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 evrededir 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 evrededir (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 çoğalır 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, transgenik 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.
- Hücresel 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 beklentiye 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, dolaşımda 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 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 böğrüne 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 molekülü 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 karsinojen 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, diyetteki 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

(6). Kullanılan kimyasal maddeler ile diğer ilaçların etkileşim olasılığı da unutulmamalıdır.

4. Genetik-Modifiye Kemirgenler

(Genetically engineered mouse models (GEMMs):

(4) Bu modeller sadece insan kanserinin ilgili birçok patofizyolojik özelliği taklit etmekle kalmayıp; aynı zamanda kansere neden olan moleküler olayların sırasını da tekrarlayabilmektedir. Meme tümörü oluşumunu indüklemek için güçlü bir meme epitel destekleyicisinin kontrolü altında fare epitelyumu içinde özgün bir onkojenin transgenik ekspresyonu kullanılır. Bu meme tümörünün başlangıç ve gelişimini takip etmede kullanılan klinik olarak değerli bir modeldir. En önemli kısım da doğal stroma içinde ve doğal immün sistem varlığında gerçekleşmesidir. Klinik meme kanserlerinde görülen belirli moleküler alt tiplerin çoğunu taklit eden çok sayıda model geliştirilmiştir. Ancak geliştirilmesi zaman alan, maliyetli yöntemler olup; deneysel sonuçları az verimlidir. Düşük ER reseptörü sunarlar. Ayrıca hematogen metastaz sergilerler. Oysa doğal meme kanseri lenfatik metastaz sergilemektedir.

Klinik Öncesi Meme Kanseri Modellerinde Kullanılan Görüntüleme Yöntemleri

Meme kanser tanısında görüntüleme tekniklerinin ilk kullanımı "translüminasyon yöntemi" ile 1929 yılında başlamıştır. Mamografi ise 1950'den beri tanı ve taramada kullanılmaktadır.

Klinik öncesi çalışma için oluşturulan modelin tümör boyutu, lokalizasyonu ve metastaz varlığına göre; ultrasonografi (USG), bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ile anatomik görüntüleme, tek foton emisyon bilgisayarlı tomografi

(SPECT), pozitron emisyon tomografi (PET) ve optik görüntüleme ile moleküler düzeyde görüntülemesi mümkündür.

Günümüzde fare ve sıçanları görüntülemek için daha iyi rezolüsyona sahip özel cihazlar geliştirilmiştir. Klinikte kullanılan ve klinik öncesi çalışmalara özel geliştirilmiş sistemlerin uzaysal rezolüsyonları arasındaki farklar Tablo 1'de sunulmuştur. Klinikte kullanılan cihazların deney hayvanlar için kullanımı bazı ülkelerde kanunen yasaklanmıştır. Klinik pratikte klinik görüntüleme cihazlarının gece, hafta sonları ve tatil günlerinde kullanılması her zaman mümkün olmayabilir. Ayrıca bu tür deney hayvanlarına özel cihazların kullanımı, immün yetmezlikli ve diğer genetik olarak işlenmiş hayvan modellerinin diğer deney hayvanları ile insanlardan bulaşabilecek hastalıklardan korunmasını sağlar.

Meme kanseri temel alındığında onkoloji araştırmalarında klinik öncesi çalışmalarda görüntülemenin temel kullanım alanları şöyle sıralanabilir (13):

- Tümör lokalizasyonu ve tümör kitlesinin kantifikasyonu

Klinik öncesi çalışmalardan ortotopik-subkütan tümör modelinde, oluşturulan tümör dokusunun lokalizasyonu ve büyümesi değerlendirilir. Günümüzde bu amaçla kullanılan tek ideal görüntüleme yöntemi yoktur.

Subkütan bir tümör modelinin (ortotopik) takibi ardışık ölçümleri içerir. Ancak çoğu palpe edilemeyebilir. Dolayısıyla görüntüleme yöntemi ile ardışık takibi yapılabilir. Yöntem hızlı ve teknolojisi güçlü olmalıdır. Ayrıca deney hayvanında minimal stres oluşturmalıdır. Yöntem çok hassas olmalıdır. Genelde bu amaçla tek yöntemden ziyade birden fazla yöntem bir arada kullanımı daha başarılı sonuçlar oluşturabilir. Vücut yüzeyine yakın/yüzeydeki tümör dokusunu tespit etme en hassas yöntem optik görüntülemedir. Optik görüntüleme teknik olarak dokuda foton dağılımının gözlemlenmesi ve ışığın tespitini içerir. Optik görüntüleme doku perfüzyonunu yani vaskülarizasyonunu değerlendirmede kullanılır. Görüntülemeindeki sinyal yoğunluğu canlı tümör kitlesi ile uyumludur. Canlı ve nekrotik dokunun ayrılmasına izin verir. Yöntemin hassasiyeti ve rezolüsyonu lezyon lokalizasyonu derinleştikçe azalır. Optik görüntüleme minimum 1000 hücreye kadar az sayıda hücrenin görüntülenmesine izin verecek hassasiyettedir. Kullanılan cihaz, lusiferaz düzeyi, tümör lokalizasyonu, hayvanın pozisyonu, tümör hücre sayısı (10-100 hücreye kadar) tümör tespitini etkileyen faktörlerdir.

Tablo 1. Klinikte kullanılan ve klinik öncesi çalışmalara özel geliştirilmiş sistemlerin uzaysal rezolüsyonları arasındaki farklar (14)

Yöntem	Uzaysal rezolüsyon	
	Klinik	Klinik öncesi
MRG	~1 mm	≤100 µm
PET	~5 mm	1-2 mm
SPECT	~1 cm	0,5-2 mm
BT	1-2 mm	≤200 µm
USG	1-2 mm	≤100 µm

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

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

Subkütan tümör değerlendirmede 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 dolaşamayabilir. 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 görüntülemeye optik görüntüleme, MRG, USG ve BT'nin yeri yoktur. Deney hayvanları ile gen görüntülemeye 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 görüntülemeye antikör işaretlemede 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 görüntülemeye 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 kanlanmasını 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 değerlendirmedir.

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 yapılabilirse 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 yöntemlerdir. 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 artırır, 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 tanılarda 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.