık görüntülenmesine olanak tanınması, değişen fizyolojik ve biyokimyasal parametreleri gözlemlenmesi ve lokalize etme imkanı sağlar. Görüntüleme çalışmalarındaki longitudinal gözlemlenmesi, enfeksiyon hastalıklarında hem tedaviye yanıtın değerlendirilmesini sağlar, hem de hastalıkların insanlardaki morbidite ve mortalitesinin gösterilmesi konusunda önemli bilgiler verir (3). Klinik öncesi araştırmalar içinde enfeksiyon hastalıklarında küçük hayvan görüntüleme çalışmaları hem enfeksiyonun patogenezinin anlaşılması hem de ilaç etkilerinin araştırılması için sıkça kullanılmaktadır. Son yıllarda küçük hayvan modelleri görüntülenmesinde özellikle anatomik ve fonksiyonel görüntülenmeyi birlikte sunan hibrid görüntüleme yöntemleri [tek foton emisyon bilgisayarlı tomografi/bilgisayarlı tomografi (SPECT/BT), pozitron emisyon tomografi/bilgisayarlı tomografi (PET/BT), PET/manyetik rezonans görüntüleme (MRG)] sıklıkla kullanılmış bunun yanında, MRG, biyoluminesans görüntüleme de (BLG) fazlaca kullanılmıştır. Enfekte küçük hayvan modellerinde görüntüleme uygulamalarının geliştirilmesinde, özellikle nükleer tıpta yeni moleküllerin keşfi ve rezolüsyonu daha yüksek küçük hayvan görüntülenmesine imkan tanıyan “mikro” cihazların üretilmesi temel araştırmaların hızla artmasına ve klinik uygulamalara hızla adapte edilmesine imkan tanımaktadır.

## Deney Hayvanlarında Oluşturulan Enfeksiyon Modelleri

Hayvan modeli; insanlara ait bir hastalıkta, insana herhangi bir zarar vermeden veya etik bir soruna neden olmadan, hastalığı daha iyi anlamaya, tedavi

yöntemlerini test etmeye yarayan çalışmaların yapıldığı deney hayvanlarında oluşturulan hastalık modelidir. Deney hayvanlarında, enfeksiyon süreçlerinin görüntülenebilmesi için uygun bir hayvanda enfeksiyon modeli oluşturulması gereklidir. Deney hayvanlarıyla çalışmanın evrensel (3R), yerel hukuki ve etik kuralları mevcuttur. Hayvanlarla deneysel çalışma yapabilmek için zorunlu kurslara katılmak ve sertifikaya sahip olmak gerekmektedir. Deney hayvanları ile çalışmanın temel prensipleri, doğru hayvan seçimi, anestezi, kan alma, enjeksiyon yöntemleri ve ilaç uygulama metodları eksiksiz öğrenilmiş olmalıdır. Tasarlanan enfeksiyon modelini oluşturmak için yerel etik kurallarına hayvanlara yapılacak tüm işlemleri basamak basamak yazmak ve izin almak gereklidir. Deney süreçleri çok iyi planlanmalıdır. Özellikle sintigrafik görüntüleme yapılacak modellerde radyoaktif maddelerin yarılanma süresi, görüntüleme süreleri gibi parametreler dikkate alınmalıdır. Mümkünse uygun sayıda hayvanda pilot çalışma yapılmalıdır. Pilot çalışma, deney sırasında karşılaşılabilecek olası aksaklıkları önceden görmemizi ve tedbir almamızı sağlar. Bunun yanında enfekte hayvanların özel barınma koşullarının sağlanması, diğer deney hayvanlarının ve deney içerisinde yer alan personelin mikrobiyolojik kontaminasyonunun önlenmesi, kişisel koruyucu ekipmanların temin edilmesi, görüntüleme cihazlarının kontaminasyonunu önlemek için gerekli koruyucu örtülerin sağlanması gereklidir. Deney sırasında ve tamamlandıktan sonra ortaya çıkan mikrobiyolojik, kimyasal ve radyoaktif atıkların mevzuata uygun şekilde ortadan kaldırılmasına dikkat edilmelidir.

Preklinik çalışmalarda en sık fare, sıçan, tavşan, domuz, köpek ve primatlar kullanılmıştır. Klinik amaçlı üretilmiş cihazlarda fare ve sıçan gibi küçük hayvanların kullanılması çözünürlük ve duyarlılık açısından yetersiz kalacağından büyük hayvanlar tercih edilmelidir. Ancak büyük deney hayvanı kullanılmasının barınma yeri temini, bakım zorlukları ve yüksek maliyet gibi dezavantajları vardır. Eğer küçük hayvanlar kullanılacaksa “mikro” görüntüleme cihazları kullanılmalıdır.

Literatürde çok sayıda hayvan modelinde, çok sayıda enfeksiyon etkeniyle oluşturulmuş modeller mevcuttur. Burada en sık kullanılan bazı modellerin oluşturulma yöntemleri anlatılmıştır.

**Deneyel osteomyelit modelleri:** Osteomyelit ve yumuşak doku enfeksiyon modelleri en sık kullanılan modellerdendir. Teorik olarak insan bedenini daha iyi taklit edebilmek için koyun, keçi, köpek gibi büyük deney hayvanları tercih edilmelidir. Tavşanlar üzerinde

kronik osteomyelit oluşturabilmek için seçilen kemiğe mikroorganizma inokülasyonundan önce sklerotik maddeler uygulanması ve yabancı cisim yerleştirilmesi gerekmektedir. Tavşan deneklerinin dezavantajları arasında deneklerin küçük olmalarından dolayı bazı cerrahi işlemlerin yapılmasında ortaya çıkan zorluklar ve geniş spektrumlu antibiyotik tedavisine uygun olmamaları sayılabilir (4,5,6).

**Lankinen ve ark. sıçanlarda oluşturduğu bir osteomyelit modeli (7):** Sıçana anestezi uygulandıktan sonra arka bacaklarından biri tıraşlanarak antiseptik bir solüsyonla sterilize edilmiştir. Steril cerrahi koşullarda diş matkabı yardımıyla tibianın proksimal metafizinde 1 mm çapında kortikal defekt oluşturulmuştur. Lokal kemik iliği serum fizyolojik ile yıkanmış, daha sonra medüller boşluk içine 0,05 mL, %5 sodyum morrhuate enjekte edilmiştir. Bu bölgeye  $3 \times 10^8$  CFU *Staphylococcus aureus*; (*S. aureus*) inoküle edilmiştir. Kemik yüzeyi balmumu ile kaplanarak cilt antibiyotikli kremlerle pansuman yapılarak dikişle kapatılmıştır. Kontrol hayvanlarına ise tibiada kortikal defekt oluşturulmuş ancak sklerozan madde ve bakteri inokülasyonu yapılmamıştır. Ameliyattan iki hafta sonra Ga-68 ajanları ile PET/BT görüntülemeleri yapılmıştır (7).

**Hematojen yolla osteomyelit modelinin oluşturulması:** Farelerin vücut savunma sistemleri hakkında pek çok şey bilinmektedir. Osteomyelitinin savunma sistemi üzerine etkileri ile ilgili çalışmalarda fare modelleri tercih edilmektedir. Fare modelleri ile osteomyelitinin moleküler düzeydeki etkileri araştırılabilir. Wang ve ark. bakteriyemi ile başlayan ve implant enfeksiyonu ile sonuçlanan hematojen bir implant enfeksiyonu incelemek için aseptik cerrahi tekniği kullanarak farelerin sağ femurlarına diz eklemine uzanan bir titanyum Kirschner teli yerleştirmişler, farelere ameliyattan 21 gün sonra intravenöz (i.v.) olarak stabil biyoluminesan özellikte metisiline dirençli *S. aureus* suşu enjekte edilmiştir. İnokülasyondan sonra 0, 3, 7, 14, 21 ve 28. günlerde *in vivo* BLG ile izlenmiş, 3-14. günlerde enfeksiyon BLG ile görselleştirilmiştir (8).

Deneysel osteomyelit oluşturmak için intramedüller yerleştirilmiş yabancı bir cismin veya kemiğin canlılığını etkileyecek bir travmanın uygulanması gereklidir. Deneysel modellerde osteomyelit için en yaygın kullanılan etken *S. aureus*'tur. Deney sırasında kullanılan bakteriler insanda hastalık yapan etken ile benzer olmalıdır. Temel olarak osteomyelit oluşturabilmek için  $10^4$ - $10^6$  CFU *S. aureus* kullanılması yeterlidir. Deneysel enfeksiyon modeli oluşturulurken kullanılacak bakteri tipi; deney modelinde kullanılacak antibiyotiklere hassas

olmalı, özel olarak izole edilmiş bakteri kullanılmalıdır. Bakteriler "World Federations for Culture Collection" a kayıtlı bir merkezden temin edilmelidir. Ülkemizde Ege Üniversitesi, İstanbul Üniversitesi, TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi ve T.C. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi'nde bu özelliklerde koleksiyonlar vardır.

*S. aureus* ile yapılan deneysel modeller dışında Johansson ve ark. tarafından anaerobik bakterilerle de osteomyelit modeli oluşturulabileceği gösterilmiştir (9). Tavşanlar dışında sıçan tibialarında da sklerotik maddeler kullanılarak deneysel osteomyelit modelleri oluşturulmuştur. Oztürk ve ark. sklerozan madde olarak polidokanol kullanarak sıçan tibialarında tekrarlanabilir kronik osteomyelit oluşturmuşlardır (10).

Osteomyelit modellerinde karşılaşılan sorunlardan biri de biyomateryaller üzerine yapışan bakterilerin oluşturduğu biyofilmlerdir. Biyofilm içinde yerleşen bakteri kolonilerinde kullanılan antibiyotiklere karşı direnç gelişir ve bu direnç tedaviyi güçleştirir. Bu durum deney sırasında test edilen tedavi protokolünün etkinliği hakkında yorum yapılmasını güçleştirir. Sklerotik madde enjeksiyonu veya mekanik travma sonrası oluşturulan osteomyelit modelleri erişkinlerde görülen kronik osteomyelit taklit etmede oldukça başarılıdır. Ancak çocuklarda görülen hematojen osteomyelit çalışmaları için farklı bir model tanımlamak gerekmiştir. Emslie ve Nade tavuklar üzerinde hematojen osteomyelit modeli tanımlamışlardır. Tavuklara kanat venlerinden yapılan *S. aureus* inokülasyonundan sonra tavukların %96'sında hematojen osteomyelit oluşturabilmişler bu yolla hematojen osteomyelitinin doğal seyrini takip etmişlerdir (11).

**Deneysel septik artrit modeli:** Uzun yıllar deneysel septik artrit oluşturmak için eklem içerisine patojen bakterinin enjeksiyonunun yeterli olacağı düşünülürdü. Ancak gerçekte, açık eklem yaralanmaları ile oluşan septik artritler dışında insanda görülen septik artritler hematojen olarak yayılan bakteriler ile oluşur. Bremell ve ark. sıçanlara kuyruk damarlarından *S. aureus* enjekte etmişler ve hematojen yolla artrit ve osteit oluştuğunu gözlemişlerdir (12). Başka bir modelde Tissi ve ark. tip IV *Streptokokkus agalactiae* kullanarak sıçanlarda deneysel septik artrit modeli oluşturmuştur (13).

**Protez enfeksiyon modelleri:** Protez enfeksiyon modelleri aslında yabancı cisim varlığında oluşan enfeksiyonlar olarak kabul edilmelidir. Deney tasarlanırken protez yapımında kullanılan yüzey ve materyal özelliklerine ve kemik enfeksiyonu tiplerine odaklanılmalıdır. Tasarlanan çalışmanın özelliklerine

göre farklı implant biçimleri tercih edilebilir. Metal kablo, vida, silindir, doku kafesleri, plak, intramedüller çivi veya doğrudan protez şeklinde tasarımlar kullanılabilir. İmplant yüzeyi parlak yüzeyli olabileceği gibi poroz kaplı olarak da tasarlanabilir. Çimentosuz protez yüzeyini taklit edebilmek için silindir şeklinde tasarlanmış kafes yapılar kullanılabilir (14). Deney tasarlanırken kullanılacak protezler ile tercih edilecek görüntüleme yönteminin uyumlu olması gerekir. Metalik protezler MRG ve BT'de artefaktlara neden olur. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar belli organizmaların biyomateryallere afinitelerinin olduğunu göstermiştir. *S. Aureus*'un metalik implantlara ve *S. epidermis*'in polimer varlığına afinitesi vardır [Poliyeten astarlar, polimetil metakrilat (PMMA)]. Titanyum ve benzer alaşımlar implant etrafında daha az fibröz reaksiyon oluşturur (15).

**Akut pyelonefrit modeli:** Prosedür cerrahi asepsi koşullarına uygun olarak yapılır. Anestezi uygulanmış sıçanlar sağ yan yüzü yukarı bakacak şekilde, sol lateral dekübitus pozisyonunda sıcak bir ısıtma yatağına yerleştirilir. 2-3 cm kesi yaparak sağ retroperitoneal insizyon yapılır, böbrek açığa çıkarılır. Böbrek pelvisinin içine yavaş ve sabit 0,1 mL UT189 *E. coli* çözeltisi (konsantrasyon aralığı:  $10^8$ - $10^9$ ) steril bir şırıngadan enjekte edilir. Hedef dışı enfeksiyonlara ve/veya komplikasyonlara neden olan çevre dokuları delmemeye veya enfekte etmemeye dikkat edilmelidir. Böbrek serum fizyolojikle yıkanır, karın boşluğuna yerleştirilerek sütürle kapatılır. Bu çalışmada enfeksiyondan sonraki 1. ve 4. günde MRG yapılmıştır (16).

Majd ve ark. domuz yavrularında cerrahi olarak üreterovezikal bileşkedeki intramural ureteri serbestleştirerek bilateral veziköüretal reflü oluşturmuşlardır. Cerrahi iyileşme için postop. 5 gün antibiyotik profilaksisi uygulamışlar, daha sonra enfeksiyon oluşturmak için mesanenin içine *E. coli* ve enfeksiyonun devamlılığını sağlamak için yabancı cisim görevi görmesi için parafin enjekte etmişlerdir. 3 gün sonra Tc-99m-DMSA/SPECT, spiral BT, MRG ve Doppler ultrasonography ile görüntüleme yapmışlardır (17).

**Yumuşak doku enfeksiyonu:** Bu model sıçan, fare ve tavşanlarda oluşturulabilir. Hayvanın bir ekstremitesine *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *C. albicans* gibi bakteri veya mantar suşlarından biri enjekte edilir. Kontrol olarak karşı ekstremiteye zymosan veya turpentine gibi steril enflamasyon yapan ajanlar enjekte edilir. Dört saat sonra enfekte ekstremitede abse oluşur. Tavşanda *S. aureus* uygun değildir. Çünkü hızla sepsis ve ölüme

sebepler olur. Tavşanda *E. coli* daha uygundur. 0-4-8-20. saatlerde I-123-interleukin I-B ile görüntüleme yapılarak enfekte ekstremitede giderek artan aktivite yoğunluğu saptanır. Ga-68-sitrat ve F-18-FDG de bu modellerin görüntülemesinde kullanılmıştır (18,19).

**Akut ve subakut endokardit:** Bu model tavşanlar, köpekler ve benzer şekilde sıçanlarda indüklenebilir. Genel anestezi altında, sağ veya sol karotis arter distal ucundan bağlanır. Bir kanülle sol ventrikül kateterize edilir. Kateter bir süre (1 saat-2 gün) yerinde bırakılır. Daha sonra bakteri veya mantar damardan veya doğrudan intrakardiyak olarak enjekte edilir. Akut endokardit kolayca indüklense de klinik olarak subakut endokarditin tavşanlarda elde edilmesi daha zordur ve uzun süreli enfeksiyonda septik komplikasyonlarla ölümler yaşanır. Patojen olarak sıklıkla *S. aureus* kullanılır. Görüntüleme için, ekokardiyografi, SPECT/BT (işaretli lökosit sintigrafisi), PET/BT (F-18-FDG) kullanılır. Ayrıca MRG ve kontrastlı BT diğer kullanılabilir görüntüleme yöntemleridir (20).

**Tavşanlarda infektif endokardit modeli oluşturulması:** Tavşanlara anestezi uygulandıktan sonra sol karotis arteri cerrahi olarak ortaya çıkarılır. Valf hasarına neden olmak ve vejetasyon oluşturmak için bir kateter sol karotid arter yoluyla 2 saat boyunca aort kapağı üzerine yerleştirilir. Kateter daha sonra çıkarılarak, sol karotis arteri bağlanır ve insizyon dikişlerle kapatılır. Ameliyattan sonra tavşanlara i.v. olarak 2 mL *Enterococcus faecalis* uygulanır. Yaklaşık 72 saat sonra modelden görüntüleme yapılır (21).

**Akut apandisit modeli:** Tavşanlar bu model için uygundur. Anestezi uygulamasından sonra steril cerrahi koşullarda laparotomi yapılır. Appendiks, damar yapılarına zarar verilmeden proksimalden sütür ipliği ile lümeni obstrükte olacak şekilde bağlanır. Batın tekrar dikilerek kapatılır. On iki saat sonra akut apandisit modeli gelişir (22). Bazı çalışmalarda lümen içine bakteri enjeksiyonu da yapılmıştır. Enfeksiyon, enflamasyon görüntüleme yöntemleri ile erken dönemde görüntüleme yapılır.

### Preklinik Enfeksiyon Modellerinde Kullanılan Nükleer Tıp Yöntemleri

Fonksiyonel ve metabolik görüntüleme tekniklerinin çoğu anatomik değişiklikler oluşmadan hastalığın tespit edilmesine olanak sağlar. Nükleer tıp görüntüleme yöntemleri noninvaziv özellikte olup tüm vücut görüntüleme olanağı sayesinde enfeksiyöz odaklarının lokalizasyonunu ve dağılımını tespit etmektedir.

Enflamatuvar yanıtın farklı aşamalarını gösteren çok çeşitli görüntüleme yöntemleri geliştirilmiştir. Klinik öncesi ve klinik çalışmalarda enfeksiyon odağının tespit edilmesinde potansiyel diagnostik maddeler olarak bir çok radyofarmasötik üzerinde çalışılmıştır. Bununla birlikte, bu konuda araştırılan bir çok görüntüleme ajanından klinik uygulamada sadece birkaçı kendine yer bulabilmiştir (23). Nükleer tıp görüntüleme yöntemleri yaklaşık elli yıldır enfeksiyon hastalıklarının tanısında kullanılmıştır (24). Aynı anda morfolojik değerlendirmeye de olanak tanıyan hibrid görüntüleme cihazlarının geliştirilmesi nükleer tıp yöntemlerinin tanısallık doğruluğunun artmasına ve kullanımının yaygınlaşmasına neden olmuştur (25).

### SPECT Görüntüleme

SPECT, fizyolojik mekanizmaların görselleştirilmesini, kan dolaşımının ölçülmesini ve radyoizotoplarla işaretlenmiş hücre ve moleküllerin dağılımının incelenmesini sağlar. SPECT, BT ile kombine edilerek anatomik detay hakkında da fikir edinilebilir. Ancak uzun süreli çalışmaları planlarken görüntüleme kaynaklı radyasyonun oluşturacağı biyolojik değişiklikler göz ardı edilmemelidir. Enfeksiyon görüntüleme için birçok farklı izotop kullanılmaktadır.

**Tc-99m ile işaretli bisfosfonatlar kullanılarak yapılan kemik sintigrafisi:** Yumuşak doku enfeksiyonları ve kemik enfeksiyonlarını değerlendirmek ve birbirinden ayırıcı tanısını yapmak için kullanılır. Yumuşak doku enfeksiyonunda yalnızca birinci ve ikinci fazda aktivite tutulumu olması yumuşak doku enfeksiyonunu gösterir. Geç fazda da (kemik fazı) aktivite tutulumunun olması osteomyeliti gösterir. Kemik sintigrafisi kemik patolojilerini göstermede duyarlıdır, ancak enfeksiyona spesifik değildir. Kemik sintigrafisinin özgüllüğü işaretli lökosit sintigrafileri ve antimikrobiyal peptid görüntüleme çalışmalarıyla kombine edilerek artırılmıştır (26).

**Ga-67 sitrat:** Ga-67 sitrat geçmiş yıllarda enfeksiyon görüntülemesinde kullanılmıştır. Enfeksiyon/enflamasyonda kullanılan Ga-67 sitrat, enfeksiyon bölgesindeki vasküler epitelden sızarak abse sıvısı ve nötrofillerde çok miktarda bulunan laktoferrine yüksek afinite ile bağlanır. Ga-67 sitrat, demire benzer şekilde sideroforlara da yoğun bağlanma gösterir. Ga-67 sitrat enfekte dokularda mikroorganizmalar tarafından üretilen sideroforlar tarafından tıpkı demirmiş gibi alınır ve hücre içine taşınır (22). Ga-67'nin yüksek gama enerjisi, uzun yarı ömrü, hastalarda yüksek radyasyon maruziyetine

sebeplendir, enjeksiyondan sonra uzun görüntüleme sürelerine ihtiyaç vardır. Bu dezavantajları nedeniyle artık kullanılmamaktadır.

**Tc-99m HMPAO veya In-111 oxine işaretli lökosit SPECT:** Enfeksiyon bölgelerinde lökositlerin birikmesi esasına dayanan bu iki yöntemden Tc-99m-HMPAO, In-111-oxin'e göre daha sık kullanılmaktadır. Bugünkü görüntüleme yöntemi enfeksiyon görüntüleme için spesifiktir. Ancak hayvan çalışmalarında kullanımı çok azdır. Bunun sebebi, yöntem için oldukça fazla kan örneğine ihtiyaç vardır, bu küçük deney hayvanlarında neredeyse imkansızdır. Lökosit etiketleme prosedürü oldukça zahmetli ve zaman alıcıdır. Ayrıca, prosedür kan ürünlerinin manipülasyonu ve yeniden enjeksiyonunu gerektirir ve yüksek bulaşıcı hastalık riski taşır. Görüntülere SPECT/BT'nin eklenmesi ve geç görüntülerinde alınması tanı doğruluğunu artırır.

**Antigranülosit monoklonal antikor sintigrafisi:** Lökosit SPECT'e alternatif bir yöntem olarak geliştirilmiştir. Lökosit SPECT'e avantajı kan ürünleriyle manipülasyon gerektirmemektir. Kullanımı sırasında ortaya çıkan yan etkiler ve muhtemelen maliyetler nedeniyle piyasadan çekilmiştir.

**Tc-99m ile işaretli antibiyotikler:** Antibiyotiklerin spesifik mekanizmalar kullanarak enfeksiyon odağında bulunan bakteriler ile birleşip metabolize olmaları konusu enfeksiyon görüntüleme çalışmalarında geniş yer almıştır. Siprofloksazin, sülfonamidler, vankomisin, beta-laktam bazlı ajanlar, aminoglikozidler, doksisiklin, linkozamidler, nitrofuran, rifampisin Tc-99m ile işaretlenebilmiştir. Siprofloksazin dışındakilerin hepsi henüz prelinik düzeyde çalışılmıştır (27).

### PET Görüntüleme

PET biyolojik süreçleri görselleştirmek için kullanılan oldukça hassas (pmol/L) moleküler görüntüleme yöntemidir. Mikro-PET çözünürlüğü (1-2 mm) BT veya MRG kadar yüksek değildir, ancak küçük hayvan görüntüleme için yeterlidir. BT ve MRG ile hibrid cihazlar PET'in etkinliğini ve kullanımını artırmıştır. Radyofarmasötik olarak en sık F-18 deoksi floro glukoz (F-18-FDG) kullanılır.

**F-18 FDG-PET/BT:** F-18 FDG/PET'nin SPECT ajanlarına göre pek çok avantajı vardır. Bu avantajlar, hastanın kanıyla işlem yapılmasına gereksinim duymaması, kısa görüntüleme süreleri, yüksek çözünürlük, semi kantitatif analiz yapılabilmesi nedeniyle enfeksiyöz-nonenfeksiyöz patolojileri ayırt edebilmesi ve tedavi yanıtının değerlendirilebilmesine olanak tanınmasıdır

(28). F-18 FDG, yaygın olarak onkolojik görüntülemelerde kullanılmıştır. Son on yılda enflamatuvar süreçleri göstermek için daha fazla kullanılmaktadır. F-18 FDG'nin enfeksiyon görüntülemesinde en büyük dezavantajı spesifik olmamasıdır.

**F-18 FDG-işaretli lökositlerle PET/BT:** Enfeksiyon görüntülemesinde FDG'ye oranla daha spesifik bir PET ajanı geliştirmedeki ilk girişim otolog lökositlerin *in vitro* olarak işaretlenmesi yöntemidir. Ancak bu yöntemin en önemli dezavantajı lökosit işaretlenmesinin yapıldığı ortamdaki glukoz konsantrasyonu ile bağlanma yüzdesi dramatik olarak değişmektedir. Kan ürünleriyle çalışmanın getirdiği dezavantajlar ve F-18 FDG'nin kısa yarı ömrünün geç görüntülemeye olanak tanımaması bu tetkikin klinik rutine girmesini zorlaştırmıştır. Pellegrino ve ark. FDG işaretli lökosit ve FDG'ye ait tutulumları kemirgenlerde steril terebentin ile oluşturulan akut enflamasyon, *E. coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* ile oluşturulan bakteriyel enfeksiyon modelinde karşılaştırmışlardır. Her iki radyofarmasötüğün tutulumu da enfekte kas dokusunda enfekte olmayana oranla belirgin artmış olarak bulunmuştur. Ortalama enfekte kas/enfekte olmayan kas tutulum oranı FDG işaretli lökosit ile FDG'ye oranla yaklaşık iki kat daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca işaretli lökositlerin enflame dokuyu normal dokudan ayırmada FDG'ye oranla daha üstün olduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar; enflamasyon alanındaki FDG işaretli lökosit akümüülasyonunun sadece lökositlerden salınan serbest FDG'ye bağlı olmadığı sonucuna varmışlardır (29). Pio ve ark. FDG işaretli lökositler ile FDG'yi insan ve fare modelinde karşılaştırmışlar ve bu iki radyofarmasötüğün normal dağılım paterninin farklı olduğu sonucunu bulmuşlardır (30).

**Cu-64-ile işaretlenmiş lökositler:** Enfeksiyon görüntülemesinde geç görüntülemeye ihtiyaç duyulması, araştırmacıları daha uzun ömürlü PET radyofarmasötiklerine yöneltmiştir. Cu-64'nun 12,7 saatlik yarı ömrü nedeniyle Cu-64 etiketli lökosit PET/BT ile yapılabileceği düşünülmüştür. Bhargava ve ark. insan lökositlerini Cu-64 ile *in vitro* olarak işaretlemişler ve işaretleme etkinliğini, hücre canlılığını ve bakır işaretli lökositlerin stabilitesini In-111 işaretli ve FDG işaretli lökositlerle karşılaştırmışlardır. Cu-64 işaretli lökositlerin ortalama işaretleme etkinliği (%87±4) ile In-111 işaretli lökositler (%86±4) ile benzer ve her ikisinin de işaretleme etkinliği FDG işaretli lökositlere (%60±19) oranla anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (31).

Locke ve ark. bu ajanı *Klebsiella pnömoni* ile oluşturulan sıçan pnömoni modelinde çalışmışlar ve işaretli peptidin enjeksiyonundan yaklaşık 18 saat sonra görüntüleme yapmışlardır. *Klebsiella pnömoni* ile enfekte farelerde ortalama akciğer standart uptake değeri değeri  $0,142 \pm 0,054$  iken bu değer kontrol grubunda  $0,028 \pm 0,003$  olarak bulunmuştur. Preklinik veriler umut verici olsa da bu ajan ile yapılmış insan çalışması bulunmamaktadır (32).

**Ga-68-Sitrat PET/BT:** Ga-67-sitrat'ın dezavantajlarından dolayı kullanımının kısıtlanması nedeniyle analog bir molekül olan aynı zamanda PET/BT cihazlarında görüntülemeye olanak tanıyan Ga-68-sitrat üzerine araştırmalar yoğunlaşmıştır. Ancak Ga-68-sitrat da enfeksiyona spesifik değildir. Malignite ve diğer enflamatuvar süreçlerde tutulum gösterir. Ga-68'in Ge-68/Ga-68-jeneratörlerinden nükleer tıp bölümlerinde kolayca elde edilebilir olması Ga-68'in ve ona bağlanabilen farmasötiklerin yüksek bir gelişim potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (33).

Kumar ve ark. sıçanlarda *Staphylococcus aureus* enfeksiyonlarını saptamada Ga-68-sitratın tanısız rolünü araştırmışlardır. Enjeksiyondan sonraki 5. dakikada içerisinde ortalama bir radyofarmasötik tutulumu gözlenmiş; 30 dakika ile 6 saat içerisinde ise tutulum yoğun ve fokal hale gelmiştir. Ayrıca postoperatif intraabdominal enfeksiyonu olan bir hastada enjeksiyon sonrasında 30. dakikada enfeksiyon odağını görüntülemişlerdir (34).

**Ga-68 DOTAVAP-P1:** Ga-68-sitratın nonspesifik olması araştırmacıları daha spesifik moleküllere yöneltmiştir. Vasküler adezyon protein-1 (VAP-1) enflamatuvar durumlarda hücre yüzeyinden eksprese edilen bir yüzey proteindir. Araştırmacılar, enfekte olmayıp yalnızca iyileşmekte olan kortikal kemik defekti bulunan, diğer grupta ise *S. aureus* osteomyeliti olan toplam 68 farede Ga-68-DOTAVAP-P1 PET'i karşılaştırmışlardır. İyileşmekte olan kortikal kemik defekti bulunan hayvanlarda ortalama VAP-1 ekspresyon düzeyi açısından 24. saatte ve 7 günde anlamlı farklılık saptanmamıştır. Osteomyeliti olan hayvanlarda ise ortalama VAP-1 ekspresyon düzeyi 7. günde, 24. saate oranla anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. VAP-1 ekspresyon düzeyleri her iki zaman değerinde de enfekte hayvanlarda iyileşmekte olan kortikal kemik defekti olanlara oranla anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır (35).

Ga-68 ile işaretlenmiş ve preklinik çalışmalarda kullanılan diğer enfeksiyon ajanlarının listesi Tablo 1'de gösterilmiştir.



Tablo 1. Ga-68 ile işaretlenmiş ve prelinik çalışmalarda kullanılan enfeksiyon ajanları (33)

Radyofarmasötik	Hedef	Uygulama
Ga-68-DOTA-depisodomisin	Bakteri hücre duvarı	Tüberküloz, <i>E. coli</i>
Ga-68-siprofloksazin	Bakteriyel DNA giraz	Kas-iskelet sistemi enfeksiyonları
Ga-68-klorür	Transferrin reseptörleri, ferritin, laktoferrin	Klamidya ve genitoüriner sistem enfeksiyonları
Ga-68-TAFC/FOX E	Sideroforlar; bakteri ve mantarda demir taşıyıcılar	Aspergillozis
Ga-68-klorür/apotransferrin	Transferrin reseptörleri, ferritin, laktoferrin	Kas-iskelet sistemi enfeksiyonu ve enflamasyon
Ga-68-NOTA-UBI 29-41	Bakteri hücre duvarı	Kas iskelet sistemi enfeksiyonu, enflamasyon, tüberküloz

**I-124/I125 fialuridin:** Radioiyodine edilmiş timidin analogu olan fialuridin (FIAU) ile enfeksiyon görüntülemesi araştırmaları yapılmıştır. Pullambhatla ve ark. farelerde bakteriyel pulmoner enfeksiyon görüntülemeye I-125 FIAU'nun rolünü araştırmışlardır. Enfekte akciğerlerde enjeksiyondan iki saat sonra tutulum saptanmış ve bu tutulum enfekte olmayan enflame akciğerlere ve kontrollere göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Antibiyotik tedavisi sonrasında ise tutulumda anlamlı bir düşüş saptanmıştır. Araştırmacılar, radyoşaretli FIAU bakteriyel görüntülemenin yeni antibiyotiklerin geliştirilmesinde faydalı olabileceğini belirtmişlerdir (36). Benzeri çalışmalar I-124 FIAU PET/ BT ile de yapılmış kas iskelet sistemi enfeksiyonlarında yeterli etkinliğe sahip olmadığı gözlenmiştir.

### Spesifik Bakteriyel Görüntülemeye Potansiyel Yeni Görüntüleme Ajanları

Bakteriyel enfeksiyonlar için yeni görüntüleme ajanları geliştirmek önemli bir araştırma alanıdır. Spesifik metabolik yollar, bakterinin yapısı ve benzersiz hücre duvarı özellikleri görüntüleme için fırsat veren özelliklerdir. Hibrid görüntüleme bakteriyel görüntüleme olanaklarını daha da artırabilir. Daha sonraki aşamada ise onkolojide uyguladığımız şekilde bu görüntüleme ajanları antibiyotiklerle birleştirilerek hedefe yönelik tedaviler geliştirilebilir.

Ayrıca, bakteriye özgü görüntüleme, enfektif odakları eşlik eden patolojiler nedeniyle diğer lezyonlardan (kanser, travma vb.) ayırt etmeye yardımcı olabilir. Spesifik bakteri görüntülemenin zorlukları vardır. Bu zorluklar bazı yayınlanmış mektup ve görüşlerle ifade edilmiş, hatta bazı yazarlar elde edilecek sonuçların bu çabaya değmeyeceğini öne sürmüşlerdir (37). Bakterilere özgü araştırmalarda farklı görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır (PET, SPECT ve optik görüntüleme).

Çoğu prelinik düzeyde araştırılan bu yöntemlerden sadece isim olarak bahsedilecektir.

#### 1. Konağın enflamatuvar yanıtlarını gösterenler:

- Antimikrobiyal peptidler: UBI 29-41 (Tc-99m, Ga-68)
- Sitokinler (I-123, I-125)

#### 2. Bakterilerden salınan veya sunulan maddeler:

- Radyo işaretlenmiş antibiyotikler: Siprofloksasin, sülfonamidler, vancomycin, beta-lactam bazlı ajanlar, aminoglükozidler, doksisisiklin, linkozamidler, nitrofuran, rifampisin, puromisin, oksazolidinonlar.

-Antibiyotikler dışındaki bakteriler tarafından sunulan maddeleri görüntüleme izleyicileri: Nükleozid analogları (FIAU)(I-124, I-125), zinc dipicolylamine (In-111) concanavalin A (NIR dye IR750), protrombin (Cu-64), peptidoglikan aptamerleri (Tc-99m), sideroforlar (Ga-68), bakteri spesifik antikorlar (Cu-64), bakteriofaj (Tc-99m).

#### 3. Bakterilere özgü metabolizmayı gösterenler:

- Bakteriyel karbonhidrat metabolizması görüntülemesi: Glukoz-6-Fosfat, sorbitol, amino şekerler, maltoheksaz, D-mannitol,
- Bakteriyel aminoasit uptake görüntülemesi: D-metiyonin,
- Bakteriyel vitamin uptake görüntülemesi: Biotin, vitamin B12, paraaminobenzoik asit (27).

### Prelinik Enfeksiyon Çalışmalarında Kullanılan Diğer Görüntüleme Yöntemleri

**Manyetik rezonans görüntüleme:** Deney hayvanlarında yüksek çözünürlüklü (50-100  $\mu$ m) noninvaziv bir görüntüleme yöntemidir. Yumuşak doku kontrastı mükemmeldir. MRG görüntüsü anatomik yapıları, dokuların kan akımını ve difüzyonu gösterebilir. Kontrast maddeler hücre veya dokuları özel olarak incelemek için kullanılabilir.

**Bilgisayarlı tomografi:** Farelerde kemik görüntüleme için mikro-BT altın standarttır. Yumuşak dokuları incelemek için kontrastlı ajanlara ihtiyaç vardır. BT’de MRG gibi boylamsal çalışmalara izin verir. X-Ray temeline dayanan, dakikalar içinde hızlı görüntülemeye olanak tanıyan yüksek rezolüsyona sahip (>50  $\mu\text{mL/L}$ ) bir görüntüleme yöntemidir. BT’de en önemli sorun yüksek radyasyon dozudur. Tekrarlayan görüntülemelerde biyolojik yollarda değişiklikler meydana getirebilir. Boylamsal çalışmalarda bu özellik gözden kaçırılmamalıdır.

**Ultrasonografi:** Yüksek uzaysal çözünürlüğe sahiptir (50  $\mu\text{m}$ ) ve yumuşak dokuda yüksek kontrast oluşturur. Noninvaziv, taşınabilir, hızlı, radyasyon içermeyen ve ekonomik bir yöntemdir. Küçük hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda ekokardiyografi yoğun şekilde kullanılmıştır.

Anatomik görüntüleme yöntemlerinin en önemli dezavantajı enfeksiyonun oluşturduğu morfolojik değişiklikler oluşmadan bilgi verememeleridir.

**Biyoluminesans görüntüleme:** Patojenik mikroorganizmaların varlığını lokalize etmek ve miktarını ölçmek için kullanılan geleneksel deneysel yöntemler deney hayvanlarının kurban edilmesini gerektiriyordu. Ancak, ışık üreten lusiferaz enziminin keşfi ve bu enzimin genetik uygulamalarla bakteri, mantar, parazit ve

farelere uygulanmasından sonra kameralar yardımıyla bu ışığın kaydedilmesiyle, yaşayan hayvanlardan, uzun süreli izleme enfeksiyöz mikroorganizmaların yeri ve büyümesi hakkında bilgi edinilmesi sağlandı.

Optik görüntüleme, küçük bir hayvanın vücudundaki görünür ışığı üretmek ve algılamak için iki yöntemden birini kullanır: Floresan ve biyoluminesans. Her iki yöntem de birkaç mm’lik sınırlı derinlikte yüksek hassasiyete (10-15  $\text{mL/L}$ ’ye kadar) sahiptir. BLG teknolojisi, travmatik deri yaralarında ve yanıklarda bakteriyel enfeksiyonları takip etmek için, osteomyelit, barsak enfeksiyonları, mikobakteriyel enfeksiyonlar, orta kulak iltihabı, akciğer enfeksiyonları, biyofilm, endodontik enfeksiyonlar ve menenjit araştırmalarında kullanılmıştır. Ayrıca BLG ile mantarlar, sıtma, leishmania, tripanozoma ve toksoplazmanın neden olduğu enfeksiyonlar izlenmiştir. Herpes simpleks, Hepatit B, C ve influenza gibi virüsler ve aşılarda çalışılmıştır. BLG kullanımı hayvan çalışmalarında ihtiyaç duyulan hayvan sayısını önemli ölçüde azaltmıştır (3).

Tablo 2’de küçük hayvan modellerindeki enfeksiyon görüntüleme çalışmalarında kullanılan yöntemlerin nerede kullanıldığı, avantajları ve sınırlılıkları gösterilmektedir.

**Tablo 2. Deneysel hayvan modellerinde enfeksiyon çalışmalarında kullanılan görüntüleme yöntemleri (38)**

Yöntem	Nerede kullanılır?	Avantajları	Dezavantajları
SPECT	Metabolizma, fonksiyon perfüzyon, hipoksi, apoptozis	Kalitatif ve kantitatif değerlendirme, dinamik görüntüleme, moleküler görüntüleme	İyonize radyasyon, düşük rezolüsyon
PET	Metabolizma ve fonksiyon, hücre proliferasyonu, apoptozis, hipoksi	Kantitatif fonksiyonel değerlendirme, pikomolar sensitivite, moleküler görüntüleme, dinamik görüntüleme	İyonize radyasyon, pahalı
MR	Yumuşak doku, anjiyografi, perfüzyon değerlendirmesi, hipoksi	Rezolüsyonu yüksek, radyasyon maruziyeti yok, morfolojik, fonksiyonel, perfüzyon, difüzyon	Görüntüleme süresi uzun
BT	Kemik, akciğer, kalp ve tüm vücut morfolojik görüntülemesi	Görüntüleme süresi kısa, yüksek rezolüsyon (<50 $\mu\text{m}$ )	Kantitatif değil, iyonize radyasyon dozu yüksek, yumuşak doku görüntülemesi ve anjiyografi için kontrast uygulama gerekliliği
US	Tüm vücutta kullanılır (özellikle yumuşak doku incelemeleri için), kalpte (ekokardiyografi)	Noniyonizan, ucuz, anatomik rezolüsyonu yüksek	Kantitatif değerlendirme yapılamaz, hava ve kemik dokular artefakta sebep olur
Optik görüntüleme	Tek hücre ve tek gen görüntülemesi	Noniyonizan, ucuz ve moleküler düzeyde değerlendirme	İnsanlarda kullanılmaz

SPECT: Tek foton emisyon bilgisayarlı tomografi, PET: Pozitron emisyon tomografi, MR: Manyetik rezonans, BT: Bilgisayarlı tomografi, US: Ultrasonografi

## Enfeksiyonun Moleküler Görüntülemesinde Gelecek Perspektifi ve Sonuç

Çoğu enfeksiyon görüntüleme ajanları hala preklinik araştırma aşamasındadır. Bunların çok büyük bir kısmı Tc-99m ile işaretlenmiştir. PET ve özellikle hibrid PET cihazlarıyla ortaya çıkan görüntü rezolüsyonundaki iyileşmeler, PET ajanlarının enfeksiyon görüntülemesinde potansiyelini artırmıştır. Yeni geliştirilen yöntemlerle enfeksiyon görüntüleme F-18, Tc-99m'nin yerini alabilir. Son yıllarda jeneratör aracılığıyla üretilen Ga-68 de gerek kolay temini, gerekse kolay işaretlenme özellikleri nedeniyle, tek başına veya çeşitli moleküllerle işaretlenerek potansiyel bir enfeksiyon görüntüleme ajanı haline gelmiştir. Ga-68 ve F-18'in kısa yarı ömürleri nedeniyle enfeksiyon görüntüleme kısıtlılıkları, Cu-64 (12,7 saat) ve Zr-89 (78 saat) gibi daha uzun yarı ömre sahip radyoizotoplarla peptidlerin işaretlenmesiyle aşılabileceği düşünülmüştür. Daha uzun etkili radyoizotoplar enfeksiyon görüntüleme bir gereklilik olan geç görüntülemeye olanak sağlar. Ancak bu radyoizotoplarda halen en büyük sorun yüksek radyasyon maruziyetleridir. Enfekte bölgelere nanopartiküllerle işaretlenmiş antibiyotik vermek enfekte bölgeye yüksek doz antibiyotik verilmesine ve antibiyotiğin sistemik etkilerinin en aza indirilmesine olanak tanır. Ayrıca, antibiyotikler radyoizotoplar ile işaretlenerek antibiyotik tedavi süresinin kısaltılması ve tedaviye dirençli organizmaların tedavisi mümkün olabilir.

PET ve MRG şu anda kendi kategorisinde en iyi görüntüleme modaliteleri olmakla birlikte, her iki görüntüleme yöntemi birleştirilerek hem anatomik hem de metabolik görüntülemenin sağlanması çok önemli bir avantajdır. PET radyofarmasötiklerinde ortaya çıkacak yeni gelişmeler bu mükemmel görüntüleme aracının faydasını daha da artıracaktır. Bakterilere özgü görüntüleme ajanlarının keşfi hedefe yönelik tedavilerin başarısını artıracaktır.

**Finansal Destek:** Yazarlar tarafından finansal destek alınmadığı bildirilmiştir.

**Çıkar çatışması:** Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

## Kaynaklar

1. WHO. World Health Statistics 2014. Available at: [http://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics/2014](http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2014).
2. Beltman JB, Maree AF, De Boer RJ. Spatial modelling of brief and long interactions between T cells and dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 2007;85:306-314.
3. Altun GD, Üstün F. Klinik öncesi görüntüleme yöntem ve protokoller. Editörler: Perihan Ünak, Gülay Durmuş Altun, Serap Teksöz, Zümrüt Biber Müftüler. *Uygulamalı Temel Radyofarmasi*. 1. baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2017. Sayfa:1-14.
4. Patel M, Rojavin Y, Jamali AA, et al. Animal models for the study of osteomyelitis. *Semin Plast Surg* 2009;23:148-154.
5. An YH, Kang QK, Arciola CR. Animal models of osteomyelitis. *Int J Artif Organs* 2006;29:407-420.
6. Norden CW. Lessons learned from animal models of osteomyelitis. *Rev Infect Dis* 1988;10:103-110.
7. Lankinen P, Noponen T, Autio A, et al. A Comparative <sup>68</sup>Ga-Citrate and <sup>68</sup>Ga-Chloride PET/CT Imaging of Staphylococcus aureus Osteomyelitis in the Rat Tibia. *Contrast Media Mol Imaging* 2018;25:1-10.
8. Wang Y, Cheng LI, Helfer DR, et al. Mouse model of hematogenous implant-related Staphylococcus aureus biofilm infection reveals therapeutic targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017;114:5094-5102.
9. Johansson A, Svensson O, Blomgren G, et al. Anaerobic osteomyelitis. A new experimental rabbit model. *Clin Orthop Relat Res* 1991;297-301.
10. Ozturk AM, Tabak AY, Aktekin CN, et al. Alendronate enhances antibiotic impregnated bone grafts in the treatment of osteomyelitis. *Int Orthop* 2008;32:821-827.
11. Emslie KR, Nade S. Acute hematogenous staphylococcal osteomyelitis. A description of the natural history in an avian model. *Am J Pathol* 1983;110:333-345.
12. Bremell T, Lange S, Yacoub A, et al. Experimental Staphylococcus aureus arthritis in mice. *Infect Immun* 1991;59:2615-2623.
13. Tissi L, Marconi P, Mosci P, et al. Experimental model of type IV Streptococcus agalactiae (group B streptococcus) infection in mice with early development of septic arthritis. *Infect Immun* 1990;58:3093-3100.
14. Lucke M, Schmidmaier G, Sadoni S, et al. A new model of implant-related osteomyelitis in rats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2003;67:593-602.
15. Gristina AG, Shibata Y, Giridhar G, et al. The glycocalyx, biofilm, microbes, and resistant infection. *Semin Arthroplasty* 1994;5:160-170.
16. Gupta K, Donnola SB, Sadeghi Z, et al. Intrarenal injection of escherichia coli in a rat model of pyelonephritis. *J Vis Exp* 2017;54649.
17. Majd M, Nussbaum Blask AR, Markle BM, et al. Acute pyelonephritis comparison of diagnosis with 99mTc-DMSA, SPECT, spiral CT, MR imaging, and power Doppler US in an experimental pig model. *Radiology* 2001;218:101-108.
18. Van der Laken CJ, Boerman OC, Oyen WJG, et al. In-vivo expression of IL-1 receptors during various experimentally induced inflammatory conditions. *J Infect Dis* 1998;177:1398-1401.

19. Ertay T, Sencan Eren M, Karaman M, Oktay G, Durak H. <sup>18</sup>F-FDG-PET/CT in Initiation and Progression of Inflammation and Infection. *Mol Imaging Radionucl Ther* 2017;26:47-52.
20. Gibson GW, Kreuser SC, Riley JM, et al. Development of a mouse model of induced *Staphylococcus aureus* infective endocarditis. *Comp Med* 2007;57:563-569.
21. McCormick JK, Tripp TJ, Dunny GM, et al. Formation of vegetations during infective endocarditis excludes binding of bacterial-specific host antibodies to *Enterococcus faecalis*. *J Infect Dis* 2002;185:994-997.
22. Turan C, Tutuş A, Ercan MT, et al. Evaluation of <sup>99m</sup>Tc-citrate, <sup>67</sup>Ga-citrate and <sup>99m</sup>Tc(V) dimercaptosuccinic acid for the scintigraphic visualization of acute appendicitis. *Res Exp Med (Berl)* 1997;197:157-164.
23. Ertay T. Enfeksiyon-Enflamasyon: Moleküler Görüntüleme Kullarılan SPECT Radyofarmasötikleri. *Nucl Med Semin* 2016;2:63-70.
24. Goldsmith SJ, Vallabhajosula S. Clinically proven radiopharmaceuticals for infection imaging: mechanisms and applications. *Semin Nucl Med* 2009;39:2-10.
25. Heiba S, Kneřaurek K. Evaluation of diabetic foot infection in nuclear medicine. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2017;61:283-291.
26. Heiba S, Kolker D, Ong L, et al. Dual-isotope SPECT/CT impact on hospitalized patients with suspected diabetic foot infection: saving limbs, lives, and resources. *Nucl Med Commun* 2013;34:877-884.
27. Ankrah AO, Klein HC, Elsinga PH. New imaging tracers for the infected diabetic foot (nuclear and optical imaging). *Curr Pharm Des* 2018;24:1287-1303.
28. Glaudemans AW, de Vries EF, Galli F, et al. The use of (18) F-FDG-PET/CT for diagnosis and treatment monitoring of inflammatory and infectious diseases. *Clin Dev Immunol* 2013;2013:623036.
29. Pellegrino D, Bonab AA, Dragotakes SC, et al. Inflammation and infection: Imaging properties of <sup>18</sup>F-FDG-labeled white blood cells versus <sup>18</sup>F-FDG. *J Nucl Med* 2005;46:1522-1530.
30. Pio BS, Byrne FR, Aranda R, et al. Noninvasive quantification of bowel inflammation through positron emission tomography imaging of 2-deoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluoro-D-glucose-labeled white blood cells. *Mol Imaging Biol* 2003;5:271-277.
31. Bhargava KK, Gupta RK, Nichols KJ, Palestro CJ. In-vitro human leukocyte labeling with (<sup>64</sup>Cu): an intraindividual comparison with (<sup>111</sup>In)-oxine and <sup>18</sup>F-FDG. *Nucl Med Biol* 2009;36:545-549.
32. Locke LW, Chordia MD, Zhang Y, et al. A novel neutrophil-specific PET imaging agent: cFLFLFK-PEG-<sup>64</sup>Cu. *J Nucl Med* 2009;50:790-797.
33. Vorster M, Maes A, Wiele Cv, Sathekge M. Gallium-68 PET: a powerful generator-based alternative to infection and inflammation imaging. *Semin Nucl Med* 2016;46:436-47.
34. Kumar V, Boddeti DK, Evans SG, Angelides S. <sup>68</sup>Ga-citrate-PET for diagnostic imaging of infection in rats and for intra-abdominal infection in a patient. *Curr Radiopharm* 2012;5:71-75.
35. Ujula T, Salomäkia S, Virsua P, et al. Synthesis, <sup>68</sup>Ga labeling and preliminary evaluation of DOTA peptide binding vascular adhesion protein-1: a potential PET imaging agent for diagnosing osteomyelitis. *Nucl Med Biol* 2009;36:631-641.
36. Pullambhatla M, Tessier J, Beck G, et al. <sup>125</sup>I-FIAU imaging in a preclinical model of lung infection: quantification of bacterial load. *Am J Nucl Med Mol Imaging* 2012;2:260-270.
37. Hess S, Alavi A, Werner T, Hoiland-Carlson PF. Molecular imaging of bacteria in patients is an attractive fata morgana, not a realistic option. *J Nucl Med* 2018;59:716-717
38. Jelicks LA, Lisanti MP, Machado FS, et al. Imaging of small-animal models of infectious diseases. *Am J Pathol* 2013;182:296-304.



# Nörodejeneratif Hastalıklarda Deneysel Modeller

## Experimental Models in Neurodegenerative Diseases

Ülkü Korkmaz<sup>1</sup>, Meryem Kaya<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

<sup>2</sup>Medicana International İstanbul, Nükleer Tıp Kliniği, İstanbul, Türkiye

### Öz

Nörodejeneratif hastalıklar (NDH), nöron fonksiyonlarında ilerleyici kayıp ve yapısal bozulma ile giden bir hastalık grubudur. Ortalama yaşam süresinin artması, NDH'ye sahip hastaların sayısının da gün geçtikçe artmasına ve bu hastalıkların toplumsal sorun haline gelmesine sebep olmuştur. Bu yazının amacı, en sık görülen dört NDH'den (Alzheimer, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı ve amiyotrofik lateral skleroz) yola çıkarak, NDH'lerin patogenezi, tanı ve tedavi seçeneklerini araştırmak için oluşturulmuş deneysel modelleri gözden geçirmek ve okuyucuda genel bir bakış açısı oluşturmaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Nörodejeneratif, Alzheimer, demans, deneysel model

### Abstract

Neurodegenerative diseases (NDDs) are a group of diseases characterized by progressive loss and structural deterioration of neuron functions. The rise in the average life expectancy has led to an increase in the number of patients with NDD and these diseases to become a social problem. The aim of this paper is to review the most common NDDs (Alzheimer's disease, Parkinson disease, Huntington disease, and amyotrophic lateral sclerosis) and to examine the experimental models in order to investigate the pathogenesis, diagnosis, and treatment options of NDDs and to provide an overview of the reader.

**Keywords:** Neurodegenerative, Alzheimer, dementia, experimental model

### Giriş

Nörodejeneratif hastalık (NDH) tanımı, nöron fonksiyonlarında ilerleyici kayıp ve yapısal bozulma ile karakterize bir grup hastalığı tarif etmek için kullanılan genel bir tanımdır (1). Bu dejenerasyon, çevresel etkiler ile, rastlantısal olarak, genetik yatkınlıkla ya da bunların kombinasyonu olarak ortaya çıkabilirler.

Bu hastalıklardan, daha sık görülen Alzheimer hastalığı (AH) ve Parkinson hastalığı (PH) genel olarak ileri yaşta bulgu verirken, amiyotrofik lateral skleroz (ALS) ve Huntington hastalığı (HH) erken yaşta ortaya çıkma eğilimindedir (2). Genel olarak, ortalama yaşam süresinin artması nedeniyle NDH'ye sahip hastaların

sayısı da gün geçtikçe artmakta ve bu hastalıklar toplumsal sorun haline gelmektedir (3,4,5).

Toplum genelinde en yaygın demans nedeni AH'dir (6). 2050 yılında, AH'li hasta sayısının yaklaşık 100 milyon olması beklenmektedir (5). Erken yaş grubunda (50 yaş altı) demans prevalansı 4000'de 1'den azdır ve kabaca %30'unun AH olduğu kabul edilmektedir (7).

Bu yazının amacı, en sık görülen dört nörodejeneratif hastalıktan (Alzheimer, Parkinson, HH ve ALS) yola çıkarak, NDH'lerin patogenezi, tanı ve tedavi seçeneklerini araştırmak için oluşturulmuş deneysel modelleri gözden geçirmek ve okuyucuda genel bir bakış açısı oluşturmaktır.

### Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Dr. Ülkü Korkmaz, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

**E-posta:** korkmaz.ulku@gmail.com **ORCID ID:** orcid.org/0000-0002-7155-7610

©Telif Hakkı 2019 Türkiye Nükleer Tıp Derneği / Nükleer Tıp Seminerleri, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.

## I. Alzheimer Hastalığı

AH, progresif beyin atrofi ile seyreden bir hastalıktır. Erken ve geç başlangıçlı olmak üzere iki tipi bulunsa da %95'ten fazlası ileri yaş grubunda görülür (8). Temel bulguları kognitif yeteneklerde azalma, sinisi başlangıçlı hafıza kaybı, konuşma bozuklukları ve nöropsikiyatrik semptomlardır (9,10). İleri olgularda günlük yaşantıyı bozacak derecede fonksiyon kaybına yol açar.

APOE4, AH için başlıca genetik risk faktörüdür (6). Yeni yapılan çalışmalarla birlikte, AH ile ilişkili 20'den fazla gen lokusu tanımlanmıştır. Bu genler, immün sistem, enflamatuvar yanıt, lipid metabolizması ve endozomal vezikül döngüsü ile de ilişkilidir (6). AH'de, normal olarak yaşanan beyinde hücre sağkalımına katkı sağlayan REST üretimi bozulmuştur. Diğer genlerdeki ve mikro RNA gibi kodlanmayan RNA kodonlarındaki değişiklikler, hastalığın oluşumunda duyarlılık oluşturan diğer genetik durumlardır (6).

Hastalığın kesin tanısı histopatolojik olarak beyin dokusunda intranöronal nörofibriler yumak (NFY) oluşumu, beta amiloid (A $\beta$ ) plak ve hiperfosforile Tau proteini birikiminin gösterilmesi ile konur (11). Beyinde A $\beta$  birikimi, hücreler arası iletişimi bozarak artmış apoptozise neden olmakta ve bunun sonucunda doku işlevsiz hale gelmektedir (8). İlave olarak granülovakuolar dejenerasyon, amiloid anjiyopati ve Hirano cisimcikleri de görülebilir (9,12). Nörodejenerasyonda etkili olduğu düşünülen diğer nedenler ise insülin direnci oksidatif stres, kolinerjik kayıp, sinaps-nöron kaybı, glutamat entoksikasyonu ve enflamatuvar süreçlerdir (13,14,15,16).

AH'de senil plaklar, amiloid prekürsör proteininin bir parçası olan A $\beta$  peptitten meydana gelirken, NFY'ler hiperfosforile Tau proteinin polimerizasyonu ile oluşur (2,8). Bu iki molekül ve oluşum mekanizmaları, AH tedavi araştırmalarının, dolayısı ile deneysel AH modellerinin en önemli hedefidir (17). Serebrospinal sıvıda A $\beta_{42}$  ve Tau seviyelerinin ölçümü, AH için biyolojik belirteç olarak kullanılmaktadır. Bu iki biyolojik belirtecin, hafif kognitif bozukluk evresindeki AH için duyarlılık ve özgüllüğü %85-90 olarak bildirilmiştir (6). Geniş ölçekli klinik çalışmalar, A $\beta_{42}$  ölçümü ve amiloid pozitron emisyon tomografinin (PET), deneysel araştırmalarda birbirinin yerine kullanılabileceğini düşündürmektedir (18,19).

A $\beta$  ve Tau birikiminin genetik sebepleri ile ilgili en güçlü genetik veriler, amiloid precursor protein (APP), presenilin-1 (PSEN1) veya PSEN-2'deki mutasyonlarla ilgili çalışmalarından elde edilmiştir. APP, A $\beta$  peptidlerinin öncü molekülüdür ve APP'deki mutasyonlar A $\beta$ 'nin

atılımını ve kümeleşme özelliklerini değiştirir. PSEN1 ve PSEN2 ise, APP'yi parçalayan  $\gamma$  sekretazlar için katalitik alt ünitelerdir. Normal formda APOE, A $\beta$ 'nin proteolitik olarak atılımını artırırken,  $\epsilon$ 4 varyantı daha az etkili olmaktadır (6).

AH için kurgulanan hayvan modelleri, ya senil plaklar ve NFY oluşumunun neden olduğu nöronal ölümü ya da lokal hasara yol açan maddelerin uygulanması ile oluşan nörotransmitter eksikliğini taklit eder (20). Transgenik modellerde, mutant genler ile endojen A $\beta$  ve Tau proteini üretimin uyarılırken, nontransgenik modellerde ise, bu proteinler doğrudan beyin içine enjekte edilir (21). Bununla birlikte, nontransgenik modellerdeki akut birikimin, insan beyindeki zamana yayılmış amiloid birikimini tam temsil edemediği bildirilmiştir (22).

### Transgenik AH Modelleri

Kendi genomunda transgen olarak adlandırılan yabancı DNA parçası taşıyan hayvanlara "Transgenik hayvan" denir (8). Transgenik hayvanların kullanıldığı deneysel modeller de transgenik model olarak adlandırılır. Oluşturulmak istenen patolojik sürece uygun transgeni taşıyan hayvanlar kullanılır.

AH transgenik fare modelleri hastalığın insandaki tüm bulgularını aynen yansıtamamasına rağmen; hastalığın patolojisinin anlaşılmasında ve tedavi stratejilerinin denenmesinde oldukça faydalı olmaktadır.

AH için üretilmiş ve A $\beta$ 'nin (Tg2576, PS1/APP, PDAPP, PGDF-APPSW, presenilin conditional KO/APP, CRND8) NFY oluşumu ve mutant Tau birikimine neden olduğunu gösteren, çok sayıda transgenik fare modeli bulunmaktadır.

İdeal bir transgenik model; etiyoloji, patolojik değişimlerin zamanla ilerlemesi, oluşturduğu yapı ve hücrelerin insandaki bulgularla örtüşmesi gibi, insandaki AH'nin birçok yönünü taklit etmelidir (23). Bu nedenle, klinik yelpazedeki farklılıkları açıklayabilmek amacıyla tekli, çift veya üçlü transgenlerin kullanıldığı modeller oluşturulmuştur (23).

Transgenik hayvan olarak hem fare hem de sıçan kullanılabilir de sıçanlarda, farelere göre daha az çözünebilir A $\beta$  ve plak oluşumu meydana geldiği ve fare modellerinin daha agresif seyrettiği bildirilmiştir (23).

AH'nin yeni tanımlanan prelinik basamağından (erken evre değişiklikler) hipokampal değişikliklerin sorumlu olduğu düşünülmektedir (24). Bu nedenle, modellerin tamamı, düzenli hipokampal fonksiyonun varlığını gerektiren davranışsal kalıplardaki çeşitlilikleri ve yaşa bağımlı bilişsel yetenek kaybını incelemektedir (8).

AH modelleri, esas olarak, sentetik veya doğal A $\beta$  peptidlerin farklı dozlarda, serebroventriküler alana ya da hipokampusu direkt enjeksiyonu ile elde edilir (8,22). Akut olarak hastalık oluşturan bu modeller, insanlarda zamanla oluşan A $\beta$  birikimini tam temsil edememektedir (22). Peptid enjeksiyonunun nasıl yapılması gerektiği ve dikkat edilmesi gerekenler Mc Larnon ve ark. tarafından tarif edilmiştir (25).

Buna göre:

- A $\beta$ 'nin çeşidine göre değişiklik yapılabilmeyle birlikte, düşük miktarlarda enjeksiyon önerilmektedir. *In vivo* ortamda çözünebilir peptid türlerinin, pre-agrege peptidlerle karşılaştırıldığında daha az etkili olabileceği bildirilmiştir.

- Enjekte edilen peptidin etkisiyle oluşabilecek nöron hasarını en aza indirmek için, peptid enjeksiyonu analiz bölgesinden ayrı, beynin iyi tanımlanmış bir bölgesinde yapılmalıdır.

- Peptid enjeksiyonuna yanıt olarak gelişen gliozisin derecesi ölçülmelidir (25).

Transgenik AH modelleri, A $\beta$  ve Tau üretimini uyarıcılar olmak üzere iki gruptur (20).

### A $\beta$ Modelleri

A $\beta$ , nörotoksitesiteyi direkt olarak uyararak basal ön beyinde kolinerjik yıkıma neden olur. (26). Hastalığın kompleks yapısı nedeniyle, karakteristik özelliklerinin tümünü birden taşıyan bir transgenik model oluşturmak oldukça güçtür. Bu nedenle çoğu model, AH'nin tüm özelliklerini değil, en belirgin patolojik özelliklerini hedeflemiştir. İlk modeller amiloid depolanmasına odaklanırken, APP'nin keşfinden sonra ailesel AH mutasyonlarını taşıyan transgenlerin aşırı üretimine yönelik modeller kullanıma girmiştir (23,6).

Mutasyonun, A $\beta$  geninin hangi ucunda yerleştiği, modellerdeki plak oluşumu ile doğrudan ilişkilidir. N terminal uçtaki mutasyonlar A $\beta$ 40 ve A $\beta$ 42 üretimini artırırken, C ucundaki mutasyonlar ise A $\beta$ 1-42 üretimini artırmaktadır (8). Bu modellerin çoğunda transgenik APP'nin, endojen APP'den çok daha fazla üretildiği bildirilmiştir (8).

AH'nin insanlardaki gelişimine benzer biçimde, transgenik modellerin büyük kısmında da amiloid yükü yaşa bağlı olarak artmakta ve senil plaklar oluşturmaktadır (26).

A $\beta$  patolojisini araştırılan transgenik modellerin en önemlilerinden birkaçı ve ana özellikleri, şu şekildedir:

Tg2576: En çok tercih edilen modelidir (21). Bu fareler, mutant APP (Swedish mutasyonu taşıyan

insan APP695) sentezlemektedir. A $\beta$  artışı ikinci aydan itibaren gözlenebilmektedir. 12 ay civarında plak oluşumunun saptanması, patolojinin, yaşa bağımlı A $\beta$  birikimi ile ilişkisini ortaya koymaktadır. A $\beta$ 'nin çözünebilir oligomerik formunun birikimi ise, 5-6. aylarda ortaya çıkan hipokampal sinaptik ve kognitif bozulma ile ilişkilendirilmiştir. Tg2576 fareler, NFY ve sinir hasarı oluşturmamasına rağmen 5 ay sonunda oligomerik Tau'nun birikimine neden olmaktadır (23,20). Tg2576 farelerde, hipokampusta ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) aktivitesinde, tanıma hafızasında ve ERK'e bağımlı olaysal, ilişkisel ve mekansal hafızada ve öğrenmede eksiklikler oluşur. Bilişsel düzeydeki tüm bu kayıplar, insanda AH'nin başlangıç evresini temsil etmektedir. Bu modellerin avantajı, hastalığın biyolojik belirteçlerinin önceden saptanarak önlenmesi ve terapötik müdahalelerin kolaylıkla takip edilebilmesidir (24). Bu model, ayrıca AH ve insülin direnci ilişkisini araştırmak için de kullanılmıştır (8).

McGill-R-Thy1-APP: Swedish ve Indiana mutasyonlarını taşıyan hAPP751 genini açıklar. Bir sıçan modelidir. Tek transgen ile AH benzeri amiloid patolojisi oluşturabilen tek model olduğu için önemlidir. Bu sıçanların tek transgene sahip olması sayesinde, beynin AH ile ilişkili spesifik bir bölgesinde, insan APP üretimi sağlanabilmiştir (8).

PSEN1: A $\beta$ 42'yi selektif olarak yükseltir (27). PDAPP: Yoğun plak oluşumu sağlar. Aşı tedavisi araştırmalarında tercih edilen bir modeldir (21).

### Tau Modelleri

İnsan Tau proteininin aşırı üretiminin, hem hiperfosforil Tau oluşumuna hem de nörofibriler bozulmaya neden olduğu bildirilmiştir (8). İlerleyen kognitif azalma ve duysal-motor ve refleks cevabındaki bozukluklar, NFY ve olgun Tau kompleksinin birikimi ve beyin sapı ile omurilikteki aşırı aksonal hasar ile orantılıdır (28). Sık kullanılan bazı mutant Tau modelleri şunlardır:

JNPL3: NFY oluşumu ve buna bağlı hücre kaybını gösteren ilk modeldir (20). P301L mutasyonu ile oluşturulur.

TAPP: Hibrit bir modeldir. Tg2576 ve JNPL3'ün çaprazlanmasıyla ortaya çıkmıştır. Bu model, ön beyindeki MAPT patolojisini JNPL3'e göre daha belirgin biçimde ortaya çıkartmaktadır

Mutant APP/PS1: Bu modelde kullanılan ilk farelerin, mutant APP/PS1'i eksprese ettiği fakat aşırı Tau üretimi yapmadığı bildirilmiştir (29). Bu farelerde, aşırı A $\beta$  üretimi, endojen fare Tau'sunda hiperfosforilasyonu

uyarırken, NFY oluşumuna neden olmamaktadır. Buna sebep olarak da endojen fare Tau'sunun NFY oluşturma kapasitesinin düşük oluşu gösterilmiştir. Oysa ki bu farelerin beynine sentetik pre-agregasyonlu A $\beta$  enjekte edildiğinde, enjeksiyon alanında ve bu alanla bağlantılı nöronlarda NFY oluşumu izlenebilmektedir (29). Ayrıca, yüksek plak yüküne sahip modellerde, yaşlı plakları çevreleyen patolojik hiperfosforile Tau (p-Tau) birikiminin neden olduğu distrofik nöritler gösterilmiştir (29). Aşırı miktarda mutant APP/PS1 üreten transgenik sıçanlar, sahip oldukları insan vahşi tip Tau genetik zemininde, Tau'nun aşırı üretiminden bağımsız olarak, p-Tau'ya karşı antikolar ve Tau-modifikasyonları geliştirmektedir. Fare modelleri arasındaki bu farklılıklar, fare soyları ve her bir soyun ürettiği endojen fare Tau'sunun farklı izoformlara ve/veya farklı ifade düzeylerine sahip olmasına bağlanmıştır. Örneğin; TauP301S transgenik fareleri ile mutant APP geçişi, sadece dişi yavrularda NFY artışına sebep olmaktadır.

Sonuç olarak, hem A $\beta$  hem de Tau-patolojisi olan birleşik bir modelde anti-A $\beta$  immünizasyonu, Tau fosforilasyonunda erken patolojik değişiklikleri azaltmaktadır (29).

### Transgenik Olmayan AH Modelleri

Transgenik olmayan modeller, daha çok ileri yaştaki demanslı hastalardaki kognitif bozuklukların, kolinerjik eksiklikten kaynaklandığını savunan, "kolinerjik hasar" hipotezini test etmek için kullanılmıştır.

AH'de izlenen kortikal kolinerjik nöral kaybı uyararak için kimyasal bileşik uygulamaları (skopalamın, kolşisin, alüminyum ve p75NTR) veya iatrojenik lezyon oluşturma (beyin travması, bilateral hipokampal fimbrio-fariks kesilmesi, adrenalektomi, ooferektomi ve iskemi sonrası hipertermi) gibi uygulamalar kullanılmaktadır (20,23,30,31).

Kullanılan uyarıcı bileşiklerden skopalamın, kolşisin ve alüminyum nonspesifik iken, p75NTR kolinerjik sinirler için spesifiktir.

Bunlara ilaveten, A $\beta$  antikoları uygulanarak oluşturulan immün yanıt modeli, insülin/fosfoinazitid-3-kinaz (PI3-K) yolağı üzerinden oluşturulan hiperinsülinemik model ve streptozotosin (STZ) ile indüklenmiş AH modeli gibi modeller de kullanılmaktadır (8,31,32).

## II. Parkinson Hastalığı

PH, parkinsonizm sendromunun en sık görülen varyantıdır ve ileri yaş grubunun nörodejeneratif

hastalıkları arasında AH'nin ardından ikinci sıklıkta görülür. Avrupa için 50 yaşın üzerindeki PH'li birey sayısının katlanarak arttığı ve 2030'a kadar 8,7 ile 9,3 milyona ulaşacağı öngörülmektedir (33).

Substansia nigra başta olmak üzere, beyin sapındaki pigmentli dopaminerjik nöronlarda kayıp ve sağ kalan nöronlarda Lewy cisimciği denen birikintilerle karakterizedir (34).

Parkinsonizm, tremor, rijidite, bradikinezi, akinezi ve postüral anormallikler ile karakterize klinik bir durumdur. PH, diğer parkinsonizm çeşitlerinden (progressif supranükleer paralizi, multipl sistem atrofi grubu hastalıklar vs), kendine has patolojisi ve dopaminerjik tedaviye iyi yanıt vermesi ile ayrılır (35).

Nörofibriller birikimler olan Lewy cisimciklerinin temel bileşeni, presinaptik bir protein olan  $\alpha$ -sinükleindir (36). Ailesel geçişli PH geçişinde ise, bir ubiquitin-protein ligaz olan "Park" genindeki mutasyonlar ve lösin açısından zengin tekrarlı kinaz 2'deki (LRRK2) mutasyonlar öne çıkmaktadır (37,38).

Deney hayvanlarında PH oluşturmak için, bu mutasyonları taşıyan transgenik modeller ve hastalığın patofizyolojik mekanizmalarını taklit eden farmakolojik modeller kullanılmaktadır.

### Transgenik PH Modelleri

PH'ye sebep olan ve aralarında  $\alpha$ -sinüklein, LRRK2, Parkin, DJ-1 ve PTEN-inklü kinaz 1'in (PINK1) de bulunduğu birçok gen mutasyonu tanımlanmıştır (39). Transgenik PH modellerinin oluşturulmasında da bu genetik mutasyonlar kullanılır. En önemlileri, ailesel PH ile ilişkisi olduğu gösterilen ilk gen olan  $\alpha$ -sinüklein, otozomal dominant kalıtsal PH'nin başlıca genetik nedenini olarak bildirilen LRRK2, otozomal resesif PH'nin en sık nedeni olan Parkin ve otozomal resesif PH'nin ikinci en sık sebebi olarak gösterilen PINK1 modelleridir (21,38,40,41).

### Transgenik Olmayan PH Modelleri

Nigrostriatal yolda kimyasal olarak hasar oluşturma prensibi ile elde edilirler. Akut etki ile, kısa süre içinde dejenerasyon oluşturabilmeleri artı özellikleri iken, genellikle Lewy cisimciği oluşturmamaları için, bu hedefe yönelik kullanılamazlar. Ana kullanım alanları nigrostriatal nörodejenerasyona yönelik tedavi araçlarının denenmesidir (37).

Deneysel hasarı oluşturmak için kullanılan etkenler arasında; 6-hidroksidopamin, 1-metil 4-fenil 1,2,3,6-tetrahidropridin, çeşitli böcek ilaçları (rotenon,



maneb vs), çeşitli psikostimülanlar, lipopolisakkarit enjeksiyonları,  $\alpha$ -sinüklein vektör enjeksiyonları ve manganez inhalasyonu bulunmaktadır (37,41,42,43,44).

### III. Huntington Hastalığı

Otozomal dominant geçen, merkezi sinir sisteminde ağır nörodejenerasyonla seyreden, erken başlangıçlı ve ilerleyici bir hastalıktır (45). Temel bulgusu olan ve hastalığa adını veren "kore"ye, bilişsel/davranışsal bozukluklar ve motor koordinasyonda bozulma eşlik eder. Psikiyatrik semptomlar da bu ilerleyici hastalığın bir diğer bulgusudur (45).

HH, huntingtin proteinini (HTT) kodlayan gende CAG kodonunu tekrar eden bir mutasyon ile ilişkilidir. Bu mutasyon nedeniyle, normalden daha uzun bir poliglutamin sentez edilir. Tekrarlardaki artış düzeyi, klinik hastalığın ortaya çıkış olasılığı ile orantılıdır (46). Deneysel HH modelleri de bu mutasyonları taşıyan transgenik hayvanlar ya da son mutant HTT'nin (mHTT) etkisini taklit edecek nörotoksinlerin beyne doğrudan uygulanması ile oluşturulmuştur (47).

### Transgenik HH Modelleri

HH'de, poliQ yolunu kapsayan, *in vivo* olarak üretilen N-terminal bölünme ürünleri, mHTT'nin agregasyonu ve toksisitesinden sorumludur. Normalde HTT, ağırlıklı olarak sitoplazmik alanda dağılmıştır, nükleus içinde ise az miktarda bulunur. Mutant HTT ise daha fazla nükleer yerleşim gösterir, bu da gen transkripsiyonundaki değişikliklerin toksisitesinde önemli olabileceğini düşündürmektedir.

mHTT transgeni ile oluşturulan modelleri, genellikle N-terminal parçası üzerinde etkilidir. Bu modeller, HH'ye özgü bilişsel ve davranışsal belirtileri hızlı bir şekilde ortaya çıkartırlar (47). Bu modellerden biri olan R6/2 fare modeli, semptomların en hızlı gelişmesini sağlayan ve beyinde huntingtin kalıntılarının en yaygın olduğu modeldir (48).

Bilişsel, motor ve psikiyatrik bozulmayla birlikte striatal ve kortikal atrofi oluşturmak da isteniyorsa, maya ve bakteri aracılı transgenik modeller (YAC128 ve BACHD) tercih edilmelidir (47).

### Transgenik Olmayan HH Modelleri

mHTT'nin etkilerini seçici olarak taklit etmeyi amaçlarlar. Bu modellerde lezyon oluşturmak için kullanılan yöntemler; glutamat reseptör agonistlerinin striatal alana doğrudan enjeksiyonu, bazı nörotoksinler ve mitokondrial toksinlerin periferik uygulamaları şeklindedir (47,48).

Glutamat beyindeki ana uyarıcı nörotransmitterdir ve sinyal iletimindeki bozukluklar HH dahil birçok nörolojik bozuklukla ilişkilidir. Nörotoksin enjeksiyonu ile oluşturulan ilk model olan kainik asit/ibutenik asit modeli, HH'den etkilenen ve etkilenmeyen nöronları ayırabilirken, mitokondrial toksin uygulamaları bilateral akut striatal hasar oluşturmaları yönünden önemlidir (47,48).

### IV. Amiyotrofik Lateral Skleroz

ALS, korteks, beyin sapı ve spinal kordu tutan, ilerleyici bir motor nöron dejenerasyonu hastalığıdır. Ortalama tanı yaşı 50 ila 75 yaş arasındadır. ALS'li hastaların yaklaşık %10'unda aile öyküsü vardır, geriye kalanlar ise sporadik olarak sınıflandırılmıştır (49).

Tipik olarak hızlı seyredir. Hastaların çoğu, solunum yetmezliği başladıktan sonraki 3 ila 5 yıl içinde ölmektedir. 2040 yılına kadar dünya çapında ALS tanısı konmuş hasta sayısının yaklaşık 400.000'e ulaşması beklenmektedir (3). AH ve PH gibi diğer NDH'lere göre daha nadir olsa da, en sık motor nöron hastalığı olması açısından önemlidir.

Hastalığın etiyolojisinde genetik, elektrik ve manyetik alana maruziyet, pestisit maruziyeti, kirli hava maruziyeti, ağır metal maruziyeti, profesyonel sporlar (özellikle futbol ve Amerikan futbolu), travma, alkol ve sigara bağımlılığı gibi çok çeşitli faktörler suçlanmaktadır (49).

### Transgenik ALS Modelleri

ALS vakalarının %10 kadarının ailesel geçiş gösterdiği bildirilmiştir (49). ALS oluşumunda etkili olduğu gösterilen 27 gen mutasyonunu taşıyan transgenik hayvanlar, bu hastalığı modellemek için kullanılmaktadır (50).

En sık kullanılan transgenik ALS modeli mutant insan *SOD1* geni taşıyan fare modelidir (51,52,53). *SOD1* dışında, TARDB (TDP43) ve C21orf72 (ALS ve frontotemporal demansların en sık genetik nedeni) modelleri de sıkça kullanılmakta olup tümü ALS'nin tipik bulgularını ortaya çıkarmaktadır (50).

### Transgenik Olmayan ALS Modelleri

Güncel literatürde, transgenik olmayan deneysel ALS modeli içeren yayına rastlanmamıştır.

### V. NDH Modellerinde Görüntüleme

İster transgenik ister nontransgenik olsun, NDH modellerinin görüntülenmesi, insan NDH'lerinin

görüntülemesi prensipleri ile benzerdir. Unutulmaması gereken, fare modellerinin, insan hastalığının tüm karmaşık yapısını yansıtan kopyalar olmaktan çok, hastalığına neden olan patolojik süreçler için bir “yol modeli” olduğudur. Dolayısı ile görüntüleme modalitesi, çalışılan patolojik yolağa uygun olmalıdır. Elbette, deneysel model görüntüleme için kullanılacak sistemler insan sistemleri değil, deney hayvanının (NDH’ler için fare, sıçan ve daha az sıklıkta maymun) boyutlarına uygun “küçük hayvan görüntüleme” sistemleridir.

Deneysel NDH modellerinin değerlendirmesinde davranış testleri ve görüntüleme beraber kullanılır. Genel olarak, erken dönem değişiklikleri görüntülemek için kullanışlı olan yöntemler, tek foton emisyonlu bilgisayarlı tomografi (SPECT), PET ve MRG gibi fonksiyonel görüntüleme yöntemleridir. Günümüzde yaygın olarak kullanılan hibrid sistemler [SPECT/bilgisayarlı tomografi (BT), PET/BT ve PET/MRG], anatomik ve fonksiyonel görüntülemeyi birleştirerek çok daha verimli sonuçlar sunmaktadır (54).

Klinik uygulamaya benzer biçimde, prelinik deneysel görüntülemelerde de, amaç beyindeki nörokimyasal değişimleri göstermek olduğunda SPECT ve PET sistemleri oldukça hassas uzaysal çözünürlük sağlamaktadır. MRG sistemleri ise, plak oluşumları ve nörodejenerasyona bağlı atrofik alanları saptamada öne çıkmaktadır. Fonksiyonel MRG ile beyin kan akımı da verimli biçimde takip edilebilir (54).

NDH araştırmalarında kullanılacak bir diğer yöntem de *in vivo* optik görüntülemedir (OG). Bu yöntemde, hastalığın biyolojik belirtecini üreten ve aktivasyon yeteneğine sahip bir gen parçasına bağlı olarak, görüntülemelerde kullanılacak bir floresan proteini de üreten transgenik fareler kullanılır. Radyasyon ve radyonüklid işaretçilerin kullanılmaması, karmaşık cerrahi teknikler gerektirmemesi ve maliyetinin düşük olması OG’nin avantajlarıdır (55).

En sık NDH’ler olan AH, PH, HH ve ALS için kullanılacak görüntüleme yöntemlerinden bazıları şunlardır:

### AH Model Görüntülemeleri

AD’nin transgenik fare modelleri, hastalığın patolojisini *in vivo* olarak göstermek ve genotip-fenotip etkileşimini ortaya koymak için temel araçlar haline gelmiştir.

*In vivo* deneylerin çoğunda, çözünmez protein agregaları olan AP’lerin rolü araştırılmaktadır. Küçük hayvan MRG sistemleri, AP’lerin yapısında bulunan

demirden faydalanarak, T2 ağırlıklı sekanslarda AP’leri başarılı biçimde gösterebilmektedir. Bu görüntülerde, AP ile komşu beyin dokusu arasındaki zemin/lezion oranı, “lokal manyetik duyarlılık” olarak tarif edilmektedir (56). Buna karşılık, AP’lerin MRG ile görülebilir hale gelmesi için hastalığın ileri dönemde olması gerektiğinden, erken dönem değerlendirmede verimsiz olmaktadır.

Serebral amiloid anjiyopatiyi (SAA) hedefleyebilen, amiloid antikoru IgG4.1 ile işaretlenmiş nano veziküller, hem erken tanı ajanı hem de terapötik olarak kullanılmaktadır. Bu nano taşıyıcılar, gadolinyum bazlı MRG kontrast maddeleri veya iyot 125 gibi SPECT ajanları ile şelatlanarak, görüntülemelerde kullanılmaktadır.

F18-FDG PET ile ölçülen beyin glikoz metabolizması, AH’nin en duyarlı biyolojik belirteçlerinden biridir (57). Klasik olarak AH’de, glukoz metabolizması, kortikal ve hipokampal bölgelerde erken ve kademeli olarak azalır. Buna karşılık, APP/PS1 modelinde, F18-FDG PET ile hipokampusta ve striatumda korteksin yaşına bağlı glikoz tutulum artışı gösterilmiştir (57). Benzer şekilde, Tg2576 farelerinde de FDG PET, proton MRG spektrometri ile ortaya konan yüksek taurin konsantrasyonları ile ilişkili hipermetabolizma göstermiştir. Aynı şekilde, 11C-PIB bileşiği, transgenik farelerde kan beyin bariyerini kolayca geçer ve normal beyin dokusundan hızlı bir şekilde temizlenerek Aβ plakların PET sistemleri ile görüntülenmesini sağlar. C11-PIB görüntülemelerde özgünlük, modele ve plak yapısına bağımlıdır. Sadece klasik ve yaygın Aβ plaklara değil, aynı zamanda SAA lezyonlarına da bağlanır.

Işık mikroskopisi ile incelemeler, çok yüksek çözünürlüğe sahiptir, ancak incelenen beyin yapılarına ulaşabilmek için inceltirilmiş kemik alanları veya kraniyotomi gibi optik bir pencereye gereklidir. Diğer yandan, yakın kızılötesi floresans, uzaysal çözünürlükten feragat ederek, daha derin beyin yapılarının üç boyutlu görüntülenmesini sağlar. Tipik olarak histopatolojik değerlendirme için kullanılan amiloide spesifik boyalar kimyasal olarak modifiye edilerek, *in vivo* amiloid plak tespitinde kullanılacak görüntüleme problemleri elde edilmiştir (58).

### PH Model Görüntülemeleri

*In vivo* görüntüleme, özellikle MRG ve nükleer görüntüleme teknikleri (SPECT ve PET), PH’nin ilerleyişini ve tedaviye yanıtı değerlendirmede faydalıdır.

Beyin fonksiyonunun biyolojik belirteci olan beyin metabolizmasını sayısal olarak ölçmek için, MRG spektroskopisi tercih edilen yöntemdir. Spektroskopik

olarak glutamaterjik, GABAerjik ve astroglial fonksiyonlarını değerlendirmek için (1,6-3C2) glukoz veya (2-13C) asetat enfüzyonu kullanılabilir (54).

DAT bağlı radyoışaretleyiciler, nigrositriatal yolağın *in vivo* görüntülemesinde PET ve SPECT ajanı olarak yaygın kullanıma sahiptir (59). DAT SPECT görüntüleme, klinik çalışmalarda nigrositriatal dopaminerjik nöronların kaybını doğrulamak veya dışlamak için sıklıkla kullanılır.

Kantitatif I-123 FP-CIT pinhole SPECT görüntüleme, PH fare modellerinde strial dopamin seviyeleri saptanabilmektedir, ancak nigral nöron sayısını öngörmede başarılı değildir (59).

F-18-DOPA PET, klinikte ve hayvan modellerinin değerlendirilmesinde, *in vivo* presinaptik dopaminerjik bütünlüğün saptanması için altın standart görüntüleme yöntemidir. Bu radyo işaretleyicinin çok hızlı metabolize olması nedeniyle, transgenik farelerde dopaminerjik değişiklikleri izleyebilmek için uzun yarı ömürlü bir VMAT2 ligandı olan F18-dihidrotetrabenzin kullanılmaktadır. Bunun dışında 2β-karbometoksi-3β-(4-klorofenil)-8-(2-[F-18]-floretoil)-nortropan da, insanlar ve maymunlarda dopaminerjik sistemi değerlendirmede başarılıdır (54).

PH'nin patolojik süreçlerinden biri olan nöroenflamasyonu görüntülemek için de radyonüklid yöntemler kullanılır. Bunun için kullanılan radyo işaretleyiciler (örneğin; isokinolon PK1195), aktif mikrogliaların *in vivo* dağılımını takip edebilirler. PH modellerinde PET görüntülemenin faydalı olduğu diğer alan da C11-PBB3 ile, Tau patolojisinin karakteristik yayılımını göstermesidir (60).

Dopaminerjik nöronlarda PH'ye bağlı oluşan apoptozu *in vivo* olarak görüntülemek için floresan OG faydalıdır.

### HH Model Görüntülemeleri

HH modellerini görüntülemeye en yaygın kullanılan yöntem MRG incelemesidir.

Transgenik fare modellerinin *ex vivo* MRG incelemesinin, azalmış striatal ve artmış ventriküler hacimler gibi morfolojik değişiklikleri geleneksel histoloji ile iyi korele şekilde gösterdiği bildirilmiştir.

HH'de, beyindeki glutamat dağılımını haritalandırmak için, MRG ile glutamat kimyasal değişimi doyunluk transferi (gluCEST) görüntülemesi önerilmektedir (61). HH modellerinde mGluR1 düşüşünü ölçmek içinse *in vivo* C11-metilbenzamid PET kullanılmıştır (62). C11 radyoligand, transgenik farelerin striatumunda, kontrol grubuna göre daha fazla tutulur.

### ALS Model Görüntülemeleri

ALS'nin hayvan modellerini değerlendirmede MRG tercih edilecek görüntüleme yöntemidir. Beyin sapı motor çekirdeğindeki nörodejenerasyon, semptomlar başlamadan önce bile T2 ağırlıklı MRG ile görüntülenebilmektedir. Preklinik MRG'nin, insan ve fareler arasındaki analogiyi tespit etmede faydalı olduğu bulunmuştur (63). T2 ölçümleri, açık difüzyon katsayısı sekanslarının aksine, hayvanın yaşından etkilenmez.

MRG, tanısal faydalarına ek olarak, ALS fare modellerine enjekte edilen kök hücrelerin izlenmesinde de kullanılmıştır.

*Ex vivo* transmisyon elektron mikroskopisi, immünohistokimyasal çalışmalar ve immünofloresans çalışmaları, omurilikteki nörovasküler değişikliklerin gösterilmesinde kullanılmaktadır. SOD1 farelerde, spinal kılcal damarların *in vivo* iki-foton mikroskopta görüntülenmesi, kılcal damarların hem çapının hem de yoğunluğunun azaldığını göstermiştir (64).

PET görüntülemenin, ALS model farelerinde patolojik ve enflamatuvar süreçlerin değerlendirilmesinde yararlı olduğu bildirilmiştir (65).

Gargiulo ve ark. F-18-DPA-714'ün, beyincik ve beyin sapında artmış oranda tutulduğunu *in vivo* olarak göstererek, translokator proteini ekspresyonu ve mikrogliyal aktivasyon çalışması için [F-18] -DPA-714'ün uygulanabilirliği ve duyarlılığı kanıtlamıştır (66).

**Finansal Destek:** Yazarlar tarafından finansal destek alınmadığı bildirilmiştir.

**Çıkar çatışması:** Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

### Kaynaklar

1. Shamim IA. Neurodegenerative Diseases. New York: Springer; 2012.
2. Avila J, Lucas J, Hernandez F. Animal Models for Neurodegenerative Disease. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 2011.
3. Arthur KC, Calvo A, Price TR, Geiger JT, Chiò A, Traynor BJ. Projected increase in amyotrophic lateral sclerosis from 2015 to 2040. Nat Commun 2016;7:12408.
4. Prince, Martin, Comas-Herrera, Adelina, Knapp, Martin et al. World Alzheimer report 2016: improving healthcare for people living with dementia: coverage, quality and costs now and in the future. Alzheimer's Disease International (ADI), London, UK.
5. Hooijmans CR, Kiliaan AJ. Fatty acids, lipid metabolism and Alzheimer pathology. Eur J Pharmacol 2008;585:176-196.

6. Scheltens P, Blennow K, Breteler MMB, de Strooper B, Frisoni GB, Salloway S et al. Alzheimer's disease. *Lancet* 2016;388:505-517.
7. Lambert MA, Bickel H, Prince M, et al. Estimating the burden of early onset dementia; systematic review of disease prevalence. *Eur J Neurol* 2014;21:563-569.
8. Elçioğlu HK, Yılmaz G, İlhan B, Karan MA. Alzheimer Hastalığında Deneysel Hayvan Modelleri. *Nobel Med* 2018;14:5-13.
9. Hardiman O, Doherty CP, Elamin M, Bede P. *Neurodegenerative Disorders*. Switzerland: Springer International Publishing; 2016.
10. Sonkusare SK, Kaul CL, Ramarao P. Dementia of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders-memantine, a new hope. *Pharmacol Res* 2005;51:1-17.
11. Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:101-112.
12. Perl DP. *Neuropathology of Alzheimer's Disease*. Mt Sinai J Med 2010;77:32-42.
13. Viola KL, Klein WL. Amyloid  $\beta$  oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathol* 2015;129:183-206.
14. Hynd MR, Scott HL, Dodd PR. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 2004;45:583-595.
15. Pratico D. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: A reappraisal. *Trends Pharmacol Sci* 2008;29:609-615.
16. Salminen A, Ojala J, Kauppinen A, Kaarniranta K, Suuronen T. Inflammation in Alzheimer's disease: Amyloid- $\beta$  oligomers trigger innate immunity defence via pattern recognition receptors. *Prog Neurobiol* 2009;87:181-184.
17. Schemmerta S, Schartmanna E, Honolda D, Zafiu C, Ziehma T, Langenb KJ et al. Deceleration of the neurodegenerative phenotype in pyroglutamate-A $\beta$  accumulating transgenic mice by oral treatment with the A $\beta$  oligomer eliminating compound RD2. *Neurobiology of Disease* 2019;124:36-45.
18. Mattsson N, Insel PS, Landau S, et al. Diagnostic accuracy of CSF Ab42 and florbetapir PET for Alzheimer's disease. *Ann Clin Transl Neurol* 2014;1:534-543.
19. Palmqvist S, Zetterberg H, Blennow K, Vestberg S, Andreasson U, Brooks DJ, et al. Accuracy of brain amyloid detection in clinical practice using cerebrospinal fluid  $\beta$ -amyloid 42 a cross-validation study against amyloid positron emission tomography. *JAMA Neurol* 2014;71:1282-1289.
20. Şahin Ş. Deneysel Alzheimer Hastalığı Modelleri. *Türkiye Klinikleri Journal of Neurology Special Topics* 2012;5:102-106.
21. Tomruk C, Şirin C, Buhur A, et al. The four horsemen of neurodegenerative diseases Alzheimer, Parkinson, Huntington and amyotrophic lateral skleroz; clinical definition and experimental models. *FNG & Bilim Tıp Dergisi* 2018;4:37-43.
22. Puzzo D, Gulisano W, Palmeri A, Arancio O. Rodent models for Alzheimer's disease drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2015;10:703-711.
23. Carmo SD, Cuello CA. Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats, *Molecular Neurodegeneration* 2013;8:1-11.
24. Dineley KT, Jahrling JB, Denner L. Insulin resistance in Alzheimer's disease, *Neurobiol Dis* 2014;72:92-103.
25. Mc Larnon J. Correlated inflammatory responses and neurodegeneration in peptid-injected animal models of Alzheimer's disease, *Biomed Research International* 2014;9:23670.
26. Sadigh-Eteghad S, Saberमारouf B, Majdi A, et al. Amyloid-beta: a crucial factor in Alzheimer's Disease. *Med Princ Pract* 2015;24:1-10.
27. McGowan E, Eriksen J, Hutton M. A decade of modeling Alzheimer's disease in transgenic mice. *Trends Genet* 2006;22:281-289.
28. Zilka N, Filipcik P, Koson P, et al. Truncated Tau from sporadic Alzheimer's disease suffices to drive neurofibrillary degeneration in vivo. *FEBS Lett* 2006;580:3582-3588.
29. Stancu IC, Vasconcelos B, Terwel D, et al. Models of amyloid beta induced Tau pathology: the lonAg and folded road to understand the mechanism. *Molecular Neurodegeneration* 2014;9:51.
30. Chesselet MF, Carmichael ST. Animal models of neurological disorders. *Neurotherapeutics* 2012;9:241-244.
31. Bajo R, Pusil S, López ME, et al. Scopolamine effects on functional brain connectivity: a pharmacological model of Alzheimer's disease. *Sci Rep* 2015;5:9748.
32. Calvo-Ochoa E, Arias C. Cellular and metabolic alterations in the hippocampus caused by insulin signalling dysfunction and its association with cognitive impairment during aging and Alzheimer's disease: studies in animal models. *Diabetes Metabolism Research and Reviews* 2015;31:1-13.
33. Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology* Jan 2007;68:384-386.
34. Victor S, Van Laar, Sarah B. Berman. Mitochondrial dynamics in Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2009;218:247-256.
35. Çakmur R. Parkinson Hastalığının Epidemiyolojisi ve Klinik Özellikleri. *Türkiye Klinikleri J Neur* 2003;1:160-163.
36. Wakabayashi K, Tanji K, Odagiri S, Miki Y, Mori F, Takahashi H. The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol* 2013;47:495-508.
37. Gubellini P, Kachidian P. Animal models of Parkinson's disease: An updated overview. *Revue Neurologique* 2015;171:750-761.
38. Fujimoto T, Kuwahara T, Eguchi T, Sakurai M, Komori T, Iwatsubo T. Parkinson's disease-associated mutant LRRK2

- phosphorylates Rab7L1 and modifies trans-Golgi morphology. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2018;495:1708-1715.
39. Mariucci G, Pagiotti R, Galli F, Romani L, Carmela Conte C. The potential role of toll-like receptor 4 in mediating dopaminergic cell loss and alpha-synuclein expression in the acute MPTP mouse model of Parkinson's Disease. *J Mol Neurosci* 2018;64:611-618.
  40. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, et al. Mutation in the a-Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science* 1997;276:2045-2047.
  41. Blandini F, Armentero MT. Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J* 2012;279:1156-1166.
  42. Lindgren HS, Lelos MJ, Dunnett SB. Do a-synuclein vector injections provide a better model of Parkinson's disease than the classic 6-hydroxydopamine model? *Exp Neurol* 2012;237:36-42.
  43. Sanchez-Betancourt J, Anaya-Martínez V, Gutierrez-Valdez AL, et al. Manganese mixture inhalation is a reliable Parkinson disease model in rats. *Neurotoxicology* 2012;33:1346-1355.
  44. Jackson-Lewis V, Blesa J, Przedborski S. Animal models of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2012;18:183-185.
  45. Vuong K, Canning CG, Menan JC, Loy CT. Gait, balance, and falls in Huntington disease. *Handb Clin Neurol* 2016;159:251-260.
  46. Sugars KL and Rubinsztein DC. Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *TRENDS in Genetics* 2003;19:233-238.
  47. Pouladi MA, Morton AJ, Hayden MR. Choosing an animal model for the study of Huntington's disease. *Nature Reviews. Neuroscience* 2013;14:708-721.
  48. Mehrotra A, Sood A, Sandhir R. Mitochondrial modulators improve lipid composition and attenuate memory deficits in experimental model of Huntington's disease. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2015;410:281-292.
  49. Talbott EO, Malek AM, Lacomis D. The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Handb Clin Neurol* 2016;138:225-238.
  50. Chia R, Chiò A, Traynor BJ. Novel genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: diagnostic and clinical implications. *Lancet Neurol* 2018;17:94-102.
  51. Martineau E, Di Polo A, Velde CV, Robitaille R. Dynamic neuromuscular remodeling precedes motor-unit loss in a Mouse model of ALS. *eLife* 2018;7:e41973.
  52. McCampbell A, Cole T, Wegener AJ, et al. Antisense oligonucleotides extend survival and reverse decrement in muscle response in ALS models. *J Clin Invest.* 2018;128:3558-3567.
  53. Pennati A, Asress S, Glass JD, Galipeau J. Adoptive transfer of IL-10+ regulatory B cells decreases myeloid-derived macrophages in the central nervous system in a transgenic amyotrophic lateral sclerosis model. *Cell Mol Immunol* 2018;15:727-730.
  54. Albanese S, Greco A, Auletta L, Mancini M. Mouse models of neurodegenerative disease: preclinical imaging and neurovascular component. *Brain Imaging Behav* 2018;12:1160-1196.
  55. Patterson AP, Booth SA, Saba R. The emerging use of in vivo optical imaging in the study of neurodegenerative diseases. *BioMed Research International* 2014;2014:401306.
  56. Wadghiri YZ, Li J, Wang J, et al. Detection of amyloid plaques targeted by bifunctional USPIO in Alzheimer's Disease transgenic mice using magnetic resonance microimaging. *PLoS ONE* 2013;8:e57097.
  57. Poisnel G, Hérard AS, Tannir E, et al. Increased regional cerebral glucose uptake in an APP/PS1 model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2012;33:1995-2005.
  58. Lin AJ, Liu G, Castello NA, et al. Optical imaging in an Alzheimer's mouse model reveals amyloid- $\beta$ -dependent vascular impairment. *Neurophotonics* 2014;1:011005.
  59. Alvarez-Fischer D, Blessmann G, Trosowski C, et al. Quantitative [(123)I]-FP-CIT pinhole SPECT imaging predicts striatal dopamine levels, but not number of nigral neurons in different mouse models of Parkinson's disease. *NeuroImage* 2007;38:5-12.
  60. Shinotoh H, Shimada H, Kokubo Y, et al. Tau imaging detects distinctive distribution of tau pathology in ALS/PDC on the Kii Peninsula. *Neurology* 2019;92:1-12.
  61. Pépin J, Francelle L, Carrillo-de Sauvage MA, de Longprez L, Gipchtein P, Cambon K, et al. In vivo imaging of brain glutamate defects in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *NeuroImage* 2016;139:53-64.
  62. Yamasaki T, Fujinaga M, Yui J, et al. Noninvasive quantification of metabotropic glutamate receptor type 1 with [11C] ITDM: a small-animal PET study. *J Cereb Blood Flow Metab* 2014;34:606-612.
  63. Zang DW, Yang Q, Wang HX, Egan G, Lopes EC, Cheema SS. Magnetic resonance imaging reveals neuronal degeneration in the brainstem of the superoxide dismutase 1 transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 2004;20:1745-1751.
  64. Miyazaki K, Masamoto K, Morimoto N, et al. Early and progressive impairment of spinal blood flow-glucose metabolism coupling in motor neuron degeneration of ALS model mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012;32:456-467.
  65. Brownell AL, Kuruppu D, Kil KE, et al. PET imaging studies show enhanced expression of mGluR5 and inflammatory response during progressive degeneration in ALS mouse model expressing SOD1-G93A gene. *J Neuroinflammation* 2015;12:217.
  66. Gargiulo S, Anzilotti S, Coda ARD, et al. Imaging of brain TSPO expression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis with 18F-DPA-714 and micro-PET/CT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2016;43:1348-1359



# Klinik Öncesi Çalışmalarda Kullanılan Ortopedi Modelleri ve Görüntüleme Teknikleri

## Orthopedic Models and Imaging Techniques in Preclinical Researchs

Deniz Bedel, Fatma Suna Kırac

Yakın Doğu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Lefkoşa, KKTC

### Öz

Tendinopatiler ve kırık hasarı sonrası gelişen osteoartritler hastanın yaşam kalitesini düşüren kronik sağlık sorunlarıdır. Osteoporoz kırıklara yol açan diğer önemli bir sağlık problemidir. Osteoporotik kırıkların tedavisinde tatmin edici sonuçlar elde edilememektedir. Son yıllarda kırık iyileşmesinin altında yatan mekanizmaların anlaşılmasına, kırık ve tendon yenilenmesinin sağlanmasına yönelik araştırmalar artış göstermiştir. Kırık iyileşmesindeki karmaşık süreçlerin ve ilgili mekanizmaların anlaşılmasını sağlamak için hayvan modellerinden yararlanılmaktadır. Kırık ve tendon patolojilerinde, yeni cerrahi yöntemlerin araştırılması, cerrahi implant ve materyallerin geliştirilmesi ve denenmesi amacıyla hayvan modellerinin kullanılması kaçınılmazdır. Doku mühendisliği modelleri yenilenmeyi sağlayacak yeni hücreler üretmeyi hedeflerken, ortopedik cerrahi modeller implantlar ve biyomekanik araştırmalar üzerine yoğunlaşmaktadır. Klinik öncesi ortopedik çalışmaların tasarlanmasında, elde edilen sonuçların doğru değerlendirilebilmesi için uygun yöntemler seçilmelidir. Dokuların mikroyapısal özelliklerinin değerlendirilmesinde histolojik yöntemler önemlidir. Ayrıca, görüntüleme yöntemlerini kullanarak yapılan nicel değerlendirmeler, sonuçların kliniğe uyarlanmasını sağlayacak değerli bilgiler sunmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Ortopedik araştırma, kırık iyileşmesi, tendinopati, kırık onarımı, osteoporotik kırık

### Abstract

Tendinopathies and osteoarthritis developed after cartilage damage are chronic health problems that decrease the patient's quality of life. Osteoporosis is another important health problem leading to fractures. In the treatment of osteoporotic fractures, satisfactory results cannot be achieved. In recent years, studies intended to understand the mechanisms underlying the fracture healing, and also, to provide the regeneration of cartilage and tendon have increased. Animal models are used to improve understanding of complex processes and related mechanisms in fracture healing. In cartilage and tendon pathologies, it is inevitable to use animal models in order to investigate new surgical methods and to develop and test surgical implants and materials. While tissue engineering models aim to produce new cells that will provide regeneration, orthopedic surgery models focus on implant and biomechanical research. In planning pre-clinical orthopedic studies, appropriate methods should be chosen in order to evaluate the results correctly. Histological methods are important in evaluating the microstructural properties of tissues. In addition, quantitative assessments obtained by imaging modalities provide valuable information for adaptation of the results to the clinic.

**Keywords:** Orthopedic research, fracture healing, tendinopathy, cartilage repair, osteoporotic fracture

### Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Dr. Deniz Bedel, Yakın Doğu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Lefkoşa, KKTC

**E-posta:** denizbedel@yahoo.com **ORCID ID:** orcid.org/0000-0001-9416-6973

©Telif Hakkı 2019 Türkiye Nükleer Tıp Derneği / Nükleer Tıp Seminerleri, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.

## Giriş

Hayvan modelleri biyomedikal araştırmalarda yaygın olarak kullanılmakta olup özellikle ortopedik patolojiler ve travmaların tıbbi ve cerrahi tedavilerinin geliştirilmesi için farklı hayvan modellerinden (küçük veya büyük hayvan modelleri) yararlanılmaktadır. Preklinik hayvan modelleri, *in vitro* çalışma sonuçlarının insan klinik çalışmalarına uyarlanması için çok önemli bir köprü görevi görmektedir. Ancak, hayvan modellerinin *in vitro* yöntemler gibi tam standardize edilememiş olması en önemli kısıtlayıcı faktördür. Kullanılacak hayvan modeli insana benzer olmalı ve uluslararası kılavuzlarda tanımlandığı gibi çalışmada çok sayıda hayvan kullanılmaktan kaçınılmalıdır. Çalışma iyi planlanmış ve yürütülmüş olsa da eğer incelenecek ortopedik patoloji için uygun hayvan modeli seçilmezse elde edilen sonuçlar yanıltıcı olacaktır. İnsanlara benzer model seçilmediğinde uygulamaya girecek sonuçlar elde edilemediği gibi hem zaman hem ekonomik kayba neden olacaktır. Bu nedenle, klinik öncesi çalışmalarda amaca uygun hayvan modelinin seçilmesi önemlidir.

Günümüzde ortopedide kullanılan tedavilerin bir kısmı, zaman içinde biriken klinik bulguların uygulanmasına ve cerrahi tecrübeye dayanmaktadır. Ancak, özellikle travmatolojide bazı klinik tabloların ideal tedavisi henüz yoktur. Örneğin; eklem kırıkdağı yaralanmaları ve patolojileri önemli bir sakatlık nedeni olup, kesin tedavisi yoktur. Travma nedeniyle gelişen osteoartritlerde hastaların yaşı gençtir; bu kırıkdağı patolojisi hastaların yaşam kalitesini azaltmakta ve sağlık sistemine klinik ve finansal yük getirmektedir (1). Tendon patolojileri ve yırtıkları, genellikle sporla ilişkili sorunlar olup kronik ağrı ve hareket kısıtlanmasına yol açmaktadır. Ne yazık ki, mevcut tedaviler ve rehabilitasyon sonrası başarısızlık ve yeniden yırtılmalar sıklıkla görülmektedir (2). Kırıkdağı ve tendon patolojilerinde yeni cerrahi yöntemlerin araştırılması, cerrahi implant ve materyallerin geliştirilmesi ve denenmesi amacıyla hayvan modellerinin kullanılması kaçınılmazdır. Son yıllarda doku iyileşmesinin altında yatan mekanizmaların anlaşılmasına, kırıkdağı ve tendon rejenerasyonunun sağlanmasına yönelik araştırmalar belirgin olarak artmıştır.

Diğer önemli bir ortopedik sorun, kemiklerde posttravmatik veya spontane kırık gelişimidir. Kırık iyileşmesi karmaşık bir süreç olup, çeşitli hücre tiplerinin, sitokinlerin ve morfogenetik proteinlerin koordinasyonunu ve düzenlenmesini içermektedir. Bu süreç sonunda kırıkların çoğu tamamen iyileşse de

bazı kırıklarda kaynama görülmez. Kırık iyileşmesinde farklılığa yol açan karmaşık süreçlerin ve bu süreçlerden sorumlu mekanizmaların anlaşılmasını sağlamak ve süreçleri geliştirmek için hayvan modellerinden yararlanılmaktadır. Osteoporoz, dünya çapında en önemli sağlık sorunlarından biri olup spontane kırıkların başlıca nedenlerinden biridir. Osteoporoz ile ilişkili kırıkların tedavisi bugün hala tam olarak yapılamamaktadır. Mevcut tedavi seçeneklerini artırmak ve osteoporotik kırıkların cerrahi tedavisinde yeni stratejiler geliştirmek için dünya çapında büyük araştırmalar yapılmaktadır. Günümüzde küçük hayvan modelleri özellikle kırık iyileşmesinin moleküler yönlerini analiz etmek için kullanılmakta; doku mühendisliği modelleri yeni kemik üretmeyi hedeflerken, ortopedik cerrahi modeller ise implantlar ve biyomekanik araştırmalar üzerine yoğunlaşmaktadır. Kırık iyileşmesindeki gecikmelerin önemli bir nedeni implantla ilişkili enfeksiyonlardır. Ancak, bu konu enfeksiyon modelleri içinde incelendiğinden burada tartışılmamıştır.

Bu derlemenin amacı, kırık iyileşmesi, osteoporotik kırıklar, kırıkdağı ve tendon yaralanmaları ile ilgili araştırmalarda kullanılan hayvan modellerini tartışmaktır. Ayrıca mümkün olduğunca, amaca uygun model seçimi ve çalışmalarda kullanılan görüntülemeler ve diğer değerlendirme yöntemleri hakkında bilgi aktarımı yapılacaktır.

## Kırık Modelleri

Oluşturulacak *in vivo* kırık modelleri araştırmacılara kemik onarımındaki fizyolojik süreçler ve çeşitli faktörlerin kırık iyileşmesi üzerindeki etkilerini araştırma olanağı sunar. Literatürde birçok farklı kırık modeli vardır. Bu modeller kullanılan deney hayvanına, kırığın yerine, açık veya kapalı kırık oluşturulmasına göre farklılık gösterir. En yaygın standart kırık modeli, sıçanlarda femur diyafiz orta kesimde oluşturulan kapalı kırık modelidir. Femur intramedüller Steinmann pini veya Kirschner (K) teli ile stabilize edildikten sonra, Einhorn ağırlık düşürme aparatı ile femur diyafizinde kırık oluşturulur (3). Bu modelin en büyük avantajı, çok iyi bir şekilde tekrarlı transvers kırıklar oluşturulabilmesi, minimal yumuşak doku hasarına yol açması ve farklı araştırmacılar tarafından modellerde yaygın olarak kullanılmış olmasıdır. Pin, iyileşmiş kırık alanında herhangi bir bozulmaya neden olmadan kolaylıkla uzaklaştırılır. Bu modelde kırık iyileşmesi çabuk ve tam olarak gerçekleşir. Bu nedenle, gecikmiş kaynakmalarda iyileşmeyi artırıcı faktörlerin araştırılması olası değildir.

Sıçanlarda femoral osteotomi ile açık kırık modeli oluşturulabilir (4). Bu teknikte salınımlı bir testereyle femur diyafiz orta kısmında osteotomi açılır; sonra kırık hatları çevresindeki periosteum sıyrılıp çıkarılarak yumuşak doku hasarı oluşturulur. Periosteum, kemik onarımı için önemli bir osteoprogenitör hücre kaynağı olduğundan bu işlem kemik iyileşmesinde önemli bir bozulmaya sebep olur. Bu nedenle periosteumu hasarlayan veya ortadan kaldıran teknikler, bozulmuş kemik iyileşmesi modelleri oluşturmak için kullanılabilir (5).

Farelerde femur veya tibiada kırık modelleri oluşturulabilir. Fareler için bir ağırlık düşürme cihazı tasarlanmıştır (6). Tibia diyafiz orta kesim kırıkları distal tibia kırıklarından daha hızlı iyileşme eğilimindedirler. Distal tibia kırıklarında bazen 3 haftada gecikmiş kaynama gözlenir (7). Bu tür kırıklar genellikle bir intramedüller pin ile sabitlenir, ancak halka ve eksternal plaka fiksatörler ile sabitleme de literatürde tanımlanmıştır (8). Fare kırık modelleri, gen nakavt fareler, transgenik veya mutant fareler kullanılarak genetik değişkenlerin test edilmesini sağlayabildiklerinden büyük bir avantaj oluşturmaktadır.

### Kemik Defekti Modelleri

Klinik öncesi deneysel model tasarlanırken kemik defekti (KD) tipinin göz önüne alınması önemlidir. Literatürde birkaç farklı model vardır, ancak bunların tamamı tüm hayvanlarda kullanılamaz. Bazı modellerde fiksasyon uygulamak gerekmediğinden pilot çalışmaların maliyetini azaltmak için iyi seçim olabilirler. Fare ve sıçanların büyüme plakları yaşamları süresince açık olduğundan, oluşturulan KD kemiğin büyüme plaklarına yakın olmamalıdır. Literatürde bildirilen farklı modeller vardır (9):

- Segmental defektler (uzun kemik segmental defektleri ve yassı kemik segmental defektleri),
- Kısmi kortikal kemik defektleri (kortikal pencereler, kama defektleri veya transkortikal matkap delikleri),
- Süngerimsi kemik defektleri (matkap delikleri).

Segmental defektler, kritik ve subkritik boyutta KD'leri oluşturulabildiğinden kaynamama çalışmaları için önemli modellerdir. Tedavi yöntemlerinin test edildiği çalışmalarda kritik boyutlu (KB) KD modellerinin seçimi önemlidir. Kritik boyutlu KD, belli bir hayvan türünde ve belli bir kemikte oluşturulan, hayvanın ömrü süresince kendiliğinden iyileşemeyen en küçük boyuttaki defektir. Farklı çalışmalarda KBKD, hayvanın ömrü boyunca %10'dan daha az miktarda iyileşmenin görüldüğü defekt olarak tanımlanmıştır. Oluşturulduktan 1 yıl sonra

defektin %10'unda iyileşme görülmediyse hayvanın ömrü boyunca iyileşmenin görülmesi beklenmez. Pratikte, defektin çalışma süresince iyileşmeyeceği kabul edilir (10,11). Tedavi edilmeden bırakıldığında iyileşme kemik yerine fibröz bağ dokusu oluşumuyla olur. Kemik iyileşme araştırmalarında kullanılan her bir hayvan türü için KBKD oluşumunda hayvan soyu ve yaşı, kemiğin yeri, cerrahi fiksasyonun varlığı veya yokluğu ve defekt büyüklüğü gibi birçok faktör göz önüne alınmalıdır. İdeal olarak her bir model, negatif kontrol ve pozitif kontrol (otojen kemik grefti) grupları kullanılarak standart hale getirilmelidir.

Kemik metabolizmaları çok yüksek olduğu için fare, sıçan ve tavşan modelleri defekt iyileşmesinin izlendiği çalışmalarda iyi seçimdir. Defektler hızlı iyileşir ve çalışmanın süresi kısa olabilir. Bu nedenle nispeten düşük maliyetlidirler. Ancak, insanlarda kullanılacak ürünleri test etmek için iyi seçim değildirler. Koyun, keçi, köpek, insan dışı primatlar ve domuzlar büyüklük ve kemik özellikleri açısından insanlarla daha yakından ilişkili büyük hayvan modelleridir. Özellikle ortopedik ve prostetik cihazlar, büyük implantlar veya biyomekanik çalışmalar için daha iyi modellerdir (12,13). Son dönemde köpek, insan dışı primatlar ve tavşan kullanımında azalma varken koyun, keçi ve domuz modellerinde artış tanımlanmıştır (12).

Klinik öncesi ortopedik çalışmalar tasarlanırken sonuçların değerlendirilmesinde uygun yöntemlerin seçilmesi önemlidir. Kemik kalitesi ile ilişkili olan mikroyapısal özelliklerin değerlendirildiği histolojik sonuçlar değerlidir. Bununla birlikte, klinik uygulamaya yansımaları için, kemik iyileşmesinin fonksiyonel ölçümleri ve kaynamanın kuvvetini gösteren mekanik testlerin sonuçlarının tartışılması daha önemlidir. Kemik iyileşme çalışmalarının çoğunda en önemli sonuç kaynamanın olması veya olmamasıdır. Son zamanlarda bazı çalışmalarda buna ek olarak kısmi kaynama durumu da tanımlanmaktadır (14). Klinikte tibia için kullanılan radyografik kaynama skalası temel alınarak, fare ve sıçanlar için bir skorlama sistemi önerilmiştir. Bu yöntemde sıçanlarda anterior-posterior ve lateral radyografilerde kortikal köprüleşme değerlendirilerek skorlama yapılmış ve gözlemciler arası uyumun iyi olduğu gösterilmiştir (15).

Kemik oluşumunu ölçmek için, mikro bilgisayarlı tomografi (mikroBT) kemiğin üç boyutlu değerlendirmesinde altın standart kabul edilmektedir. Bu yöntem özellikle fare ve sıçanlardaki kırık çalışmalarında kullanılmıştır. Örnekler üzerinde bir tahribat yapmadığı için mikroBT görüntüleme ilk inceleme olarak tercih edilir; daha sonra örnekler mekanik veya histolojik



analizlerden geçirilebilir. MikroBT görüntüleme verileri, kallus özelliklerinin belirlenmesi ve daha sonra elde edilen biyomekanik verilerle kallus arasındaki ilişkilerin incelenmesi amacıyla da kullanılabilir (16). Boussein ve ark., mikroBT yöntemi ile kemik oluşumunu değerlendiren çalışmaların raporlarının standardizasyonu için kılavuz yayınlamıştır (17). Böylece, farklı mikroBT sistemleri ile yapılan çalışmaların sonuçlarının değerlendirilmesi ve karşılaştırılması mümkün olacaktır. Bu kılavuza göre, mikroBT görüntüleri değerlendirilirken kemik hacim fraksiyonu, trabekül sayısı, kalınlığı ve ayrımı gibi trabeküler kemik morfolojik özellikleri raporda tanımlanmalıdır. Kortikal kemik morфомetrisini tanımlamak için total kesit alanı, kortikal kemik alanı, kortikal kemik alan fraksiyonu ve kortikal kalınlık belirtilmelidir. Diğer değişkenler görüntüleme özellikleri (görüntüleme alanı, X-ray akımı, voksel boyutu, vb.) ve görüntü işleme özellikleri (filtre seçimi, segmentasyon vb.) ile araştırma hipotezine göre seçilecek değişkenler olabilir.

### **Osteoporotik Kırık Tedavisine Yönelik Çalışmalarda Kullanılan Hayvan Modelleri**

Osteoporoz, kemik kütlesinin kaybına ve kemik dokusunun mikro mimarisinin bozulmasına yol açan, bunun sonucunda kemik kırılabilirliğinin ve kırık gelişimine yatkınlığın artmasıyla karakterize sistemik bir hastalıktır. Yaşam beklentisinin ve nüfustaki yaşlı insan popülasyonunun artması nedeniyle, osteoporoz dünya çapında en önemli sağlık sorunlarından biri haline gelmiştir. Osteoporoz ile ilişkili kırıkların tedavisi bugün hala tatmin edici değildir. Osteoporotik kemiğe kırık fiksasyonu için geleneksel implantların uygulanması sınırlıdır ve zayıf kemik yapısının sonucu olarak fiksasyonlar başarısızlıkla sonuçlanır (18). Mevcut tedavi seçeneklerini artırmak ve osteoporotik kırıkların cerrahi tedavisinde yeni stratejiler geliştirmek için dünya çapında büyük araştırmalar yapılmaktadır. Osteosentez veya artroplastisi için implantlar geliştirilmesinin yanı sıra, biyomateryaller, hücreler ve sitokinler gibi biyolojik yaklaşımları içeren çalışmalar yürütülmektedir (19).

Standart tedaviden farklı olan herhangi bir yeni yöntemin yararının gösterilmesi için hayvan modelinde çalışılması gerekir. Ayrıca, yeni tedavilerin veya cihazların verimlilik ve güvenliğinin kanıtlanması için klinik uygulama öncesinde test edilmeleri gerekir. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), osteoporoz tedavisindeki potansiyel ajanların çalışılması için iki farklı hayvan türünün kullanılmasını önermektedir. Bu hayvan

modellerinden birincisi ovaryektomize sıçanlardır; ikincisi ise fare veya sıçan olmayan ve insandakine benzer şekilde Haversian sistemine sahip bir büyük hayvan modelidir (20). FDA kılavuzlarındaki öneriler yalnız farmasötik ajanları içerir. Ancak, yeni cerrahi tedavi seçeneklerinin de klinik uygulama öncesinde değerlendirilmesi gerekir. Bu nedenle küçük ve büyük hayvan osteoporoz modellerine gereksinim vardır.

Azalmış kemik mineral yoğunluğu (BMD), azalmış kemik kütlesini yansıtır. İnsanlarda osteoporoz, sağlıklı genç yetişkinlerin ortalama kemik yoğunluğu değerinin (T-skoru), 2,5 standart sapma altında olan BMD olarak tanımlanmıştır. Hayvan modelleri için bu tanımın kullanılması tartışmalıdır; çünkü belirlenmiş bir T-skoru yoktur. Yumurtalıkların fonksiyonunun sona ermesinden sonra uzun süreli bir gözlemlerde BMD'nin önemli miktarda azalması kemik kaybını kanıtlayabilir. Fakat omurgadaki spontane kırıklar gibi klinik bulgular oluşmaz (19). Ek olarak, hayvan çalışmalarında saptanan BMD azalmaları için elde edilen değerleri karşılaştırmak zordur. Çünkü, çift enerjili X-ışını absorpsiyometrisi (DEXA) ve periferik kantitatif (pQ) BT gibi farklı yöntemlerle elde edilen değerlerden yararlanılmaktadır. DEXA yöntemi daha popüler olmasına ve yaygın olarak kullanılmasına rağmen, hayvan modellerini içeren çalışmalarda kortikal ve trabeküler kemik arasında ayırım yapılabilmesi için pQBT gibi üç boyutlu tekniklerin kullanılması önerilir (18).

Ovaryektomize sıçan modeli, osteoporozda en çok çalışılan hayvan modelidir. Bu modelde yumurtalıkların çıkarılmasını takiben bifazik kemik kaybı oluşur. İlk 100 güne kadar hızlı bir kemik kaybının ardından süngerimsi kemik hacminin osteopeni düzeyinde stabilize olduğu gözlenir. Model oluşturulduktan 270 gün sonra, süngerimsi kemik hacminin azaldığı yavaş bir kemik kaybı fazı görülür. Bununla birlikte, toplam BMD kaybı, insanlarda görülen kayıptan daha azdır (21). Bu model göreceli olarak kısa bir süre içinde incelendiğinde, postmenopozal kemik kaybını taklit etmektedir. On iki aylık ve daha uzun süreli gözlemlerde ise, ovaryektomize sıçanlarda kemik mineral içeriği, kemik alanı ve vücut ağırlığı değerleri insanlarda görüldenden daha yüksek bulunmuştur (20). Ayrıca, kortikal kemikte Haversian sistemin bulunmaması ve klinikte östrojen eksikliğinin geç evrelerinde görülen bozulmuş osteoblast fonksiyonunun olmaması nedeni ile bu modelin kullanımı sınırlıdır (22).

Yaşlanma ve osteoporozun bir sonucu olarak kemiklerde kortikal gözenekli yapının artışı gözlenmektedir. İntrakortikal gözenekli yapı, kemik

oluşumu ile rezorpsiyon arasındaki dengesizliğin bir sonucudur. Hem kortikal kemiğin mekanik dayanıklılığını hem de kullanılan vidaların sabitleme gücünü etkiler. Brockstedt ve ark. 64 normal kişide (41 kadın ve 23 erkek; ortalama yaş 48 yıl) ilyak kortikal kemiği inceledikleri çalışmalarında kortikal gözenekli yapıdaki artışın duvar kalınlığındaki azalma ve Haversian kanal çapındaki artış ile ilişkili olduğunu saptamıştır (23). Kortikal gözeneklilik değerlerinde hayvan modelleri arasında büyük farklılıklar gözlenmekte ve modellerin hiçbirinde insandaki durumla karşılaştırılabilir intrakortikal gözenekli yapı bulunmamaktadır. Bu durum, spontane kırık riskinin hayvan osteoporoz modellerinde gözlenmemesine rağmen insanlarda neden yüksek olduğunu açıklamakta faydalı olabilir.

Birçok hayvan deneyinde belirtildiği gibi, osteoporotik kemikte kırıkların iyileşme kapasitesi azalmış görünmektedir. Ayrıca, osteoporoz varlığında gözlenen azalmış iyileşme kapasitesi, implant fiksasyonundaki başarısızlık oranını belirgin yükseltmektedir. Ovaryektomize sıçan modeli ve koyun modeli kullanılarak yapılan bazı çalışmalarda, kırık iyileşmesinde bozulma olduğu bildirilmiştir (24,25). Osteoporotik kemikte kırık fiksasyonunun araştırılması için bir hayvan modelinin seçilmesi, insanlarla karşılaştırılabilir boyutta uzun kemik bulunmasına dayanmaktadır. Bu nedenle, koyunlar küçük hayvan modellerine tercih edilmiştir. Günümüzde implant üretimindeki teknik gelişmeler, kemirgen kemiğinin plakalar ve vidalar vasıtasıyla iç fiksasyonuna izin veren çok küçük fiksasyon cihazlarının geliştirilmesini sağlamıştır. Bu gelişmelerle, deneysel çalışmalarda hayvan büyüklüğü sorunu aşılabilecektir. Böylece, osteoporoz için yaygın olarak kullanılan modeller olan ovaryektomize sıçanlar veya genetiği düzenlenmiş fareler, fiksasyon cihazlarının araştırılması için kullanılabilir.

### Kıkırdak Defekti Modelleri

Eklem kıkırdağı patolojileri ve yaralanmaları önde gelen bir sakatlık nedenidir. Kondral yüzeyin avasküler yapısı ve düşük hücre yoğunluğuna sahip ekstrasellüler matris nedeniyle, kıkırdak dokusu nadiren kendiliğinden yenilenebilir. Kıkırdak yüzeyinde kusurlara neden olan fokal travma, genellikle orijinal kıkırdaktan daha dayanıksız bir doku ile onarılır. Bu dayanıksız onarım dokusu daha sonra osteoartrit gelişimine yol açabilir (26). Eklem yüzeyini etkileyen fokal travmatik olaylar için çeşitli eklem yenileme tedavileri vardır. Bunlar arasında debridman teknikleri, osteokondral transplantlar veya yeni replasman cihazları bulunur. Araştırmalarda hayvan

modelleri rejeneratif eklem yenileme için yeni kavramları değerlendirmede yaygın olarak kullanılmaktadır. Preklinik hayvan modelleri, *in vitro* çalışmalarla insan klinik çalışmaları arasında çok önemli bir köprü görevi görmektedir.

Kıkırdak onarımına yönelik biyomateryal uygulamalarının (doku mühendisliği teknikleri, hücre ve doku transplantasyonu uygulamaları, büyüme faktörü temelli uygulamalar) etkinliğinin değerlendirilmesi için uygun bir hayvan modeli seçerken birçok faktör göz önünde bulundurulmalıdır. Öncelikle küçük veya büyük hayvan modeli mi seçileceğine karar verilmesi gerekir. Her birinin avantajları ve dezavantajları vardır. Yeni malzemelerin klinikte kullanılabilirliğinin değerlendirilmesinde, insan anatomisini ve fizyolojisini en yakın temsil eden model seçilmelidir. Dikkate alınması gereken faktörler arasında eklem büyüklüğü, kıkırdak kalınlığı, defektin derinliği ve kritik boyutu, iskelet yaşı ve matürasyonu bulunur (27). Ek olarak kıkırdak defektinin konumu da önemlidir. Klinik olarak en çok defekt femurun yük taşıyan medial kondilinde gelişir. Ancak, birçok hayvan çalışmasında, kullanılan materyallerin tutulmasını artırmak için troklea gibi kısmi yük taşıyan eklem yüzeyleri seçilmektedir (28). Küçük hayvan modelleri, bir implantın kalış süresi hakkında bilgi vermek ve ayrıca oluşan onarım dokusunun tipini belirlemek için çok faydalı olabilir. Farelerin ve sıçanların atimik, transgenik ve nakavt suşlarının olması nedeniyle, bu modeller çok sayıda faktörü değerlendirmek için kullanılabilirler (29). Ancak fare ve sıçanların eklemdeki küçük ve kıkırdakları çok ince olup, yalnız birkaç hücre katmanından oluşur. Kıkırdak tabakasının inceliği nedeniyle, fare ve sıçan modelleri kondral defekt onarımının değerlendirilmesinde genellikle kullanılmaz. Fare ve sıçanlar, biyomateryallerin ve implantların bozulma oranının ve güvenlik profilinin değerlendirilmesi için faydalı, genellikle 6-8 hafta süren deri altı ve kas içi modeller sağlayabilir (30).

Tavşanlar daha büyük eklemlere sahip olduklarından ve kolay cerrahi işlemlere uygun boyutta olduklarından kıkırdak onarımının değerlendirilmesi için daha uygun küçük hayvan modelidir. Defektler femurda medial ve lateral kondilde (31) veya trokleada (32) oluşturulabilir. Femoral kondil ağırlık taşıyan modeller için en sık kullanılan defekt bölgesidir. Tavşanlar dizlerinin yüksek dereceli fleksiyon yapması ve düşük vücut ağırlıkları (2-4,5 kg) nedeni ile kısmi ağırlık taşıma yüzeyi olarak troklea çentiği kullanır. Bu nedenle, insanlar ve büyük hayvanlardan çok farklı yüklenme durumu oluşur. Tavşan modeli spontane iyileşme potansiyelinin yüksek olması,

eklem yüklenme durumunun insandan farklı olması ve ince kırıldak dokusu nedeni ile son yıllarda önemini yitirmiştir.

Biyouyumluluk, erken hücrel cevap ve implantın defekt içindeki kalıcılığı ve durumu hakkında bilgi sağlamak için kısa süreli (8-12 hafta) çalışmalar yapılabilir. Ancak, eklem kırıkdağının onarımı ve başarıyla yenilenmesi ile ilgili güvenli sonuçlara ulaşmak için daha uzun süreli (6-12 ay) çalışmalara gereksinim vardır. Kırıldak onarımının değerlendirilmesine uygun bir dizi büyük hayvan modeli araştırılmıştır.

Alternatif büyük hayvan modellerinin bulunması ve etik nedenlerle, köpek modelleri ile yapılmış çalışmalar sınırlıdır. Köpek modellerinde defektler femurda medial ve lateral kondilde veya trokleada oluşturulabilir. Bu modellerde artroskopik inceleme yapmak ve biyopsi almak mümkündür. Ayrıca köpekler kolayca eğitilebilir hayvanlar olduğundan koşu bandı kullanılarak egzersiz çalışmaları yapılabilir (33). Ancak oluşturulan defekt hacimlerinin diğer büyük hayvan modellerine göre küçük olması ve etik nedenlerle, köpekler çalışmalarda sıklıkla kullanılan bir hayvan türü değildir (26).

Koyun, kolayca bulunan ve nispeten ucuz olduğu için yaygın olarak kullanılan bir hayvan modelidir. Ayrıca koyunların diz anatomisi insanlara benzer. Artroskopi uygulanabilir ve faydalı bilgiler sağlar. Bununla birlikte, büyük bir yağ yastığının varlığı ve femur kondillerini görebilmek için gereken bükülme derecesi nedeniyle zorluklar içeren bu işlem tecrübe gerektirmektedir. Koyunların değişken kalınlıkta eklem kırıkdağı vardır. Bu durum, kırıldak ve subkondral kemiği içeren defekt hacminin, denekler arasında farklı olmasına sebep olabilir. Yayınlanmış çalışmalar arasındaki standart sapma büyük olup koyun çalışmaları arasında karşılaştırma yapmak güçtür (26,34,35). Diğer bir dezavantaj ise, subkondral kemiğin çok yoğun ve sert olmasıdır; defektler ancak subkondral sondaj yöntemiyle oluşturulur. Subkondral delme işlemi, kemiğin mikromimarisini bozar ve subkondral kemik uzun süre kırılabilirliğini korur (36).

Keçi modelleri de yaygın olarak kullanılmaktadır. Keçilerin kalın kırıldak yapısı ve insanlara benzer eklem anatomisi vardır ve femorotibial eklem artroskopik muayenesi mümkündür (37). Kalın kırıldak yapısı kısmi veya tam kalınlık defektlerinin oluşturulmasına izin verir. Bu seçenek daha küçük hayvan modellerinde mümkün değildir. Yayınlanan çalışmalarda daha çok osteokondral defektler oluşturulmuştur. Oysa insan kırıldak defektlerinin büyük kısmı subkondral kemiği içermez, bu nedenle hayvan modellerinde kısmi kalınlık

defektleri yaratılabilmesi daha önemlidir (38). Keçilerde subkondral kemik koyunlara kıyasla daha yumuşaktır ve osteokondral defektler oluşturmak için kullanılan, delik açmayı gerektirmeyen cerrahi teknikler kolayca ve başarıyla uygulanabilir.

Domuzlar büyük boyutları, bakım ve barındırma konusundaki güçlükler nedeniyle kırıldak defekt araştırmalarında yaygın olarak kullanılan bir model değildir. Bu güçlükler minyatür domuzların kullanımıyla kısmen giderilebilir. Domuz medial femoral kondilinin 1,5 mm ve 2,0 mm kalınlıkta olduğunu bildiren çalışmalar vardır (39,40). Kırıldak kalınlıkları kısmi veya tam kalınlıktaki defektlerin oluşturulmasına izin verir. Bu özellik, Vasara ve ark.'nın çalışmasında kısmi kalınlıktaki kırıldak defektlerinin tedavilerini incelemek için kullanılmıştır (41).

Atlar mevcut olan en büyük hayvan modelidir. At modeliyle çalışırken konaklama ve ameliyat için büyük tesisler gerekir. Ayrıca uygun ekipmanların ve model oluşturulması için gerekli olan teknik beceriye sahip kişilerin bulunması kolay değildir. Atlar biyomedikal araştırmalarda kullanılmak için yetiştirilen hayvanlar değildir. Çalışmalarda genellikle çeşitli atletik kariyerlerinden emekli olan atlar kullanılır. Bu nedenle önceden var olan kas-iskelet sistemi hastalığının taranması gerekir. Öte yandan at, uzun ömürlü ve atletik bir hayvan olduğu için, kronik kusurlardaki yenileme teknolojilerini değerlendirmek için çekici bir modeldir. Ayrıca atlara operasyon sonrası egzersiz yaptırılabilirdiğinden zorlu yüklenme koşulları altında onarımın değerlendirilmesi mümkündür. Sporcu atlarda klinik olarak osteoartrit uyumlu bir eklem dejenerasyonu görüldüğünden, eklem sağlığına yönelik çok sayıda araştırmada kullanılmışlardır (42,43,44).

### **Tendon Araştırmalarında Kullanılan Hayvan Modelleri**

Tendon patolojileri veya diğer ismiyle tendinopatiler, kas-iskelet sistemi rahatsızlıklarının önemli bir bölümünü oluşturur. Bunların ciddiyeti geçici ağrı ve iltihaptan, tendonun kısmi veya tam yırtıklarını içeren kronik durumlara kadar değişmektedir. Tendon patolojisi ve onarımda ortaya çıkan süreçleri incelemek amacıyla hayvan modelleri sıklıkla kullanılmaktadır (45). Rotator cuff tendon yırtıkları, sıklıkla cerrahi onarım gerektiren ve yaygın görülen omuz yaralanmalarıdır. İleri tekniklerle yapılan rotator cuff onarımı ve cerrahi sonrası rehabilitasyona rağmen, cerrahi başarısızlıklar ve yeniden yırtılmaların oranı yüksektir. Sıçan omzu insan omzuna

benzeye anatomik yapıya sahiptir. Bu nedenle sıçan, rotator cuff araştırmalarında en çok kullanılan hayvan modelidir (46). Bununla birlikte, fare (47,48), tavşan (49), koyun (50) gibi çeşitli başka hayvan modelleri de rotator cuff yaralanması ve onarımının araştırılmasında kullanılmaktadır. Rotator cuff onarımında yüksek başarısızlık oranları nedeniyle, bu yırtıkların cerrahi onarımında kullanılan yöntemler ve malzemeler aktif bir araştırma alanı olmayı sürdürmektedir (50,51).

Büyüme faktörleri, trombositten zengin plazma (PRP), hormonlar, kemik morfogenetik proteini, otolog hücre tohumlaması ve kök hücre gibi potansiyel rejeneratif ajanların kullanımını araştırmak için hayvan modellerinden rutin olarak faydalanılmaktadır (52). Mezenkimal ve adipöz kök hücrelerin iyileştirme potansiyeli yakın zamanda tavşan ve sıçan modelleri (53,54,55) ile test edilmiş ve bu deneylerin sonuçları PRP tabanlı çalışmalardan daha istikrarlı sonuçlar vermiştir.

Şiddetli rotator cuff yırtıklarında belirgin kas atrofisi ve yağ infiltrasyonu geliştiği gösterilmiştir (56). Klinik olarak, progresif dejenerasyon ve yağ infiltrasyonu cerrahi onarımdan sonra düşük başarı oranları ile koreledir. Ultrasonografi (US), BT ve manyetik rezonans (MR) spektroskopisi dahil olmak üzere, kas dejenerasyonu ve yağ infiltrasyonunu görselleştirmek için çeşitli görüntüleme teknikleri kullanılmıştır. Rotator cuff kaslarındaki atrofiyi değerlendirmede kas hacmini belirlemek için MR görüntüleme protokolleri de belirlenmiştir (57). Rotator cuff kaslarındaki yağ infiltrasyonunu ölçmek için MR ve BT görüntülemeleri kullanılmıştır. BT görüntülerinden yararlanılarak büyük hayvan modellerinde kas içi yağ birikimi incelenmiştir (58,59,60). Goutallier ve ark. tarafından BT görüntüleme ile yağ infiltrasyon derecesi için standart derecelendirme yapılmıştır (61). Bu yöntem zamanla omuz MR görüntülemesinde kullanılmak üzere değiştirilmiştir. Samagh ve ark., farelerdeki rotator cuff yırtıklarında gelişen kas atrofisi ve yağ infiltrasyonunu yüksek rezolüsyonlu MR (7T) kullanarak değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada invazif yöntemlere alternatif olarak, küçük hayvanlarda rotator cuff yırtıklarında oluşan kas atrofisi ve yağ infiltrasyonunun izlenmesinde MR görüntülemenin kullanılabilceği gösterilmiştir (62).

Aşıl tendonu insan vücudundaki en büyük ve en güçlü tendon olup rutin olarak bireyin ağırlığının 12,5 katına kadar olan yükleri taşır. Bu yüklenme, diğer faktörlerle birlikte aşıl tendonu patolojilerinin gelişimine olasılıkla önemli katkıda bulunur. Hem cerrahi hem de konservatif yöntemler için aşıl tendon araştırmalarına gereksinim vardır. Sıçanlar aşıl tendon kopması ve

tendinopatiji modellemek için sıklıkla kullanılmıştır. Sıçan modellerinde mekanik veya kimyasal yöntemler kullanılarak yaralanma oluşturulur. Kollajenazın indüklediği aşıl tendinopati modeli en yaygın kullanılan yaklaşımdır. Ancak, son zamanlarda trasforme edici büyüme faktör-1'in veya substance P'nin tendon içi enjeksiyonu ile oluşturulan yeni yöntemler önerilmiştir (63,64). Rotator cuff yaralanmalarına benzer şekilde, malzeme ve tekniklerdeki gelişmelerle aşıl tendonu tamir yöntemlerini iyileştirmek için de hayvan modelleri yaygın olarak kullanılmıştır.

Görüntüleme yöntemlerinin kullanımı patolojiye bağlı olarak değişmektedir, ancak aşıl tendonu yüzeysel konumu nedeniyle US ile değerlendirme için özellikle uygundur. Ultrason, aşıl tendon patolojisinin derecesini ve yerini belirlemede kullanılabilcek düşük maliyetli, invazif olmayan bir yöntemdir. Sonoelastografi yöntemi, tendon elastikiyetini izleyebilme yeteneği kanıtlanan ultrason temelli bir tekniktir. Kronik lokal hipervaskülarite, tendinopatiye bağlı ağrıya ilişkilendirilmiş olup indüklenmiş tendinopatiden sonra gelişen vaskülariteyi derecelendirmede kontrastı artırılmış sonografinin etkili olduğu kanıtlanmıştır (65,66).

## Sonuç

Ortopedi ve travmatolojide klinik öncesi hayvan modelleri, *in vitro* çalışmalarla insan klinik çalışmaları arasında geçişi sağlayan çok önemli bir köprü görevi görür. Ancak, klinik koşulları tamamen yansıtan bir hayvan modeli henüz yoktur. Bununla birlikte, her modelin kendine özgü avantajları vardır. Araştırmanın amacına en uygun model seçimi yapılmalıdır. Denenmiş ve test edilmiş modeller, tamamen yeni bir modelin tasarımını yapmak yerine yeni klinik sorulara uyacak şekilde adapte edilebilir. Doku iyileşmesi süreçlerinin ve fonksiyonel gereksinimlerin daha iyi anlaşılması, doku mühendisliğinin ilerletilmesi için kritik önemdedir. Bu süreçlerin aydınlatılması insanlarda kullanılabilcek yeni biyomateryallerin, implantların ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesini sağlayacaktır.

**Finansal Destek:** Yazarlar tarafından finansal destek alınmadığı bildirilmiştir.

**Çıkar çatışması:** Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

## Kaynaklar

1. Harvey EJ, Giannoudis PV, Martineau PA, et al. Preclinical animal models in trauma research. J Orthop Trauma 2011;25:488-493.

2. Hast MW, Zuskov A, Soslowsky LJ. The role of animal models in tendon research. *Bone Joint Res* 2014;3:193-202.
3. Bonnarens F, Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res* 1984;2:97-101.
4. Tägil M, McDonald MM, Morse A, et al. Intermittent PTH(1-34) does not increase union rates in open rat femoral fractures and exhibits attenuated anabolic effects compared to closed fractures. *Bone* 2010;46:852-859.
5. Kokubu T, Hak DJ, Hazelwood SJ, Reddi AH. Development of an atrophic nonunion model and comparison to a closed healing fracture in rat femur. *J Orthop Res* 2003;21:503-510.
6. Marturano JE, Cleveland BC, Byrne MA, O'Connell SL, Wixted JJ, Billiar KL. An improved murine femur fracture device for bone healing studies. *J Biomech* 2008;41:1222-1228.
7. Schindeler A, Morse A, Harry L, et al. Models of tibial fracture healing in normal and Nf1-deficient mice. *J Orthop Res* 2008;26:1053-1060.
8. Röntgen V, Blakytyn R, Matthys R, et al. Fracture healing in mice under controlled rigid and flexible conditions using an adjustable external fixator. *J Orthop Res* 2010;28:1456-1462.
9. Harvey EJ, Giannoudis PV, Martineau PA, et al. Preclinical animal models in trauma research. *J Orthop Trauma* 2011;25:488-493.
10. Roohani-Esfahani SI, Dunstan CR, Davies B, Pearce S, Williams R, Zreiqat H. Repairing a critical-sized bone defect with highly porous modified and unmodified baghdadite scaffolds. *Acta Biomater* 2012;8:4162-4172.
11. Gosain AK, Song L, Yu P, et al. Osteogenesis in cranial defects: Reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-beta isoforms. *Plast Reconstr Surg* 2000;106:360-371.
12. Martini L, Fini M, Giavaresi G, Giardino R. Sheep model in orthopedic research: a literature review. *Comp Med* 2001;51:292-299.
13. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater* 2007;13:1-10.
14. Schindeler A, Mills RC, Bobyn JD, Little DG. Preclinical models for orthopedic research and bone tissue engineering. *J Orthop Res* 2018;36:832-840.
15. Tawonsawatruk T, Hamilton DF, Simpson AH. Validation of the use of radiographic fracture-healing scores in a small animal model. *J Orthop Res* 2014;32:1117-1119.
16. Morgan EF, Mason ZD, Chien KB, et al. Microcomputed tomography assessment of fracture healing: relationships among callus structure, composition, and mechanical function. *Bone* 2009;44:335-344.
17. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010;25:1468-1486.
18. Strømsøe K. Fracture fixation problems in osteoporosis. *Injury* 2004;35:107-113.
19. Egermann M, Goldhahn J, Schneider E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2005;16:S129-138.
20. Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone* 1995;17:125S-133S.
21. Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Cintrón M. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int* 1989;45:360-366.
22. Miller SC, Wronski TJ. Long-term osteopenic changes in cancellous bone structure in ovariectomized rats. *Anat Rec* 1993;236:433-441.
23. Brockstedt H, Kassem M, Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Age and sex-related changes in iliac cortical bone mass and remodeling. *Bone* 1993;14:681-691.
24. Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, et al. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone* 2001;28:80-86.
25. Lill CA, Hesseln J, Schlegel U, Eckhardt C, Goldhahn J, Schneider E. Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a large animal model of osteoporosis. *J Orthop Res* 2003;21:836-842.
26. Ahern BJ, Parvizi J, Boston R, Schaer TP. Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage* 2009;17:705-713.
27. Hunziker EB, Quinn TM, Häuselmann HJ. Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:564-572.
28. Hoemann C, Kandel R, Roberts S, et al. International cartilage repair society (ICRS) recommended guidelines for histological endpoints for cartilage repair studies in animal models and clinical trials. *Cartilage* 2011;2:153-172.
29. Nordling C, Karlsson-Parra A, Jansson L, Holmdahl R, Klareskog L. Characterization of spontaneously occurring arthritis in male DBA/1 mice. *Arthritis Rheum* 1992;35:717-722.
30. Chu CR, Szczodry M, Bruno S. Animal models for cartilage regeneration and repair. *Tissue Eng Part B Rev* 2010;16:105-115.
31. Ramallal M, Maneiro E, López E, et al. Xenotransplantation of pig chondrocytes into rabbit to treat localized articular cartilage defects: an animal model. *Wound Repair Regen* 2004;12:337-345.
32. Hoemann CD, Sun J, Légaré A, McKee MD, Buschmann MD. Tissue engineering of cartilage using an injectable and adhesive chitosan-based cell-delivery vehicle. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13:318-329.
33. Hurtig MB, Buschmann MD, Fortier LA, et al. Preclinical studies for cartilage repair: recommendations from the international cartilage repair society. *Cartilage* 2011;2:137-152.

34. Lu Y, Hayashi K, Hecht P, Fanton GS, Thabit G. The effect of monopolar radiofrequency energy on partial-thickness defects of articular cartilage. *Arthroscopy* 2000;16:527-536.
35. Kandel RA, Grynepas M, Pilliar R, Lee J. Repair of osteochondral defects with biphasic cartilage-calcium polyphosphate constructs in a Sheep model. *Biomaterials* 2006;27:4120-4231.
36. Orth P, Goebel L, Wolfram U, et al. Effect of subchondral drilling on the microarchitecture of subchondral bone: analysis in a large animal model at 6 months. *Am J Sports Med* 2012;40:828-836.
37. Brehm W, Aklin B, Yamashita T, et al. Repair of superficial osteochondral defects with an autologous scaffold-free cartilage construct in a caprine model: implantation method and short-term results. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14:1214-1226.
38. Brittberg M, Sjögren-Jansson E, Lindahl A, Peterson L. Influence of fibrin sealant (Tisseel) on osteochondral defect repair in the rabbit knee. *Biomaterials* 1997;18:235-242.
39. Chiang H, Kuo TF, Tsai CC, et al. Repair of porcine articular cartilage defect with autologous chondrocyte transplantation. *J Orthop Res* 2005;23:584-593.
40. Hembry RM, Dyce J, Driesang I, et al. Immunolocalization of matrix metalloproteinases in partial-thickness defects in pig articular cartilage. A preliminary report. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A:826-838.
41. Vasara AI, Hyttinen MM, Pulliainen O, et al. Immature porcine knee cartilage lesions show good healing with or without autologous chondrocyte transplantation. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14:1066-1074.
42. Hurtig MB, Fretz PB, Doige CE, Schnurr DL. Effects of lesion size and location on equine articular cartilage repair. *Can J Vet Res* 1988;52:137-146.
43. Frisbie DD, Trotter GW, Powers BE, et al. Arthroscopic subchondral bone plate microfracture technique augments healing of large chondral defects in the radial carpal bone and medial femoral condyle of horses. *Vet Surg* 1999;28:242-255.
44. Barnewitz D, Endres M, Krüger I, et al. Treatment of articular cartilage defects in horses with polymer-based cartilage tissue engineering grafts. *Biomaterials* 2006;27:2882-2889.
45. Hast MW, Zuskov A, Soslowsky LJ. The role of animal models in tendon research. *Bone Joint Res* 2014;3:193-202.
46. Soslowsky LJ, Carpenter JE, DeBano CM, Banerji I, Moalli MR. Development and use of an animal model for investigations on rotator cuff disease. *J Shoulder Elbow Surg* 1996;5:383-392.
47. Liu X, Laron D, Natsuhara K, Manzano G, Kim HT, Feeley BT. A mouse model of massive rotator cuff tears. *J Bone Joint Surg Am* 2012;94:e41.
48. Kim HM, Galatz LM, Lim C, Havlioglu N, Thomopoulos S. The effect of tear size and nerve injury on rotator cuff muscle fatty degeneration in a rodent animal model. *J Shoulder Elbow Surg* 2012;21:847-858.
49. Quigley RJ, Gupta A, Oh JH, et al. Biomechanical comparison of single-row, double-row, and transosseous-equivalent repair techniques after healing in an animal rotator cuff tear model. *J Orthop Res* 2013;31:1254-1260.
50. Maguire M, Goldberg J, Bokor D, et al. Biomechanical evaluation of four different transosseous-equivalent/suture bridge rotator cuff repairs. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2011;19:1582-1587.
51. Onay U, Akpınar S, Akgün RC, Balçık C, Tuncay IC. Comparison of repair techniques in small and medium-sized rotator cuff tears in cadaveric sheep shoulders. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2013;47:179-183.
52. Hapa O, Cakıcı H, Kükner A, Aygün H, Sarkalkan N, Baysal G. Effect of platelet-rich plasma on tendon-to-bone healing after rotator cuff repair in rats: an in vivo experimental study. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2012;46:301-307.
53. Kida Y, Morihara T, Matsuda K, et al. Bone marrow-derived cells from the footprint infiltrate into the repaired rotator cuff. *J Shoulder Elbow Surg* 2013;22:197-205.
54. Kim YS, Lee HJ, Ok JH, Park JS, Kim DW. Survivorship of implanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in acute rotator cuff tear. *J Shoulder Elbow Surg* 2013;22:1037-1045.
55. Levy DM, Saifi C, Perri JL, Zhang R, Gardner TR, Ahmad CS. Rotator cuff repair augmentation with local autogenous bone marrow via humeral cannulation in a rat model. *J Shoulder Elbow Surg* 2013;22:1256-64.
56. Gladstone JN, Bishop JY, Lo IK, Flatow EL. Fatty infiltration and atrophy of the rotator cuff do not improve after rotator cuff repair and correlate with poor functional outcome. *Am J Sports Med* 2007;35:719-728.
57. Doro LC, Ladd B, Hughes RE, Chenevert TL. Validation of an adapted MRI pulse sequence for quantification of fatty infiltration in muscle. *Magn Reson Imaging* 2009;27:823-827.
58. Coleman SH, Fealy S, Ehteshami JR, et al. Chronic rotator cuff injury and repair model in sheep. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A:2391-2402.
59. Frey E, Regenfelder F, Sussmann P, et al. Adipogenic and myogenic gene expression in rotator cuff muscle of the sheep after tendon tear. *J Orthop Res* 2009;27:504-509.
60. Gerber C, Meyer DC, Frey E, et al. Neer Award 2007: Reversion of structural muscle changes caused by chronic rotator cuff tears using continuous musculotendinous traction. An experimental study in sheep. *J Shoulder Elbow Surg* 2009;18:163-171.
61. Goutallier D, Postel JM, Bernageau J, Lavau L, Voisin MC. Fatty muscle degeneration in cuff ruptures. Pre- and postoperative evaluation by CT scan. *Clin Orthop Relat Res* 1994;304:78-83.

62. Samagh SP, Kramer EJ, Melkus G, et al. MRI quantification of fatty infiltration and muscle atrophy in a mouse model of rotator cuff tears. *J Orthop Res* 2013;31:421-426.
63. Bell R, Li J, Gorski DJ, et al. Controlled treadmill exercise eliminates chondroid deposits and restores tensile properties in a new murine tendinopathy model. *J Biomech* 2013;46:498-505.
64. Andersson G, Backman LJ, Scott A, Lorentzon R, Forsgren S, Danielson P. Substance P accelerates hypercellularity and angiogenesis in tendon tissue and enhances paratendinitis in response to Achilles tendon overuse in a tendinopathy model. *Br J Sports Med* 2011;45:1017-1022.
65. Gehmert S, Jung EM, K gler T, et al. Sonoelastography can be used to monitor the restoration of Achilles tendon elasticity after injury. *Ultraschall Med* 2012;33:581-586.
66. Chang KV, Wu CH, Ding YH, et al. Application of contrast-enhanced sonography with time-intensity curve analysis to explore hypervascularity in Achilles tendinopathy by using a rabbit model. *J Ultrasound Med* 2012;31:737-746.



# Klinik Öncesi Çalışmalarda Kullanılan Hastalık Modelleri ve Görüntüleme Teknikleri-Endokrinolojik Modeller

## Disease Models and Imaging Techniques Used in Pre-Clinical Studies - Endocrine Models

✉ Burcu Dirlik Serim<sup>1</sup>, ✉ Mustafa Kula<sup>2</sup>

<sup>1</sup>İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Kardiyoloji Enstitüsü, Nükleer Tıp Bölümü, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup>Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

### Öz

Hastalık modelleri genellikle insan hastalıklarının ve/veya neoplazmalarının etiolojisi ve biyolojisi hakkında yeni bilgiler edinmek ve yeni tedaviler geliştirmek için kullanılır. Klinik tanı ve genetik analizdeki teknolojik gelişmeler son yıllarda hastalıkların biyolojisine dair anlayışımızı daha da artırmış olsa da hücrel ve moleküler etiolojiye yeni biyolojik bakış açıları kazanmak için genetik ve doku mühendisliği katkısıyla oluşturulan modeller yeni bir platform sağlayabilir. Doku biyolojisinin mekanizmalarını ve sonuçlarını doğru yansıtan hastalık modelleri geliştirilmesiyle hastalıkların klinik özellikleri ve genetik arka planı hakkında elde edilen veriler gün geçtikçe artmaktadır. Hastalıkları basitçe yeniden özetleyen modeller, hayvan modeli temelli araştırmaların kliniğe çevrilmesi ve bu hastalıkların tedavi stratejilerine katkıda bulunmak için vazgeçilmezdir. Bu derlemede sık rastlanan endokrin hastalıkları modelleri ile bu modellerin insandaki hastalık biyolojisini ne ölçüde özetlediğini ve son çalışmalardan toplanan ana fikirleri vurguladık. Ayrıca bu hastalıkların teşhisinde kullanılan görüntüleme yöntemlerini son çalışmalar ışığında sunduk.

**Anahtar Kelimeler:** Hastalık modeli, prelinik modelleme, tanısal, görüntüleme, endokrin, graves, tiroid kanseri, hiperparatiroidi, osteoporoz, feokromasitoma, Cushing hastalığı, diabetes mellitus

### Abstract

Disease models are often used to obtain new information on the etiology and biology of human diseases and/or neoplasms and to develop new treatments. Although technological advances in clinical diagnosis and genetic analysis have further increased our understanding of the biology of diseases in recent years, models created with the contribution of genetic and tissue engineering to provide new biological perspectives to cellular and molecular etiology can provide a new platform. With the development of disease models that accurately reflect the mechanisms and results of tissue biology, data on the clinical features and genetic background of diseases are increasing day by day. Models that simply re-summarize diseases are indispensable to translate animal model-based research into a clinic and to contribute to the treatment strategies of these diseases. In this review, we present the models of common endocrine diseases and we emphasize the extent to which these models outline human biology and the main ideas collected from recent studies. We also presented the imaging modalities used in the diagnosis of these diseases in the light of recent studies.

**Keywords:** Disease model, preclinical modeling, diagnostic, imaging, endocrine, graves, thyroid cancer, hyperparathyroidism, osteoporosis, pheochromocytoma, Cushing's disease, diabetes mellitus

### Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Dr. Burcu Dirlik Serim, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Kardiyoloji Enstitüsü, Nükleer Tıp Bölümü, İstanbul, Türkiye

**E-posta:** burcudirlik@hotmail.com **ORCID ID:** orcid.org/0000-0003-0173-4535

©Telif Hakkı 2019 Türkiye Nükleer Tıp Derneği / Nükleer Tıp Seminerleri, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.



## Klinik Öncesi Çalışmalarda Kullanılan Hastalık Modelleri ve Görüntüleme Teknikleri

### Endokrinolojik Modeller

Endokrinolojik hastalıklar konusunda biriken epidemiyolojik ve klinik veriler, genel olarak hastalıkların patolojik özelliklerine ışık tutmaktadır. Endokrin sistem hastalıkları her ne kadar fizyopatolojinin bozulması olarak tanımlansa da, nörohumoral ve epigenetik ilişkiler etiyojilerini daha iyi anlama gereksinimini vurgulamaktadır. Hastalarla büyük ölçekli klinik denemeler yürütmek ve dolayısıyla yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi her hasta grubunda aynı derecede verimli olamamıştır. Bu sınırlamanın üstesinden gelmek için oluşturulan hastalık modelleri, bu hastalıkların ortaya çıkmasının özelliklerini yansıtmaktadır.

Bu derlemede endokrinolojide sıklıkla rastlanılan hastalıklarının modelleri ve bunların görüntülenmeleri hakkındaki genel bilgiler ile bu modellerin insan biyolojisini ne ölçüde özetlediğini, endokrin sisteme etkilerini son çalışmalardan toplanan ana fikirler ile birlikte sunuyoruz.

### 1. Otoimmün Tiroid Hastalıkları

Hashimoto tiroiditi ve Graves hastalığı (GH), iki karşıt klinik sendrom olarak görülen otoimmün tiroid hastalığıdır. Bunlar %1-2 oranında görülme sıklığı ile organa özgü en yaygın otoimmün hastalık olup, başlıca özellikleri tiroid bezinin lenfositler tarafından infiltrasyonu ve tiroid oto-antikörlerinin üretimidir. Hashimoto tiroiditindeki başlıca immünolojik durum, lenfosit aracılı folliküler yıkım ve buna bağlı süreçlerdir. Buna karşılık, GH, immün reaktivite sonucu oluşan patojenik antikörlerin (Abs) folikül hücrelerindeki tirotropin hormonu reseptörünü (TSHR) aktive ederek foliküler hiperplaziye yol açması ve tiroid uyarıcı hormonu (TSH) taklit etmesinin sonucu gelişir (1).

Oto-immünitenin deneysel hayvan modelleri, kendiliğinden veya indüklenmiş modellere dayanmaktadır. İnsandaki mekanizmanın aksine, hayvanlarda tiroidit oluşumunda, ne TSHR antikörleri ne de Graves hipertiroidi kendiliğinden gelişir. GH için birkaç farklı uyarılmış deneysel fare modeli tarif edilmiştir. Hayvanlarda tiroidit oluşumu, ham tiroid özütlerinin enjeksiyonu, protein ve/veya protein antijenini taşıyan adjuvan özelliğinde bir maddenin enjeksiyonu ile indüklenebilir. Protein ve adjuvan ile immünizasyonun aksine, farklı fare suşlarının rekombinant TSHR proteini

ile immünizasyonu, deneysel otoimmün hipertiroidizm indüklenmesine yol açmaz, bununla birlikte reseptör proteinine antikörler ve T hücre yanıtları belirgindir (2).

Shimojo ve ark. tarafından geliştirilen GH için ilk başarılı hayvan modelinde, major histocompatibility complex (MHC) II eksprese eden tiroisitlerin otoimmüniteye yol açmasından faydalanılarak, enjeksiyon için hem TSHR hem de MHC sınıf II antijenleri taşıyan transfekte fibroblast hücre dizileri kullanıldı ve bu modeldeki hastalık insidansı %10-15 olarak bildirildi (3,4). TSHR antijenini rekombinant olarak vermek yerine, bunu kodlayan plazmid vektörü enjekte edilen modellerde otoimmünite gelişmekle birlikte insidans düşük olmaya devam etti (1). Model, kendi genomunda yabancı DNA parçası taşıyan transgenik HLA-DR3 farelerinde, endojen MHC sınıf II'sinden yoksun sitokinler (IL-4 veya GM-CSF) ile birlikte yapılan immünizasyonla hastalık insidansında %30'luk bir artışla geliştirildi (5,6,7). TSHR DNA'nın gen verme yönteminin farelerde plazmidden rekombinant adenovirüsüne değiştirilmesiyle, hastalık insidansı (%55) arttı ve tiroid stimulan antikör (TSAb) bakımından büyük bir iyileşme elde edildi (1). İmmünojenin, tam uzunluktaki TSHR yerine TSHR-A alt birimi için kodlayan cDNA'ya değiştirilmesi, hayvan gruplarının %70'inde hipertiroidizm başlangıcında bir artışa yol açtı. Bu yöntem bugüne kadarki en yaygın modeli temsil etmekte olup dişi BALB/c farelerine rekombinant virüsün (50 uL, 109 parçacık) üç haftalık aralıklarla üç kez enjekte edilmesine dayanır (8). Ancak bu çalışmada da adenovirüsün kendi immünojenik etkisinin katkısı mevcuttur; TSAb'ler son bağışıklamadan sonra hızla düştüğünden uzun vadeli bağışıklığın korunması zordur. GH'nin adenovirüs TSHR-A alt ünite modeli üzerine yapılan çalışmalar, B hücrelerinin sadece antikör salgılaması için değil aynı zamanda hastalık sürecinde antijen sunan hücreler olarak da önemli rol oynadığını göstermiştir. GH modelinde IFN-a, IL-4 ve IL-10 gibi eksojen sitokin uygulanmasının, endojen sitokinlerin varlığına kıyasla değişken sonuçlara yol açması nedeniyle; Th1'e karşı Th2 tipi immün yanıt ikilemi yapabilmek zor gözükmektedir (9).

GH için bir hayvan modelinin geliştirilmesine yönelik sonraki adım, hücrelere kısa süreli yüksek güçte bir elektriksel alan uygulayarak, hücre zarında DNA'nın geçebileceği nanometre boyutunda geçici gözenekler açılması mantığına dayanan gen aktarımı işlemi olan elektroporasyon ile TSHR A-alt ünite DNA içeren plazmid vektör ile immünizasyona dayanıyordu. HTSHR A-alt birim genini BALB/c farelerinin bacak uyluk kaslarına aktarmak için elektroporasyon kullanılması, immün farelerin %70-

80'inde hipertiroidizmin indüklenmesine neden oldu ve reseptöre uzun süreli bağışıklık, son enjeksiyondan sonra birkaç ay sürdürüldü (8).

Sonraki çalışmalarda fare TSHR immünizasyonlarına (yukarıda açıklanan tüm modellerde insan TSHR immünizasyonlarına değil) dayalı yeni bir model tarif edilmiş olup GH için gerçek, bir model olma yolunda önemli bir adımdır (1). Model, TSHR otoimmünitesinin, TSHR nakavt (KO) farelerden T hücreleri eksik (çıplak) farelere transferini içerir. Kısaca, vahşi tip fareler, aşılama ile "kırılması" zor olan fare TSHR'ye karşı toleranslıdır, ancak TSHR nakavt fareler, reseptöre tolerans geliştirmez ve bu nedenle fare reseptörüne bir bağışıklık tepkisinin indüklenmesine elverişlidir. Bununla birlikte, hipertiroidizmin olması beklenmemektedir, çünkü bu fareler endojen TSHR içermemektedir (1). Splenositlerin TSHR KO farelerinden çıplak farelere uyarlanmasıyla, alıcı farelerin %50'sinin 24 hafta devam eden TSHR antikoruna sahip olduğu bulundu ama bunların çoğu bloklayıcı antikorlardı ve 24 haftada, uyarıcı antikorları daha önce tespit edilenlerin dominant bloke edici bir antikor tepkisi vardı. Bununla birlikte, bu modelde, uzun süreli bağışıklık ve küçük bir derece orbital enflamasyon olmak üzere iki bulgu bildirilmiştir. Diğer modellerde rastlanmayan orbital değişikliklerin bu çalışmada bildirilmiş olması heyecan verici olmuştur (1).

GH'nin ilk fare modelinin geliştirilmesinden bu yana geçen yirmi yıl boyunca, yüksek derecelerde hastalık insidansı ve tekrarlanabilirliği olan daha iyi modellerin tanımlanmasıyla antikorların hipertiroidizmi indüklemekteki patojenik kabiliyetleri daha iyi anlaşılmiştir.

Deneysel modellerde hipertiroidizm teşhisi, birçok faktörden dolayı zordur. Laboratuvar testlerin onaylandığı türlerde bile (örneğin; köpek ve kediler) tiroid değerlerinin yorumlanması zor olarak kabul edilebildiğinden tiroid bezinin fonksiyonel patolojilerinin teşhisinde nükleer tıp daha güvenilir bir yöntemdir (10). Tiroid bezinin değerlendirilmesinde sintigrafinin kullanımı hayvanlarda tanımlanmıştır (11). Hem lokal hem de metastatik ve/veya ektopik tiroid dokusunu saptamak için kullanılabilir. Sintigrafi, farklı radyonüklidlerin seçici olarak alınmasından dolayı fonksiyonel dokunun görsel olarak tanımlanmasına izin verir ve laboratuvar testleri anormal hale gelmeden önce hipertiroidizm teşhisini sağlayabilir. Tiroid sintigrafisi için I-131, I-123 veya Tc-99m perteknetat, gibi farklı izotopların kullanımı tanımlanmıştır. Sintigrafinin kobaylardaki hipertiroidizm

tanısındaki spesifikliğı net olmamakla birlikte potansiyel olarak anormal bir tiroid bezinin işlevini belgelemek için en kesin tanı araçlarından biri olduğu görülmektedir (12).

## 2. Tiroid Kanseri

Tiroid kanseri en sık görülen endokrin tümördür ve görülme sıklığı artmaktadır. Diferansiye tiroid kanserleri tiroid foliküler hücresi kaynaklı olup tiroid malignitelerinin %80'inden fazlasını temsil eden en yaygın alt tip olan papiller tiroid kanseri (PTC) ile ikinci büyük grup olan foliküler tiroid kanseri (FTC) ve bunun varyantlarından oluşur. Tiroid kanserlerinin diğer histolojik grupları arasında, az farklılaşmış ve farklılaşmamış olanlar ile parafoliküler C hücreleri kökenli medüller tiroid kanseri ve lenfoma bulunur. Aynı epitel hücresi kaynaklı olsalar da PTC ve FTC arasındaki tümör biyolojisi belirgin farklılıklar gösterir. Tiroid kanseri hastaları tipik olarak iyi prognoza sahiptir, ancak metastatik hastalığı olan hastalar 10 yıl boyunca %50'ye yaklaşan mortalite oranlarına sahip olabilir ve FTC'li hastaların PTC'den daha kötü bir gidişatı vardır.

Tiroid kanserini modellemek için geniş bir yelpaze bulunmakla birlikte her birinin kendine özgü sınırlamaları vardır. İnsan tiroid kanseri dokusunun kullanılmasındaki en büyük zorluk, sınırlı mevcudiyetine bağlı heterojen hasta grubunda malign/benign dokularda genetik ve epigenetik ayrımı yapmanın zor olmasıdır. Tiroid kanseri hücre kültürleri, sinyal yolları tespiti ile farmasotik ajanlara tümör yanıtını öngörmeye faydalıdır (13). Ama üç boyutlu tiroid folikülü olan tiroidin temel fonksiyonel birimi, tek katmanlı kültürlerde kaybolur. İki boyutlu kültür sisteminde, tiroisitler TSH yanıt verebilirliği gibi normal fonksiyonlarını kaybedebilir. Üç boyutlu matris veya diğer büyüme faktörlerine sahip kültür sistemleri tiroid foliküllerini *in vitro* olarak yeniden oluşturabilir ve tümör-stromal etkileşimi hakkında ek bilgi sağlayabilir.

Tümörleri indüklemek için üç genel yaklaşım vardır: Karsinojenik bileşikler (guatrojen maddeler ile) kullanımı, tümör hücrelerinin immün sistemi baskılanmış farelere subkütan veya ortotopik (vericiden alınan dokunun, alıcıda aynı anatomik bölgeye aktarılması) bir yolla implantasyonu veya genetik olarak değiştirilmiş modeller (13).

İnsan hücre kültürleri *in vivo* olarak immünojenik fare suşlarında kullanılır, bunlar; ağır kombine immünojenik (SCID) ve atimik (çıplak) suşları içerir (14). Farelerin bağışıklık sistemlerinde tümör gelişimini etkileyebilecek ince farklılıklar vardır, çünkü SCID fareler çıplak farelerden farklı olarak insan lenfositlerini tolere edebilir (15). Ayrıca

tümör gelişiminde; implantasyonunun tümör davranışını etkilediği, ortotopik olarak implante edilenlerde büyüme ve metastazının kolaylaştığı, ortotopik tiroid kanseri modellerinin lenf nodu ve pulmoner metastaz geliştirdiği, ancak diğer uzak metastaz bölgeleri olmadığı gösterilmiştir. Kemik metastazını modellemek için intrakardiyak veya tümör hücrelerinin kemiğe doğrudan enjekte edilmesi gerektiği gözlenmiştir (13).

Genetiği değiştirilmiş modeller, ilgili genin dölleniş yumurtaya dahil edilerek rastgele entegrasyonu ile yabancı DNA'nın fare genomuna öngörülemez kopya sayıları ile sonuçlanan, yani DNA enjekte edilerek oluşturulan geleneksel transgenik fareyi içerir. Tiroid kanserinde birçok transgenik fare modeli mevcuttur. Bunlardan bir tanesi tiroid spesifik bir onkogen ekspresyonudur. Onkogenik hedef geni, ekspresyonunu önleyen iki loxP bölgesi-durdurma sinyali-arasına yerleştirilen bir fare ile Cre-rekombinaz eksprese eden bir fare suşu ile çaprazlanır (13). Başında ve sonunda Cre-rekombinaz enziminin tanıyıp kesebileceği DNA parçaları eklenmiş olan bu alanlar, örnekte okside edilmiş dizilimin silinmesine ve gen etkisizleşmesine yol açar; durdurma kısmının Cre-rekombinaz ile eksizyonu, sadece tiroid içerisinde hedef onkogenik gen ekspresyonuna izin verir. Aynı örnek hedef olarak tümör süpresör geni olan bir farenin yine Cre-rekombinaz eksprese eden bir fare suşu ile çaprazlanması yoluyla eksizyonun nakledilmesi şeklinde de uygulanabilir. Cre, tiroid spesifik bir promotörün (tiroglobulin gibi) kontrolü altındadır ve ekspresyonu tiroid ile sınırlıdır. Bu örnekte hedef gen okside edilen parçaların sonrasına değil, bizzat arasına yerleştirilir ve çaprazlamayla rekombinaz tarafından kesilerek silinmiş olur (16,17).

Diferansiye tiroid kanserinden sorumlu genler hakkındaki veriler fare modellerinin kullanımıyla kazanılmıştır. Rearranged in transformation (RET)/PTC düzenlemeleri veya BRAF V600E mutasyonu gibi insan PTC'de bulunan yaygın genetik değişiklikler, genetik olarak değiştirilmiş fare serilerine modifiye edilmiştir (18). Bu ve diğer prelinik fare modelleri, PTC'de siklik adozin monofosfat/protein kinaz A ve mitojenle aktive olan protein kinaz sinyal yollarının önemini doğrulamıştır. RAS mutasyonları hem papiller hem de FTC gelişiminde rol oynamaktadır. Fosfatidilino-3-kinazın-AKT ve/veya tirotropinle düzenlenmiş sinyal yollarının aşırı aktifleşmesine sahip farelerin FTC geliştirdiği bulunmuştur. Uyarılabilir ekspresyon sistemlerini kullanan ilave tiroid kanseri modelleri geliştirilmesi kalıtsal olmayan tiroid kanserlerinin çoğunu daha iyi ifade edecektir (18).

Sodyum iyodür transport proteini-NIS, radyoaktif iyotun hedefi olarak hem tanı hem de tedavide kritik öneme sahiptir. İnsan tiroid kanserini saptamak için klinikte kullanılanlara benzer şekilde, yüksek frekanslı ultrason, mikro bilgisayarlı tomografi (BT) ve tek foton emisyon tomografisi (SPECT) ile SPECT/BT ve mikro pozitron emisyon tomografisi (PET) gibi mikro görüntülemeler farelerde tümörü ve varsa metastazını tespiti konusunda yol gösterici olacaktır. Örneğin; kanserli farelerin PET taramasında sadece tümör bölgesinde yüksek spesifik bir alım göstermekle birlikte; SPECT çalışmalarında tümör taşımayan farelerde tiroide ve midede NIS'ye bağlı yüksel tutulum görülürken, tükürük ve meme bezlerinde daha düşük bir alım saptanmış ve bu sonuçlar biyodağılım çalışmaları ile doğrulanmıştır (19). Bunun dışında ortotopik bir anaplastik tiroid kanseri modelinin yeşil floresan proteinini stabil bir şekilde eksprese eden bir hücre hattı ile geliştirilmesi, lenf nodlarında ve akciğerde tiroid kanseri metastazının flüoresans görüntüleme ile tespit edilmesinin fizibilitesini göstermiştir. *In vivo* çalışmalarda ışıldayan proteinleri eksprese eden hücre dizilerinin ardışık olarak görselleştirilmesi gelecekte tümörün ilerleyişini ve sonunda terapötik maddelere verilen cevabı ölçmek için kullanılabilir (20).

### 3. Hiperparatiroidi

Primer hiperparatiroidizm bir veya daha fazla paratiroid tümörü tarafından paratiroid hormonunun (PTH) aşırı salgılanmasından kaynaklanan hiperkalsemi, bu problemin incelenebileceği bir model sunar (21). Bu hastalıkta sadece paratiroid hiperselülerliğine yol açan proliferatif bir kusur değil, paratiroid hücrelerinin patolojik çalışmaları da sorumludur. Aşırı paratiroid endokrin hücre çoğalmasının, anormal hormonal regülasyonun sonucu mu, yoksa nedeni mi olduğu tartışmalıdır. Paratiroid adenomlarının patogeneğinde iki spesifik gen gösterilmiştir: siklin D1/PRAD1 onkogen ve MEN1 tümör baskılayıcı gen (22). Siklin D1, hücre siklusunun G1/S kontrol noktası boyunca ilerlemeyi sağlamak için sikline bağımlı kinazlarla etki eden hücre döngüsü düzenleyici yapının ayrılmaz bir bileşenidir. Siklin D1 aşırı ekspresyonu, paratiroid adenomlarının %20-40'ında bulunur. Siklin D1 onkogen, kromozom 11 inversiyonu olan bir paratiroid adenomu alt grubunda aktifleştirilir. Paratiroid neoplazisinde siklin D1'in rolünü tanımlamak ve bu hastalıkta proliferatif ve hormonal düzenleyici anormallikler arasındaki ilişkiyi araştırmak için, insan PTH-siklin D1 geni taklit eden bir transgen kullanarak paratiroid bezlerinde siklin D1 onkogeni aşırı eksprese eden transgenik fareler üretilmiştir (21).

Transgen ekspresyonu oluşturan PTH-siklin D1 transgenik vahşi tip farelerin paratiroid bezleri ve kemikleri histolojik incelendi, serum kalsiyum, PTH seviyeleri ölçüldü. Serum kalsiyum konsantrasyonundaki değişime PTH yanıtı ile paratiroid bezinde kalsiyum reseptör ekspresyonunun immünohistokimyasal analizleri yapıldı. PTH-siklin D1 farelerinde sadece anormal paratiroid hücre proliferasyonu gelişmeyip, aynı zamanda kemikte karakteristik patolojiye yol açan kronik biyokimyasal hiperparatiroidizm ve özellikle serum kalsiyum ve PTH arasındaki ilişkide bir kayma gözlemlendi. Bu nedenle, insan primer hiperparatiroidizminin bu hayvan modeli, siklin D1 onkojenin aşırı ekspresyonunun aşırı paratiroid hücre çoğalmasına yol açabileceği ve bunun da yalnızca serum kalsiyumuna yanıt olarak salgılanan bir hormon yüksekliği olmadığına dair deneysel kanıtlar sunmaktadır. Hücre büyüme yollarının primer düzenlenmesi nörohümorale cevaplarla, birbiriyle ilintilidir ancak bu örnekte hormonal sekresyon (PTH), aşırı hücreliliğe bağlı artmış olmakla birlikte, bu PTH artışı fizyolojik cevabı olan Ca yüksekliğine yanıt vermemiş, PTH salınımı hücre yapım artışına- selülariteye- bağlı olarak devam etmiştir. PTH-siklin D1 transgenik farelerinin paratiroid dokusunda kalsiyum reseptörü (CaR) ekspresyonunda azalma görülmüş olup, bunun altında yatan mekanizma bilinmemektedir (23). Bu model ile aşırı siklin D1 ekspresyonunun, doğrudan veya dolaylı olarak paratiroid CaR'sinde böyle bir azalmaya neden olabileceği ortaya konmuştur. Bu bulgu, insan hiperparatiroidizminin bir modeli olarak PTH-siklin D1 fare modelini doğrular ve azalmış CaR ekspresyonunun moleküler temeli ve patofizyolojik rolünü gösteren deneysel bir sistem olarak sunulabilir (21).

Preklinik paratiroid görüntülemesine dair ilk kapsamlı çalışmalardan birinde; sıçan paratiroid bezinin aminoasit alımının uygun bir pozitron emisyon tomografi (PET) ajanı ile değerlendirilmesi amacıyla otobiyografik yöntem kullanılmıştır. (24). İntravenöz enjeksiyonun ardından karbon-14 lösin plazmadan hızla kaybolmuş ve 14C-lösin ve 14C-arginininin, tiroid bezinin ve boyun kasının alımı ile karşılaştırıldığında paratiroid bezleri tarafından nispeten seçici bir şekilde alındığı görülmüştür. Böylece her iki ajanın paratiroid bezinin PET taramasında kullanılabilirliği gösterilmiştir (24).

Son zamanlarda doğal kimyasal yapıyı kullanarak yakın kızılötesi (nearly infrared-NIR) floroforlara özgü dokular oluşturmanın mümkün olduğunu gösterildi (25). Domuzlarda sadece 0,06 mg kg<sup>-1</sup>'lik tek bir intravenöz enjeksiyondan sonra spesifik bezlerde yüksek tutulum

gösteren 700-nm ve 800-nm halojenli floroforlar sentezlenip çift kanallı yakın kızılötesi görüntüleme sistemi kullanıldı. Kan ve çevre yumuşak doku bağlamında aynı anda paratiroid ve tiroid bezlerinin gerçek zamanlı, yüksek hassasiyetli ve net bir şekilde tanımlandığı gösterildi. NIR floroforlar nispeten düşük foton dokusu zayıflaması, düşük otofloresans ve 5 mm'ye kadar hedef tespit derinliği nedeniyle tercih edilebilir ve baş boyun cerrahisinde hassasiyet ve verimliliği artırarak önemli rol oynayabilme potansiyeline sahiptirler (25). Görünür ışık mikron ölçeğinde dokuya nüfuz ederken, NIR ışığı (700 nm - 900 nm) milimetreden santimetreye kadar doku boyunca geçebilir. Doku NIR spektrumunda neredeyse hiç otofloresans göstermediğinden, sinyal-arka plan NIR floresan kontrast ajanları kullanarak maksimize edilebilir ve "siyah gökyüzünde beyaz yıldızlar" oluşturur. Ek olarak, iyonlaştırıcı radyasyon kullanılmaz, lazer aydınlatma seviyelerine dikkat edilmesi şartıyla doğal olarak güvenli bir tekniktir.

#### 4. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus, insülin eksikliği veya insülinin etkisiz kalması sonucu oluşan; birlikte karbonhidrat, protein ve yağ metabolizması düzensizliğinin eşlik ettiği hiperglisemi ile seyreden kronik, metabolik bir sendromdur. Diyabet hastalığının gelişiminde genetik ve çevresel faktörler birlikte rol oynamaktadır.

Kobaylarda yapılan çalışmalarda diyabeti indüklemek için pankreas langerhans adacıklarındaki beta hücrelerini tahrip ederek hipoinsülinemik ve hiperglisemik duruma neden olan streptozosin (STZ) uygulamaları mevcuttur (26). Kobaylar yüksek yağ, yüksek karbonhidrat diyeti ile beslendikten sekiz hafta sonra glukoz tolerans bozukluğu geliştirmiş, diyetle indüklenen glukoz intoleransı, hücre hiperplazisi, kompensatuar hiperinsülinemi ve hepatoselüler steatozlu dislipidemi ile birlikte görülmüştür (27). Tek başına STZ uygulamasının, kobaylarda diyabetik hiperglisemiyi indüklemekte etkisiz kaldığı; bununla birlikte yüksek yağ oranı, yüksek karbonhidrat diyeti ile beslenen kobaylara STZ uygulanmasından 21 gün sonra glukoz intoleransı ve açık hiperglisemisinin devam ettiği görülmüştür (28). Bu çalışmada, kobay glukozunda yüksek yağ, yüksek karbonhidrat diyeti ve yoğun STZ uygulaması optimizasyonu ile sıralı glukoz intoleransı ve beta hücre kaybı modeli geliştirilmiştir. Bu modelde pankreas dokusu immüno floresans ile tespit edilmiş, histopatolojik görüntü analizi ile ölçüm yapılmıştır.

STZ ile deneysel diyabet oluşturmanın dışında son yıllarda genetik mutasyonlu spontane diyabetik

şıçanların kullanılması daha güncel bir konudur (29). Böylece diyabetik indüksiyon için kullanılan STZ ve buna bağlı oluşabilecek direkt doku hasarı önlenmekte ve sadece hiperglisemiye bağlı etkilerin ortaya çıkması sağlanmaktadır.

### 5. Feokromositoma

Feokromositomalar ve ekstra adrenal paragangliomalar katekolamin üreten, kromaffin hücre kaynaklı tümörler olup, somatostatin tip 2 reseptörlerinin (SSTR2) yüksek oranda ekspresyonu vardır. Tümörlü dokunun nakledildiği bir fare feokromositoma allograft modelinde, tümörde yüksek SST2 yoğunluğu (mSSTR2) ve Cu-64-DOTATATE'in yüksek tümör alımını göstermiştir (30). Bu durum lutesyum-177-DOTA- gibi radyonüklidlere ve/veya sitotoksik bileşiklere bağlı somatostatin analogları kullanılarak uygulanan reseptör düzeyindeki moleküler tedavilere yönelik ilgiyi arttırmıştır. Hem floresans görüntüleme hem de mikro-PET görüntüleme yapılan bu çalışma metastazı belirleme ve tedavi edebilme açısından da ufuk açıcı olmuştur. Tümör taşıyan farelerde tümör büyümesinde ve tümörle ilişkili böbrek monoamin atılımında önemli bir azalma gösterilmiş olup, analizler tek mSSTR2 hedefleme tedavisi sonrasında agonist bağımlı reseptör azalması regülasyonu göstermemiştir. Bu allograft modeli *in vivo* olarak SSTR2-hedefleme uygulamalarının prelinik değerlendirmesi için önemli bir araçtır. Edinilen veriler metastatik feokromositoma tedavisi için somatostatin analoglarının, özellikle [(177) Lu] Lu-DOTATATE'in terapötik potansiyelini vurgulamaktadır (30).

### 6. Cushing Hastalığı

Cushing hastalığı, hiperkortizolizme yol açan ACTH'yi aşırı salgılayan, kısmen glukokortikoide dirençli hipofiz kökenli kortikotrop adenomların neden olduğu bir nöroendokrin durumdur (31). Glukokortikoid reseptörünün (GR) fonksiyonunu bozan mutasyonlar sadece sporadik olgularda glukokortikoid direncini açıklar. Kortikotrop adenomlarında, normal hipofizle karşılaştırıldığında ısı şoku proteini 90'ın (HSP90) aşırı ekspresyonu tespit edilmiştir. Bu proteinin iki ucunda yer alan N- ve C-terminal inhibitörleri, kortikotrop hücre proliferasyonunu ve GR transkripsiyon aktivitesini düzenlemek için katalitik döngünün farklı adımlarında etki ederler (32). Fare hipofiz hücre kültürüyle yapılan bir çalışmada, C-terminal inhibitörünün, HSP90'ı ekspresyon döngüsünden çıkarıp olgun GR'nin salınmasına yol açtığı ve transkripsiyonel aktiviteyi kortikotrop hücre hattında

ve insan kortikotrop adenomlarının primer kültürlerinde güçlendirdiği görülmüştür (33). Ayrıca yapılan bir allograft fare modelinde, hücre koruyucu, anti-enflamatuvar, anti-kanserojen ve anti-oksidan etkileri olan silibininin C-terminal HSP90 inhibitörünün anti-tümörojenik etkisi saptanmış, hormonal değişimlerin kısmen geri döndürüldüğü ve Cushing hastalığının semptomlarının hafiflediği gösterilmiştir. Bu sonuçlar, ısı şoku proteinlerinin aşırı ekspresyonu ve dolayısıyla yanlış düzenlenmiş GR duyarlılığının ekspresyonundan kaynaklanan Cushing hastalığının patogenezinin, uygun bir HSP90 inhibitörü ile farmakolojik olarak üstesinden gelinebileceğini göstermektedir. Her iki modelde de; hem hücre kültüründe hem de plazmadaki ACTH düzeyi radyoimmünassay yöntemi ile belirlenmiştir (33).

### 7. Osteoporoz

Osteoporoz düşük kemik yoğunluğu ve kemik yapısında bozulmayla karakterize, kemiğin kırılmaya eğilimini artıran sistemik bir hastalık olarak tanımlanır. İnsanlarda görülen başlıca osteoporoz tipleri, postmenapozal osteoporoz (PO), kullanılmamaya bağlı osteoporoz ve glukokortikoid kaynaklı osteoporozdur. PO için hayvan modelleri overlerin çıkarılması ile üretilir, östrojen eksikliği ile kemik kaybı, artmış kemik rezorpsiyonu ve bozulmuş osteoblast işlevi ortaya çıkar (34). Östrojen reseptörü osteoklast apoptozisini indükler, ancak bozulmuş osteoblast fonksiyonu için mekanizma net değildir. Kullanılmamaya bağlı modellemeler siyatik nörektomi, tenotomi veya alçı döküm kullanılarak kuyruk süspansiyonu veya arka bacak immobilizasyonu ile üretilir (35). Sempatik sinir sisteminin dahil edilmesinin daha fazla araştırılması gerekmele birlikte, kullanılmamaya bağlı kemik üzerindeki mekanik stresin azaltılması, osteoblast aracılı kemik oluşumunu inhibe eder ve osteoklast aracılı kemik rezorpsiyonunu hızlandırır (35). Osteosit ağı, mekanik strese tepki vererek kemik kütlesini düzenler. Osteosit ağının tamamen bozulduğu osteoblast-spesifik BCL2 transgenik fare modelinde, osteosit işlemlerinin sayısı yüksek transgen ekspresyonlu osteoblastlarda azalır ve bunlar kemik matrisine gömülerek osteositler haline gelir (36). Osteosit süreçlerindeki ciddi azalma nedeniyle, kanalikül sayısı da ciddi şekilde azalır. Bu nedenle, hem hücre içi hem de hücre dışı iletişim sistemleri bozulur, osteositler apoptosis ile yavaş yavaş ölür. Tüm bu süreçlerde endosteumdaki osteoklastların sayısı ve buna bağlı kemik emilimi azalır. Kemik erimesinin arttırılmamasının sebebi, bozulmuş hücre dışı iletişim sisteminden kaynaklanmaktadır, çünkü ölü

osteositlerden salınan immünostimülatör moleküller kemik yüzeyine erişemez. Her ne kadar BCL2 transgenik fare, osteosit fonksiyonunun değerlendirilmesi için ideal bir model olmasa da, osteosit ağlarının tamamen bozulduğu ancak kemik onarım sürecinin başlayamadığı tek fare modelidir (36). Bu modelde farelerin distal femoral metafizinin iki boyutlu aksel görüntüsü mikro-BT ile alınarak trabeküler kemik hacmi ile trabeküler sayı ve kalınlıkları analiz edilmiştir. Ayrıca trabeküler kemik hacmi, osteoid kalınlığı, osteoblast ve osteoklast sayısı ile aşınmış yüzey, mineral katılma oranı, mineralleşme yüzeyi ve kemik oluşum hızı kemik histomorfometrik analizi ile elde edilmiştir (36). Osteoporotik ilaçların tedavi cevaplarının karşılaştırıldığı bir sıçan modelinde kemik mineral yoğunlukları çift enerjili X-ışını absorpsiyometrisi kullanılarak tespit edilmiş ve kan alkali fosfataz değeri ile birlikte değerlendirilmiştir (37).

**Finansal Destek:** Makale hazırlanmasında finansal destek alınmamıştır.

**Çıkar çatışması:** Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

### Kaynaklar

- Moshkelgoshia S, So PW, Diaz-Cano S, Banga JP. Preclinical models of Graves' disease and associated secondary complications. *Curr Pharm Des* 2015;21:2414-2421.
- Ng HP, Banga JP, Kung AW. Development of a murine model of autoimmune thyroiditis induced with homologous mouse thyroid peroxidase. *Endocrinology* 2004;145:809-816.
- Shimojo N, Kohno Y, Yamaguchi K, et al. Induction of Graves like disease in mice by immunization with fibroblasts transfected with the thyrotropin receptor and a class II molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:11074-11079.
- Rao PV, Watson PF, Weetman AP, Carayanniotis G, Banga JP. Contrasting activities of thyrotropin receptor antibodies in experimental models of Graves' disease induced by injection of transfected fibroblasts or deoxyribonucleic acid vaccination. *Endocrinology* 2003;144:260-266.
- Nagayama Y, McLachlan SM, Rapoport B, Niwa M. A major role for non-major histocompatibility complex genes but not for microorganisms in a novel murine model of Graves' hyperthyroidism. *Thyroid* 2003;13:233-238.
- Bottazzo GF, Pujol-Borrell R, Hanafusa T, Feldmann M. Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity. *Lancet* 1983;2:1115-1119.
- Sasazuki T, Inoko H, Morishima S, Morishima Y. Gene map of the HLA region, Graves' Disease and hashimoto thyroiditis, and hematopoietic stem cell transplantation. *Adv Immunol* 2016;129:175-249.
- Kaithamana S, Fan J, Osuga Y, Liang SG, Prabhakar BS. Induction of experimental autoimmune Graves' disease in BALB/c mice. *J Immunol* 1999;163:5157-5164.
- Banga JP, Nielsen CH, Gilbert JA, El Fassi D, Hegedus. Application of new therapies in Graves' disease and thyroid-associated ophthalmopathy: animal models and translation to human clinical trials. *Thyroid* 2008;18:973-981.
- Brandão J, Vergneau-Grosset C, Mayer J. Hyperthyroidism and hyperparathyroidism in guinea pigs (*Cavia porcellus*). *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 2013;16:407-420.
- Künzel F, Mayer J. Endocrine tumours in the guinea pig. *Vet J* 2015;206:268-274.
- Mayer J, Wagner R, Taeymans O. Advanced diagnostic approaches and current management of thyroid pathologies in Guinea pigs. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 2010;13:509-523.
- Kim CS, Zhu X. Lessons from mouse models of thyroid cancer. *Thyroid* 2009;19:1317-1331.
- Schwepe RE, Klopper JP, Korch C, et al. Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell lines reveals crosscontamination resulting in cell line redundancy and misidentification. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:4331-4341.
- Talmadge JE, Singh RK, Fidler IJ, Raz A. Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. *Am J Pathol* 2007;170:793-804.
- Lakso M, Sauer B, Mosinger B Jr, et al. Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:6232-6236.
- Kusakabe T, Kawaguchi A, Kawaguchi R, Feigenbaum L, Kimura S. Thyrocyte-specific expression of Cre recombinase in transgenic mice. *Genesis* 2004;39:212-216.
- Antonello ZA, Nucera C. Orthotopic mouse models for the preclinical and translational study of targeted therapies against metastatic human thyroid carcinoma with BRAF(V600E) or wild-type BRAF. *Oncogene* 2014;20;33:5397-5404.
- Greco A, Auletta L, Orlandella FM, et al. Preclinical Imaging for the Study of Mouse Models of Thyroid Cancer. *Int J Mol Sci* 2017;18. pii: E2731.
- Tran Cao HS, Kaushal S, Snyder CS, Ongkeko WM, Hoffman RM, Bouvet M. Real-time imaging of tumor progression in a fluorescent orthotopic mouse model of thyroid cancer. *Anticancer Res* 2010;30:4415-4422.
- Imanishi Y, Hosokawa Y, Yoshimoto K, et al. Primary hyperparathyroidism caused by parathyroid-targeted overexpression of cyclin D1 in transgenic mice. *J Clin Invest* 2001;107:1093-1010.
- Arnold A, Shattuck TM, Mallya SM, Krebs LJ, Costa J, Gallagher J, Wild Y, Saucier K. Molecular pathogenesis of primary hyperparathyroidism. *J Bone Miner Res* 2002;17:N30-36.

23. Kifor O, Diaz R, Butters R, Kifor I, Brown EM. The calcium-sensing receptor is localized in caveolin-rich plasma membrane domains of bovine parathyroid cells. *J Biol Chem* 273:21708-21713.
24. Wortman JA, Alavi A, Attie M, Yudd AP, Johnston SA, Greenberg J. Quantitative autoradiography of parathyroid glands in rats with carbon-14-labeled amino acids. *J Nucl Med* 1987;28:1447-1452.
25. Hyun H, Park MH, Owens EA, et al. Structure-inherent targeting of near-infrared fluorophores for parathyroid and thyroid gland imaging. *Nat Med* 2015;21:192-197.
26. Lenzen, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2008;51:216-226.
27. Shafrir E, Ziv E, Mosthaf L. Nutritionally induced insulin resistance and receptor defect leading to beta-cell failure in animal models. *Ann N Y Acad Sci* 1999;892:223-246.
28. Podell BK, Ackart DF, Richardson MA, DiLisio JE, Pulford B, Basaraba RJ. A model of type 2 diabetes in the guinea pig using sequential diet-induced glucose intolerance and streptozotocin treatment. *Dis Model Mech* 2017;10:151-162.
29. Chen D, Wang MW. Development and application of rodent models for type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2005;7:307-317.
30. Ullrich M, Bergmann R, Peitzsch M, et al. Multimodal Somatostatin Receptor Theranostics Using  $[(64)\text{Cu}]\text{Cu-}[(177)\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-(Tyr(3))octreotate}$  and AN-238 in a Mouse Pheochromocytoma Model. *Theranostics* 2016;6:650-665.
31. Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB, Nieman LK. Cushing's syndrome. *Lancet* 2006;367:1605-1617.
32. Lamberts SWJ. Glucocorticoid receptors and Cushing's disease. *Mol Cell Endocrinol* 2002;197:69-72.
33. Riebold M, Kozany C, Freiburger L, et al. A C-terminal HSP90 inhibitor restores glucocorticoid sensitivity and relieves a mouse allograft model of Cushing disease. *Nat Med* 2015;21:276-280.
34. Komori T. Animal models for osteoporosis. *Eur J Pharmacol* 2015;759:287-294.
35. Takata S, Yasui N. Disuse osteoporosis. *J Med Invest* 2001;48:147-156.
36. Moriishi T, Maruyama Z, Fukuyama R, et al. Overexpression of Bcl2 in osteoblasts inhibits osteoblast differentiation and induces osteocyte apoptosis. *PLoS One* 2011;6:e27487.
37. Lucinda LMF, Aarestrup BJV, Reboredo MM, et al. Evaluation of the anti-osteoporotic effect of Ginkgo biloba L. in Wistar rats with glucocorticoid-induced-osteoporosis by bone densitometry using dual-energy x-ray absorptiometry (DEXA) and mechanical testing. *An Acad Bras Cienc* 2017;89:2833-2841.



# Kardiyovasküler Hastalık Modelleri

## Models of Cardiovascular Disease

Neşe Torun<sup>1</sup>, Gülay Durmuş Altun<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Başkent Üniversitesi Adana Dr. Turgut Noyan Uygulama ve Araştırma Merkezi, Nükleer Tıp Kliniği, Adana, Türkiye

<sup>2</sup>Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

### Öz

Kardiyovasküler hastalıklar dünya genelinde mortalitenin ve morbiditenin önde gelen nedenidir ve küresel sağlık yükünün büyük kısmını oluşturmaktadır. Erken tanı ve tedavi hastalıkların seyri için önemli olduğundan, tanı ve tedavi alternatiflerini geliştirmek üzere çok sayıda klinik öncesi çalışma yapılmaktadır. Preklinik çalışmalarda, cerrahi yöntemler, ya da kardiyovasküler sisteme toksik ajanlar ile küçük veya büyük hayvanlar kullanılarak kardiyovasküler modeller oluşturulmaktadır. Görüntüleme bu modellerin vazgeçilmezidir. Hayvan modellerini görüntüleme, biyolojik yapıyı değerlendirmek için *in vivo* invazif olmayan bir yol sağlar, görüntüleme sintigrafik yöntemler ve pozitron emisyon tomografi sıklıkla kullanılmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Kardiyovasküler hastalıklar, hayvan modelleri, görüntüleme

### Abstract

Cardiovascular diseases are the leading causes of mortality and morbidity worldwide and account for the substantial proportion of global health burden. Since early diagnosis and treatment are important in disease course, numerous pre-clinical studies are being conducted to develop diagnostic and therapeutic alternatives. In preclinical studies, small or large animal models of cardiovascular diseases are created using surgical methods or toxic agents to the cardiovascular system. Imaging is essential in these models. Imaging of animal models provides a non-invasive way of evaluating the biological structure *in vivo* with scintigraphic methods and positron emission tomography being used often.

**Keywords:** Cardiovascular diseases, animal models, imaging

### Giriş

Kardiyovasküler (KDV) hastalıklar mortalitenin ve morbiditenin önde gelen nedenidir ve küresel sağlık yükünün büyük kısmını oluşturmaktadır. Miyokard infarktüsü (Mİ) sıklıkla aterosklerotik plak ve sonrasında trombus oluşumu ile koroner damarların oklüzyonuna bağlı uzamış iskemi (>20 min) sonucu kalp dokusunun ölümüdür (1). Akut veya tekrarlayan Mİ, uzun süreli hipertansiyon, kapak hastalığı, onkolojik hastalıkların tedavisine bağlı toksite ya da kardiyomiyopatiye bağlı kalp yetmezliği gelişebilir. Erken tanı ve tedavi KDV hastalıkların seyri için oldukça önemlidir.

Elektrokardiyografi, üç boyutlu ekokardiyografi, miyokard perfüzyon sintigrafisi ve diğer stres testleri, çok kesitli bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans

(MR) KDV sistemi ayrıntılı değerlendirmeye izin verir. Bu yöntemler koroner arter stenozu, kardiyak dilatasyon ve hipertrofi, aritmiler, perfüzyon defektleri, bozulmuş kontraktıl fonksiyon gibi morfolojik ve/veya fonksiyonel bilgi verir. Ancak ilgili hastalıkların altında yatan hücrenel nedenlerini ve moleküler patofizyolojisini değerlendiremez. Öte yandan genetik tarama, transgenik hayvan modellerinin geliştirilmesi ve uygulanması ile KDV hastalıkların moleküler temeline dair önemli yeni bilgiler elde edilmiştir (2).

Görüntüleme klinik uygulamanın vazgeçilmezidir. Klinikteki yerine ek olarak, deney hayvanlarında görüntüleme, biyolojik yapıyı değerlendirmek için *in vivo* invazif olmayan bir yol sağlar, normal ve hastalıklı dokular üzerinde kantitatif, uzaysal ve zamansal olarak indekslenmiş bilgiler verir. En önemlisi, invaziv olmaması

### Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Dr. Neşe Torun, Başkent Üniversitesi Adana Dr. Turgut Noyan Uygulama ve Araştırma Merkezi, Nükleer Tıp Kliniği, Adana, Türkiye

**E-posta:** ntorun@hotmai.com **ORCID ID:** orcid.org/0000-0002-5597-676X

©Telif Hakkı 2019 Türkiye Nükleer Tıp Derneği / Nükleer Tıp Seminerleri, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.



nedeniyle, görüntüleme, başlangıçtan itibaren, hastalık sürecinin tüm doğal seyri değerlendirilmeye, tedavinin ya da diğer müdahalelerin etkinliğinin izlenmesine olanak sağlar. Hayvan modellerinde oluşturulacak hastalığın mutlaka insanda gözlenen hastalığın fonksiyonel ve yapısal özelliklerine yakın benzerlik göstermesi gerekmektedir. Hastalıkların etiyojisi, oluşturulacak hayvan modellerinin en önemli ipuçlarını taşımaktadır (3).

### Kardiyovasküler Modeller

KDV hastalıkları değerlendirmede küçük kemiriciler (sıçan, fare, tavşan) ve büyük hayvan modelleri (köpek, domuz, koyun) kullanılmaktadır.

KDV hastalıkları modellemede bazı avantajlarından dolayı sıçanlar en çok tercih edilen hayvan modelidir. Barınacak yer ve bakımları büyük hayvanlara göre ucuzdur ve istatistiksel analiz açısından daha fazla sayıda denek kullanımına fırsatı tanır. Sıçanların kardiyak fonksiyon testlerinin değerlendirilmesi, açık kalp ameliyat prosedürünün geliştirilmesi farelere kıyasla daha kolaydır. Ayrıca sıçanların kalp kütlesi fare kalp kütlesine oranla 10 kat daha fazladır bu da postmortem histolojik ve moleküler değerlendirmede kolaylık sağlar. Sıçan modelleri kalp hastalıklarının tedavisi için potansiyel yeni farmakolojik ya da moleküler ajanların keşfi için kullanılırken, fare modelleri önemli gen ya da protein hedeflemeleri ile moleküler veya farmakolojik tedavi yollarının keşfinde kullanılmaktadır (3,4).

KDV biyolojinin moleküler ve hücrel özellikleri küçük hayvan modelleri özellikle de fare modelleri ile açığa çıkarılmıştır. Ancak fareler ile insanlar arasında kalp açısından önemli karakteristik farklılıklar olduğu bilinmektedir. Bu nedenle büyük hayvan modelleri, özellikle de insanla olan fizyolojik yakınlıklarından, fonksiyon ve anatomik benzerliklerinden dolayı önemli bir yer tutmaktadır (5,6,7).

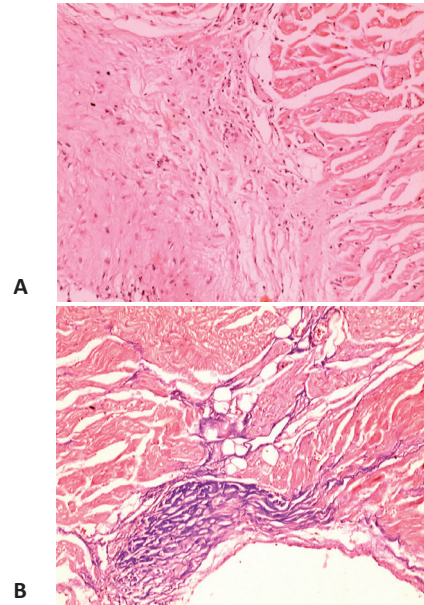
### MI ve Kalp Yetmezliği Modelleri

KDV kaynaklı ölümlerin en sık nedeni koroner kalp hastalıklarıdır. Tanı ve tedavideki gelişmeler akut koroner sendromlu ve MI'li hastaların hayatta kalmasını sağlamakta ancak, bu hastalarda kalp yetmezliğinin (KY) ilerlemesi kaçınılmaz bir şekilde devam etmektedir. Koroner kalp hastalıklarına bağlı KY'nin engellenmesi ve daha efektif bir şekilde yönetilmesi için bu hastalıkların zemininde yatan patofizyolojik mekanizmaların anlaşılması ve bunların doğrultusunda yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle de hayvan modelleri kullanılmaktadır.

Akut ve kronik MI modelleri cerrahi veya farmakolojik olarak oluşturulabilir.

**Cerrahi MI Modelleri:** Koroner arter ligasyonu (bağlama), kriyonekrozis yöntemi, koroner arter embolizasyonu, hidrolik occluder ve ameroid konstriktör, Coiling/Gelfoam yöntemi, koterizasyon yöntemleri cerrahi MI modellerinde kullanılmaktadır (3,8).

**MI İndüklemesi:** İsopterenol, adriamisin (doksarubisin) gibi kardiyak toksite oluşturan ajanlar MI'yi indüklemeye kullanılmaktadır (3). İsopterenol, sentetik bir sempatomimetik katekolamindir. Yapı olarak adrenaline çok benzemekle beraber sadece  $\beta_1$  ve  $\beta_2$  reseptörlerini uyarır ve  $\alpha$  reseptörlerini hiç etkilemez. Sıçanlarda deneysel olarak MI oluşturmak için ilk ve yaygın olarak kullanılan ajandır (9,10). İsopterenol, kalp kasının infarktüs benzeri nekrozuna neden olur (Resim 1). Bu nekroz membran geçirgenliğinin değişmesine yol açarak miyokard membran bütünlüğünün ve fonksiyonunun kaybına yol açar. İsopterenol tarafından oluşturulan MI sonrası sıçan kalbinde oluşan patofizyolojik değişiklikler, insanlarda MI sonrası oluşan değişikliklere benzerlik göstermektedir (11,12).



**Resim 1.** İsopterenol, deneysel olarak MI oluşturulmuş miyokard dokusu. ISO uygulanmasından 15 gün sonra sakrifiye edilerek kalp dokuları histopatolojik olarak incelenen deneklerde ISO ile indüklenmiş MI bulgusu olarak miyokard lifleri arasında fibrotik alanlar izlenmektedir. A) Hematoksilen-eosin ve B) Masson's trichrome ile boyama (100x büyütme) (Arşivlerini kullanmamıza izin verdikleri için çalışma ekibine teşekkür ederiz. E Özgün, GS Özgün, U Usta, S Eskiocak, SS Gökmen)

Kardiyak toksite oluşturan diğer bir ajan adriamisin (doksarubisin) konjestif KY ve ölüme neden olabilmektedir. Adriamisin uygulanan sıçanlar genellikle kardiyotoksitenin mekanizmasının anlaşılması ve önlenmesine yönelik araştırmalarda kullanılırlar. Sıçanlara 12 hafta boyunca 2 mg/kg/hafta şeklinde uygulanan adriamisin, kan basıncının ve kardiyak output'un azalmasına, plevral effüzyon, asit ve karaciğer konjesyonu gelişmesine neden olur. Bu modelin avantajı basit, noninvaziv, ekonomik olması ve çabuk gelişmesidir. Ayrıca, adriamisin toksitesinin anlaşılması için de uygun bir modeldir. Fakat kronik hipertrofinin neden olduğu dekompanse KY mekanizmalarının anlaşılmasına ve önlenmesine yönelik araştırmalar için aynı uygunluk söz konusu değildir (4).

### Kalp Yetmezliği Modelleri

1. Miyokardiyal iskemi ile indüklenen KY modelleri: Koroner arter ligasyonu ve embolizasyonu ile oluşturulan modellerdir (13).

2. Taşikardi ile indüklenen KY modeli: Hızlı atriyal veya ventriküler kalp pili ile taşikardi sonucu yetmezlik oluşturulur. Bu modelde teknik zorluklar nedeniyle genellikle küçük hayvanlardan çok büyük hayvanlar kullanılır (14,15).

3. Basınç yükü ve volüm yükü ile oluşturulan KY modelleri: Aort kapak darlığı ile basınç yükü, mitral kapak yetmezliği ile hacim yükü oluşturulan modellerdir. Kedi, köpek, koyun ve domuz gibi büyük hayvanlarda supravavuler pozisyonda aort darlığı, fare gibi küçük hayvanlarda transvers aortik darlık ile KY modelleri oluşturulmuştur. Köpeklerde korda tendinelerin kesilmesi ya da beta adrenarjik ve anjiotensin II yolları ile mitral yetmezlik ve KY oluşturulmuştur (16,17).

4. Dilate, restriktif kardiyomiyopati ve hipertansiyon ile oluşturulan KY modelleri: Dilate kardiyomiyopati ventriküler dilatasyon, sistolik disfonksiyon, diyastolik dolum anormallikleri ile karakterizedir. En önemli yapısal değişiklik miyosit uzunluğunda ve genişliğinde artıştır. Ayrıca interstisyel fibrozis, ekstrasellüler matrikste azalma, progresif miyosit ölümü ve kapiller yoğunluğunda azalma saptanır. Küçük ve büyük hayvanlarda koroner arter ligasyonu veya hasarı gibi cerrahi yöntemler ile iskemik yolla ya da, toksik ajanlar (isoproterenol, doxorubicin) ile kardiyomiyopati oluşturulabilir. Yaşlandıkça, ya da bazı durumlarda genetik olarak spontane kardiyomiyopati gelişen spontane hipertansif sıçanlar kullanılarak kardiyomiyopati modelleri kullanılabilir (13,17,18,19).

Restriktif kardiyomiyopati diyastolik basınçların ciddi şekilde yükseldiği, önemli biatriyal dilatasyonun ve sonrasında ventriküler kontraktilitenin bozularak KY'nin geliştiği önemli bir patolojidir. Genelde son dönemlere kadar ejeksiyon fraksiyonunda azalma görülmez. Normal veya azalmış ventrikül hacimlerine rağmen ciddi biatriyal dilatasyon görülmesi tipiktir. Sarkoidoz, eozinofilik kardiyomiyopati, endomiyokardiyal fibrosis, skleroderma, radyasyon fibrozisi, amiloidoz, hemakromatozis ve idiyopatik nedenler ile ilişkili olabilir. Restriktif kardiyomiyopati çalışmalarında bu hastalıkların modelleri kullanılmıştır (13,17).

### Kardiyovasküler Model Görüntüleme

Küçük hayvan görüntüleme, temel ve translayonel KDV araştırmalarının farklı alanlarında sıklıkla kullanılmaktadır. İnsan KDV hastalıklarını taklit eden genetik veya cerrahi fare modellerini karakterize etmek, yeni ve mevcut hayvan modellerinin fenotiplendirilmesi amacı ile kullanılır. İlaç tedavisi, cerrahi müdahale, gen tedavisi, kök hücre tedavisi gibi girişimsel yöntemler ile oluşturulan morfolojik, fonksiyonel ve moleküler değişiklikleri izlemek için de görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır. Seri noninvaziv görüntüleme çalışmaları ile bireyin kendi içindeki değişikliklerin değerlendirilmesine izin verir. Preklinik çalışmalarda küçük hayvan görüntüleme modaliteleri kullanılarak ve geliştirilerek klinik görüntülemeye taşınır. Bu özellikle moleküler görüntüleme için yeni görüntüleme problemlerini test ederken yararlıdır (kontrast ajanlar, radyofarmasötik, optik boyalar vb.) (2).

İnsanda modellemede KDV hastalıkları taklit eden uygun hayvan modelleri kullanılmalıdır. Çeşitli hayvan modelleri kullanılabilir. Büyük hayvanlardan domuz klasik olarak Mİ da araştırmalarda sıklıkla kullanılsa da Mİ ve ateroskleroz modellerinde küçük hayvanlar da kullanılmış ve kullanılmaktadır (3).

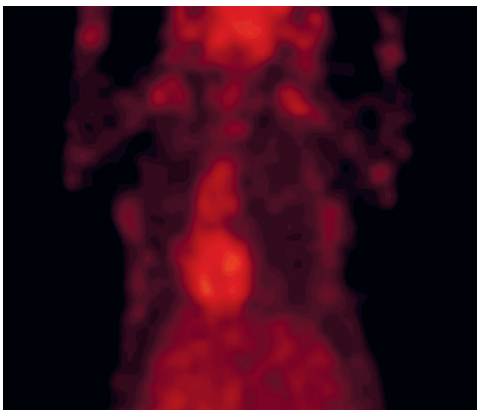
Gelişmeler ve moleküler görüntülemenin gündeme gelmesi ile nükleer tıbbın konvansiyonel fonksiyonel görüntüleme yöntemi olan sintigrafi son yıllarda tekrar ilgi görmüştür. Tüm in vivo görüntüleme modaliteleri içerisinde floresan optik görüntüleme ile birlikte sintigrafik yöntemler en yüksek moleküler duyarlılığı sağlar. Sintigrafik yöntemlerin duyarlılığı hedefe duyarlı ligandlara etkili, eser miktarda radyofarmasötik enjeksiyonuna dayanır. Sintigrafik ve moleküler görüntüleme ile ejeksiyon fraksiyonu, bölgesel duvar hareketleri, perfüzyon, viabilite, oksijen tüketimi, glikoz ve yağ asidi metabolizması değerlendirilebilir. Ayrıca koroner arterlerin fonksiyonları, iskemi, infarkt ve ateroskleroz gibi ilişkili hastalıklar araştırılabilir (2).

Dedektör teknolojisindeki önemli gelişmeler sayesinde klinikte kullandığımız cihazlar dışında prelinik çalışmalarda küçük dokuları (örneğin; fare kalbi gibi) görüntülemeye yüksek rezolüsyon ve çözünürlükte tek foton emisyon bilgisayarlı tomografi (SPECT) ve pozitron emisyon tomografi (PET) (small animal SPECT/PET, microSPECT/PET) cihazları tasarlanmış ve kullanıma girmiştir. Pinhol görüntüleme kullanılarak geliştirilen small animal SPECT ile fare gibi küçük hayvanlarda papiller kas da dahil kalbin radyofarmasötik tutulumunu görüntüleme imkanı sağlar. Small animal SPECT'in diğer bir avantajı, farklı enerjide çoklu radyofarmasötik aynı anda kullanılarak görüntüleme sağlanır. Mevcut small animal PET sistemlerinde uzaysal rezolüsyon 1,5 mm'dir. PET'in başlıca avantajları çoğu fizyolojik ve biyokimyasal belirteç olan pozitron yayıcı radyonüklidlerin dedeksiyon gücünün yüksek olmasıdır (20).

Küçük hayvanlarda SPECT ve PET görüntülemenin ilk ve en sık kullanım alanı miyokard perfüzyon ve metabolizma görüntülemedir. Çalışmalarda en sık perfüzyon ajanları kullanılmaktadır (Resim 2). İkinci sıklıkta kullanılan, PET ajanı olan F-18 fluorodeoksiglukozdur (F-18-FDG). Bazı çalışmalarda kombine yöntemler kullanılmıştır.

Sıçan ve farelerde pek çok çalışmada Tc-99m ile işaretli perfüzyon ajanları ile Pinhol SPECT görüntüleme yapılmış, küçük hayvan kalbinde yüksek kalitede perfüzyon görüntüleri elde edilmiş ve *in vivo* değerlendirmede mükemmel sonuçlara ulaşılmıştır (21,22).

Acton ve ark. sıçanlarda 45 dakika sol anterior desenden arter ligasyonu ile MI modeli oluşturmuşlar, ligasyondan 1 ve 6 saat sonra Tc-99m-sestamibi pinhol SPECT görüntüleme ile perfüzyonu değerlendirmişlerdir (23). Stegger ve ark. sol anterior desenden arter



**Resim 2.** Tc-99m-MIBI (1 mCi. iv) enjeksiyonunu takiben pinhol kolimatör ile kalp görüntülemesi

ligasyonu ile farelerde transmural-nontransmural MI modeli oluşturarak PET'de enfarkt alanında canlı dokuyu kolayca ayırt etmişlerdir (24).

20. yy'ın sonlarında küçük hayvan PET sistemlerinin gelişmesi ve rezolüsyonun iyileşmesi ile sıçanlarda sonrasında farelerde PET'de küçük hayvan kalbinde glukoz kullanımını, perfüzyon ve metabolizmayı değerlendiren çalışmalar yapılmıştır. N<sup>13</sup>H<sup>3</sup> amonyak PET görüntüleme miyokardiyal perfüzyonu özellikle miyokardiyal perfüzyona etkili ilaçları değerlendirmede kullanılmıştır (25,26). Sıçanlarda ve farelerde infarkt boyutunu ölçmek ve metabolik olarak değerlendirmek için F-18-FDG PET ile yapılan pek çok çalışma bulunmaktadır. Sonuçlar MR ile ve/veya histopatolojik olarak doğrulanmıştır (24,27). Shoghi ve ark.'nın yaptıkları çalışmada diyabetik yağlı sıçanlarda miyokardın glukozu yağsız yavrulara göre daha az kullandıklarını göstermişlerdir (28). Yeni PET ajanlarının gelişmesi ile miyokardiyal mertabolizmayı değerlendirmede farklı ajanlar karşılaştırılmıştır. Herrero ve ark. sıçanlarda C<sup>11</sup> asetat ve H<sup>2</sup>O<sup>15</sup> su kullanarak mikro PET ile miyokardiyal kan akımını kantitatif değerlendirmişlerdir (29). Welch ve ark. diyabetik sıçanlarda 1-O15-su, 1-C11-glikoz, 1-C11-asetat, 1-C11-palmitat ile miyokardiyal kan akımını ve metabolizmayı değerlendirmişler ve tip 2 DM'de erken metabolik anormallikler bu ajanlar ile PET de gösterilmiştir (30). Higuchi ve ark. sıçanlarda yaptıkları akut iskemi-reperfüzyon çalışmasında I-125-15-(p-iodophenyl)-3-R,S-methyl penta decanoic acid (BMIPP), TI201, Tc-99m sestamibi kullanarak 3 ajan ile otoradyografik değerlendirme yapmıştır (31).

KDV alanda hücrel ve moleküler gelişmeler oldukça ilerlemiştir. Miyokardiyal innervasyon, apoptosis, anjiyogenezis, ateroskleozda vasküler enflamasyon, gen taşıyıcı görüntüleme, kök hücre takibi small animal SPECT ve PET görüntüleme ile yapılmaktadır (32,33,34,35,36).

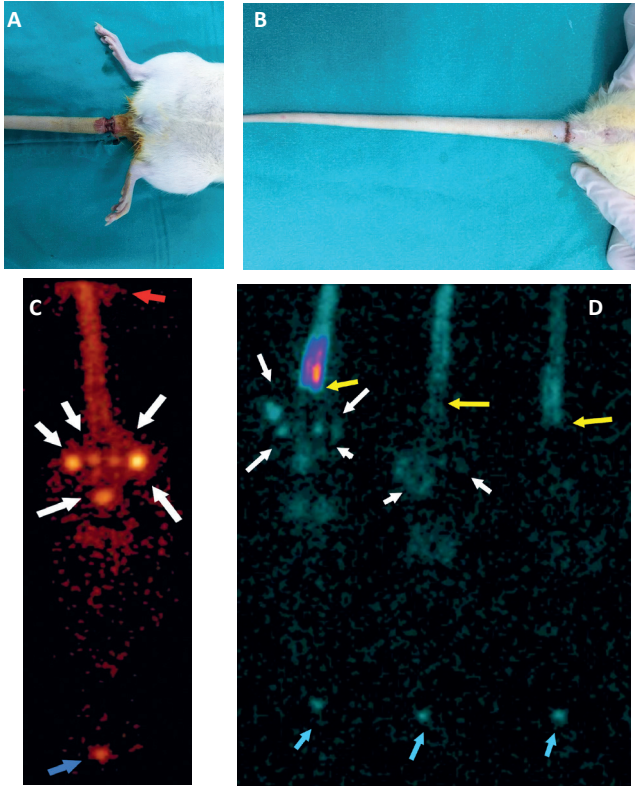
Prelinik small animal SPECT/MR, PET/MR gibi füzyon yöntemler araştırma ve gelişme aşamasındadır. Bu sayede hem damarların hem, miyokardın moleküler görüntülemesi sağlanacaktır (37).

### Sekonder Lenfödem Modelleri

Lenfödem, lenfatik alım ve/veya akımdaki kusurlardan dolayı doku sıvısı dengesinin yaygın bir şekilde bozulduğu vasküler bir patolojidir. Mikrosirkülasyondaki bozukluklar, sıklığına rağmen hala bir tedavisi olmayan ortak bir patolojik durum olan sekonder lenfödeme yol açabilir. İlk başarılı lenfödem modeli 1968'de bildirilmiştir. Bu buluş, hem yüzeysel hem de derin lenfatikler etki etmek için bir

köpeğin arka bacağında cerrahi olarak oluşturulmuştur. Kolay ulaşılabilir, ucuz ve uygulanabilir bir hayvan modeli oluşturmak için bu strateji tavşanlara ve kemirgenlere modifiye edilmiştir. Günümüzde, kemirgenler lenfatik araştırmalarda en yaygın olarak kullanılan hayvan modelleridir ve yayınlanmış modellerin yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır. Görüntüleme sistemleri için en uygun model fare veya sıçan kuyruğunda oluşturulan cerrahi lenfödem modelidir (38).

Sıçan ve faredede kuyrukta lenfödem modeli cerrahi olarak kolay uygulanabilir bir modeldir. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi'nde Wistar albino veya Sprague Dawley sıçanlarda uygulama yapılarak farklı soylarda model oluşturduğu test edilmiştir. Fare (BALB/c) modeli de benzer teknikle uygulanır. Anestezi uygulamasını takiben dermal lenfatik damarları kesmek için kuyruk tabanına yakın dermis boyunca çevresel bir kesi yapılır.



**Resim 3.** Cerrahi lenfödem modelinin sıçanda uygulaması. A) Cerrahi uygulama, B) Birinci haftada lenfödem oluşmuş kuyruk, C) Normal sıçanda kuyruktan yapılan lenfosintigrafi, geç 30. dakika görüntülemesi, D) Cerrahi lenfödem oluşturulmuş farklı seviyede geçiş sağlanan 3 sıçanın eş zamanlı lenfosintigrafisi, geç 30. dakika görüntülemesi (kırmızı ok: enjeksiyon noktası, beyaz ok: pelvik lenfnodları, mavi ok: burun ucu marker, sarı ok: cerrahi lezyon seviyesi, Philips BrightView çift başlı gama kamera, 50 mCi Tc-99m Nanokolloid, LEHR kolimatör, 1024\*1024 matriks)

Bu insizyonun kenarları daha sonra koterize edilerek derideki derin lenfatikler bozulur, yüzeysel kanama kontrolü sağlandıktan sonra yara temiz pansuman ile açık iyileşmeye bırakılır. Yaranın kapanmasını geciktirmek için fare ve sıçanlarda 2-3 mm'lik bir doku boşluğu oluşturulur (Resim 3). Belli başlı kan damarlarının ve tendonların bütünlüğünün korunmasına özen gösterilmelidir, böylece kesikten sonraki distal kuyruk alanı nekrozdan korunur. Lenfödem 1. haftada oluşmaya başlar ve 15. günden sonra iyileşmesini tamamlayarak kısmen ödem çözülmeye başlar. Eğer bir görüntüleme çalışması planlanacaksa cerrahiye takiben 2 hafta tamamlandığında görüntüleme için en uygun dönemdir.

Sonuç olarak, önemli mortalite nedenlerinden olan KDV hastalıklarının, erken tanı ve tedavisi hastalığın seyrinde oldukça önemlidir. Tanı ve tedavi alternatiflerini geliştirmek üzere çok sayıda klinik öncesi çalışma yapılmaktadır. Preklinik çalışmalarda küçük ve büyük hayvan modelleri kullanılmaktadır. Bu modelleri görüntüleme nükleer tıp yöntemleri önemli yer tutmaktadır.

**Finansal Destek:** Yazarlar tarafından finansal destek alınmadığı bildirilmiştir.

**Çıkar çatışması:** Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

### Kaynaklar

1. Jones DP, Patel J. Therapeutic approaches targeting inflammation in cardiovascular disorders. *Biology (Basel)* 2018;7.
2. Imaging in Cardiovascular Research. In: Kiessling F, Pichler BJ, Hauff P, editors. *Small animal imaging*. First edition. heidelberg: springer ;2011.p.449-471.
3. Akbay E, Onur MA, Gürpınar ÖA. Miyokard infarktüs modelleri. *Türkiye Klinikleri J Cardiovasc Surg-Special Topics* 2013;5:49-57.
4. Minareci-Karasu E, Öğütman Ç. Kardiyovasküler sistem hastalıklarında kullanılan deneysel hayvan modelleri. *Türkiye Klinikleri J Cardiovasc Sci* 2011;23:65-74.
5. Shim J, Al-Mashhadi RH, Sorensen CB, Bentzon JF. Large animal models of atherosclerosis--new tools for persistent problems in cardiovascular medicine. *J Pathol* 2016;238:257-266.
6. Haghghi K, Kolokathis F, Pater L, et al. Human phospholamban null results in lethal dilated cardiomyopathy revealing a critical difference between mouse and human. *J Clin Invest* 2003;111:869-876.
7. Ginis I, Luo Y, Miura T, et al. Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* 2004;269:360-380.
8. Doğancı S. Kalp cerrahisinde iskemi-reperfüzyon modelleri. *Türkiye Klinikleri J Cardiovasc Surg-Special Topics* 2013;5:72-76.

9. Gökmen SS, Kılıçlı G, Özçelik F, Gülen S. Serum total and lipid-bound sialic acid levels following acute myocardial infarction. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:1249-1255.
10. Özgün E, Özgün GS, Usta U, Eskiocak S, Gökmen SS. Melatoninin deneysel miyokard infarktüsünde serum paraoksonaz ve laktonaza etkisi. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2018;16:32-41.
11. Benjamin IJ, Jalil JE, Tan LB, et al. Isoproterenol-induced myocardial fibrosis in relation to myocyte necrosis. *Circ Res* 1989;65:657-670.
12. Tipnis UR, He GY, Li S, Campbell G, Boor PJ. Attenuation of isoproterenol-mediated myocardial injury in rat by an inhibitor of polyamine synthesis. *Cardiovasc Pathol* 2000;9:273-280.
13. Gürbüz HA, Kalp yetmezliği modelleri. *Türkiye Klinikleri J Cardiovasc Surg-Special Topics* 2013;5.
14. Shinbane JS, Wood MA, Jensen DN, et al. Tachycardia-induced cardiomyopathy: a review of animal models and clinical studies. *J Am Coll Cardiol* 1997;29:709-715.
15. Morgan DE, Tomlinson CW, Qayumi AK, et al. Evaluation of ventricular contractility indexes in the dog with left ventricular dysfunction induced by rapid atrial pacing. *J Am Coll Cardiol* 1989;14:489-495; discussion 496-498.
16. Tsutsui H, Spinale FG, Nagatsu M, et al. Effects of chronic beta-adrenergic blockade on the left ventricular and cardiocyte abnormalities of chronic canine mitral regurgitation. *J Clin Invest* 1994;93:2639-2648.
17. Houser SR, Margulies KB, Murphy, AM et al; American Heart Association Council on Basic Cardiovascular Sciences, Council on Clinical Cardiology, and Council on Functional Genomics and Translational Biology. Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association. *Circ Res* 2012;111:131-150.
18. Bing OH, Brooks WW, Robinson KG, et al. The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:383-396.
19. Tuna AT, Hipertansiyon modelleri. *Türkiye Klinikleri J Cardiovasc Surg-Special Topics* 2013;5:45-48.
20. Tsui BM, Kraitchman DL. Recent advances in small-animal cardiovascular imaging. *J Nucl Med* 2009;50:667-670.
21. Constantinesco A, Choquet P, Monassier L, Israel-Jost V, Mertz L. Assessment of left ventricular perfusion, volumes, and motion in mice using pinhole gated SPECT. *J Nucl Med* 2005;46:1005-1011.
22. Hirai T, Nohara R, Hosokawa R, et al. Evaluation of myocardial infarct size in rat heart by pinhole SPECT. *J Nucl Cardiol* 2000;7:107-111.
23. Acton PD, Thomas D, Zhou R. Quantitative imaging of myocardial infarct in rats with high resolution pinhole SPECT. *Int J Cardiovasc Imaging* 2006;22:429-434.
24. Stegger L, Hoffmeier AN, Schäfers KP, et al. Accurate noninvasive measurement of infarct size in mice with high-resolution PET. *J Nucl Med* 2006;47:1837-1844.
25. Inubushi M, Jordan MC, Roos KP, et al. Nitrogen-13 ammonia cardiac positron emission tomography in mice: effects of clonidine-induced changes in cardiac work on myocardial perfusion. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004;31:110-116.
26. Croteau E, Bénard F, Bentourkia M, et al. Quantitative myocardial perfusion and coronary reserve in rats with <sup>13</sup>N-ammonia and small animal PET: impact of anesthesia and pharmacologic stress agents. *J Nucl Med* 2004;45:1924-1930.
27. Higuchi T, Nekolla SG, Jankaukas A, et al. Characterization of normal and infarcted rat myocardium using a combination of small-animal PET and clinical MRI. *J Nucl Med* 2007;48:288-294.
28. Shoghi KI, Gropler RJ, Sharp T, et al. Time course of alterations in myocardial glucose utilization in the Zucker diabetic fatty rat with correlation to gene expression of glucose transporters: a small-animal PET investigation. *J Nucl Med* 2008;49:1320-1327.
29. Herrero P, Kim J, Sharp TL, et al. Assessment of myocardial blood flow using <sup>15</sup>O-water and <sup>1-11</sup>C-acetate in rats with small-animal PET. *J Nucl Med* 2006;47:477-485.
30. Welch MJ, Lewis JS, Kim J, et al. Assessment of myocardial metabolism in diabetic rats using small-animal PET: a feasibility study. *J Nucl Med* 2006;47:689-697.
31. Higuchi T, Taki J, Nakajima K, et al. Time course of discordant BMIPP and thallium uptake after ischemia and reperfusion in a rat model. *J Nucl Med* 2005;46:172-175.
32. Tipe DN, Fox JJ, Holt DP, et al. In vivo PET imaging of cardiac presynaptic sympathoneuronal mechanisms in the rat. *J Nucl Med* 2008;49:1189-1195.
33. Cauchon N, Langlois R, Rousseau JA, et al. PET imaging of apoptosis with (<sup>64</sup>Cu)-labeled streptavidin following pretargeting of phosphatidylserine with biotinylated annexin-V. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007;34:247-258.
34. Laitinen L, Saraste A, Weidl E, et al. Evaluation of  $\alpha\beta 3$  Integrin- Evaluation of alphavbeta3 integrin-targeted positron emission tomography tracer <sup>18</sup>F-galacto-RGD for imaging of vascular inflammation in atherosclerotic mice. *Circ Cardiovasc Imaging* 2009;2:331-338.
35. Wu JC, Inubushi M, Sundaresan G, Schelbert HR, Gambhir SS. Positron emission tomography imaging of cardiac reporter gene expression in living rats. *Circulation* 2002;106:180-183.
36. Acton PD, Zhou R. Imaging reporter genes for cell tracking with PET and SPECT. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2005;49:349-360.
37. Wehrl HF, Judenhofer MS, Wiehr S, Pichler BJ. Pre-clinical PET/MR: technological advances and new perspectives in biomedical research. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2009;36 (Suppl 1):S56-68.
38. Hadrian R, Palmes D. Animal models of secondary lymphedema: new approaches in the search for therapeutic options. *Lymphat Res Biol* 2017;15:2-16.



# Klinik Öncesi Çalışmalarda Kullanılan Nefroüroloji Modelleri ve Görüntüleme

## Nephrourologic Models and Imaging Methods Used in Preclinical Studies

• Fikriye Gül Gümüşer, • Elvan Sayıt

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

### Öz

Klinik öncesi nefroürolojik hayvan modelleri oluşturulma şekline göre cerrahi ve toksik olmak üzere iki türdür. Bu modeller aminoglikozitlerle oluşturulan böbrek toksisitesi, ureteropelvik bileşkede tıkanıklık, piyelonefrit ve vezikoüreteral reflüdür. Oluşturulan nefroürolojik modellerin görüntülenmesinde kullanılan nükleer tıp yöntemleri renal kortikal sintigrafi ve dinamik böbrek sintigrafisidir.

**Anahtar Kelimeler:** Nefroürolojik hayvan modelleri, Tc-99m DMSA, Tc-99m MAG3, Tc-99m DTPA

### Abstract

Preclinical nephrourological animal models are divided into two different types as surgical and toxic according to the way they are formed. These models are renal toxicity induced by aminoglycosides, congestion in the ureteropelvic junction, pyelonephritis and vesicoureteral reflux. Nuclear medicine procedures used in imaging of nephrourological models are renal cortical scintigraphy and dynamic renal scintigraphy.

**Keywords:** Nephrourological animal models, Tc-99m DMSA, Tc-99m MAG3, Tc-99m DTPA

### Klinik Öncesi Çalışmalarda Kullanılan Nefroüroloji Modelleri ve Görüntüleme Yöntemleri

Moleküler görüntüleme tıp alanında önemli bir yere sahiptir. Moleküler ve hücresel seviyede noninvaziv olarak görüntü elde etmemizi sağlar. İmajlar iki ya da üç boyutlu, statik veya dinamik görüntüler şeklinde olabilir. Tek foton emisyon bilgisayarlı tomografi (SPECT), pozitron emisyon tomografi (PET), manyetik rezonans görüntüleme, bilgisayarlı tomografi (BT) ultrason, gibi tekniklerle de görüntüler elde edilmektedir (1).

Son zamanlarda SPECT ve PET/BT teknikleri prelinik çalışmalarda özellikle küçük deney hayvan modellerinde tercih edilen görüntüleme yöntemleridir. Normal fizyoloji, anatomi ve hastalık modellerinde kullanılmaktadır (1).

Böbrek hastalıklarının tanı ve takibinde nükleer tıp yöntemlerinin önemli yeri vardır. Nükleer tıp yöntemleri hem anatomik hem de fonksiyonel görüntülemeye olanak sağlar.

Nükleer tıpta böbreklerin değerlendirilmesinde kullanılan radyofarmasötikler başlıca iki grupta sınıflandırılabilir. Birinci grup radyofarmasötikler, böbreklerden hızla atılan ve böylece böbrek fonksiyonlarını ve idrar akışını değerlendirmeye olanak veren radyofarmasötiklerdir. Bu radyofarmasötiklerin başlıcaları Tc-99m dietilentriaminpentasetik asit (DTPA), Tc-99m merkaptosetiltriglisin (MAG3), Tc-99m etilendisistein (EC), I-123 veya I-131 ortoiyodohippuratır (2,3,4).

İkinci grupta, böbrek parankiminde konsantre olarak böbrek parankiminin görüntülenmesine

### Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Prof. Dr. Fikriye Gül Gümüşer, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

**E-posta:** fggumuser@hotmail.com **ORCID ID:** orcid.org/0000-0001-7103-2323

©Telif Hakkı 2019 Türkiye Nükleer Tıp Derneği / Nükleer Tıp Seminerleri, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.

olanak veren radyofarmasötikler yer alır. Bu gruptaki radyofarmasötikler Tc-99m dimerkaptosüksinik asit (DMSA) ve Tc-99m glukohexonattır (GH). Tc-99m DMSA, renal kortikal sintigrafi için ideal bir radyofarmasötiktir. Enjeksiyonu takiben yaklaşık %90'ı plazma proteinlerine bağlanır. Büyük oranda böbrek parankiminde birikir. Enjeksiyondan 2 saat sonra verilen miktarın %40-65'i böbrekte proksimal tübül hücrelere bağlanır. Tc-99m GH her iki gruba dahil edilebilir. Çünkü verilen dozun %65'i 6 saat içinde idrarla atılır. %10-15'i ise böbrek parankiminde tutulur (5).

Hayvan modelleri, oluşturulma şekline göre toksik modeller ve cerrahi modeller olmak üzere ikiye ayrılır. Cerrahi olarak üreteral tıkanıklık ve böbrek iskemisi/reperfüzyon çalışmaları ile oluşturulurken, toksik modeller özellikle aminoglikozitlerle indüklenen nefrotoksisite modelleridir (5,6,7).

### Toksik Modeller

Hayvan modelleri, akut böbrek yetmezliğinin (ABY) oluşturulması sonrası etkili tedavinin geliştirilmesinde çok önemli rol almaktadır. Böbrek yetmezliğinin oluşturulmasında etiyoloji çok yönlü olduğundan, birçok hayvan modeli geliştirilmiştir.

Her hayvan modeli belirli bir metodoloji ile oluşturulduğundan, modeli ayrıntılı bir şekilde tanımlamak ve sonuçların belirli bir model bağlamında yorumlanması çok önemlidir (7). Gliserolün neden olduğu ABY, iskemisi, miyoglobülinin neden olduğu tübül nefrotoksisite ve sitokinlerle ilişkilidir.

Böbrek yetmezliğini indüklemek için sıçanlarda uygulanan metod %50 gliserolün 8 mL/kg her iki arka bacağına, kas içine derin olarak uygulanması yöntemidir.

Tavşanlarda ise 10 mg/kg gliserolün kas içine enjeksiyonu şeklindedir. Bu model insanlarda travma sonrası çizgili kas hücrelerinin harabiyeti sonrası oluşan ABY modelini oluşturur (Crush sendromu) (7).

İskemi-reperfüzyon ile oluşturulan deneysel ABY'ye örnek olarak köpeklerde sol renal arterin 1 saat boyunca kelepçelenmesi sonrası 3 saat içinde ABY geliştiği bildirilmiştir (8). Sıçanlarda ise her iki böbrek arter ve veninin 60 dakika boyunca kelepçelenmesi ile 24 saat içinde ABY oluşturulduğu gibi yine sol renal arterin 25-37 dakika kelepçelenmesiyle de oluşturulabilir (9). İnsanlarda hemodinamik değişikliklerin neden olduğu böbrek fonksiyonlarındaki değişiklikleri modellemek için yaygın olarak kullanılan hayvan modeli 45 dakikalık iskemisi sonrası 24 saat reperfüzyondur (7).

Toksik modeller özellikle aminoglikozitlerle indüklenen nefrotoksisite modelleridir. Ayrıca kanser tedavisinde kullanılan sisplatin ile oluşturulduğu gibi non steroid anti enflamatuvar ilaçlarla ve kontrast ilaçlarla oluşturulan modeller de vardır (7,10).

Fatemikia ve ark. yaptıkları çalışmada birinci grup sıçana Gentamisin 100 mg/kg/gün 1 mL içinde intraperitoneal olarak 7 gün boyunca uygulayarak, ikinci gruba ise tek taraflı üreteri bağlayarak nefrotoksisite oluşturmuşlardır (6).

Öktem ve ark. sıçanlara intraperitoneal Vankomisin 200 mg/kg günde iki kez şeklinde 7 gün süre ile uygulayarak nefrotoksisite oluşturmuşlardır. Vankomisin ile indüklenen nefrotoksisitenin mekanizması hala tam olarak bilinmemektedir (11).

### Cerrahi Modeller

#### Deneysel Tek Taraflı Üreteropelvik Bileşke Kısmi veya Tam Obstrüksiyon Modeli

Üreteropelvik bileşke tıkanıklığı, idrarın pelvisden üretere geçişinin anatomik veya fonksiyonel sebeplerle engellenmesidir. Üreteropelvik tıkanıklık çocukluk çağı hidronefrozunun en sık sebebidir. Çocuklarda böbrek yetmezliğinin en sık sebepleri arasındadır (12,13).

ABY üre ve kreatinin birikmesi ile idrar çıkışının bozulması sonucu hızla böbrek fonksiyonlarının kötüleşmesidir (13). Obstrüksiyona bağlı olarak gelişecek böbreğin yapısal ve morfolojik değişiklikleri, obstrüksiyonun derecesine, süresine ve enfeksiyon olup olmamasına göre değişir. Obstrüksiyon ne kadar proksimalde olursa böbrekler üzerindeki basınç etkisi o kadar fazla olacaktır. Artmış basıncın etkisi ile önce kalikslerde dilatasyon gözlenir. Özellikle akut obstrüksiyonlarda erken dönemde hidronefroz veya dilatasyon görülmeyebilir. Daha sonra iskemik atrofi oluşur ve papillalar önce düzleşir, sonra konveksleşir. Obstrüksiyonun devamı halinde renal parankimal hasar oluşmaya başlar (13,14).

Üreteropelvik bileşke tıkanıklıklarında özellikle renal tübül hasar meydana gelmektedir. Obstrüktif üropatinin tanısında ultrasonografi, sintigrafi, intravenöz piyelografi ve manyetik rezonans ürografi gibi değişik inceleme yöntemleri kullanılmaktadır (13,14,15,16,17).

Thornhill ve ark. yaptıkları çalışmada tek taraflı üreteral kısmi tıkanıklık modelini tanımlamışlardır. Bu çalışma ve benzeri çalışmalarda uygulanan modeli anlatacak olursak; çalışma için sıçanların beslenmeleri deneyden 24 saat önce kesilmeli ve sadece su

içmelerine izin verilmelidir. Genel anestezi altında, supin pozisyonunda, betadinle deri asepsisi sağlandıktan sonra sol paramedian insizyon yapılır. Cerrahi işlem uygulanan sıçanların herhangi birinin böbreğinde anormal bir kitle veya piyelonefrit bulgusu olup olmadığı kontrol edilmelidir. Eğer böyle bir durum varsa bu sıçanlar çalışma dışı bırakılmalıdır. Sol böbrek ve üreter bulunduktan sonra, sol üreter üreteropelvik bileşkeye yakın bir bölgede künt diseksiyonla çevre dokulardan serbestleştirilmelidir. Daha sonra 3 cm uzunluk, uygun çaplardaki kılavuz tel üreterin yanına yerleştirildikten sonra, kılavuz tel ve üreter birlikte serbest 7/0 prolensütür kullanılarak bağlanır (0,25-0,30 şiddetli; 0,35 orta; 0,60-0,95 mm hafif tıkanıklık). Her düğümde aynı gerginliğin sağlanmasına özen gösterilmelidir. Daha sonra kılavuz tel dikişin içinden çıkartılır. Böylece Thornhill ve ark. tarif ettiği şekilde parsiyel üreteropelvik bileşke darlık modeli oluşturulmuş olur. Ardından abdominal katlar 4/0 ipek ile ayrı ayrı iki tabaka olacak şekilde devamlı sütürlerle kapatılır (13).

Sham operasyonu için sıçanlar üreteropelvik bölge bağlanmadan diseke edilir. Sadece laparotomi yapılan gruptur (13).

### Piyelonefrit Modeli

Çocuklarda piyelonefrit, akut morbiditeye neden olabileceği gibi ileriki yıllarda hipertansiyon ve kronik böbrek yetmezliğine öncülük edebilecek böbrek parankim zedelenmesiyle de ilişkilidir. Çocukluk çağında idrar yolu enfeksiyonunun en sık (%90) etkeni *Escherichia Coli*'dir. Çocuklarda tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonları sonrasında piyelonefrit tablosu oluşabilir (18,19,20).

Sıçanlarda piyelonefrit oluşturmak üzere *Escherichia Coli* ATCC 25922 suşu kullanılır. Bir mililitresinde  $10^{10}$  bakteri içeren solüsyon hazırlanarak aynı gün sıçanlara uygulanır. Sıçanlar genel anestezi altında, supin pozisyonunda iken karın ön duvarları betadinle silindikten sonra, vertikal abdominal insizyon ile batin açılıp her iki böbrek açığa çıkartılır. Cerrahi işlem uygulanan sıçanların herhangi birinin böbreğinde anormal bir kitle veya piyelonefrit bulgusu olup olmadığı kontrol edilmelidir. Eğer böyle bir durum varsa bu sıçanlar çalışma dışı bırakılmalıdır. Açığa çıkartılan böbreklere  $10^{10}$  bakteri/mL *Escherichia Coli* ATCC 25922 suşu içeren 0,1 mL bakteri solüsyonu insülin enjektörü ile kortekslerinden girilerek medullaya ulaşınca dek yavaş yavaş enjekte edilir, sonra insizyon bölgesi dikilerek kapatılır (18,19,20).

### Vezikoüreteral Reflü Modeli

Vezikoüreteral reflü (VUR), mesaneden üst üriner sisteme idrarın geri kaçmasıdır. Normal çalışan bir üreterovezikal bileşkede ise idrar üreterden mesaneye rahatlıkla geçebilmeli ancak mesaneden üretere geri kaçış kesinlikle olmamalıdır. Böylece böbrekler mesanedeki yüksek basınçtan ve üriner sistem enfeksiyonundan korunmuş olur. Çocuklarda VUR görülme olasılığı %1 civarındadır. Tanı ve tedavide yetersiz kalındığında renal skar, hipertansiyon ve sonrasında kronik böbrek yetmezliği ortaya çıkmaktadır (21,22,23).

VUR'ye bağlı böbrek parankim hasarının etiyopatogenezi halen tartışmalıdır. Bu konuda yapılan çalışmalarda enfeksiyon olmadan da renal skar geliştiği gösterilmiştir. Reflü nefropatisi VUR'ye eşlik eden renal skar olarak tanımlanabilir. Reflü nefropatisi bir tübülointerstisyel hastalıktır ve genellikle bu tabloya böbrek fonksiyonlarındaki değişiklikler eşlik etmektedir. Böbrek hasarlanmasıyla sonuçlanan bu durum histolojik ve radyolojik olarak tanımlanabilir (21,22).

Deney hayvanlarının büyük bir kısmında VUR intravezikal üreteral tünel çatısının insizyonu ile oluşturulur. Ayrıca üretral orifis bir klemple kapatılıp mesaneye basınç yapılarak da VUR oluşturulabilir (21,22,23).

Biçer ve ark. yaptığı bir çalışmada Yeni Zelanda tipi tavşanlarda uygulanan VUR modellemeye; tavşanlara uygulanan genel anestezi sonrası simfizis pubis üzerinden 2 cm'lik orta hat insizyonu yapılmakta, deri ve deri altı geçilip mesaneye ulaşılmaktadır. Askı sütürleri konularak mesane vertikal olarak açıldıktan sonra sol üreterin submukozal tüneli kateter rehberliğinde cerrahi olarak kaldırılıp kateter çıkarılarak mesane sütürlerle kapatılmalıdır. VUR oluşturulduktan 10 gün sonra tavşanların mesanesine üretral yoldan 6 French nelaton kateter yerleştirilip, mesanedeki idrar boşaltılmış ve opak madde tavşan mesanesine verilip, skopi altında mesane dolumu ve reflü oluşumu belirlenmiştir (22).

Sencan ve ark.'nın yaptığı çalışmada da Yeni Zelanda tipi tavşanlarda üreterin intravezikal bölümünün çatısı insizyonla açılarak VUR oluşturulmuştur (23).

### Nefroörolojik Modellemelerde Sintigrafi

Günümüzde ürogenital sistemin görüntülenmesinde böbrek parankimini değerlendirmek için Tc-99m DMSA böbrek fonksiyonlarını değerlendirmek için Tc-99m DTPA ve MAG3 kullanılmaktadır.



### Tc-99m DMSA Görüntüleme

Böbrekte oluşan parankimal hasarın saptanmasında önemli bir yeri vardır. Split renal fonksiyon hesaplanmasına izin verir.

Molibden 99/Tc-99m jeneratöründen sağım ile elde edilen 740 MBq Tc-99m perteknetat, 3 mL serum fizyolojik ile ticari DMSA kiti bağlanır. Oda sıcaklığında 15 dakika beklendikten sonra kalite kontrol işlemleri uygulanır. İşaretlenme verimliliğinin %95 olması gerekir (5).

Sıçanlara anestezi altında 37 MBq Tc-99m DMSA kuyruk veninden uyguladıktan yaklaşık 2-4 saat sonra gama kamera altında anterior, posterior, sağ ve sol posterior oblikten statik görüntüler alınır. Statik görüntüleme yüksek rezolüsyonlu kolimatör ile 256x256 matriks, 1,5 zoom ve 450000 sayım olacak şekilde planlanmalıdır (24,25). Pinhole kolimatör ile görüntüleme de skar ayrımı için faydalı olmaktadır (26). Yine enjeksiyondan 2-4 saat sonra yüksek rezolüsyonlu kolimatör ile 64x64 matriks ve 30 s/projeksiyon ile 60 projeksiyonluk SPECT görüntüleme yapılabilir (25).

### Dinamik Böbrek Sintigrafisi

Diüretik böbrek sintigrafisi, obstrüktif üropati tanısında altın standart kabul edilen ve dilate toplayıcı sistemin değerlendirilmesinde daha yaygın kullanıma giren minimal invaziv bir yöntemdir. İntravenöz piyelografi ile karşılaştırıldığında radyasyon oranı belirgin şekilde düşüktür ve kontrast maddeye bağlı nefrotoksitesi yoktur.

Sıçanlar genel anestezi altında iken abdomen insizyonla açılıp intrakaval olarak veya kuyruk venine takılan kateterden Tc-99m MAG3 37 MBq/0,2 mL olacak şekilde uygulanır (21). Enjeksiyondan hemen sonra ilk dakikada 1 saniyelik 60 frame, ardından 60 saniyelik 39 frame olacak şekilde 40 dakikalık dinamik görüntüler alınır. Dinamik görüntüleme 64x64 matriks ve yüksek sayım hassasiyetine sahip kolimatör ile yapılmalıdır. Çalışmanın 20. dakikasında 1 mg/kg olacak şekilde diüretik enjeksiyonu yapılır. Her iki böbreğe çizilen ilgi alanları ile elde edilen eğriler dikkate alındığı gibi görsel olarak da görüntüler değerlendirilir (3).

Ayrıca farklı bir çekim yöntemi olarak 1,5-2 mCi, Tc-99m MAG3 kuyruk venine 24 F katater ile damar yolu açıldıktan sonra; 128x128 matrikste, 2,55 zoom faktörü kullanılarak 60 frame/2 saniye; 16 frame/15 saniye ve 24 frame/60 saniye olacak şekilde de sintigrafik görüntüler alınmaktadır (27). Klinikler çekim protokolünü kendi kliniklerine ve yaptıkları çalışmaya göre düzenleyebilmektedirler.

Yazıcı ve ark.'nın çalışmasında tavşanlarda parsiyel üreteral tıkanıklık oluşturmuşlardır. Çalışmadan 30 dakika önce hayvanları 10 mL/kg olacak şekilde hidrate etmişler ve intavenöz olarak 1,85 MBq/kg olarak Tc-99m MAG3'ü enjekte etmişlerdir. Çalışmanın 20. dakikasında 1mg/kg furosemid iv olarak verdikten sonra böbrek aktivitesinde %50 azalma izlendiği zamanı T1/2 olarak tanımlamışlardır. Renogram eğrilerinden 1/2 Tmax değerini ve split fonksiyonlarını değerlendirdikleri çalışmalarında T1/2 20 dakikanın üzerinde olanları obstrüktif hidronefroz olarak tanımlamışlardır (17).

### Sonuç

Klinik öncesi deney hayvan modellemeleri ve görüntüleme yöntemleri insanda yapılacak olan çalışmalar öncesinde oldukça önemli bilgiler elde etmemize olanak sağlar.

**Finansal Destek:** Yazarlar tarafından finansal destek alınmadığı bildirilmiştir.

**Çıkar çatışması:** Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

### Kaynaklar

1. Mejia J, Miranda AC, Durante AC, et al. Preclinical molecular imaging: development of instrumentation for translational research with small laboratory animals. *Einstein* 2016;14:408-414.
2. Erbas B, Sayman H, Alan N, et al. Dinamik böbrek sintigrafisi kılavuzu. *TJNM* 2001;10(Suppl):85-91.
3. Nedim C, M. Gülaldı, Tamer Aksoy, et al. TNTD, çocuklarda dinamik böbrek sintigrafisi uygulama kılavuzu 2.0. *Nük Tıp Sem* 2015;1:15-18.
4. Okumuş E, Erdoğan M. Ürolojik ve nefrolojik problemleri olan çocuklarda MAG3 kitinin DTPA kitine göre avantajı. *Selçuk Üniv Fen Fakültesi Fen Dergisi* 2016;42:57-63.
5. Özcan Kara P, Aksoy T, Aydın F, et al. TNTD, çocuklarda renal kortikal sintigrafi uygulama kılavuzu 2.0. *Nük Tıp Sem* 2015;1:8-14.
6. Fatemikia H, Seyedabadi M, Karimi Z, Et al Comparison of 99mTc-DMSA renal scintigraphy with biochemical and histopathological findings in animal models of acute kidney injury. *Mol Cell Biochem* 2017;434:163-169.
7. Singh AP, Junemann A, Muthuraman A, et al. Animal models of acute renal failure. *Pharmacol Rep* 2012;64:31-44.
8. Yatsu T, Arai Y, Takizawa K, et al. Effect of YM435, a Dopamine DA1 receptor agonist, in a canine model of ischemic acute renal failure. *Gen Pharmacol* 1998;31:803-807.
9. Susa D, Mitchell JR, Verweij M, et al. Congenital DNA repair deficiency results in protection against renal ischemia reperfusion injury in mice. *Aging Cell* 2009;8:192-200.

10. Yürekli Y, Ünak P, Yenisey C, et al. L-Carnitine Protection against cisplatin nephrotoxicity in rats: comparison with amifostin using quantitative renal Tc 99m DMSA uptake. *Mol Imaging Radionucl Ther* 2011;20:1-6.
11. Oktem F, Koyuncu Arslan M, Ozguner F, et al. In vivo evidences suggesting the role of oxidative stress in pathogenesis of vancomycin-induced nephrotoxicity: Protection by erdosteine. *Toxicology* 2005;215:227-233.
12. Kaçar M, Çetin E, Çalışkan Y, et al. Deneysel tek taraflı üreteropelvik bileşke obstrüksiyonunda karşı böbrek parankiminde görülen erken ve geç dönem değişiklikler. *Çocuk Cerrahisi Dergisi* 2010;24:113-120.
13. Thornhill BA, Burt LE, Chen C, et al. Variable chronic partial ureteral obstruction in the neonatal rat: a new model of ureteropelvic junction obstruction. *Kidney Int* 2005;67:42-52.
14. Cachat FO, Lange-Sperandio B, Chang AY, et al. Ureteral obstruction in neonatal mice elicits segment-specific tubular cell responses leading to nephron loss. *Kidney Int* 2003;63:564-575.
15. Ma MC, Huang HS, Chen CF. Impaired renal sensory responses after unilateral ureteral obstruction in the rat. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:1008-1016.
16. Sancak EB, Tan YZ, Turkon H, Silan C. Attenuation of partial unilateral ureteral obstruction-induced renal damage with hyperbaric oxygen therapy in a rat model. *Int Braz J Urol* 2017;43:946-956.
17. Yazıcı M, Celebi S, Kuzdan Ö, et al. Current radiological techniques used to evaluate unilateral partial ureteral obstruction: an experimental rabbit study. *Int Urol Nephrol* 2015;47:1045-1050.
18. Sadeghi Z, Kajbafzadeh A, Tajik P et al. Vitamin E administration at the onset of fever prevents renal scarring in acute pyelonephritis. *Pediatr Nephrol* 2008;23:1503-1510.
19. Hewitson TD, Darby IA, Bisucci TT, et al. Evolution of tubulointerstitial fibrosis in experimental renal infection and scarring. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:632-642.
20. Sabetkish N, Sabetkish S, Mohseni MJ, Kajbafzadeh AM. Prevention of renal scarring in acute pyelonephritis by probiotic therapy: an experimental study. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2017.
21. Bowen SE, Watt CL, Murawski IJ, Gupta IR, Abraham SN. Interplay between vesicoureteric reflux and kidney infection in the development of refluxnephropathy in mice. *Dis Model Mech* 2013;6:934-941.
22. Biçer Ş, Yurtçu M, Köylü Ö, et al. Veziköüreteral reflüde reflü nefropatisine melatoninin etkisi. *Genel Tıp Derg* 2009;19:161-167.
23. Sencan A, Vatansever S, Yılmaz O, et al. Early renal parenchymal histological changes in an experimental model of vesico-ureteral reflux and the role of apoptosis. *Scand J Urol Nephrol*. 2008;42:213-219.
24. Tyson R, Daniel GB. Renal scintigraphy in veterinary medicine. *Semin Nucl Med* 2014;44:35-46.
25. Silva-Rodriguez J, Cortes J, Pardo-Montero J, et al. In vivo quantification of renal function in mice using clinical gamma cameras. *Physica Medica* 2015;31:242-247.
26. Young K, Daniel GB, Bahr A. Application of the pin-hole collimator in small animal nuclear scintigraphy: a review. *Veterinary Radiology Ultrasound* 1997;38:83-93.
27. Üstün F. Deneş Hayvanlarında Nükleer Tıp Görüntü Atlası. In: Durmuş Altun G Üstün F, editors. *Deneş Hayvanlarında Moleküler Görüntüleme*. 1nd Edition. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 2015p:265-281.