



# 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 çalışmalarından 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-antikorlarının üretimidir. Hashimoto tiroiditindeki başlıca immünolojik durum, lenfosit aracılı folliküler yıkım ve buna bağlı süreçlerdir. Buna karşılık, GH, immun reaktivite sonucu oluşan patojenik antikorların (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 antikorları 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 antikorlar 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 antikor (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 antikor 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 antikoruyla sahip olduğu bulundu ama bunların çoğu bloklayıcı antikordur ve 24 haftada, uyarıcı antikoru 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 antikorumun hipertiroidizmi indüklemekteki patojenik kabiliyetleri daha iyi anlaşılabilir.

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 yollarını tespiti ile farmasotik ajanlara tümör yanıtını öngörmede 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 hücresellikçe 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 kütlelerini 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.
- Schweppe 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  $[(64)\text{Cu}]\text{Cu-}[(177)\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-(Tyr}(3))\text{octreotate}$  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.