



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 ksenograflar, 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 ksenograflar (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 ksenograflar 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 karsinogeneğinde 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 anjiyogenezi 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.

Mikrooradyografide 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 fotoğrafçılıkta 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 kurban 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 kurban 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. Mikrooradyografide 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 malignitelerde 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 floretoilkolin 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 (CH₃COO⁻). 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 karbondioksite 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 tanıda 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

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Coleman RE. Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clin Cancer Res* 2006;12:6243-6249.
6. Corn PG. The tumor microenvironment in prostate cancer: elucidating molecular pathways for therapy development. *Cancer Manag Res* 2012;4:183-193.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* 2014;345:124-125.
13. Sachs N, Clevers H. Organoid cultures for the analysis of cancer phenotypes. *Curr Opin Genet Dev* 2014;24:68-73.
14. 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.
15. 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.
16. Garber K. From human to mouse and back: 'tumorgraft' models surge in popularity. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:6-8.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. Cunha L1, Horvath I, Ferreira S, et al. Preclinical imaging: an essential ally in modern biosciences. *Mol Diagn Ther* 2014;18:153-173.
24. Weissleder R, Mahmood U. Molecular imaging. *Radiology* 2001;219:316-333.
25. Grassi R, Lagalla R, Rotondo A. Genomics, proteomics, MEMS and SAIF: which role for diagnostic imaging? *Radiol Med* 2008;113:775-778.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.