



**BEZMİÂLEM**  
VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**FARE BEYİN METASTAZI MODELİNDE OPTİMAL STEREOTAKTİK  
RADYOCERRAHİ YÖNTEMİNİN BELİRLENMESİ VE İMMÜNOLOJİK  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**  
**Dr. Güven GÖNEN**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Prof. Dr. Mustafa Aziz HATİBOĞLU**

**Bu tez, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu  
Başkanlığı tarafından 20201201 numaralı proje ile desteklenmiştir.**

**HAZİRAN 2022**



**BEZMİÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**FARE BEYİN METASTAZI MODELİNDE OPTİMAL STEREOTAKTİK  
RADYOCERRAHİ YÖNTEMİNİN BELİRLENMESİ VE İMMÜNOLOJİK  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**  
**Dr. Güven GÖNEN**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Prof. Dr. Mustafa Aziz HATİBOĞLU**

**Bu tez, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu  
Başkanlığı tarafından 20201201 numaralı proje ile desteklenmiştir.**

**HAZİRAN 2022**

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı Öğrencisi Güven GÖNEN, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “ FARE BEYİN METASTAZI MODELİNDE OPTİMAL STEREOTAKTİK RADYOCERRAHİ YÖNTEMİNİN BELİRLENMESİ VE İMMÜNOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı :**      **Prof. Dr. Mustafa Aziz HATİBOĞLU** .....  
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

**Jüri Üyeleri :**      **Doç. Dr. Murad ASİLTÜRK** .....  
Bakırköy Prof. Dr. Mazhar Osman Ruh Sağlığı ve Sinir  
Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi

**Doç. Dr. Mustafa Namık Öztanır** .....  
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

**Teslim Tarihi**      : 1 Haziran 2022  
**Savunma Tarihi**    : 30 Haziran 2022

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Güven GÖNEN

İmza



## TEŞEKKÜR

Uzmanlık tezimi hazırlamamda ve tüm uzmanlık eğitimim süresince engin bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, üzerimde büyük emeği olan Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Mustafa Aziz HATİBOĞLU'na,

Nöroşirurji uzmanlık eğitimim süresince engin bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, cerrahi prensibi ve mesleki özgüveni kazanmamı sağlayan, mikronöroşirurji sanatını öğreten saygıdeğer hocalarım, Doç. Dr. Mehmet Hakan SEYİTHANOĞLU, Doç.Dr. Mustafa Namık ÖZTANIR, Doç. Dr. Erdiç ÖZEK, Doç. Dr. Tolga Turan DÜNDAR, Doç Dr. Serkan KİTİŞ ve Op.Dr. Meliha GÜNDAĞ PAPAKER'e,

İmmünohistokimyasal ve histolojik inceleme aşamasında katkı ve bilgisiyle yardımcı olan Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Görevlisi Dr. Ganime ÇOBAN'a,

Tezin her aşamasında katkı ve yardımını esirgemeyen Medikal Fizik Uzmanı Kerime AKDUR'a,

Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Enstitüsü Moleküler Biyolog Büşra KARAÇAM ve Öykü DAĞDEVİREN'e,

Eğitimim süresince birlikte çalışma fırsatı bulduğum asistan arkadaşlarıma, klinik, poliklinik ve ameliyathane personeline,

Uzmanlık eğitimimin belirli bir süresinin geçtiği Erciyes Üniversitesi Nöroşirurji Anabilim Dalı'ndaki hocalarıma

Eşime, oğluma ve aileme,

Sonsuz teşekkürler ederim...

Bu tez, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 20201201 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Haziran 2022

Dr. Güven GÖNEN

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

BEYAN.....	II
TEŞEKKÜR .....	III
İÇİNDEKİLER .....	IV
KISALTMALAR ve SEMBOLLER .....	VII
TABLO LİSTESİ .....	XI
ŞEKİL LİSTESİ.....	XII
ÖZET.....	XIV
SUMMARY .....	XV
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. BEYİN METASTAZI .....</b>	<b>3</b>
2.1 Genel Bilgiler .....	3
2.2 Epidemiyoloji.....	4
2.3 Histopatoloji ve Moleküler Mekanizmalar .....	6
2.3.1 Epitelyal mezenkimal geçiş .....	8
2.3.2 Tümör stroması ile etkileşim.....	11
2.3.3 Lokal invazyon.....	11
2.3.4 Disseminasyon ve ekstrasvazasyon .....	14
2.3.5 Eksozomlar.....	15
2.3.6 Kanda dolaşan tümör DNA'sı (ctDNA) .....	15
2.3.7 Kolonizasyon .....	16
2.3.8 Kan beyin bariyeri ve metastaz .....	17
2.3.9 Metastatik süreçte anjiyogenez .....	18
2.4 Görüntüleme Özellikleri.....	19
2.5 Radyasyon Nekrozu .....	24
2.6 Klinik.....	28
2.7 Tedavi Seçenekleri .....	31
2.7.1 Medikal tedavi.....	32
2.7.2 Kemoterapi ve immünoterapi.....	33
2.7.3 Cerrahi.....	34
2.7.4 Radyoterapi .....	35
2.8 Tedaviye Yanıt Ve Prognostik Faktörler .....	36
<b>3. RADYASYON TEDAVİSİ.....</b>	<b>41</b>
3.1 Tarihçe.....	41
3.2 Tüm Beyin Radyoterapisi .....	44
3.3 Stereotaktik Radyocerrahi .....	46
3.3.1 Radyocerrahi Yöntemleri .....	49
3.3.1.1 Gamma Knife .....	50
3.3.1.2 Lineer hızlandırıcı (LINAC) tabanlı stereotaktik radyocerrahi .....	51
3.3.1.3 Proton beam radyoterapi .....	51
3.3.1.4 CyberKnife (CK) robotik radyocerrahisi .....	51

3.4 Tedavi Yaklaşımları ve Literatür Araştırması.....	52
<b>4. TÜMÖR MİKROÇEVRESİ .....</b>	<b>57</b>
4.1 İmmün Sistem Hücreleri .....	58
4.2 Tümörle İlişkili Makrofajlar .....	60
4.3 Miyeloid Kökenli Süpresör Hücreler .....	62
4.4 Matriks Metalloproteinazlar .....	62
4.5 Beyin Metastazı ve Tümör Mikroçevresi.....	63
<b>5. RADYASYONA DİRENÇ MEKANİZMALARI .....</b>	<b>65</b>
5.1 Radyasyon Biyolojisi .....	66
5.2 Radyasyonun Normal Dokuya Etkileri .....	67
5.3 DNA Hasar Yanıtları.....	69
5.4 Redistribüsyon Ve Hücre Döngüsü.....	71
5.5 Repopülasyon.....	72
5.6 Reoksijenizasyon ve Anjiyogenez .....	72
5.7 Radyosensitizasyon .....	74
5.8 Uzak Hücrel Etki .....	75
5.9 Radyasyon ve Tümör Mikroçevresi .....	76
5.10 Sinyal Yolakları ve Kanser Kök Hücreleri .....	81
5.10.1 HIF1 ve radyorezistans .....	83
5.10.2 Oksidatif stres ve radyorezistans.....	85
5.10.3 PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı ve radyorezistans .....	85
5.10.4 EGFR/HER sinyal yolağı ve radyorezistans .....	86
5.10.5 STAT3 ve radyorezistans.....	87
5.10.6 E-Kaderin yolu ve radyorezistans .....	88
<b>6. YAP1 ve HSP90 .....</b>	<b>90</b>
6.1 Radyasyona Direnç Oluşmasında YAP1'in Rolü .....	90
6.2 Radyasyona Direnç Oluşmasında HSP90'nın Rolü .....	98
6.2.1 Büyük HSP'ler.....	100
6.2.2 Küçük HSP'ler.....	102
6.2.3 Isı şoku proteinleri ve kanser .....	103
6.2.4 Isı şok proteinleri ve tedaviye direnç .....	104
<b>7. MATERYAL ve METHOD .....</b>	<b>108</b>
7.1 Tümör Hücreleri.....	108
7.2 Fare Modeli ve Tedavi .....	108
7.3 İn Vivo Sağkalım Deneyi.....	110
7.4 İn Vivo Bağışıklık Cevabının Değerlendirilmesi.....	110
7.5 HSP90 ve YAP1 Etkisinin Değerlendirilmesi .....	111
7.6 İmmünohistokimya .....	112
7.7 Protein İzolasyonu.....	113
7.8 CCL4 Antikoru Tayini .....	113
7.9 ELISA ile IL17A Tayini .....	115
7.10 İstatistiksel Analiz.....	115
<b>8. SONUÇLAR .....</b>	<b>116</b>
8.1 Sağkalım Sonuçlar .....	116
8.2 İmmünohistokimya .....	117
8.2.1 YAP1 sonuçlar .....	118
8.2.2 HSP90 düzeyi.....	119
8.3 ELISA Sonuçları .....	120
8.3.1 ELISA CCL4 sonuçları .....	121
8.3.2 ELISA IL-17A sonuçları.....	121

<b>9. TARTIŞMA .....</b>	<b>122</b>
<b>10. SONUÇ</b>	<b>125</b>
<b>11. KAYNAKLAR .....</b>	<b>126</b>
<b>12. EKLER.....</b>	<b>148</b>



## KISALTMALAR ve SEMBOLLER

$\alpha$	: Alfa
$\beta$	: Beta
$\gamma$	: Gama
<b>17-AAG</b>	: 17-allilamino-geldanamisin
<b>17-DMAG</b>	: 17-(dimetilaminoetilamino)-17-demetoksigeldanamisin
<b>ADC</b>	: Aşık difüzyon katsayısı
<b>AG</b>	: Ağırlıklı görüntüleme
<b>AKT</b>	: Protein kinaz B
<b>AML</b>	: Akut miyeloid lösemi
<b>AMOT</b>	: Anjiomotin
<b>AMPK</b>	: Adenosin monofosfatla aktive olan protein kinaz
<b>APAF-1</b>	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
<b>APC</b>	: Antijen sunan hücre
<b>ARG1</b>	: Arjinaz 1
<b>ATM</b>	: Ataksi-telenjiektazi mutasyonu
<b>ATR</b>	: Ataksi-telenjiektazi ve Rad3 ile ilgili, Serin/Treonin kinaz
<b>BM</b>	: Beyin metastazi
<b>BMP2</b>	: Kemik morfogenetik protein 2
<b>BMV</b>	: Beyin metastaz hızı
<b>BOS</b>	: Beyin omurilik sıvısı
<b>Breg</b>	: B düzenleyici hücre
<b>BT</b>	: Bilgisayarlı tomografi
<b>CBCT</b>	: Cone beam bilgisayarlı tomografi
<b>CBV</b>	: Serebral kan hacmi
<b>CCL</b>	: Kemokin ligand
<b>CCN</b>	: Büyüme faktörlerinin hücrel iletişim ağı faktörü
<b>CCR</b>	: Kemokin reseptör
<b>CDH2</b>	: N-kaderin
<b>CSC</b>	: Kanseri kök hücresi
<b>CXCL</b>	: Kemokin ligand
<b>CXCR</b>	: Kemokin reseptör
<b>ÇDK</b>	: Çift sarmallı DNA kırılmaları
<b>CDK</b>	: Siklin bağımlı kinaz
<b>Chk2</b>	: Kontrol noktası kinaz 2
<b>Cho/Cr</b>	: Kolin/kreatinin
<b>CK</b>	: CyberKnife
<b>Co60</b>	: Kobalt-60
<b>COX-2</b>	: Siklooksijenaz-2
<b>CSF</b>	: Koloni uyarıcı faktör
<b>CTC</b>	: Kanda dolaşan tümör hücresi
<b>ctDNA</b>	: Dolaşımdaki tümör DNA'sı
<b>CTGF</b>	: Bağ dokusu büyüme faktörü

<b>CTL</b>	: Sitotoksik T lenfosit
<b>CTLA-4</b>	: CTL ilişkili antijen-4
<b>CYR61</b>	: Sisteinden zengin protein 61
<b>DAG</b>	: Difüzyon ağırlıklı görüntüleme
<b>DAMP</b>	: Hasarla ilişkili moleküler kalıp
<b>DC</b>	: Dendritik hücre
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>DS-GPA</b>	: Tanıya özgü dereceli prognostik değerlendirme
<b>DTI</b>	: Difüzyon tensör görüntüleme
<b>EGF</b>	: Epidermal büyüme faktörü
<b>EGFR</b>	: Epitelyal büyüme faktörü reseptörü
<b>EMG</b>	: Epitelyal mezenkimal geçiş
<b>Epcam</b>	: Epitelyal marker, epitelyal hücre yapışma molekülü
<b>ER</b>	: Endoplazmik retikulum
<b>ESM</b>	: Ekstrasellüler matriks
<b>FAP<math>\alpha</math></b>	: Fibroblast aktivasyon proteini $\alpha$
<b>FGF</b>	: Fibroblast büyüme faktörü
<b>G-CSF</b>	: Granülosit koloni stimüle edici faktör
<b>GBM</b>	: Glioblastom
<b>GFAP</b>	: Glial fibriler asidik protein
<b>GK</b>	: Gamma knife
<b>GLUT</b>	: Glikoz taşıyıcı
<b>GPCR</b>	: G protein-bağlı reseptörler
<b>GRP94</b>	: Glikoz düzenleyici protein 94
<b>Gy</b>	: Gray
<b>HER</b>	: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü
<b>HGF</b>	: Hepatosit büyüme faktörü
<b>HIF</b>	: Hipoksi ile indüklenebilir faktör
<b>HMGB</b>	: High mobility group box
<b>HSF</b>	: Isı şok faktör
<b>HSP</b>	: Isı şok proteini
<b>IFMM</b>	: İntrafraction Motion Management
<b>IFN</b>	: İnterferonlar
<b>IGF</b>	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>IR</b>	: İyonlaştırıcı radyasyon
<b>JNK</b>	: c-Jun N terminal kinaz
<b>KBB</b>	: Kan beyin bariyerini
<b>KHAK</b>	: Küçük hücreli akciğer karsinomu
<b>KHDAK</b>	: Küçük hücreli dışı akciğer karsinomu
<b>KIFC1</b>	: Kinezin benzeri protein 1
<b>KPS</b>	: Karnofsky performans skoru
<b>LAG3</b>	: Lenfosit aktivasyon geni 3
<b>LATS1/2</b>	: Büyük tümör baskılayıcı kinaz 1/2
<b>LET</b>	: Lineer enerji transferi
<b>LINAC</b>	: Lineer hızlandırıcı, lineer accelerator
<b>LM</b>	: Leptomeningeal metastaz
<b>MAPKK</b>	: Mitojenle aktive olan protein kinaz
<b>MDSC</b>	: Miyeloid kökenli süpresör hücre
<b>MHC</b>	: Majör histo-uyumluluk kompleksi

<b>MMP</b>	: Matriks metalloproteinaz
<b>Mob1</b>	: Mob kinaz aktivatörü 1
<b>MRG</b>	: Manyetik rezonans görüntüleme
<b>MRP</b>	: MR Perfüzyon
<b>MRS</b>	: MR Spektroskopisi
<b>MST1/2</b>	: Serin/Treonin Kinaz 20 (STE20) benzeri protein kinazlar
<b>mTOR</b>	: Rapamisinin hedef molekülü
<b>NAA</b>	: N-asetil aspartat
<b>Nf2</b>	: Nörofibromatozis 2
<b>NF-κB</b>	: Nükleer faktör-κB
<b>NK</b>	: Doğal öldürücü hücre
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>NOV</b>	: Aşırı eksprese nefroblastom
<b>Nrf2</b>	: Nükleer faktör ile ilişkili faktör 2
<b>NT</b>	: Nörotrofin
<b>p53</b>	: Protein 53
<b>PAMP</b>	: Patojenle ilişkili moleküler kalıpları
<b>PARP</b>	: Poli ADP-ribozil polimerazları
<b>PDGF</b>	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
<b>PD-L1</b>	: Programlanmış ölüm ligandı-1
<b>PET</b>	: Pozitron emisyon tomografi
<b>PI3K</b>	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
<b>PNS</b>	: Paraneoplastik nörolojik sendrom
<b>PRR</b>	: Patojen tanıma reseptörleri
<b>PS1</b>	: Presenilin 1
<b>PTEN</b>	: Tümör baskılayıcı genlerden fosfat ve tensin
<b>QUANTEC</b>	: Quantitative Analysis of Normal Tissue Effects in The Clinic
<b>RAD</b>	: Emilen radyasyon dozu
<b>RANO</b>	: Nöroonkolojide yanıt değerlendirilmesi
<b>RBE</b>	: Göreceli biyolojik etkinlik
<b>RECIST</b>	: Solid Tümörlerde Cevap Değerlendirme Kriterleri
<b>RIG-I</b>	: Retinoik asit ile indüklenebilir gen I
<b>RIP</b>	: Reseptör ilişkili protein
<b>RN</b>	: Radyasyon nekrozu
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>RPA</b>	: Recursive partitioning analiz
<b>RPA</b>	: Recursive Partitioning analizi
<b>RT</b>	: Radyasyon tedavisi
<b>RTK</b>	: Reseptör tirozin kinaz
<b>RTOG</b>	: Radyasyon tedavisi onkoloji grubu
<b>RUNX2</b>	: Runt ilişkili transkripsiyon faktörü 2
<b>SAV1</b>	: Salvador Homolog Protein1
<b>SDF-1α</b>	: Stromal kaynaklı 1α
<b>SIR</b>	: Radyocerrahi için skor indeksi
<b>SIRT3</b>	: Sirtuin 3
<b>SPECT</b>	: Tek foton emisyon bilgisayarlı tomografi
<b>SRC</b>	: Stereotaktik radyocerrahi
<b>SSS</b>	: Santral sinir sistemi
<b>STAT3</b>	: Transkripsiyon 3'ün sinyal dönüştürücü ve aktivatörü
<b>STING</b>	: İnterferon genlerini uyarıcı

<b>SWI</b>	: Duyarlılık Ağırlıklı Görüntüleme
<b>TAF</b>	: Tümör ile ilişkili fibroblast
<b>TAM</b>	: Tümör ilişkili makrofaj
<b>TAZ</b>	: PDZ bağlanma motifli transkripsiyonel koaktivatör
<b>TBRT</b>	: Tüm beyin radyoterapi
<b>TCR</b>	: T hücre reseptörü
<b>TEAD</b>	: Transkripsiyonel geliştirilmiş ilişkili etki alanı
<b>TGF</b>	: Tümör büyüme faktörü
<b>Th1</b>	: CD4+ T, Thelper, Yardımcı
<b>Tim3</b>	: T hücresi immünooglobulini ve müsin alanı içeren-3
<b>TLR</b>	: Toll-like reseptör
<b>TMÇ</b>	: Tümör mikroçevresi
<b>TNF</b>	: Tümör nekroze edici faktör
<b>TRAP1</b>	: TNF reseptör ilişkili protein 1
<b>Treg</b>	: T düzenleyici hücre
<b>uPA</b>	: Plazminojen aktivatör
<b>VEGF</b>	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
<b>VP</b>	: Verteporfin
<b>XRCC1</b>	: X-ışını tamir tamamlayıcı protein
<b>YAP</b>	: Yes ilişkili protein
<b>Zeb-1</b>	: E-box homeobox transkripsiyon faktörü

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 2.1 :</b> Primer tümör tipi, klinik olarak tespit edilen beyin metastazlarının yüzdesi.....	5
<b>Tablo 2.2 :</b> Artmış metastaz potansiyeli ile ilişkili genler. ....	10
<b>Tablo 2.3 :</b> Metastaz ve invazyonda süpresör genlere örnekler. ....	13
<b>Tablo 2.4 :</b> Tümör yanıt değerlendirme kriterleri. ....	37
<b>Tablo 2.5 :</b> Nöroonkoloji beyin metastazları yanıt değerlendirme kriterleri.....	38
<b>Tablo 2.6 :</b> RPA sınıflamasına göre prognostik faktörler [147,148].....	39
<b>Tablo 2.7 :</b> Skor İndeks Radyocerrahi (SIR) için prognostik değişkenler. ....	39
<b>Tablo 2.8 :</b> Karnofsky performans skoru. ....	40
<b>Tablo 3.1 :</b> Cerrahi rezeksiyon ve SRC' nin endikasyonları, avantajları ve dezavantajları. ....	53
<b>Tablo 5.1 :</b> Radyoterapide kullanılan ilaçların mekanizması.....	74
<b>Tablo 5.2 :</b> Radyosentitizör ilaçlara örnekler. ....	75
<b>Tablo 5.3 :</b> DAMP örnekleri ve özellikleri. ....	77
<b>Tablo 5.4 :</b> Farklı histolojik kökenli kanser kök hücrelerinin (CSC'ler) potansiyel belirteçlerinin listesi. ....	82
<b>Tablo 6.1 :</b> Kanser progresyonu ve YAP'ın rolü. ....	97
<b>Tablo 6.2 :</b> Radyorezistansta HSP70 ve HSP90 ile ilgili yapılan çalışmaların bulguları. ....	106
<b>Tablo 8.1 :</b> Gruplar arası HSP90 ve YAP1 düzeyi.....	117
<b>Tablo 8.2 :</b> Her grupta tümörlü ve sağlıklı dokunun CCL4 ve IL-17A düzeyi istatistiği. ....	120
<b>Tablo 8.3 :</b> Tümörlü dokular ve sağlıklı dokuların kendi içinde CCL4 ve IL-17A düzeyi istatistiği. ....	120

## ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 : Beyin metastazı oluşum sürecinin şematizasyonu. ....	7
Şekil 2.2 : Beyin metastazı oluşum süreci ve hücreler. ....	8
Şekil 2.3 : Beyin metastazı sürecinde epitelyal (E)-mezenkimal (M) geçişin moleküler mekanizması. ....	9
Şekil 2.4 : Kanser hücrelerinin invazyon mekanizmaları. ....	12
Şekil 2.5 : Tümör hücrelerinin beyinde kolonizasyonu şematizayon. ....	18
Şekil 2.6 : Beyin metastazı görüntüleme ayırıcı tanı. ....	24
Şekil 2.7 : MR ile radyonekroz metastaz ayrımı. ....	27
Şekil 4.1 : Tümör mikroçevresi şematizasyonu. ....	57
Şekil 4.2 : IL-17'nin antitümör ve protümör özellikleri. ....	59
Şekil 4.3 : M1 ve M2 Makrofajlar. ....	61
Şekil 5.1 : Radyasyonun biyolojik etkileri ve direnç mekanizmaları. ....	65
Şekil 5.2 : Hipoksi ve radyodirençte rolü. ....	84
Şekil 5.3 : Radyasyon ile aktifleşen PI3K/AKT/mTOR ve NFκB yolları. ....	86
Şekil 5.4 : Radyasyon ile aktive olan EGFR/ HER yolağı. ....	87
Şekil 5.5 : STAT3 ile aktive olan yollar. ....	88
Şekil 5.6 : N-kaderin ve radioresistanstaki rolü. ....	89
Şekil 6.1 : Hippo yolağı ve YAP/TAZ aktivasyonu. ....	91
Şekil 6.2 : YAP/TAZ kompleksinin uyarıcıları ve ilgili yollar. ....	92
Şekil 6.3 : YAP/TAZ'ın hücre-hücre bağlantıları ve sitoskelet ile ilişkisi. ....	93
Şekil 6.4 : Hippo yolunun şematik gösterimi ve diğer sinyal yollarıyla ilişkisi. ....	95
Şekil 6.5 : Tümör bağışıklığında YAP. ....	95
Şekil 6.6 : Kanser gelişiminde rol alan HSP'lerin genel özellikleri. ....	99
Şekil 6.7 : Hücre yaşlanmasında ve apoptozda HSP'lerin rolü. ....	100
Şekil 6.8 : HSP90 ve büyüme sinyallerini düzenlemesi. ....	102
Şekil 6.9 : Çeşitli proneoplastik süreçlerde HSP90. ....	104
Şekil 7.1 : Stereotaktik frame ile B16F10 melanom hücre implantasyonu. ....	109
Şekil 7.2 : Gamma Knife işlemi örnek görüntü. ....	110
Şekil 7.3 : Melanoma infiltrasyonu makroskopik kesitsel görüntüler. ....	111

<b>Şekil 7.4</b> : ELISA ile CCL4 tayini.....	114
<b>Şekil 8.1</b> : Sağkalım sonuçları .....	116
<b>Şekil 8.2</b> : Hematoksilen-Eozin boyama. ....	117
<b>Şekil 8.3</b> : YAP1 boyama. ....	118
<b>Şekil 8.4</b> : YAP1 sonuçlar grafik.....	118
<b>Şekil 8.5</b> : HSP90 boyama. ....	119
<b>Şekil 8.6</b> : HSP90 sonuçlar grafik. ....	119
<b>Şekil 8.7</b> : CCL4 sonuçları.....	121
<b>Şekil 8.8</b> : IL-17A sonuçları .....	121



## ÖZET

Kanser hastalarında morbidite ve mortalitenin hala en önemli nedeni olan beyin metastazlarında, tümör hücrelerinin immün supresif özellikleri ve geliştirdikleri direnç mekanizmaları nedeniyle bu tümörlerin lokal kontrol başarı oranları düşmektedir. Stereotaktik radyocerrahinin beyin metastazlarında ve primer beyin tümörlerinde, immün yanıtı ve tümör mikroçevresini düzenlemede etkili olduğu artık bilinen bir gerçektir ancak hipofraksiyone radyocerrahinin beyin metastazlarında immün sistem üzerine etkisi üzerine yeterli bilgi yoktur. Ayrıca, farklı kanser türlerinde tedaviye direnç oluşumunda rolleri kanıtlanan ısı şok proteinleri ve Hippo yolağının, beyin metastazlarında radyasyon ile ilişkisini ve farklı radyocerrahi doz ve fraksiyonasyonlarının bu moleküller üzerine etkisini araştıran çalışmalar kısıtlıdır.

Bu amaçla B16F10 fare melanoma hücre serisi ile C57BL/6J farelerde beyin metastazı modeli oluşturduk. Fareleri kontrol ve Gamma Knife ile farklı doz ve fraksiyonlarda (15Gy, 3x7Gy, 5x5Gy) tedavi edilmek üzere dört gruba ayırdık. Her grupta sağkalım sürelerini ölçtük. Ölüm sonrası sakrifiye edilen beyinden sağlam ve tümörlü dokular ayrıldıktan sonra tümörlü dokulardan immünohistokimya ile radyasyona direnç ile ilişkisini ve farklı radyocerrahi tedavi şemalarının bu moleküller üzerine etkisini değerlendirmek için HSP90 ve YAP1 düzeylerini ölçtük. ELISA ile tümörlü ve sağlıklı beyin dokularında immün yanıtı değerlendirmek için CCL4 ve IL-17A seviyelerini analiz ettik. Toplanan tüm verileri istatistiksel açıdan karşılaştırdık.

15 Gy dozunda Gamma Knife tedavisi uygulanan grupta en fazla olmak üzere tedavi alan gruplar ile kontrol grubu arasında sağkalımda anlamlı fark saptadık. İmmünohistokimyasal analizde HSP90 ve YAP1 düzeyleri için gruplar arasında; ELISA ile de, CCL4 ve IL-17A düzeyleri için gruplar arasında ve her grupta sağlıklı beyin dokusu ve tümör dokusu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark tespit etmedik.

Stereotaktik radyocerrahinin immün yanıt üzerine etkinliği kanıtlanmış olsa da, özellikle beyin metastazlarındaki radyasyona direnç mekanizmalarının üstesinden gelmek için, radyocerrahinin etkin ve güvenilir doz ve fraksiyonasyonlarının belirlenmesi gerekmektedir. Bu bağlamda çalışmamızın, ileriki çalışmalara yol gösterici olacağını umuyoruz.

Anahtar kelimeler: gamma knife radyocerrahi, HSP90, YAP1, radyasyona direnç, immün cevap

## SUMMARY

In brain metastases, which is still the most important cause of morbidity and mortality in cancer patients, local tumor control rates decrease due to the immunosuppressive properties of tumor cells and their resistance mechanisms. It is now known that stereotactic radiosurgery is effective for brain metastases and primary brain tumors, in regulating the immune response and tumor microenvironment, but there is not enough information on the effect of hypofractionated radiosurgery on the immune system in brain metastases. In addition, studies investigating the relationship of heat shock proteins and Hippo pathway, which have proven roles in the formation of resistance to treatment in different cancer types, with radiation in brain metastases, and the effects of different radiosurgical doses and fractions on these molecules are limited.

For this purpose, we created a brain metastasis model in C57BL/6J mice with the B16F10 murine melanoma cell line. We divided mice into four groups; control and to be treated with Gamma Knife at different doses and fractions (15Gy, 3x7Gy, 5x5Gy). We measured survival times in each group. After separating healthy and tumor tissues from postmortem sacrificed brain, we measured HSP90 and YAP1 levels from tumor tissues to evaluate their relationship with radiation resistance and the effect of different radiosurgical treatment schemes on these molecules by immunohistochemistry. We analyzed CCL4 and IL-17A levels to assess the immune response in tumor and healthy brain tissues by ELISA. We compared all collected data statistically.

We found a significant difference in survival between the groups that received the treatment and the control group, the highest in the group that received 15 Gy Gamma Knife treatment. We did not detect a statistically significant difference in immunohistochemical analysis, between groups for HSP90 and YAP1 levels; with ELISA, between groups for CCL4 and IL-17A levels, and between healthy brain tissue and tumor tissue in each group.

Although the effectiveness of stereotactic radiosurgery on immune response has been proven, effective and reliable doses and fractions of radiosurgery need to be determined, especially in order to overcome the radiation resistance mechanisms in brain metastases. In this context, we hope that our study will guide further studies.

Keywords: gamma knife radiosurgery, HSP90, YAP1, radioresistance, immune response

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, gelişmiş ülkelerin halen kardiyak nedenlerden sonra ölüm istatistiklerinde ikinci sırada yer alan ve yaşamı tehdit eden bir hastalık olup metastazlar kansere bağlı morbidite ve mortalitenin en önemli sebebidir [1, 2]. Beyin metastazları ise erişkinlerde görülen en sık intrakraniyal tümör olmasının yanı sıra [6,7] çoğu kemoterapi ajanının kan beyin bariyerini geçememesi [1,4], lezyonun direk etkisi veya tedaviye sekonder bilişsel fonksiyonları ve yaşam kalitesini kötüleştirilmesi nedeniyle [6] önemli ve tedavisi güç bir sorun olmaya devam etmektedir. Tüm tedavilere rağmen ortalama yaşam süresi 26-32 haftadır [2]. Tedavi seçenekleri cerrahi, kemoterapi, tüm beyin radyoterapi (TBRT), stereotaktik radyocerrahi (SRC), immünomodülatörler ve bunların kombinasyonlarını içermektedir [30]. Yaşam beklentisi 3 aydan az olmayan hastalarda cerrahi rezeksiyon veya stereotaktik radyocerrahi gibi lokal agresif tedaviler önerilmektedir. Cerrahinin uygun olmadığı derin yerleşimi lezyonlara uygulanabilmesi, minimal invaziv, tekrarlanabilir olması, aynı seansta birden fazla lezyona uygulanabilmesi ve TBRT'ye göre bilişsel fonksiyonlarda çok daha az kötüleşme yapması nedeniyle SRC, günümüzde yaygın olarak kullanılan bir tedavi yöntemi olmuştur [2, 138, 163].

Kanserin moleküler biyolojisi ve biyokimyası hakkında edinilen bilgiler ve gelişmeler ile tümör ve metastaz oluşum süreci aydınlatılmakta ve bu süreçte görev alan hedef biyomoleküller ve yolların tespit edilmesi ile tedavi yöntemleri gelişmektedir. [32, 33]. Yeni ve etkin tedavi arayışları neticesinde, onkojenik sinyal yolları konusunda bilgiler artmış, kanser tedavisinde immün yanıtın ve tümör mikroçevresinin önemi, radyasyonun etki mekanizmaları daha iyi anlaşılmıştır. Bu gelişmeler aynı zamanda tümör hücrelerinin radyasyon ve kemoterapiye nasıl direnç geliştirebildikleri konusunda da bilgi sahibi olmamızı sağlamıştır [38, 201, 266].

Radyoterapi, kanser hastalarının genel sağkalımını ve yaşam kalitesini önemli ölçüde iyileştirmiş olsa da, radyorezistans nedeniyle etkinliği, önemli sayıda kanser hastasında hala belirgin şekilde sınırlandırılmıştır ve bu da tedavinin başarısız olmasına neden olmaktadır. Kanser hastalarında kemoterapi ve radyoterapiye direnç

gelişiminde rol alan farklı birçok mekanizma ve molekül tanımlanmıştır. Bunlar içerisinde Hippo yolağı ve ısı şok proteinleri (HSP'ler) de önemli bir yer tutmakta ve kanser tedavisinde umut vadeden bir çalışma alanı olmaya devam etmektedir. Hücre ve organ büyümesini, hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenleyen Hippo yolağının, aynı zamanda tümör oluşum sürecindeki onkogenik yolaklar ve tedavilere direnç oluşumunda da rolü mevcuttur. Bu yolağın düzenlenmesindeki sorunların, birçok kanserin progresyonunda önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Hippo yolağının temel efektörü olan Yes ilişkili proteinin (YAP1), tedaviye direnç gelişiminde rol oynamakta ayrıca kanser tedavisi ve prognozu için bir belirteç olarak kabul edilmektedir [280-285]. HSP'ler ise radyasyon gibi stres etkenleriyle uyarılan bir protein ailesi olup, hedef proteinlerin (onkogenler gibi); doğru katlanmasında, translokasyonunda, kararlı yapılarının korunmasında moleküler şaperonlar olarak işlev görürler. Özellikle yüksek HSP90 ekspresyonu, malignite olmak üzere birçok patolojik durumda gözlenmekte, kötü prognoz ve tedaviye direnç ile ilişkilendirilmektedir [297, 309].

YAP1 ve HSP90 kemoterapiye ve radyoterapiye direnç oluşturduğunu gösteren güçlü kanıtlar olmakla birlikte, bu proteinler için farklı ve etkin radyasyon doz-fraksiyon şemalarının radyo-direnç ile ilgili ilişkisini gösteren yeterli çalışma yoktur. Bu nedenle çalışmamızda farklı radyasyon doz ve fraksiyonasyonlarının, HSP90 ve YAP1 üzerine etkisini araştırarak; radyasyona direnç mekanizmalarının üstesinden gelmeyi amaçlayan, daha etkin, ve ileriki çalışmalara yol göstereci bir tedavi şeması oluşturmayı amaçladık. Bu amaçla B16F10 fare melanoma hücre serisi ile beyin metastazı modeli oluşturularak, farklı Gamma Knife tedavi protokollerini inceleyerek bunların radyasyon direncine olan etkisini araştırdık. Hipofraksiyone radyocerrahi tedavisinin YAP1 ve HSP90 düzeylerinde azalmaya neden olabileceği ve tümör hücrelerinde radyasyona duyarlılığı artıracığı öngörüldü.

## 2. BEYİN METASTAZI

### 2.1 Genel Bilgiler

Kanser, gelişmiş ülkelerin halen kardiyak nedenlerden sonra ölüm istatistiklerinde ikinci sırada yer alan ve yaşamı tehdit eden bir hastalık olup metastazlar kansere bağlı morbidite ve mortalitenin en önemli sebebidir [1, 2]. Kanser hastalarının yaklaşık üçte birinde beyne metastaz olduğu görülmektedir [3]. Beyin metastazı (BM) insidansındaki artışın nedeni; malignite hastalarında gelişen sistemik tedaviler ile yaşam süresinin uzaması, yaygınlaşan tanı testleri, kullanılan kemoterapi ilaçlarının kan beyin bariyerini (KBB) geçememeleri ve bu ilaçların bazılarının bu engeli geçici olarak bozmaları sonucunda malign hücrelerin beyne yerleşmesi olarak düşünülebilir [1, 4]. Beyin metastazı; santral sinir sistemi (SSS) dışından kaynaklanan kanser hücre veya hücrelerinin çoğunlukla hematogen yayılım olmak üzere lenfatik ya da komşuluk yoluyla intrakraniyal yayılım yaparak tümöral lezyon oluşturması olarak tanımlanabilir [5]. Beyin metastazları yetişkinlerde en sık görülen intrakranial tümörlerdir ve primer SSS tümörlerinden yaklaşık 10 kat fazla görülmektedir [6,7]. İntrakranial metastazlarda kalvaryuma, leptomeninkslere yayılım olabildiği gibi en sık olarak parankimal yayılım görülür [1, 8]. Parankimal metastazların %80-85'i serebrumda, %10-15'i serebellumda ve %3-5'i ise beyin sapında görülmektedir [6, 9]. Beklenen hayatta kalma süresi tanıdan sonra herhangi bir tedavi olmaksızın yaklaşık 1 aydır. Her ne kadar beyin metastazına neden olan kanser tipine göre farklılık gösterse de, hastaların yaşam süreleri; maksimum agresif tedavilere rağmen 12 aydan azdır [2]. Hastaların çoğu baş ağrısı, fokal güçsüzlük veya uyuşukluk, bilişsel bozukluk veya nöbet gibi nörolojik semptomlarla başvurur [6].

SSS metastazları, çoğu konvansiyonel kemoterapinin KBB'ye nüfuz etme kabiliyeti sınırlı olduğundan, cerrahi veya radyoterapötik seçenekler dahil olmak üzere sıklıkla fokal tedavi gerektirir. Bu hastalarda metastatik beyin tümörünün tedavisinin temel amacı, beyindeki hastalığı kontrol altına almak, nörolojik hastalıktan ölümü önlemek

ve tatmin edici bir yaşam kalitesi sağlamaktır [2]. Bununla birlikte, beyin metastazlarının farmakolojik tedavisi, moleküler ve genomik tümör profiline dayalı immünoterapilerin ve hedefe yönelik tedavilerin ortaya çıkması nedeniyle son yıllarda gelişme göstermektedir.

İntrakranial metastaz saptanan erişkin hastalarda en sık görülen primer malignite akciğer kanseridir. Bunun dışında meme, malign melanom, renal ve gastrointestinal sistem maligniteleri beyne sık metastaz yaparlar [6]. Meme kanseri, jinekolojik ve gastrointestinal sistem malignitelerine bağlı BM'ler genelde tek lezyon görülmektedir. Renal hücreli karsinom ve malign melanom daha sık olmak üzere tiroid papiller karsinomu ve akciğer kanseri hemorajik metastaz yapma eğilimindedir [5, 10-12].

## 2.2 Epidemiyoloji

Erişkin sistemik kanserli hastaların yaklaşık %20-40'ında hastalığın seyri boyunca beyin metastazı gelişme olasılığı vardır, otopsi serilerinde ise bu oran daha da artmaktadır [6, 13-15]. Beyin metastazlarının sıklığına ilişkin yayınlanmış veriler büyük farklılıklar göstermektedir. Son yıllarda, bildirilen beyin metastazı sıklığı, bir artış eğilimine girmiştir, ancak bu eğilimin beyin metastazlarının insidansındaki gerçek bir artıştan mı yoksa daha doğru raporlamadan mı kaynaklandığı da belirsizdir. Epidemiyolojik çalışmalar, hastalığın ciddiyetini, tedavideki ilerlemelerin etkisini anlamak ve kaynakların uygun şekilde kullanılmasını sağlamak için önemlidir [16]. Beyin metastazlarının insidansını etkileyen ana faktör, primer tümörün histolojisidir. Primer kanserin sıklığını ve tipini etkilediği için yaşla beraber beyin metastazı insidansı artmaktadır, cinsiyet dağılımında ise anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ortalama yaşam süresi, esas olarak primer tümöre (alt) tipine, metastaz sayısına, ekstrakraniyal diğer yayılımlara bağlı olarak değişmekle birlikte yaklaşık 4 ila 14 aydır [17,18]. 5 yıllık ortalama sağkalım oranı ise sadece %2.4'tür [19].

Yapılan bir çalışmada BM yıllık insidansı 100.000'de 7-14 kişi olarak saptanmıştır [1]. BM insidansı yaşla beraber artmakta; 25 yaş altında insidans 100.000'de 1'den az iken, 60 yaş üstünde insidans 100.000'de 30'dan yukarı çıkar [20]. Primer malignite ve histolojik tipi de BM oluşma riski ve metastaz paterni ile doğrudan ilişkilidir. Küçük hücreli akciğer karsinomu (KHAK), malign melanom, koryokarsinom ve diğer germ hücreli tümörlerde BM olasılığı en yüksek iken; meme kanseri, küçük hücreli dışı akciğer karsinomu (KHDAK), renal karsinom gibi tümörlerde BM riski orta düzeyde,

prostat karsinomu, gastrointestinal sistem kanserleri, over kanserleri, tiroid kanserleri ve sarkomlarda ise risk görece daha düşüktür. BM'ler %50–60 akciğer, %15–20 meme, %5–10 deri ve %4–6 gastrointestinal sistem kaynaklıdır [6, 21]. Bununla birlikte histopatolojik olarak metastaz tanısı alan hastaların %15'inde malignite kaynağının saptanılmadığı gösterilmiştir [6]. Kanser hastalarının %4 ila %15'inde 'karsinomatozis menenjitis' olarak isimlendirilen BOS yayılımı da olabilmektedir. Çocuklarda beyne metastaz görülme olasılığı %6-10 oranında saptanmıştır. Lösemiden köken alan metastazlar en sık olarak görülmekteyken, lenfomalar ikinci sıradadır, germ hücreli tümörler, rabdomyosarkom, osteojenik sarkomda da çocuklarda beyne metastaz görülebilir [22, 23]. Çoğu kanser hastasında beyin metastazları geç evre bulgusudur. Kanser hastalarının yalnızca küçük bir oranının (%1.7), primer kanser teşhisi sırasında senkron (eş zamanlı) BM ile başvurduğu gösterilmiştir. Bunlar içinde de en fazla senkron metastaz görülenler; KHAK (%15,1) ve KHDAK'dır (%10,7) [24]. Primer tümör tipine göre beyin metastazı insidansı ile ilgili veriler aşağıda mevcuttur ( Tablo 2.1).

**Tablo 2.1 :** Primer tümör tipi, klinik olarak tespit edilen beyin metastazlarının yüzdesi [3].

Primer kanser	Toplam	Beyin metastazı	%	1 yıl içinde tanı alan	%
Akciğer	938	156	17	142	91
Meme	802	42	5.2	8	19
Melanom	150	12	8	6	50
Renal hücreli	114	56	10.5	6	50
Kolorektal	720	10	1.4	4	40
Toplam	2724	232	8.5	166	71.6

Gelişmiş nörogörüntüleme teknikleri ve uzun süreli sağkalım ile sonuçlanan sistemik kanser tedavileri nedeniyle BM'lerin insidansı artmaktadır. Kesin insidans bilinmemekle birlikte, insidans oranları; primer tümör tipine, farklı alt tiplerine göre büyük ölçüde değişmektedir. Ayrıca, farklı tümör ve tümör alt tiplerine bağlı; beyin metastazlarının sayısı, lokalizasyonu ve oluşumu için geçen süre değişkenlik gösterir. Altta yatan hastalığın prognozu tedaviye karar vermede kritik bir faktör olduğundan, epidemiyolojik verileri bilmek tedaviyi şekillendirmede yol gösterecektir.

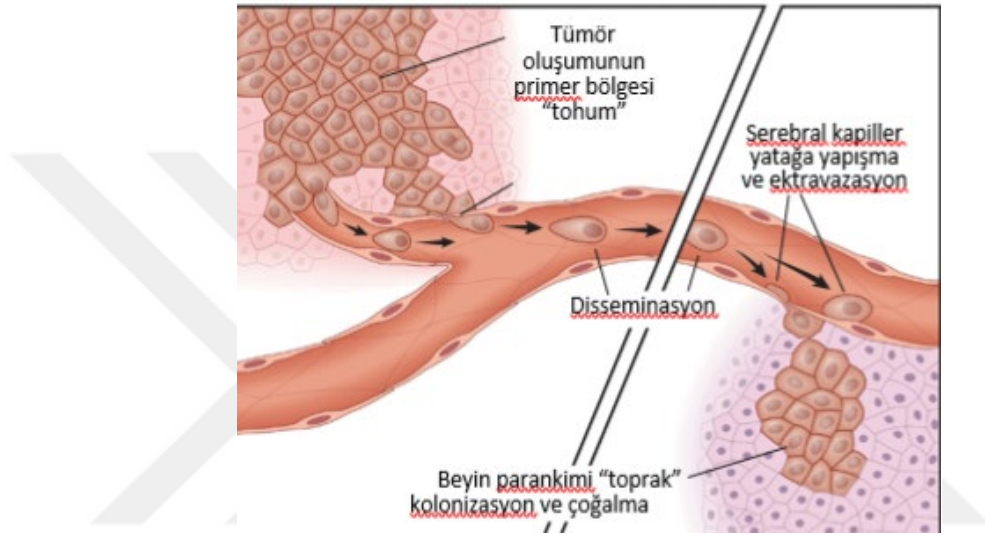
### 2.3 Histopatoloji ve Moleküler Mekanizmalar

Tümör hücrelerinin genetik heterojenitesi nedeniyle, metastaz oluşturma kabiliyeti ve ihtimali de değişkendir. Primer kanser dokusunun stromal yapılanmasını aşan neoplastik hücreler; hipoksi, yetersiz enerji kaynağı, hipoperfüzyon, immün sistemi gibi çevresel zorluklara rağmen uzak bölgelere metastaz yapabilirler [15, 25, 26]. İntrakranial metastazlarda en sık görülen yayılım mekanizması, hematojen yayılım olup arteriyel sistem ile gerçekleşir, daha az oranda direkt invazyon yoluyla da meydana gelebilir [27]. SSS'nin direkt invazyonu tipik olarak perinöral veya perivasküler ekstansiyon ile ortaya çıkan, çoğunlukla primer baş ve boyun tümörlerinin tercih ettiği yayılma yoludur. Metastazlar arteriyel sulama alanı kesişim bölgeleri olan 'watershed' alanlarda, gri-beyaz cevher bileşkesindeki subkortikal alanlarda yerleşirler. Özellikle orta ve arka serebral arterlerin karıştığı bölgelerle, ön ve orta serebral arterlerin beslenmesinin karıştığı bölgelere daha sık yerleşirler. Emboli gibi neoplastik hücreler de çapı küçülen kapiller yatağa takılarak invazyona başlar [9, 27]. İnvazyon sonucu metastatik hücreler KBB'yi bozarak parankim içerisine yerleşir. Pelvik ve gastrointestinal sistem kaynaklı tümörler genel olarak Batson pleksusu yoluyla posterior fossaya metastaz yapma eğilimindedir [6].

BM'lerin makroskopik özelliklerine bakıldığında çoğunlukla düzgün sınırlı, 'watershed' alanlara invazyon gösterdiği için de korteks-subkorteks ayırımına yerleşen çevre parankimde kitle boyutuna oranla daha geniş bir ödem alanının izlendiği lezyonlar olarak görülmektedir [12]. Çevre parankimle olan makroskopik ayrımı çoğunlukla histopatolojik incelemelerde de aynı şekilde görülmekte ve normal tümöral doku ayrımı net sınırlar dahilinde olmaktadır. Patolojik incelemelerde, BM'ler orjin aldığı kanserin histolojik özelliklerini göstermesinin yanı sıra santralinde genelde nekroz alanı görülmektedir [28]. Beyin parankimini tek hücresele düzeyde infiltrate etmek yerine, Virchow-Robin boşluklarını hücresele gruplar halinde infiltrate ederek, nöroglial doku destrüksiyonu ile birlikte gliosis, inflamasyon ve mikrovasküler proliferasyon gibi reaktif değişikliklere neden olurlar [12,28]. İmmunohistokimyasal incelemelerde de, metastatik lezyonlar genellikle köken aldıkları primer tümörlere benzer özellikler gösterir [12].

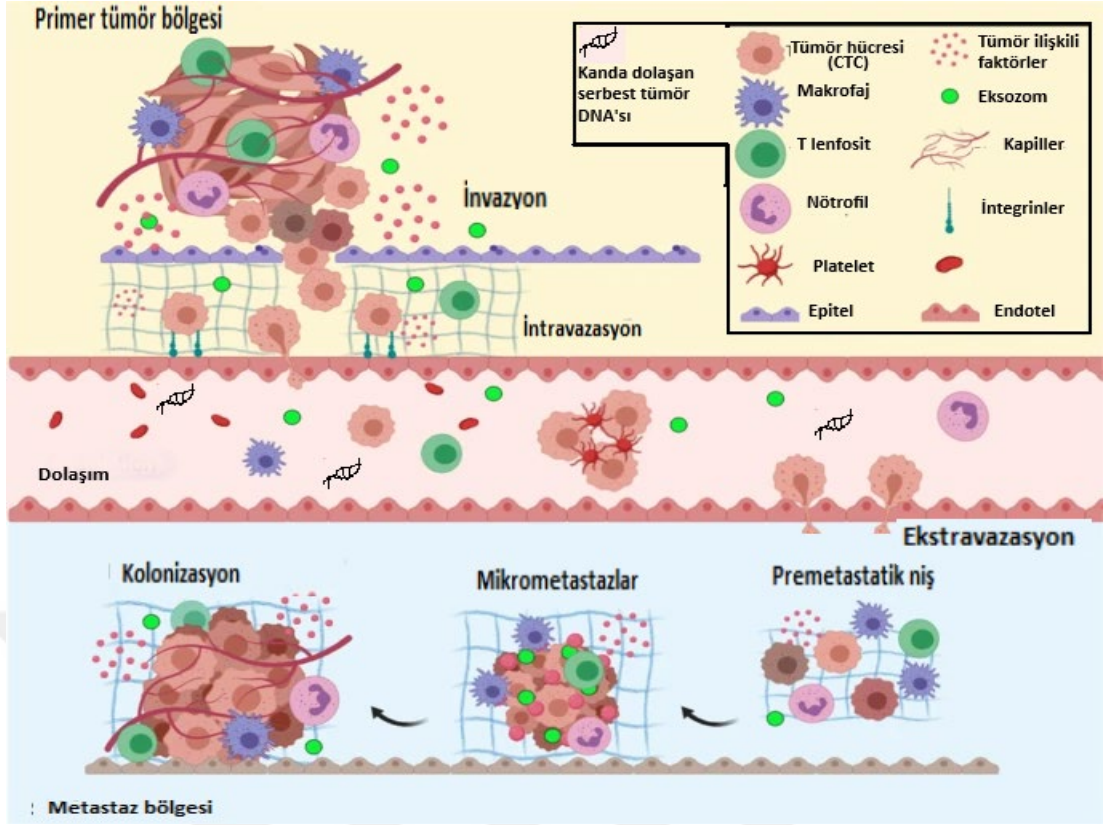
1888 yılında Bramwell beyinde metastaz oluşumu konusunda görüşünü ''*vücutta başka hiçbir durumda bu kadar çeşitli tümörlerle karşılaşmadığını, hassas ve*

*yumuşak beyin dokusunun yeni oluşumlar için besleyici bir zemin hazırladığını"* diyerek belirtmiştir [29]. Takip eden yılda Stephen Paget, beyin metastazlarının oluşumunun rastgele olmadığını; tümör hücrelerinin (tohum), belirli dokulara (toprak) yerleştiğini “*tohum-toprak*” hipoteziyle savunmuştur [30]. Bu hipoteze göre neoplaziler farklı karakterdeki hücrelerin heterojen alt gruplarından oluşmaktadır, sadece belli hücre alt grupları hayatta kalma, çoğalma ,invazyon ve göç kabiliyetine sahiptir. Kolonizasyon ise bu hücre gruplarının hedef organdaki mikroçevreyle olan iletişimine bağlıdır [30, 31]. (Şekil 2.1)



**Şekil 2.1 :** Beyin metastazı oluşum sürecinin şematizasyonu [33].

Çok aşamalı karsinogenez modelinde; ilk olarak onkojenik değişimlere bağlı hücre-tümör dönüşümü başlar. Bu değişimler; tipik olarak tümör supresyonunu düzenleyen DNA alanlarındaki metilasyona yol açan karsinojenler tarafından oluşturulan mutasyonlardır. İkinci olarak spesifik kanser hücre yolakları ile tümör gelişimi devam eder, mikroçevresel faktörlere bağlı malign dönüşüm olur ve son olarak metastatik süreç başlar. Bir metastazın gelişebilmesi için malign hücrelerinin primer lezyondan ayrılıp, çevre dokuya invazyonu ile başlayan seçici, ardışık ve karmaşık bir dizi süreci tamamlaması gerekmektedir. Bu süreci kısaca migrasyon ve kolonizasyon olarak ayırabiliriz [32]. Migrasyon süreci malign hücrelerin daha geçirgen olan tümöral damar endotelleri yoluyla kan dolaşımına geçişi (intravazasyon); dolaşım sisteminde immün sistemden ve mekanik etkilerden kaçarak beyne kadar ulaşması (disseminasyon); beyin mikrodamarlarında endotel hücrelerine adezyonu ve perikapiller alana geçişi (ekstravazasyon) içerir (Şekil 2.2).



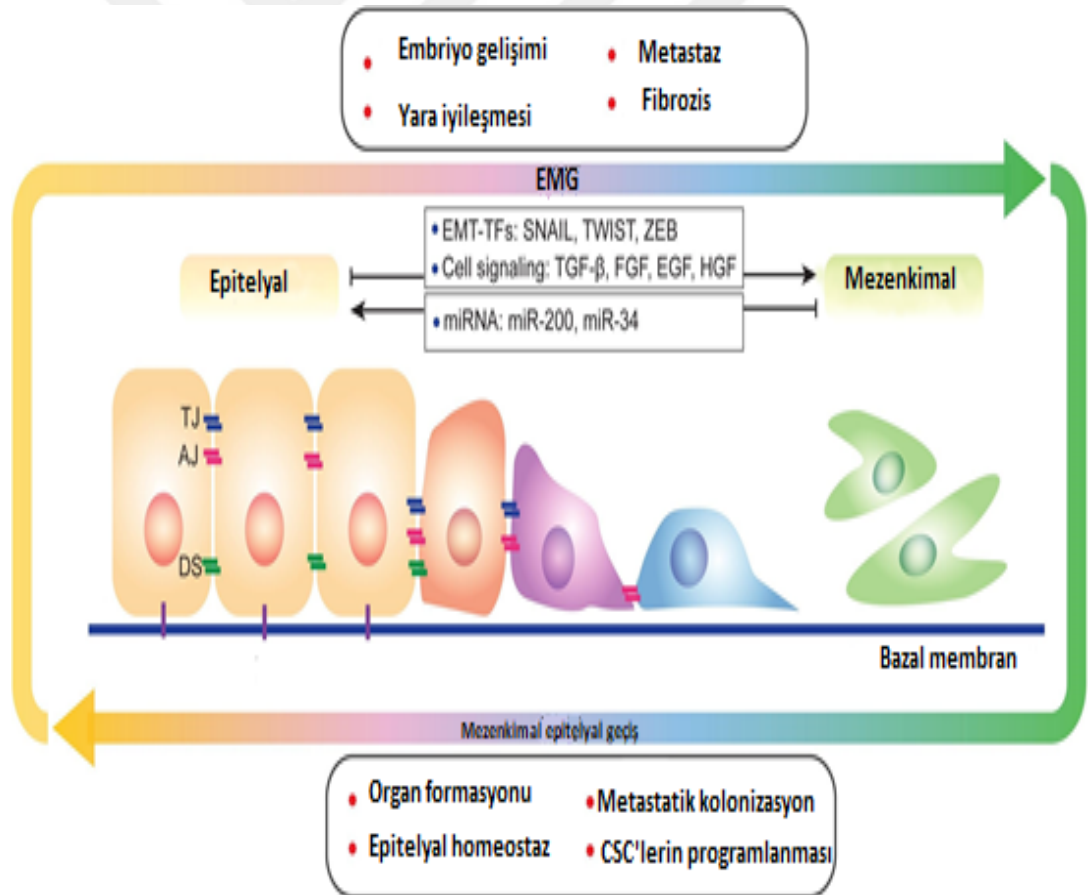
Şekil 2.2 : Beyin metastazı oluşum süreci ve hücreler [35]. (düzenleme yapılmıştır)

### 2.3.1 Epitelyal mezenkimal geçiş

Metastaz sürecinin kavramsallaştırılmasında büyük bir ilerleme, ilk olarak Elizabeth Hay tarafından metastatik kaskadın ilk aşaması (intravazasyon) için gerekli olan hücresel fenotiplerin farkına varılmasıyla ve bu aşamayı epitelyal mezenkimal geçiş (EMG) olarak adlandırması ile olmuştur [34]. Bu süreci başlatan uyarılar, çeşitli gen mutasyonları ve büyüme faktörleri olabilir [25]. Öncelikle epitelyal hücrelerden (kanser kök hücresi) transkripsiyon faktörlerinin salınımı ile başlar ve böylelikle epitelyal hücreler; çevre dokulara invazyon ve yayılım kabiliyeti olan, proliferatif sinyalleri ve anjiyogenezi uyarma özelliği olan, apoptozise ve hücre çoğalmasını inhibe eden faktörlere karşı dirence sahip, sürekli bölünebilen mezenkimal türevlerine dönüşür [25, 33]. (Şekil 2.3)

Kanser hücreleri yüksek hücresel proliferasyonu sürdürmek için belirli onkogenleri değiştirir ve düzenler (Tablo 2.2). Ras geni buna örnektir. Ras mutasyonu, tüm insan tümörlerinin yaklaşık %30'unda meydana gelmektedir. Ras genindeki bir mutasyon, MAP kinaz yolunu etkiler ve çeşitli hücre tiplerinde hücresel proliferasyonda ciddi bir artış sağlar. Diğer bir örnek PI3-kinaz (fosfotidil inozitol-3 kinaz) yoludur. PI3-kinaz yolu içindeki genlerdeki mutasyonlar, yüksek hücresel proliferasyona ve apoptozise

dirence neden olur. Protein 53 (p53) gibi tümör supresör genlerdeki mutasyonlar sayesinde ise hasarlı hücre çoğalmaya devam eder [33]. Tümör hücreleri antiapoptotik düzenleyicilerin artmış ekspresyonu (Bcl-2, Bcl-xL) ve proapoptotik faktörlerin (Bax, Bim ve Puma) azalmış üretimi ile apoptozise direnç oluştururlar [32, 33]. DNA metilasyonu, histon modifikasyonu, telomeraz üretiminde artış gibi genetik mutasyonlar ile de hayatta kalma kabiliyetlerini artırır [25]. EMG aşamasında tümör büyüme faktörü beta (TGF $\beta$ ) epidermal büyüme faktörü (EGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) salınımı; ZEB1/2, SNAIL, SLUG, TWIST1 gibi transkripsiyon faktörleri; Wnt, PI3k/AKT, Hedgehog yolları ve Notch sinyal ailesi büyük rol oynamaktadır [25, 32, 33, 35, 36]. TGF $\beta$  ayrıca fibronektin ve vimentin ekspresyonunu artırır [25]. TWIST1 meme epitelial karsinom hücre ekstrasvasyonu için kritiktir ve çok sayıda kanser için metastatik kapasite ile ilişkilendirilmiştir [37].



**Şekil 2.3 :** Beyin metastazı sürecinde epitelial (E)-mezenkimal (M) geçişin moleküler mekanizması [36].

**Tablo 2.2 : Artmış metastaz potansiyeli ile ilişkili genler [33].**

Genler	Primer Kanser	Rolü ve etkisi	OMIM numarası	Kromozom lokasyonu
<i>RHoC</i>	Melanom	Morfogenez sırasında aktin hücre iskeletinin yeniden şekillenmesini düzenler. Tümör hücre invazyonunda rol oynar.	165380	1p21-p13
<i>LOX</i>	Meme, baş ve boyun kanserleri	Hücre-matriks yapışması ve fokal adezyon kinaz aktivitesi yoluyla hipoksik kanser hücrelerinin invazyonunu artırır.	153455	5q23.1-q23.2
<i>VEGF</i>	Akciğer, meme, melanom, kolon	Anjiyogenik büyüme faktörüdür, İnhibisyonu ile beyin metastazı oluşumunu azaltır; kan damarı oluşumunu ve hücre çoğalmasını azaltır; apoptozu artırır.	192240	6p21.1
<i>CSF1</i>	Meme, akciğer	Makrofaj proliferasyonunu ve ardından büyüme faktörlerinin salınımını uyarır.	120420	1p13.3
<i>IDI</i>	Meme, akciğer	Matriks yeniden şekillenmesinde, hücre içi sinyalleşme ve anjiyogeneze rol oynar.	600349	20q11.21
<i>TWIST1</i>	Meme, Gastrik, Rabdomiyosarkom, melanom, hepatosellüler	E-kaderin aracılı hücre-hücre adezyonu kaybına neden olur, mezenkimal belirteçleri aktive eder ve epilyal-mezenkimal geçişi uyarak hücre hareketliliğini indükler.	601622	7p21.1
<i>MET</i>	Renal hücreli kanser	Mitogenez, morfogenez ve motogenezden gibi çeşitli biyolojik aktiviteleri etkiler.	164860	7q31.2
<i>MMP-9</i>	Kolorektal, meme, melanom, kondrosarkom	Hücre dışı matriks bozulması, doku yeniden şekillenmesi.	120361	20q13.12
<i>NEDD9</i>	Melanom	Metastatik potansiyelin kazanılması.	602265	6p24.2
<i>LEF1</i>	Akciğer	Beyin metastazı için WNT yolağında transkripsiyonel efektör; kolonizasyonu azaltır; in vitro invazyonu azaltır.	153254	4q25
<i>HOXB9</i>	Akciğer, meme	Homeobox gen ailesi; embriyonik segmentasyon için kritik; in vivo beyin metastazını engellemektedir.	142964	17q21.32
<i>BMP4</i>	Akciğer, kolorektal	Embriyonik gelişimde önemli bir rol oynar ve epilyal-mezenkimal geçişin önemli bir bileşenidir.	112262	14q22.2
<i>STAT3</i>	Melanom	Hücre sinyal transkripsiyon faktörü, azalması beyin metastazını bastırır; in vivo anjiyogenezi ve in vitro hücre invazyonu azaltır.	102582	17q21.2

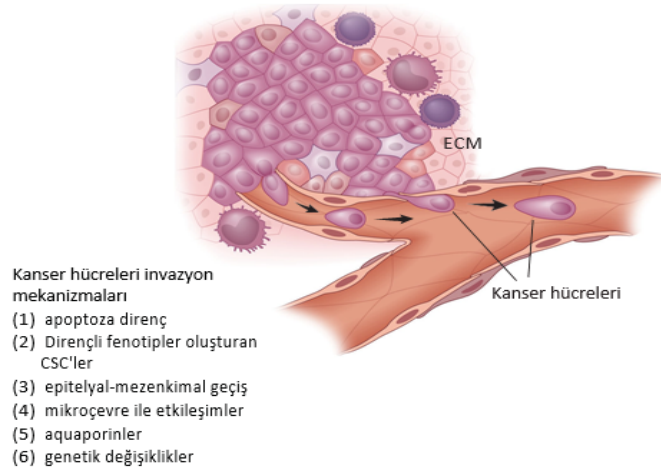
OMIM numarası: Bu genler, protein ürünleri ve potansiyel işlevleri için ayrıntılı bilgi ve referanslar sağlayan Online Mendel Kalıtım Kimliği (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [33].

### 2.3.2 Tümör stroması ile etkileşim

Kanser hücreleri progresyon aşamasında parakrin sinyalleri ile endotel hücreleri, perisitler, fibroblastlar ve lökositler gibi çevre bağ dokusu hücreleri etkileşime geçer. Bu hücreler büyüme faktörleri, hormonlar ve tümör proliferasyonunu destekleyen sitokinleri salgılar [25]. Özellikle kanser ilişkili fibroblastların yüksek miktarlarda TGF $\beta$ , HGF, EGF, FGF, stromal kaynaklı 1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ) ve interlökin-6 (IL-6) gibi sitokinleri eksprese ettiği bilinmektedir [38, 39]. Kanser dokusu belirli bir hacme ulaştıktan sonra enerji ihtiyacını sağlayabilmek ve çoğalabilmek için neovaskülarizasyonu uyaran vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) salgılar ve çevre stroma hücreleri ile iletişimi artar [38].

### 2.3.3 Lokal invazyon

Tümör hücrelerinin dolaşıma ulaşması için endotel bazal membranını aşması gerekmektedir bunu temel olarak iki yolla sağlar (Şekil 2.4). Birincisi, hacmi artan tümöral dokunun çevre bağ dokusu ve endotellere yaptığı bası sonucu bazal membranın incelmesidir. İkincisi ise tümör hücrelerinin koloni stimüle edici faktör 1 (CSF1) salgılayarak çevre makrofaları uyarmasıdır. Uyarı sonrası MAP kinaz yoluyla aktivasyonu sağlanır, hücreler bazal membran invazyonu ve immünitiden kaçmak amacıyla matriks-metalloproteinaz (MMP) ile yüzeyindeki hücre polaritesini düzenleyen, hücre-hücre yapışması için aracı olan adezyon moleküllerinden kurtulur [40-42]. Bunu integrin ve aderan moleküllerdeki değişikliklerle sağlar; E-kaderin, N-kaderin'e dönüşür ve hücre hareket kabiliyeti kazanır. MMP'ları metastaz sürecinde ekstrasellüler matriks (ESM) yıkımındaki işlevleri iyi bilinen 20 proteolitik enzim içeren bir komplekstir. Üretimleri, sitokin, kemokin ve tümör hücre yüzeyinde bulunan ESM metalloproteinaz aktivatör ile düzenlenmektedir. Aktivasyon ile ESM yıkımı ve tümör hücrelerinin migrasyonu hız kazanır. MMP düzeyinin, kanserin invaziv ve metastaz yapma özelliğiyle ayrıca kötü prognoz ile korele olduğu gösterilmiştir [43-45]. MMP-2 aktivitesinin sağkalımla ters orantılı olduğu gösterilmiştir [43]. Malign hücreler çevresindeki immün hücrelerden salınan kemokin ve sitokinlerle, stroma ve ESM'yi bozarak VEGF salınımını artırır ve migrasyona başlar. E-kaderin promoter bölgesindeki deoksiribonükleik asit (DNA) hipermetilasyonu ile ekspresyonun bozulması veya tamamen ortadan kalkması, çoğu metastatik kanserde sıkça karşılaşılan bir bulgudur [42, 46].



**Şekil 2.4 :** Kanser hücrelerinin invazyon mekanizmaları [33].

İntegrinler, migrasyon ve invazyon da rol oynayan ekstrassellüler matriksi hücresel yapıya bağlayan sinyal reseptör proteinleridir. Çeşitli sinyal iletim yollarını tetiklerler ve hücre iskeleti organizasyonunu, spesifik gen ekspresyonunu düzenler; büyümeyi ve apoptozisi kontrol ederler [45]. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri üzerine yapılan hayvan modellerinde  $\alpha\beta1$  integrin blokajının BM oluşumunu önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Ek olarak, Carbonell ve ark. tarafından yapılan çalışmada  $\beta1$  integrin alt birimi blokajının metastaz gelişimini azalttığı saptanmıştır [47]. Nörotrofinler (NT'ler), bir ESM proteolitik enzimi olan heparinaz üretimini artırarak beyin metastazı gelişmesine zemin hazırlar. Heparinaz, ESM ve KBB'deki heparin sülfatı parçalayan bir enzimdir [15]. Melanomlarda tümör-beyin arayüzündeki NT'lerin varlığı ve BM'lerde NT p75 reseptörünün rolü gösterilmiştir [48]. Ürokinaz tipi plazminojen aktivatör (uPA) sistemi de lokal invazyonda rol oynamaktadır. uPA, CD87 reseptörüne bağlanarak ürokinaz aracılığıyla plazminojeni plazmine dönüştürür. uPA seviyesinin metastatik tümörlerde fazla olduğu ve sağkalımla ters orantılı olduğu gösterilmiştir [49]. Ayrıca aquaporin adı verilen protein ailesi de migrasyonda önemli rol oynamaktadır. Beyne özgü meme metastazı üzerine yapılan çalışmalarda, meme kanserinde görülen ve potasyum kanalı ile ilişkili bir gen olan KCNMA1'in ekspresyonun arttığı, invazivlik ve transendotelyal geçişte rol oynadığı gösterilmiştir [50]. Tümör süpresör ve promotor genlerin de migrasyon ve intravazasyonda önemi bilinmektedir. Bunların en iyi bilineni 1. kromozomdaki gen KiSS1'dir. KiSS1 ekspresyonun melanom ve meme metastazını baskıladığı görülmüştür [51]. (Tablo 2.3).

**Tablo 2.3 : Metastaz ve invazyonda süpresör genlere örnekler [33].**

Genler	Primer kanser	Rolü ve etkisi	OMIM numarası	Kromozom lokasyonu
<i>NM23</i>	Meme, kolon, melanom	Bir histidin kinaz. Nm23, KSR'yi fosforile eder ve ERK 1/2 aktivasyonunun azalmasına neden olabilir. Normal gelişim ve farklılaşmada rol oynadığı görülmektedir.	156490	17q21.3
<i>MKK4</i>	Meme, over ve prostat	p38 ve Jun (JNK) kinazlarını fosforile eden mitojenle aktive olan bir protein kinaz (MAPKK).	601335	17p11.2
<i>BRMS1</i>	Meme, melanoma	Gap-junction iletişimde işlev görür.	606259	11q13.1-q13.2
<i>KiSS1</i>	Meme, melanom	Metastin olarak da bilinen bir G-proteinine bağlı reseptör ligandı.	603286	1q32
<i>KAI1 (CD82)</i>	Mesane, meme, akciğer, pankreas ve prostat	Beta-katenin-reptin ve histon deasetilazlarla etkileşime girer. Kangai olarak da bilinen EGFR aktivitesini duyarısızlaştırabilir	600623	11p11.2
<i>CD44</i>	Meme, kolon, akciğer, melanom, prostat	Hücre adezyonunu etkileyen hücre iç zarı zarı glikoproteini.	107269	11pter-p13
<i>CRSP3</i>	Melanom	Faktörü Sp1 ile çalışan transkripsiyonel koaktivatör.	605042	
<i>RHOGDI2</i>	Mesane, Meme, kolon, böbrek, karaciğer, akciğer ve prostat	Ras süper ailesinin GTP bağlayıcı proteinleri olan Rho ve Rac'in işlevini düzenler.		11p11.2
<i>VDUP1</i>	Melanom	Tioredoksin inhibisyonu yoluyla çalışan transkripsiyon faktörü.	606599	1q21
<i>PTEN/MMAC1</i>	Meme, kolon, endometriyal, germ hücreli, böbrek, akciğer, melanom ve tiroid	Fokal adezyonlarda aktin filamentleri ile etkileşim yoluyla invazyon ve metastaza yol açan hücre iskeleti homologue	601728	10q23.31
<i>VHL</i>	Renal hücreli, feokromasitoma, hemangioblastom	Mikrotübül stabilitesi, oryantasyonu, tümör baskılanması, silia oluşumu, sitokinlerin sinyal ve hücre dışı matriks oluşumunda önemli rol oynayan protein ürünlerini kodlar.	608537	3p25.3
<i>TIMP2</i>	Melanom	Proteaz inhibitörü, aşırı ESM bozulmasını önlemede rol oynar.	188825	17q25.3
<i>SMAD4</i>	Pankreas, kolorektal ve prostat	Transkripsiyon faktörü, TGFβ'nin sinyal iletiminde önemli rol oynar	600993	18q21.2
<i>RRM1</i>	Akciğer	Hücre döngüsü düzenleyicisi.	180410	11p15.4
<i>PTPN11</i>	Akciğer, kolon, tiroid ve melanom	Hücrelerin tirozin fosfatasını, çoğalmasını, farklılaşmasını, hareketliliğini ve apoptozunu düzenler.	176876	12q24.1
<i>CDH1</i>	Gastrik, meme	Hücrel bağlantı proteinlerini yapılandırır.	192090	16q22.1
<i>CASP8</i>	Gastrik, meme, akciğer ve PNET	Aspartata özgü sistein proteazları yoluyla apoptotik kaskada rol oynar	601763	2q33

Tanımlar: EGFR: epidermal büyüme faktörü; ERK: ekstrasellüler sinyal ilişkili kinaz; JNK: Jun-terminal kinaz; KSR: Ras'ın kinaz baskılayıcısı. OMIM numarası: Bu genler, protein ürünleri ve potansiyel işlevleri için ayrıntılı bilgi ve referanslar sağlayan Online Mendel Kalıtım Kimliği (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [33].

Epitelyal mezenkimal geçiş sürecine dahil olan adezyon moleküllerini ve migrasyondan sorumlu proteinleri düzenleyen birkaç mikroRNA mevcuttur. Özellikle yapımı TGF $\beta$  tarafından baskılanan miR-200 ailesinin EMG’de büyük rolü olduğu gösterilmiştir. Beyin metastazına neden olan primer tümörler üzerine yapılan bir çalışmada miRNA düzeyinin %80 oranında primer tümörü doğru gösterdiği saptanmıştır [16].

#### **2.3.4 Disseminasyon ve ekstrasvazyon**

Malign hücreler kendi mikroçevresini aşıp damar ya da lenfatiklere ulaştığında birçok stres faktörünün olduğu bir ortamda varlığını idame etmek zorundadır. Malign hücreler; hücre iskeletlerini güçlendirerek ve damar duvarına yapışma kabiliyeti kazanarak bu ortama direnç oluşturur. Ayrıca tümör hücreleri, makrofajlara ait; morfolojik görünüm, fagositoz gibi özellikleri barındırmakta ve makrofajlarca üretilen ve salınan farklı genleri kodlamaktadır. Bunun neticesinde, bu özellikleri kazanan ile tümör hücreleri immün sissem hücrelerini taklit edip; bağışıklık sistemine karşı saklanmakta ve dolşaim sisteminde seyrine devam edebilmektedir. Hedef doku endoteline yapışırken de malign hücreler immün sistem hücreleri gibi davranarak yalancı ayakıklar oluşturarup hücre ve hücreler arası bağlantılara tutunabilmektedir [52, 53]. Fare beyin metastazı modeli üzerine yapılan bir çalışmada; makrofaj gibi davranan malign hücrelerin damar içinde ve ekstrasvazyon sırasında normalde makrofajlara özgü proteinler olan CD11b, Iba1, F4/80, CD68, CD45, CXCR eksprese ettikleri görülmüştür [54]. İlave olarak, malign hücreler taşıdıkları yüzey doku proteinleri nedeniyle trombositleri kendisine çekerek yapışır ve sonuç olarak bu da onları immün sistemden korumaktadır [52]. Artmış tümör nekroze edici faktör alfa (TNF $\alpha$ ) salınımı, endotel hücresinde E-selektin ve P-selektin salınımını uyararak hücrenin damar duvarına yapışmasına olanak sağlar. Endotele adezyon yaparak kümeleşen tümör hücresi ve tümör ile ilgili faktörlerin ekstrasvazyonu, çoğunlukla lokal proinflatuar veya hipoksik bölgelerde gerçekleşir [45, 46]. Genelde hücrelerin embriyolojik olarak aynı orijinden kaynaklandığı organlara metastaz yaptığı düşünülmektedir. rnek vermek gerekirse; nöral krestten kökenli melanomaların leptomeninkslere metastaz yapması, kolorektal karsinomda metastaz oluşumunda rolü olduğu gösterilen gen ile serebellum gelişimindeki genin (SNAI1 ve SNAI2) aynı olması ve kolorektal karsinomların metastazlarının daha sıklıkla serebellumda görülmesi bu hipotezi desteklemektedir [55].

Primer ve metastatik kitleden kan dolaşımına bazı hücreler salınır, bunlara kanda dolaşan tümör hücreleri (CTC) denir ve metastaz ve hastalığın relapsından sorumlu oldukları düşünülmektedir. CTC'lerin detaylı analizi primer kanser hakkında detaylı bilgi verebilir [56, 57]. Bu hücreler hızla makro-metastazlar oluşturmak için uzak bölgelere kolonize olur veya aylar, yıllar sonra makro-metastazlar oluşturmak için metastatik nişlerde uyuyan kanser hücreleri olarak kalırlar. CTC'ler yalnızca birincil tümör bölgesinden değil, aynı zamanda uzak makro metastazlardan da kaynaklanabilir (Şekil 2.2). Bu hücreler kanser hastalarının çoğunda kısa ömürleri nedeniyle rutin olarak gösterilememesine rağmen; flow sitometri, mikrofluid cihazları gibi çeşitli tekniklerle hasta kanından izole edilebilmektedir [16, 56, 57]. Ancak az sayıda CTC'ler bile DNA, RNA ve proteinler gibi tümör kaynaklı biyobelirteçleri barındırır. Periferik kandaki yüksek CTC sayıları; hastalık yükü, kötü sağkalım ile ilişkilidir [58]. Kandaki hücrelere özgü epitelyal marker (epitelyal hücre yapışma molekülü=Epcam), mezenkimal marker gibi belirli antikorlar kullanılarak elde edilirler. Bu konuda meme kanseri üzerine yapılan bir çalışmada beyin metastazı ile ilişkili 121 gen imzası belirlenmiştir [59]. BM'lerde yapılan likid biyopsiler, CTC'lerin saptanmasının dışında eksozomların ve dolaşımdaki tümör DNA'sı (ctDNA) profilinin çıkarılmasına da olanak sağlamaktadır.

### **2.3.5 Eksozomlar**

DNA, RNA, proteinleri ve lipidleri içeren kanser hücreleri tarafından salgılanan hücre dışı veziküllerdir. Eksozomlar, primer ve metastatik tümörler içinde lokal olarak ayrıca metastatik bölgelere dolaşım yoluyla giderek işlev görür [60]. BM'lerde; EMG, anjiyogenez, metastaz, tedavi direnci ve epigenetik/kök hücre düzenlemesi gibi çok sayıda biyolojik sürecin indüklenmesinden sorumludurlar. Tümör büyümesi, evrimi ve patogenezi hakkında bilgi verdikleri için likid biyopsilerde giderek daha fazla analiz edilmeye başlanmıştır [61]. Melanomda, CD46 reseptörlerinin, KBB endotel hücrelerinde tümörle ilişkili eksozomların alımından sorumlu olduğu gösterilmiştir [62]. Beyne özgü eksozomları hedeflemenin, BM oluşumunu azaltmak için gelecekte yararlı bir strateji olabileceği düşünülmektedir.

### **2.3.6 Kanda dolaşan tümör DNA'sı (ctDNA)**

Kanda dolaşan tümör DNA'sı (ctDNA), apoptotik veya nekrotik kanser hücreleri tarafından biyolojik sıvılara salınır ve dolaşımdaki yarı ömürleri 16 dakika ile 2,5 saat

arasında olduğu bilinmektedir. ctDNA, metastaz sayısı ile orantılı artan düzeylerde çoğu sistemik kanserde saptanmaktadır. Bir çalışmada BM'lere eğilimi yüksek olan iki kanser olan meme kanseri ve melanomda, ctDNA vakaların %80'inden fazlasında saptanmıştır [63]. ctDNA seviyeleri, tümör yükü ve hasta sağkalımı ile ilişkilidir [61, 63]. Bilinen kadarıyla, ctDNA ile BM insidansı veya BM oluşumundaki rolü hakkında veri yoktur. Bununla birlikte, beyin omurilik sıvısından (BOS) ctDNA analizi BM ve leptomeningeal hastalığı olan hastalarda plazma kaynaklı ctDNA'dan daha duyarlı ve spesifik bir belirteç olarak ortaya çıkmaktadır [64]. Sonuç olarak, CTC'lerin klinik ve biyolojik önemi; devam eden bir araştırma alanıdır, ancak prognoz, tedavi yanıtları, metastatik risk ve hatta yeni terapötik yaklaşımlar hakkında bilgi verme konusunda büyük umut vaat eden bir alandır.

### **2.3.7 Kolonizasyon**

Metastaz oluşumunda bir sonraki aşama malign hücrelerinin kan dolaşımı yoluyla ulaştıkları organın endotel yatağında birikmeleri, sonrasında da ekstravaze olarak, çoğalıp kolonize olmalarıdır (şekil 2.5). Bu aşama için öne sürülen hipotez; malign hücreler ve beyin arasında, henüz net çözümlenememiş, beyne özgü bir güdüm yeteneği ile doğrudan nörotropik iletişimin olduğudur. Bazı kemokin ve reseptörlerin; malign hücrelerin, primer malignite alanından metastaz oluşturacakları dokuya güdümünde rol aldığı düşünülmektedir [53, 33, 65, 66]. Beyne özgül meme kanseri metastazı hücre serilerinde tanımlanan bir ısı-şok proteininin olan HSP27 in metastatik hedefe güdümü kolaylaştırdığı düşünülmektedir [65]. Başka bir hipotez ise; malign hücreler, hedef dokuda klinik olarak gördüğümüz lezyon oluşmadan önce var olan damar cidarlarına yerleşerek kolonize olmakta ve mikrometastazlar oluşturmaktadır. Bu nedenle endotel yatağının malign hücrelerin çoğalmasına uygun bir ortam sağladığı, beyin parankiminin kanlanması fazla olması nedeniyle de beyin metastazının daha sık görüldüğü düşünülmektedir [67].

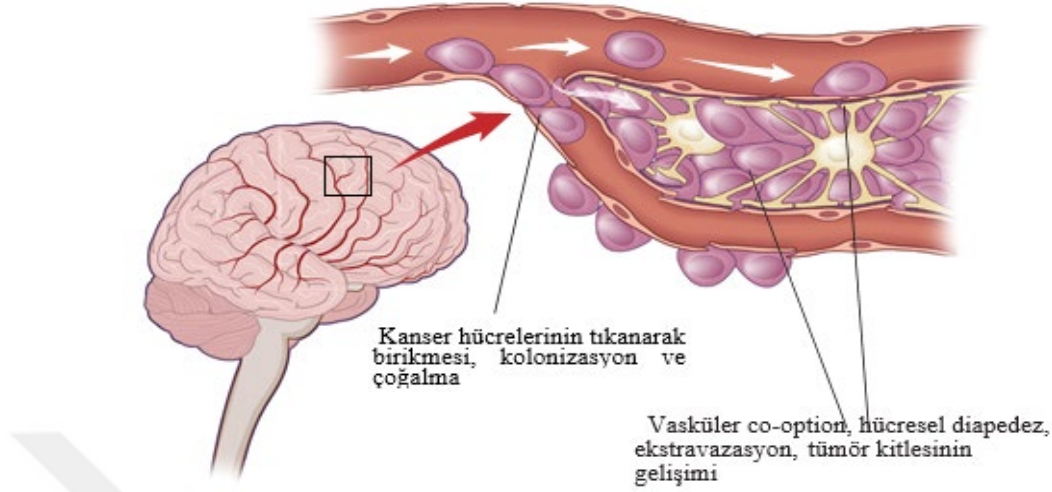
Kolonizasyon aşamasında etkisi iyi bilinen bir belirteç olan CD44, tümör hücrelerinin hiyaluronat matriks ligandı yoluyla hedef dokudaki endotele yapışmasına aracılık eder. Tiroid, meme kanseri ve malign melanoma sekonder metastazlarda ekspresyonunun arttığı belirtilmiştir. Primer beyin tümörleri CD44 standart formunu eksprese ederken, metastatik lezyonlar gen ürününün sadece “splicing” türünü eksprese ederler ki bu da klinik açıdan muhtemel bir tümör belirteci olabilir [16, 68]. Bir diğer örnek ise;

normalde tümör süpresör gen olan ve aktin filamanlarını düzenleyerek hücre migrasyonunu baskılayan kromozom 10'daki PTEN (fosfat ve tensin homoloğu) mutasyonudur. Bu genin mutasyonu sonucu kanserlerin beyin parankimine invazyonunun ve hücrel göçün hızlandığı belirtilmiştir [33, 69].

### **2.3.8 Kan beyin bariyeri ve metastaz**

Kan beyin bariyeri (KBB), birçok SSS kan damarının etrafında bulunan; endotel hücreleri, perisitler ve astrositlerden oluşan sıkı bağlantılar ile boyut ve yüklerine bağlı olarak moleküllerin kandan beyne geçişini sınırlayan seçici geçirgen bir dokudur [70]. KBB, birçok molekülde olduğu gibi hidrofilik kemoterapötiklerin de beyne geçişini engeller. P-glikoprotein (PgP)/çoklu ilaca direnç proteinleri gibi ilaç atım pompaları da KBB'de yüksek oranda bulunmaktadır. Sıkıca kontrol edilen bu mikroçevre, perivasküler boşlukta tümör hücresinin yerleşimini ve büyümesini kolaylaştırır [30, 70]. Malign hücrelerinin KBB'ni nasıl aşabildikleri net olarak bilinmemekle birlikte, öne sürülen hipotezlerin çoğu in vitro ve in vivo modellerdeki gözlemlerden çıkmıştır. Birincisi, malign hücreler, immün sistem hücrelerine benzeyerek endotele yapışır ve perivasküler alana geçebilir. İkincisi, malign hücreler immün sistem hücrelerine reseptör-ligand etkileşimi yoluyla yapışabilir ve KBB'ni geçebilir. Üçüncüsü de, mekanik olarak damar yatağında duran malign hücreler MMP'ler yoluyla endotel hücre duvarında değişime neden olabilir, bu da perivasküler alana geçiş zemin hazırlar [32, 70]. Ek olarak, KBB tarafından oluşturulan metabolik ortam, neoplastik hücre türlerinin sınırları içinde daha kolay çoğalmasını sağlayabilmektedir. Örneğin, beynin interstisyel sıvısının yüksek klorür içeriği, akciğerin küçük hücreli karsinomu veya melanom gibi neoplastik hücrelerin çoğalmasına uygun ortam sağlar [71]. Anlaşılacağı üzere beyinde metastaz oluşumunda mutlaka KBB harabiyeti şart değildir. Lokal tedavi sonrası rekürensın sebebinin de, KBB sağlam olması nedeniyle tanı sırasında görüntülenemeyen mikro metastazlar olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle bazı hastalarda intrakraniyal hastalığın kontrolü için KBB'ne yönelik tedavi stratejileri geliştirilmektedir; bariyerin tahrip edilmesi, KBB'de bulunan endotel hücreleri üzerindeki mevcut reseptörleri kullanarak bariyeri geçebilecek ilaçların tasarlanması veya ilaç atım pompalarının engellenmesi yoluyla ilacın dokudaki yoğunluğunun artırılması gibi [30]. Son yıllarda, meme kanserinde malign hücrelerin ekstrasvazyonuna, kolonizasyonuna yardımcı olarak beyin metastazı oluşumunu

indüklediği öne sürülen 3 gen tanımlanmıştır. Bunlar; Siklooksijenaz-2 (COX-2), epitelyal büyüme faktörü reseptör (EGFR) ligandı ve heparin bağlayan EGF'dir [72].



Şekil 2.5 : Tumor hücrelerinin beyinde kolonizasyonu şematizasyonu [33].

### 2.3.9 Metastatik süreçte anjiyogenez

Primer ve metastatik tümörlerin çoğalması ve büyümesi yeterli kan dolaşımının sağlanması ile mümkündür. Bir tümör vasküler beslenme ağını farklı şekillerde oluşturabilir. Bunlar; anjiyogenez (mevcut damarlardan yeni damarların gelişmesi), vaskülogenez (endotel progenitör hücrelerden yeni damar ağının oluşumu), "co-option" (malign hücrelerinin mevcut damar yatağı boyunca çoğalması), "intussusception" (interstisyel doku elemanlarının mevcut damar lümenine doğru sokulmasıyla damarın yeniden şekillenip genişlemesi), malign hücrelerinin endotel hücrelerine farklılaşması ve malign kök hücreye benzer hücrelerin endotele benzer bir şekil almasıdır. Metastatik tümör damarlarının, normal beyin damarlarıyla mukayese edildiğinde daha kalın, düzensiz olduğu ve daha kalın bir bazal membran yapısı gösterdiği bilinen bir gerçektir. İlaveten bu anormal kan damarlarında sıklıkla yavaş kan akımı ve artmış permabilite (geçirgenlik) saptanmaktadır, yetersiz kan akımı neticesinde hipoksi, asidoz gibi metabolik değişiklikler ve nekroz görülebilmektedir. Artan damar permeabilitesi nedeniyle de interstisyel alanda artan osmotik basınç kemoterapik ilaçların geçişini engellemektedir [30, 73,]. Anjiyogenik faktörler arasında en bilineni, vasküler endotelyal büyüme faktörüdür (VEGF). Deneysel modellerde VEGF reseptörü aktivitesinin engellenmesi ile tümörün belirgin olarak küçüldüğü gösterilmiştir [30]. Bu nedenle yeni tedavi seçenekleri planlamak,

kemoterapötik ajanların etkinliğine yönelik yeni stratejiler geliştirmek için metastatik tümör damar yapısındaki moleküler ve hücrel değişikliklerin bilinmesi büyük önem arz etmektedir. Kanser araştırmalarında popüler olan bazı moleküllerin metastatik süreçte hangi aşamada rol aldığı bilinmese de metastaz oluşmasında etkileri gösterilmiştir. Bunlardan Zeb-1 (E-box homeobox transkripsiyon faktörü), metastatik kanserlerde aşırı eksprese edilmekte ve bu aşırı ekspresyon epitelyal-mezenkimal geçişi artırmaktadır. GİS malignitelerinde sisplatin direncinden sorumlu olduğu düşünülmektedir [74]. 4q kolundaki delesyonun küçük hücreli ve küçük hücre dışı akciğer karsinomlarında beyin ve kemik metastazlarında rol oynadığı saptanmıştır [75]. Ek olarak, CDH2 (N-kaderin) ve KIFC1'in aşırı ekspresyonunun küçük hücreli akciğer karsinomlarında beyne metastaz ihtimali için iyi bir belirteç olduğu savunulmaktadır [76]. Meme kanserinde, TGFβ salınımı ile artan homeoprotein Six-1'in aşırı ekspresyonunun kısalan nüks zaman aralığıyla ilişkili olduğu görülmüştür [77].

Metastatik döngü başlangıcından tamamlanmasına kadar çok aşamalı ve son derece karmaşık bir süreçtir. Kanser hücresi ile hedef organ arasındaki ilişki hala araştırılmaktadır. Primer tümörden ayrılıp dolaşıma katılan tümör hücrelerinin sahip oldukları özgül mutasyonlar nedeniyle beyin metastazı oluşturacağının metastatik sürecin başlangıcından itibaren belli olduğu ya da bu hücrelerin, bu nitelikleri yeni mikroçevre şartlarında kazandığını söyleyebiliriz. Her iki mekanizmanın birlikte olması da mümkündür. BM'lerin tespiti ve tedavisinde; metastatik süreci anlamak ve bunun neticesinde geliştirilecek tedaviler, daha iyi sonuçlara yol açabilir. Anlaşıldığı üzere her kanser türü ve alt tipleri farklı olduğu gibi; aynı kanser hücresinin farklı kişilerde farklı seyir göstermesi de mümkündür. Tüm bunlar, BM'lerin etkin tedavisi için sadece tümörün değil, aynı zamanda konağa ait faktörlerin de hedeflenmesi gerektiğini göstermektedir. Nihai amaç ilk aşamada, metastatik süreç başlamadan, genetik ve moleküler düzeyde metastaz oluşumunu önlemektir [16, 25, 30, 33, 53].

## 2.4 Görüntüleme Özellikleri

BM'de tanı koyma aşamasında klinik bulgular her zaman yeterli olmayabilir, değişen serilerde; hastaların % 10-60'ında nörolojik semptom veya bulgu olmayabilir. Ayrıca intrakraniyal kitle etkisi yapan lezyonlar çoğunlukla benzer semptom ve bulguları verir. BM tanısı anamnez, fizik muayene ve radyolojik yöntemlerle konulur. Beyin

metastazı tedavisinde görüntülemenin amacı; tedavi öncesi dönemde beyin metastazlarını primer beyin tümörleri gibi diğer diğer neoplastik lezyonlardan veya benign, tedavi edilebilir lezyonlardan ayırarak, saptamak ve teşhis etmektir. Tedavi sonrasında ise tedaviye yanıtı değerlendirmek, olası komplikasyonları görmek, oluşabilecek yeni lezyonları saptamak; nüks, radyonekroz ve psödoprogresyon ayırımı yapmak temel amaçtır. RT ve cerrahi için tümör lokalizasyonunu, tümör sayısını belirlemede ve tedavi seçiminde rolü olduğundan radyolojik incelemeler çok önemlidir [78, 79]. Radyoterapi, KBB'nin bozulmasına yol açarak; kontrast artışı ve vazojenik ödem artışına neden olabilir. Bu da, manyetik rezonans görüntüleme (MRG) tedavi edilen lezyonların normalden daha büyük görünmesine veya tümör progresyonu olarak düşünülmesine yol açar [80]. İmmünoterapi alan hastalarda da kontrast artışı, lezyonların boyutunda geçici bir büyüme ve buna bağlı vazojenik ödem gelişebilir [80].

Konvansiyonel bilgisayarlı tomografi (BT) ve MRG, BM tanısında en sık kullanılan radyolojik yöntemlerdir. BM'ler, kısmen iyi sınırlı ve çoğunlukla santral nekroz alanı içeren kitlelerdir. Etrafında kitle boyutundan beklenmeyecek ölçüde geniş ödem alanı içerebilirler [5, 11, 78-80] Nekroz ve hemoraji makroskopik olarak da görülebilir. Beyin parankiminin yanı sıra leptomeninksleri de tutabilirler. Genellikle primer hastalığın histolojik özelliklerini barındırırlar. Solid kanserin metastazı solid, kistik kanserin metastazı kistik olma eğilimindedir [5, 11]. Lezyon sayısının birden fazla olması metastatik hastalığı düşündürmekle birlikte; multisentrik yüksek dereceli glial tümör ve tümör taklitçileri olan enfeksiyöz lezyonlar ve tümefaktif demiyelinizan lezyonlardan (2 cm veya daha fazla çapa sahip kitlesel etki, perilezyonal ödem ve halkasal yapı ile karakterize lezyon) ayırımı kimi zaman güç olabilmektedir [81]. BM'ler sıklıkla supratentoryal alanda gri-beyaz cevher bileşkesinde, arter distal sulama alanlarında yerleşim gösterirler [1, 3, 82, 83]. BM'ler radyolojik görüntülemelerde çoğunlukla homojen ya da punktat (noktasal), nodüler, halkasal paternde kontrastlanan lezyonlar şeklinde görülür. Lezyon çevresinde ödem olmayabileceği gibi çoğunlukla lezyon boyutuna kıyasla çok daha geniş bir ödem alanı görüntülenir [81, 82]. Tipik olarak tek veya çoğul, gri-beyaz cevher ayırımına yakın alanlarda, kontrast tutan, etrafı ödemli ve kitle etkisi yapan lezyonlardır. MRG, ödemi göstermede BT'ye üstündür [82-84]. Melanom, renal hücreli kanser, tiroid ve akciğer kanserine bağlı BM'lerin görüntülemelerinde, lezyon içerisinde farklı evrelerde

hemoraji bulguları görülebilmektedir. [80-84]. Bazı görüntüleme bulguları altta yatan lezyonu işaret edebilmektedir, BT'de hiperatenüasyonun (kemiğe yakın yüksek dansite) ve MRG'de düşük T2 sinyalinin musinöz karsinom metastazlarını işaret etmesi ve yüksek melanin içeriğinden dolayı hemoraji olmasa dahi melanom metastazlarının BT'de hiperdens ve T1 MRG'de hiperintens görülmesi buna örnek verilebilir. [83-84, 277].

BT, dura ve kemik ile ilişkili lezyonları ayırt etmede daha değerlidir. BM'ler, gri cevhere göre izodens-hafif hiperdens olarak izlenir ve yeterince büyük boyutlara ulaşmış lezyonlarda çevre beyaz cevherde hipodens vazojenik ödem görülebilir. Tümör içi kanamalar da BT ile hiperdens alanlar şeklinde daha kolay saptanabilir [80-84]. Metastazlar genellikle BT'de yuvarlak, iyi sınırlı kitleleler olarak görülür. Karakteristik olarak derin beyaz cevher ödemi tümörden beynin derinliklerine doğru uzanır ve genellikle primer beyin tümörlerinde görülenden daha belirgindir [82]. Ancak belirgin bir lezyon çevresi ödem yok veya lezyon içi hemoraji bulguları mevcut değil ise büyük metastazlar dahi kontrastsız BT görüntülemelerinde gözden kaçabilir ya da hiç görüntülenemeyebilir [81-83].

Kontrastlı MRG, BM'ler için hassas bir tarama testi ve tanı koymada kontrastlı BT'ye göre daha üstündür [85]. Ek olarak, BM'lerin tanı ve tedavisine yönelik 2006 Avrupa Nöroloji Dernekleri Federasyonu kılavuzları, cerrahi veya radyocerrahi planlanan durumlarda ek lezyonları tespit etmek için; BT'nin negatif olduğu ancak malignitesi olduğu bilinen hastalarda metastaz için güçlü klinik şüphenin olduğu durumlarda; bir lezyonun neoplastik veya nonneoplastik olup olmadığını belirlemede BT'nin kesin bilgi veremediği hastalarda MRG önermektedir. Metastaz T1 ağırlıklı görüntüde (AG) izointens-hafif hipointens olarak izlenir. Melanom metastazları melaninin paramanyetik etkilerinden dolayı T1 AG'de hiperintens görülebilir. T2 AG/FLAIR'de lezyonlar genellikle hiperintensdir; lezyon içerisinde hemoraji mevcut ise kanama zamanının akut, subakut ya da kronik olmasına göre intensitesi değişebilir. Lezyon çevresindeki ödem T2 AG-FLAIR sekanslarda en belirgindir ve hiperintens olarak görülür. Peritümöral FLAIR hiperintensitesinin kontrastlanan lezyona oranının, primer beyin tümörleri ile BM'lerin ayrımında iyi bir belirteç olduğu düşünülmektedir [80-85]. Bir çalışmada, ödem hacminin tümör hacmine oranı BM'ler için ortalama 3,1, primer beyin tümörleri için 1,4 bulunmuştur [86]. Başka bir çalışmada, 26 BM ile 22

yüksek grade glial tümör karşılaştırılmış; ödem hacminin tümör hacmine oranı sırasıyla  $2,41\pm 1,63$  ve  $0,69\pm 0,41$  bulunmuştur [83].

Gradient ya da SWI (Susceptibility Weighted Imaging=Duyarlılık Ağırlıklı Görüntüleme) ağırlıklı sekanslarda hemorajik alanlarda kan ürünlerine bağlı olarak düşük sinyalli alanlar izlenir. Birden fazla lezyon varlığında farklı kontrastlanma paternleri de görülebilir [82]. Difüzyon ağırlıklı görüntüleme (DAG), su moleküllerinin hareketine duyarlı bir MR tekniği olup; metastazlar genelde difüzyon kısıtlaması göstermektedir. ADC (Aşık Difüzyon Katsayısı = Apparent diffusion coefficient) değerleri tümör selülaritesi ile ters orantılı olup, sellüler tümörlerde ekstrasellüler su moleküllerinin difüzyonu kısıtlandığından kantitatif ADC değerleri daha düşüktür [88]. Primer beyin tümörleri ile BM'lerin ayrımında DAG'de, tümör dokusunda ve çevresinde ölçülen yüksek ADC değerlerinin yüksek dereceli glial tümörlere kıyasla BM tanısını desteklediği belirtilmiştir [87].

Primer SSS tümörleri, beyin apsesi, iskemik serebrovasküler lezyonlar ve multipl skleroz gibi demyelizan lezyonlar BM ayırıcı tanıları arasındadır. Bir çalışmada konvansiyonel MRG ile BM tanısı konulan hastalarda özellikle soliter lezyon varlığında yanlış pozitiflik oranları yaklaşık % 11 saptanmış. Bu yanlış pozitif olarak metastaz tanısı konan hastalarda histopatolojik inceleme sonrasında yarıya yakınının primer beyin tümörlerini, diğer yarının ise enfektif süreçleri temsil ettiği bulunmuştur [79]. T1 kontrastlı MR'de santrali kontrastlanmayan lezyonların ADC kesitlerinde, beyin apselerinde püy miktarı ile doğru orantılı difüzyon kısıtlaması görülürken; yüksek grade glial tümörlerde ve metastazlarda görülmez. T2 ağırlıklı görüntülemelerde, halkasal kontrastlanan kısmın çevresinde, apselerin %90'ında hipointens bir halka bulunur [89]. Bu alan kortekse yakın kısımda daha kalın, en derin kısımda (ventriküllere yakın) daha incedir. Primer beyin tümörlerinden özellikle glioblastom (GBM) ile soliter metastaz ayrımında konvansiyonel radyolojik yöntemler her zaman mümkün olmaz. Bu ayrımı yapmak için kullanılan MR Spektroskopi (MRS) ve MR Perfüzyon (MRP) gibi görüntülemelerdeki parametreler, kontrastlanan lezyonun T2 kesitlerde etrafındaki ödem ile uyumlu hiperintens alanlarına uygulandığında; GBM ve metastaz ayrımını sağlayabilmektedir. Eşlik eden klinik ve laboratuvar bulguları, BM'leri, beyin absesi ve septik emboliden ayırmada genellikle faydalıdır. Hastanın bilinen malignite öyküsü ve radyolojik görüntülemelerde beyin parankiminde birden fazla lezyon var ise BM tanısını öncelikle düşünmek gerekir.

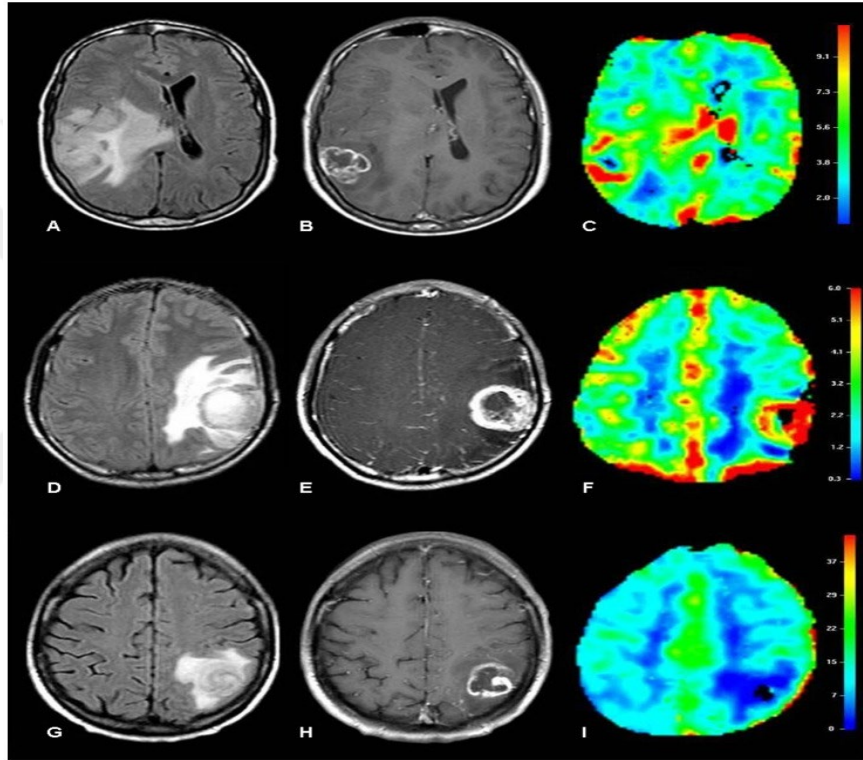
Ancak beyinde tek soliter lezyon varlığında ise radyolojik görüntülemelerin spesifitesi düşmektedir [79, 90]. Metastaz tanısı alan olguların yaklaşık %50'sinde soliter lezyon olduğu düşünüldüğünde [81] tanının invaziv olmayan yöntemlerle konulabilmesi önemli bir sorun haline gelmekte ve histopatolojik incelemeye ihtiyaç duyulabilmektedir [90]. Soliter metastaz varlığında ayırıcı tanıda en önemli lezyonlar, GBM ve beyin absesidir. Kontrastlı MRG'de, GBM daha düzensiz sınırlı iken, apse ve metastaz düzgün sınırlı ve yuvarlak şekillidir. Ancak yukarıda belirtildiği gibi konvansiyonel radyolojik yöntemler ile bu lezyonların ayrımı her zaman mümkün olmayabilir. İleri MRG yöntemler olan MRS, MRP, Difüzyon Tensör Görüntüleme (DTI) ve DAG ayırıcı tanıda önemli bilgiler verebilir [79,91].

Primer SSS tümörleri ile BM ayırımında perfüzyon MR da kullanılmaktadır. Bir MRP parametresi olan serebral kan hacmi (CBV) değerinin solid lezyon alanı için; GBM'lerde BM'lere kıyasla daha yüksek olduğu, enfeksiyonlarda ise daha da az olduğu görülmektedir [92, 93]. Ayrıca lezyon çevresindeki ödem zonunda ölçülen CBV değerlerinin, GBM'lerde BM'lere kıyasla daha yüksek olduğu izlenmektedir [91-93]. Bunun yüksek dereceli glial tümörlerin vazojenik ödeme ek olarak ödem alanında anjiyogenik tümör hücrelerinin bulunması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Metastazlarda ise peritümöral ödem pür vazojenik ödem olup tümör hücresi içermez.

MRS, beyinin önceden tanımlanmış bir hacminin metabolit profili hakkında bilgi sağlayan bir MR tekniğidir. Her metabolitin rezonans zirveleri genellikle beyinde sabittir ve milyonda bir kısım (ppm) olarak ifade edilir. Piyojenik apselerde genellikle bir amino asit piki vardır (valin, lösin ve izolösin) [94]. Santral nekrotik alanların MRS ile incelemesinde, yüksek grade glial tümör ve metastazda nöronal hasara bağlı azalmış N-asetil aspartat (NAA) piki görülürken; metastazlarda biraz daha fazla olamk üzere her ikisinde de artmış lipid ve laktat piki görülür. Metastatik lezyonda kolin piki izlenir ancak peritümöral ödem dokusunda kolin normal seviyededir [93]. MR spektroskopik incelemede yüksek kolin (Cho)/kreatinin (Cr) oranları metastazlardan ziyade yüksek derece gliomlarda izlenmektedir. CBV değerleri gibi lezyon çevresindeki alanda Cho/Cr oranının yüksek dereceli glial tümör ile metastaz ayırımında sensitivitesi yüksektir (Şekil 2.6). 53 yüksek dereceli glial kitle ve 20 beyin metastazının dahil edildiği bir çalışmada, peritümöral bölgedeki Cho/Cr oranının %100 sensitivite ve %88,9 spesifite ile ayrımı sağladığı görülmüştür (cutoff değeri

1.24) [95]. Metastazın özellikle yüksek dereceli gliomlardan ayırımında konvansiyonel MR'ın yanı sıra ileri MR görüntülemelerinin yer aldığı multiparametrik görüntüleme seçenekleri göz önünde bulundurulmalıdır.

Single photon emission computerized tomography (SPECT=Tek foton emisyon bilgisayarlı tomografi) primer beyin tümörleri ile BM'lerin ayırımında kullanılabilir, pozitron emisyon tomografi (PET) ise malignite derecesinin belirlenmesi, radyonekroz ayırımının yapılması ve primer tümörün yerinin saptanmasında yardımcı olabilir [80].



**Şekil 2.6 :** Beyin metastazı görüntüleme ayırıcı tanı. 49 yaşındaki bir erkekte glioblastoma multiforme (A,B,C). Aksiyel FLAIR görüntüsünde sağ parietal lobda vazojenik ödem ile çevrili (A), aksiyel kontrastlı T1 görüntüde düzensiz periferik kontrastlanma (B) ve perfüzyonda artmış çevresel rCBV (C). 18 yaşındaki bir erkekte metastatik melanom (D,E,F). Aksiyel FLAIR görüntüsü, sol parietal lobda perilezyonel geniş vazojenik ödem (D), aksiyel post-kontrast T1 görüntüsünde düzensiz periferik kontrastlanma (E), perfüzyonda artmış kitle içi rCBV azalmış perilezyonel rCBV (F). 54 yaşında bir kadında serebral toksoplazmozis (G,H,I). Aksiyel FLAIR görüntüsünde çevre vazojenik ödem (G), aksiyel kontrast sonrası T1 görüntüde düzensiz periferik kontrastlanma (H), perfüzyonda azalmış kitle içi ve çevresel rCBV (I) [96].

## 2.5 Radyasyon Nekrozu

Beyin metastazları için ameliyattan sonra, kısmi rezeksiyon nüks ile ilişkili olduğundan lezyonların tamamen çıkarılıp çıkarılmadığı MRG ile değerlendirilmelidir. MRG, potansiyel yanlış yorumlara yol açabilecek reaktif

kontrastlanmanın ortaya çıkmasından önce erken (ameliyattan sonraki ilk 48 saat içinde) yapılmalıdır. Bu tür reaktif artışın ameliyattan sonraki 24 saat içinde de görülebileceğini, ancak insidansın ameliyattan sonraki zamanla arttığını ve 48 saat sonra ikiye katlandığını bilinmektedir [97]. SRC'den sonra, radyosensitif lezyonlarda beklenen seyir; tedavi edilen lezyonda hafif genişleme ödemde artışı takiben lezyonda ilerleyici bir küçülme ve çevredeki ödemin azalmasıdır [98]. Bununla birlikte, tedavi edilen lezyonların yaklaşık %30'unda, tipik olarak tedaviden sonra yaklaşık 6 hafta ile 15 ay arasında kontrastlanan hacimde geçici bir artış görülebilir. Bu durum, SRC'den sonra 6 ay içinde meydana gelmişse 'psödoprogresyon' olarak adlandırılır [99]. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, SRS'den 1 hafta sonra MRG ile ölçülen intra-ekstrasellüler su değişim oranındaki erken değişikliklerin, uzun vadeli tümör yanıtı ile yüksek oranda korele olduğunu ve SRS'den 1 ay sonra tümör küçülmesinin derecesini tahmin edebileceğini göstermiştir [100].

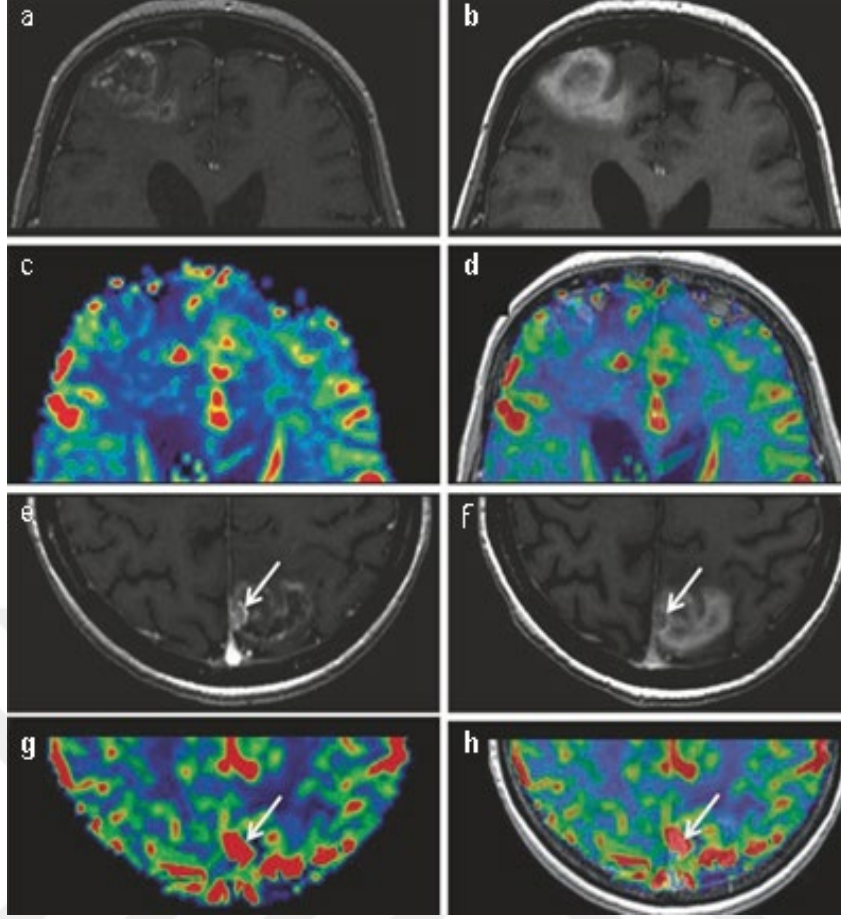
Radyasyon nekrozu (RN) tanısı, klinik, radyolojik ve histopatolojik olarak konabilir. Ancak klinik semptomlar, her zaman radyolojik bulgularla korelasyon göstermeyebilir. Hiçbir klinik bulgu olmayabileceği gibi, bilişsel düzeyde azalma, nöbet veya sensorimotor kayıplar görülebilir [101]. Kesin tanı, dokunun histopatolojik incelemesiyle konur ama rutin pratikte çok az tercih edilen bir yöntemdir. Serebral radyasyon nekrozunun histopatolojik bulguları arasında; damarların fibrinoid nekrozu, inflamasyon, endotelial proliferasyon, vasküler hyalinizasyon, tromboz ve telenjiektazi yer almaktadır. Buna demiyelinizasyon ve gliosis alanları eşlik edebilir [101,102].

Ayırıcı tanı için tercih edilen yöntem; konvansiyonel MR, MRS, MRP gibi radyolojik görüntüleme seçenekleridir [101-103]. Radyasyon nekrozu, MRG'da özellikle T2-ağırlıklı ve FLAIR sekanslarda belirgin olan artmış sinyal intensitesi olarak görülür. RN'nin patofizyolojisinde endotelial hücre hasarının olması nedeniyle, KBB'nin bozulduğunu işaret eden kontrast tutulumunun ve ödem artışının olması şaşırtıcı değildir [101-103]. Bu yüzden RN, MRG'da gliomlara veya metastazlara benzer görünümde olabilir. RN, MRG'de iki tip paternde görülebilir: "İsviçre peyniri" ve "sabun köpüğü" paterni. İlk patern, beyaz cevherin ve ilişkili korteksin diffüz nekrozuna bağlı etkilenen korteks sınırlarında ve beyaz cevherde diffüz kontrast tutulumuyla karakterizedir. "Sabun köpüğü" paterni ise, daha küçük heterojen kontrastlanan nekrotik odağa sahip lezyonlardaki görünümdür [101]. RN, SRC

tedavisinden sonra genellikle 3 ay ile ilk 2 yıl içinde ortaya çıkmaktadır ve tek başına morfolojik parametrelere dayanarak tümör nüksünden ayırt etmek çok zordur. RN'yi nüksten ayırt etmede en kullanışlı yöntem perfüzyon MR ile rölatif CBV değerinin ölçümüdür (Şekil 2.7). Radyasyon nekrozunda, tüm nekrozlar gibi, kan damarlarında bir seyreklik görülmekteyken; metastaz nüksünde kanlanmada belirgin bir artış görülür. Ayrıca metazlarda çekim sırasında erken kontrast dolumu görülürken, radyasyon nekrozunda kademeli ve geç bir kontrast dolumu görülür [98, 104].

Beyin metastazlı hastaların stereotaktik tedavilerinin en sık görülen komplikasyonu ışınlanmış lezyonların önemli bir bölümünde, özellikle yüksek dozların tek fraksiyonda büyük tümör hacimlerine uygulandığı tedavilerde ortaya çıkabilen radyasyon nekrozudur [98] SRC ile tedavi edilen lezyonların %24-50'sinde ortaya çıkabildiği (semptomatik veya asemptomatik) ve doz, tümör hacmi, tümör lokalizasyonu ile korele olduğu gösterilmiştir [105].

Tümör lokalizasyonu, RN oluşumunu etkilemese de bazı alanlarda nekroz görülme riskinin fazla olduğunu belirten çalışmalar da mevcuttur. Bunlar diensefalon, serebellar pedinküller, bazal ganglionlar ve beyin sapıdır. RN'yi etkileyen diğer risk faktörleri ise kemoterapi kullanımı, ileri yaş, şeker hastalığıdır [106] V10 ve V12 Gy (10 ve 12) Gray alan normal beyin hacmi) değerlerinin RN oluşma oranına etkisini bulmak için yapılan bir çalışmada, hastalara uygulanacak tedavi dozları; 4.3 cm<sup>3</sup>'den küçük hedeflere 20 Gy, 4.3-14.1 cm<sup>3</sup> arasında olan hedeflere 18 Gy ve 14.1 cm<sup>3</sup>'den büyük hedefler için ise 15-16 Gy olarak tanımlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre V12 değerleri için sırasıyla; 3.3 cm<sup>3</sup>'den küçük, 3.3-5.9 cm<sup>3</sup> arasında, 6- 10.9 cm<sup>3</sup> arasında, 10.9 cm<sup>3</sup>'den büyük olduğunda RN oranının sırasıyla; %2.6, %11, %24, %47 olduğu saptanmıştır [105]. Sneed ve ark. 2200 beyin metastazı için gamma-knife ile tedavi edilen 435 hastayı analiz etmişlerdir. 9,9 aylık bir medyan lezyon görüntüleme takibi ile, çapı 2,1 cm ile 5,1 cm olan metastazlar için bir yıllık radyasyona bağlı yan etki görülme olasılığı %14, 1.6 cm ile 2 cm arası lezyonlar için %10 bulunmuş. RN başlangıç medyan süresi 7.2 ay saptanmış [107].



**Şekil 2.7 :** MR ile radyonekroz metastaz ayrımı: (a) T1 kontrastlı MR’de radyonekrozda erken fazda çevresel kontrastlanma (b) geç fazda kontrastlanmada artış; (c) Rölatif serebral kan akımında azalma; (d) a ve c nin birleştirilmiş sekansı; (e)T1 kontrastlı MR’de nüks metastaz(ok) ve radyonekroz birlikte görülmekte, nüks erken fazda kontrastlanmakta; (f) geç fazda metazda kontrastlanma hafif azalırken nekroz alanında artmakta; (g) metastazda artmış rölatif serebral kan akımı; (h) e ve g nin birleştirilmiş sekansı [16].

Radyasyon tedavisi onkoloji grubu (RTOG) doz yükseltme protokolü 90-05'te, daha önce TBRT ile tedavi edilen hastalar için SRC'nin güvenli ve etkin dozu araştırılmış;  $\leq 2$  cm, 2.1–3 cm ve 3.1–4 cm'ye kadar sırasıyla lezyonlar için önerilen doz 24 Gy, 18 Gy ve 15 Gy olarak önerilmiştir [108]. Hipofraksiyone radyocerrahi sonrası radyonekroz gelişimi ile ilgili yapılan çalışmalarda, oligo beyin metastazlarından etkilenen hastalara 3-7 fraksiyonda toplam 24-35 Gy dozlarının verilmesinin, yaklaşık %2-10'luk bir RN riskine neden olduğu gösterilmiştir [109]. Başka bir çalışmada ise; 5 fraksiyonda toplam 30-35 Gy ile RN arasında ilişki görülmüştür. Ayrıca fraksiyon başına 4 Gy'den fazla alan normal beyin hacmi 23 cm<sup>3</sup>'ün üzerinde ise RN'nin başlangıcı ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır (V20 > 23 cm<sup>3</sup> için %70 risk, V20 < 23 cm<sup>3</sup> için %14, p = 0,001) [110].

Orijinal Emami yayını, standart fraksiyon ile beyin 1/3'üne 60 Gy doz uygulandığında, 5 yılda %5'lik bir RN riski olduğunu tahmin etmiştir. Bu risk beyin 2/3'üne 50 Gy veya tüm beyine 45 Gy doz uygulandığında da geçerlidir. Emami'nin bu raporunda 5 yılda %50 RN riski tahminleri de bulunmaktadır [111]. Daha yakın bir zamandaki bir çalışma "Quantitative Analysis of Normal Tissue Effects in The Clinic (QUANTEC)" modern literatürün geniş bir incelemesini yapıp beyin için yeni doz kısıtlamalarını yayınlamıştır. TBRT standart fraksiyon için RN oranı; maksimum doz (Dmax) <60 Gy ise %3, Dmax 72 Gy ise %5, Dmax 90 Gy için ise %10 radyonekroz riski bulunmuştur [106].

Rezeksiyon kavitesinin 3 cm'den büyük olduğu ve cerrahi sonrası tek fraksiyonlu SRC ile tedavi edilen hasta serilerinin 1 yıllık izleminin yapıldığı çalışmalarda; radyonekroz, %6 gibi düşük bir oranla %18-26 gibi yüksek bir oran arasında saptanmıştır [112-114].

## 2.6 Klinik

Beyin metastazları kanser hastalığının seyri boyunca herhangi bir noktada ortaya çıkabilir ve hastaların yaklaşık üçte ikisi bu süreçte semptomatik hale gelir. Belirti ve bulgular çoğunlukla kafa içi basınç artışına, lezyonun lokalizasyonuna ve lokal bası etkisine ikincil oluşmaktadır. Bu belirti ve bulgular; baş ağrısı, bulantı, kusma, mental durum değişiklikleri, görme bozuklukları, ataksi, pareziler ve duyu defisitleri olarak sıralanabilir [5, 6, 13, 14, 115]. Bazı hastalar nöbet geçirme, tümör içine kanama ve iskemi gibi akut tablolar ile kliniğe başvurabilir. Kitle etkisi ve beyin omurilik sıvısı (BOS) akımının engellenmesine bağlı intrakranial hipertansiyon, obstrüktif hidrosefali ve beyin herniasyonları da gözlenebilir [116, 117]. Metastaza bağlı nörolojik semptomlar genellikle günler veya haftalar içinde giderek artan tarzda ortaya çıkar. En sık görülen ve kafa içi basınç artışına bağlı olan baş ağrısı, hastaların %50-60'nda ilk semptomdur [6, 118]. Genellikle hafif ve lokaldır ancak; zamanla şiddeti ve süresi artar. Sabahları daha şiddetli, zorlama veya öksürme gibi kafa içi basıncı artıran manevralar ile artan karakterdedir. Baş ağrısı patofizyolojisinde lezyonun direk basısı veya neden olduğu ödem sonucu büyük damarlarda ve özellikle durada gerçekleşen traksiyon rol oynamaktadır. İntrakranial metastazlı olgularda akut ve ciddi baş ağrısı hemoraji ve bunun sonucu ortaya çıkan intrakranial basınç artışı ile ilişkili olabilir [118]. Yorgunluk ve halsizlik; beyin metastazı mevcut hastalarda sık görülen bir

şikayettir. Fiziksel, bilişsel ve emosyonel yorgunluk beyin metastazlı olgularda radyoterapi sürecinde belirginleşmektedir [119]. Nöbetler, hastaların yaklaşık %40-50'sinde görülür. Multipl lezyon varlığı veya melanom metastazlarında artmış nöbet riski vardır. Metastaza bağlı nöbetler genel olarak fokal veya sekonder generalize nöbet şeklindedir. Nöbet sonrası felç ve disfazi gelişimi olabilir. Cerrahi rezeksiyon yapılan, 500 hastayı içeren retrospektif bir çalışmada; çoklu lezyon, temporal ve oksipital yerleşim, kemik invazyonu da olan metastazlarda preoperatif nöbet yüksek oranda ve anlamlı bulunmuş. Yine aynı çalışmada frontal lob dışındaki büyük lezyonlarda (>5 cm) nöbetin tedaviye dirençli olduğu veya birden fazla antiepileptik ilaç gereksinimi olduğu görülmüş [120, 121]. Rutin pratikte yaygın olmasına karşın çoğu çalışma primer beyin tümörleri de dahil beyin metastazlarında profilaktik antiepileptik kullanımını önermemektedir. Buna rağmen yüksek riskli hasta grubunda veya erken postoperatif nöbet oranını azaltmak için perioperatif dönemde primer profilaksinin faydalı olabileceğini düşündüren veriler de vardır [122].

Duyusal veya motor bozukluk, konuşma bozuklukları ve görme alanlarındaki bozukluklar gibi fokal nörolojik defisitler %20-40 oranında, davranışsal bozukluklar ise hastaların üçte ikisinde görülen belirtilerdir. %10 hastada papilödem saptanabilir. Hipofiz metastazlarında klinik belirti olmayacağı gibi baş ağrısı, görme bozukluğu ve diyabetes insipidus, kortizol yetmezliği gibi hormonal disfonksiyon belirtileri ortaya çıkabilir. Meme ve akciğer kanseri, hipofiz bezine en sık metastaz yapan kanserlerdir. Adenomların aksine metastazlar daha çok arka hipofiz bezini tutmaktadır [115-117, 120].

Supratentoryal metastazlar beynin herhangi bir lobunu tutabilir. Frontal loblarda semptomatik tümörleri olan hastalar, kişilik değişiklikleri, kontralateral hemiparezi, abuli (irade-istem kaybı), disinhibisyon (dürtüleri baskılayamama) gibi semptomlarla başvurabilir. Lezyon baskın hemisferde ise, dili ifade etme zorluğu ile karakterize Broca tipi afazi meydana gelebilir. Düşük ayak gibi motor homonculustaki tutulum yerine göre, farklı kas gücü kayıplarıyla gelebilir [6, 16, 115, 116].

Temporal loblar Wernicke alanını içerir ayrıca hipokampus, limbik sistem ve görme yolları ile yakın bağlantısı bulunmaktadır. Temporal lob metastazları, özellikle bilateral lezyonlar, kısa süreli hafıza bozukluğu ile ortaya çıkabilir. Baskın hemisfer etkilenirse, dili kavrayamama ile karakterize Wernicke afazisi ortaya çıkabilir. Muayenede, optik trakt tutulmuşsa kontralateral superior kadranopsi saptanabilir.

Nöbetler de özellikle medial temporal lob lezyonlarında çok yaygındır. İşitsel halüsinasyonlar da görülebilir [6, 16, 115, 116].

Sağ parietal lezyonları olan hastalar sol tarafını ihmal edebilir. Bu klinikte; hasta tarafından kendini sol tarafındaki cisimlere çarpma kapıları kapatmayı unutma gibi şikayetler ile ifade edilebilir. Baskın olmayan parietal hemisfer lezyonlarında hastalarda anosognozi (kişinin nörolojik defisitinin farkında olmaması) görülebilir. Sol parietal lezyonlarda akalkuli (hesap yapabilme kabiliyetinde bozukluk), kontralateral duyu kaybı gelişebilir. Oksipital lezyonlar çoğunlukla kontralateral görme alanı defekti ile bulgu verir, karmaşık görsel halüsinasyonlara da neden olabilir [6, 16, 115, 116].

İnfratentoryal lezyonlar genelde ataksi veya yürüme bozukluğu ile kendini gösterir. Serebellar hemisferik lezyonlar ipsilateral dismetri (mesafenin, hızın veya hareketin gücünün ayarlanamaması) ve koordinasyon bozukluğuna neden olabilir. Beyin sapından geçen kranial sinir çekirdeklerinin yanı sıra motor ve duyu yollarının yüksek yoğunluğu göz önüne alındığında, küçük lezyonlar bile oldukça semptomatik olabilir. Beyin sapı lezyonları yüz, kol ve bacakta kontralateral hemiparezi ve hemisensoriyel kayıplara neden olabilir [6, 16, 115, 116].

Leptomeningeal metastazlar (LM) tipik olarak kanserin geç evre bir komplikasyonudur. Leptomeningeal hastalık en sık adenokarsinomlarda ve hematolojik malignitelerde görülürken, hemen hemen her kanser leptomeninklere metastaz yapabilir [124]. LM'nin kliniğe yansımaları oldukça değişkendir; semptomatik hidrosefaliden izole kranial nöropatlere, multifokal defisitlere ve/veya nöbetlere kadar değişebilir. Leptomeningeal metastazlar, araknoid granülasyonlar yoluyla BOS geri emilimini engelleyerek hidrosefaliye veya radyolojik hidrosefali olmaksızın yaygın subaraknoid mikrometazlar neticesinde ventriküler kompliyansı azaltarak intrakraniyal basınç artışına neden olabilir [125,]. Omurilik ve kauda ekina, sinir köklerinin tutulumu; radiküler ağrıya, bağırsak veya mesane disfonksiyonuna veya bacaklarda fokal uyuşukluk veya zayıflığa neden olabilir [125, 126]. Metastatik kanserli bir hastada nöronal aksın birden fazla seviyesini etkileyen semptomların varlığı LM şüphesi uyandırmalıdır. Radyolojik görüntülemeler ile LM tanısı konulamadağı durumlarda klinik şüphe var ise BOS örnekleme mutlaka gereklidir. Pozitif sonuç alınmaması halinde, en az üç kez örnekleme önerilmektedir [125]. Spinal metastazların büyük çoğunluğu ekstraduraldır. Ekstradural metastazlar sıklıkla

vertebra cisimlerinde, en sık olarak torasik omurgada ortaya çıkar ve ekstradural alana uzanır . Başlangıçta, bu lezyonlar şiddetli sırt ağrısı ile ortaya çıkabilir. Ağrı genellikle şiddetlidir, geceleri daha kötüdür ve hastayı uykudan uyandırabilir. Hem ekstradural hem de intradural lezyonlar kord bası bulguları ile ortaya çıkabilir. Omurilik basısı arttıkça; hastalarda güçsüzlük, uyuşukluk, bağırsak veya mesane disfonksiyonu veya yürüme bozukluğu gibi fokal nörolojik defisitler gelişebilir. Metastatik kanserli hastaların yaklaşık %5'i başlangıçta kord basısı ile başvurur [16].

Tüm bu belirtiler özellikle bilinç değişiklikleri; cerrahi tedavi, kemoterapi ya da radyoterapi sonrası da gelişebilir. Bilinç değişikliği nedeniyle konsülte edilen 132 hasta üzerine yapılan bir çalışmada sadece %15'inde altta yatan sebebin beyin metastazı olduğu görülmüştür [127]. Ayrıca kemoterapiye sekonder ensefalopatide görülebilir. Bununla beraber çoğul beyin metastazlarına rağmen asemptomatik olan ve metastazları insidental saptanan hastalar da vardır. Daha önce bilinen primer bir malignite öyküsü olmayan hastaların %15'inde BM'lere sekonder oluşan semptomlar ile başvurabildiği bildirilmiştir [10, 11, 16]. Özellikle de leptomeningeal metastazı olan olguların BOS sitolojik incelemesinde yaklaşık %50 olguda malign hücreler saptanabilir [128]. Olguların %15-20'sinde BM, primer kanser ile aynı anda (senkron) tespit edilirken; yaklaşık % 80 olguda ise BM primer kanser tanisi konulduktan sonra (metakron) ortaya çıkmaktadır [24]. Yaygın metastazı olan olgularda veya tedavi almayanlarda daha kısa olmakla birlikte tanı sonrasında beklenen yaşam süresi ortalama 6 aydır.

## **2.7 Tedavi Seçenekleri**

Metastatik beyin tümörlü hastaların yaşam süresi sınırlıdır ve çoğunlukla tüm tedavi uygulamaları palyatif amaçlıdır. Ortalama yaşam süresi sadece 26-32 haftadır, nörolojik bulgular geliştikten sonra tedavi edilmeyen hastalarda ise ortalama yaşam süresi 1 aydır. Şimdiye kadar, metastatik beyin hastalığı olan hastalarda en etkili tedavi konusunda bir fikir birliği yoktur. Tümör histolojisi, primer hastalığın durumu, beyin lezyonlarının sayısı, lezyonların boyutu ve performans durumu gibi birçok faktör bu hastaların sonuçlarını etkileyebilir ve bu nedenle optimal tedavi bu faktörler göz önünde bulundurularak her hasta için ayrı ayrı tasarlanmalıdır [2, 30]. Beyin metastazı olan kanser hastalarında merkezi sinir sistemi hastalığını kontrol altına almak, nörolojik fonksiyonları maksimal düzeyde koruyarak semptomların iyileştirmek,

kanserin nörolojik komplikasyonlarına bağlı ölümleri önlemek, yaşam kalitesini korumak için etkili ve güvenli bir tedavi düşünülmelidir. Hiçbir tedavi yöntemi tek başına yeterli olmayıp etkileri de komplikasyonsuz değildir [2, 79, 129, 130]. BM'lerde tedaviye karar verirken birçok parametrenin özenle değerlendirilmesi gerekmektedir. Bunlar; lezyonun hacmi ve sayısı, lokalizasyonu ve eloquent alanlara komşuğu; primer kanserin histolojik tipi ve radyo-kemoterapi duyarlılığı; hastanın yaşı, genel durumu, nörolojik muayenesi, tedaviden beklentisi ve kararı; sistemik yayılım durumu ve önceki tedavilere yanıtı, primer kanser ile BM tanısı arasındaki geçen süredir [2,16, 129, 130].

BM'ler, kanser hastalarında ciddi bir morbidite ve mortalite nedeni olup, varlığı onkolojik bir terminal olay olarak değerlendirilmektedir. BM'lerin tedavisi tümöre yönelik kesin tedavi seçenekleri ve semptomları azaltmaya yönelik destekleyici tedavi seçenekleri olarak ikiye ayrılabilir. Destekleyici tedavi seçenekleri arasında glukokortikoidler, antiepileptik ilaçlar ve antikoagülanlar sayılabilir [115, 277]. Asıl tedavi seçenekleri ise; cerrahi, tüm beyin radyoterapi (TBRT), sistemik kemoterapi, hedefe yönelik biyolojik ajanlar ve stereotaktik radyocerrahi (SRC) veya bunların değişik kombinasyonlarından oluşur. Hangi tedavi seçeneğinin ya da kombinasyonun hasta için uygun olduğuna karar verilmesi tedavinin en önemli aşamasıdır [2, 30].

Bu hastalar için, tedavilerindeki belki de en büyük kısıtlama tedavi seçim aşaması olabilir. Günümüzde hala BM tanısı alan bir grup hasta, lokal agresif tedavi seçenekleri daha uygun olabilecekken TBRT ve/veya kemoterapi ile takibe yönlendirilebilmektedir. Her ne kadar BM tanısı alan hastaların büyük çoğunluğunda farklı tedavilere rağmen beklenen yaşam süresi kısıtlı olsa da cerrahi ve/veya SRC gibi lokal agresif tedaviler ile palyasyon sağlanabilmekte, var olan nörolojik defisitte daha hızlı bir düzelmeye şansı oluşmakta, TBRT'nin muhtemel bir yan etkisi olan bilişsel fonksiyonlarda bozulma çok daha az görülmekte ve sonuç olarak hastanın yaşam kalitesinde artma olmakta veya kötüye gidiş yavaşlamaktadır [2, 30]. Seçilmiş olgularda cerrahi uygulanmalı ve ardından gerekirse RT eklenmelidir. Kemoterapi ise KBB'den geçişi kısıtlılığı olduğu ancak belirli tümör tiplerinde uygulanabilmektedir [52].

### **2.7.1 Medikal tedavi**

BM'lerde medikal tedavinin birincil amacı tedaviye karar verene kadar ödem ve kafa içi basıncı azaltarak zaman kazanmak, nörolojik defisitte düzelmeye sağlamaktır. Hiçbir

tedavi almayan hastalarda yaşam süresi ortalama 1 aydır, ödem kontrol eden ilaçlarla bu süre sadece iki katına çıkarılabilir. TBRT buna ilave edilirse ortalama yaşam süresi 3-6 aya uzayabilir. Cerrahi tedaviyi takiben TBRT uygulandığında ise bu süre 1 yılı aşar. Cerrahi önerilmeyen çoklu metastazlarda SRC yöntemleri daha iyi sonuçlar verebilmektedir. Aynı sonuçlar tek metastazlarda da görülmüştür [6, 11, 131]. Steroidler ile hızlı klinik yanıt alınabileceği ve faydası hastalar için % 60-75 arasında değişkenlik gösterebilmektedir. Dekametazon (veya eşdeğer steroid) başlangıç dozu olarak 16-24 mg/gün şeklinde kullanılması, semptomlar kontrol altına alındıktan sonra en düşük etkili doza inilmesi ve RT boyunca kullanımının devam edilmesi önerilmektedir. Steroidler hem akut hem de kronik dönemde etkili olmasına karşın, yararı geçicidir. Maksimum klinik cevap alabilmek için mümkünse steroid tedavisine cerrahi veya diğer tedavilerden 3-5 gün önce başlamak gerekir. Osmotodavi genellikle intrakranial basınç artışı kontrolünde acil olarak kullanılabilir. Bu amaçla hiperosmolar solüsyonlar ve diüretikler kullanılabilir [132].

### **2.7.2 Kemoterapi ve immünoterapi**

BM'li hastalarında kemoterapi ile tedavinin hedefi; sağkalımı uzatmak, tümör ile ilgili semptomları hafifletmek veya önlemek ve yaşam kalitesini iyileştirmektir. Kemoterapinin amacı semptomları hafifletmek olsada, paradoksal olarak olgularda yorgunluk, bulantı, kusma, ishal, saç dökülmesi, mukozit, nötropeni ve nöropati gibi toksisitelere sebep olabilir [6, 132, 133]. KBB'yi kemoterapik ajanların geçmesinin zorluğu sebebi ile kemoterapi BM'lerde çoğunlukla çok etkili değildir [133]. Ancak BM nedeniyle tedavi ihtiyacı olan hastalarda ölümün en sık nedeni sistemik hastalıklarının ilerlemesi olduğundan, primer hastalığın kemoterapi ile kontrol altına alınması gereklidir [133, 134]. Günümüzde kemoterapötik ajanlar germ hücreli tümörler ya da küçük hücreli akciğer kanseri gibi yüksek derecede kemoterapi sensitif tümörler dışında beyin metastazı tedavisinde rutin olarak kullanılmamaktadır [133]. Kemoterapi cevabını öngörmeye primer tümörün kemoterapi sensitivesi ve ajanın kan-beyin bariyeri permeabilitesi önemli iki faktördür. Bu konuda hedefe yönelik ajanların da bulunduğu çeşitli biyolojik çalışmalar devam etmektedir. Sonuç olarak kemoterapi, sistemik kanser tedavisinde önemli ilerleme kaydetmiştir, fakat beyin metastazlarının tedavisinde farmakolojik etkinlik yetersizdir.

### 2.7.3 Cerrahi

Günümüzde seçilmiş hastaların tedavisinde cerrahi önemli yer tutar. Tek metastatik kitlelerde öncelikle tercih edilen yol cerrahi tedavidir. Böylelikle primeri belli olmayan kitlelerde histolojik tanı koymak da mümkün olacaktır. Radyorezistans olduğu bilinen kitlelerde cerrahi tedavi daha fazla tercih edilebilmektedir [2, 11, 130, 132, 135]. Cerrahi tedavisine karar verilirken, primer tümörün patolojisi ve evresi; lezyon sayısı, yeri ve boyutu önemli rol oynar. Ayrıca hastanın genel durumu, yaşı ve nörolojik tablosu, leptomeningeal tutulum da cerrahi kararını etkiler [2, 6, 135, 136]. İntrakranial basınçta artış bulguları, belirgin perilezyonal ödem ve nörolojik defisit varlığı cerrahi tedavi tercihini kuvvetlendirir [6, 135]. Metastazektomi, lezyonun kitle etkisine ve kafa içi basınç artışına bağlı bulgularda çok hızlı bir düzelme görülebilmektedir. Tek veya soliter BM'lerde cerrahi uzun süredir kullanılmaktadır; sağkalım süresini artırdığını gösteren bir çok çalışma mevcuttur ve cerrahi ile tümör total çıkarılabilirse belirli hastalarda kür ihtimalinden bahsedilmektedir [137]. Multiple BM'lerde çoğunlukla cerrahi tercih edilmez ancak, kafa içi basınç artışına neden olan, hayati fonksiyonları etkileyen lezyon için; histopatolojik tanı gereksinimi varlığında ve bir kraniotomi ile iki veya daha fazla metastaz eksizyonu yapılabilecekse cerrahi kararı verilebilmektedir. Buna primer hastalığın kontrol altında olması da eklenebilir. Multiple metastazlı olan hastalara uygulanan cerrahi tedavinin tek metastazlı hastalara uygulanan cerrahi tedavi kadar etkili olduğu bulunmuştur [5, 137, 138].

Metastaz rezeksiyonu lokal bir tedavidir ve oluşması muhtemel yeni metastazları engelleyememektedir. Lezyonun total çıkartılamaması durumunda veya var olan ancak görüntüleme teknikleri ile saptanmayan mikrometastazlar ve yeni metastaz oluşma ihtimaline karşı ek tedaviler gerekebilir [139]. Bu nedenle cerrahi sonrası erken dönemde TBRT verilir, bu ikili kombinasyon sistematik hastalığı olmayan ve iyi prognoza sahip hastalarda tek başına uygulanan TBRT'den daha etkin sonuç verir [115, 130, 140]. BM'ye bağlı semptomları olan hastalarda radyoterapi palyatif yarar sağlamaktadır. Semptomlarda radyoterapi ile olguların % 70- 93'ünde gerileme sağlanabilir de her hastada uzun süreli olmayabilir. 6 ay sonra hastaların yaklaşık % 20'sinde 1 yıl sonra da % 35'inde semptomlar tekrar ortaya çıkabilmektedir [141].

Metastatik beyin tümörlü hastalarda uygulanacak olan cerrahi tedavinin %4-40 mortalite oranı vardır. Cerrahinin tüm riskleri açısından hasta ve hasta yakınları bilgilendirilmelidir. Cerrahi öncesi planlama yapılmalı ve cerrahi esnasında

nöronavigasyon, intraoperatif ultrasonografi, perioperatif MRG gibi yardımcı yöntemler imkan dahilindeyse kullanılmalıdır [11, 130, 138].

#### **2.7.4 Radyoterapi**

Radyoterapi, iyonize radyasyonun hedef dokuya (kansere) doğrudan ya da dolaylı olarak uygulanmasıyla tedavi olanağı sağlayan bir yöntemdir. Radyoterapideki temel amaç, belirlenen hedef dokuya maksimum etkin dozu verirken, etrafındaki sağlıklı doku ve kritik organlara olabilecek minimum dozu vererek korumaktır. Cerrahinin uygun olmadığı lezyonlarda; sağlam beyin dokusuna en az hasarı vermeyi amaçlayan tedavi arayışı ve teknolojik gelişmeler neticesinde ortaya çıkan radyocerrahi etkinliğini gösteren kanıtlar ve kullanımı her geçen gün artmaktadır [2, 130, 140].

BM'li hastalar için TBRT uzun zamandır standart bir tedavi olmuştur. TBRT'de kullanılan doz ve fraksiyon değerlerini karşılaştıran çalışmaların neticesinde; ortalama sağkalım, nörolojik fonksiyon skoru ve lokal kontrol değerleri açısından en iyi doz şeması olarak 3 Gy dozun 10 fraksiyonda toplam 30 Gy önerilmektedir. SRC tek veya oligo metastazı olan ve genel durumu iyi olgularda TBRT'ye tercih edilmektedir [2, 136 139, 140]. Bununla birlikte cerrahi sonrası lezyonun total eksize edilememesi ve yeni metastaz oluşma ihtimaline karşı ek tedavi uygulamaları gerekmektedir. Ameliyat sonrası TBRT'nin tedaviye eklenmesi, lokal kontrolü sağlamakta ve görülmeyen mikrometastazları tedavi edebilmektedir [64]. Tek başına SRC kullanıldığında ise lokal kontrolü artırmanın yanında TBRT sonrası oluşabilecek yan etkiler gözlenmemektedir [140]. TBRT sonrasında metastazı tekrarlayan hastalarda SRC kullanılabilir [2]. Performans durumu iyi ve yaşam beklentisi yüksek hastalarda; 1-4 beyin metastazına kadar SRC tek başına veya TBRT kombinasyonu ile birlikte kullanılabilir ancak 5 veya daha fazla metastazı olan hastalarda SRC ile ilgili veriler yetersizdir [142]. BM'ler fiziksel ve biyolojik karakterlerinden dolayı radyocerrahi için ideal lezyonlardır: Genellikle BT'de ve MRG'de görüldüğü gibi sınırları belirgin ve tespit edildiğinde küçüktür (< 3 cm); çoğunlukla çevre parankimi iterler ve doku hasar olasılığı azalır; kontrastlanan alan dışında hücresel düzeyde yayılım ihtimali azdır. Bu sebeplerle tüm lezyonun radyocerrahi tedavi alanı içerisinde kalması sağlanabilir [132, 142].

## 2.8 Tedaviye Yanıt Ve Prognostik Faktörler

BM'ler yukarda bahsettiğimiz gibi en sık karşılaşılan SSS tümörü ve kanserin nörolojik komplikasyonları arasında birinci sırada yer almaktadır. [2, 6, 130]. Bu noktada en önemli husus ise tedaviye karar vermektir. Tedaviye karar verme, gereksiz tedavi uygulamalarından kaçınılması ve ortak bir dili konuşmak açısından prognostik faktörlerinin belirlenmesi ve bilinmesi önemlidir. BM'lerin prognozu kötüdür ve nörolojik fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak hastaların yaşam kaliteleri önemli derecede etkilenir. Bu durumda beyin metastazlarına sahip olan hastaların prognozu öncelikle sistematik hastalığın durumuna ve tedavinin etkinliğine bağlıdır [6, 16]. Yaş, hasta performansı, primer kanserin durumu ve yaygınlığı, mevcut metastazların sayısı ile değişmekle birlikte beyin metastazlı hastalarda ortalama sağkalım 2-15 aydır [107, 143].

BM'lerde, farklı tedavi seçeneklerini ve etkinliğini araştıran prospektif çalışmalarda, tedavi yanıtının objektif olarak değerlendirilebilmesi gerektirmektedir. Tedavi yanıtının ve etkinliğinin belirlenmesi ihtiyacı, bu alanda bazı kriterlerinin ortaya çıkmasına yol açmıştır. Hastaların demografik ve klinik özelliklerine göre prognoz analizlerinin yapıldığı pek çok çalışma vardır. İlk olarak 1981 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından tedavi yanıt kriterleri yayınlanmıştır, 1990'da özellikle yüksek dereceli glial tümörlü hastalar için, tedavi yanıtını ve progresyonu değerlendirmede MacDonald kriterleri bildirilmiştir. MacDonald kriterlerinde, MR bulgularına ve klinik bulgulara dayanılarak tümörün tedaviye yanıtı başlıca 4 kategoriye ayrılmaktaydı: Tam yanıt, kısmi yanıt, stabil hastalık ve progresyon. Ancak lezyonun sadece kontrastlanan komponentinin değerlendirilmeye alınması ve bu kontrastlanan bölgenin sadece iki boyutta ölçülmesi; multipl tümöral odakların, rezeksiyon kavitelerinin ve kistik alanların dikkate alınmayarak, ölçüme dahil edilmeleri; tedaviye sekonder olabilecek değişikliklerin tanımlanmaması gibi bazı kısıtlılıkları mevcuttu [144]. Bu kısıtlılıklar nedeniyle 2000 yılında 'Solid Tümörlerde Cevap Değerlendirme Kriterleri' (RECIST= Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) yayınlanmıştır, daha sonrasında ihtiyaçlara ve kriterlerin klinik gereksinimleri karşılamamasına bağlı olarak RECIST kriterlerinde güncellemeler gerçekleştirilmiştir (Tablo 2.4) [145, 146].

**Tablo 2.4 : Tümör yanıt değerlendirme kriterleri [144-146].**

	WHO (1979)	RECIST 1.1 (2009)
<b>Ölçüm Stratejileri</b>		
Görüntüleme	Spesifik bir görüntüleme yöntemi belirtilmemiş	BT, MR ve göğüs grafisi önerilmiş, FDG-PET yeni lezyonların belirlenmesi için istenmiş
Ölçüm	UÇ × KÇ (cm <sup>2</sup> )	Lenf nodu dışı lezyonlar için UÇ (cm) lenf nodları için KÇ
Ölçülebilir lezyonlar	Minimal lezyon boyutuna ait sınır yok	BT ile lenf nodu dışı lezyonlar <sup>b</sup> için UÇ ≥10 mm, lenf nodları için KÇ ≥15 mm
Hedef lezyonların sayısı	Belirtilmemiş	Toplam 5 lezyon. Bir organda en fazla 2 lezyon
<b>Yanıt kriter kategorileri</b>		
Tam yanıt (TY)	Bilinen tüm lezyonların kaybolması	Boyutu (KÇ) <10 mm lenf nodları dışında tüm hedef ve hedef olmayan lezyonların kaybolması
Parsiyel Yanıt (PY)	≥ %50 küçülme	≥ %30 küçülme
Stabil Hastalık (SH)	TY, PY veya PD olmayan	TY, PY veya PD olmayan
Progresif Hastalık (PH)	Hedef lezyonda ≥ %25 boyut artışı, yeni lezyon, veya hedef olmayan lezyonda PH	Hedef lezyonda ≥ %20 ve en az ≥5 mm boyut artışı, yeni lezyon, veya hedef olmayan lezyonda PH

Kısaltmalar: UÇ: Uzun çap, KÇ: Kısa çap, TY: Tam yanıt, PY: Parsiyel yanıt, PH: Progresif hastalık

2008 yılında Response Assessment in Neuro-Oncology (RANO=Nöroonkolojide yanıt değerlendirilmesi) grubu oluşturulmuştur. 2011 yılında da BM'lere yönelik alt grubu RANO-BM oluşturularak, klinik çalışmalarda beyin metastazlarının radyolojik değerlendirilmesi konusunda yeni standart kriterler önermişlerdir. Bunlar RECIST kriterlerinde olduğu gibi lezyonun tek boyutunun ölçülmesine dayanmaktadır. Lezyonun 'ölçülebilir lezyon' olarak değerlendirilebilmesi için minimum 10 mm çapında olması gerekmektedir. RANO-BM'ye göre, lezyon tedavi başlamadan maksimum 4 hafta içerisinde bazal ölçümler açısından değerlendirilmelidir ve lezyon çevresinde bulunan kistik alan ya da rezeksiyon kavitesi ölçüme dahil edilmemelidir. Tedaviye yanıtın değerlendirilmesi için önerilen süre, 6-12 hafta olmakla birlikte; yöntem ve klinik gereksinime bağlı daha uzun ya da daha kısa zaman aralıklarının seçilebileceği de belirtilmiştir. Öncesinde tedavi edilmiş lezyonlar için yöntem belirtilmelidir. Birden fazla lezyon varlığında maksimum 5 lezyonun hedef lezyon

olarak belirlenmesi önerilmektedir. Hedef lezyonlar boyutlarına, boyut artışına, lokal tedavi alma durumlarına göre seçilmelidir. Bunun dışındaki lezyonlar hedef olmayan lezyonlar olarak dokümanite edilmelidir. Hedef olmayan lezyonlarda boyut ölçümü gerekli değildir (Tablo 2.5) [146].

**Tablo 2.5 :** Nöroonkoloji beyin metastazları yanıt değerlendirme kriterleri (RANO-BM) [146].

	Tam yanıt	Kısmi yanıt	Stabil hastalık	Progresif hastalık
Hedef lezyonlar	Yok	Başlangıca göre toplam en fazla azalma	Başlangıca göre en az azalma	En düşük mesafeye göre toplam en mesafede $\geq$ %20 artış
Hedef dışı lezyonlar	Yok	Stabil veya iyileşme	Stabil veya iyileşme	Kesin progresif hastalık
Yeni lezyon(lar)	Yok	Yok	Yok	Var
Klinik yanıt	Yok	Stabil veya azalmış	Stabil veya azalmış	Uygulanamaz
Kortikosteroidler	Stabil iyileşme	veya Stabil iyileşme	Stabil veya iyileşme	Kötü
Yanıt şartı	Tümü	Tümü	Tümü	Herhangi biri

Kullanımı daha kolay ve anlaşılır diğer bir prognostik sınıflama ise, radyoterapi onkoloji grubu (RTOG) tarafından oluşturulan ‘recursive partitioning analizi’ (RPA) sınıflamasıdır [147, 148] (Tablo 2.6). BM’lerde stereotaktik radyocerrahi için de bazı prognostik kriterler belirlenerek tahmini sağkalım sürelerini belirten ‘Radyocerrahi için skor indeks (SIR)’ oluşturulmuştur: Bu indekse göre ortalama sağkalım süreleri; 0-3 puan için 6 aydan az, 3-7 puan için ortalama 7 ay, 8-10 puan için ise ‘uzun süre’ (çalışmada 31 ay bulunmuş) (Tablo 2.7) [149]. Bunlar dışında beyin metastazlarının sayısı kadar primer tümör tipinin de prognoz için önemli olduğunun kabul edilmesiyle ‘Tanıya özgü dereceli prognostik değerlendirme (DS-GPA)’ skorlaması ve metastaz oluşum hızını kriter alan ‘Beyin metastaz hızı (BMV)’ skorlaması da mevcuttur. Bu iki skorlamanın; daha güncel ve genel sağkalım için ana belirleyici olduğu belirtilmekle birlikte, rutin pratikte yaygın kullanımı için randomize kontrollü çalışmalar gerekmektedir [131, 150].

**Tablo 2.6 :** RPA sınıflamasına göre prognostik faktörler [147,148].

Sınıf	Kriterler	Ortalama Sağkalım
Sınıf I	Yaş <65, KPS $\geq$ 70, primer kontrolde, ekstrakraniyal metastaz yok	7.1
Sınıf II	Sınıf I ve II dışındakiler	4.2
Sınıf III	KPS <70	2.3

**Tablo 2.7 :** Skor İndeks Radyocerrahi (SIR) için prognostik değişkenler [149].

	0	1	2
Yaş	$\geq$ 60	51-59	$\leq$ 50
KPS	$\leq$ 50	60-70	>70
Sistemik hastalık durumu	PH	KR-SH	TR-HKY
En geniş lezyon(cm <sup>3</sup> )	>13	5-13	<5
Lezyon sayısı	$\geq$ 3	2	1

Kısaltmalar: PH: Progresif hastalık; KR: kısmi remisyon; SH: Stabil hastalık; TR: tam klinik remisyon; HKY: Hastalık kanıtı yok.

Metastatik beyin tümörlü hastalarda nörolojik tablo, genel sağlık durumunu gösteren KPS (Tablo 2.8), metastaz sayısı, yerleşim yeri ve boyutu tedavi yönteminin belirlenmesindeki en önemli faktörlerdir. KPS, bir hastanın fonksiyonel durumunu,% 100 (hastalık kanıtı yok, semptom yok) ile% 0 (ölüm) arasında değişen yüzde değerleriyle ilişkili kapsamlı 11 noktalı bir ölçek olarak tanımlar. Ayrıca, KPS tedavi yöntemine karar vermede rol gösterici olmasının dışında, tek başına bağımsız olarak çoğu kanserde prognostik bir faktör olarak kabul edilmektedir [151]. Beyin metastazı ile takipli hastalarda nörolojik komplikasyonların sadece metastaza bağlı oluşmayacağı bilinmeli; daha basit ve tedavi edilebilir etiyojiler araştırılmalıdır. Nörolojik komplikasyonlar kanserli hastalarda yaygındır. Bunun nedeni beyin metastazının doğrudan etkisi, omurilik ve sinir kökü basısı, leptomeningeal hastalık olabileceği gibi; toksik, enfeksiyöz veya metabolik anormalliklerden, ilaçların yan etkilerinden, immünosupresyon ortamında artan enfeksiyondan da kaynaklanabilir.

**Tablo 2.8 : Karnofsky performans skoru [151].**

Puan	Durumu
100	Normal; şikayet yok; hastalığa ait semptom yok
90	Normal aktivitelerini yapabiliyor; hastalığa ait minör semptomlar ve bulgular
80	Efor harcayarak normal aktivite; hastalığa ait bazı semptom ve bulgular
70	Kendi işini görebilir; normal aktivite ya da aktif çalışma yapamaz
60	Nadiren yardıma ihtiyaç duyar, ancak kendi ihtiyaçlarının çoğunu halleder
50	Önemli derecede yardıma ihtiyaç duyar ve sık tıbbi yardım
40	Sakattır; özel bakım ve yardıma muhtaçtır
30	Hastane bakımı gerektirecek şekilde sakat, fakat ölüm riski yoktur.
20	Çok hasta; hastaneye yatış gereklidir; aktif destek tedavisi gereklidir
10	Ölüm çok yakın; ölümcül olay hızla yaklaşmaktadır
0	Ölü

Kanser hastalarında serebrovasküler hastalıklar (iskemik veya hemorajik inme), metastazlardan sonra SSS lezyonlarının ikinci sebebidir. Kanser hastalarında hiperkoagülopatiyeye bağlı arteriyel ve venöz tromboembolizm riski artmaktadır [1]. Bu nedenle hastalarda profilaktik antitrombolitik tedavi seçeneği her zaman göz önünde bulundurulmalıdır. Kanserli hastaların ayrıca paraneoplastik nörolojik sendromlar (PNS) da görülebilir geliştirebilir. PNS; kanserin doğrudan, metastaz ya da tedavi yan etkisine bağlı olmayan, uzak etkisi ile ortaya çıkan, tümör tarafından aşırı eksprese edilen nöral antijenlere karşı gelişen immün yanıt sonucunda oluşur. PNS'lerin çoğu subakut ve ilerleyicidir. PNS'ler, bir kanserin saptanmasından veya nüksetmesinden önce klinik bulgu verebilir, serebral korteksten nöromusküler bileşkeye ve kasa kadar bir çok alanı etkileyebilirler [16].

Sistemik kanserlerin yayılımı ve diğer metastazlar, sağkalım süresi, önceki tedavilere yanıtı, düzenlenecek tedavilerde oluşabilecek toksisiteler de tedavi seçiminde göz önünde bulundurulmalıdır [2, 130, 132]. Metastaz sayısından çok, toplam tümör hacminin de prognoz üzerindeki önemi görülmüştür [6,140, 143,2]. Tedavi kararında; genel sağkalım oranı, yaşam kalitesi, oluşabilecek toksisiteler, tedavi edilen metastazın lokal kontrolü ve alan dışındaki yeni metastazların oranı önemli etkenler arasındadır [139].

### 3. RADYASYON TEDAVİSİ

Radyasyon, alfa, beta, gamma gibi elektromanyetik dalgalar halinde bir enerji yayılımı olup, yeryüzünde hayatın başlangıcından beri mevcuttur. Ancak radyasyonun tanınması, sağlık ve enerji sektöründe kullanılması uzun yıllar almış, son yıllarda teknolojiye gelişmelerle kullanımı hız kazanmıştır [152]. Radyasyonun tanı ve tedavide kullanılması, tıp dünyasında çığır açmıştır. İyonlaştırıcı radyasyon (IR) genel olarak lokalize bir hedefi, hızla çoğalan kanser hücrelerinin radyasyonun neden olduğu DNA hasarına normal dokudan daha duyarlı olması temelinde, kanseri tedavi etmek için kullanılmaktadır. Radyoterapi, çevredeki sağlıklı doku üzerindeki toksik etkileri en aza indirerek tümörler üzerindeki etkisini maksimize etmeyi, iyileşme oranlarını artırmayı, hayatta kalma süresini uzatmayı ve yaşam kalitesini iyileştirmeyi amaçlar [153].

Radyoterapi, çok sayıda kanser türünün tedavisinin temelini oluşturan ve multidisipliner tedavi yaklaşımlarının önemli bir parçasıdır, cerrahiye uygun olmayan veya cerrahiye reddeden hastalar için uygun ve etkili bir yöntemdir. Radyoterapi, X ve  $\gamma$  (gama) gibi ışınlarını elektromanyetik dalgalar yoluyla iletme prensibine dayanmaktadır. Işınları, elektron tabancası ve magnetron aracılığıyla elektron akışını hızlandırarak ve metal bir hedefe çarptırılarak üretilir. Yüksek enerjili foton insan dokusunda ikincil elektron üretir. Oluşan elektronlar hücre bölünmesinde DNA'da hasara neden olmaktadır [153, 154].

#### 3.1 Tarihçe

Radyasyonun ilk ışınlarının tarif edilmesi, 1895'te Alman fizikçi Wilhelm Conrad Röntgen tarafından olmuştur. Anot ve katottan oluşan bir deney tüpü üzerinde floresan adı verilen ışık parlamaları üzerine çalışan Röntgen, deneyi biraz değiştirip tüpü siyah bir karton ile kaplamış ve ışık geçirgenliğini anlayabilmek için odayı karartıp deneyi tekrarlamış. Deney tüpünden 2 m uzaklıkta baryum platinocyanite sarılı olan kağıtta bir parlama fark etmiş ve deneyi her tekrarladığında aynı olayı gözlemlemiştir.

Bunu mat yüzeyden geçebilen yeni bir ışın olarak tanımlamış ve matematikte bilinmeyi simgeleyen X harfini kullanarak “X ışını” adını vermiştir. Daha sonraları bu ışınlar, “Röntgen ışınları” olarak anılmıştır [155]. O gün, Röntgen, X ışınlarının aynı zamanda tıbbi tanısal potansiyellerini de fark etmiş, arkadaşı Alman anatomist August Kölliker ile birlikte, floresan ekran arasına bir elin tutulması yoluyla el kemiklerinin görünür hale gelebileceğini göstermişlerdir [156]. Radyasyon tedavisi (RT), X-ışınlarının bulunmasından sonra, 1896’da Fransız fizikçi Victor Despeignes ve 1897’de Avusturyalı radyolog Leopold Freund tarafından bu ışınların terapötik amaçlı ilk kez kullanılması ile başlamıştır. 1896’da Amerikalı beyin cerrahı Harvey Cushing bir hastanın servikal omurgasına takılan kurşunun yerini ortaya çıkarmak için bir radyografik cihaz kullanmıştır. İlk başarılı radyoterapi, Freund ile çalışan Schiff tarafından lupus vulgaris olgusunda uygulanmıştır. Bunun dışında X ışınları o dönemde, diğer karsinomlarda, lösemi tedavisinde, bakterisidal etkisi olduğu düşünülerek tüberkülozda ve hatta epilepsi tedavisinde denenmiştir [156-158].

1898’de radyoaktivite teorisini geliştiren ve ilk radyoaktif izotoplardan polonyum ve radyumu izole eden Polonyalı fizik ve kimya mühendisi Marie Curie’nin yaptığı çalışmalar ışığında, çalışmalar radyoaktif izotopların tümör tedavisinde kullanılmasına yönelmiştir. Radium, çok sayıda farklı yolla uygulanabildiği için, X ışınlarının yeterli olmadığı hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. İlk radyasyon hastalığı, X-ışınlarının keşfinden 6 ay sonra tanımlanmıştır. Marcuse, bu ışınların epilasyon ve dermatit gibi istenmeyen ve zararlı yan etkileri olduğunu ve bunların belli bir süre sonrasında düzeldiğini söylemiştir. Kienböck, tavşanlar üzerinde yaptığı çalışmada, tüp ile cilt arasındaki mesafeyle radyasyonun biyolojik etkilerinin azaltılabileceğini, dolayısıyla etkilerin X ışınlarının dozuyla ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu bilgiler ışığında, dozun zamana bölünmesi, kümülatif etki, hedef-cilt-uzaklık, radyasyon tedavisi kavramlarını içeren X ışınlarının etkilerinin genel kurallarını yayınlamış; tanısal amaçlı kullanılan X ışınlarının yan etkilerinden korunmak için kurşun kalkan kullanımı, gerektiğinden fazla maruz kalınmaması gibi uyarılarda bulunmuştur. 1901 yılında Fransız fizikçi Becquerel, cebinde unuttuğu radyumun birkaç hafta sonra vücudunda eritem ve ülserasyon yarattığını bildirerek, sağlık fiziğine ve radyum kanser tedavisine katkıda bulunmuştur. Benzer şekilde Madam Curie de, uzun süreli radyasyona maruz kalmaya bağlı aplastik anemi sonucu hayatını kaybetmiştir. “Tıbbi elektriğin babası” olarak görülen Jean Alban Bergonié, Röntgen’in X ışınları ve

Curie'nin radiumu buluşu ile terapötik ve tanısal kullanım amaçlı birçok cihaz geliştirmiştir. Bergonié ve histolog Tribondeau ratların ışınlanmış testislerinde yaptıkları bir çalışmayı yayınlamışlar; bu çalışmada spermatogonyanın en radiosensitif hücreler olduğunu, tümör hücreleriyle normal sağlıklı hücrelerin ışından farklı etkilendiklerini göstermişlerdir. Bu verilerin ışığında Bergonié ve Tribondeau Kanunu'nu ortaya koymuşlardır: Buna göre üreme aktivitesi daha fazla olan ve diferansiyasyonu az olan hücreler X ışınlarına daha duyarlı olmaktadır. Ayrıca, ışının öldürmediği hücreler, tümör oluşumunu açıklayacak şekilde ileri evrimleşme gösterebiliyor ve çoğalma davranışlarını değiştirebiliyorlar. Bergonié, radyasyona bağlı sağ işaret parmağında oluşan dermatiti, kendi kendine diatermi ile tedavi etmiş; ancak yine de önce eli, sonra da kolunun ampute edilmesi gerekmiştir. Sonunda akciğer metastazına yenik düşmüştür. 1901'de Röntgen, 1903'de Becquerel, Marie ve Pierre Curie Nobel Fizik Ödülü ile onurlandırılmıştır. İkinci dünya savaşında, Hiroşima ve Nagazaki'ye atılan atom bombalarının etkilerinin incelenmesi ile radyoterapinin uzun dönem etkileri daha iyi anlaşılmıştır [155-159].

Stereotaktik radyocerrahi kavramı ilk olarak bir nörofizyolog ve cerrah olan Victor Horsley ve bir matematikçi olan Robert H. Clarke tarafından 1908 yılında maymun beyninde belirledikleri bir hedef noktayı kartezyen koordinat sisteminde lokalize etmeyi sağlayan bir cihaz tasarımları ile başlamıştır. Bu araştırmacılar, maymun beyninde bugün kullanılabilecek şekilde fiksator bir çerçeveye anatomik yapıları göz önüne alarak stereotaktik bir atlas oluşturmuştur. Daha sonra bir nörofizyolog olan Ernest Spiegel, cerrah Henry Wycis 1940'ların sonunda insan kullanımı için ilk stereotaktik cihazı duyurmuştur. Bu stereotaktik cihaz prosedür sırasında kafaya sabitlenmekte olup intraoperatif radiogramlar aracılığıyla intrakraniyal yapıları lokalize etmekteydi. Radyocerrahinin babası olarak bilinen İsveçli beyin cerrahı Lars Leksell; beyinde konvansiyonel cerrahi ile alınamayacak kadar küçük boyuttaki lezyonları tedavi etmek amacıyla stereotaktik teknik ile radyasyon salınımını kavramını birleştirmiştir. Horsley ve Spiegel'in çalışmalarının prensiplerine dayanarak nörocerrahi için uygun ilk stereotaktik aparatı 1947 yılında geliştirmiş, 1951 yılında da stereotaktik radyocerrahi konseptini tanımlamıştır. İlk cihazda, X-ışını tüpüne bağlı bir kolimatör ve başın üzerine yerleştirilen yarım daire şeklindeki bir stereotaktik aparat yardımıyla tanımlanmış intrakraniyal hedefe X-ışınları çapraz ateşle gönderilmekteydi. 10 yıl sonra Leksell, fizikçi Kurt Leiden ve Borje Larsson'nun

katılımıyla aynı işlemi proton ışınlarıyla yayınlamış [160, 161].  $\gamma$  (gamma) ışınları yayan kobalt-60 (Co60) kaynağının kullanımının keşfedilmesiyle 1968 yılında gamma knife tanımlanmış ve Stockholm’de kullanıma girmiştir [160]. Leksell Gamma knife cihazında 179 adet Co60 kaynağı dairesel olarak yerleştirilmiş ve yayılan gamma ışınlarının odaklanması sağlanmıştır. Leksell, yöntemin fonksiyonel nörocerrahiye uygun olabileceğini belirtmiş ve takip eden yıllarda Parkinson hastalığı, trigeminal nevralki, beyin tümörleri ve arteriovenöz malformasyonlar gibi beyin lezyonları için kullanılmaya başlanmıştır. 1972 yılında Steiner ve ark. radyocerrahi ile ilk arteriovenöz malformasyonu tedavi etmişlerdir. SRC, ilk zamanlarda kullanılırken hastanın başı invaziv bir çerçeve ile sabitlenmekteydi, teknolojik gelişmeler sayesinde “çerçevesiz stereotaktik teknikler” adı altında daha az invaziv olacak şekilde termoplastik maskeler de geliştirilmiştir. 1980’li yıllarda bilgisayar teknolojisine paralel olarak Lineer Akseleratör cihazları yaygınlaşmış ve kullanıma girmiştir. 1990’lı yıllarda ise Amerikalı beyin cerrahı John R. Adler tarafından lineer akseleratöre robotik kol yardımıyla farklı eksenlerde hareket imkânı kazandırılmış ve Cyberknife teknolojisi tıbbın kullanımına girmiştir [160, 161].

SRC, ilk başlarda cerrahinin uygun olmadığı veya ulaşılamayacağı düşünülen derin yerleşimli lezyonlar için kullansa da, zamanla seçili hastalarda ilk tercih tedavi seçeneği olmuştur. Aynı zamanda geleneksel tedavi şekli olan TBRT’nin lokal kontrolünü artırmak ve desteklemek amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde SRC, beyin metastazlı hastalarda TBRT’ye alternatif bir tedavi olmaktan ziyade, tek başına ilk tercih edilen radyoterapi yöntemi olmuştur [162,163].

### **3.2 Tüm Beyin Radyoterapisi**

Tüm beyin radyasyon tedavisi (TBRT) ilk olarak 1950’lerde rapor edilmiş ve 1980’lerde RTOG tarafından yapılan klinik çalışmalardan sonra tek veya çoklu beyin metastazlı olan hastalarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Genel olarak olarak leptomeninksler de dahil olmak üzere tüm beyin ışınlamasını içerir [117]. TBRT’nin bu hastalar arasında 1 yıllık sağkalım oranı %10-15, medyan sağkalımı yaklaşık 4 ila 6 aya kadar uzattığı bildirilmiştir [2, 117, 165]. TBRT, cerrahi rezeksiyon veya SRC’ye uygun olmayan hastalarda tedavi seçeneğidir, tümör hacmini küçülterek nörolojik nedene bağlı ölümü önlemeyi amaçlar ve MR’de görülmeyen mikrometastazları tedavi eder [130, 165]. KHAK’lı hastalarda tanı anında ve hastalığın seyri sırasında yüksek

oranda BM görülmektedir, profilaktik kraniyal ışınlama standart bir tedavi olup metastaz insidansını azalttığı, progresyonsuz sağkalım süresini artırdığı ve bu hasta grubunda genel sağkalım süresini iyileştirdiği bildirilmiştir [165, 166]. Bu nedenle KHAK teşhisi konan hastalarda TBRT önerilen bir tedavi seçeneğidir. TBRT çok sayıda BM varlığında en sık kullanılan tedavi seçeneği olup nörolojik semptomlarda ve sağkalımda fayda göstermektedir [165-167].

TBRT endikasyonları arasında; multipl beyin metastazı, oligometastazlar (1-3 adet), SRC için büyük lezyonlar (>4cm), geç TBRT başarısızlığı sonrası tekrar ışınlama, cerrahi ve SRC gibi tedavilere ek olarak lokal ve uzak kontrol oranını artırmak sayılabilir [140,143]. Ayrıca TBRT, fokal tedavilerden sonra intrakraniyal nüksler için salvage (kurtarma) tedavi amacıyla kullanılabilir [2, 135, 136,169, 170 ]. TBRT için önerilen doz 10 günlük fraksiyonlarda 30 Gy'dir. Düzey I sınıf I kanıtlar, standart TBRT dozu ile farklı doz/fraksiyon planları karşılaştırıldığında veya radyoterapi duyarlaştırıcı ajanlarla (ionidamin, metronidazol, misonidazol, moteksafin gadolinyum, bromodeoksiüridin, efaproksiral gibi) birlikte yapılan çalışmalar; anlamlı sağkalım farkı saptanmadığını, progresyonsuz sağkalım süresi ve komplikasyonları etkilemediğini göstermektedir [2, 165-170]. Radyoterapi de diğer tedavilerde olduğu gibi komplikasyonsuz değildir. TBRT, uzun dönem sağkalıma sahip hastalarda gecikmiş, progresif ve geri dönüşümsüz kognitif disfonksiyon ile ilişkili olarak düşünülmektedir [142]. Ancak tümör progresyonu ilişkili kognitif disfonksiyon, radyoterapi ilişkili nörotoksisiteden daha sık karşımıza çıkmaktadır. Diğer radyoterapi seçeneklerinde olduğu gibi TBRT sonrası da radyonekroz, psödoprogresyon görülebilir [6, 11, 171]. TBRT ilişkili nörotoksisiteyi azaltmak için memantin, donepezil gibi nöroprotektif ajanlar kullanılmakta olup bu ajanların başarısı tatmin edici değildir [172]. Ayrıca bu konuda yeni bir teknik olan hipokampüs koruyucu TBRT, hafızayı koruma ve yaşam kalitesini iyileştirme konusunda umut vaadedici olsa da bu konudaki çalışmalar devam etmektedir [173].

TBRT'den sonra %33-42'de ve radyocerrahiden sonra %39-52'de yeni uzak beyin metastazları bildirilmektedir, ancak TBRT genellikle sadece bir kez uygulanırken, radyocerrahi uzak nüksler veya TBRT'den sonra yeni metastazlar için tekrar tekrar kullanılabilir. Daha büyük metastazlar (>8-10 cc) cerrahi olarak çıkarılmalıdır, ancak daha küçük metastazlarda Gamma Knife radyocerrahisi, cerrahi tümör rezeksiyonu kadar etkili görünmektedir (düzey I kanıt) [139].

Uzak bölgelerde yeni beyin metastaz oluşum riski TBRT'den sonra yaklaşık %15 daha düşük olmasına rağmen, TBRT'nin tedavi edilen beyin metastazları üzerinde %24-55'te tam veya kısmi yanıtlarla yalnızca sınırlı lokal kontrol sağladığı gösterilmiştir. Bu nedenle sistemik prognozu iyi olan hastalarda TBRT'nin yetersiz olduğu düşünülebilir [139,174].

Radyasyon tedavisinde daha sofistike teknolojilerin tanıtılmasından sonra SRC, tek veya hatta multiple metastazı olan hastalar için önemli bir tedavi modalitesi haline gelmiştir ve bu hastaların tedavisine yönelik eğilim, seçilmiş hastalarda TBRT'den SRC'ye doğru kaymıştır [165, 175]. Ancak, kontrol edilemeyen primer hastalık veya yaygın sistemik metastaz nedeniyle kötü prognozu olan, fonksiyonel durumu kötü olan ve leptomeningeal yayılımı olan hastalar için TBRT hala geçerli bir seçenektir [168-170].

### **3.3 Stereotaktik Radyocerrahi**

Günümüzde nöroonkolojik hastalıkların tedavisinde yüksek etkinlikli ve minimal invaziv olan SRC, hedeflenen lezyona görüntüleme kılavuzluğunda yüksek doz radyasyonun tedavi amaçlı planlanması ve uygulanmasıdır. SRC'nin avantajı hedeflenen lezyona uygulanan radyasyon dozunu maksimize ederek, çevredeki normal beyin dokusuna uygulanan radyasyon dozunu minimize etmesidir. Böylece radyasyona duyarlı dokular korunarak, radyasyona bağlı komplikasyonlar azaltılır [2, 163, 165, 174, 176]. SRC sıklıkla yüksek tedavi dozları tek fraksiyonda hastaya uygulanmaktadır. Fraksiyone SRC ise tedavinin 2-7 seansta uygulanarak tek seansta uygulanan doz miktarının azaltılması ve radyoterapiye bağlı komplikasyonların azaltılmasını, ayrıca etkinliğinin artmasını amaçlar [174, 176]. Birden fazla seansta verildiği için 'stereotaktik radyoterapi'de denilebilmektedir [177]. Fraksiyone SRC büyük (>3cm) veya kritik yapıların yakınında olan lezyonlarda, tek fraksiyonlu SRC'ye tercih edilmektedir [2]. SRC çoklu metastazlarda dahi lokal kontrol sağlayabilmektedir. Beyin metastazları; düzgün sınırlı olmaları, genellikle erken tanı nedeniyle büyük boyutta olmamaları, çevre sağlam parankime hücresel boyutta yayılımının az olması ve lezyonun normal beyin dokusu içermemesi sebebiyle SRC tedavisi için ideal lezyonlardır [2, 11, 138, 139, 153, 170]. Tedaviye bağlı nörolojik ve kabul edilemeyen zararlardan kaçınmak ve uzun süreli lokal kontrol asıl amaçtır. Kritik anatomik yerlere yakın lezyonlara da, dikkat dahilinde uygulanabilmektedir.

Ancak tümör boyutu ve sayısı artıka tedavi etkinliği de azalmaktadır [176-182]. SRC'de tedavi dozunun artması etkinliği ve lokal kontrol oranını artıracadı gibi, radyonekroz ihtimalini de arttırır. Tümör boyutu ile radyonekroz riski arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir Patolojik bir son olan radyonekroz, radyolojik görüntülemeler ve biyopsi ile saptanabilir. SRC ile çoklu beyin metastazlarının tedavi uygulanmasında gereken toplam hacim ve tümör dokusu etrafında etkilenebilecek normal yapıların hacmi de artacağından, beyin toksisitesi riski de artmış olur [183]. Ayrıca SRC'in hedef dokuya tek fraksiyonda yüksek doz verilmesinden kaynaklı TBRT'ye kıyasla geçici yan etkileri (kızarıklık, kabarma) bulunmaktadır [174]. Radyocerrahi, TBRT'nin bir sonucu olabilecek bilişsel ve yaşam kalitesindeki bozulmaları önler (düzey I kanıt). Yüksek lokal etkinlik, serebral fonksiyonların korunması, kısa hastanede yatış ve sistemik kemoterapiye devam edebilme seçeneği, minimal invaziv bir yaklaşım olması, birden fazla lezyona aynı seansta uygulanabilmesi, ciddi komorbidite sahip hastalara da uygulanabilmesi SRC lehine faktörlerdir [184-186]. SRC tedavisinde hasta seçiminde hastanın yaşı, performans durumu, ekstrakranial tümör aktivitesi ve beklenen yaşam süresi göz önünde bulundurulmalıdır. 3 cm'den küçük tek beyin metastazı olan hastalarda, 2,5 cm'den küçük 2-4 beyin metastazı olan hastalarda ve yaşam beklentisi 3 aydan uzun olan hastalarda SRC tedavisi uygun olabilir. Ayrıca kötü performans durumuna sahip hastalarda, sistemik hastalık progresyonu olan hastalarda ve yaşam beklentisi 3 aydan kısa olan hastalarda palyatif amaçlı SRC tedavisi düşünülebilir [2, 184, 185].

Cerrahi teknikler ve görüntüleme yöntemlerinde gelişmeler görülse de, çoğu modern çalışma grubunda, beyin metastazı için yalnızca cerrahi uygulanması halinde rekürrens oranı halen %50'ye yakın bildirilmektedir [183]. Bu rekürrens oranının azaltılması için, TBRT'nin bilişsel fonksiyonlardaki kötü etkileri nedeniyle de, genellikle postoperatif tek seans SRC ya da fraksiyone SRC önerilmektedir [169, 170, 174]. Yüksek dozlarda uygulanan SRC için hastanın doğru konumlandırılması ve dozimetrik hassasiyetin kalite standartlarına uygun olması önem taşımaktadır [177].

Genellikle çapı 3 cm'den küçük olan tümörler için endikedir. Çünkü SRC'de radyasyon toksisitesi riski tümörün boyutu büyüdükçe, önemli ölçüde artmaktadır [181]. Stereotaktik radyocerrahi günümüzde 1-3 beyin metastazı olan hastalarda standart bir tedavi olarak kabul görmektedir. Hasta TBRT almış ve yeni beyin metastazları saptanmışsa dahi, SRC en etkin tedavi olarak kullanılabilir [180]. Hedef

ışınlanması sonucu oluşacak doz düşüşü önemlidir. Çünkü hedef dışında normal beyin dokusu da radyasyona maruz kalmaktadır. RTOG beyin tümörleri ve beyin metastazlarının tedavisinde gerekli doz şemalarını belirlemek için farklı çalışmalar yapmıştır. Bu çalışmaların sonucuna göre; primer beyin tümörlerinde ve beyin metastazlarında tedavi amacı ile verilecek maksimum güvenli doz tümör çapına bağlı olarak değişmektedir. Yukarıda 'Radyonekroz' başlığı altında belirtildiği gibi; 20 mm den küçük hedeflerde 24 Gy, 21-30 mm arası hedeflerde 18 Gy ve 31-40 arası hedeflerde 15 Gy olarak belirlenmiştir [177, 187]. Ayrıca tek tümörü olan hastalara kıyasla çoklu metastazı olan hastalarda çevresel dozlarda önemli bir artış olduğu saptanmıştır. Bunun sonucunda 5 veya daha fazla metastazı olan hastalarda reçetelenen dozun 1 Gy düşürülmesi tavsiye edilmiştir [187].

Beyin metastazı tedavisinde tarihsel olarak SRC, öncelikle TBRT tedavisi sonrası lokal kontrol amacıyla kullanılmaktaydı. RTOG tarafından yapılan çalışmada, TBRT ile TBRT-SRC kombinasyonu karşılaştırılmıştır. Tek beyin metastazı olan, performans durumu yüksek ve sistemik hastalığı kontrol altında olan hastalarda tedaviye SRC'in eklenmesinin sağkalımı artırdığı ve 6 aylık takipte performans durumunu iyileştirdiği ortaya konmuştur [188].

Yapılan bir diğer çalışmada 2-4 beyin metastazına sahip hastalarda TBRT ile TBRT+SRC karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada 1 yıl sonunda lokal tedavi başarısızlığı yalnızca TBRT tedavisi alan grupta %100 (median lokal tedavi başarısızlığı 6 ay) bulunurken, TBRT+SRC tedavisi alan hastalarda %8 (median lokal tedavi başarısızlığı 36 ay) olarak bulunmuştur. Ayrıca yalnızca TBRT tedavisi alan grupta ortalama sağkalım 7,5 ay, TBRT+SRC grubunda ise 11 ay olarak bulunmuştur [189]. Yapılan bir diğer retrospektif çalışmada 1-6 metastazı olan 463 hastada TBRT ile TBRT+SRC karşılaştırılmıştır; iki grup arasında bir aylık lokal kontrol oranları benzer olmakla birlikte ortalama sağkalımın SRC kombinasyonu ile belirgin arttığı bildirilmiştir [190].

SRC tedavisinin beyin metastazlarında tek başına etkinliği araştıran çalışmalar da mevcuttur. 1-4 beyin metastazına sahip 132 hastada yapılan bir çalışmada yalnızca SRC tedavisi ile SRC+TBRT tedavisi karşılaştırılmıştır. İki grup arasında ortalama sağkalım ve nörolojik sebepli ölüm oranında fark saptanmamakla birlikte, 12 aylık süreçte yeni gelişen metastatik beyin lezyonu oranı TBRT tedavisi almayan grupta anlamlı olarak fazla bulunmuştur [168]. SRC ile cerrahi tedaviyi karşılaştıran bir çalışmada sağkalım, nörolojik kaynaklı ölüm oranı ve lokal rekürrens oranlarında

anlamli farklilik saptanmamıştır. Histopatolojik tanı gereken olgularda, büyük, semptomatik veya posterior fossa metastazlarında, beyin sapı basısının olduğu durumlarda, hemorajik metastazı olan hastalarda ilk planda cerrahi tedavi düşünölmelidir. SRC ve cerrahi tedavi kombinasyonu; tek ve büyük semptomatik metastaz veya sınırlı sayıda küçük metastazın olduğu durumlarda kombine edilebilir. Postoperatif kaviteye yönelik SRC seçilmiş hastalarda efektif bir seçenek olarak görönsede beyinde yeni uzak metastaz riskini azaltmak konusunda etkisiz olarak değerlendirilmektedir [186-191].

Rekürren metastazlarda da SRC ile kurtarıcı tedavi, yüksek lokal kontrol oranlarına sahip bir tedavi seçeneğidir. TBRT sonrası rekürrenlerde uygulanan SRC tedavisinde 1 yıllık lokal kontrol oranları %70-90, 2 yıllık lokal kontrol oranları ise %60-84 olarak bildirilmiştir [217,218]. Daha önce SRC tedavisi alan hastalarda rekürren lezyonda SRC tedavisi uygulandığında radyonekroz riski %50'ye ulaşmaktadır [192,193]. SRC tedavisi sonrası lezyonların çoğu boyut olarak stabil kalmakta ya da küçölmektedir. Bazı lezyonlarda tedavi sonrası 3-6. aylarda boyutta artışı görölebilir. Yapılan bir çalışmada ilginç olarak tedavi sonrası boyut artışı izlenen hastalarda ortalama sağkalımın daha iyi olduğu bulunmuştur [80].

### **3.3.1 Radyocerrahi Yöntemleri**

Radyocerrahide tedavi amaçlı enerjiyi aktarmak için X ışını, gama ışını ve protonlar kullanılmaktadır. Gamma Knife radyocerrahisinde kullanılan gama ışınları radyoaktif bozunma tarafından oluşturulan radyasyon kullanırken, lineer hızlandırıcı (LINAC) radyocerrahisinde ise elektron tabancasıyla elektronları yoğun (atom kütle numarası yüksek) olan tungsten metallere çarpıtılarak üretilen X ışını radyasyonu kullanılır. Protonlar ise bir atomdan bir elektronun çıkarılması ve kalan protonun bir siklotronun veya bir senkrosiklotronun manyetik alanda hızlandırılmasıyla oluşturulur. X ve  $\gamma$  ışını ile yapılan radyocerrahiye kıyasla proton radyocerrahisi daha yeni bir teknolojidir [53]. Günümüzde Gamma Knife, LINAC (lineer hızlandırıcı) radyocerrahi, proton radyocerrahisi, Cyberknife gibi yaygın olarak kullanılan SRC yöntemleri mevcuttur [143].

### 3.3.1.1 Gamma Knife

Gamma knife (GK) radyocerrahinin klinik uygulamaları arasında; benign tümörler (menenjiom, hipofiz adenomu, schwannom), beyin damarsal hastalıkları (AVM, kavernom), malign tümörler (metastaz, glial tümörler) ve fonksiyonel hastalıklar (Parkinson, epilepsi, trigeminal nevralji) yer alır. GK radyocerrahi tekniğinde Co60 gamma ışınları kullanılmaktadır. Lezyonun türü, boyutu, önemli anatomik yapılara yakınlığı ve daha önceki radyocerrahi geçmişine göre verilecek doz hesaplanır. İşlem sırasında hedef doku üç boyut olarak çeşitli çapta kolimatörler yardımıyla izodoz eğrisi (genellikle %50'lik izodoz eğrisi) ile sardırılır. Radyasyona sensitif dokular özellikle korunur. Leksell Gamma Knife , intrakraniyal stereotaktik radyocerrahi için özel bir sistemdir. 201 adet Cobalt-60 kaynağı [Gama kaynakları 1mm çapında ve 20 mm uzunluğundadır. 40 cm mesafeden ortak bir odak noktasına (izomerkez) doğru radyal olarak hizalanır] aracılığıyla kaynaktan gelen ışınların izomerkezde kesişmesi için konumlandırılan hedef hacme yüksek radyasyon dozu verir. GK tedavisi, her biri stereotaktik alandaki konumu, kolimatör (bir ışın demetinin istenilen şekil ve çapta ışın demetine çeviren cihaz) ayarı (4 mm, 8 mm veya 16 mm) ve yoğunluk ile belirtilen bir veya daha fazla çekimden oluşur. Planlama sistemi, her ışınlanmanın konumunu, kolimasyonunu ve yoğunluğunu ayarlar, doz hızını, süresini ve hasta yüzeyi ile ışınlama merkezi arasındaki mesafeyi hesaba katarak verilecek dozu hesaplar. Son gelişmiş teknolojiler birlikte Leksell Gamma Knife radyocerrahi sistemi, gereken hassasiyeti korumak için, hem cone beam bilgisayarlı tomografi (CBCT) hem de hareket izleyici (IFMM) sistemi içermektedir. CBCT ile stereotaktik referans uygunluğu için fiducial (referans) markerların gerekliliği ortadan kalkmıştır. IFMM sistemi ise bir kızılötesi kamera ve olgunun burun üst kısmına yerleştirilen yansıtıcı bir markerdan oluşur. Kamera marker tarafından belirli bir hareket eşiği algırsa, ayarlamalar yapılan kadar sistem tedaviyi otomatik olarak durdurur. Bu özelliklerle tedavi sırasında olgu izlemi sayesinde istenilen hedef hacime ulaşılabilir [182, 194]. Tedavi süresi lezyonun tipine, büyüklüğüne ve yerine bağlı olarak birkaç dakika ile birkaç saat arasında olabilirken, genellikle tek seans yeterli olmaktadır. GK tedavisi, bir takım çalışmasıyla uygulanabilen bir prosedür olup; beyin cerrahı, nöroradyolog, tıbbi fizik mühendisi ve deneyimli bir hemşire gerekmektedir. Takip görüntüleme 3 ayda bir kontrastlı MRG ile yapılmalıdır. Tedavi sonrası ilk görüntüleme ek bulgular varlığında 6-8. haftaya kısaltılabilir.

### **3.3.1.2 Lineer hızlandırıcı (LINAC) tabanlı stereotaktik radyocerrahi**

LINAC ile radyocerrahi ilk olarak 1984 yılında Arjantinli beyin cerrahı Betti ve ark. bir lineer hızlandırıcı ile stereotaktik bir başlığın birleştirilmesiyle tanımlamışlardır. Günümüzde birçok farklı Linac tabanlı radyocerrahi sistemi mevcuttur. Son 20 yıldan itibaren görüntüleme ve lif özellikleri artırılmış yeni nesil LINAC sistemlerinin geliştirilmesiyle tüm vücuda SRC uygulaması mümkün hale gelmiştir. GK'ya benzer şekilde doğrusal hızlandırıcı ile homojen bir doz dağılımının oluşturulması, ışının hem çok sayıda farklı açıdan hem de farklı düzlemlerde girişini ve hem masanın hem de olgunun sürekli sırayla döndürülmesini gerektirir [295].

### **3.3.1.3 Proton beam radyoterapi**

Proton radyocerrahisi, X ve gama radyasyon tedavisine göre ek terapötik olanaklar yaratan dozimetrik avantajlar sunar. X ışını ve gama ışınından farklı olan protonlar, vücuttan geçerken girişte düşük doz profili sağlayan kademeli doz gradyanı ve parçacık ışınının çıkışıdır. Hedef bölgeye maksimum dozlarını Bragg Peak olarak bilinen dar bir tepe bölgeye bırakırlar. Bragg Peak'in devamında doz ani bir şekilde düşer ve doz alan hedef hacmin arkasında kalan normal dokular doza maruz kalmaz. Proton radyocerrahisinde, masa aparatına bağlı bir kafa çerçevesi yerleştirilir ve sabit bir ışın portalına göre masa döndürülmektedir. Yeni gelişen cihazlarda ise alternatif olarak, ışın kaynağının masa etrafında döndürülmesine olanak sağlanmıştır. Tedavi merkezlerinin sayısı sınırlı olduğundan, proton radyocerrahisi için yalnızca seçilmiş olgular sevk edilebilmektedir. Proton radyocerrahisi, küçük lezyonlar (hacim olarak <10cc) ve küresel şekilli lezyonlarda endikedir ve bu lezyonlar; kritik anatomik yapılara yakın, işlevsel beyin bölgelerinde veya derin subkortikal alanlarda olmamalıdır ayrıca daha önce ışınlanan hacimlerde endike değildir [194].

### **3.3.1.4 CyberKnife (CK) robotik radyocerrahisi**

CK sistemi, 6-MV enerjili X ışınlarıyla radyocerrahi sağlamak için mobil bir LINAC ile görüntü kılavuzlu bir robotik sistemini birleştirir. Kranial ve ekstrakraniyal tümörleri tedavi etmek için tasarlanmış, çerçevesiz, iki çapraz görüntülemeli X-ışını tüpünden oluşan gerçek zamanlı görüntü kılavuzlu bir hedefleme sağlayan bir stereotaktik radyocerrahi sistemidir. Tedaviden önce olgunun kemik anatomisi ile hedef hacim arasındaki ilişkiyi analiz etmek için BT görüntüleri alınır. Bu görüntüyü tedavi öncesi tarama ile karşılaştıran mobil LINAC, olgu hareketine yanıt olarak

otomatik hareket eder ve <1 mm'lik hata payı sağlar. Tedavi sırasında olgu X-ray kameraları ile izlenmektedir. Eksrakraniyal alanlarda uygun tümör anatomisinin (yumuşak doku, prostat v.s.) içine veya yakınına referans işaretleyicilerin konulması gerekmektedir [196].

### **3.4 Tedavi Yaklaşımları ve Literatür Araştırması**

Cerrahi; erişilebilir tek lezyonu olan hastalarda, özellikle kitle etkisine neden olan büyük lezyonlarda, performans durumu iyi olan, primer ve sistemik hastalığı kontrol altında hastalarda standart tedavi haline gelmiştir [79]. Kötü prognoz nedeniyle kanser hastalarında beyin metastazının fokal tedavisinin bireyselleştirilmesi çok önemlidir ve gereksiz agresif tedavi riskinden kaçınılmalıdır. Cerrahi rezeksiyon veya radyocerrahi ile daha agresif lokal tedaviler, nörolojik durumu uygun, primer hastalığı kontrol altında olan ve sistemik hastalığı olmayan hastalar için muhtemelen faydalıdır. Ayrıca, kanser tedavisinde primer ve sistemik hastalığın kontrolüne öncülük eden sistemik tedavilerdeki ilerlemeyle birlikte, metastatik beyin lezyonunu kontrol etmek; hastaların yaşam süresini ve kalitesini artırmak için kritik hale gelmiştir. Beyin metastazı olan hastalarda lokal tedavi için cerrahi rezeksiyon ve SRC'nin her ikisinin de etkili olduğu bulunmuştur [2].

Yaşam beklentisi 3 aydan az olmayan hastalarda cerrahi rezeksiyon veya SRC gibi lokal agresif tedaviler önerilmektedir. Belirgin ödem ve kitle etkisi olan ,  $\geq 3$  cm çapında tek tümörü olan bir hastada cerrahi tedavi tercih edilebilirken, SRC belirgin ödem ve kitle etkisi olmayan daha küçük lezyonlar ve derin yerleşimli lezyonlar için kullanılır [2, 185, 197, 198]. Cerrahi rezeksiyon ve SRS'nin endikasyonları, avantajları ve dezavantajları Tablo 3.1'de özetlenmiştir. BM'li hastaların prognozu öncelikle sistemik hastalığın durumuna ve dolayısıyla sistemik tedavinin etkinliğine bağlı olsa da, kemoterapiler beyin metastazları için tedavi seçenekleri olarak hala yeterince güvenilir değildir. Hızla artan kanıtlar, stereotaktik radyocerrahinin tek ve çoklu beyin metastazları için oldukça etkili ve öngörülebilir lokal tümör kontrolü sağladığını göstermektedir. TBRT'yi ertelemek veya birinci seçenek olarak kullanmamak, hastanın bilişsel durumu ve yaşam kalitesi üzerinde olumlu bir etkiye sahip olabilir (düzey I kanıt). Çok sayıda çalışma  $>3$  beyin metastazı için GK tedavisinin yüksek lokal kontrol sağladığını gösterdiğinden, tek bir radyocerrahi seansında birden fazla sayıda beyin metastazını tedavi etme eğilimi vardır. TBRT sonrası lokal nüksler veya

yeni metastazlar için radyocerrahi uygulanabilir. Daha büyük metastazların (>8–10 cc) rezeke edilmesi gerekirken, GK daha küçük metastazların tedavisinde cerrahi yaklaşımlar kadar etkilidir (düzey I kanıt). Tümör hacmi belirlenen sınırların altında kaldığı sürece yeni metastazlar için radyocerrahi tekrarlanabilir. Bu nedenle tedavi edilen beyin metastazlı hastaların radyolojik takibi çok önemlidir [2, 162-165].

**Tablo 3.1 :** Cerrahi rezeksiyon ve SRC' nin endikasyonları, avantajları ve dezavantajları [2].

	<b>Cerrahi Rezeksiyon</b>	<b>Stereotaktik Radyocerrahi</b>
<b>Endikasyonlar</b>	Maksimal lezyon boyutu $\geq$ 3 cm Ödemli lezyon ve kitle etkisi Kontrollü birincil hastalık Yüksek performans puanı Sınırlı sayıda lezyon (1–3) Radyorezistan tümörler	Maksimum lezyon boyutu < 3 cm İyi sınırlı, derin lezyonlar veya elequent alanlar Cerrahi için komorbiditesi olanlar Tercih edilir lezyon sayısı için sınır (1–3) 4-10 lezyon güvenli bir şekilde tedavi edilebilir 10+ lezyon seçilmiş hastalarda tedavi edilebilir
<b>Avantajlar</b>	Kitle ve ödem etkisinin hemen kalkması Stereoid gereksiniminin azalmazı Hızlı nörolojik iyileşme Radyolojik yorum kolaylığı(nüks, radyonekroz vs.) Lezyonun histolojik değerlendirilmesi	Ayakta tedavi prosedürü Primer kanserin tedavisinde gecikme olmaz Multiple lezyonlar tek seansta tedavi edilebilir TBRT ile karşılaştırıldığında radyorezistans tümörlerde daha iyi sonuç TBRT'den kaçınılabilir Genel anestezi gerekmez
<b>Dezavantajlar</b>	Primer kanserin tedavisinde gecikmeye neden olabilir Genel anestezi gerektirir İnvaziv girişim Sistemik kanserin tedavisinde gecikmeye neden olabilir	Radyolojik takip zorluğu (nüks,radyonekroz vs.) Uzun süreli steroid kullanımı Histolojik tanı olmaması

Kanser hastalarında 3 cm'den küçük metastatik beyin lezyonları için SRC'nin rolü, iyi bilinen bir tedavi seçeneği olmuştur. Bununla birlikte, çapı 3 cm'den büyük hastalarda beyin metastazları için SRC uygulanmasının kötü prognoz ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Normal beyin toksisitesi riski nedeniyle daha düşük radyasyon dozları reçete etmek SRC ile daha büyük lezyonları tedavi etmenin sınırlamalarıdır. Bu sınırlamaların üstesinden gelmek ve büyük lezyonların tedavisinde SRC'nin etkinliğini arttırmak için hipofraksiyone radyocerrahi kullanılmış; çevre normal parankimde daha iyi bir koruma ve tek seanslı SRC'ye kıyasla daha yüksek bir biyolojik etkin doz

sağlanmıştır. Çalışmalar, hipofraksiyone radyocerrahinin tek seans SRC ile benzer lokal kontrol oranları ile sonuçlandığını göstermiştir [2,113,114]. BM'li hastaların tedavisinden sonra, tümör radyobiyojisini ve doz fraksiyonasyonunun lokal tümör kontrolü üzerindeki etkisini değerlendiren bir çalışmada, tek seans SRC'nin radyasyona dirençli beyin metastazları (melanom, renal hücreli karsinom ve sarkom dahil) ve radyosensitif beyin metastazları (tüm diğerleri) için kontrol oranlarının benzer olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, radyosensitif beyin metastazlarında hipofraksiyone radyocerrahi sonrası radyorezistan tümör tiplerine kıyasla daha iyi lokal tümör kontrol oranları görülmüştür [199]. Düzey 1 Sınıf I kanıtlar, tek metastazlı hasta grubunda postoperatif TBRT ile cerrahi rezeksiyon kombinasyonunu desteklese de, düşük KPS, ileri sistemik hastalık gibi olumsuz prognostik faktörleri olan hastalarda cerrahi önerisinde bulunmak için yeterli veri yoktur [2, 117, 161]. Metastatik beyin lezyonunun rezeksiyonu sonrasında; kitle etkisine bağlı nörolojik defisitlerde ve kafa içi basınç artışında hızlı düzelme ve steroid ihtiyacında azalma görülebilir [185]. Ayrıca yaygın hastalığı olan ve KPS'si düşük olan hastalarda bile lezyon büyük ve ciddi bası etkisi, herniasyon riski var ise kitle etkisini gidermek için cerrahi rezeksiyon tercih edilir. Randomize bir klinik çalışmada Patchell ve ark. [93] cerrahi rezeksiyon + postoperatif TBRT uygulanan hastaları tek başına cerrahi rezeksiyon uygulanan hastalarla karşılaştırmış; sadece cerrahi uygulanan grupta hem lokal nüks oranı (cerrahi %46'ya karşı cerrahi+TBRT %10,  $p < 0,001$ ) hem de uzak metastaz oranı (cerrahi %37'ye karşılık cerrahi+TBRT %14,  $p < 0.01$ ) yüksek bulunmuştur. Cerrahi + TBRT grubu için ortalama genel sağkalım süresi 48 hafta ve tek başına cerrahi grubu için 43 hafta saptanmış. Nörolojik nedene bağlı ölüm oranı cerrahi + TBRT grubuna kıyasla tek başına cerrahi grubunda daha sık görülmüş (%44'e karşı %14,  $p = 0,003$ ). Ayrıca retrospektif çalışmalar, tek beyin metastazı olan hastalarda SRC'nin TBRT'yi geciktirerek tek başına etkili ve güvenli bir tedavi olduğunu düşündürmektedir; bununla birlikte, SRC tedavisine TBRT eklendiğinde lokal ve uzak nüks riski daha düşük bulunmuştur [2].

Bir çalışmada tedavi öncesi ve SRC tedavisi sonrasında hastaların durumları radyolojik olarak kıyaslanmıştır; hastaların ilk 3 ay ve 1 yıllık durumları karşılaştırılmıştır. 3 aylık dönemde; %16'sında progresyon, %34'ünde regresyon görülmüş, %42'sinde stabil hastalık, %4'ünde ise tam cevap olduğu görülmüştür. 1 yıllık dönem incelendiğinde ise hastaların %28'inde stabil hastalık, %6'sında

progresyon, %34'ünde regresyon ve %6'sında tam cevap saptanmıştır. Hastaların %13'ünde KPS değerlendirmesinde artış görülmüş, %41'inde değişme görülmemiş ve %45'inde kötüye gidış görülmüştür [108]. Bir çalışmada tek başına TBRT ile SRC kıyaslanmış; tek veya en fazla 3 metastaz olan çoklu beyin metastazlarında anlamlı bir sağkalım farkı görülmemiştir. Tek başına SRC ile rezeksiyon+TBRT karşılaştırıldığında ise; tek metastazlı hastalarda fonksiyonel performans durumu karşılaştırıldığında da anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ortalama yaşam süreleri kıyaslandığında da anlamlı bir fark görülmemiştir. Yaşam süreleri kıyaslandığında 1-3 metastazlı olan hastalarda SRC lehine öneride bulunulmuştur. Başka bir çalışmada ise tek metastazlı olan hastalarda sağkalımda rezeksiyon+TBRT lehine bulgu olsa da, bilişsel fonksiyonlar ve yaşam kalitesi açıdan rezeksiyon+TBRT yerine SRC önerilmektedir [198].

Birden fazla beyin metastazlı olan hastalar için ise optimal tedaviye karar vermek zordur. KPS, yaş, birincil kanserin durumu ve sistemik hastalığın yaygınlığı gibi hastayla ilgili faktörler ve lezyon sayısı, yerleşim yeri ve toplam tümör hacmi gibi tümörle ilgili faktörler karar verme sürecinde önemlidir [130-132, 148]. Birkaç randomize klinik çalışma, TBRT ile veya TBRT olmadan cerrahi ve SRC gibi lokal agresif tedavilerin rolünü araştırmıştır. 1-4 beyin metastazlı olan ve KPS > 70, stabil primer kanser, kontrollü sistemik hastalık ve daha genç yaş gibi olumlu prognostik faktörleri olan hastalarda cerrahi ve SRC grupları arasında özellikle benzer sağkalım ve lokal kontrol oranları bildirmişlerdir. Bu lokal tedavilere ek olarak TBRT'nin lokal ve uzak tümör kontrolünü iyileştirdiği gösterilmiş olmasına rağmen, sağkalım üzerine ek yararı görülmemiştir. Tek başına SRC alanlara kıyasla adjuvan TBRT ile tedavi edilen hastalarda daha kötü yaşam kalitesi gözlemlenmiştir [2, 169-172].

Çoklu beyin metastazlı olan hastalarda cerrahinin rolü net değildir. Cerrahi, SRC ve TBRT gibi birincil tedaviden sonra veya bu modalitelerin farklı kombinasyonları ile lokal başarısızlık gelişen hastaların tedavisi zordur [2]. Tekrarlayan beyin metastazı için hangi tedavinin en iyi olduğuna dair somut bir kanıt yoktur. Kurtarma tedavisi için cerrahi ve/veya TBRT ve SRC ve/veya TBRT olası seçeneklerdir. Kurtarma tedavisi, yaş, yüksek performans durumu ve birincil kanser ve sistemik hastalık durumu gibi hastayla ilgili faktörlere ve lokasyon, lezyonun/lezyonların boyutu ve önceki tedavi gibi tümörle ilgili faktörlere göre uyarlanmalıdır. Seçilmiş hastalarda hem cerrahi rezeksiyon hem de SRC kurtarma tedavisi için uygun olabilir. Kitle etkisini ortadan

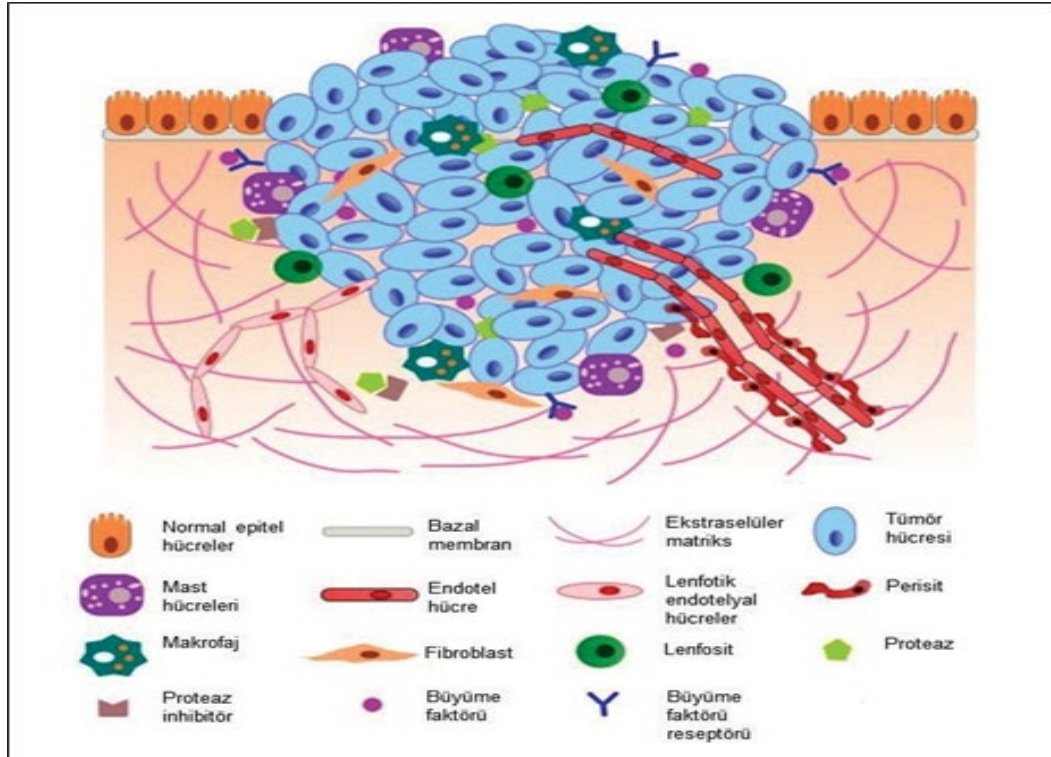
kaldırmak ve nörolojik fonksiyonu ve sağkalımı iyileştirmek için özellikle kontrollü primer hastalığı ve stabil sistemik hastalığı, yüksek performans skoru ve erişilebilir konumu olan hastalarda radyasyon tedavisi sonrası başarısızlıktan sonra tekrar cerrahi rezeksiyon önerilmiştir [174-180].

İlk SRC'den sonra nüks için tekrar SRC uygulamada bazı kısıtlayıcı faktörler mevcuttur. Yeniden ışınlama yapıldığında, radyasyona bağlı daha ciddi yan etkiler oluşma ihtimali veya endişesi bunlardan biridir. Ayrıca başlangıç tedavisi için optimal SRC dozu iyi tanımlanmış olmasına rağmen, nüks metastaz için etkili ve güvenli optimal doz şemasına yönelik net veriler yoktur [2, 169, 176]



#### 4. TÜMÖR MİKROÇEVRESİ

Radyoterapiye direnç mekanizmalarının ve radyoterapinin tümör, çevre doku ve sistemik etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için bu bölümde tümör mikroçevresi (TMÇ) kavramından bahsedilecektir. Metastatik tümörler, salgıladıkları faktörler ile uzak bölgeleri etkileyip, metastaz öncesi ortamı hazırlayabilmekte ve tümör büyümesini ve tedavi direncini destekleyen inflamatuvar ve immünosupresif bir mikroçevre oluşturmaktadır [38, 201]. Metastaz bölgesinde ise tümör ve stromal hücreler arasında daha yoğun bir etkileşim gerçekleşir. Bu güçlü etkileşimin meydana geldiği dinamik hücresel ve moleküler ortama beyin mikroçevresi (niş) denir. İmmün BM mikroçevresi, tümör ve yerleşik nöral hücreler ile infiltre olan lenfoid (sitotoksik CD4+, yardımcı CD4+, düzenleyici T hücreler ve doğal öldürücü hücreler) ve miyeloid seri (dendritik/antijen sunan hücreler, makrofajlar ve miyeloid türevli baskılayıcı hücreler) hücreleri arasındaki karmaşık etkileşimleri içerir [38, 201, 203]. (Şekil 4.1)

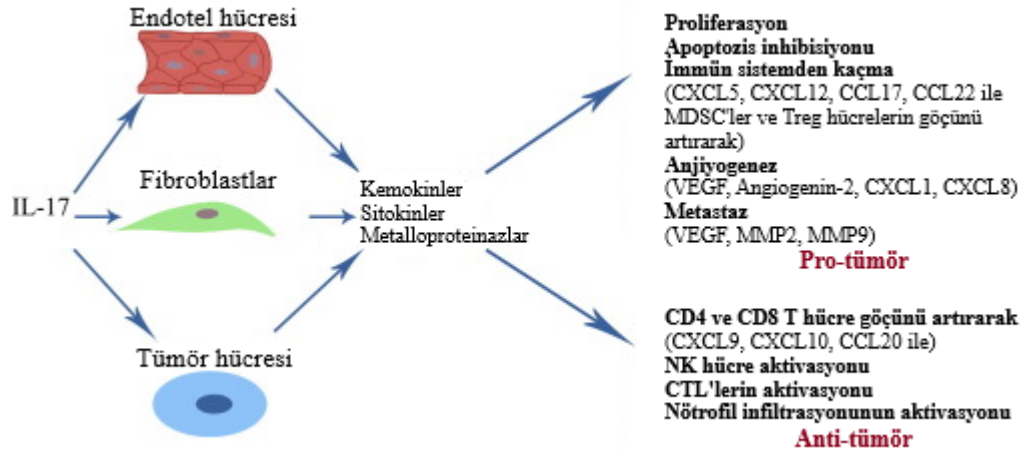


Şekil 4.1 : Tümör mikroçevresi şematizasyonu [202].

Bazı tümörler biyopsilerde yüksek derecede lenfositik infiltrasyona sahiptir (immünolojik olarak "sıcak" tümörler olarak adlandırılır), diğerleri ise çoğunlukla bağışıklık hücrelerinden yoksun görünür ("soğuk" tümörler olarak adlandırılır). Hem sıcak hem de soğuk tümörler, endojen bağışıklık sisteminin tümörü yeterince kontrol etmedeki başarısızlığını açıkça temsil etse de, bu iki durumda tümör kaçış mekanizması farklı olabilir. "Sıcak" bir tümörde, TMC'de tümöre özgü efektör CD4 ve CD8 T hücrelerinin tümöre saldırmasını önleyen immünosupresif mekanizmaların baskınlığı olabilir [38, 202, 204].

#### 4.1 İmmün Sistem Hücreleri

İmmün sistem hücreleri tümörlü dokunun doğal bileşenleridirler. Bu hücreler tümöre antagonist etki edebilecekleri gibi, tümör gelişiminde olumlu etki de gösterebilmektedirler. Tümör gelişimini destekleyen inflamatuvar hücreler arasında; mast hücreleri, makrofajlar, nötrofiller, B ve T lenfositler yer almaktadır [205]. Bu hücreler çeşitli sinyal moleküllerinin (VEGF, sitokinler, kemokinler, FGF, MMP-9 vb.) salgılanmasını sağlayarak tümör gelişimine yardımcı olurlar [203,206]. Tümör hücrelerini öldürebilen sitotoksik CD8+ bellek T hücreleri, tümör hücrelerinin immün sistemden kaçmak için birincil hedefi olarak bilinmektedir. Ayrıca IL-2 ve IFN-  $\gamma$  ile karakterize olan yardımcı CD4+ T (Thelper, Th) hücreleri tarafından CD8+ T hücrelerinin uyarıldığı bilinmektedir. IL-4, IL-5 ve IL-13 üreten Th2 hücreleri, IL-17A, IL-17F, IL-21 ve IL-22 üreten Th17 hücreleri ve transkripsiyon faktörü FOXP3 ve CD25 yüzey ekspresyonu ile karakterize Treg (regulatory= düzenleyici) hücrelerinin genellikle tümör büyümesine katkı sağladıkları düşünülmektedir. Çalışmamızda da düzeyine baktığımız esas olarak Th17 hücreleri tarafından üretilen bir proinflamatuvar sitokin olan IL-17A, hem doğuştan gelen hem de adaptif bağışıklık tepkilerine katılır ve bulaşıcı hastalıklar, otoimmün bozukluklar ve kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda rol oynar. Ortaya çıkan kanıtlar, IL-17'nin sadece tümör anjiyogenezini düzenleyerek ve tümör immün kaçışını artırarak tümörjenezde onkojenik bir role sahip olmadığını, aynı zamanda NK hücreleri ve sitotoksik T hücrelerin aktivasyonunu artırarak anti-tümör işlevleri uyguladığını göstermektedir. Nötrofillerin, NK hücrelerinin ve CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin tümör dokusuna alınmasını da uyarmaktadır [207]. (Şekil 4.2)



**Şekil 4.2 :** IL-17'nin antitümör ve protümör özellikleri [207].

İndüklenen Treg hücreleri IL-10 üretimiyle immünsüpresif bir fonksiyon sergileyerek TGF $\beta$  ve sitotoksik T lenfosit (CTL) ilişkili protein-4 (CTLA-4) aracılığıyla tümör hücrelerinin bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını ve temizlenmesini engellemektedir. Ayrıca TGF $\beta$ , IL-35 ve Galektin-1'in üretilmesi hücrelerin farklılaşmasını, proliferasyonunu ve aktivasyonunu inhibe ederek CD4<sup>+</sup> hücrelerinin sitokin üretimini baskılamaktadır. Treg hücrelerinden salgılanan granzim A/granzim B ise dentritik hücrelerde ve CD4<sup>+</sup> hücrelerinde hem perforine bağlı hem de bağımsız bir şekilde apoptoza neden olmaktadır. TMC'de yüksek sayıda bulunan Treg hücreleri immünosüpresif özelliklerinden dolayı birçok kanser türünde kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Tümör içerisinde kanserle ilişkili fibroblastlar (CAF'lar), tümör ilişkili makrofajlar (TAM'lar), miyeloid kökenli süpresör hücreler (MDSC'ler) dahil olmak üzere çeşitli tipte stromal CTL'lerin fonksiyonunu baskılamak için tümör hücreleri ile iş birliği yapmaktadır. Bu hücreler tarafından salınan büyüme faktörleri (VEGF), sitokinler (TGF $\beta$ ) ve metabolik enzimler tümör infiltre CTL'lerin yayılmasını engelleyerek sitotoksik özelliklerine zarar vermektedir [203, 208].

B lenfositlerinin, antikor üretimi yoluyla inflamatuvar ve immün yanıtları pozitif olarak düzenlediği ve antijen sunumu yoluyla T hücresi aktivasyonunu ve proliferasyonunu desteklediği bilinmektedir. Bununla birlikte, B lenfositlerinin bir alt kümesi olan B10 veya B düzenleyici hücreler (Bregs), IL-10 gibi anti-inflamatuvar sitokinleri salgılayarak ve programlanmış ölüm ligandı-1 (PD-L1) gibi inhibitör molekülleri eksprese ederek tümörlere karşı otoimmün tepkileri bastırır. Neoplastik hastalıklarda, TMC'den gelen sinyallere yanıt olarak Breg hücreleri üretilir [203, 206].

Dendritik hücreler (DC= dendritic cells), hem doğal hem de adaptif bağışıklıkta rol oynayan, tümör hücreleri de dahil olmak üzere birçok antijeni yakalayan, işleyen ve bunları yanıt başlatmak için T hücrelerine sunan en güçlü antijen sunan hücrelerden (APC) biridir. Proinflamatuvar sitokinler üretmeyen ancak göç eden olgunlaşmamış veya yarı olgun DC'ler lenfoid olmayan dokularda ve organlarda bulunabilirken, antijenle aktive olan DC'ler T hücreleri ile etkileşime girer ve immün yanıtları indüklemek için lenfoid dokulara göç eder. Ayrıca, DC'lerin aktivasyonu ve olgunlaşması bölgesel mikro çevreye bağlıdır ve alt popülasyonlara farklılaşmak için belirli faktörler tarafından bloke edilerek veya tetiklenerek immünoşüpresif etkiler gösterebilir [208].

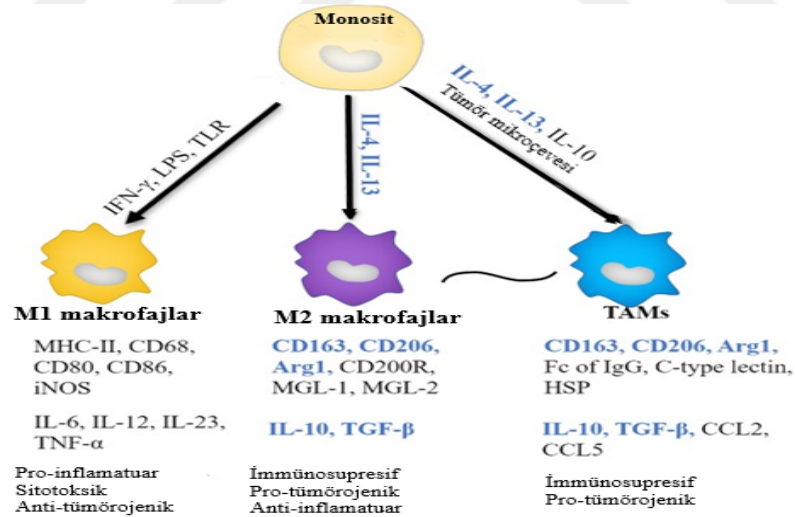
Doğuştan gelen bağışıklığın önemli bir elemanı olan nötrofiller ise, tümör hücrelerinin ortadan kaldırılması için güçlü immün düzenleyici sitokin salınımı yapmaktadır. Tümörle ilişkili nötrofiller ise TMC'ye bağlı olarak pro veya anti tümörojenik olarak işlev görebilmektedir. G-CSF/IL-6 gibi inflamatuvar faktörler tümör gelişimini arttıran nötrofilleri uyardığı, TNF- $\alpha$  ve IFN- $\gamma$  gibi sitokinlerin de yine nötrofilleri uyararak tam tersi etki yaptığı gösterilmiştir. TMC'de bulunan nötrofiller ile NK (doğal öldürücü=natural killer) hücreleri arasındaki ilişkiyi anlamak için yapılan çalışmaya göre, tümör kaynaklı G-CSF'nin nötrofillerde STAT3 (Transkripsiyon 3'ün sinyal dönüştürücü ve aktivatörü) yolu aracılığıyla PD-L1 ekspresyonunu indüklediği ve tümörle ilişkili nötrofillerin, NK hücrelerinin sitotoksik etkisini PD-L1/ PD-1 etkileşimi yoluyla baskıladığı tespit edilmiştir [209].

TMC'deki lenfatik endotelial hücreler ve bu hücreler tarafından oluşturulan lenfatik damarlar, tümör büyümesinde ve metastazında önemli bir rol oynamaktadır. Kanser hücrelerinde VEGF-C ve VEGF-D'nin aşırı ekspresyonunun tümörle ilişkili lenfatik damar büyümesi ve lenf nodu metastaz insidansını önemli ölçüde artırdığını göstermektedir. Perisitler ve adipositler de TMC'nin bir bileşeni olup immünoşüpresif etki göstererek anjiyogenezi, tümör büyümesini ve yayılımı artırabilmektedir [203,205].

#### **4.2 Tümörle İlişkili Makrofajlar**

Tümörle ilişkili makrofajlar (TAM= tumor associated macrophages) TMC'in temel bileşeni olup tümörün metastaz yapma yeteneği ve radyoterapiye karşı direnciyle arasında yakın ilişki bulunmaktadır . Tümör stroması ve tümör hücrelerinden salınan

kemokinler ve büyüme faktörleri TAM'ların bu alanda toplanmasını tetiklemektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda makrofajların 2 alt tipinin olduğu gösterilmiştir. M1 ve M2 olarak ayrılan bu alt tipler; yüzey belirteçleri, davranışları ve verdikleri yanıtlar bakımından farklıdırlar. Monositlerden köken alan ve IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-12, IL-6 ve CXCL9/10 gibi inhibitör sitokinleri salgılayan klasik makrofajlar, M1 olarak tanımlanırken; pro-tümör fonksiyonuna sahip olan, CSF-1, IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ , and IL-13 gibi proinflamatuvar sitokinleri salgılayan, alternatif olarak aktive olmuş makrofajlar M2 olarak tanımlanmaktadır (Şekil 4.3). M1 makrofajlar; bakteri ve yabancı maddelere karşı savaş için programlanmıştır ve tümör ile karşılaşınca bunu baskılama kapasitesine sahiptirler. Bunları; yüzeyinde bulundurdukları özel belirteçler aracılığıyla yapmaktadırlar. IL-10 ve TGF $\beta$ , inhibitör reseptörlerin (PD-L1 veya B7-H4) ekspresyonunun artmasını sağlar, kemokin ve enzimlerin (arjinaz-1, indüklenen nitrik oksit sentaz gibi) salınımıyla Treg hücrelerinin çoğalmasını uyarır ve T efektör hücreleri inhibe ederek immünoşüpresif ortamın korunmasına da katkıda bulunmaktadır. M2 makrofajları özellikle doku tamirinde, üretimini arttırdıkları VEGF ve CCL8 (kemokin ligand 8) ile anjiyogenez mekanizmalarında rol oynar [41, 210, 211].



**Şekil 4.3 :** M1 ve M2 Makrofajlar. M1 ve M2 makrofajlar, bulundurdukları yüzey reseptörleri ve görevlerindeki farklılıklar nedeniyle birbirlerinden ayrılırlar [210].

Yapılan bir çalışmada; farelerde makrofaj büyüme faktörü olan CSF-1'in ekspresyonunun azalmasıyla birlikte tümörde TAM yoğunluğu oldukça azalmış; buna bağlı olarak da tümör gelişimi ve metastaz sürecinin geciktiği gözlenmiştir [212]. Bu veriler TAM'lerin metastaz oluşumu için gerekli olduklarını ayrıca göstermektedir.

TAM'ler tarafından salgılanan VEGF, PDGF, TGF $\beta$  ve FGF gibi büyüme faktörleri ile vaskülarizasyonun artırılmasıyla anjiyogenez sürecinde rol almaktadırlar. Ayrıca, TAM'ler endotel hücre göçünü teşvik eden anjiyogenik faktör timidin fosforilazı da salgılamaktadırlar. MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-12 gibi proteaz enzimleri de TAM'ler tarafından üretilmektedir [210].

### **4.3 Miyeloid Kökenli Süpresör Hücreler**

Kemik iliğinden köken alan miyeloid kökenli süpresör hücreler (MDSC=myeloid derived suppressor cells) farklılaşmanın birçok aşamasında olan henüz olgunlaşmamış oldukça heterojen bir hücre popülasyonudur [25]. Tümör gelişiminde MDSC havuzunun genişlemesi ile tümörün ilerleme seviyesi ve metastaz arasında ilişki olduğu bilinmektedir [214]. MDSC'lerin en önemli işlevi; tümörün immün sistemden kaçışı sırasında immün baskılayıcı ve anti-inflamatuvar yanıtı ortaya çıkarmak için immün sistemi düzenlenmeleridir [25]. Ayrıca MDSC'lerin arjinaz 1 (ARG1), iNOS, TGF $\beta$ , IL-10, COX2 gibi immünoşüpresif molekülleri üreterek efektör T hücre aracılı sitotoksitesiteyi baskıladıkları bilinmektedir. Ayrıca MDSC'nin, STAT3'ün IL-6'ya bağlı fosforilasyonunu tetiklediği ve nitrik oksit (NO) yoluyla Notch'u aktive ederek uzun süreli STAT3 aktivasyonu ile kanser kök hücrelerinin uyarılmasına neden olduğu görülmüştür. MDSC'ler, Treg'lerin uyarılmasına yol açan TGF $\beta$  salmak, T hücrelerinin aktivasyonu için gerekli besin maddelerini tüketmek ve NK hücre aktivitesini azaltmak gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla immünoşüpresif etki gösterirler [25, 213].

### **4.4 Matris Metalloproteinazlar**

MMP'lerin, tümör gelişiminin karmaşık alt yapısını oluşturan; hücre adezyonu, göç, epitelyal mezokimal geçiş ve anjiyogenez aşamalarında; sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerinin salgılanmasında görevleri olduğu bilinmektedir [25, 203]. MMP'ler tümör stromasında ekstrasellüler matris yapısını bozarak hasara uğratmakta, tümör yayılımı ve metastazında görev almaktadırlar. İnvaziv tümörlerde, MMP'ler ve integrinlerin yüksek düzeyde bulunması, bunlar ile kanser yayılımı, invazyon ve metastaz arasında güçlü bir ilişki olduğuna işaret etmektedir. Birçok kanserde MMP ve integrin seviyeleri, E-kaderin N-kaderin arasındaki dengenin N kaderin lehine

dönmesiyle, metastaz ve kötü prognoz arasında ilişki görülmüştür. [40, 43, 44, 215]. MMP'ler aracılığıyla EMG'nin yeniden düzenlenmesiyle tümör kitlesinden ayrılabilme yeteneği kazanan tümör hücrelerine, metastaz yapabilmek için bir kaçış yolu sağlanmış olmaktadır [214].

#### **4.5 Beyin Metastazı ve Tümör Mikroçevresi**

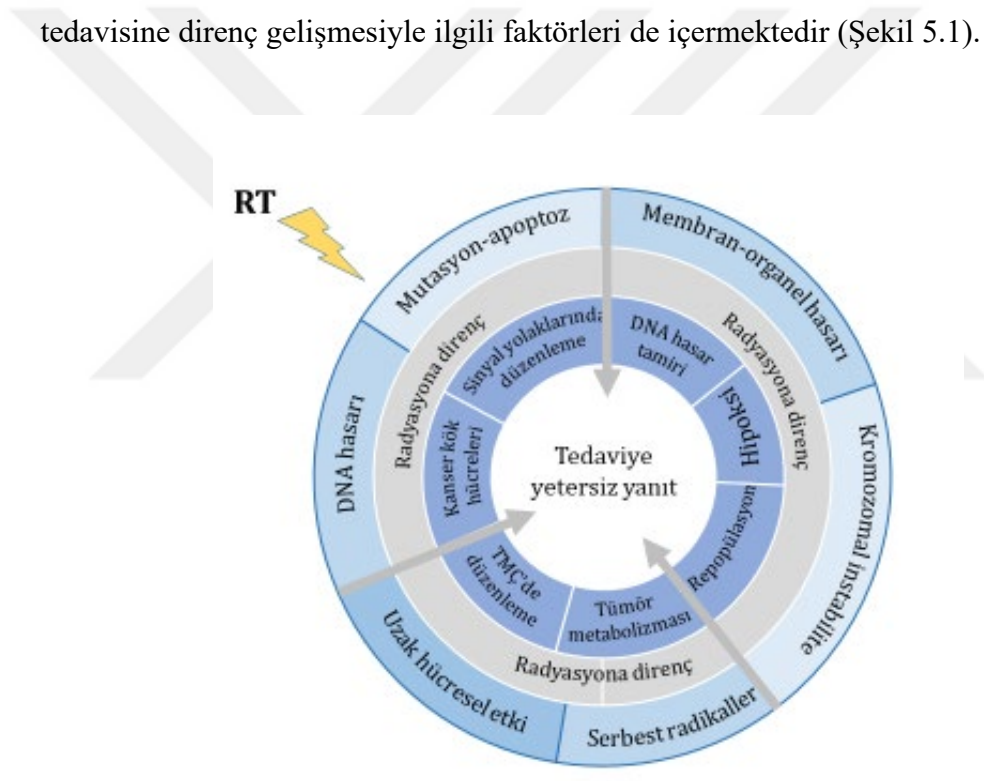
Tümör hücreleri beyin dolaşımına girdiklerinde akımın yavaşladığı kapiller yatakta durgun hale gelirl ve çoğalmalarına ve invazyonlarına katkıda bulunan endotel hücreleri ile karşılaşılır. İlave olarak, CAF'lar gibi primer tümörden ayrılan stromal hücreler de metastatik nişte bulunur ve tümör hücrelerinin sağkalımı, çoğalması ve metastaz odağında erken yerleşimini kolaylaştırır. Ekstravazasyon sonrası kanser hücreleri, mikroglia ve astrositler gibi yerleşik hücrelerle karşılaşır. Bu hücreler, kanser hücrelerinin anjiyogenez, tümör çoğalması ve invazyonuna doğrudan veya dolaylı etki edebilecek sitokin, büyüme faktörü, enzim ve reaktif oksijen ürünleri salgılar. Muhtemeldir ki; metastaz sürecinin erken safhalarında, tümör hücrelerince salınan bir dizi faktör ve uyarıya bağlı olarak mikrogliaların koruyucu ve sitotoksik işlevleri arasında bir denge bulunmaktadır [30]. Astrositler, hasara cevap olarak aktif duruma geçer, hipertrofiye uğrar, glial fibriler asidik protein (GFAP) ekspresyonları artar. Bu süreç "gliosis" olarak adlandırılır. Reaktif astrositlerin, tümör hücrelerinin çoğalması, sağkalımı, invaziv yetenek kazanmalarını ve kemoterapi direncini artırdığı gösterilmiştir [201]. Reaktif astrositlerin miR19a içeren eksozomlar salgılayıp miyeloid hücrelerde PTEN seviyelerini azaltarak onları metastaza sürüklediği gösterilmiştir [53]. Astrositlerin insan tümör hücre serilerinde, 5-flourourasil ve sisplatinin oluşturduğu apoptozu belirgin olarak azalttığı gösterilmiştir [30]. Tümör hücrelerinin, tümör mikroçevresinde bulunan nörotropik faktörler ile aktive olan nörotropin reseptörü içerdikleri gösterilmiştir. Ayrıca metastatik hücrelerin, nöral kök hücrelerin astrositlere farklılaşmasında güçlü bir molekül olan kemik morfogenetik protein (BMP)-2'yi artmış şekilde eksprese ettikleri gözlenmiştir [201]. Nöral çevredeki kanser hücrelerinin, kolonizasyonu kolaylaştıran bir takım faktörlere zaten sahip olduğu ya da bunları bu ortamda sonradan mı kazandığı net değildir. Primer tümörden, beyin metastazı için özgül mutasyona sahip hücreler kopmakta ya da hücreler, bu nitelikleri yeni mikroçevre şartlarında kazanabilmektedir. Her iki mekanizmanın birlikte olması da mümkündür. Bu sayede, kendileri için uygun saha

şartları sağlandığında semptomatik lezyonları oluşturmak üzere ilerleme gösterebilirler. Bununla birlikte, hastanın biyolojisi, uygulanan tedaviler gibi faktörler heterojen klinik tablolara yol açabilir. Tüm bunlar, beyin metastazlarının etkin tedavisi için sadece tümöre değil, aynı zamanda konağa ait yanıtların da hedeflenmesi gerektiğini göstermektedir [30,53,201]



## 5. RADYASYONA DİRENÇ MEKANİZMALARI

Direnç mekanizmalarından bahsedilmeden önce, bu bölümde; öncelikle tedavi amaçlı kullanılan radyasyon çeşitlerine, radyasyonun normal dokulara ve tümör mikroçevresine etkilerine, RT'ye bağlı immün yanıtta değişikliklere değinilecektir. RT sürecinde herhangi bir yolaktaki bir maddenin veya hücrenin miktranın değişimi, radyasyonun etkinliğini artırabileceği gibi direnç gelişmesine de yol açabilir. Bu sebeple etki mekanizması içerisinde bahsedeceğimiz bir konu aynı zamanda radyasyon tedavisine direnç gelişmesiyle ilgili faktörleri de içermektedir (Şekil 5.1).



**Şekil 5.1 :** Radyasyonun biyolojik etkileri ve direnç mekanizmaları [266].  
(düzenleme yapılmıştır)

Radyasyona direnç mekanizmaları; CSC'lerin aktivitesi, DNA'nın gelişmiş onarım kabiliyeti, hücre döngüsü kontrol mekanizmalarının artması, hipoksi, reaktif oksijen türleri ve serbest radikallerin temizlenmesi, tümör stroması ve mikroçevre ile etkileşimler gibi birçok karmaşık faktöre bağlıdır. Radyoterapi, kanser hücrelerinde doğrudan DNA hasarı yapar veya dolaylı olarak reaktif oksijen türlerinin üretimini

indükler. Ek olarak, immünoterapi ve kemoterapi ile kombine edilen radyoterapi, tümör oksijen tüketimini azaltarak tümör hipoksisini tersine çevirebilir ve tümör immün yanıtını değiştirerek birçok farklı tümör türünde önemli klinik iyileşmelere yol açabilir. Radyoterapinin bu avantajlarının yanı sıra; SNAI1, HIF1 (hipoksi ile indüklenebilir faktör 1), ZEB1 ve STAT3 dahil olmak üzere epitelyal mezenkimal geçişte rol alan çeşitli transkripsiyon faktörlerini aktive ettiği ve tümör hücrelerinin çoğalmasını uyardığı gösterilmiştir. Radyo-direnç, tedavide yetersiz yanıtı neden olarak kanser hastalarında tümör nüksü ve metastazlarına yol açabilen temel etkenlerden biridir [266].

### 5.1 Radyasyon Biyolojisi

SSS parankiminde, 2 ana hücre tipi vardır: nöronlar ve destekçi glial hücreler. Radyosensitivitede belirleyici önemli bir özellik olan çoğalma yeteneği, nöronlarda doğumdan önce veya doğumdan kısa bir süre sonra ortadan kalkmaktayken; glial hücrelerde, gelişimin tamamlandığı dönemlerde bile mitotik faza geçebilme özelliği devam etmektedir. Diğer hücre grubu olan destekçi glial hücreler arasında başlıca astrositler ve oligodendroglialar yer almaktadır. Astrositler, nöronların etrafındaki stromayı sağlayan ve doku tamiri ile skar formasyonundan sorumlu hücrelerdir. Oligodendroglialar ise miyelin kılıfı formasyonu ve devamlılığını sağlar. Bunların dışında, SSS'de yeni tanımlanan ve SSS'nin makrofajları olduğu düşünülen mikroglialar da bulunmaktadır. Literatürdeki genel görüş, glial ve endotelyal hücrelerin erişkin yaşlarda da çoğalmaya devam ettiği yönündedir [111,157]. Yetişkin dönemde de mitotik aktivitesini koruyan embriyonel gelişimin kalıntısı subependimal bölge, iyonize radyasyona akut hücresel yanıtın ölçülebildiği SSS'nin tek yapısıdır [157].

RT'ye bağlı yan etkilerin patofizyolojik mekanizmaları, henüz tüm açıklığıyla aydınlatılamamıştır [106, 107]. Doza ve süreye bağlı farklı etkiler oluşturduğu bilinen iyonize radyasyonun (IR), vücudun farklı yerlerinde etki kapasitesi de farklı olmaktadır [109]. Önceleri radyasyonun bölünmeyen SSS hücrelerini etkilemediği düşünülürken, son yıllarda yapılan deneysel ve klinik çalışmalar, bazı SSS hücre tiplerinde hasar geliştirebildiğini göstermiştir [102]. IR'nin santral sinir sistemi üzerindeki etkileri, 1930'larda maymun ve tavşan beyinlerinde yapılan deneylerle ortaya konmaya başlamıştır. Bu çalışmalarda IR'ye bağlı serebral demiyelinizasyon,

atrofi, nöronal apoptozis ve nekroz olduğu gösterilmiştir [216, 217]. Radyasyon hasarını etkileyen faktörler radyasyona bağlı faktörler ve hedef biyolojik doku ile ilgili faktörler olarak iki grupta sınıflanabilir. Radyasyona bağlı faktörler; radyasyonun tipi, doz hızı, uygulama şekli (fraksiyone, tek doz) ve verilen total dozdur. Hedef biyolojik dokuya bağlı faktörler; hücrenin tipi (radyosensitif, radyorezistan), hücrenin onarım yeteneği, hücre siklusu, doku oksijenizasyonu (serbest radikal oluşumunun oksijenle artması), ışınlanan toplam volüm, bireyin yaşı ve sağlık durumu, kimyasal modifikatörlerdir (radyo-koruyucu ve radyo-duyarlılaştırıcı ajanlar) [102].

Tümör dokusundaki vasküler yapıların IR etkisiyle hasarlanması da tedavi edici etkiye katkıda bulunur. IR sonucu tümörü besleyen damarlarda hyalinizasyon ve miyointimal tabakada proliferasyon meydana gelir. Bu da hipoksi ve iskemi sonucu tümör vaskülaritesinin bozulmasına ve hücre proliferasyonunun inhibisyonuna yol açar. SRC sonrası tümör vaskülaritesinin bozulmasına bağlı kontrastlanma paterninde ve perfüzyon parametrelerindeki değişiklikler bu mekanizma sonucu oluşur [106, 107].

Mevcut bilgilere göre radyoaktif partiküller, canlı dokuya veya hücrelere nüfuz edebilir ve biyolojik materyale enerji transferi yapabilir. Absorbe olan iyonize radyasyon, kimyasal bağları kırar ve su da dahil olmak üzere, DNA, membran lipidleri ve protein gibi farklı atom ve molekülleri iyonlaştırarak kimyasal çatısını yıkar [218]. Radyasyonun bu şekildeki direkt enerji transferi dışında, serbest radikaller yoluyla indirekt enerji transferi de radyasyon hasarında önemlidir. Bu yollarla suyun ve diğer moleküllerin hidroksil radikallerine parçalanması, canlı sistemlerde radyasyon hasarının oluşumunda etkilidir [102, 218]. Radyasyona bağlı geri dönüşümlü ve dönüşümsüz hücre hasarlarının tümünde; mitokondriyal şişme, endoplazmik retikulumun şişmesi ve içeriğinin boşalması, golgi kompleksin vakuolizasyonu, lizozomal rüptür, sitoiskeletal sistemin dağılması, nükleer laminanın şişmesi ve çözülmesi ile plazma membranında kırılmalar gibi nekrotik sürecin morfolojik özellikleri görülür [219-222].

## **5.2 Radyasyonun Normal Dokuya Etkileri**

Radyasyon tedavisinin amacı, tümöre verilen dozu en üst düzeyde tutarken normal dokulara oluşacak toksisiteyi en aza indirecek uygun radyasyon sağlamaktır. Radyasyon tedavisindeki modern gelişmeler, bu amaca ulaşmak için önemli adımlar ile sonuçlanmıştır. Bununla birlikte, radyasyon tedavisi ile tedavi edilen hastalarda

radasyona bağlı bazı erken ve geç toksisiteler hala yaygın olarak gözlenmektedir. Erken radyasyon etkileri, yüksek oranda proliferatif dokularda radyasyon tedavisi sırasında veya haftalar içinde ortaya çıkar ve genelde geri dönüşümlüdür. IR hücre bölünmesini bozup, hücre kayıp oranını hızlandırarak; proliferatif dokulardaki hücre kaybı ve hücre üretimi arasında dengeyi bozar. Yaygın erken toksisite örnekleri arasında üst ve alt gastrointestinal yolların mukoziti, kemik iliği hipoplazisi ve saç dökülmesi yer alır. Radyasyon tedavisinin kesilmesiyle hücre replikasyonu ve hücre kaybı arasındaki denge sonunda yeniden kurulur. Dokular iyileşir ve uzun süreli tedavi sekelleri çok az veya hiç olmaksızın normal işlevine döner. IR'nin SSS'ye ait hücresel akut etkileri, subependimal bölge hücreleri üzerinde görülmekte olup; subependimal plakanın bulunmaması nedeniyle spinal kordda görülmemektedir [106, 107, 154]. Subependimal bölge, beynin lateral ventriküllerinde ependimin altında bulunan bir hücre tabakasıdır. Embriyonik ön beyin germinal bölgesinin yetişkin bir versiyonudur. Bu bölge, yeni nöronlar ve glial hücreler üretme potansiyeline sahip, nöroepitelyal hücreler olarak da adlandırılan yetişkin nöral kök hücreleri içerir. Subakut sayılabilecek diğer etki ise, IR'nin geçici vasküler ve glial etkilerine bağlı oluşan, MRG'de geçici artmış kontrast tutulumu ve ödem ile karakterize psödoprogresyon fenomenidir. Psödoprogresyonun mekanizmasının, IR'ye gösterilen aşırı doku cevabı olduğu düşünölmektedir. Subakut klinik semptomlar, IR'yi takiben birkaç ay içerisinde gelişir ve aralarında halsizlik/letarji, bilinç bulanıklığı, yeni veya ilerleyici nörolojik fokal defisit yer alır. Subakut nörolojik semptomların diğer bir nedeninin, geçici demiyelinizasyon olduğu iddia edilmektedir [102, 223, 319].

Geç radyasyon etkileri, radyasyon tedavisi sonrası aylar veya yıllar içinde ortaya çıkar ve kalıcı ve ilerleyici olma eğilimindedir. Tarihsel olarak geç radyasyon etkilerinin, hedef hücre hipotezi olarak adlandırılan, organ parankimal hücrelerinin tükenmesinin neden olduğu fonksiyonel yetersizliğe ikincil olarak meydana geldiği düşünölmüştür [102, 154]. Bununla birlikte, geç toksisiteye ilişkin daha yeni anlayışlar, organ parankim hücreleri, fibroblastlar, vasküler endotelyal hücreler ve makrofajlar arasındaki karmaşık etkileşimleri içermektedir. İyonize radyasyon, pro-fibrozis sinyal yollarının aktivasyonu, hücre dışı matriks ve kollajenin ilerleyici birikimi ile sonuçlanan büyüme faktörü basamaklarını (TGFβ gibi) indükler. Fibrozis, organ fonksiyon kaybı (bağırsak malabsorbsiyonu gibi) ve ayrıca ağrı, nöropati, güç azalması ve eklem hareket açıklığında azalma gibi diğer semptomlarla ilişkilidir. Daha yüksek

radasyon dozları, ışınlama ile geç toksisitenin başlangıcı arasındaki süreyi azaltır [154, 224]. Bu etkiler içerisinde en önemlisi, radyonekroz olup, patogenezinin temelinde, glial hücre hasarı yanında mikrovasküler radyasyon hasarı ve buna bağlı hipoksi yer almaktadır. Vasküler değişiklikler, nöroglial değişikliklere göre daha düşük dozda fakat daha uzun sürede oluşmaktadır [105, 109, 224].

Radyoterapiye sekonder malignite gelişme riski yaş ile ters orantılı olup çocukluk çağında radyasyon alanlarda en siktir. Örneğin, kraniyal ışınlama ile tedavi edilen çocukların, genel popülasyona kıyasla, daha sonra merkezi sinir sistemi maligniteleri geliştirme riski 8.1 ile 52.3 kat arasında daha fazladır. Bunun dışında ışınlanan bölge, ışınlanan toplam hacim, radyasyon dozu gibi etkenler de sekonder malignite gelişme riskini etkileyen ana faktörlerdir [225].

### **5.3 DNA Hasar Yanıtları**

Radyasyon tedavisi, DNA'ya zarar vererek kanseri tedavi eder; bunu da , onarımı zor olan çift zincirli DNA kırılmaları yoluyla gerçekleştirir. Hücreler ise, DNA hasar yanıtı olarak adlandırılan DNA hasarını tespit etmek ve onarmak için karmaşık bir dizi mekanizmaya sahiptir. DNA bazlarına verilen hasar veya tek zincirli DNA kırılmaları gibi basit DNA hasarları kolay onarılabilir [226]. Buna karşılık, çift sarmal kopmalarını onarmak için homolog rekombinasyon ve homolog olmayan uç birleştirme kullanılır ki bu da mutasyon (delesyon ve translokasyon) oluşmasına neden olabilir. Güçlü DNA onarımının, IR'nin etkilerine karşı direnç oluşturarak bazı kanser tiplerinde görülen radyoterapi direncinin de nedeni olduğu düşünülmektedir [231,233].

Tek zincirli bir DNA bağlayıcı protein olan replikasyon proteini A; DNA replikasyonu, hasar onarımı ve hücre döngüsü düzenlemesinde vazgeçilmez bir rol oynar. Bu proteinin gen ekspresyonunun inhibisyonu ile, radyasyondan sonra hücresel DNA onarımının baskılandığı görülmüştür. Glioblastomda yüksek replikasyon proteini A ekspresyonu kötü sağkalım ile ilişkili bulunmuştur ve ekspresyonunun baskılanması ile radyasyona duyarlılığın arttığı görülmüştür [275].

DNA hasar yanıtı ile ilişkili olan bir diğer mekanizma ise Poli ADP-ribozil polimerazlarıdır (PARP); radyasyon sonrası oluşan PARP-1, rapamisinin hedef

molekölü (mTOR) ve adenosin monofosfatla aktive olan protein kinaz (AMPK) yolağını aktive ederek otofajiyi artırır ve radyasyona duyarlılığı inhibe eder. [275].

Kanser hücrelerinde radyasyon kaynaklı DNA hasarının saptanmasının ardından, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K), mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolakları gibi birkaç ana sinyal yolu hızla yanıt verir ve DNA onarımını başlatabilir. MAPK, XRCC1'in (X-ışını tamir tamamlayıcı protein) fosforilasyonunda ve oksidatif stres tepkisinin düzenlenmesinde yer almakta, hasar onarımını artıran hücrel stres tepkilerin uyarılmaktadır [266].

Radyasyon tedavisini takiben hücre ölümü farklı mekanizmalar ile gerçekleşebilir; Apoptoz, mitotik felaket, nekroz, otofaji, yaşlanma, immünojenik etki, seyirci (bystander) etkisi bunlara örnektir [226,227]. Bunlardan en bilineni apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, radyasyonun ana biyolojik sonuçlarından biridir. Hücre onarılmaz hasara yanıt olarak, gen ve proteinlerin ekspresyonundaki düzenleme ile, ilerde daha ayrıntılı bahsedeceğimiz farklı yolakları aktive ederek apoptozisi başlatır. IR'nin kaspaz bağımlı ekstrinsek ve intrinsek apoptozis yollarını ayrıca kaspaz bağımsız T hücrelerden salınan Granzim A/B aracılı apoptozis yollarını uyardığı gösterilmiştir [227-231].

Mitotik felaket ise, anormal bir mitoz bölünme sırasında kromozomların ayrışmaması nedeniyle hücre döngüsü kontrol noktalarının başarısız olması ve dev hücrelerin oluşması sonucu oluşur. IR sonrası hücre ölümlerinin çoğunun bu mekanizma ile olduğu düşünülmektedir. Nekroz, hücrel organellerin parçalanmasını ve hücre zarının kırılmasını içeren bir hücre ölümü türüdür. Apoptozun aksine, hücre zarı bütünlüğünü etkileyen nispeten daha yüksek radyasyon dozlarına yanıt olarak nekrotik hücre ölümü meydana gelir. Hücre içeriğinin kontrolsüz salınımı nekrotik hücre ölümü sırasında meydana gelir ve inflamasyon ve bağışıklık reaksiyonu ile sonuçlanır.

IR'ye bağılı otofaji ise, bir hücre ölümü mekanizmasından ziyade, hayatta kalmayı sürdüren bir hücrel mekanizma olarak kabul edilir ve radyasyona direnç ile ilişkilidir. Radyasyona maruz kalan tümör hücreleri tarafından ayrılmış hücrel organelleri içeren otofagozomlar oluşturulduğunda daha sonra lizozomal bozulmaya uğrar, bu süreç genellikle kanser hücreleri tarafından hücrel bileşenleri geri dönüştürerek stresli ortamda hayatta kalmak için kullanılır [230]. Yaşlanma, hücre

çoğalma kapasitesinin kalıcı kaybını ifade eder. Yaşlanan hücreler canlıdır, ancak bölünmezler, DNA sentezlemeyi durdurur. Radyasyon tedavisinin neden olduğu DNA hasarında yaşlanmanın kanser hücrelerinde meydana geldiği bildirilmiştir [229,231]. IR'ye bağlı immünojenik hücre ölümü, hedeflenen hücreler içindeki belirli antijenlerin hücre zarına doğru yer değiştirmesi ve diğer proteinlerin mikroçevreye hücre dışı salımı ile karakterizedir. Bu salgılanan faktörlere tehlike sinyalleri veya hasarla ilişkili moleküler modeller (DAMPs= danger-associated molecular patterns) denir. Bunlar antijen sunan hücreleri aktive eder ve tümör hücrelerine karşı bir bağışıklık tepkisini uyarır. Kalretikulin, Adenosine Trifosfat , HMGB1 ve ısı şok proteinleri (daha sonra ayrıntısına değineceğimiz ve çalışmamızda baktığımız ısı şok proteini 90 gibi).

Diğer bir mekanizma ise bystander (seyirci) etkisidir. Işınlanmış hücreler, doğrudan ışınlanmamış, yakındaki hücrelerin hücre ölümünü indükleyen tehlike sinyalleri veya diğer sitotoksik moleküller yayabilir. Seyirci etkisi nedeniyle tümörlerde apoptotik hücre ölümü, genomik instabilite tetiklenebilir. Klinik etkileri olabilecek yeni bir kavramdır. p53, mitojenle aktive protein kinazlar (MAPK), Ataksi-telenjiektazi mutasyonlu (ATM) kinaz, Ataksi-telenjiektazi ve Rad3 ile ilgili (ATR) kinaz, LDOPA, nitrik oksid gibi seyirci etkilerinin üretilmesinde rol oynayan hem hücre içi hem de hücre dışı moleküller vardır [232].

#### **5.4 Redistribüsyon Ve Hücre Döngüsü**

Hücre döngüsü; iki yeni hücre üretmek için hücrenin büyüme, replikasyon ve bölünme sürecini içeren bir dizi aşamadan oluşur. Radyosensitivite hücre döngüsünün fazına bağlı olarak değişir. Mitoz ve G2 (mitozdan hemen önceki boşluk) evrelerindeki hücreler daha radyosensitiftir. Buna karşılık, S fazı (DNA duplikasyonu) sırasındaki hücreler daha radyorezistandır. Tümör kitlesi içerisinde hücre döngüsünün farklı aşamalarında olan hücreler mevcuttur. Hücre döngüsü kontrol noktaları hücrelerde kusurluysa veya DNA hasarı onarılamıyorsa, hasarlı hücreleri ortadan kaldırmak için diğer tepkiler (apoptoz, yaşlanma, otofaji hücre ölümü veya nekroz gibi) etkinleştirilebilir. Radyasyon tedavisinin ilk birkaç fraksiyonu öncelikle radyosensitif fazlardaki (mitoz ve G2) hücreleri öldürürken, radyorezistan fazlardaki (S fazı) hücrelere daha az etki eder. Bununla birlikte, hayatta kalan hücreler hücre döngüsünü sürdürmeye devam edecek ve radyasyon tedavisinin sonraki fraksiyonları bu hücreleri radyosensitif fazlarda yakalayacaktır. Bu redistribüsyon (yeniden dağılım) olarak

adlandırılmaktadır. Sonuç olarak, fraksiyone radyasyon tedavisinin tek ve yüksek doz radyasyon verilmesinden daha etkili olduğu düşünülmektedir [227, 230, 231]. Ancak kanser hücrelerinde de buna yanıt olarak, ATM ve ATR aktivasyonu ile hücre döngüsü durdurulur, hasarlı DNA'nın mitoza gitmesi engellenir ve DNA onarımı mekanizmaları aktifleştirilir. ATM'nin aktivasyonu, p53'ü ve kontrol noktası kinaz 2'yi (Chk2) uyarır. p53, p21'i aktive ederek döngüsü G1/S fazında durdurur. ATM ekspresyonunun radyasyona yetersiz yanıtla ilişkili olduğu bulunmuştur. ATM ekspresyonunun inhibisyonu; Nükleer faktör-κB (NF-κB) translokasyonunu önleyerek, p38 fosforilasyonunu inhibe ederek ve c Jun N terminal kinaz (JNK) aktivitesini uyararak kanser hücrelerinin radyoterapiye duyarlılığını artırabilir [275].

## **5.5 Repopülasyon**

Repopülasyon radyasyon ile ölen dokudaki hücrelerin yerine zamanla yeni hücreler çoğalarak gelmesidir. Hızlandırılmış repopülasyon, radyasyon tedavisini takiben önemli bir tedavi başarısızlığı nedenidir. Fraksiyone radyasyon tedavisi sırasında, hayatta kalan tümör hücreleri çoğalabilir ve radyasyon tedavisi ile öldürülen tümör hücrelerinin yerini alabilir. Tümör hücrelerinde repopülasyonu hızı, radyasyon tedavisinin başlamasından sonra büyümenin giderek daha hızlı bir şekilde meydana gelmesiyle birlikte hızlanır. Hızlandırılmış repopülasyon lokal kontrolü sağlamak için yok edilmesi gereken daha fazla sayıda tümör hücresi oluşması nedeniyle, genel tedavi süresini uzatmaktadır. Repopülasyonun etkilerine karşı koymanın bir yöntemi, radyasyonun daha az gün içinde verildiği ve tümör hücrelerinin çoğalması için daha az zaman sağladığı hızlandırılmış radyoterapidir. Bununla birlikte, bu strateji radyasyon hasarından kaynaklanan normal doku onarımı fırsatını da azaltmakta, böylece tedavinin toksisite riskini artırmaktadır. Ayrıca radyosensitiviteyi artıran, tümör hücresi reoksijenasyonu ve hücre döngüsünün fazlarına geçiş için daha az fırsat bırakır [227, 230].

## **5.6 Reoksijenizasyon ve Anjiyogenez**

Tümör hipoksisi, solid tümörlerin ortak bir özelliğidir. Tümörün hızla büyümesi nedeniyle, bazı hücreler vaskülarizasyondan uzak kalır ve diffüzyon kısıtlı kronik hipoksik alanlar oluşur. Kan damarlarının geçici olarak tıkanıp durumlarda ise akut olarak hipoksi gelişebilir, bu da perfüzyon sınırlı hipoksiye neden olur. Hipoksik

alanlarda, eşdeğer hücre öldürme etkisini elde etmek için normale göre radyasyon dozunun üç katına kadar ihtiyaç duyulabilmektedir. İyonize radyasyona bağlı DNA hasarının önemli bir mekanizması olan reaktif oksijen radikallerinin üretilmemesi nedeniyle hipoksik radyorezistans gelişmektedir. Ayrıca, hipoksik bir mikro çevreye yanıt olarak hücreler; anaerobik metabolizmayı, invazyonu ve anjiyogenezi teşvik etmek için hipoksi ile indüklenebilir transkripsiyon faktörlerini aktive eder. Bu değişiklikler daha agresif ve radyo-dirençli bir fenotip oluşmasına, tedavi sonrası nüks gelişmesine neden olabilir [234].

Toplam radyasyon dozu, günler veya haftalar içinde verilen çok sayıda daha küçük doza bölündüğünde (fraksiyone); oksijenizasyon iyileştirilebilir, böylece radyasyon tedavisinin etkinliği artar. Radyasyon tedavisinin fraksiyonları arasındaki dönemde, tümör dakikalar içinde geçici olarak kapatılan damarlardan reperfüzyon yoluyla hızlı bir şekilde oksijenlenebilir ve böylelikle tümör hücreleri radyasyon tedavisinin etkilerine sekonder olarak ölür [235]. Radyocerrahide hedef lezyon tahrip edici dozda radyasyon alırken, etraf normal dokuda küçük bir alan olsa da radyasyon dozuna maruz kalmaktadır. Bu durum, normal doku hasarına ve ödeme yol açmaktadır [226]. SSS'de radyocerrahiye bağlı vasküler permeabilitede değişikliklerle sonuçlanan endotelial hücrelerde şişme, damarların genişlemesi, bazal membranda kalınlaşma gibi vasküler bozukluklar sıkça gözlenmektedir [236].

İyonize radyasyon, hipoksi-indüklenebilir-faktör 1-alfa (Hif-1 $\alpha$ ) ilişkili yolakla vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ekspresyonunu artırmaktadır. Anjiyogeneze etkili olan büyüme faktörlerinden biri olan ve vasküler permeabilite faktörü olarak da bilinen VEGF, radyasyona yanıt olarak endotel hücrelerinin proliferasyonunu uyarır, su ile büyük moleküler ağırlıklı proteinler için damar geçirgenliğini artırır. Gelişmekte olan SSS'de VEGF yeni damar oluşumu için kritik role sahipken, anjiyogenezi tamamlamış erişkin SSS'de düzeyi azalmaktadır [237]. Metabolik ihtiyacın arttığı patolojik durumlarda (tümör, iskemi, travmatik beyin hasarı veya radyasyon hasarı), VEGF düzeyi artmaktadır [101, 237]. Glioblastom tedavisinde kullanılan bevacizumab da etkisini VEGF blokajı ile sağlamaktadır. Stereotaktik radyocerrahi sonrası SSS'de VEGF düzeyinin zamana bağımlı olarak değişiklik gösterdiği, buna göre ışınlanan bölgelerde 8 haftada aşamalı olarak yükselerek, 16 haftada maksimum düzeye ulaştığı, 20 hafta sonrasında azalmaya başladığı gösterilmiştir [238]. VEGF'in erken dönem değişiklikleri konvansiyonel radyoterapi

ile stereotaktik radyocerrahide benzer olmakla birlikte, SRC'yi takiben VEGF artışı daha uzun süreli olmaktadır. SRC'ye bağlı geç dönem hasar, tedaviden aylar sonra çıkabilmektedir. VEGF'in sonradan azalmasının, gecikmiş hücre kaybı ve nekrozla ilişkili olduğu düşünülmüştür [238, 239]. Sonuç olarak, radyasyon hasarı sonrası görülen geç dönem nekroz ve ödemde, patolojik anjiogenez ve vasküler permeabilite artışı etkili olmaktadır. SRC'yi takiben hasara cevap olarak görülen VEGF artışı, oluşan patolojik anjiyogenezden ve permeabilite artışından sorumlu tutulabilir [238, 239].

## 5.7 Radyosensitizasyon

Farklı kanser türleri veya aynı kanserin farklı alt türleri, farklı radyosensitiviteye sahip olabilir. İntrinsik radyosensitivite, kanser hücrelerinin genomik kararsızlıkları ile ilgilidir. Tümör hücrelerinde radyosensitivite veya radyorezistans ile ilişkili potansiyel genlerin belirlenmesi ve radyoterapi ile kombinasyon halinde hedeflenmesi radyoterapinin etkinliğini artırabilir ve nihayetinde hastanın sağkalımını iyileştirebilir. Radyosensitizör ilaçlar, radyasyon tedavisinden sonra hayatta kalan hücrelerin oranını azaltır. Sistemik ilaçların radyasyon tedavisinin etkinliğini arttırdığı birçok mekanizma vardır (Tablo 5.1 ve Tablo 5.2). Günümüzde radyonekrozun en etkin medikal tedavisi olarak, VEGF'e karşı monoklonal antikor olan bevacizumab görünmektedir [240].

**Tablo 5.1 : Radyoterapide kullanılan ilaçların mekanizması [241].**

Mekanizma	Örnek
Artmış radyasyon ilişkili DNA hasarı veya bozulmuş DNA tamiri	Antimetabolitler, Alkilatörler, Platinyum ajanlar, Topoizomeraz inhibitörleri
Hücrelerin radyosensitif hücre döngüsüne redistribüsyonu	Antimetabolitler, Topoizomeraz inhibitörleri
Radyoterapiden sonra hızlanan repopülasyonu azaltan sitostatik ajanlar	Moleküler hedef ajanlar
Tümör kanlanmasını artırarak hipoksi ilişkili radyorezistansı azaltma	VEGF-hedefli ajanlar
İmmünojenik ajanların salınımıyla proinflamatuvar sinyal yollarının indüksiyonu	İmmün kontrol noktası inhibitörleri

**Tablo 5.2 : Radyosentitizör ilaçlara örnekler [241].**

	Örnek
Antimetabolitler	5-Fluorourasil, Gemcitabine, Pemetrexed
Alkilatörler	Siklofosamid, Temozolomid
Platinyum ajanlar	Cisplatin, Carboplatin
Mikrotübül düzenleyiciler	Vincristine, Docetaxel
Topoizomeraz inhibitörleri	Etoposide, Doxorubicin
Moleküler hedef ajanlar	Bevacizumab (VEGF), Trastuzumab (HER2-neu), Gefitinib (EGFR)
İmmün kontrol noktası inhibitörleri	Pembrolizumab (PD-1), Nivolumab (PD-1), Ipilimumab (CTLA-4)

### 5.8 Uzak Hücresel Etki

Uzak hücresel etkiler veya seyirci etkileri, ışınlanmış hücrelerin yakınında bulunan ışınlanmamış hücreler, ışınlanmış hücelere benzer hücresel hasara uğradığında ortaya çıkar. Hedeflenen hücreler radyasyonla öldürülebilirken, seyirci teorisine göre, hedeflenmemiş hücreler de sonunda hücreyi öldüren radyasyon hasarı belirtileri gösterebilir. IR'ye maruz kalan hücreler, hasar sinyallerini, gap-junctionlar (ara bağlantılar) yoluyla komşu hedeflenmemiş hücelere yönlendirdiğinde; bu hücelerde radyasyon almış gibi davranır. Seyirci etkileri hem tümör hem de normal hücelerde kanıtlanmıştır. Tümörler yüksek doz radyasyon ile hedeflenirken, lezyon çevresindeki normal doku çok daha düşük dozlarda radyasyon alır. Hedeflenmemiş normal dokudaki maruz kalınan radyasyonun, sekonder olarak birincil kanser riskini arttırdığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, sağlıklı hücelerdeki düşük doz (2-50 mGy) radyasyona maruziyetin; sitokin ve reaktif oksijen radikallerini uyararak, prekanseröz hücre popülasyonunda apoptozise neden olduğu gösterilmiştir [242, 243]. Seyirci etkisinin yanı sıra, radyasyona maruziyetten sonra bildirilen bir diğer uzak hücresel etki ise; adaptif yanıttır. Adaptif yanıt sonraki radyasyon dozlarına dirence neden olurken, seyirci etkisi hücre ölümü ile sonuçlanır. Adaptif yanıt modeline göre; radyasyonun ilk dozu, sonraki dozlara göre tümör hücresi popülasyonunun daha yüksek bir yüzdesini öldürmesi gerektiğinden, doz fraksiyonu başına izoetki artık geçerli bir teori değildir [242-244].

## 5.9 Radyasyon ve Tümör Mikroçevresi

Bağışıklık sisteminin hemen hemen tüm dokuları denetlemede rol oynadığı ve neoplastik veya anormal işleyen hücrelerin büyük çoğunluğunu klinik olarak tanımlanabilir hale gelmeden çok önce ortadan kaldırdığı bilinmektedir. Yine de, bağışıklık sisteminin düzenleyici ve immüsupresif yeteneklerinin zaman zaman tümör büyümesini, anjiyogenezi ve hatta metastatik yayılmayı destekleyebileceğine dair önemli klinik ve klinik öncesi kanıtlar vardır. Bağışıklık sisteminin bu görünüşte iki yüzlü rolü için popüler bir hipotez öne sürülmüştür: 'Eliminasyon, Denge ve Kaçış' [245]. Eliminasyon aşamasında, bağışıklık sistemi tüm normal hücreleri denetler ve herhangi bir neoplastik veya düzensiz hücreyi tanımlayabilir ve ortadan kaldırabilir. Bu hücrelerin bazıları, genetik mutasyonlar biriktirmeye devam edip çoğaldıkça, kontrolsüz neoplastik hücre bölünmesi ile immün aracılı eliminasyon arasında bir "denge"ye ulaşırlar. Sonunda, bağışıklık sisteminin tümörün büyümesini engelleyemediği ve klinik olarak tanımlanabilir kanserin ortaya çıktığı 'kaçış' aşamasına ilerler. Klinik tedavinin amacı, dengeyi eliminasyon lehine değiştirmektir. Bununla birlikte, tümörler ilerledikçe ve adapte oldukça, genellikle bağışıklık hücrelerini tümör mikroçevresinden dışlamak, işlevlerini baskılamak veya bağışıklık sisteminden saklanmak gibi mekanizmalar geliştirir [246]. Tüm konakçı hücreler, hücre yüzeylerinde immün tanınmaya ve korunmaya izin veren majör histo-uyumluluk kompleksi (MHC) sınıf I bulundurur. Enfekte hücredeki antijenler veya kanser hücrelerindeki mutasyona uğramış onkogenlerden gelen peptitler gibi yabancı proteinler, MHC'ye yüklenir ve immün sistem tarafından yabancı olarak tanınmasını sağlar. Bununla birlikte, tümör hücreleri sıklıkla MHC üretimini azaltarak bağışıklık sisteminden kaçabilir. IR sonucu oluşan enflamasyonun MHC sınıf I ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir [247].

Sağlam ve tümöral dokuda radyasyon etkisiyle meydana gelen yapılar, viral antijen gibi davranarak, endoplazmik retikulum (ER) stresine neden olur. ER stresi sonucu, proteinlerde yanlış katlanma ve birikim sonucu şaperon adı verilen proteinler oluşur, sonra da apoptoz ve hücre ölümü gerçekleşir. Hücresel stres, beklenmedik ölüm veya yabancı antijenler, bir bağışıklık tepkisi oluşturmanın ilk adımıdır. Tepki hasarla ilişkili moleküler kalıpları (DAMPs=damage-associated molecular patterns) ve patojenle ilişkili moleküler kalıpları (PAMPs=pathogen-associated molecular

patterns) içerir. PAMP'ler; toll-like reseptör (TLR), retinoik asit ile indüklenebilir gen (RIG-I) benzeri reseptör gibi patojen tanıma reseptörleri (PRR) tarafından algılanan eksojen sinyaller sağlayabilen, konakçı dışındaki organizmalarla ilişkili moleküllerdir. DAMP'ler ise radyasyon gibi dış uyaranlara karşı bağışık sistemini aktive eden hücre içi moleküllerdir. Tabloda DAMP örnekleri verilmiştir; çalışmada da özellikle baktığımız ve daha sonra ayrıntısına değineceğimiz ısı şok proteini 90 buna örnektir (Tablo 5.3). IR, DAMP'i doza bağlı bir şekilde indükler [248-251]. Bu nedenle, IR'ye bağlı immünojenik hücre ölümü, DAMP sinyalleriyle birlikte bir tümör kaynaklı antijen kaynağı sağlar. Bu, anti-tümör bağışıklığının oluşturulması için gerekli bir kombinasyondur. DAMP'ler, dendritik hücrelerin aktivasyonunu ve olgunlaşmasını, ayrıca NK hücrelerin aktivasyonunu teşvik edebilen hücre hasarı ve stres göstergeleridir. DC'ler, çevresindeki antijen ve hücre kalıntıları aldıktan sonra lenf düğümlerine giderek, T hücreleri üzerindeki MHC Sınıf I veya II reseptörlerine CD40 ile bağlanıp antijen sunan hücrelerdir (APC).

**Tablo 5.3 : DAMP örnekleri ve özellikleri [251].**

DAMP	Bağışıklık aktivasyonu yolu	Reseptörler	Azalttıkları etkiler
kalretikülin	Erken evre hücre ölümünde hücre yüzeyine yer değiştiren endoplazmik retikulum şaperonu	CD91, SRF1	Makrofajlar tarafından fagositoz
Isı şoku proteinleri 28, 70, 90	Hücre yüzeyine yer değiştiren veya hücre dışı olarak salınan sitozolik ve nükleer proteinler, Antijenik peptit şaperon	NK hücreleri, CD94	NK aktivasyonu
HSP60, HSP70	Hücre yüzeyine yer değiştiren veya hücre dışı olarak salınan mitokondriyal proteinler	TLR4, TLR2, CD14	DC ve monosit aktivasyonu, immün indüksiyon
HSP78, HSP96	Hücre yüzeyini yer değiştiren endoplazmik retikulum proteinleri	CD91	DC aktivasyonu ve geçişi
HMGB1	Hücre dışı salınır	TLR4	DC aktivasyonu, bağışıklık indüksiyonu
Adenosin trifosfat	Hücre dışı salınır	P2X7	DC aktivasyonu, T hücresi hazırlama

IR etkisiyle oluşan oksitlenmiş lipidler ve proteinler veya radyasyonun DNA hasarına bağlı apoptozis sonucu oluşan hücre kalıntıları , PRR'leri aktive ederek DAMP'leri ve PAMP'leri taklit etme kabiliyetine sahiptir [251, 252]. IR sonrası stres ve PRR uyarımı; tümör nekroz faktörü  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), IL1, IL-6, IL-12 ve interferonlar (IFN) dahil olmak üzere inflamatuvar sitokinleri indükler. Bu sitokinler TMCÇ'deki hücreler ile iletişime geçer. Tip I IFN'ler, tümör hücresi tarafından antijen sunumunu uyararak, bağışıklık hücreleri tarafından öldürülmeye karşı duyarlı hale getirir, ayrıca NK işlevini ve T hücrelerinin yanıtını artırır. Bununla birlikte, kronik maruz kalma, artan IL-10 salgılanması ve programlanmış ölüm ligandı 1'in (PD-L1) artmasıyla ile immünsupresyona yol açabilir. Tümör hücrelerinde IFN $\alpha$  reseptörü aracılığıyla tip I IFN sinyali, genellikle bir bağışıklıktan kaçış mekanizması olarak aşağı regüle edilir. DC'lerdeki tip I IFN'ler bloke edildiğinde radyasyon etkinliğinin azaldığı gösterilmiştir [253]. Tip 1 IFN uyarımında rol alan temel yollardan biri DC'lerde bulunan interferon genlerini uyarıcı (STING=stimulator of interferon genes) yoldur. IR'den sonra meydana gelen çift sarmallı DNA kırılmaları (ÇDK) ile aktive olur. ÇDK için onarım mekanizmaları daha önce bahsettiğimiz üzere, hücre döngüsü durması sırasında meydana gelen homolog olmayan uç birleştirmeyi veya homolog rekombinasyonu içerir. ÇDK'lar, tip 1 IFN salınımını ve STAT1 aktivasyonunu uyararak tümör hücresini apoptozise yönlendirir. DC'ler tarafından ekspresyonu artan CD47, tümörlerin immün sistemden ve fagositozdan kaçmasına olanak sağlar [254].

CD8+ T hücrelerinin sitotoksik fonksiyonlarını yerine getirmek üzere aktive olması için hem antijen tanımaya hem de uyarılmaya ihtiyacı vardır [206-208]. CTL hücrelerinin aktivasyonu; APC'lerin MHC Sınıf I ve B-7 reseptörlerine sırasıyla T lenfosit üzerinde bulunan, T hücre reseptörü (TCR) ve CD28 reseptörü ile bağlanması ile başlar. CTL'lerin ayırt edici bir özelliği, hedef hücreleri öldürmek için granül ekzositozu yoluyla granzim A ve granzim B salmalarıdır. Ancak uyarıcı veya baskılayıcı olmadan, CTL hücresi bir antijenle karşılaşırse tolerans gelişip tükenmiş (yorgun) T hücre konumuna geçecektir. Tükenmiş T hücreleri; PD1, lenfosit aktivasyon geni 3 (LAG3) ve T hücresi immünoglobulini ve müsin alanı içeren-3 (Tim3) salgılar [255]. CD4 yardımcı hücreleri, etkilerinin çoğunu kemokinler ve sitokinler yoluyla gösterir. CD4 T hücresi alt gruplarına, inflamatuvar yanıtlarda yer alan 3 ana fenotip dahildir; Th1, Th2, Th17 ve T düzenleyici hücreler (Treg'ler). Th1, IFN $\gamma$  ve TNF sitokinlerini salgılmaktadır. Th1 CD4+ yardımcı hücre yüzeyi reseptörü,

CXCR3 ve IL-12R içerir. Th1 yanıtları, hücre içi patojenlerle ilişkilidir ve hücrenel aracılı bağışıklığı destekler. Th2 yanıtları, hücre dışı patojenler ve humoral bağışıklık ile ilişkilidir ve IL-4, IL-5 ve IL-13 salgılar. Th2'ye farklılaşmış CD4 hücreleri, CCR5 ve IL-4R gibi yüzey reseptörleri içerir. Treg'ler, normal bağışıklık homeostazı için gerekli olan düzenleyici hücrelerdir. Tregler yüzey reseptörü olarak CD25 bulundurulur, FOXP3 aktivitesine sahiptir, bağışıklık üzerine negatif düzenleyici etkisi olan kanser progresyonunda rol oynayan IL-10 ve TGF $\beta$  salgılar. Yardımcı hücrelerin Th17 alt kümesinin, kanserin ilerlemesinde ve kontrolünde karmaşık ve değişken bir role sahip olduğu ancak son zamanlarda ortaya konmuştur. Th17 CD4 hücreleri ve Treg hücrelerinin birbirine dönüşebileceği de gösterilmiştir. Adaptif bağışıklığın yanı sıra, NK hücreleri gibi efektör işlev yapabilen doğuştan gelen hücreler vardır. NK hücreleri antijene özgü değildir, aksine sağlıklı hücrelerde MHC Sınıf I'e bağlandıklarında inhibe edilirler. MHC Sınıf I'in aşağı regüle edildiği tümör hücrelerini hedefleyerek bağışıklığa katkı sağlarlar. CTL hücrelerine çok benzeyen NK hücreleri, perforin ve granzim B ile granül ekzositozu yoluyla hedef hücreleri öldürür [211, 256, 257]. Genel olarak, bağışıklık hücreleri epitel hücrelerinden daha radyo-duyarlıdır. Lenfosit popülasyonları için, daha düşük 1 Gy dozları bile hücre ölümünü indükleyebilir. Miyeloid popülasyonlar 20Gy'ye kadar hayatta kalabilir, daha radyo-dirençli olma eğilimindedir. Bununla birlikte, daha düşük RT dozları, bağışıklık hücre popülasyonları üzerinde yeniden programlama etkilerine sahip olabilir [257, 258].

Hipofraksiyone radyocerrahi, tümör infiltre edici lenfositleri öldürerek, tümör üzerindeki iyileştirici etkilerini tersine çevirebilir [258]. Lokal tümör kontrolü büyük ablatif dozlarla kolayca elde edilebilse de, bu dozlar immünsüpresif moleküllerin yukarı regülasyonuna, TGF $\beta$  salgılanmasına, MDSC ve Treg hücre artışına neden olarak tümör ilerlemesini artırabilir ve prognozu olumsuz etkiler [259]. Ayrıca IR, vaskülojenezi ve tümör yeniden büyümesini destekleyen kemik iliği kaynaklı CD11b+ miyeloid hücreleri artırır [260]. Düzensiz tümör büyümesi yine aynı şekilde düzensiz bir tümör vasküler ağıyla sonuçlanır. Bu düzensiz vasküler ağ içerisindeki endotel hücreleri de gelişimini tam olarak tamamlayamamıştır. Bunun sonucu olarak dolaşımdan immün hücrelerin ekstravazasyonu azalır. Endotel hücreleri ayrıca, tolerizasyona yol açan inhibitör moleküllerin ekspresyonu yoluyla T hücresi aktivasyonunu da etkileyebilir. Bu düzensizlik, hipoksinin artmasına neden olmakta, ilaçların tümöre ulaşmasını zorlaştırmakta, radyo-dirence de katkı da bulunmaktadır.

TMÇ'deki hipoksi, tümör hücrelerinin hayatta kalmasını düzenleyen hipoksi ile indüklenebilir 1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ) ekspresyonunun artmasına neden olur [234, 235]. IR ayrıca, anti-tümör bağışıklığı üzerinde hem olumlu hem de olumsuz etkileri olan tümör mikroçevresinin bileşenlerini doğrudan etkiler. IR; VCAM1, ICAM1 ve CD31 dahil olmak üzere vasküler ve matriks adezyon proteinlerinin ekspresyonunu artırır, bu da immün hücre ekstrasvazasyonunu ve tümör infiltrasyonu kolaylaştırır [261].

Hipofraksiyone SRC immünmodülör etki göstermektedir, doğrudan hücre ölümünü indükleyerek, çapraz sunum için büyük miktarlarda antijen salar ve böylece lokal tümör büyümesini kontrol ederek tümör hücrelerinin intrinsik radyo-direncinin üstesinden gelmek için kullanılır. Ayrıca, DAMP ekspresyonunda doza bağlı bir artışa ve hayatta kalan tümör hücreleri üzerinde MHC Sınıf I'in yukarı regülasyonuna neden olarak, bağışıklık kaçışını tersine çevirerek bir immünomodülör işlevi görmektedir [247]. Tek yüksek doz radyasyon tedavisinin dezavantajı; immüno-inhibitör molekül PD-L1'in yukarı regülasyonuna ve M2 fenotipindeki TAM'lar tarafından salgılanan TGF $\beta$  ile inflamasyonun artmasına neden olarak anti-tümör tepkisini azaltmasıdır. Radyasyon tedavisi aynı zamanda MDSC'leri çeken CCL2, MIP-1 $\alpha$ , CCL5, CCL7, CCL12 gibi sitokinlerin salgılanmasını ve Treg'leri çeken CCL22 ve CXCR3 gibi sitokinlerin salgılanmasını artırır [259].

Hipofraksiyone RT, TNF reseptör ailesinin bir üyesi olan ve CTL aracılı öldürmeyi daha da artıran Fas/CD95'te doza bağlı bir artış yapmaktadır. Tümör hücrelerindeki fenotipik değişikliklerin yanı sıra, ayrıca lökosit göçünü neden olan adezyon moleküllerinde de bir artışa neden olur. Radyasyondan sonra TMÇ içindeki inflamatuvar ve düzenleyici tepkilerin bu hassas dengesi, sitokin ve kemokin miktarı ile de ilişkilidir. Radyasyondan sonra TNF $\alpha$ , IL-6, CXCL10, CXCL16, CCL5 (çalışmamızda bakılan CCL4'ün reseptörü) gibi sitokinlerin ve kemokinlerin ekspresyonunun arttığı, efektör T hücrelerini tümöre çektiği ve aynı zamanda Treg sayısı azalttığı gösterilmiştir [259, 262]. Bununla birlikte radyoterapinin etkinliğini artırmak ve radyorezistan mekanizmaları önlemek için Tablo 5.2 de örneklerini verdiğimiz gibi immün kontrol noktası inhibitörleri ile kombinasyon tedavileri de mevcuttur.

Radyasyon, tümöre özgü bir T hücresi tepkisini indükler, ancak tedaviden sonra bağışıklık tepkileri, TMÇ'deki bağışıklık baskılayıcı faktörler tarafından sıklıkla zayıflatılabilir. Bağışıklık düzenlemesini tersine çevirmek için başka bir yaklaşım, RT

sonra uyarılan immünsüpresif hücreleri ve molekülleri modüle etmektir. Agresif metastatik akciğer kanseri üzerine yapılan bir çalışmada; DC'lerin proliferasyonunu ve infiltrasyonunu uyarmak için, Flt3-Ligand (diğer büyüme faktörleri ile beraber çoğalmayı ve diferansiyasyonu uyaran bir protein) ile tek fraksiyonlu RT kombinasyonun, metastatik ilerlemenin azalmasına, etkili tümör kontrolüne ve sağkalımda uzamaya neden olduğu gösterilmiştir [263]. Kombinasyon terapilerine yönelik araştırmalar, olumlu ilerleme olduğunu öne süren birçok çalışma ile son on yılda önemli ölçüde artmıştır. Bununla birlikte, dozlama, programlama ve modellerdeki farklılıklar nedeniyle, olumlu sonuçlar genellikle çelişkili ve karşılaştırması zor olabilir. Etkin tümör kontrolü ve standardizasyon için doğru fraksiyon ve doz değerini saptamak da çalışmamızdaki amaçlardan biridir.

### **5.10 Sinyal Yolakları ve Kanser Kök Hücreleri**

İnsan kanser dokularından ve klinik öncesi çalışmalardan elde edilen kanıtlar, farklı sinyal yollarının kanser progresyonu, metastaz ve kemo/radyo-dirençte kritik bir rol oynadığını göstermektedir. Radyorezistansı belirleyen sinyal yollarını anlamak, hastalar için uygun tedavi yöntemlerini seçmek ve insan kanserlerinde radyosensitiviteyi arttırmaya yönelik yeni moleküler ajanlar geliştirmek için hayati önem taşımaktadır. Bu bölümde, kanser radyo-direnci ile yüksek oranda ilişkili olan birkaç önemli sinyal yolağından ve kanser kök hücrelerinin (CSC'ler) öneminden bahsedeceğiz. IR'ye yanıt olarak hayatta kalma sinyali yolları tipik olarak DNA onarımının desteklenmesinde ve apoptoz uyarımının inhibisyonunda rol oynar. Bu sinyal yolakları, kanser hücrelerinde radyasyonun neden olduğu sitotoksisteyi en aza indirmek için birlikte hareket edebilir ve ardından kanser hücrelerini radyo-dirençli hale gelecek şekilde biyokimyasal olarak yeniden programlayabilir [278]. Kanser radyo biyolojisine klasik yaklaşım olan 6 R'ye yukarıda değinmiştik. Bunlar; DNA hasarına yanıt (repair of DNA damage), redistribüsyon, repopülasyon, reoksijenizasyon, radyosensitivite ve uzak hücrese etkilerdir (remote cellular effects). Klasik radyobiolojide, başarısızlık oranı (direnç) radyobiyojinin 6 R'si tarafından belirlenmektedir. Bununla birlikte, günümüzde birçok solid kanserin yaygın olarak CSC'ler olarak adlandırılan ve tümör hücrelerinde heterojeniteden sorumlu küçük bir hücre grubunu içerdiği bilinmektedir. Bu hücrelerin, geleneksel radyasyon tedavisine ve kemoterapiye doğal olarak dirençli oldukları bulunmuştur [264]. Yüksek dereceli

gliomalarda, CSC'lerin radyasyona yanıt olarak insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF1) aracılığıyla DNA hasar kontrol noktasında daha fazla aktivasyona neden olarak radyasyona bağlı hasarın onarıldığı gösterilmiştir [265]. Bu CSC'ler süresiz olarak yenilenme, invazyon ve metastaz yapma yeteneğine sahiptir. CSC'lerin temelde reaktif oksijen radikalleri tarafından uyarılan gelişmiş bir DNA onarım mekanizması vardır. CSC'lerin akut ışınlama sonrası, IGF1-AKT (Protein kinaz B) yolağında hızlı bir aktivasyona neden olarak radyasyona direnç geliştirdiği gözlenmiştir. Ek olarak metformin, salinomisin, rapamisin gibi ilaçların kullanımı; CSC'nin kendini yenilemesini veya redoks kapasitesini inhibe ederek radyo-dirençli hücrelerin gelişimini önlemeye yardımcı olabileceği de gösterilmiştir [266, 273]. Çeşitli kanserlerde CSC'leri tanımlamak için kullanılan belirteçler aşağıda tabloda gösterilmiştir (Tablo 5.4).

**Tablo 5.4 :** Farklı histolojik kökenli kanser kök hücrelerinin (CSC'ler) potansiyel belirteçlerinin listesi [269].

Belirteçler	Tümör tipi
CD34+ CD38-	Akut miyeloid lösemi (AML)
ALDH1+	Kolon, AML, meme, mide, melanom
CD133+	Beyin; kolon, pankreas, akciğer, prostat ve mide
CD133+ EpCAM+	Karaciğer kanseri
CD44+ EpCAM+	Kolon kanseri
ESA+ CD44+ CD24+	Pankreas kanseri
CBX3+ ABCA5+	Osteosarkom
LGR5+	Kolon kanseri
CD44+ CD24-	Meme kanseri
CD44+ a2b1 high CD133+	Prostat kanseri
ABCB5+	Melanom
CD44+	Kolon, baş ve boyun kanseri
CD24+	Kolon kanseri
CD166+	Kolon kanseri; küçük hücre dışı akciğer kanseri
CD44+ ALDH1+	Over kanseri
CD90+	Karaciğer kanseri
CD34+ CD38+ CD19+	Lösemi
HSP DNAJB8	Renal hücreli karsinom

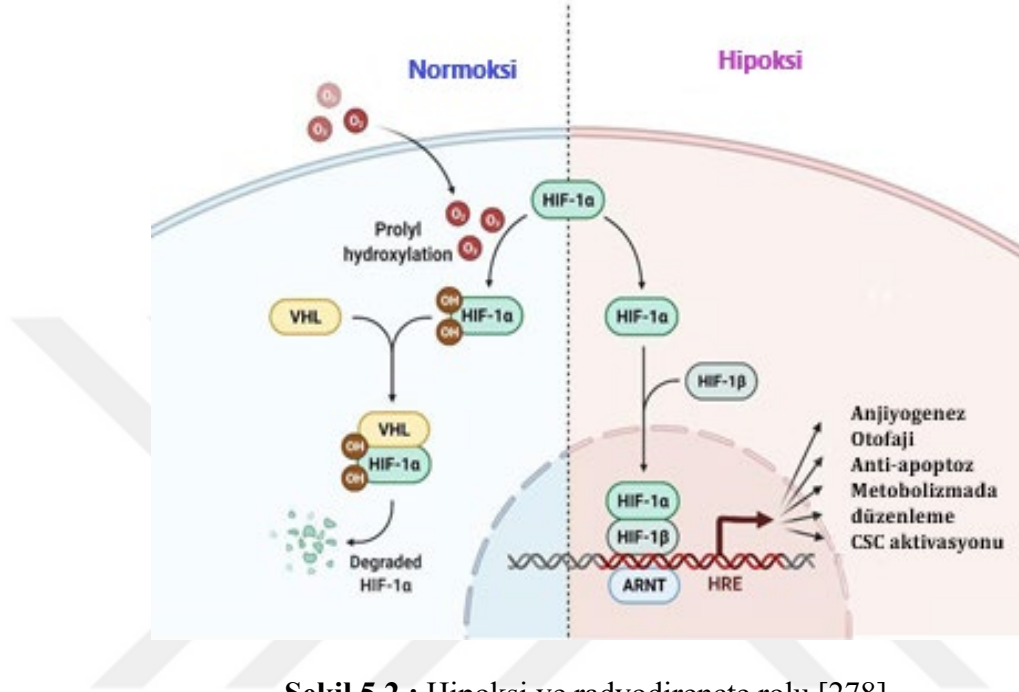
Metabolik değişikliklerin sistemik kanserin oluşumunda ve ilerlemesinde bir risk faktörü olduğu bilinmekle birlikte, özellikle glikolitik ve mitokondriyal metabolizmalardaki değişikliklerin radyo-direnç gelişimine katkıda bulunabileceği de gösterilmiştir [266]. Kanser hücreleri, ‘Warburg etkisi’ olarak adlandırılan, oksijen varlığında dahi enerji ihtiyacını oksidatif fosforilasyon yerine glikoliz ile sağlamaktadır. Bu da tümör hücreleri için, geçici veya kalıcı, hipoksik şartlara duyarsız olmalarını sağladığından hayatta kalma avantajı oluşturmaktadır. Ayrıca meydana gelen artmış glikoz alımı, hem homolog olmayan uç birleştirme hem de homolog rekombinasyon yollarını aktive ederek radyasyonun neden olduğu DNA zincir kırıklarının yeniden birleşmesini kolaylaştırır, böylece kanser hücrelerinde radyasyonun neden olduğu sitogenetik hasarı azaltmaktadır. Oluşan laktat ise hücre göçünü, anjiyogenezi, immun sistemden kaçışı artırmakta ve radyasyona direnç oluşturmaktadır. Glikoz taşıyıcı-1’in (GLUT1) hipoksi varlığında üretiminin arttığı, radyoterapiye direnç ve kötü prongoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [266, 268]. Kolon, meme ve glioblastom kanser hücre serilerinde, siklin bağımlı kinaz-1’in (CDK1), sirtuin 3’ün (SIRT3) aktivasyonunu uyardığı, mitokondriyal protein deasetilasyonunu düzenleyerek mitokondriyal fonksiyonları artırdığı ve radyasyona direnç gelişmesine neden olduğu gösterilmiştir [267].

Mevcut literatür, iyonlaştırıcı radyasyonun yaşlanmayı, apoptozisi, otofajiyi, hücre döngüsü kontrol noktalarını ve DNA onarımına yol açan çok sayıda hücre sel sinyal yolunu aktive edebileceğini göstermektedir. Buna yanıt olarak da tümör hücresindeki hayatta kalma sinyali yolları ise, DNA onarımının desteklenmesinde ve apoptoz indüksiyonunun inhibisyonunda rol oynar. Bu sinyal yolları, kanser hücrelerinde radyasyonun neden olduğu sitotoksisteyi en aza indirmek için birlikte hareket edebilir ve ardından kanser hücrelerini radyo-dirençli hale gelecek şekilde biyokimyasal olarak yeniden programlayabilir.

### **5.10.1 HIF1 ve radyorezistans**

Hücrelerdeki hipoksik koşullar genellikle radyoterapi sonuçları üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir. Hipoksik ortam, tümör hücresi metabolizmasının oksidatif metabolizmadan, tümör hücrelerini koruyan ve tümör kök hücrelerinde radyorezistansın gelişimini indükleyen anaerobik glikolize dönüşümünü teşvik eder. HIF1, anaerobik glikolitik yolda bir aracı faktördür ve transkripsiyonunun aktivasyonu

ile birlikte radyasyona direnç oluşturmaktadır. Oksijene bağımlı HIF1 $\alpha$  ve bağımsız HIF1 $\beta$  olmak üzere iki alt birimden oluşur (Şekil 5.2). HIF1 $\alpha$ 'nın hücre proliferasyonu, glukoz metabolizması ve pH regülasyonu dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçleri düzenleyen hedef genlerin transkripsiyonunu aktive edebildiği ve kanser hücrelerinin hipoksik koşullara adaptasyonunda hayati bir rol oynadığı gösterilmiştir [266, 270].



Şekil 5.2 : Hipoksi ve radyodirençte rolü [278].

HIF1'e bağılı radyo-direnç gelişiminin altında yatan mekanizmalar şunları içerebilir:

- (1) Tümör anjiyogenezinin uyarımı: HIF1, VEGF ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi anjiyogenik sitokinlerin ekspresyonunu aktive eder, tümör vasküler proliferasyonunu artırır ve radyorezistans gelişimini mümkün kılar [270].
- (2) Apoptozun inhibisyonu; HIF1, proapoptotik protein BAX'ın ekspresyonunu inhibe ederek radyo-direnç gelişimini artırır. HIF1 $\alpha$  ayrıca p53 ile indüklenen apoptozu doğrudan inhibe edebilir. p53, HIF1'in tümör radyosensitivitesi üzerindeki etkilerinin ana belirleyicisidir [266].
- (3) Radyo-dirençle ilgili sinyal yollarının aktivasyonu; HIF1 $\alpha$ , kemokin CXCL8'in ekspresyonunu uyarır. CXCL8 ekspresyonu ayrıca AKT/mTOR/STAT3 sinyal yolunu aktive ederek metastaz oluşumuna aracılık eder ve radyoterapi direncini uyarır [271].
- (4) Hipoksi kaynaklı otofaji; Otofaji, strese (hipoksik koşullar vs.) yanıt olarak aktive edilir, HIF1 $\alpha$ 'nın meme kanseri hücrelerinde radyasyona bağılı otofajik hücre ölümüne

dahil olduğu gösterilmiştir. Yüksek otofaji seviyeleri, RT kaynaklı DNA hasarını azaltır [266].

(5) Hipoksi kaynaklı CSC aktivasyonu: Hipoksik veya perinekrotik bir mikro ortamın, diğer CSC türlerinin hayatta kalması ve çoğalması için avantajlı olduğu bulunmuştur. Hipoksik hücreler, CD44, CD133, OCT3/4 ve SOX2 gibi daha yüksek seviyelerde CSC belirteçleri bulundurur. CD44, CSC fenotipini ve radyasyona direnci destekler. Işınlamayı takiben, CD44 ekspresyonu, doza bağımlı bir şekilde kuvvetli bir şekilde yukarı regüle edilir ve EMG'yi koruyarak daha uzun süreli hücre sağkalımına katkıda bulunur. CD44, tümör radyosensitivitesinin tahmini için yararlı bir belirteç olarak rapor edilmiştir [68, 266].

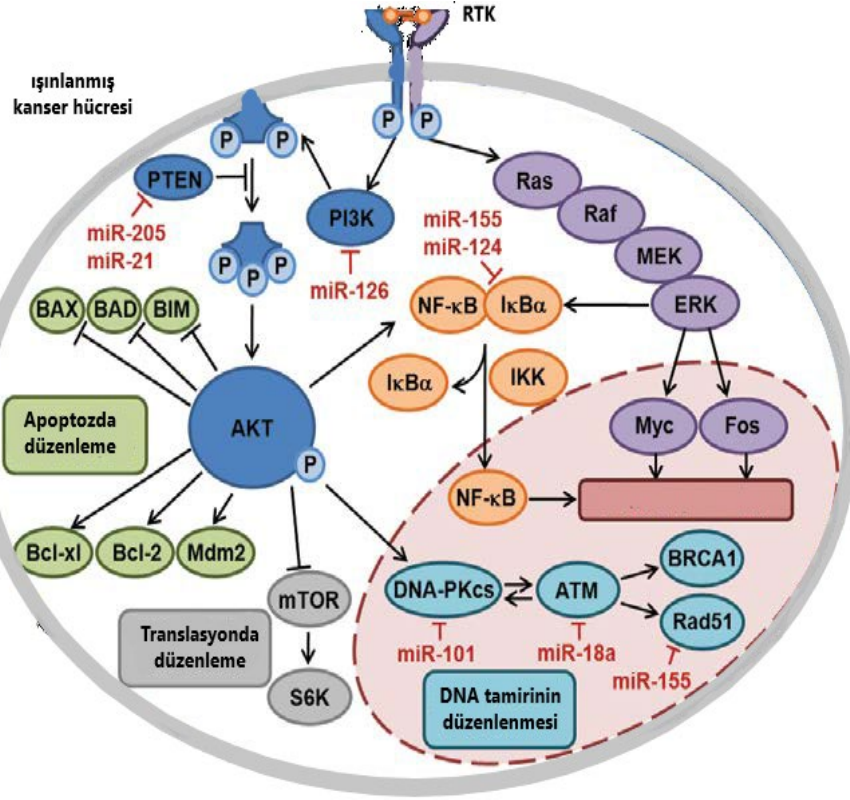
### **5.10.2 Oksidatif stres ve radyorezistans**

Uzun süreli oksidatif stres, nükleer faktör ile ilişkili faktör 2 (Nrf2), nükleer faktör kappa-beta (NFκB) ve p53 gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerini/aktivatörlerini uyarabilir; böylece hücre döngüsünü, DNA onarımı düzenler ve tümör hücresinin sağkalımını artırır. Nrf2; hücreleri apoptozdan, ksenobiyotik metabolizma enzimlerinden ve ilaç akış pompalarından koruyarak radyo-dirençli bir fenotip oluşmasına neden olmaktadır. Radyasyon etkisiyle oluşan reaktif oksijen türlerinin, hayatta kalmasını destekleyen Nrf2 ile ilişkili detoksifikasyon enzimlerini ve antioksidanları uyarabildiği bilinmektedir [272]. NFκB ise bağışıklık sistemi gelişimi, inflamasyon, hücresel büyüme ve apoptoz gibi farklı biyolojik süreçlerde yer alan bir transkripsiyon faktörü ailesidir. Bu fizyolojik rollere ek olarak, NF-kB proteinlerinin malignitelerin gelişiminde rol oynadığını ve dolayısıyla kanserin ilerlemesine katkıda bulunduğunu gösteren kanıtlar mevcuttur. Normal koşullarda, NF-kB kompleksleri inaktiftir ve sitoplazmada tutulur, spesifik uyarılardan sonra aktive olur [273]. (Şekil 5.3)

### **5.10.3 PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı ve radyorezistans**

Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/protein kinaz B (AKT) aktivasyonu, çoğu tümör tipinde sık görülen onkogenik yollardan biridir ve çoğalma, invazyon, apoptoz ve radyasyona direnç dahil olmak üzere birçok hücresel süreci düzenler. Anjiyogenez ve inflamatuvar hücrelerin toplanmasını uyararak tümör mikroçevresini yapılandırır. Radyasyon ile uyarılan DNA hasarına yanıt olarak reseptör tirozin kinazlar (RTK) aracılığıyla PI3K aktive olur ve AKT'nin fosforilasyonuna yol açar, ardından

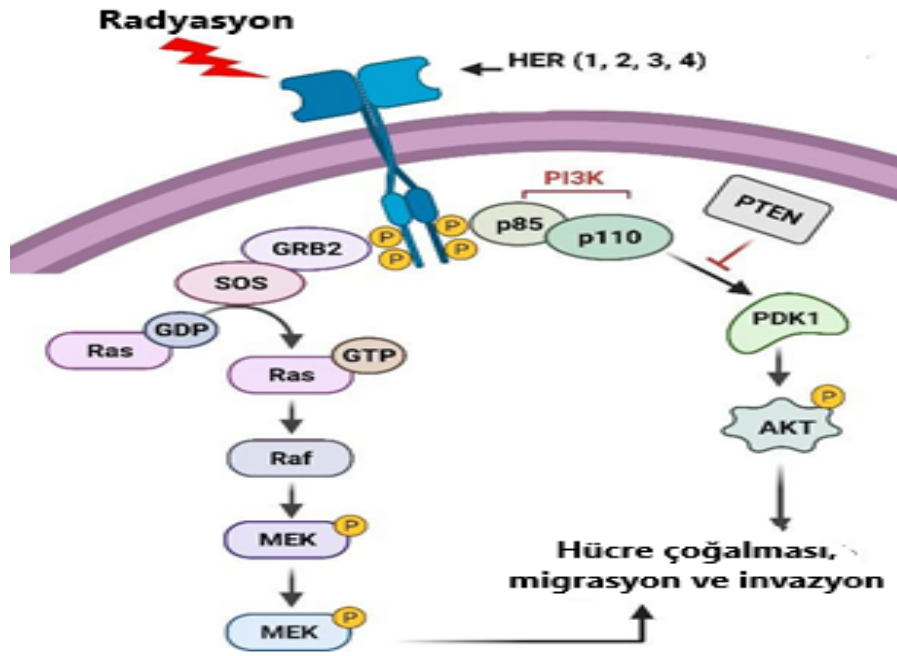
radıyorezıstans oluşturmak için anti-apoptoik proteinleri (Bcl2 ve mTOR gibi) uyarır. AKT yolağı; hücre ölümünü önlemek, kanser büyümesini ve metastazı uyararak için BAD gibi pro-apoptotik bir proteinin negatif düzenlenmesini ve HIF-1 $\alpha$  ve VEGF gibi genlerin pozitif düzenlenmesini de içerir [276]. (Şekil 5.3)



Şekil 5.3 : Radyasyon ile aktifleşen PI3K/AKT/mTOR ve NF $\kappa$ B yolakları [276].

#### 5.10.4 EGFR/HER sinyal yolağı ve radyorezıstans

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR)/insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER) ailesinin, reseptör tirozin kinazlar (RTK) aracılığıyla radyasyona dirençte rol aldığı gösterilmiştir. RTK'ların uyarılmasının ardından PI3K/AKT, RAS/RAF/MAPK ve JAK/STAT yolaklarının aktivasyonunu tetikler ve radyasyona direnç gelişir (Şekil 5.4). EGFR/HER ve RTK'lar, radyasyona yanıt olarak kanser hücreleri sağkalımını artırdığı gösterilmiştir [278].



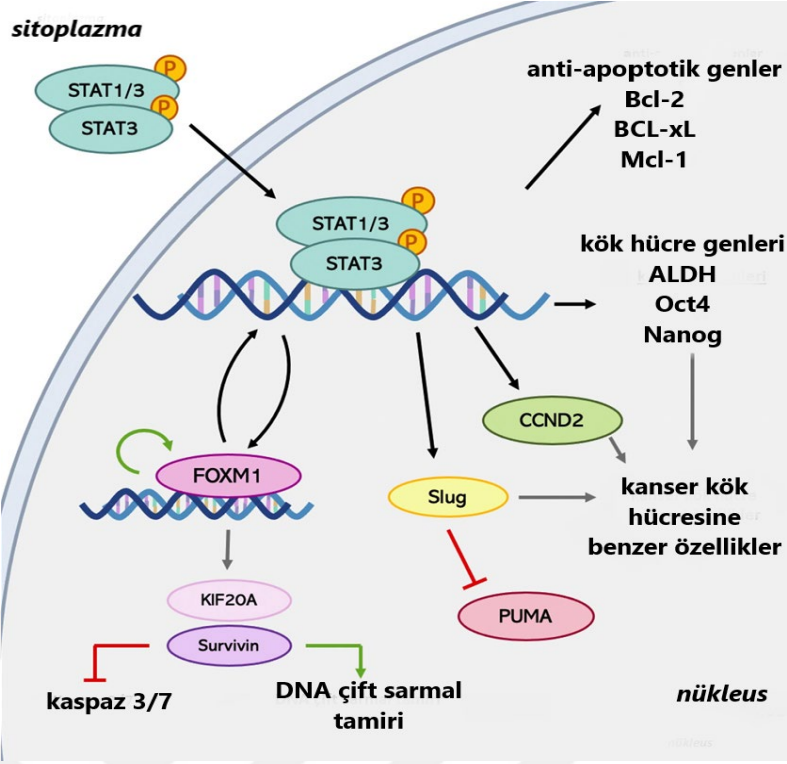
Şekil 5.4 : Radyasyon ile aktive olan EGFR/ HER yolağı [278].

#### 5.10.5 STAT3 ve radyorezistans

Transkripsiyon 3'ün sinyal dönüştürücü ve aktivatörü (STAT3) radyo-dirençi ile ilişkisini gösteren bir çok çalışma mevcuttur. STAT3, sitokinler tarafından uyarılan 17q21.2 kromozomu üzerinde kodlanmış 92 kDa'lık bir transkripsiyon aktivatörüdür. Başlangıçta sitokinler tarafından uyarılması nedeniyle inflamasyonda pozitif rolü olduğu düşünülse de, hücreleri dönüştürme yeteneği ve çeşitli kanserlerde aşırı ekspresyonunun saptanmasıyla; STAT3 şu anda bir onkogen olarak kabul edilmektedir [273, 274]. STAT3 radyasyona farklı şekillerde direnç oluşturabilir:

- 1) Hücrelerin apoptozunu baskılayarak farklı anti-apoptotik genlerin (Bcl-2, BCL-xL vs.) ekspresyonunu indükleyebilir.
- 2) Siklinlerin ve diğer büyüme ile ilişkili onkogenlerin ekspresyonu yoluyla hücrel proliferasyona yol açabilir.
- 3) Hücrel invazyon, anjiyogenez ve metastazı uyarır [274]. (Şekil 5.4)

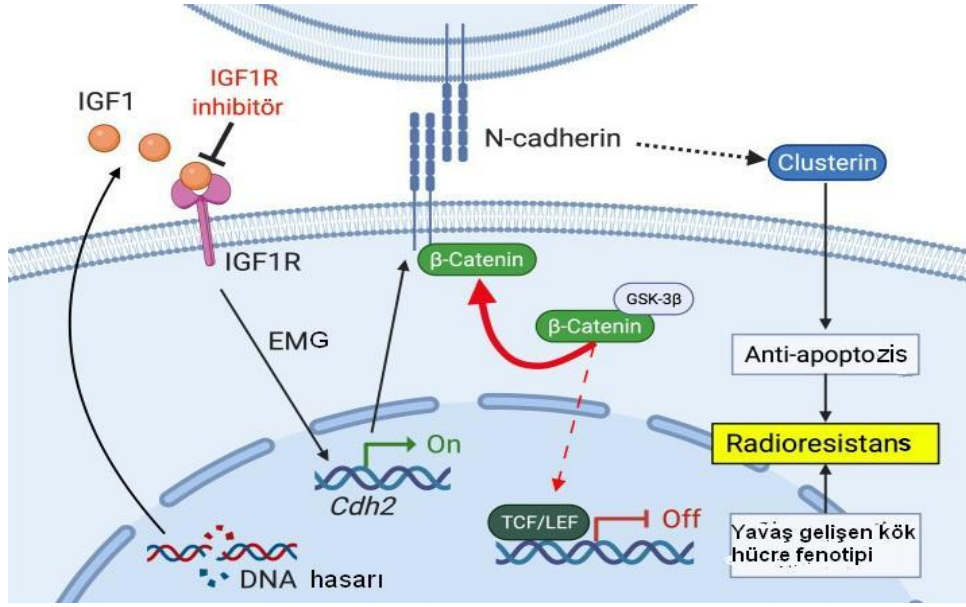
STAT3 ile glioblastom nüksü arasında bir korelasyon olduğuna dair yayınlar da mevcuttur. Benzer şekilde, insan epidermal büyüme faktörü 2 (HER2) uyarısıyla STAT3 aktivasyonunun meme kanserinde radyoterapi sonrası nüks ve tedaviye direnç ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [273].



Şekil 5.5 : STAT3 ile aktive olan yollar [273].

### 5.10.6 E-Kaderin yolu ve radyorezistans

E-kaderinin metastaz oluşumundaki rolü bölüm 2’de metastaz oluşum sürecinde bahsedilmiştir. E-kaderin kaybı ile tümör hayatta kalma, hücre hareketliliği, invazyon ve tedaviye direnç özelliği kazanır [43]. Bu değişiklikler, tümör hücrelerinin birincil tümörden ayrılması ve metastatik bölgelere gitmesi için gereklidir. Daha düşük E-kaderin içeriğine sahip meme kanseri hücrelerinin, daha yüksek E-kaderin seviyelerine sahip hücelere göre daha fazla radyo-dirençli olduğu gösterilmiştir. E kaderin seviyeleri bu nedenle tedavi direnci ile ters orantılıdır. SNAIL 26 gibi EMG promotörlerine bağlı E-kaderin kaybının, kemoterapi ve radyasyon tedavilerine direnç oluşturduğu da belgelenmiştir. SNAIL, E kaderin aracılı radyorezistansda rol oynar. Radyasyon, SNAIL’de yukarı regülasyona neden olarak; PI3k ve Erk1 gibi radyo-dirençli yolları aktive eder [279]. Glioblastom insan ve fare hücre serileri üzerine yapılan bir çalışmada radyasyonun IGF1 aracılığıyla N-kaderin düzeyini artırdığı ve EMG yi uyardığı ayrıca N-kaderinin Clusterin proteininin aktivasyonunu artırarak anti apoptozise neden olduğu gösterilmiştir. IGF1 inhibitörü veya N-kaderin ile ilgili genin blokajı ile hücrelerin radyoasyona duyarlılığının arttığı görülmüştür [320]



Şekil 5.6 : N-kaderin ve radioresistanstaki rolü [320].

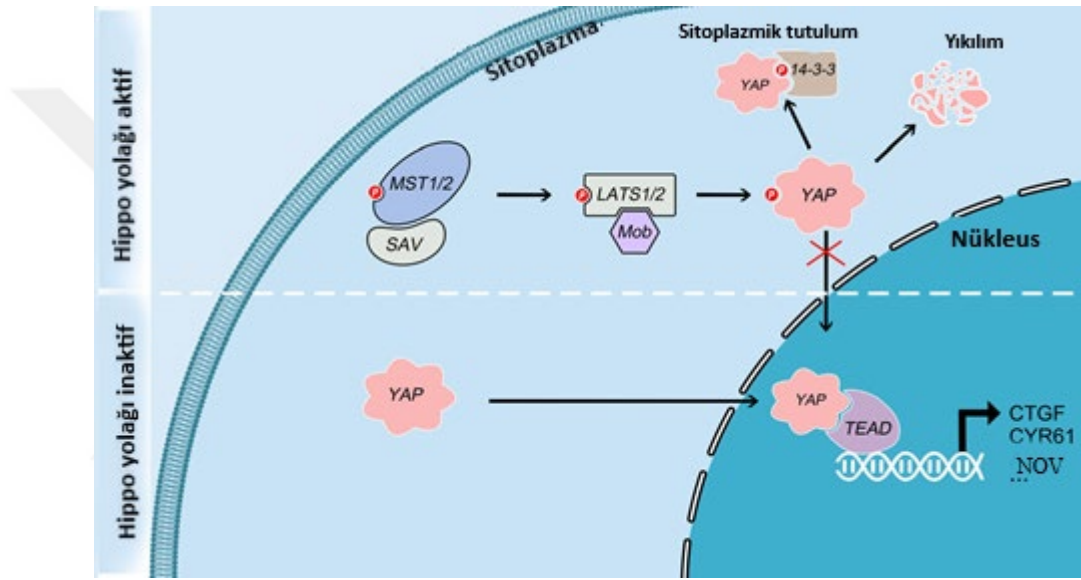
## 6. YAP1 ve HSP90

### 6.1 Radyasyona Direnç Oluşmasında YAP1'in Rolü

Yüksek düzeyde korunmuş bir kinaz kaskadı olan Hippo yolağı, hücre büyümesini, çoğalmasını ve farklılaşmasını kontrol ederek organ boyutunu ve doku homeostazını düzenlemede kritik rol oynayan bir yoldur. Bu yolağın düzenlenmesindeki sorunların, birçok kanserin progresyonunda önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Hippo yolağının temel efektörü olan Yes-association protein (YAP1), kanser tedavisi ve prognozu için bir belirteç olarak kabul edilmektedir [280-285]. YAP1'in kemoterapiye direnç oluşturduğunu gösteren güçlü kanıtlar mevcuttur ancak radyoterapiye direnç oluşumundaki rolü ile ilgili çalışmalar sınırlıdır, ek olarak farklı ve etkin radyasyon doz-fraksiyon şemalarının radyo-direnç ile ilgili ilişkisini gösteren yeterli çalışma yoktur [287, 289]. YAP1 işlevi ile ilgili moleküler, hücre ve çevresel faktörlerin karmaşık etkileşimlerin anlaşılmasına başlanmasıyla, kemoterapi ve radyoterapiye direncin altında yatan mekanizmalar hakkında yeni bilgiler ortaya çıkmakta ve bu alandaki gelişmeler, kanser hastalarının tedavisi ve prognozu için umut vaat etmektedir.

Hippo yolağı, ilk olarak *Drosophila melanogaster* cinsi sineklerde keşfedilmiştir. Bu yolak memelilerde temel olarak; Serin/Treonin Kinaz 20 (STE20) benzeri protein kinazlar (MST1/2), büyük tümör baskılayıcı kinaz1/2 (LATS1/2), SAV1 (Salvador Homolog Protein1), PDZ bağlanma motifli transkripsiyonel koaktivatör (TAZ), Yes ilişkili protein (YAP1), TEA alanı içeren transkripsiyon faktörü (TEAD) ve Mob kinaz aktivatörü 1'i (Mob1) içerir. Bu yolak mekanik ve hormonal sinyaller gibi çeşitli sinyallere cevap olarak, YAP/TAZ kompleksinin çekirdek ve sitoplazmik transkripsiyonel aktivitelerini kontrol etmektedir. Temel olarak bu yolak YAP'ın fosforilasyonu ile düzenlenir. Hippo yolağı aktif iken MST1/2 kinazlar kofaktörü SAV1 ile hareket ederek LATS1/2, MOB1A ve MOB1B'yi fosforile eder. Aktive edilmiş LATS1/2 kinazlar, YAP ve TAZ'ı fosforile ederek YAP/TAZ kompleksinin oluşmasına engel olur ve YAP'ın çekirdek içine geçişini inhibe eder ve YAP

sitoplazmada yıkılır. Hippo yolu aktif olduğunda ise YAP'ın fosforilasyonu inhibe edilerek YAP/TAZ kompleksi oluşturulur, YAP çekirdeğe geçer ve farklı hücresel süreçlerde yer alan genlerin transkripsiyonunu etkinleştirmek için Transkripsiyonel geliştirilmiş ilişkili etki alanı (Transcriptional Enhanced Associate Domain=TEAD) ailesi ile bağlanır. TEAD ise bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF), sisteinden zengin protein 61 (CYR61) ve aşırı eksprese nefroblastom (NOV) uyarır. Bu üçlüye büyüme faktörlerinin hücresel iletişim ağı faktörü (CCN) denilmektedir. Sonuç olarak rejenerasyon süreci, doku büyümesi, apoptoz azalması ve proliferasyon başlatılmış olur [280-285]. (Şekil 6.1)

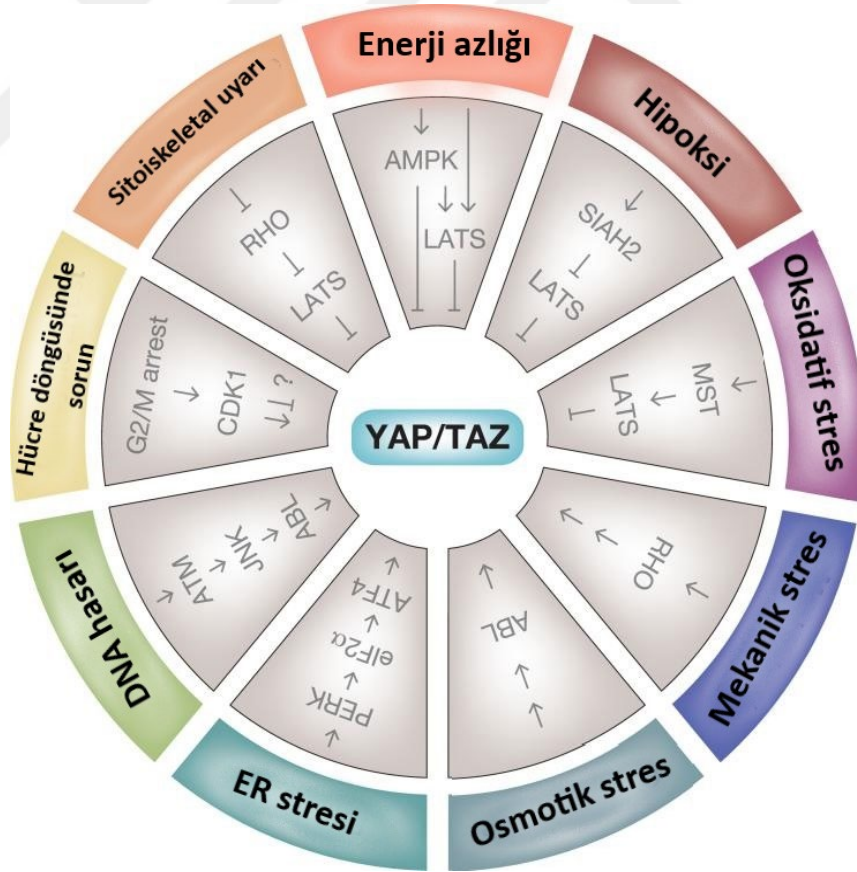


Şekil 6.1 : Hippo yolu ve YAP/TAZ aktivasyonu [281].

İnsanlarda 11q22 kromozom bölgesinde bulunan YAP1'in tek başına transkripsiyonel aktivitesi yoktur ancak, reseptör tirozin kinazlar (RTK), Runt ilişkili transkripsiyon faktörü 2 (RUNX2), TEAD ve p73 gibi moleküller ile etkileşime girerek onların aktivitelerini düzenleyen, Hippo yolunun önemli bir transkripsiyonel koaktivatörüdür. Kemik iliği hariç tüm dokularda sentezlenebilmekte ve kök hücre uyarımı, mekanik transdüksiyon, hücre polaritesi ve immün baskılama gibi birçok hücre ve fizyolojik süreçte yer almaktadır. Örneğin, YAP insan embriyonik kök hücrelerinde ve uyarılmış pluripotent kök hücrelerde; Sox2, Nanog ve Oct4 gibi transkripsiyon faktörlerini düzenler [280-282]. YAP doku mikroçevresinde, ekstremsk ve intrinsik mekanik sinyallere yanıt veren, hücre morfolojisini ve hücre iskeleti gerilimini düzenleyen bir mekanosensör olarak işlev görür (Şekil 6.2). YAP, IL-1 $\beta$  ve TNF $\alpha$  gibi enflamatuar faktörlerin ekspresyonunu güçlü bir şekilde aktive

eder [282]. Radyasyon gibi DNA hasarına neden olan durumlarda YAP1, p73'e bağlanır ve proapoptotik genlerin (BAX, p53, puma) ekspresyonunu artırır [287]. Hippo yolağında, diğer yolakların aksine özel hücre dışı ligand/reseptör kompleksleri yoktur. Bunun yerine düzenlenmesi, birçok mekanizmaya ve diğer sinyal yolakları ile ilişkisine bağlıdır. Hippo yolağı ve YAP/TAZ kompleksinin düzenleyicilerini özetlemek gerekirse:

- 1) Hücre apikal ve transmembran proteinleri; FERM alanı içeren proteinler, NF2 ve FRDM6 geni ve KIBRA proteini
- 2) Hücre adezyonu ve polaritesi; fat4 proteini, Crumbs kompleksi,  $\alpha$ -katenin E-kaderin
- 3) Hücre dışı faktörler, G protein-bağlı reseptörler (GPCR) ve RTK'lar
- 4) Mekanik kuvvetler; Rho ve F-aktin
- 5) Onkojenik sinyal yolakları örnek verilebilir [288].



Şekil 6.2 : YAP/TAZ kompleksinin uyarıcıları ve ilgili yolaklar [289].



sorunun kansere yol açtığı gösteren veri yoktur [287, 293, 294]. Bu nedenle diğer onkojenik yollardaki mutasyonlar neticesinde Hippo yolağının etkilendiği görüşü daha hakimdir. YAP'ın; Wnt, TGF $\beta$ , KRAS, MAPK, GPCR gibi çeşitli onkojenik sinyal yollarıyla bağlantısı mevcuttur [289, 290] (Şekil 6.4).

YAP, Hippo ve PI3K-mTOR yolağı arasında bağlantıyı sağlayan ana yapıdır. YAP  $\beta$ -katenin yıkıcı kompleksinin önemli bir bileşenidir ve sitoplazmada  $\beta$ -katenin'i tutarak Wnt sinyalini inhibe eder [290]. YAP, Wnt yolunun temel proteini olan DVL tarafından baskılanır [289, 293]. YAP ayrıca çekirdeğe SHP2 taşınmasını uyarır ve nihayetinde Wnt sinyalini aktive eder. YAP nükleer birikiminin artmasıyla Smad2/3-Smad4 kompleksine bağlanır ve TGF $\beta$  aracılı kök hücrenin yenilemesini ve nöral epitel farklılaşmayı uyarır. Oct4, YAP ve Smad2/3 mezodermal farklılaşmayı baskılayan çeşitli genlerin transkripsiyonunu uyararak bir kompleks oluşturur.

Hippo yolağında sorun olan tümörlerde, MAPK yolu ile TEAD arasında bir etkileşim oluşur [288]. P38 kinaz, TEAD'nin sitoplazmik translokasyonunu uyarır ve çeşitli stres sinyallerine yanıt olarak YAP aracılı kanser hücrelerinin büyümesini engeller [281]. Artan kanıtlar, YAP'taki düzensizliklerin kanserin başlamasında, ilerlemesinde ve antikanser ilaç direncinin desteklenmesinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. TEAD ailesinin insan genomunda bulunan dört farklı türünün farklı etkileri gösterilmiştir; TEAD1'in kardiyak farklılaşma ile ilişkili olduğu, mutasyonunun embriyolarda ölümcül kalp defektiyle sonuçlandığı; TEAD2 nöral kapanma defektleriyle ilişkisi; TEAD3'ün hücre döğüsünde, DNA metilasyonunda ve ilaç direncindeki rolü; TEAD4 embriyonun endometriuma tutulmasında etkili olduğu [288, 293].

YAP tümör mikroçevresini düzenlenmesinde de rol oynamaktadır (Şekil 6.5). YAP'ın aktivasyonu, tümör gelişimini destekleyen CCL4 ve CSF1 ekspresyonunu indükleyerek tümör ilişkili makrofajları ve fibroblastları uyarır. [140, 141]. Nükleer birikimi direkt olarak CSC'leri uyararak DNA hasar onarımını tetikler ve sonuç olarak radyoterapiye direnç gelişebilir. YAP ayrıca birçok tümörde zenginleştirilmiş ve antitümör bağışıklığının baskılanmasıyla ilişkili düzenleyici T hücrelerinin (Treg'ler) birikmesinde de işlev görür. YAP'ın aşağı regülasyonu, Treg'lerin immünosupresif etkisini önemli ölçüde inhibe eder [291, 293].



Akciğer, meme başta olmak üzere birçok solid tümörde, YAP1'in regülasyonunun, aktivitesinin arttığı, kötü prognoz ve kısa sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Tablo 6.1). YAP, Wnt/ $\beta$ -katenin yolunu ve N-kaderin aktive ederek insan glioma hücrelerinde büyümeyi arttırdığı belirtilmiştir. Ayrıca glioma hücre kültürlerinde, YAP'ın DNA hasar onarımını artırarak radyo-dirence sebep olduğu, YAP-FGF2-MAPK sinyallerinin inhibisyonu ile radyoterapiye duyarlı hale geldikleri gösterilmiştir [294, 295].

Güçlü bir anti-tübülin ilacı olan Taxol, çeşitli tümör tiplerini tedavi etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. YAP, CTGF ve CYR61'in ekspresyonunu uyararak dolaylı yoldan Taxol direncine neden olmakta, özofagus karsinomunda EGFR ekspresyonunu artırarak 5-FU ve docetaxele karşı direnç oluşturmaktadır. 5-FU'ya dirençli kolon kanseri hücrelerinde c-Yes, YAP ile etkileşime girerek ve nükleer geçişini uyardığı ve YAP'ı aktive ederek tedavi direncine sebep olduğu gösterilmiştir. YAP aktivasyonunun, bir EGFR monoklonal antikoru olan setuksimab direnci ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Hepatosellüler karsinomda, hipoksi ve siroz ile aktive olan YAP; sorafenib direnciyle ilişkilendirilmiştir. YAP aktivitesinin verteporfin ile inhibisyonu, melanom hücrelerinin bir BRAF inhibitörüne yeniden duyarlı hale gelmesini indüklemiştir [281, 288, 293, 295].

Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomunda, yüksek YAP seviyeleri radyoterapiye zayıf yanıt ile ilişkilendirilmiştir. Medulloblastomda YAP aşırı ekspresyonu, ışınlanmanın ardından artmış hücre sağkalımı ile ilişkilendirilmiştir ve YAP'ın, insülin büyüme faktörü 2 (IGF2) aracılığıyla AKT aktivasyonunu uyararak hücrelerin onarılmamış DNA ile mitozaya girmesine, bu da ATM/Chk2 inaktivasyonuna ve hücre döngüsü kontrol noktalarından kaçışa yol açtığı gösterilmiştir [285]. Radyoterapi ile tedavi edilen glioma hastalarında yüksek YAP düzeylerinin kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Radyasyon YAP'ı çekirdeğe sürer, ardından FGF2 ekspresyonunu teşvik ederek MAPK sinyal yolunu aktive eder ve glioma hücre büyümesi uyarılır. YAP-FGF2-MAPK yolunun aktivasyonu, DNA onarımının güçlendirilmesine, hücre döngüsü ilerlemesini teşvik etmeye ve apoptozun inhibisyonuna katkıda bulunur ve radyasyondan sonra glioma hücresinin hayatta kalmasına neden olur. YAP- FGF2-MAPK'nın AZD4547 tarafından bloke edilmesi, gliomaları radyoterapiye duyarlı hale getirir [296].

Eksudatif yaşlı-maküler dejenerasyonu tedavi etmek için FDA onaylı bir ilaç olan verteporfin (VP), bir ışığa duyarlılaştırıcı görevi görür ve birincil biyolojik aktivitesini kısa ömürlü tek oksijen ve reaktif oksijen radikallerinin etkisiyle sergiler. VP, YAP'a bağlanma ve YAP-TEAD kompleksini bozma yeteneğine sahiptir. Kanser hücrelerinde VP ile tedavi, CYR61, CTGF, AXL ve BIRC5 gibi YAP hedef genlerinin ekspresyonunu inhibe eder [281]. Bir çalışmada, VP'nin YAP aktivitesini inhibe ederek gliomlarda radyoterapi duyarlılığını artırabileceği bulunmuştur [296].

YAP inhibitörlerini klinikte başarıyla uygulamak için toksisite önemli bir zorluktur. YAP'ın karaciğerde, kalpte ve akciğerde tükenmesi organ yetmezliği ve hipoplaziyi indükleyebilir. Ayrıca YAP, çoğu solid tümörde yüksek oranda ifade edilirken, hematolojik malignitelerinde sessizdir. YAP'ı hedeflemenin dolaşım sistemindeki etkilerini tam olarak araştırmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır [281]. YAP/TAZ kompleksini hedefleyerek yapılacak sistemik tedavilerin muhtemel yan etkileri nedeniyle, çalışmamızda YAP1'in radyasyona dirençle ilişkisini göstermek ve farklı radyocerrahi tedavi şemalarının bu dirence etkisini belirlemeye amaçladık.

**Tablo 6.1 : Kanser progresyonu ve YAP'ın rolü [281].**

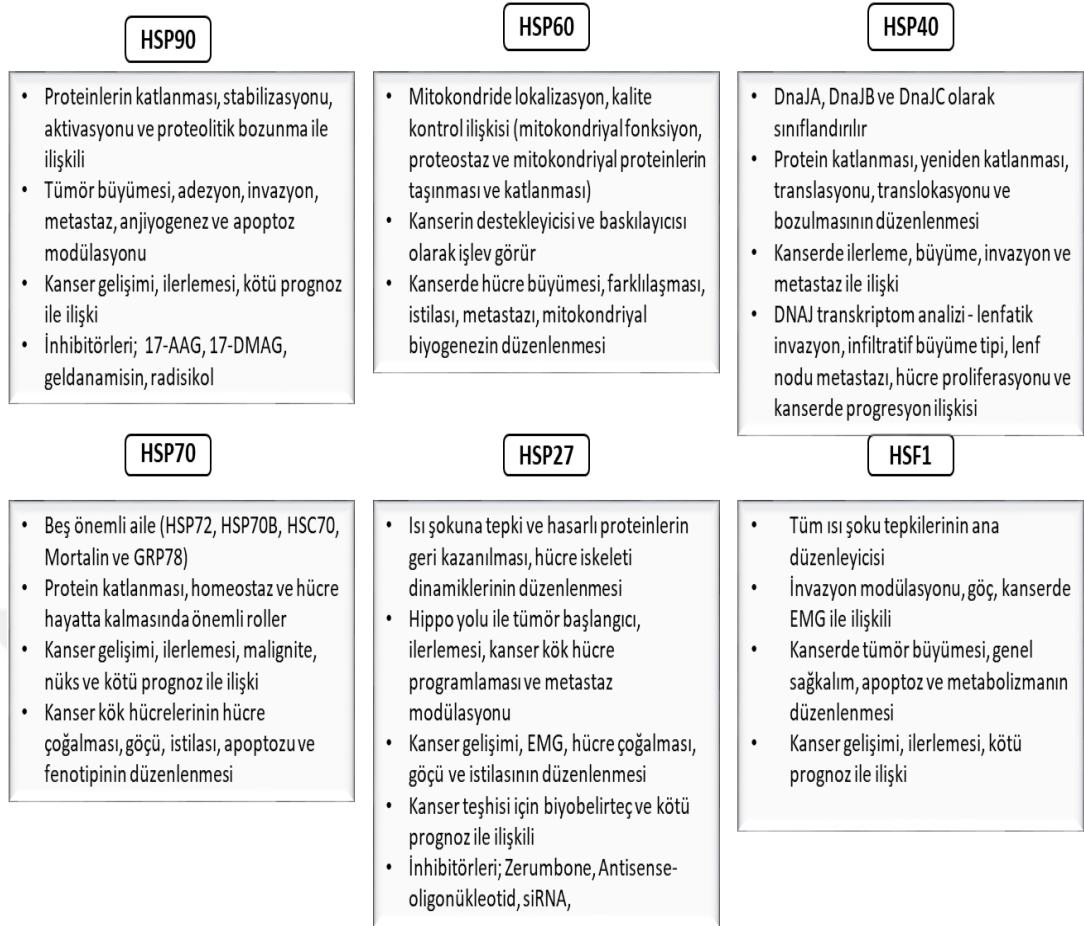
Tümör	Mekanizma
Akciğer kanseri	Siklin A ve MAPK ekspresyonunu uyarır.
Meme kanseri	FGFBP1, ITGB2, NEGR1, CYR61, CTGF düzeylerini artırır.
Mide kanseri	c-Fos ekspresyonunu artırır, p21 seviyesini ve tümör baskılayıcı mikroRNA'yı bastırır.
Hepatoselüler karsinom	Hedef genlerin ekspresyonunu artırır, hücre yaşlanmayı azaltır.
Kolorektal kanser	PTEN'i inhibe eder, epitelyal-mezenkimal geçişi uyarır.
Pankreas duktal adenokarsinomu	Tümör oluşumunu uyarır ve hücre döngüsünü aktive eder
Glioma	Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağını, N-kaderin, Twist ve HMGB1'in aracılı otofajiyi uyarır, radyo-direnç oluşturur.

## 6.2 Radyasyona Direnç Oluşmasında HSP90'nın Rolü

Isı şoku proteinleri (HSP'ler), endojen veya ekzojen hasar karşısında hücrenin hayatta kalmasını sağlamak için fizyolojik stres altında indüklenen bir protein ailesidir. HSP'ler, stres etkenine karşı hedef proteinlerin (onkogenler gibi) doğru biçimsel yapısını koruyarak moleküler şaperonlar olarak işlev görür. Yüksek HSP ekspresyonu, özellikle malignite olmak üzere birçok patolojik durumda gözlenmektedir. Çoğu kanser türünde yüksek oranda eksprese edilir, kötü prognoz ve tedaviye direnç ile ilişkilir [297, 309]. Kanser hücreleri, proliferatif potansiyellerini sürdürebilmek için HSP'ler tarafından sağlanan koruyucu fenotipten yararlanır. HSP'lerin metastatik kaskadın her aşamasında işlevi olmakta ve kanser gelişimine katkı sağlamaktadırlar [309]. Sonuç olarak, HSP ekspresyonunu ortadan kaldırmak, kanser hücrelerini radyasyona veya kemoterapiye daha duyarlı hale getirebilir. Bu bölümde çalışmamızda da etkisine baktığımız HSP90 gibi, HSP üyelerinin kanser seyrindeki ve tedaviye direnç gelişimindeki rollerinden bahsedilecektir [297].

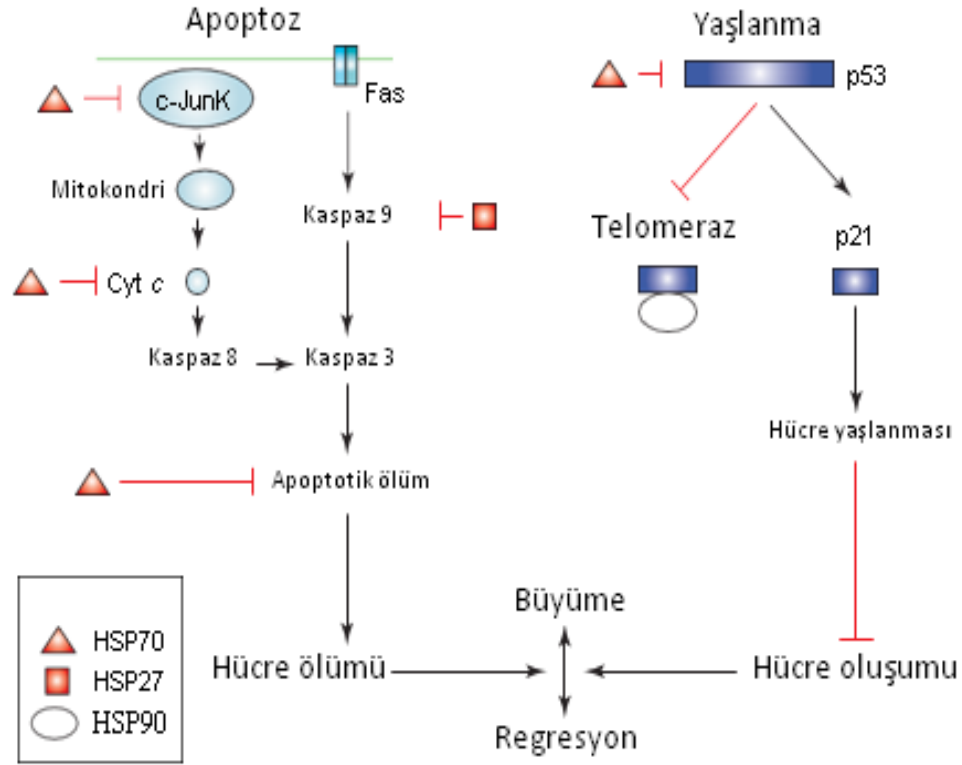
Fizyolojik stres karşısında hücreler, başarılı bir şekilde hayatta kalmak için bir dizi mekanizma ile donatılmıştır. Bu tür mekanizmanın bilinen örneği, ilk olarak yine *Drosophila melanogaster* cinsi sineklerde bulunan ısı şoku yanıtıdır. Daha sonra ise ısı şok yanıtının sentezinin Isı Şok Proteinleri (HSP'ler) olarak adlandırılan bir protein sınıfı tarafından düzenlendiği bulunmuştur. HSP'lerin sitotoksik ajanlar, oksidanlar, ağır metaller ve enfeksiyon dahil olmak üzere hem endojen hem de ekzojen saldırılara karşı hücrenin hayatta kalmasını sağladığı gösterilmiştir [298]. Isı şok faktör (HSF) 1 ve 2 de bu süreçte HSP'lerin ekspresyonunu düzenlemektedir [299].

HSF1 monomerleri, hücrelerin sitoplazmasında Hsp90 şaperonu ile kompleks oluşturarak her iki proteini de işlevsel olarak inaktif hale getirir. Sadece strese neden olan koşullar altında, etkileşim muhtemelen fosforilasyon olayları yoluyla bozulur ve fonksiyonel HSF1 trimeri, HSP'lerin aktivasyonunu uyandırır [315]. HSP'ler moleküler ağırlığa göre sınıflandırılır ve HSP100 üyelerini (bakterilerde ve mayalarda gösterilmiş, memelilerde homoloğu yoktur), HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 ve küçük HSP'leri içerir [297, 309]. (Şekil 6.6)



**Şekil 6.6 :** Kanser gelişiminde rol alan HSP'lerin genel özellikleri [317] (düzenleme yapılmıştır).

HSP'ler ağırlıklı olarak diğer hücrel proteinler için moleküler şaperon görevi görür; yüksek moleküler ağırlıklı HSP'ler ATP'ye ihtiyaç duyarken, düşük moleküler ağırlıklı HSP'ler ATP'den bağımsızdır. Moleküler şaperonlar olarak çok çeşitli proteinlerle etkileşime girdiklerinden, HSP'ler yalnızca hücrel işlevlerde yer almakla kalmaz, aynı zamanda bir dizi patolojik durumda da önemli aktörler olarak rol alır. İlgili proteinler, HSP'ler sayesinde, kümeler oluşturmadan veya işlevini bozacak hücrel proteinlere bağlanmadan uygun şekilde olgunlaşır [298, 300]. HSP'lerin ağırlıklı olarak şaperon olarak işlevi gösterilse de, apoptoz ve bağışıklık tepkisi dahil olmak üzere diğer hücrel süreçlerde de etkileri bilinmektedir. Bcl-2 protein ailesi gibi, HSP'ler de hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik aile üyelerini içerir ve apoptotik kaskada çeşitli basamaklarda işlev görür. Örneğin; Hsp27 ve Hsp70, anti-apoptotik rollerle ilişkilendirilmiştir, oysa Hsp60 pro-apoptotik işleve sahip olabilmektedir [297, 301]. (Şekil 6.7)



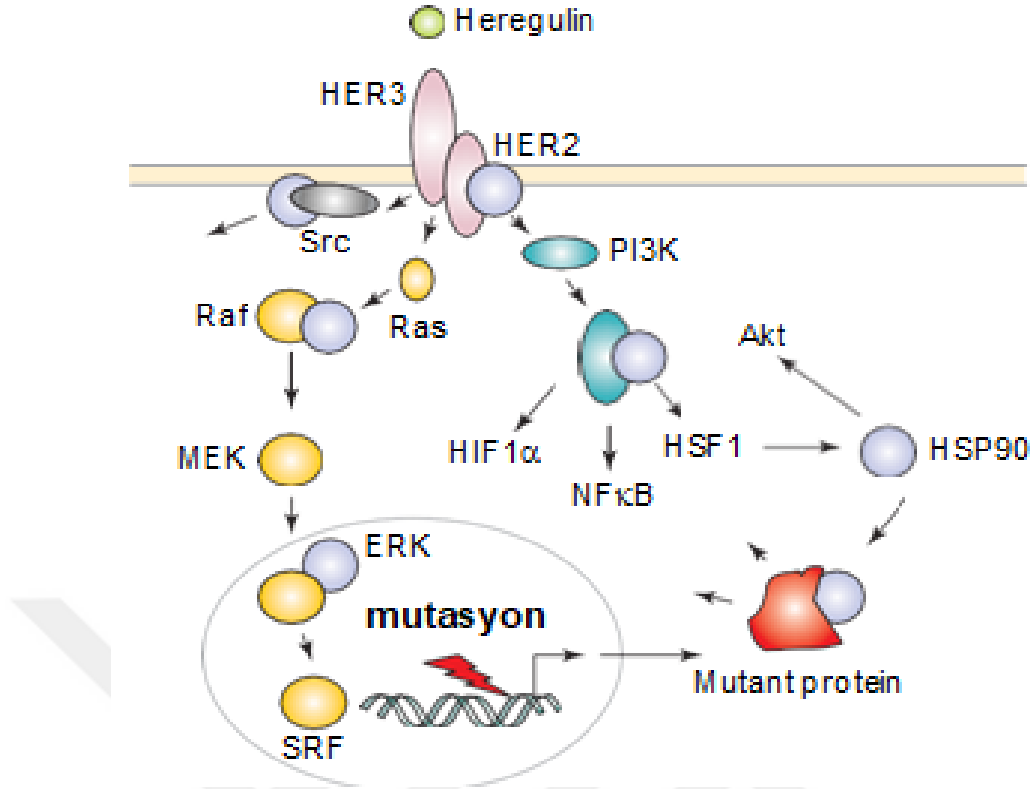
**Şekil 6.7 :** Hücre yaşlanmasında ve apoptozda HSP'lerin rolü. Oklar; aktivasyon, düz çizgiler bağlanma ve inhibisyon [309].

### 6.2.1 Büyük HSP'ler

HSP90 en çok eksprese edilen HSP'dir. Bazal koşullar altında bile, HSP90 toplam hücre protein içeriğinin %2'sini temsil edebilir [300]. HSP90 için 200'den fazla istemci (müşteri) protein tanımlanmıştır (güncel liste bakınız; <https://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf>). Yüksek bazal ekspresyonu hücre homeostazda büyük önem teşkil etmekle birlikte, onkogenез de anti-apoptotik özelliğini gösteren birçok çalışma mevcuttur [302]. HSP90 temelde; ATP'ye bağımlı bir şekilde HSP70, HSP40, Hip, Hop, p23 ve Cdc37 gibi birkaç yardımcı şaperon proteinleriyle birlikte moleküler şaperon olarak işlev görür. HSP90 $\alpha$ , HSP90 $\beta$ , TRAP1 (TNF reseptör ilişkili protein 1) ve GRP94 (Glikoz düzenleyici protein 94) olmak üzere dört izomerik formda bulunmaktadır. HSP90 $\alpha$  ve HSP90 $\beta$  sitozolde, TRAP1 mitokondride ve GRP94 endoplazmik retikulumda bulunur [302]. Hsp90 kompleksi, hücre gelişimi, büyümesi ve hayatta kalmasında önemli olan sinyal iletim yollarında yer alan yapısal olarak kararsız, olgunlaşmamış 'müşteri' proteinleri bağlayarak doğal biçimlerini almalarına yardımcı olur. Bunlar arasında transmembran tirozin kinazlar (HER-2/neu, EGFR, IGF-1R gibi), sinyal proteinleri (Akt, Raf-1 ve IKK), tümör baskılayıcılar (p53, Kit), kimerik sinyal proteinleri (BCR/ABL), steroid

hormon reseptörleri ve hücre döngüsü düzenleyicileri bulunur [303]. Bu moleküler şaperon, normal hücre sel büyümenin yolları boyunca uzanan birçok reseptörün, protein kinazın ve transkripsiyon faktörlerinin kırılma yapılarını stabilize etmek için vazgeçilmezdir. HSP90, hem HER2'nin hem de HER2 sinyal yolağında hücre büyümesi ve hayatta kalmasında kilit rollere sahip olan protein kinazları Akt, c-Src ve Raf-1 gibi proteinlerin stabilitesi ve aktivitesi için gereklidir [309] (Şekil 6.8). Ancak HSP90 kompleksleri heterojendir. Örneğin, steroid hormon reseptörleri ile kompleksleri, çekirdek proteinlere ek olarak, reseptör fonksiyonu için gerekli olan immünofilinler FKBP51, FKBP52 ve CyP40'ı içerir [309]. Bu nedenle HSP90 protein aktivitesini değiştirebilir, hücre döngüsü düzenlemesine katılabilir, hücre büyümesini ve çoğalmasını etkileyebilir, anti-apoptotik özelliği sayesinde hücrenin hayatta kalmasını da sağlayabilir [297]. Anti-apoptotik özelliği çoğunlukla NF- $\kappa$ B yolu üzerindeki etkisiyle ilgili olduğu gösterilmiştir [304]. HSP90, ligandına bağlandığında TNF $\alpha$  reseptörü ile birleşen RIP'i (reseptör ilişkili protein) stabilize eder, böylece NF- $\kappa$ B aktivitesini artırır [304, 305]. Hsp90 ayrıca Akt fosforilasyonu ile hücre büyümesini de artırmaktadır [297]. Hsp90, Apaf-1'in inhibisyonu ile, intrinsik apoptotik yolu da etkileyerek, kaspaz aktivitesini azalttığı ve apoptozisi önlediği de gösterilmiştir [306].

Ayrıca telomeraz stabilitesi için de HSP90 şarttır [308]. Sitozolde sentezlenen ve mitokondride lokalize olan, yapısal ve fonksiyonel olarak sitozolik HSP90 $\alpha$  ve HSP90 $\beta$  izoformlarına yüksek oranda benzerlik gösteren HSP90 izoformuna ise TRAP1 denilmektedir. Moleküler şaperon olarak TRAP1, mitokondride oksidatif stresin yarattığı olumsuz şartlara karşı hücreyi korumaktır. Oksidatif stresin artışına bağlı olarak kanser hücrelerinde, hücre sel proteinler zarar görmekte ve hücre ölümü gerçekleşmektedir. TRAP1 kanser hücrelerinde bu zarar görmüş proteinleri tutarak, tekrar düzgün üç boyutlu yapı kazanmasında görev almaktadır [318]. Grp94 izoformu ise özellikle Toll-like reseptörler ve integrinler gibi sekresyon proteinlerinin katlanma süreçlerinde ve immün sistemin düzenlenmesinde önemli roller oynamaktadır [302, 303]. HSP90'dan farklı olarak HSP70 ve HSP27, çoğalmanın araçları değildir. Bununla birlikte, çeşitli insan kanserlerinde artarlar ve kanserdeki diğer iki temel özellik olan programlanmış hücre ölümü ve yaşlanmanın inhibisyonunu içeren yollara aracılık ederek tümör oluşumuna katkı sağlarlar.



**Şekil 6.8 :** HSP90 ve büyüme sinyallerini düzenlemesi [309].

Hsp70, mitoz, mayoz ve hücrel farklılaşma dahil olmak üzere stres koşullarında bir dizi hücrel aktivitenin korunmasına yardımcı olur. Hsp90'a benzer şekilde, ATP'ye bağımlı ve yardımcı şaperonlarla birlikte işlev gören moleküler bir şaperondur. Hsp90'dan farklı olarak, genellikle bazal koşullar altında düşük seviyelerde bulunur [299]. Hsp70, apoptoza müdahale ederek (Apaf-129 aracılığıyla) ve lizozomal membranın geçirgenliğini inhibe ederek hücrenin hayatta kalmasını yardımcı olur. Hücreleri  $TNF\alpha$  monosit sinyali, oksidatif hasar, kemoterapötikler, radyasyon, NO ve ısı stresi tarafından uyarılan ölümden koruyabilirler [297]. Ayrıca, Hsp70'in, p21 ve p53'e bağlı yaşlanma yollarını inhibe ettiği ve böylece hücre proliferasyonunu daha da desteklediği bulunmuştur. Hsp60, hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik işlevleri mevcuttur [309].

### 6.2.2 Küçük HSP'ler

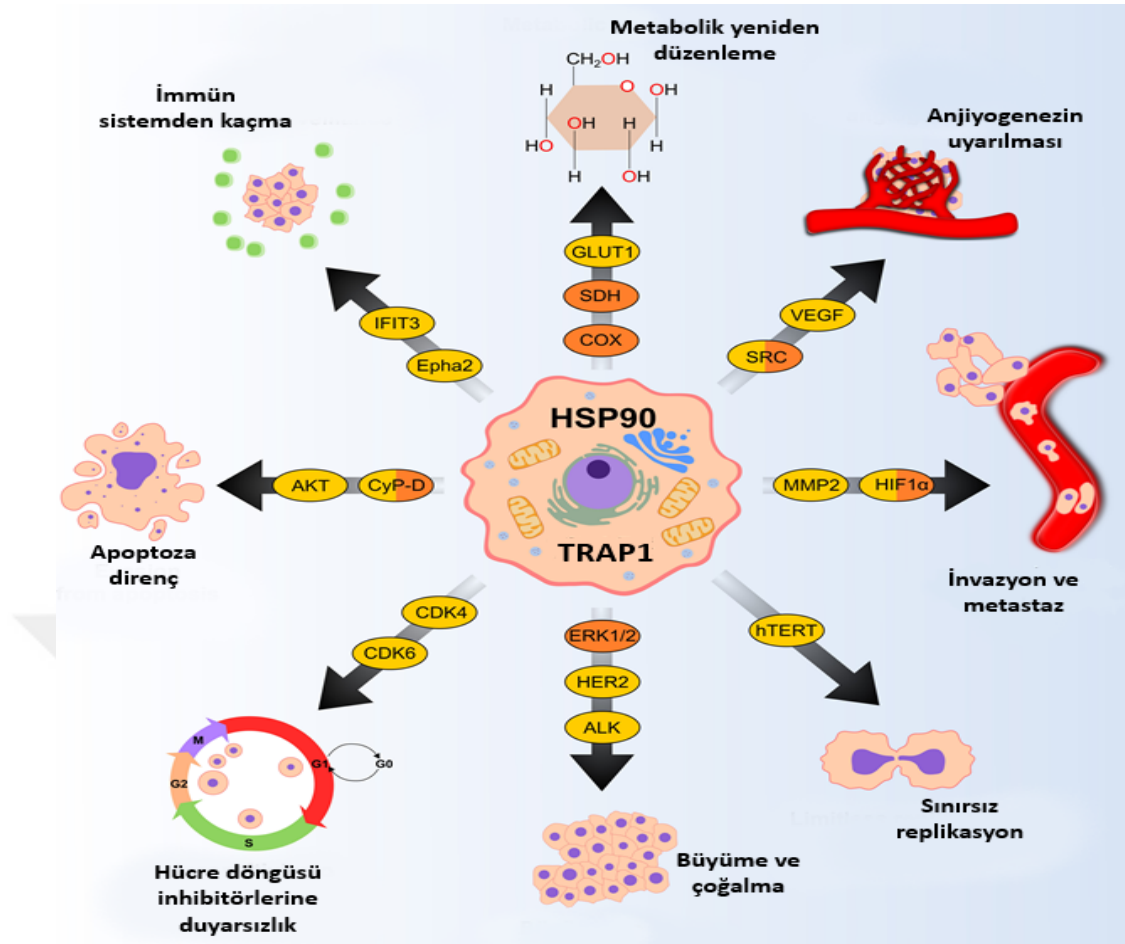
Küçük HSP'ler, en önemlisi Hsp27 (Hsp25 ve HspB1 olarak da bilinir) dahil olmak üzere MKBP, HspB3, aA-kristalin, aB-kristalin, Hsp20, cvHsp, Hsp22, HspB9 ve Hsp10'u içerir. Düz kas fonksiyonu, trombosit regülasyonu, kardiyovasküler hastalık, mikobakteriyel hastalık, nörolojik hastalık ve kanser ile ilişkileri gösterilmiştir [299].

Özellikle Hsp27'in, çeşitli malignitelerle ilişkisi mevcuttur. Isı, oksidatif stres, ışınlama ve kanser önleyici ilaçların tümü Hsp27 ekspresyonunu artırır. Hsp27, ATP'den bağımsızdır ve şaperon aktivitesi, oligomerizasyon durumu tarafından düzenlenir. Hsp27, prokaspaz-9 ve prokaspaz-3 ile etkileşime girerek ve sitokrom c'ye bağlanarak anti-apoptotik etki göstermektedir [307]. Oksitlenmiş protein hasarını onarma yeteneğinin yanı sıra, hücresele glutatyonu artırarak hücrenin oksidatif hasara dayanma yeteneğini de arttırdığı gösterilmiştir [308].

### 6.2.3 Isı şoku proteinleri ve kanser

HSP sınıfının birkaç üyesi tümör hücresi genişlemesi, farklılaşması ve apoptoz ile yüksek korelasyon göstermiştir. Özellikle Hsp90 kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır ve araştırmalar, steroid hormon reseptörleri, tirozin kinazlar, SRC ailesi kinazlar, serin/treonin kinazlar, hücre döngüsü düzenleyicileri, telomeraz, transkripsiyon faktörleri ve Bcr-Abl gibi mutant kimerik onkogenler gibi kanser ile ilişkili proteinlere etkisini göstermiştir. Hsp90 ayrıca, p53 ve MSH2 gibi mutant, inaktif tümör baskılayıcı ve DNA onarım proteinlerini de stabilize eder [297, 309]. (Şekil 6.9)

Büyük HSP'ler, hücre büyümesini düzenleyici işlevlerinin dışında tümör oluşumuna da katkıda bulunabilir. Örneğin, Hsp90 ve Hsp70, endotel hücre mobilitesini ve proliferasyonunu teşvik ederek anjiyogenezi uyarır. Bu etkisini HIF1a'yi düzenleyerek, nitrik oksit sentaz ve VEGF uyarılmasını sağlayarak oluşur [302, 309]. HSP90 MMP-2'yi uyararak tümör hücrelerin göçünü ve metastazı hızlandırır [297, 302]. Artan HSF1 ve HSP ekspresyonun tümör hücresinin invazyonunu ve migrasyonunu artırdığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Radyasyon gibi stres faktörlerine bağlı tümör hücresinde gelişen nekrotik ölüm sonucu, ölen hücrelerdeki HSP'lerin diğer tümör hücrelerinde ölüme neden olduğu gösterilmiştir (uzak hücresele etki). Hsp90, meme tümörleri, akciğer kanseri, lösemi ve Hodgkins ve Hodgkins olmayan B hücreli lenfoma dahil olmak üzere bir dizi kanserde insan dokusunda aşırı eksprese edilir [307, 309]. Bir çalışmada, erken evre prostat kanserini saptamada serum PSA ile karşılaştırmalı olarak serum Hsp70'i araştırılmış ve serum protein seviyeleri ile hastalık arasında anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir [310]. Başka bir çalışmada radyo-dirençli bir baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom hücre dizisi olan SQ20B'de, oldukça yüksek Hsp27 konsantrasyonu saptanmış [308].



Şekil 6.9 : Çeşitli proneoplastik süreçlerde HSP90. HSP90 (sarı) ve TRAP1 (turuncu) şaperonları [316].

#### 6.2.4 Isı şok proteinleri ve tedaviye direnç

HSP'lerin stres karşısında sitoprotektif işlevleriyle tümörlere tedaviye dirençli bir fenotip kazandırmakta ve kanser hücrelerini radyasyona veya kemoterapiye karşı dirençli hale getirmektedir [297]. Radyasyondan kaynaklanan tek veya çift iplik kopmalarının neticesinde oluşan ATR, FANCA, RAD51 ve BRCA2 gibi DNA hasar tepki proteinlerinin HSP70 ve HSP90 tarafından aktif hale tutulduğu gösterilmiştir. Ayrıca HSP70 ve HSP90; Chk1, WEE1, CDK1 ve CDK4 dahil olmak üzere hücre döngüsü düzenleyicileriyle doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle radyoterapi sonrası direnç oluşmasına neden olurlar [317].

Radyoterapi tedavisi altında, HSF1 çekirdeğe taşınır ve HSP70'in promotör bölgesindeki ısı şoku elemanına bağlanır. İnsan kanserlerinde HSP70'in bu indüklenebilir aşırı ekspresyonu, kötü prognoz ve radyoterapiye karşı direnç ile ilişkilidir. HSP90 aracılı sinyalleşme ise, kanser hücrelerinin radyoterapiye direnciyle ilişkili ana yol olduğu varsayılmaktadır. Buna göre, çok sayıda aday inhibitör

kullanılarak HSP90'ın hedeflenmesi, çeşitli kanserleri radyoterapiye duyarlı hale getirmek için çekici bir strateji olarak kabul edilmiştir [316, 320]. Bununla birlikte, HSP'lerin ekspresyonunun ortadan kaldırılması ve neticesinde tedaviye duyarlılık gelişmesinin arkasındaki mekanizmalar karmaşık ve çok faktörlü görünmektedir. Bir hipotez, HSP'lerin, hücreleri kemoterapi ve özellikle radyoterapinin neden olduğu hücre ölümünden koruyan sinyal moleküllerini stabilize ettiğini yönündedir. Radyasyon ile birlikte kullanılan HSP90 inhibitörlerinin, HSP90 ekspresyonunun azalmasına neden olarak; hücre çoğalması ve radyasyonun neden olduğu hücre ölümünden korunmayla ilişkili Akt, EGFR, Raf-1, ErbB2, IGF-1R gibi proteinlerin ekspresyonunun azalmasına ve bunların ubiquitin aracılı proteozomal bozunmasında bir artışa neden olmaktadır [311, 312].

17-allilamino-geldanamisin (17-AAG), 17-(dimetilaminoetilamino)-17-demetoksigeldanamisin (17-DMAG), geldanamisin ve radisikol gibi HSP'lerin küçük molekül inhibitörleri, kanser hücrelerinin kemoterapiye ve radyoterapiye daha duyarlı hale getirilmesinde umut vadetmektedir [311, 312]. Hedef genlerin ekspresyonunu seçici olarak azaltmak için antisens oligonükleotid ve siRNA teknolojisinin son gelişimi, kanser hücresi kemosenstizasyonu için HSP ekspresyonunun değiştirilmesinde de yeni bir yöntem ve çalışma lanı olmuştur [297].

Radyosensitizasyonda HSP işlevini engelleyen küçük moleküller, kanser hücrelerini radyosensitize etmek için yoğun bir şekilde araştırılmış olup, 17-AAG için umut verici in vitro ve in vivo çalışmalar mevcuttur. Servikal, akciğer ve kolon kanserleri dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde klinik olarak iyi sonuçları bildirilmektedir. 17-AAG, kanser hücrelerinde normal hücrelere kıyasla HSP90 için 100 kat daha yüksek afiniteye sahiptir [302]. Başka bir küçük molekül yaklaşımı, Hsp27 monomerlerini polimerize eden zencefil ekstraktı olan zerumbone'dur. Bu bileşiğin, Hsp27'nin anti-apoptotik aktivitesini inhibe ederek, önceden tedavi edilmiş kanser hücrelerini radyasyona karşı duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir [313]. Hsp27'yi hedefleyen RNAi ve antisense cDNA kullanılarak Hsp ekspresyonunu azaltmanın da radyoterapi duyarlılığını artırabildiği gösterilmiştir [297].

**Tablo 6.2 :** Radyorezistansta HSP70 ve HSP90 ile ilgili yapılan çalışmaların bulguları [317].

Kanser türü	Bulgu
Glioblastom	HSP70'in HSF1 tarafından düzenlenmesi; kötü prognosis ve radyoterapiye direnç ile ilişkili
<b>HSP70</b>	
Endometrial kanser	HSP70'in siRNA tarafından inhibisyonu; radyosensitizasyon
Akciğer kanseri	HSP70 ve AKT fosforilasyonunun Redd1 tarafından düzenlenmesi; radyoterapi direncinin kazanılması
Meme ve akciğer kanseri	Peptit aptamer A17 (HSP70 inhibisyonu), NVP-AUY922 (HSP90 inhibitörü); DNA çift sarmal kopmalarını artırarak radyosensitizasyon ve hücre döngüsü durması
Safra kesesi kanseri	NW457 (HSP90 inhibitörü); DNA hasar yanıt proteinlerini baskılayarak apoptoz indüksiyonu
Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu	AUY922 (HSP90 inhibitörü); kromozomal parçalanma yoluyla radyosensitizasyon
<b>HSP90</b>	
Pankreatik duktal karsinom	Ganetespi (HSP90 inhibitörü); HIF-1 $\alpha$ , STAT3 ve AKT ilişkili yolların düzenlenmesi yoluyla radyosensitizasyon
Akciğer kanseri	Ganetespi (HSP90 inhibitörü); hücre döngüsü durdurma ve DNA hasar yanıt proteinlerinde bozunma yoluyla kanser hücresi sağkalımının inhibisyonu
Mürin osteosarkom	PU-H71 (HSP90 inhibitörü); hücre sağkalımının inhibisyonu ve RAD51 ve Ku70'in azalması yoluyla DNA hasarının artması
Akciğer kanseri	NVP-AUY922 (HSP90 inhibitörü); HSF1'in inhibisyonu, HSP90 istemci proteini AKT'nin azaltılması, homolog rekombinasyonu bozarak radyosensitizasyon

Radyasyonun neden olduğu DNA hasarına yanıt olarak, hücre hasara karşı koymak için uygun DNA onarım yollarını aktive eder ve hayatta kalır. Hsp90 inhibitörleri, özellikle DNA onarım yollarını inhibe eden özellikleri nedeniyle radyoterapiye duyarlılık geliştirebilir. Tümör hücrelerinde Hsp90 inhibitörü 17-DMAG ve 17-AAG ile, DNA çift stant kırılma onarımının inhibisyonu gerçekleştiği ve radyasyona duyarlı hale geldikleri farklı çalışmalarda gösterilmiştir [311, 316]. Başka bir çalışmada 17-AAG ile HSP90 inhibisyonun p53 aracılığıyla oral skuamöz hücreli karsinom hücre kültüründe radyoterapiye duyarlılığı artırdığı görülmüştür [315]. HSP90 ayrıca anjiyogenezi artırarak tedaviye direnç gelişmesine sebep olabilmektedir, bu etkisini

radasyona direnç mekanizmalarında bahsettiğimiz, VEGF ekspresyonunu artırarak anjiyogenezi uyaran HIF1 $\alpha$  üzerinden yapmaktadır. 17-AAG ve 17-DMAG, HIF1 $\alpha$ 'nın Hsp90 aracılı stabilizasyonunu bozarak tümör vaskülarizasyonunu baskılayabilmektedir [314].

HSP'ler, kanser hücrelerinde artan seviyeleri ve/veya artmış aktivitelerinden, hayatta kalma ve çoğalma üzerine etkilerinden dolayı; aktivitelerini, özellikle kemosenitizasyon ve radyosenitizasyon bağlamında inhibe etmek, kanser tedavisi için umut verici bir hedef haline gelmiştir. Kemoterapi ve radyoterapiye ek olarak kullanılan HSP90 gibi büyük HSP inhibitörlerine yoğun ilgi olmasına karşın, küçük HSP'ler üzerine yapılan çalışmalar da umut vadetmektedir [297]. Etki mekanizmalarının karışık olması, konakçı için toksisite veya hedef dışı etkiler olmadan işlevlerini seçici olarak inhibe etmenin zor olması, özellikle küçük ve ATP bağımsız HSP'lere karşı inhibitör molekül geliştirmenin zorluğu nedeniyle HSP inhibitörlerini klinikte kanser tedavisine entegre etmek güçtür. Bu nedenle çalışmamızda farklı radyasyon doz ve fraksiyonasyonlarının, YAP1 ve HSP90 üzerine etkisini araştırarak; daha etkin, radyodirenç mekanizmalarının üstesinden gelmeyi amaçlayan ve ileriki çalışmalara yol göstereci bir tedavi şeması oluşturmayı amaçladık.

## 7. MATERYAL ve METHOD

Bu çalışmamızda Avrupa Konseyi'nin önerdiği standartlara (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes) (ETS 123) uyulmuştur. Çalışmanın deneysel kısmı Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda, GK tedavisi Bezmialem Vakıf Üniversitesi Gamma Knife Ünitesi'nde immünohistokimya çalışmaları Bezmialem Vakıf Üniversitesi Patoloji Laboratuvarı'nda, ELISA testleri Bezmialem Vakıf Üniversitesi Beykoz Araştırma Merkezi Beyin ve Sinir Cerrahisi Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Farelerin temini Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'ndan sağlandı, işlem öncesi ve sonrasında takibi kafeslerde oda sıcaklığı (22-25C)'nda 12 saat gündüz/12 saat gece sirkadien siklusu halinde izlendi. Normal diyet ve suya erişimi deney sürecinde serbest bırakıldı.

### 7.1 Tümör Hücreleri

B16F10 fare melanoma hücre serisinin seri pasajları American Type Culture Collection'dan (Rockville, Maryland) elde edildi. %10 ısıyla inaktive edilmiş fetal sıgır serumu, 100 mg/mL penisilin ve 100 mg/mL streptomisin ile desteklenmiş Dulbecco modifiye Eagle ortamında kültürlendi (Life Technologies, Carlsbad, California, USA). Hücre kültürlerinin inkübasyonu, 5% CO<sub>2</sub> içerikli ve 37°C'lik nemlendirilmiş atmosfer şartları sağlayan elektronik inkübatörlerde sağlandı.

### 7.2 Fare Modeli ve Tedavi

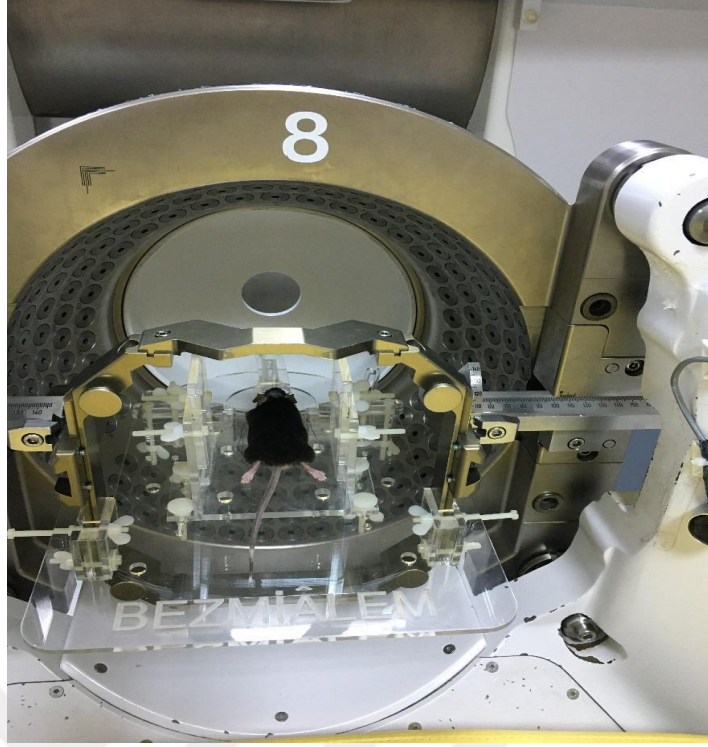
Bu çalışmada 4-6 haftalık dişi C57BL/6J fareler, Laboratuvar Hayvan Kaynakları Komisyonu standartlarına ve onaylanmış protokole göre (BVU-2015/07) kullanıldı.. C57BL/6J farelerinde intraserebral tümör oluşturmak için B16F10 hücreleri logaritmik fazda toplandıktan sonra PBS (Phosphate-Buffered Saline) ile iki defa yıkandı ve aynı hacimde DMEM (50 ml fetal sıgır serumu ve 200 mM L-glutaminden 10ml, 100IU/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin karışımından 10 ml= medyum'da

%5 metil selüloz ile karıştırılarak 25-gauge iğnesi olan 25-µl şırıngaya (Hamilton, Reno, NV) koyulmuştur. Daha sonra farelere genel anestezi uygulandıktan sonra kafatası orta hattında yaklaşık 1 cm'lik insizyon yapılmış ve stereotaktik frame'e yerleştirilmişlerdir. İğne ucu bregmanın 2 mm sağ tarafına hedeflenmiş ve kafatasının 3 mm altına kadar iğne yerleştirilip, intraserebral tümörojenik doz olan 100.000 hücre 5 µl hacimde verilmiştir. Daha sonra cilt kapatılıp fare uyanana kadar gözlenmiştir. Fareler dört gruba ayrılmıştır: B16F10 tümör hücresi implante edilen ve tedavi verilmeyecek kontrol grubu; Gamma Knife (GK) ile 15 Gy dozunda, tek fraksiyon-tek doz tedavi alacak grup; Gamma Knife ile 7 Gy dozunda, 3 fraksiyon (3 doz) tedavi alacak grup; Gamma Knife ile 5 Gy dozunda, 5 fraksiyon (5 doz) tedavi alacak grup şeklinde. GK tedavisine tümör implantasyonundan sonra 3. günde başlanmıştır.

GK öncesi tedavi alacak gruplara volümetrik bilgisayarlı tomografi çekildi ve tedavi planı Leksell GammaPlan Version 10.1.1 (Stockholm, İsveç) yazılımı kullanılarak yapıldı. Radyocerrahi planı 1 izomerkezli 4 mm kolimatör kullanılarak yapıldı. Tedavide Gamma Knife Model 4C modeli (Stockholm, İsveç) kullanıldı ve gama ışınlaşmasının doz hızı 2.51 Gy/dakika idi.



**Şekil 7.1** : Stereotaktik frame ile B16F10 melanom hücre implantasyonu.



**Şekil 7.2 :** Gamma Knife işlemi örnek görüntü.

### **7.3 İn Vivo Sağlık Deneyi**

Fareler tümör implantasyonundan ve tedaviden sonra her gün takip edilmiş, ağırlık ölçümleri yapılmış, yeme ve suya ulaşma kabiliyetleri değerlendirilmiştir. Fareler ölene kadar takip edilmiş veya ağırlıklarının %20'sini kaybettiklerinde kurban edilmişlerdir. Farelerin ölüm tarihleri kayıt altına alınıp, otopsi yapılarak beyin tümörünün varlığı teyit edilerek patolojik inceleme için alınmıştır. Bu deney ile farklı tedavi kombinasyonlarının, farelerin yaşam sürelerine etkisi değerlendirilmiştir.

### **7.4 İn Vivo Bağışıklık Cevabının Değerlendirilmesi**

Bu deney ile tedavi gruplarında bağışıklık sistemin nasıl etkilendiği araştırılmıştır. Kanser hastalarında bağışıklık sistemi baskılandığı için bu hastaların tedavisinde bağışıklık sisteminin kuvvetlendirilmesi önem teşkil etmektedir. Radyasyonun immün yanıtı artırabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur, ki bu da immunoterapinin bir şeklidir. Çalışmamızda GK ile farklı radyasyon doz ve fraksiyonlarının immün yanıtı etkisi değerlendirilmiştir. Bu nedenle aynı deney düzeni ile ölen fareler kurban edildikten sonra sağlıklı (tümör infiltrasyonu olmayan) beyin dokusu ve tümör infiltrasyonlu beyin dokusundan immün sistem ile ilişkili IL-17A, CCL4 gibi belirteçler

incelenecektir. Bu veriler beyin metastazı tedavisinde immün cevabın ve radyocerrahi fraksiyonasyonunun buna etkisi konusunda önemli bilgiler vermesi amaçlanmıştır.

### 7.5 HSP90 ve YAP1 Etkisinin Değerlendirilmesi

Bölüm 6’da bahsedildiği gibi radyoterapiye direnç gelişiminde HSP90 ve YAP1’in rolü ve önemi büyüktür. Hipofraksiyona radyocerrahinin bu proteinlere ve radyasyona direnç ile ilişkileri konusunda yeterli çalışma yoktur. Bu nedenle GK ile farklı tedavi doz ve fraksiyonların, bu proteinler üzerine etkisine bakarak radyasyona direnç gelişimindeki rollerini anlamak ve bunun neticesinde direnç mekanizmalarının üstesinden gelecek etkin bir tedavi şeması oluşturmayı amaçladık. Sakrifiye edilen farelerin metastatik beyin dokusundan immüno histokimya ile YAP1 ve HSP90 düzeyi bakıldı.



Şekil 7.3 : Melonama infiltrasyonu makroskopik kesitsel görüntüler.

## 7.6 İmmünohistokimya

Hematoksilen-Eozin boyama için rodajlı lamlara alınan 3- 4 µm kalınlığındaki paraffin kesitler 1 gece etüvde deparafinize edildikten sonra aşağıdaki sırayla boyama işlemi yapıldı.

- 3 kere 15' er dakika ksilolde bekletildi.
- Sırasıyla %96, %96 ve %80' lik alkollerde 10 ar dakika bekletilerek rehidrate edildi.
- Akar suda 10 dakika yıkandı.
- Kullanılmadan önce süzülen Hematoksilende 15 dakika bekletildi.
- Akar suda 10 dakika yıkandı.
- 2 kere asit alkole batırılıp çıkartıldı.
- Akar suda 10 dakika yıkandı.
- 2 kere amonyaklı suya batırılıp çıkartıldı.
- 60 sn eozinde bekletildi.
- Sırasıyla %80, %96, %96' lık alkollerden geçirildi.
- Kurutulup, 45 dakika ksilolde bekletildikten sonra Kanada balsamı ile lamlar kapatıldı.

İmmünohistokimyasal analiz için tümör içeren doku örnekleri %10'luk formolde 12 saat fikse olduktan sonra doku takip cihazında takibe alındı.

Cihazdan çıktıktan sonra parafine gömüldü ve mikrotom cihazında lizinli lamlara 2-4 mikronluk kesitler alındı. İmmunohistokimyasal olarak CD45 (158-4D3) hazır antikor, YAP1 (EP1674Y, Abcam, 1/100 dilüe), HSP90 boyaları ile boyandı.

Boyalı lamlar ışık mikroskobu altında değerlendirildi. Değerlendirme yapılırken CD45 için sitoplazmik, HSP90 ve YAP1 için sitoplazmik ve nükleer boyamalar dikkate alındı.

CD45 için tüm gruplarda tümör içerisinde boyalı lenfositler sayıldı.

HSP90 ve YAP1 için ekspresyon şiddeti yanı sıra yaygınlığı da derecelendirilerek "h skoru" elde edildi. Ekspresyon yaygınlığı; tümör hücrelerinin %25'inden az ise;1, %25-75'inde mevcutsa 2, %75'inden fazla ise;3 olacak şekilde derecelendirildi.

Boyanma şiddeti ise boyanma yoksa; 0, zayıf boyanma varsa; 1, orta şiddette boyanma varsa; 2, kuvvetli boyanma varsa; 3 olarak derecelendirildi. Ardından; boyanma şiddeti ile boyanma yaygınlığı çarpılarak “h skoru” elde edildi ve h skoru 1-4 arası olanlar düşük ekspresyon gösteren grup, h skoru 4-9 arası olanlar ise; yüksek ekspresyon gösteren grup olarak kabul edildi [321].

### **7.7 Protein İzolasyonu**

CC14 ve IL-17A tayini için öncelikle sakrifikasyon sonrası elde edilen beyin dokularından her denek için sağlıklı ve tümörlü dokular ayrıldı. Daha sonra her grup için sağlıklı ve infiltratif dokular ayrı ayrı toplanarak havuzlandı. Her havuzdan kontrol amaçlı iki kez deney tekrarlandı. Sağlıklı ve tümörlü bölgelerden ayrı ayrı izolasyon gerçekleştirildi. Doku küçük parçalara ayrıldı. 1 gr'a 3ml RIPA (Radyoimmünopresipitasyon tayini) tamponu (1ml RIPA + 10ml inhibitör + 10ml EDTA) olacak şekilde ayarlandı. Dokular tartılıp miktarına göre RIPA tamponu eklendi. Toplamda 6 kez olacak şekilde işlem tekrarlandı. İşlem buz üzerinde +4 derecede 1300 rpm'de santrifüj edilerek gerçekleştirildi. Süpernat alınarak numuneler -20 derecede saklandı.

### **7.8 CCL4 Antikoru Tayini**

Farklı radyocerrahi tedavilerinin CCL4 ekspresyonuna etkilerini görmek ve neticesinde immün yanıtı artıracak etkin tedavi şemalarını belirlemek amacıyla bu deneyi plandık.

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays) ile antikor tayini yapılmıştır. Öncelikle tüm reaktifler kullanımdan önce oda sıcaklığına getirildi. 80ng/L standart stok solüsyonu oluşturmak için 120ul standard (160ng/L) 120ul standart seyreltici ile sulandırıldı. Seyreltme yapmadan önce standardın hafif çalkalama ile 15 dakika oturmasına izin verildi. 40ng/L, 20ng/L, 10ng/L ve 5ng/L solüsyonları üretmek için standart stok solüsyonunu (80ng/L) 1:2 standart seyreltici ile seri olarak seyrelterek çift standart durakları hazırlandı.

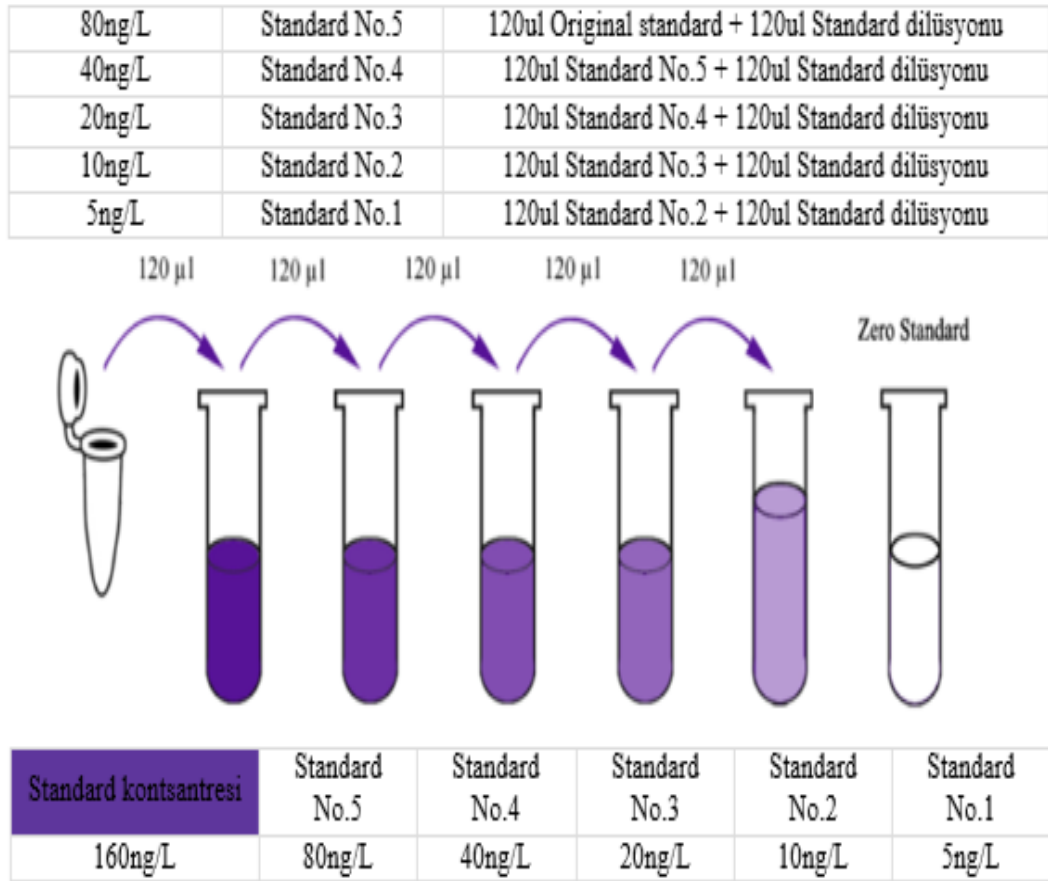
Tüm reaktifleri, standart solüsyonları ve numuneler hazırlanıp oda ısısına geldikten sonra strip sayısı belirlenip çerçevelere yerleştirildi.

Standart bölmeye 50ul standart eklendi. Numune bölmelerine 40ul numune eklendi ve ardından numune bölmelerine 10ul Fare CCL4 antikorunu eklendi.

Daha sonra numune bölmelerine ve standart bölmelere 50ul streptavidin-HRP (Horseradish Peroksidaz) eklendi. Karıştırılarak plaka üzeri kapatıldı ve 37°C'de 60 dakika inkübe edildi. Sonra plaka 5 kez yıkama tamponu ile yıkandı.

Bölmeler, her yıkama için 30 saniye ile 1 dakika arasında 300ul yıkama tamponu ile ıslatıldı. Her bölmeye 50ul substrat solüsyonu A ve ardından 50ul substrat solüsyonu B eklendi. Karanlıkta 37°C'de 10 dakika boyunca yeni bir kapatici ile kaplanmış plak ile inkübe edildi.

Durdurma solüsyonunu ekledikten sonra 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropilaka okuyucu kullanarak her bölmenin optik yoğunluğun (OD değeri) belirlendi.



Şekil 7.4 : ELISA ile CCL4 tayini

## 7.9 ELISA ile IL17A Tayini

Uyguladığımız prosedür şu adımlarından oluşmaktadır:

1. Uygun bölmelere standart, boş ve numunenlerin her birinden 100 uL dilüsyonunu eklendi. Tüm numuneler ve standartlar iki kopya halinde test edildi. Plakalar koruyucu ile kapatıldı. 37°C'de 90 dakika inkübe edildi.
2. Her bölmeden sıvılar boşaltıldı ve hemen 100 L Biotinylated Detection Ab çalışma solüsyonu eklendi. Plaka yeni bir kapatici ile örtülerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
3. Solüsyon her bölmeden boşaltıldı ve 350 L yıkama tamponu eklendi. 1 dakika bekletilip süzöldükten sonra her bölmeden solüsyon boşaltıldı ve kurutuldu. Bu yıkama adımı 3 kez tekrarlandı.
4. Her bölmeye 100 uL HRP Konjugat çalışma solüsyonu eklendi. Plaka yeni bir kapatici ile örtüldü ve 30 dakika 37°C'de inkübe edildi.
5. Çözelti her bölmeden boşaltıldı, yıkama işlemi adım 3'te olduğu gibi 5 kez tekrarlandı.
6. Her bölmeye 90 uL Substrate Reaktif ve 50 ul durdurma solüsyonu eklendi. Plakayı yeni bir kapatici ile örtülüp yaklaşık 15 dakika süreyle 37°C'de inkübe edildi.
7. 450 nm'ye ayarlanmış bir mikro plaka okuyucu ile her bir kuyunun optik yoğunluğunu (OD değeri) tek seferde belirlendi.

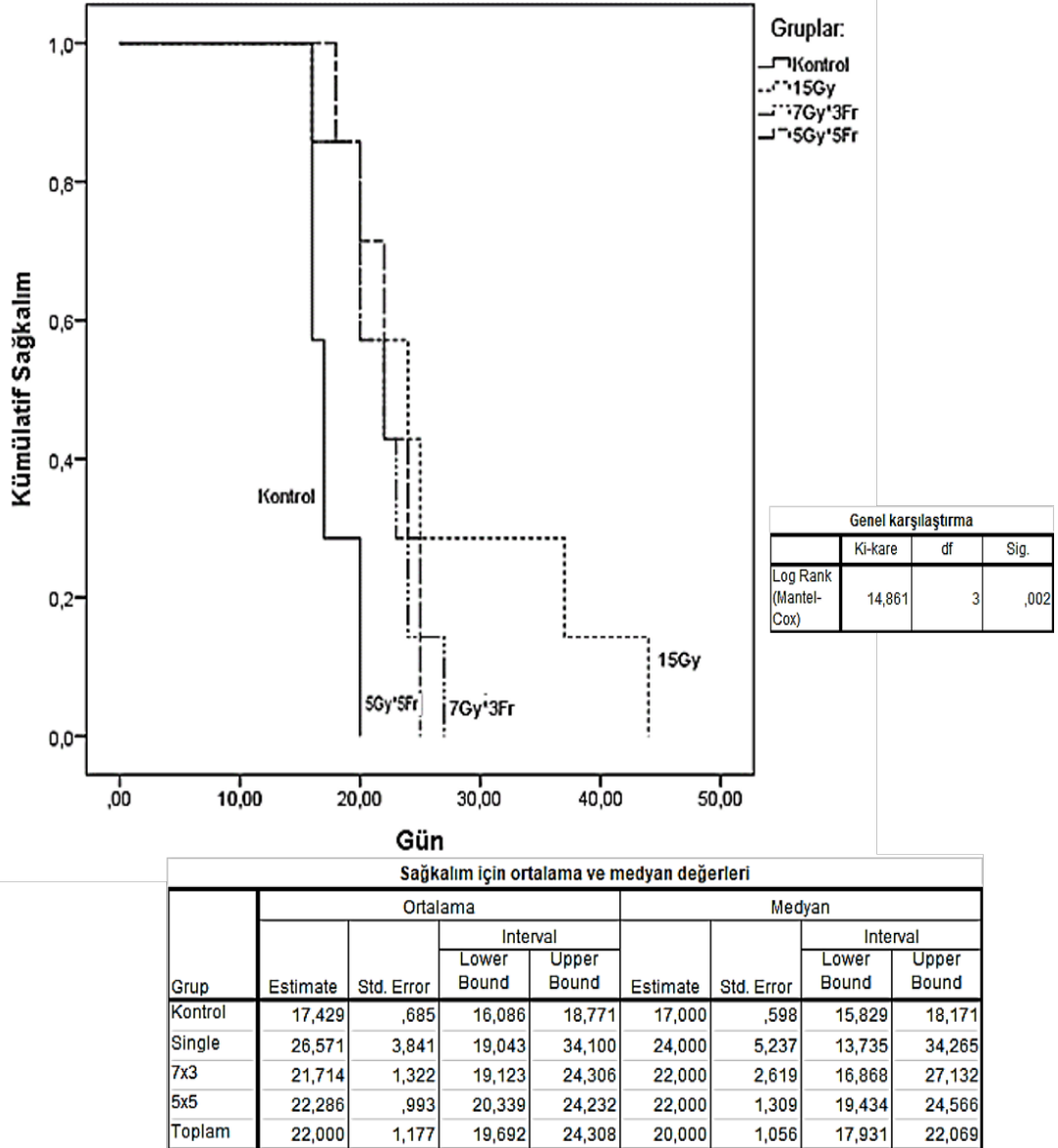
## 7.10 İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen sonuçlar için IBM Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 22 programı kullanıldı. Genel sağkalıma ilişkin Kaplan-Meier hayatta kalma olasılık tahminleri hesaplandı ve gruplar arası karşılaştırmalar için log-rank testleri yapıldı. P değeri 0.05'in altı istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

İmmünohistokimyasal ve ELISA sonuçları için gruplar arası karşılaştırmalar verilerin özelliklerine göre Kruskal Wallis testi ya da Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. P değeri 0.05'in altı istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 8. SONUÇLAR

### 8.1 Sağkalım Sonuçları

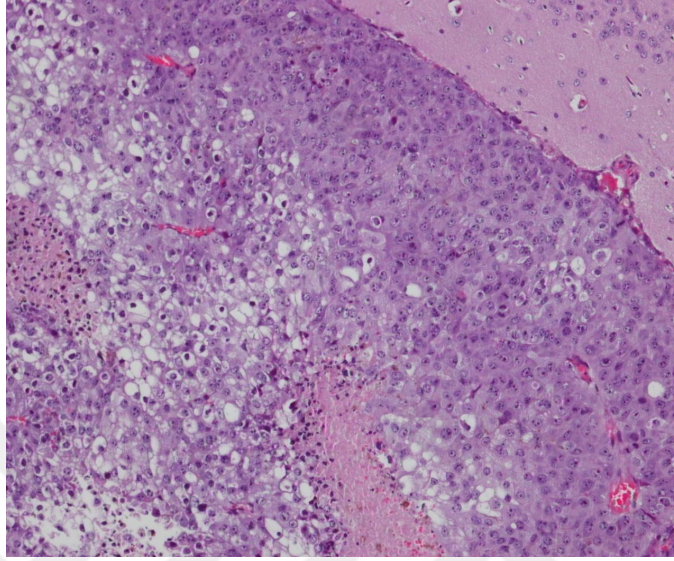


Şekil 8.1 : Sağkalım sonuçları

Kaplan Meier eğrisine göre tüm GK tedavi gruplarının kontrol grubuna göre daha uzun süre yaşamış olduğu görülmektedir ( $p=0,02$ ). Tedavi grupları arasında da 15 Gy tek fraksiyon alan grubun hipofraksiyon tedavi alan gruba göre daha uzun yaşadığı görülmekte olsa da bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

## 8.2 İmmünohistokimya

Preparatların hematoksilin-eozin boyanmış kesitlerinde tedavi alan gruplarda özellikle 15 Gy tek doz alan grupta belirgin nekroz ile uyumlu bulgular görülmüştür. Ancak istatistiksel değerlendirmeye alınmamıştır. (Şekil 8.1)



**Şekil 8.2 :** Hematoksilin-Eozin boyama. Glial dokudan düzgün sınırlar ile ayrılan nükleolleri belirgin geniş eozinofilik sitoplazmalı hücrelerden oluşan tümöral infiltrasyon (HEX100).

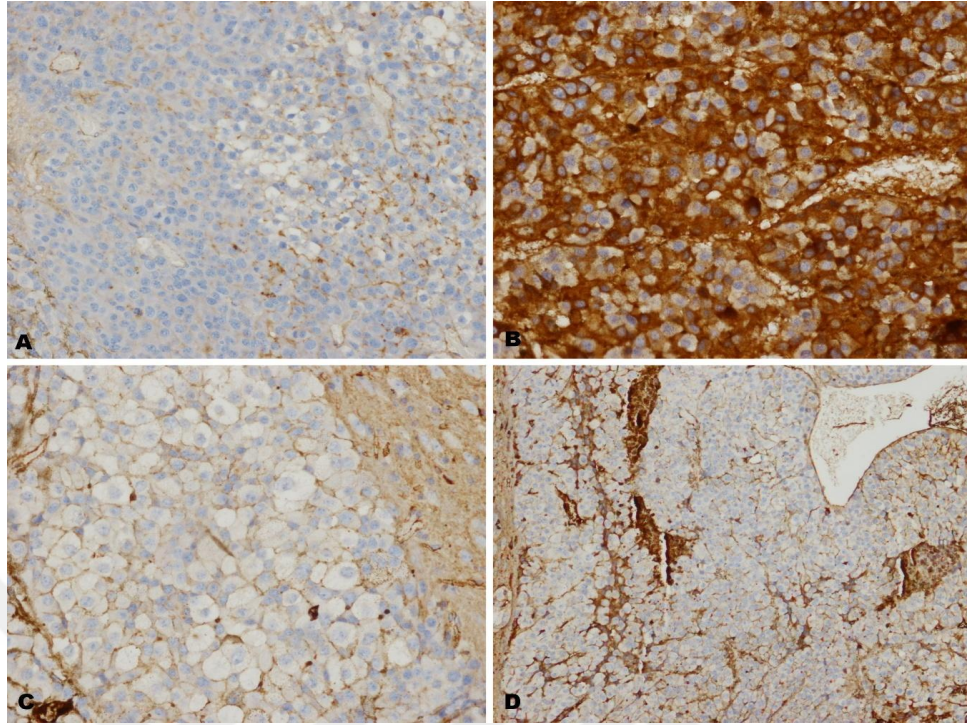
**Tablo 8.1 :** Gruplar arası HSP90 ve YAP1 düzeyi.

	<i>p</i>	
	HSP90	YAP1
Gruplar arası	0,648	0,762

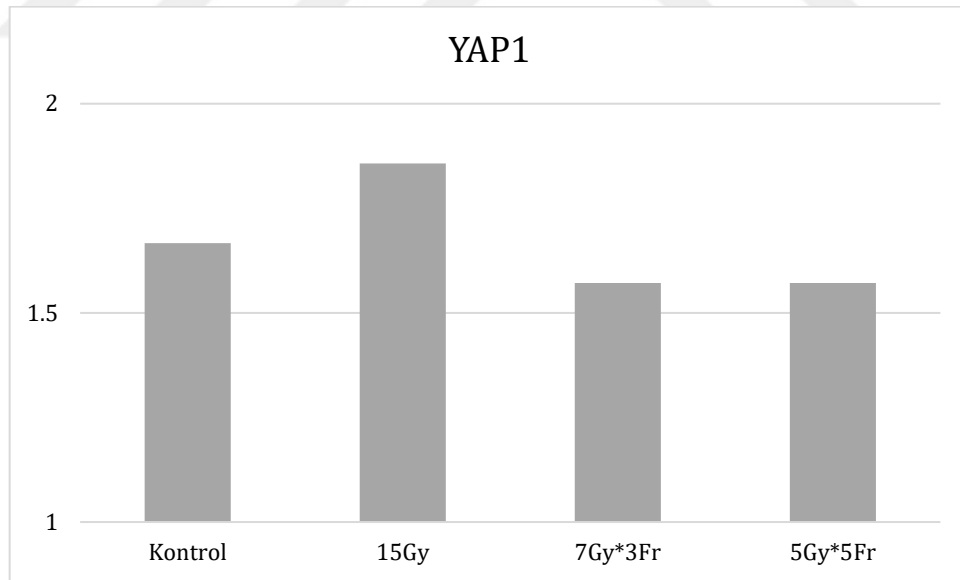
(Bağımsız değişkenler Kruskal Wallis Testi)

HSP90'nın ve YAP1'in düzeyi immünohistokimyasal olarak method kısmında bahsedilen prosedüre uygun bir şekilde her dört grup için ayrı ayrı ölçülmüş ve istatistiksel analizi yapılmıştır. Gruplar arasında HSP90 için p değeri 0,648, YAP1 için ise p değeri 0,762 tespit edilmiş olup istatistiksel olarak anlamlı sonuç çıkmamıştır.

### 8.2.1 YAP1 sonuçlar



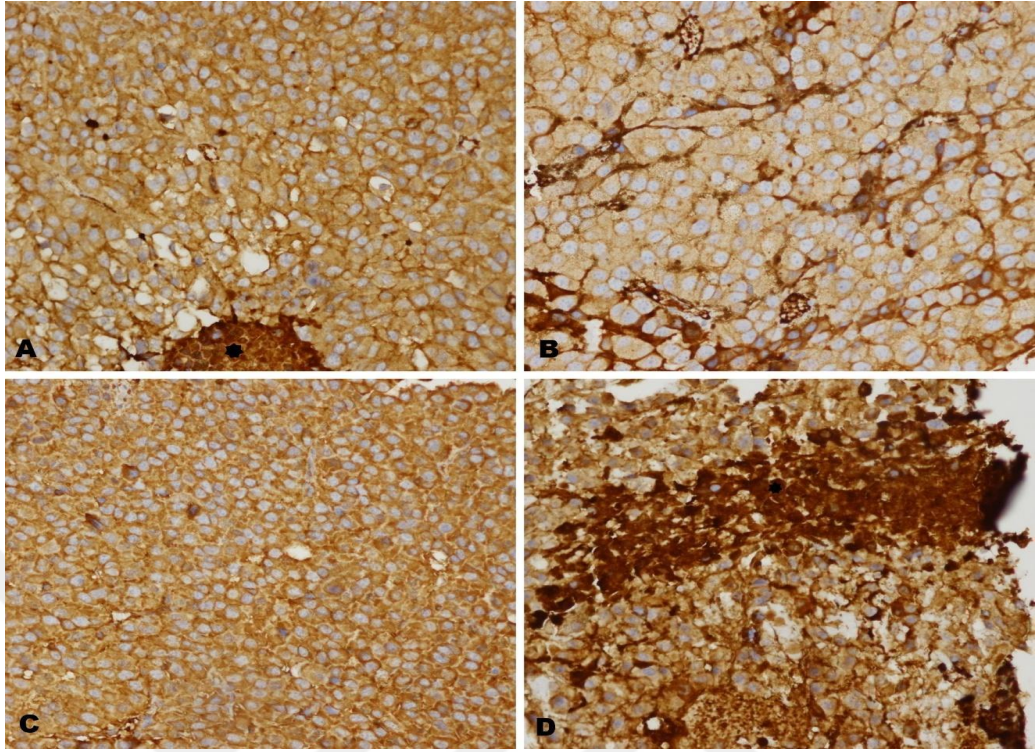
**Şekil 8.3 :** YAP1 boyama. Tümör hücrelerinde fokal zayıf sitoplazmik boyanma, A; 5x5Gy B;7x3Gy C; kontrol D; 15Gy (A,C,D x100), tümör hücrelerinde kuvvetli sitoplazmik boyanma (B, x200).



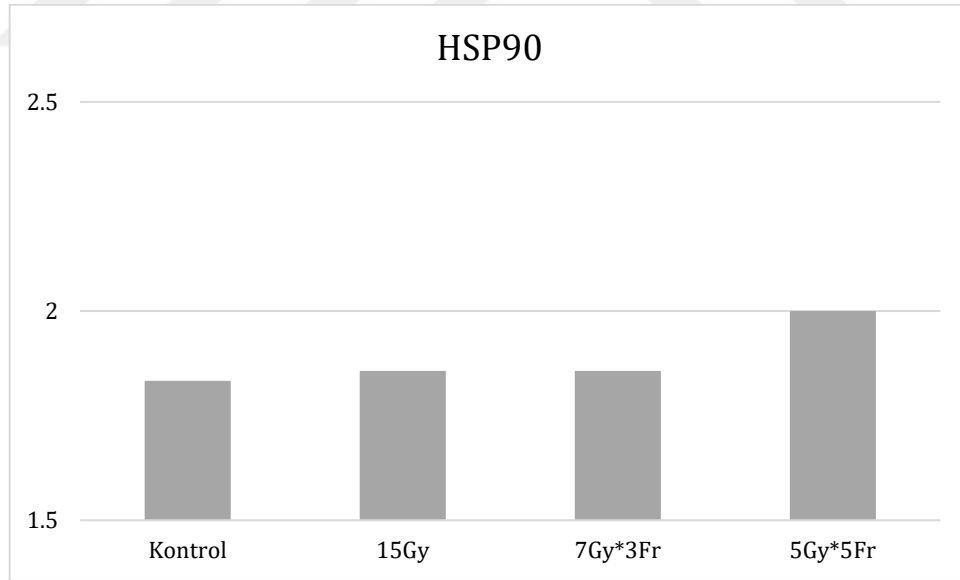
**Şekil 8.4 :** YAP1 sonuçlar grafik.

YAP1 için gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. 15 Gy tek doz alan grupta diğerlerine göre yüksek olduğu görülmüştür.

### 8.2.2 HSP90 düzeyi



**Şekil 8.5 :** HSP90 boyama. Tüm gruplarda tümör hücrelerinde sitoplazmik pozitif boyanma, A; 5x5Gy B;7x3Gy C; kontrol D; 15Gy (A,B,C,D X200, \* nekroz alanı).



**Şekil 8.6 :** HSP90 sonuçlar grafik.

HSP90 için gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ancak 5Gy x5 Fr alan grupta düzeyi diğer gruplara göre yüksek saptanmıştır. Bunun nedeni verilen dozun düşük olması ve ölmeyen tümör hücrelerinde direnç mekanizmasının harekete geçmesi ve HSP90 ekspresyonunun artması olabilir. Bu da bölüm 6'da bahsettiğimiz gibi HSP'lerin tedaviye direnç gelişimindeki rolü ile uyumaktadır.

### 8.3 ELISA Sonuçları

Tümörlü dokular ve sağlıklı beyin dokuları için her grubun kendi içinde CCL4 ve IL-17A düzeyleri karşılaştırılmıştır, istatistiksel açıdan anlamlı sonuç elde edilmemiştir. Ayrıca bütün gruplardaki tümörlü dokudaki CCL4 ve IL-17A düzeyleri ile sağlıklı beyin dokusundaki CCL4 ve IL-17A düzeyleri karşılaştırılmıştır, istatistiksel açıdan anlamlı bir bulunmamıştır. (Tablo 8.2 ve Tablo 8.3)

**Tablo 8.2 :** Her grupta tümörlü ve sağlıklı dokunun CCL4 ve IL-17A düzeyi istatistiği.

	<i>p</i>	
<b>Gruplar:</b>	<b>CCL4</b>	<b>IL17A</b>
Kontrol Sağlıklı-Kontrol Tümör	0,333	0,667
15Gy Sağlıklı-15Gy Tümör	0,333	0,333
7Gy*3Fr Sağlıklı-7Gy*3FrTümör	0,333	1,000
5Gy*5Fr Sağlıklı-5Gy*5FrTümör	0,333	0,333

(Bağımsız değişkenler Mann-Whitney U testi)

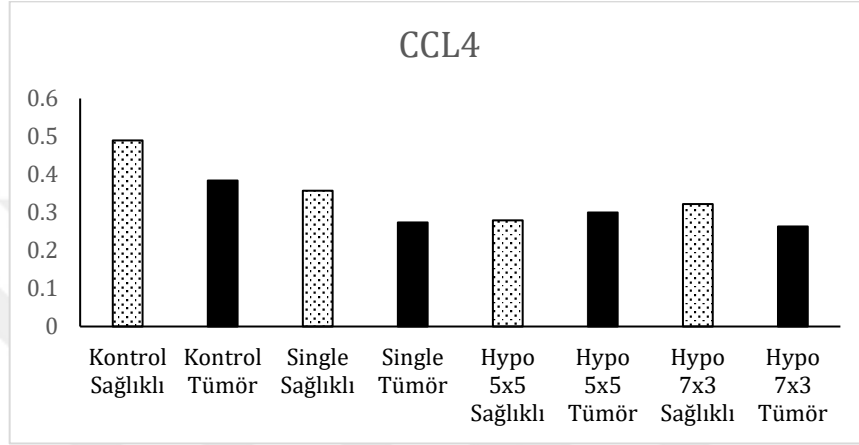
**Tablo 8.3 :** Tümörlü dokular ve sağlıklı dokuların kendi içinde CCL4 ve IL-17A düzeyi istatistiği.

	<i>p</i>	
<b>Gruplar:</b>	<b>CCL4</b>	<b>IL17A</b>
Tümörler arası	0,083	0,080
Sağlıklı Beyinler arası	0,083	0,244

(Bağımsız değişkenler Kruskal Wallis Testi)

### 8.3.1 ELISA CCL4 sonuçları

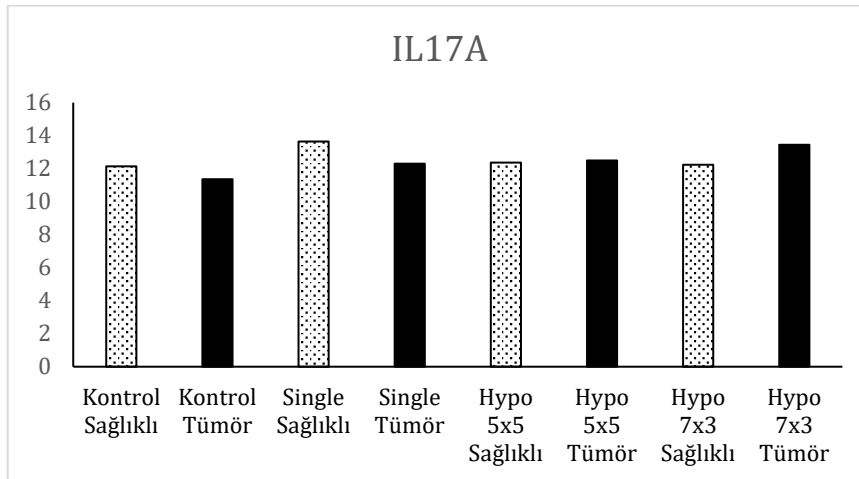
Deney gruplarından alınan dokun örneklerinin havuzlanarak ELISA yöntemi ile değerlendirilmesi sonucu deney grupları ile standartların optik dansitelerinin karşılaştırılması ile gruplara ait CCL4 antikor düzeyleri elde edilmiştir. Çalışma iki tekrarlı yapılarak sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırılmış olup gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır. ( $p=0,083$ )



Şekil 8.7 : CCL4 sonuçları

### 8.3.2 ELISA IL-17A sonuçları

Deney gruplarından alınan dokun örneklerinin havuzlanarak ELISA yöntemi ile değerlendirilmesi sonucu deney grupları ile standartların optik dansitelerinin karşılaştırılması ile gruplara ait IL-17A düzeyleri elde edilmiştir. Çalışma iki tekrarlı yapılarak sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırılmış olup gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır. (sağ  $p=0,08$  tümö  $p=0,244$ )



Şekil 8.8 : IL-17A sonuçları

## 9. TARTIŞMA

Bu preklinik çalışmamızda, B16F10 fare melanom hücre serisi ile beyin metastazı modeli oluşturduk. GK ile yapılan üç farklı tedaviyi, kendi içinde ve kontrol grubu ile karşılaştırarak; radyasyona direnç gelişiminde HSP90 ve YAP1 rolünü ayrıca farklı radyocerrahi tedavi planlarının bu moleküller üzerine olası etkilerini değerlendirmeyi amaçladık. Her grupta sağkalım sürelerini kayıt altına aldık. Ek olarak her grup için sağlam ve tümörlü beyin dokusundan CCL4 ve IL-17A düzeylerini ölçerek immün yanıtı artıracak daha etkin radyocerrahi tedavi şeması oluşturmayı amaçladık. Literatürde, radyasyona direnç mekanizmalarının üstesinden gelmek için farklı radyocerrahi doz ve fraksiyonlarının HSP90 ve YAP1 üzerine etkisini araştıran çalışma hiç bulunmamaktadır. Radyocerrahinin beyin metastazında immün yanıtı düzenlemedeki etkinliğini birçok klinik ve preklinik çalışmalar ile gösterilmiştir [322-325] ancak farklı hipofraksiyone radyocerrahi tedavi şemalarının beyin metastazı modelinde immün yanıtı etkisini gösteren yeterli veri yoktur. Bu bağlamda çalışmamız alanında öncü olmakta ve gelecek çalışmalara ışık tutmasını amaçlamaktayız.

BM'nin cerrahi, medikal ve radyolojik tedavisi açısından son birkaç on yılda önemli ilerleme kaydedilmesine rağmen hala kanser hastalarında yaşam kalitesini ve sağkalımı etkileyen temel faktör olarak yerini korumaktadır. Cerrahi rezeksiyon ve ardından rezeksiyon yatağına radyocerrahi veya seçili hasta gruplarına tek başına radyocerrahi uygulanmasının birçok kanser türüne bağlı gelişen BM'lerde lokal nüks oranını önemli ölçüde azalttığı görülmüştür [2]. Ancak bölüm 5 ve 6'da bahsettiğimiz gibi farklı mekanizmalardan dolayı, BM'li hastalarda tedavinin etkinliğini kısıtlayan en önemli faktör direnç gelişimidir. Tümör hücrelerindeki bu direnç mekanizmalarının üstesinden gelmek, radyoterapiye ve kemoterapiye duyarlılığı artırmak için immün sistemin rolü ve immün yanıtın düzenlenmesinin önemi popüler bir çalışma alanı olarak önemini korumaktadır.

Uzun süre iyonlaştırıcı radyasyonun, bağışıklık sisteminin anti-tümör tepkisini etkilemediğine inanılıyordu, ancak son veriler, radyasyonun doğuştan gelen ve

edinilmiş bağışıklık tepkilerini uyarma ve güçlendirme yoluyla bağışıklık sistemini etkilediğini göstermektedir. IR'ye bağılı bağışıklık tepkisi; antijene özgü bağışıklık tepkisini uyarabilen DC'ler gibi antijen sunan bağışıklık hücrelerinin tümör mikroçevresine göçünü, immünmodülatör yolakların aktivasyonunu ve sitokinlerin, kemokinlerin düzenlenmesini içermektedir. GK ile TBRT'yi karşılaştıran bir çalışmada; yüksek tek dozda radyocerrahinin immün yanıtla ilgili hücreler ve moleküller üzerine etkisi olduğu gösterilirken TBRT'de böyle bir etki saptanmamıştır [322].

Etkili bir inflamatuvar bağışıklık tepkisi, önce hücrelerin inflamasyon bölgesine alınmasını ve ardından uygun aktivasyon ve düzenlenmesini gerektirir. Kemokinler, hem kemotaktik hem de bağışıklık düzenleyici moleküller oldukları için bu yanıtta kritik öneme sahiptir. Radyasyonun kemokinleri etkileyerek immunsupresif etki yapabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu bağlamda, özellikle CCL4-CCR5 arasındaki etkileşim, T hücrelerinin polarizasyonuna, aktivasyonuna ve farklılaşmasına aracılık ederek immün yanıtta kritik rol almaktadır [259,262]. Makrofaj inflamatuvar protein 1 (MIP-1)  $\alpha$  ve  $\beta$  sırasıyla CCL3 ve CCL4 olarak yeniden adlandırılmıştır. CCL4, spesifik reseptörü olarak CCR5'i kullanır. Bununla birlikte, CCR5, aynı zamanda CCR1'e bağlanabilen ancak farklı kemokinler olan CCL3 ve CCL5 (RANTES) tarafından da kullanılır. CCL4'ün tümör mikroçevresinin düzenlenmesinde, sitotoksik T lenfositlerin ve DC'lerin TMC'ye göçünde birçok etkisi gösterilmiştir [326]. Melanom fare modeli üzerine yapılan bir çalışmada, Treg hücre deplesyonu sonrası bazofil göçünün arttığı gösterilmiştir. Bazofil kaynaklı CCL3 ve CCL4 ekspresyonunda artışın da CD8+ T hücre infiltrasyonunu ve ardından tümör reddini uyardığı belirtilmiştir [327]. Çalışmamızda ise CCL4 düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Sitokinler, kanserin başlaması, patogenez ve anti-kanser tedavilerine yanıt sürecinde önemli rol oynamaktadır. Tümör mikroçevresindeki sitokinlerin varlığı dinamiktir ve kemoterapötik ajanlar ve iyonlaştırıcı radyasyon gibi bazı dış etkilere yanıt olarak profillerinin değiştiği bilinmektedir [322]. Bununla birlikte, metastatik bir beyin tümöründe iyonlaştırıcı radyasyona karşı bağışıklık tepkisinin mekanizması hakkında veri eksikliği vardır. İnflamatuvar yanıtta, otoimmün hastalıklarda ve kanser bağışıklığında kritik bir rol oynayan proinflamatuvar bir sitokin olan IL-17, tümör büyümesinin güçlü bir düzenleyicisi ve monositlerin ve nötrofillerin göçünü artırarak

inflamatuvar reaksiyonlarda önemli bir aracı görevi görür [328]. Bununla birlikte, IL-17'nin tümör büyümesi ve metastazındaki rolü hala belirsizdir, tümör oluşumunda çift yönlü bir etkisi olduğundan söz edilmektedir [207]. Tümör lojuna radyoterapi almış hastalarda IL-17A'nın tümör progresyonu ve dolayısıyla radyoterapiye direnç ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir [329]. Çalışmamızda ise IL-17A düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Kanserde, HSP90'nın tedaviye direnç ile ilişkisini, çeşitli HSP90 inhibitörleri ile kemoterapiye ve radyoterapiye duyarlılığın artırıldığını gösteren kanıtlar mevcuttur. Ancak çalışmalar daha çok HSP90 inhibitörleri üzerine yoğunlaşmıştır [330, 331]. Her ne kadar radyosensitizasyonda faydaları gösterilse de sağlıklı dokularda da etkileri olacağından hepatik, kardiyak ve oküler toksisiteleri de bildirilmiştir [332]. Bu sebeple HSP90 inhibisyonu için sadece tümör dokusunu hedefleyerek, etkin radyocerrahi doz ve fraksiyonasyonunu belirlemeyi amaçladık ancak çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır. IR'nin YAP/taz kompleksi üzerinden radyosensitizasyon sağladığını gösteren çalışmalar mevcuttur [285, 296, 333]. Özellikle hipofraksiyone radyocerrahinin YAP1 molekülünü etkileyerek radyasyona direnç gelişimini önleyebileceğini ve sağkalımı artıracaklarını öngördük ancak çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunamamıştır.

Gruplardaki denek sayısının az olması, immün yanıt ile bakılan moleküllerin sınırlı sayıda olması çalışmamızın zayıf yönleridir. Bir diğer kısıtlama ise sakrifiye edilen dokularda sonuçlara hemen bakılmaması ve her denek için ayrı bakılması yerine tüm grupların kendi içinde havuzlanarak sonuçların değerlendirilmesidir. Ek olarak immünmodülatör ilaçlar kullanarak karşılaştırma yapılmaması da çalışmanın diğer bir zayıf noktasıdır.

## 10.SONUÇ

Beyin metastazı modelinde radyocerrahin farklı doz ve fraksiyonasyonlarının, immün yanıt üzerine, sağkalıma etkisini inceledik; tedaviye direnç ile ilişkili olduğu bilinen HSP90 ve YAP1 hedefleyerek radyasyona direnç mekanizmalarının üstesinden gelmeyi amaçlayan etkin ve güvenilir tedavi şeması oluşturmayı amaçladık. Sağkalım üzerine radyocerrahinin etkinliğini göstermiş olsak da immün yanıtı değerlendirmek için baktığımız CCL4 ve IL-17A düzeylerinde ve radyasyona direnç mekanizmalarını değerlendirmek için baktığımız HSP90 ve YAP1 düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark tespit etmedik. Elde ettiğimiz sonuçların, bu alanda yapılacak gelecek çalışmalara ışık tutmasını umuyoruz.

## 11.KAYNAKLAR

- [1] **Fox BD, Cheung VJ, Patel AJ, Suki D, Rao G.** Epidemiology of metastatic brain tumors. *Neurosurg Clin N Am.* 2011;22(1):1-v. doi:10.1016/j.nec.2010.08.007
- [2] **Hatiboglu MA, Akdur K, Sawaya R.** Neurosurgical management of patients with brain metastasis. *Neurosurg Rev.* 2020;43(2):483-495. doi:10.1007/s10143-018-1013-6
- [3] **Gavrilovic IT, Posner JB.** Brain metastases: epidemiology and pathophysiology. *J Neurooncol.* 2005;75(1):5-14. doi:10.1007/s11060-004-8093-6.
- [4] **Gloeckler Ries LA, Reichman ME, Lewis DR, Hankey BF, Edwards BK.** Cancer survival and incidence from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program. *Oncologist.* 2003;8(6):541-552. doi:10.1634/theoncologist.8-6-541
- [5] **Sul, J., Posner, J.B.** (2007). Brain Metastases: Epidemiology and Pathophysiology. In: Raizer, J.J., Abrey, L.E. (eds) Brain Metastases. Cancer Treatment and Research, vol 136. Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-69222-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-0-387-69222-7_1)
- [6] **Patchell RA.** The management of brain metastases. *Cancer Treat Rev.* 2003;29(6):533-540. doi:10.1016/s0305-7372(03)00105-1
- [7] **Platta CS, Khuntia D, Mehta MP, Suh JH.** Current treatment strategies for brain metastasis and complications from therapeutic techniques: a review of current literature. *Am J Clin Oncol.* 2010;33(4):398-407. doi:10.1097/COC.0b013e318194f744
- [8] **Katano A, Yamashita H.** Brain metastasis: Recent treatment modalities and future-perspectives. *Oncol Lett.* 2022;23(6):191. doi:10.3892/ol.2022.13311
- [9] **Nayak L, Lee EQ, Wen PY.** Epidemiology of brain metastases. *Curr Oncol Rep.* 2012;14(1):48-54. doi:10.1007/s11912-011-0203-y
- [10] **D'Ambrosio AL, Agazzi S.** Prognosis in patients presenting with brain metastasis from an undiagnosed primary tumor. *Neurosurg Focus.* 2007;22(3):E7. Published 2007 Mar 15. doi:10.3171/foc.2007.22.3.8
- [11] **Brem S, Panatier JG.** An era of rapid advancement: diagnosis and treatment of metastatic brain cancer. *Neurosurgery.* 2005;57(5 Suppl):S5-S4. doi:10.1093/neurosurgery/57.suppl\_5.s4-5
- [12] **Becher MW, Abel TW, Thompson RC, Weaver KD, Davis LE.** Immunohistochemical analysis of metastatic neoplasms of the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006;65(10):935-944. doi:10.1097/01.jnen.0000235124.82805.2b
- [13] **Walker AE, Robins M, Weinfeld FD.** Epidemiology of brain tumors: the national survey of intracranial neoplasms. *Neurology.* 1985;35(2):219-226. doi:10.1212/wnl.35.2.219
- [14] **Tsao MN, Lloyd NS, Wong RK, et al.** Radiotherapeutic management of brain metastases: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev.* 2005;31(4):256-273. doi:10.1016/j.ctrv.2005.04.007
- [15] **Nathoo N, Chahlavi A, Barnett GH, Toms SA.** Pathobiology of brain metastases. *J Clin Pathol.* 2005;58(3):237-242. doi:10.1136/jcp.2003.013623

- [16] Ahluwalia M., Metellus P., Soffietti R. Springer 'Central Nervous System Metastases' 1st Edition, Springer Nature Switzerland AG 2020 ss: XIII, 421 <https://doi.org/10.1007/978-3-030-23417-1>
- [17] Berghoff AS, Schur S, Füreder LM, et al. Descriptive statistical analysis of a real life cohort of 2419 patients with brain metastases of solid cancers. *ESMO Open*. 2016;1(2):e000024. Published 2016 Mar 16. doi:10.1136/esmoopen-2015-000024
- [18] Cagney DN, Martin AM, Catalano PJ, et al. Incidence and prognosis of patients with brain metastases at diagnosis of systemic malignancy: a population-based study. *Neuro Oncol*. 2017;19(11):1511-1521. doi:10.1093/neuonc/nox077
- [19] Hall WA, Djalilian HR, Nussbaum ES, Cho KH. Long-term survival with metastatic cancer to the brain. *Med Oncol*. 2000;17(4):279-286. doi:10.1007/BF02782192
- [20] Suh YL, Koo H, Kim TS, et al. Tumors of the central nervous system in Korea: a multicenter study of 3221 cases. *J Neurooncol*. 2002;56(3):251-259. doi:10.1023/a:1015092501279
- [21] Wen PY, Loeffler JS. Brain metastases. *Curr Treat Options Oncol*. 2000;1(5):447-458. doi:10.1007/s11864-000-0072-3
- [22] Levy AS. Brain tumors in children: evaluation and management. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2005;35(6):230-245. doi:10.1016/j.cppeds.2005.04.001
- [23] Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL. Epidemiology of brain tumors. *Neurol Clin*. 2007;25(4):867-vii. doi:10.1016/j.ncl.2007.07.002
- [24] Kromer C, Xu J, Ostrom QT, et al. Estimating the annual frequency of synchronous brain metastasis in the United States 2010-2013: a population-based study. *J Neurooncol*. 2017;134(1):55-64. doi:10.1007/s11060-017-2516-7
- [25] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- [26] Chiang AC, Massagué J. Molecular basis of metastasis. *N Engl J Med*. 2008;359(26):2814-2823. doi:10.1056/NEJMra0805239
- [27] Kotecha R, Gondi V, Ahluwalia MS, Brastianos PK, Mehta MP. Recent advances in managing brain metastasis. *F1000Res*. 2018;7:F1000 Faculty Rev-1772. Published 2018 Nov 9. doi:10.12688/f1000research.15903.1
- [28] Valiente M, Ahluwalia MS, Boire A, et al. The Evolving Landscape of Brain Metastasis. *Trends Cancer*. 2018;4(3):176-196. doi:10.1016/j.trecan.2018.01.003
- [29] Hare AW: The surgical treatment of intracranial tumors. In Bramwell B (ed): *Intracranial Tumors*. Edinburgh, Young J. Pentland, 1888, pp. 254–264.
- [30] Eichler AF, Chung E, Kodack DP, Loeffler JS, Fukumura D, Jain RK. The biology of brain metastases-translation to new therapies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8(6):344-356. doi:10.1038/nrclinonc.2011.58
- [31] Ramakrishna R, Rostomily R. Seed, soil, and beyond: The basic biology of brain metastasis. *Surg Neurol Int*. 2013;4(Suppl 4):S256-S264. Published 2013 May 2. doi:10.4103/2152-7806.111303
- [32] Svokos KA, Salhia B, Toms SA. Molecular biology of brain metastasis. *Int J Mol Sci*. 2014;15(6):9519-9530. Published 2014 May 28. doi:10.3390/ijms15069519

- [33] **Rahmathulla G, Toms SA, Weil RJ.** The molecular biology of brain metastasis. *J Oncol.* 2012;2012:723541. doi:10.1155/2012/723541
- [34] **Hay ED.** An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel).* 1995;154(1):8-20. doi:10.1159/000147748
- [35] **Fares J, Fares M.Y, Khachfe H.H. et al.** Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Sig Transduct Target Ther* 5, 28 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>
- [36] **Lai X, Li Q, Wu F, et al.** Epithelial-Mesenchymal Transition and Metabolic Switching in Cancer: Lessons From Somatic Cell Reprogramming. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:760. Published 2020 Aug 6. doi:10.3389/fcell.2020.00760
- [37] **Yang J, Mani SA, Donaher JL, et al.** Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell.* 2004;117(7):927-939. doi:10.1016/j.cell.2004.06.006
- [38] **Pietras K, Ostman A.** Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res.* 2010;316(8):1324-1331. doi:10.1016/j.yexcr.2010.02.045
- [39] **Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL.** Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature.* 2004;432(7015):332-337. doi:10.1038/nature03096
- [40] **Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z.** Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2010;141(1):52-67. doi:10.1016/j.cell.2010.03.015
- [41] **Qian BZ, Pollard JW.** Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell.* 2010;141(1):39-51. doi:10.1016/j.cell.2010.03.014
- [42] **Hirohashi S, Kanai Y.** Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci.* 2003;94(7):575-581. doi:10.1111/j.1349-7006.2003.tb01485.x
- [43] **Jääliinojä J, Herva R, Korpela M, Höyhty M, Turpeenniemi-Hujanen T.** Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) immunoreactive protein is associated with poor grade and survival in brain neoplasms. *J Neurooncol.* 2000;46(1):81-90. doi:10.1023/a:1006421112839
- [44] **Stamenkovic I.** Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol.* 2003;200(4):448-464. doi:10.1002/path.1400
- [45] **Langley RR, Fidler IJ.** The biology of brain metastasis. *Clin Chem.* 2013;59(1):180-189. doi:10.1373/clinchem.2012.193342
- [46] **Bremnes RM, Veve R, Hirsch FR, Franklin WA.** The E-cadherin cell-cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis, and prognosis. *Lung Cancer.* 2002;36(2):115-124. doi:10.1016/s0169-5002(01)00471-8
- [47] **Yoshimasu T, Sakurai T, Oura S, et al.** Increased expression of integrin alpha3beta1 in highly brain metastatic subclone of a human non-small cell lung cancer cell line. *Cancer Sci.* 2004;95(2):142-148. doi:10.1111/j.1349-7006.2004.tb03195.x
- [48] **Marchetti D, Aucoin R, Blust J, Murry B, Greiter-Wilke A.** p75 neurotrophin receptor functions as a survival receptor in brain-metastatic melanoma cells. *J Cell Biochem.* 2004;91(1):206-215. doi:10.1002/jcb.10649
- [49] **Danø K, Behrendt N, Høyer-Hansen G, et al.** Plasminogen activation and cancer. *Thromb Haemost.* 2005;93(4):676-681. doi:10.1160/TH05-01-0054
- [50] **Khaitan D, Sankpal UT, Weksler B, et al.** Role of KCNMA1 gene in breast cancer invasion and metastasis to brain. *BMC Cancer.* 2009;9:258. Published 2009 Jul 29. doi:10.1186/1471-2407-9-258
- [51] **Lee JH, Welch DR.** Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. *Cancer Res.* 1997;57(12):2384-2387.

- [52] **Kumar S, Weaver VM.** Mechanics, malignancy, and metastasis: the force journey of a tumor cell. *Cancer Metastasis Rev.* 2009;28(1-2):113-127. doi:10.1007/s10555-008-9173-4
- [53] **Göksu E ve Kazan S:** Metastazların Moleküler Mekanizmaları Türk Nöroşir Derg 27(2):137-142, 2017
- [54] **Huysentruyt LC, Mukherjee P, Banerjee D, Shelton LM, Seyfried TN.** Metastatic cancer cells with macrophage properties: evidence from a new murine tumor model. *Int J Cancer.* 2008;123(1):73-84. doi:10.1002/ijc.23492.
- [55] **Nguyen DX, Bos PD, Massagué J.** Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(4):274-284. doi:10.1038/nrc2622
- [56] **Dasgupta A, Lim AR, Ghajar CM.** Circulating and disseminated tumor cells: harbingers or initiators of metastasis?. *Mol Oncol.* 2017;11(1):40-61. doi:10.1002/1878-0261.12022
- [57] **Joose SA, Gorges TM, Pantel K.** Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol Med.* 2015;7(1):1-11. doi:10.15252/emmm.201303698
- [58] **Hanssen A, Riebensahm C, Mohme M, et al.** Frequency of Circulating Tumor Cells (CTC) in Patients with Brain Metastases: Implications as a Risk Assessment Marker in Oligo-Metastatic Disease. *Cancers (Basel).* 2018;10(12):527. Published 2018 Dec 19. doi:10.3390/cancers10120527
- [59] **Boral D, Vishnoi M, Liu HN, et al.** Molecular characterization of breast cancer CTCs associated with brain metastasis. *Nat Commun.* 2017;8(1):196. Published 2017 Aug 4. doi:10.1038/s41467-017-00196-1
- [60] **Liu Y, Cao X.** Organotropic metastasis: role of tumor exosomes. *Cell Res.* 2016;26(2):149-150. doi:10.1038/cr.2015.153
- [61] **Shankar GM, Balaj L, Stott SL, Nahed B, Carter BS.** Liquid biopsy for brain tumors. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017;17(10):943-947. doi:10.1080/14737159.2017.1374854
- [62] **Kuroda H, Tachikawa M, Yagi Y, et al.** Cluster of Differentiation 46 Is the Major Receptor in Human Blood-Brain Barrier Endothelial Cells for Uptake of Exosomes Derived from Brain-Metastatic Melanoma Cells (SK-Mel-28). *Mol Pharm.* 2019;16(1):292-304. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.8b00985
- [63] **Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al.** Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med.* 2014;6(224):224ra24. doi:10.1126/scitranslmed.3007094
- [64] **Boire A, Brandsma D, Brastianos PK, et al.** Liquid biopsy in central nervous system metastases: a RANO review and proposals for clinical applications. *Neuro Oncol.* 2019;21(5):571-584. doi:10.1093/neuonc/noz012
- [65] **Martín B, Aragüés R, Sanz R, et al.** Biological pathways contributing to organ-specific phenotype of brain metastatic cells. *J Proteome Res.* 2008;7(3):908-920. doi:10.1021/pr070426d
- [66] **Salmaggi A, Maderna E, Calatuzzolo C, et al.** CXCL12, CXCR4 and CXCR7 expression in brain metastases. *Cancer Biol Ther.* 2009;8(17):1608-1614. doi:10.4161/cbt.8.17.9202
- [67] **Carbonell WS, Ansorge O, Sibson N, Muschel R.** The vascular basement membrane as "soil" in brain metastasis. *PLoS One.* 2009;4(6):e5857. Published 2009 Jun 10. doi:10.1371/journal.pone.0005857
- [68] **Harabin-Słowińska M, Słowiński J, Konecki J, Mrówka R.** Expression of adhesion molecule CD44 in metastatic brain tumors. *Folia Neuropathol.* 1998;36(3):179-184.

- [69] **Tamura M, Gu J, Takino T, Yamada KM.** Tumor suppressor PTEN inhibition of cell invasion, migration, and growth: differential involvement of focal adhesion kinase and p130Cas. *Cancer Res.* 1999;59(2):442-449.
- [70] **Neuwelt EA.** Mechanisms of disease: the blood-brain barrier. *Neurosurgery.* 2004;54(1):131-142. doi:10.1227/01.neu.0000097715.11966.8e
- [71] **Beasley KD, Toms SA.** The molecular pathobiology of metastasis to the brain: a review. *Neurosurg Clin N Am.* 2011;22(1):7-v. doi:10.1016/j.nec.2010.08.009
- [72] **Bos PD, Zhang XH, Nadal C, et al.** Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature.* 2009;459(7249):1005-1009. doi:10.1038/nature08021
- [73] **Carmeliet P, Jain RK.** Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 2011;473(7347):298-307. doi:10.1038/nature10144
- [74] **Liu Y, El-Naggar S, Darling DS, Higashi Y, Dean DC.** Zeb1 links epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence. *Development.* 2008;135(3):579-588. doi:10.1242/dev.007047
- [75] **Wrage M, Ruosaari S, Eijk PP, et al.** Genomic profiles associated with early micrometastasis in lung cancer: relevance of 4q deletion. *Clin Cancer Res.* 2009;15(5):1566-1574. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2188
- [76] **Grinberg-Rashi H, Ofek E, Perelman M, et al.** The expression of three genes in primary non-small cell lung cancer is associated with metastatic spread to the brain. *Clin Cancer Res.* 2009;15(5):1755-1761. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2124
- [77] **Micalizzi DS, Christensen KL, Jedlicka P, et al.** The Six1 homeoprotein induces human mammary carcinoma cells to undergo epithelial-mesenchymal transition and metastasis in mice through increasing TGF-beta signaling. *J Clin Invest.* 2009;119(9):2678-2690. doi:10.1172/JCI37815
- [78] **Potchen EJ, Schonbein WR, Harris GI.** Radiologic approaches to the diagnosis of cerebral metastasis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1977;2(1-2):173-178. doi:10.1016/0360-3016(77)90026-8
- [79] **Patchell RA, Tibbs PA, Walsh JW, et al.** A randomized trial of surgery in the treatment of single metastases to the brain. *N Engl J Med.* 1990;322(8):494-500. doi:10.1056/NEJM19900223220802
- [80] **Patel TR, McHugh BJ, Bi WL, Minja FJ, Knisely JP, Chiang VL.** A comprehensive review of MR imaging changes following radiosurgery to 500 brain metastases. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2011;32(10):1885-1892. doi:10.3174/ajnr.A2668
- [81] **Mills SJ, Thompson G, Jackson A.** Advanced magnetic resonance imaging biomarkers of cerebral metastases. *Cancer Imaging.* 2012;12(1):245-252. Published 2012 Aug 10. doi:10.1102/1470-7330.2012.0012
- [82] **Brekenfeld C, Foert E, Hundt W, Kenn W, Lodeann KP, Gehl HB.** Enhancement of cerebral diseases: how much contrast agent is enough? Comparison of 0.1, 0.2, and 0.3 mmol/kg gadoteridol at 0.2 T with 0.1 mmol/kg gadoteridol at 1.5 T. *Invest Radiol.* 2001;36(5):266-275. doi:10.1097/00004424-200105000-00004
- [83] **Hakyemez B, Erdogan C, Gokalp G, Dusak A, Parlak M.** Solitary metastases and high-grade gliomas: radiological differentiation by morphometric analysis and perfusion-weighted MRI. *Clin Radiol.* 2010;65(1):15-20. doi:10.1016/j.crad.2009.09.005
- [84] **Young RJ, Sills AK, Brem S, Knopp EA.** Neuroimaging of metastatic brain disease. *Neurosurgery.* 2005;57(5 Suppl):S10-S4. doi:10.1227/01.neu.0000182774.54193.37

- [85] **Davis PC, Hudgins PA, Peterman SB, Hoffman JC Jr.** Diagnosis of cerebral metastases: double-dose delayed CT vs contrast-enhanced MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1991;12(2):293-300.
- [86] **Winking M, Wildförster U.** Computer tomographic assessment of perifocal edema surrounding tumors of the cerebral cortex. *Neurosurg Rev.* 1989;12(1):55-58. doi:10.1007/BF01787130
- [87] **Chiang IC, Hsieh TJ, Chiu ML, Liu GC, Kuo YT, Lin WC.** Distinction between pyogenic brain abscess and necrotic brain tumour using 3-tesla MR spectroscopy, diffusion and perfusion imaging. *Br J Radiol.* 2009;82(982):813-820. doi:10.1259/bjr/90100265
- [88] **Server A, Kulle B, Maehlen J, et al.** Quantitative apparent diffusion coefficients in the characterization of brain tumors and associated peritumoral edema. *Acta Radiol.* 2009;50(6):682-689. doi:10.1080/02841850902933123
- [89] **Smirniotopoulos JG, Murphy FM, Rushing EJ, Rees JH, Schroeder JW.** Patterns of contrast enhancement in the brain and meninges. *Radiographics.* 2007;27(2):525-551. doi:10.1148/rg.272065155
- [90] **Tang YM, Ngai S, Stuckey S.** The solitary enhancing cerebral lesion: can FLAIR aid the differentiation between glioma and metastasis?. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2006;27(3):609-611..
- [91] **Tsougos I, Svolos P, Kousi E, et al.** Differentiation of glioblastoma multiforme from metastatic brain tumor using proton magnetic resonance spectroscopy, diffusion and perfusion metrics at 3 T. *Cancer Imaging.* 2012;12(3):423-436. Published 2012 Oct 26. doi:10.1102/1470-7330.2012.0038
- [92] **Young GS, Setayesh K.** Spin-echo echo-planar perfusion MR imaging in the differential diagnosis of solitary enhancing brain lesions: distinguishing solitary metastases from primary glioma. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2009;30(3):575-577. doi:10.3174/ajnr.A1239
- [93] **Bulakbasi N, Kocaoglu M, Farzaliyev A, Tayfun C, Ucoz T, Somuncu I.** Assessment of diagnostic accuracy of perfusion MR imaging in primary and metastatic solitary malignant brain tumors. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2005;26(9):2187-2199.
- [94] **Gupta RK, Jobanputra KJ, Yadav A.** MR spectroscopy in brain infections. *Neuroimaging Clin N Am.* 2013;23(3):475-498. doi:10.1016/j.nic.2013.03.004
- [95] **Server A, Josefsen R, Kulle B, et al.** Proton magnetic resonance spectroscopy in the distinction of high-grade cerebral gliomas from single metastatic brain tumors. *Acta Radiol.* 2010;51(3):316-325. doi:10.3109/02841850903482901
- [96] **Floriano VH, Torres US, Spotti AR, Ferraz-Filho JR, Tognola WA.** The role of dynamic susceptibility contrast-enhanced perfusion MR imaging in differentiating between infectious and neoplastic focal brain lesions: results from a cohort of 100 consecutive patients. *PLoS One.* 2013;8(12):e81509. Published 2013 Dec 6. doi:10.1371/journal.pone.0081509
- [97] **Kamp MA, Rapp M, Bühner J, et al.** Early postoperative magnet resonance tomography after resection of cerebral metastases. *Acta Neurochir (Wien).* 2015;157(9):1573-1580. doi:10.1007/s00701-015-2479-4
- [98] **Zhuang H, Zheng Y, Wang J, et al.** Analysis of risk and predictors of brain radiation necrosis after radiosurgery. *Oncotarget.* 2016;7(7):7773-7779. doi:10.18632/oncotarget.6532
- [99] **Pollock BE, Lunsford LD.** A call to define stereotactic radiosurgery. *Neurosurgery.* 2004;55(6):1371-1373. doi:10.1227/01.neu.0000143613.13759.d4

- [100] Mehrabian H, Desmond KL, Chavez S, et al. Water Exchange Rate Constant as a Biomarker of Treatment Efficacy in Patients With Brain Metastases Undergoing Stereotactic Radiosurgery. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2017;98(1):47-55. doi:10.1016/j.ijrobp.2017.01.016
- [101] Giglio P, Gilbert MR. Cerebral radiation necrosis. *Neurologist*. 2003;9(4):180-188. doi:10.1097/01.nrl.0000080951.78533.c4
- [102] Rogers LR. Neurologic complications of radiation. *Continuum (Minneapolis)*. 2012;18(2):343-354. doi:10.1212/01.CON.0000413662.35174.a8
- [103] Rogers LR, Gutierrez J, Scarpace L, et al. Morphologic magnetic resonance imaging features of therapy-induced cerebral necrosis. *J Neurooncol*. 2011;101(1):25-32. doi:10.1007/s11060-010-0222-9
- [104] Zach L, Guez D, Last D, et al. Delayed contrast extravasation MRI for depicting tumor and non-tumoral tissues in primary and metastatic brain tumors. *PLoS One*. 2012;7(12):e52008. doi:10.1371/journal.pone.0052008
- [105] Minniti G, Clarke E, Lanzetta G, et al. Stereotactic radiosurgery for brain metastases: analysis of outcome and risk of brain radionecrosis. *Radiat Oncol*. 2011;6:48. Published 2011 May 15. doi:10.1186/1748-717X-6-48
- [106] Lawrence YR, Li XA, el Naqa I, et al. Radiation dose-volume effects in the brain. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010;76(3 Suppl):S20-S27. doi:10.1016/j.ijrobp.2009.02.091
- [107] Sneed PK, Mendez J, Vemer-van den Hoek JG, et al. Adverse radiation effect after stereotactic radiosurgery for brain metastases: incidence, time course, and risk factors. *J Neurosurg*. 2015;123(2):373-386. doi:10.3171/2014.10.JNS141610
- [108] Shaw E, Scott C, Souhami L, et al. Single dose radiosurgical treatment of recurrent previously irradiated primary brain tumors and brain metastases: final report of RTOG protocol 90-05. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2000;47(2):291-298. doi:10.1016/s0360-3016(99)00507-6
- [109] Lupattelli M, Ali E, Ingrosso G, et al. Stereotactic Radiotherapy for Brain Metastases: Imaging Tools and Dosimetric Predictive Factors for Radionecrosis. *J Pers Med*. 2020;10(3):59. Published 2020 Jul 4. doi:10.3390/jpm10030059
- [110] Ernst-Stecken A, Ganslandt O, Lambrecht U, Sauer R, Grabenbauer G. Phase II trial of hypofractionated stereotactic radiotherapy for brain metastases: results and toxicity. *Radiother Oncol*. 2006;81(1):18-24. doi:10.1016/j.radonc.2006.08.024
- [111] Emami B, Lyman J, Brown A, et al. Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1991;21(1):109-122. doi:10.1016/0360-3016(91)90171-y
- [112] Ojerholm E, Lee JY, Thawani JP, et al. Stereotactic radiosurgery to the resection bed for intracranial metastases and risk of leptomeningeal carcinomatosis. *J Neurosurg*. 2014;121 Suppl:75-83. doi:10.3171/2014.6.GKS14708
- [113] Eaton BR, Gebhardt B, Prabhu R, Shu HK, Curran WJ Jr, Crocker I. Hypofractionated radiosurgery for intact or resected brain metastases: defining the optimal dose and fractionation. *Radiat Oncol*. 2013;8:135. Published 2013 Jun 7. doi:10.1186/1748-717X-8-135
- [114] Eaton BR, LaRiviere MJ, Kim S, et al. Hypofractionated radiosurgery has a better safety profile than single fraction radiosurgery for large resected brain metastases [published correction appears in J Neurooncol. 2015

- May;123(1):113. La Riviere, Michael J [corrected to LaRiviere, Michael JJ]. *J Neurooncol.* 2015;123(1):103-111. doi:10.1007/s11060-015-1767-4
- [115] **Lin X, DeAngelis LM.** Treatment of Brain Metastases. *J Clin Oncol.* 2015;33(30):3475-3484. doi:10.1200/JCO.2015.60.9503
- [116] **Ewend MG, Elbabaa S, Carey LA.** Current treatment paradigms for the management of patients with brain metastases. *Neurosurgery.* 2005;57(5 Suppl):S66-S4. doi:10.1227/01.neu.0000182739.84734.6e
- [117] **Suh JH, Kotecha R, Chao ST, Ahluwalia MS, Sahgal A, Chang EL.** Current approaches to the management of brain metastases. *Nat Rev Clin Oncol.* 2020;17(5):279-299. doi:10.1038/s41571-019-0320-3
- [118] **Taylor LP.** Mechanism of brain tumor headache. *Headache.* 2014;54(4):772-775. doi:10.1111/head.12317
- [119] **Powell C, Guerrero D, Sardell S, et al.** Somnolence syndrome in patients receiving radical radiotherapy for primary brain tumours: a prospective study. *Radiother Oncol.* 2011;100(1):131-136. doi:10.1016/j.radonc.2011.06.028
- [120] **Pojksic M, Bopp MHA, Schymalla M, Nimsky C, Carl B.** Retrospective study of 229 surgically treated patients with brain metastases: Prognostic factors, outcome and comparison of recursive partitioning analysis and diagnosis-specific graded prognostic assessment. *Surg Neurol Int.* 2017;8:259. Published 2017 Oct 24. doi:10.4103/sni.sni\_228\_17
- [121] **Wu A, Weingart JD, Gallia GL, et al.** Risk Factors for Preoperative Seizures and Loss of Seizure Control in Patients Undergoing Surgery for Metastatic Brain Tumors. *World Neurosurg.* 2017;104:120-128. doi:10.1016/j.wneu.2017.05.028
- [122] **Joiner EF, Youngerman BE, Hudson TS, et al.** Effectiveness of perioperative antiepileptic drug prophylaxis for early and late seizures following oncologic neurosurgery: a meta-analysis [published online ahead of print, 2018 Apr 1]. *J Neurosurg.* 2018;1-9. doi:10.3171/2017.10.JNS172236
- [123] **He W, Chen F, Dalm B, Kirby PA, Greenlee JD.** Metastatic involvement of the pituitary gland: a systematic review with pooled individual patient data analysis. *Pituitary.* 2015;18(1):159-168. doi:10.1007/s11102-014-0552-2
- [124] **Mittica G, Senetta R, Richiardi L, et al.** Meningeal carcinomatosis underdiagnosis and overestimation: incidence in a large consecutive and unselected population of breast cancer patients. *BMC Cancer.* 2015;15:1021. Published 2015 Dec 29. doi:10.1186/s12885-015-2042-y1
- [125] **Mendez JS, DeAngelis LM.** Metastatic Complications of Cancer Involving the Central and Peripheral Nervous Systems. *Neurol Clin.* 2018;36(3):579-598. doi:10.1016/j.ncl.2018.04.011
- [126] **Nayar G, Ejikeme T, Chongsathidkiet P, et al.** Leptomeningeal disease: current diagnostic and therapeutic strategies. *Oncotarget.* 2017;8(42):73312-73328. Published 2017 Aug 16. doi:10.18632/oncotarget.20272
- [127] **Tuma R, DeAngelis LM.** Altered mental status in patients with cancer. *Arch Neurol.* 2000;57(12):1727-1731. doi:10.1001/archneur.57.12.1727
- [128] **Bruno MK, Raizer J.** Leptomeningeal metastases from solid tumors (meningeal carcinomatosis). *Cancer Treat Res.* 2005;125:31-52. doi:10.1007/0-387-24199-x\_3
- [129] **Patel KR, Burri SH, Asher AL, et al.** Comparing Preoperative With Postoperative Stereotactic Radiosurgery for Resectable Brain Metastases: A Multi-institutional Analysis. *Neurosurgery.* 2016;79(2):279-285. doi:10.1227/NEU.0000000000001096

- [130] **Sills AK.** Current treatment approaches to surgery for brain metastases. *Neurosurgery.* 2005;57(5 Suppl):S24-S4. doi:10.1227/01.neu.0000182763.16246.60
- [131] **Farris M, McTyre ER, Cramer CK,** et al. Brain Metastasis Velocity: A Novel Prognostic Metric Predictive of Overall Survival and Freedom From Whole-Brain Radiation Therapy After Distant Brain Failure Following Upfront Radiosurgery Alone. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2017;98(1):131-141. doi:10.1016/j.ijrobp.2017.01.201
- [132] **Moravan MJ, Fecci PE, Anders CK,** et al. Current multidisciplinary management of brain metastases. *Cancer.* 2020;126(7):1390-1406. doi:10.1002/cncr.32714
- [133] **van den Bent MJ.** The role of chemotherapy in brain metastases. *Eur J Cancer.* 2003;39(15):2114-2120. doi:10.1016/s0959-8049(03)00577-x
- [134] **Cavaliere R, Schiff D.** Chemotherapy and cerebral metastases: misperception or reality?. *Neurosurg Focus.* 2007;22(3):E6. Published 2007 Mar 15. doi:10.3171/foc.2007.22.3.7
- [135] **Nahed BV, Alvarez-Breckenridge C, Brastianos PK,** et al. Congress of Neurological Surgeons Systematic Review and Evidence-Based Guidelines on the Role of Surgery in the Management of Adults With Metastatic Brain Tumors. *Neurosurgery.* 2019;84(3):E152-E155. doi:10.1093/neuros/nyy542
- [136] **Gaspar LE, Mehta MP, Patchell RA,** et al. The role of whole brain radiation therapy in the management of newly diagnosed brain metastases: a systematic review and evidence-based clinical practice guideline. *J Neurooncol.* 2010;96(1):17-32. doi:10.1007/s11060-009-0060-9
- [137] **Fuentes R, Osorio D, Expósito Hernandez J, Simancas-Racines D, Martinez-Zapata MJ, Bonfill Cosp X.** Surgery versus stereotactic radiotherapy for people with single or solitary brain metastasis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018;8(8):CD012086. Published 2018 Aug 20. doi:10.1002/14651858.CD012086.pub2
- [138] **Hasegawa T, Kondziolka D, Flickinger JC, Germanwala A, Lunsford LD.** Brain metastases treated with radiosurgery alone: an alternative to whole brain radiotherapy?. *Neurosurgery.* 2003;52(6):1318-1326. doi:10.1227/01.neu.0000064569.18914.de
- [139] **Lippitz B, Lindquist C, Paddick I, Peterson D, O'Neill K, Beaney R.** Stereotactic radiosurgery in the treatment of brain metastases: the current evidence. *Cancer Treat Rev.* 2014;40(1):48-59. doi:10.1016/j.ctrv.2013.05.002
- [140] **Tsao MN, Lloyd N, Wong RK,** et al. Whole brain radiotherapy for the treatment of newly diagnosed multiple brain metastases. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;2012(4):CD003869. Published 2012 Apr 18. doi:10.1002/14651858.CD003869.pub3
- [141] **Jemal A, Tiwari RC, Murray T,** et al. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin.* 2004;54(1):8-29. doi:10.3322/canjclin.54.1.8
- [142] **Hunter GK, Suh JH, Reuther AM,** et al. Treatment of five or more brain metastases with stereotactic radiosurgery. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012;83(5):1394-1398. doi:10.1016/j.ijrobp.2011.10.026
- [143] **Mehta MP, Tsao MN, Whelan TJ,** et al. The American Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ASTRO) evidence-based review of the role of radiosurgery for brain metastases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005;63(1):37-46. doi:10.1016/j.ijrobp.2005.05.023

- [144] **Macdonald DR, Cascino TL, Schold SC Jr, Cairncross JG.** Response criteria for phase II studies of supratentorial malignant glioma. *J Clin Oncol.* 1990;8(7):1277-1280. doi:10.1200/JCO.1990.8.7.1277
- [145] **Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al.** New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer.* 2009;45(2):228-247. doi:10.1016/j.ejca.2008.10.026
- [146] **Chukwueke UN, Wen PY.** Use of the Response Assessment in Neuro-Oncology (RANO) criteria in clinical trials and clinical practice. *CNS Oncol.* 2019;8(1):CNS28. doi:10.2217/cns-2018-0007
- [147] **Lagerwaard FJ, Levendag PC, Nowak PJ, Eijkenboom WM, Hanssens PE, Schmitz PI.** Identification of prognostic factors in patients with brain metastases: a review of 1292 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1999;43(4):795-803. doi:10.1016/s0360-3016(98)00442-8
- [148] **Gaspar L, Scott C, Rotman M, et al.** Recursive partitioning analysis (RPA) of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) brain metastases trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1997;37(4):745-751. doi:10.1016/s0360-3016(96)00619-0
- [149] **Weltman E, Salvajoli JV, Brandt RA, et al.** Radiosurgery for brain metastases: a score index for predicting prognosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000;46(5):1155-1161. doi:10.1016/s0360-3016(99)00549-0
- [150] **Sperduto PW, Chao ST, Sneed PK, et al.** Diagnosis-specific prognostic factors, indexes, and treatment outcomes for patients with newly diagnosed brain metastases: a multi-institutional analysis of 4,259 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010;77(3):655-661. doi:10.1016/j.ijrobp.2009.08.025
- [151] **Péus D, Newcomb N, Hofer S.** Appraisal of the Karnofsky Performance Status and proposal of a simple algorithmic system for its evaluation. *BMC Med Inform Decis Mak.* 2013;13:72. Published 2013 Jul 19. doi:10.1186/1472-6947-13-72
- [152] **Mould RF.** The early history of x-ray diagnosis with emphasis on the contributions of physics 1895-1915. *Phys Med Biol.* 1995;40(11):1741-1787. doi:10.1088/0031-9155/40/11/001
- [153] **Formenti SC, Demaria S.** Systemic effects of local radiotherapy. *Lancet Oncol.* 2009;10(7):718-726. doi:10.1016/S1470-2045(09)70082-8
- [154] **Barazzuol L, Coppes RP, van Luijk P.** Prevention and treatment of radiotherapy-induced side effects. *Mol Oncol.* 2020;14(7):1538-1554. doi:10.1002/1878-0261.12750
- [155] **Riesz PB.** The life of Wilhelm Conrad Roentgen. *AJR Am J Roentgenol.* 1995;165(6):1533-1537. doi:10.2214/ajr.165.6.7484601
- [156] **Widder J.** The origins of radiotherapy: discovery of biological effects of X-rays by Freund in 1897, Kienböck's crucial experiments in 1900, and still it is the dose. *Radiother Oncol.* 2014;112(1):150-152. doi:10.1016/j.radonc.2014.06.010
- [157] **Rodemann HP, Wouters BG.** Molecular and translational radiation biology/oncology: what's up?. *Radiother Oncol.* 2011;99(3):257-261. doi:10.1016/j.radonc.2011.06.033
- [158] **Kogelnik HD.** Inauguration of radiotherapy as a new scientific speciality by Leopold Freund 100 years ago. *Radiother Oncol.* 1997;42(3):203-211. doi:10.1016/s0167-8140(96)01887-7
- [159] **Walker JS.** The controversy over radiation safety. A historical overview. *JAMA.* 1989;262(5):664-668.

- [160] **Leksell DG.** Stereotactic radiosurgery. Present status and future trends. *Neurol Res.* 1987;9(2):60-68. doi:10.1080/01616412.1987.11739775
- [161] **Trifiletti DM, Ruiz-Garcia H, Quinones-Hinojosa A, Ramakrishna R, Sheehan JP.** The evolution of stereotactic radiosurgery in neurosurgical practice. *J Neurooncol.* 2021;151(3):451-459. doi:10.1007/s11060-020-03392-0
- [162] **Kocher M, Wittig A, Piroth MD, et al.** Stereotactic radiosurgery for treatment of brain metastases. A report of the DEGRO Working Group on Stereotactic Radiotherapy. *Strahlenther Onkol.* 2014;190(6):521-532. doi:10.1007/s00066-014-0648-7
- [163] **Boehling, N.S., Chang, E.L., Ma, L. et al.** Stereotactic radiosurgery for brain metastases: current status and future directions. *J Radiat Oncol* 1, 245–253 (2012). <https://doi.org/10.1007/s13566-012-0043-x>
- [164] **Mantovani C, Gastino A, Cerrato M, Badellino S, Ricardi U, Levis M.** Modern Radiation Therapy for the Management of Brain Metastases From Non-Small Cell Lung Cancer: Current Approaches and Future Directions. *Front Oncol.* 2021;11:772789. Published 2021 Nov 2. doi:10.3389/fonc.2021.772789
- [165] **Hatiboglu MA, Tuzgen S, Akdur K, Chang EL.** Treatment of high numbers of brain metastases with Gamma Knife radiosurgery: a review. *Acta Neurochir (Wien).* 2016;158(4):625-634. doi:10.1007/s00701-016-2707-6
- [166] **Johnson BE, Grayson J, Makuch RW, et al.** Ten-year survival of patients with small-cell lung cancer treated with combination chemotherapy with or without irradiation. *J Clin Oncol.* 1990;8(3):396-401. doi:10.1200/JCO.1990.8.3.396
- [167] **Jeene PM, de Vries KC, van Nes JGH, et al.** Survival after whole brain radiotherapy for brain metastases from lung cancer and breast cancer is poor in 6325 Dutch patients treated between 2000 and 2014. *Acta Oncol.* 2018;57(5):637-643. doi:10.1080/0284186X.2017.1418534
- [168] **Aoyama H, Shirato H, Tago M, et al.** Stereotactic radiosurgery plus whole-brain radiation therapy vs stereotactic radiosurgery alone for treatment of brain metastases: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2006;295(21):2483-2491. doi:10.1001/jama.295.21.2483
- [169] **Brown PD, Jaeckle K, Ballman KV, et al.** Effect of Radiosurgery Alone vs Radiosurgery With Whole Brain Radiation Therapy on Cognitive Function in Patients With 1 to 3 Brain Metastases: A Randomized Clinical Trial [published correction appears in *JAMA.* 2018 Aug 7;320(5):510]. *JAMA.* 2016;316(4):401-409. doi:10.1001/jama.2016.9839
- [170] **Patchell RA, Tibbs PA, Regine WF, et al.** Postoperative radiotherapy in the treatment of single metastases to the brain: a randomized trial. *JAMA.* 1998;280(17):1485-1489. doi:10.1001/jama.280.17.1485
- [171] **Aoyama H, Tago M, Kato N, et al.** Neurocognitive function of patients with brain metastasis who received either whole brain radiotherapy plus stereotactic radiosurgery or radiosurgery alone. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007;68(5):1388-1395. doi:10.1016/j.ijrobp.2007.03.048
- [172] **Brown PD, Pugh S, Laack NN, et al.** Memantine for the prevention of cognitive dysfunction in patients receiving whole-brain radiotherapy: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neuro Oncol.* 2013;15(10):1429-1437. doi:10.1093/neuonc/not114
- [173] **Gondi V, Pugh SL, Tome WA, et al.** Preservation of memory with conformal avoidance of the hippocampal neural stem-cell compartment during whole-brain

- radiotherapy for brain metastases (RTOG 0933): a phase II multi-institutional trial. *J Clin Oncol*. 2014;32(34):3810-3816. doi:10.1200/JCO.2014.57.2909
- [174] **Specht HM, Combs SE.** Stereotactic radiosurgery of brain metastases. *J Neurosurg Sci*. 2016;60(3):357-366.
- [175] **Yamamoto M, Serizawa T, Shuto T, et al.** Stereotactic radiosurgery for patients with multiple brain metastases (JLGK0901): a multi-institutional prospective observational study. *Lancet Oncol*. 2014;15(4):387-395. doi:10.1016/S1470-2045(14)70061-0
- [176] **Badellino S, Levis M, Cuffini EM, et al.** Role of Radiosurgery and Stereotactic Ablative Radiotherapy for Oligometastatic Non-Oncogene Addicted NSCLC. *Cancers (Basel)*. 2022;14(6):1465. Published 2022 Mar 12. doi:10.3390/cancers14061465
- [177] **Hatiboglu MA, Akdur K.** Evaluating Critical Brain Radiation Doses in the Treatment of Multiple Brain Lesions with Gamma Knife Radiosurgery. *Stereotact Funct Neurosurg*. 2017;95(4):268-278. doi:10.1159/000478272
- [178] **Loo M, Pin Y, Thierry A, Clavier JB.** Single-fraction radiosurgery versus fractionated stereotactic radiotherapy in patients with brain metastases: a comparative study. *Clin Exp Metastasis*. 2020;37(3):425-434. doi:10.1007/s10585-020-10031-5
- [179] **Goethe EA, Rao G, Harvey A, et al.** Temporal Change in Tumor Volume Following Stereotactic Radiosurgery to a Single Brain Metastasis. *World Neurosurg*. 2020;136:e328-e333. doi:10.1016/j.wneu.2019.12.168
- [180] **McDermott MW, Sneed PK.** Radiosurgery in metastatic brain cancer. *Neurosurgery*. 2005;57(5 Suppl):S45-S4. doi:10.1227/01.neu.0000182741.82422.14
- [181] **Chon H, Yoon K, Lee D, Kwon DH, Cho YH.** Single-fraction versus hypofractionated stereotactic radiosurgery for medium-sized brain metastases of 2.5 to 3 cm. *J Neurooncol*. 2019;145(1):49-56. doi:10.1007/s11060-019-03265-1
- [182] **Bush A, Vallow L, Ruiz-Garcia H, et al.** Mask-based immobilization in Gamma Knife stereotactic radiosurgery. *J Clin Neurosci*. 2021;83:37-42. doi:10.1016/j.jocn.2020.11.033
- [183] **Wiggenraad R, Verbeek-de Kanter A, Kal HB, Taphoorn M, Vissers T, Struikmans H.** Dose-effect relation in stereotactic radiotherapy for brain metastases. A systematic review. *Radiother Oncol*. 2011;98(3):292-297. doi:10.1016/j.radonc.2011.01.011
- [184] **Halasz LM, Rockhill JK.** Stereotactic radiosurgery and stereotactic radiotherapy for brain metastases. *Surg Neurol Int*. 2013;4(Suppl 4):S185-S191. Published 2013 May 2. doi:10.4103/2152-7806.111295
- [185] **Soffiatti R, Rudà R, Trevisan E.** Brain metastases: current management and new developments. *Curr Opin Oncol*. 2008;20(6):676-684. doi:10.1097/CCO.0b013e32831186fe
- [186] **Kalkanis SN, Kondziolka D, Gaspar LE, et al.** The role of surgical resection in the management of newly diagnosed brain metastases: a systematic review and evidence-based clinical practice guideline. *J Neurooncol*. 2010;96(1):33-43. doi:10.1007/s11060-009-0061-8
- [187] **Sagawa T, Ohira S, Ueda Y, et al.** Dosimetric effect of rotational setup errors in stereotactic radiosurgery with HyperArc for single and multiple brain metastases. *J Appl Clin Med Phys*. 2019;20(10):84-91. doi:10.1002/acm2.12716

- [188] **Andrews DW, Scott CB, Sperduto PW, et al.** Whole brain radiation therapy with or without stereotactic radiosurgery boost for patients with one to three brain metastases: phase III results of the RTOG 9508 randomised trial. *Lancet*. 2004;363(9422):1665-1672. doi:10.1016/S0140-6736(04)16250-8
- [189] **Kondziolka D, Patel A, Lunsford LD, Kassam A, Flickinger JC.** Stereotactic radiosurgery plus whole brain radiotherapy versus radiotherapy alone for patients with multiple brain metastases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1999;45(2):427-434. doi:10.1016/s0360-3016(99)00198-4
- [190] **Wang LG, Guo Y, Zhang X, et al.** Brain metastasis: experience of the Xi-Jing hospital. *Stereotact Funct Neurosurg*. 2002;78(2):70-83. doi:10.1159/000068015
- [191] **Levitt MR, Levitt R, Silbergeld DL.** Controversies in the management of brain metastases. *Surg Neurol Int*. 2013;4(Suppl 4):S231-S235. Published 2013 May 2. doi:10.4103/2152-7806.111300
- [192] **Chao ST, Barnett GH, Vogelbaum MA, et al.** Salvage stereotactic radiosurgery effectively treats recurrences from whole-brain radiation therapy. *Cancer*. 2008;113(8):2198-2204. doi:10.1002/cncr.23821
- [193] **Yomo S, Hayashi M.** The efficacy and limitations of stereotactic radiosurgery as a salvage treatment after failed whole brain radiotherapy for brain metastases. *J Neurooncol*. 2013;113(3):459-465. doi:10.1007/s11060-013-1138-y
- [194] **Chen CC, Chapman P, Petit J, Loeffler J.** Proton radiosurgery in neurosurgery. *Neurosurg Focus*. 2007;23(6):E5. doi:10.3171/FOC-07/12/E5
- [195] **Ayadi M, Ginestet C, Gassa F, Claude L, Mazeron JJ.** Radiothérapie stéréotaxique par accélérateurs adaptés ou dédiés [Linac-based stereotactic radiosurgery and radiotherapy]. *Bull Cancer*. 2010;97(7):791-806. doi:10.1684/bdc.2010.1144
- [196] **Heron DE, Mintz A.** CyberKnife robotic stereotactic radiosurgery. *Technol Cancer Res Treat*. 2010;9(5):431-432. doi:10.1177/153303461000900501
- [197] **Desai R, Rich KM.** Therapeutic Role of Gamma Knife Stereotactic Radiosurgery in Neuro-Oncology. *Mo Med*. 2020;117(1):33-38.
- [198] **Linskey ME, Andrews DW, Asher AL, et al.** The role of stereotactic radiosurgery in the management of patients with newly diagnosed brain metastases: a systematic review and evidence-based clinical practice guideline [published correction appears in *J Neurooncol*. 2010 Jan;96(1):69-70]. *J Neurooncol*. 2010;96(1):45-68. doi:10.1007/s11060-009-0073-4
- [199] **Oermann EK, Kress MA, Collins BT, et al.** Predicting survival in patients with brain metastases treated with radiosurgery using artificial neural networks. *Neurosurgery*. 2013;72(6):944-952. doi:10.1227/NEU.0b013e31828ea04b
- [200] **Skibber JM, Soong SJ, Austin L, Balch CM, Sawaya RE.** Cranial irradiation after surgical excision of brain metastases in melanoma patients. *Ann Surg Oncol*. 1996;3(2):118-123. doi:10.1007/BF02305789
- [201] **Termini J, Neman J, Jandial R.** Role of the neural niche in brain metastatic cancer [published correction appears in *Cancer Res*. 2014 Oct 1;74(19):5680]. *Cancer Res*. 2014;74(15):4011-4015. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1226
- [202] **Xu X, Farach-Carson MC, Jia X.** Three-dimensional in vitro tumor models for cancer research and drug evaluation. *Biotechnol Adv*. 2014;32(7):1256-1268. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.07.009
- [203] **Spano D, Zollo M.** Tumor microenvironment: a main actor in the metastasis process. *Clin Exp Metastasis*. 2012;29(4):381-395. doi:10.1007/s10585-012-9457-5

- [204] **Zhang H, Jiang R, Zhou J, et al.** CTL Attenuation Regulated by PS1 in Cancer-Associated Fibroblast. *Front Immunol.* 2020;11:999. Published 2020 Jun 10. doi:10.3389/fimmu.2020.00999
- [205] **Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z.** Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell.* 2010;18(6):884-901. doi:10.1016/j.devcel.2010.05.012
- [206] **Poschke I, Mougiakakos D, Kiessling R.** Camouflage and sabotage: tumor escape from the immune system. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60(8):1161-1171. doi:10.1007/s00262-011-1012-8
- [207] **Qian X, Chen H, Wu X, Hu L, Huang Q, Jin Y.** Interleukin-17 acts as double-edged sword in anti-tumor immunity and tumorigenesis. *Cytokine.* 2017;89:34-44. doi:10.1016/j.cyto.2015.09.011
- [208] **Wang M, Zhao J, Zhang L, et al.** Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer.* 2017;8(5):761-773. Published 2017 Feb 25. doi:10.7150/jca.17648
- [209] **Sun R, Xiong Y, Liu H, et al.** Tumor-associated neutrophils suppress antitumor immunity of NK cells through the PD-L1/PD-1 axis. *Transl Oncol.* 2020;13(10):100825. doi:10.1016/j.tranon.2020.100825
- [210] **Chen Y, Song Y, Du W, Gong L, Chang H, Zou Z.** Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression. *J Biomed Sci.* 2019;26(1):78. Published 2019 Oct 20. doi:10.1186/s12929-019-0568-z
- [211] **Tsai MJ, Chang WA, Huang MS, Kuo PL.** Tumor microenvironment: a new treatment target for cancer. *ISRN Biochem.* 2014;2014:351959. Published 2014 Apr 10. doi:10.1155/2014/351959
- [212] **Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW.** Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med.* 2001;193(6):727-740. doi:10.1084/jem.193.6.727
- [213] **Weinberg RA.** Mechanisms of malignant progression. *Carcinogenesis.* 2008;29(6):1092-1095. doi:10.1093/carcin/bgn104
- [214] **Mosser DM, Edwards JP.** Exploring the full spectrum of macrophage activation [published correction appears in *Nat Rev Immunol.* 2010 Jun;10(6):460]. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(12):958-969. doi:10.1038/nri2448
- [215] **Azevedo Martins JM, Rabelo-Santos SH, do Amaral Westin MC, Zeferino LC.** Tumoral and stromal expression of MMP-2, MMP-9, MMP-14, TIMP-1, TIMP-2, and VEGF-A in cervical cancer patient survival: a competing risk analysis. *BMC Cancer.* 2020;20(1):660. Published 2020 Jul 15. doi:10.1186/s12885-020-07150-3
- [216] **Davidoff LM, Dyke CG, Elsberg CA, Tarlov IM.** The Effect of Radiation Applied Directly to the Brain and Spinal Cord. *Radiology* 1938; 31(4): 451- 63.
- [217] **RUSSELL DS, WILSON CW, TANSLEY K.** Experimental radio-necrosis of the brain in rabbits. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1949;12(3):187-195. doi:10.1136/jnnp.12.3.187
- [218] **McNamara AL, Kam WW, Scales N, et al.** Dose enhancement effects to the nucleus and mitochondria from gold nanoparticles in the cytosol. *Phys Med Biol.* 2016;61(16):5993-6010. doi:10.1088/0031-9155/61/16/5993
- [219] **Burkart W, Jung T, Frasch G.** Damage pattern as a function of radiation quality and other factors. *C R Acad Sci III.* 1999;322(2-3):89-101. doi:10.1016/s0764-4469(99)80029-8

- [220] Saw CB, Celi JC, Saiful Huq M. Therapeutic radiation physics primer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2006;20(1):25-43. doi:10.1016/j.hoc.2006.01.004
- [221] Jones B, McMahon SJ, Prise KM. The Radiobiology of Proton Therapy: Challenges and Opportunities Around Relative Biological Effectiveness. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2018;30(5):285-292. doi:10.1016/j.clon.2018.01.010
- [222] Mohan R, Grosshans D. Proton therapy - Present and future. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017;109:26-44. doi:10.1016/j.addr.2016.11.006
- [223] Hubbard BM, Hopewell JW. Quantitative changes in the cellularity of the rat subependymal plate after X-irradiation. *Cell Tissue Kinet.* 1980;13(4):403-413. doi:10.1111/j.1365-2184.1980.tb00479.x
- [224] Coderre, Jeffrey A., et al. "Late Effects of Radiation on the Central Nervous System: Role of Vascular Endothelial Damage and Glial Stem Cell Survival." *Radiation Research*, vol. 166, no. 3, 2006, pp. 495–503. JSTOR, <http://www.jstor.org/stable/4098831>. Accessed 3 Jun. 2022.
- [225] Kamran SC, Berrington de Gonzalez A, Ng A, Haas-Kogan D, Viswanathan AN. Therapeutic radiation and the potential risk of second malignancies. *Cancer.* 2016;122(12):1809-1821. doi:10.1002/cncr.29841
- [226] Kondziolka D, Shin SM, Brunswick A, Kim I, Silverman JS. The biology of radiosurgery and its clinical applications for brain tumors. *Neuro Oncol.* 2015;17(1):29-44. doi:10.1093/neuonc/nou284
- [227] Eriksson D, Stigbrand T. Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumour Biol.* 2010;31(4):363-372. doi:10.1007/s13277-010-0042-8
- [228] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516. doi:10.1080/01926230701320337
- [229] Li M, You L, Xue J, Lu Y. Ionizing Radiation-Induced Cellular Senescence in Normal, Non-transformed Cells and the Involved DNA Damage Response: A Mini Review. *Front Pharmacol.* 2018;9:522. Published 2018 May 22. doi:10.3389/fphar.2018.00522
- [230] Baskar R, Dai J, Wenlong N, Yeo R, Yeoh KW. Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Front Mol Biosci.* 2014;1:24. Published 2014 Nov 17. doi:10.3389/fmolb.2014.00024
- [231] Borges HL, Linden R, Wang JY. DNA damage-induced cell death: lessons from the central nervous system. *Cell Res.* 2008;18(1):17-26. doi:10.1038/cr.2007.110
- [232] Zhu M, Yang M, Zhang J, et al. Immunogenic Cell Death Induction by Ionizing Radiation. *Front Immunol.* 2021;12:705361. Published 2021 Aug 20. doi:10.3389/fimmu.2021.705361
- [233] Bolus NE. Basic Review of Radiation Biology and Terminology. *J Nucl Med Technol.* 2017;45(4):259-264. doi:10.2967/jnmt.117.195230
- [234] Hong BJ, Kim J, Jeong H, Bok S, Kim YE, Ahn GO. Tumor hypoxia and reoxygenation: the yin and yang for radiotherapy. *Radiat Oncol J.* 2016;34(4):239-249. doi:10.3857/roj.2016.02012
- [235] Peitzsch C, Perrin R, Hill RP, Dubrovskaya A, Kurth I. Hypoxia as a biomarker for radioresistant cancer stem cells. *Int J Radiat Biol.* 2014;90(8):636-652. doi:10.3109/09553002.2014.916841
- [236] Yuan H, Gaber MW, McColgan T, Naimark MD, Kiani MF, Merchant TE. Radiation-induced permeability and leukocyte adhesion in the rat blood-brain barrier: modulation with anti-ICAM-1 antibodies. *Brain Res.* 2003;969(1-2):59-69. doi:10.1016/s0006-8993(03)02278-9

- [237] **Cabrera AR, Cuneo KC, Desjardins A, et al.** Concurrent stereotactic radiosurgery and bevacizumab in recurrent malignant gliomas: a prospective trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2013;86(5):873-879. doi:10.1016/j.ijrobp.2013.04.029
- [238] **Cheng L, Ma L, Ren H, et al.** Alterations in the expression of vascular endothelial growth factor in the rat brain following gamma knife surgery. *Mol Med Rep.* 2014;10(5):2263-2270. doi:10.3892/mmr.2014.2520
- [239] **Boothe D, Young R, Yamada Y, Prager A, Chan T, Beal K.** Bevacizumab as a treatment for radiation necrosis of brain metastases post stereotactic radiosurgery. *Neuro Oncol.* 2013;15(9):1257-1263. doi:10.1093/neuonc/not085
- [240] **Levin VA, Bidaut L, Hou P, et al.** Randomized double-blind placebo-controlled trial of bevacizumab therapy for radiation necrosis of the central nervous system [published correction appears in *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012 Sep 1;84(1):6. Grewal, Jai [added]]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011;79(5):1487-1495. doi:10.1016/j.ijrobp.2009.12.061
- [241] **Lebow, E.S., Bussière, M.R., Shih, H.A.** (2020). Basic Radiobiology and Radiation Physics Primer. In: Ramakrishna, R., Magge, R., Baaj, A., Knisely, J. (eds) Central Nervous System Metastases. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-42958-4\\_19](https://doi.org/10.1007/978-3-030-42958-4_19)
- [242] **Portess DI, Bauer G, Hill MA, O'Neill P.** Low-dose irradiation of nontransformed cells stimulates the selective removal of precancerous cells via intercellular induction of apoptosis. *Cancer Res.* 2007;67(3):1246-1253. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2985
- [243] **Yahyapour R, Motevaseli E, Rezaeyan A, et al.** Mechanisms of Radiation Bystander and Non-Targeted Effects: Implications to Radiation Carcinogenesis and Radiotherapy. *Curr Radiopharm.* 2018;11(1):34-45. doi:10.2174/1874471011666171229123130
- [244] **Hei TK, Zhou H, Chai Y, Ponnaiya B, Ivanov VN.** Radiation induced non-targeted response: mechanism and potential clinical implications. *Curr Mol Pharmacol.* 2011;4(2):96-105. doi:10.2174/1874467211104020096
- [245] **Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD.** The three Es of cancer immunoeediting. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:329-360. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803
- [246] **Weichselbaum RR, Liang H, Deng L, Fu YX.** Radiotherapy and immunotherapy: a beneficial liaison?. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14(6):365-379. doi:10.1038/nrclinonc.2016.211
- [247] **Reits EA, Hodge JW, Herberts CA, et al.** Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J Exp Med.* 2006;203(5):1259-1271. doi:10.1084/jem.20052494
- [248] **Golden EB, Frances D, Pellicciotta I, Demaria S, Helen Barcellos-Hoff M, Formenti SC.** Radiation fosters dose-dependent and chemotherapy-induced immunogenic cell death. *Oncoimmunology.* 2014;3:e28518. Published 2014 Apr 25. doi:10.4161/onci.28518
- [249] **Lee Y, Auh SL, Wang Y, et al.** Therapeutic effects of ablative radiation on local tumor require CD8+ T cells: changing strategies for cancer treatment. *Blood.* 2009;114(3):589-595. doi:10.1182/blood-2009-02-206870
- [250] **Habets TH, Oth T, Houben AW, et al.** Fractionated Radiotherapy with 3 x 8 Gy Induces Systemic Anti-Tumour Responses and Abscopal Tumour Inhibition without Modulating the Humoral Anti-Tumour Response. *PLoS One.*

2016;11(7):e0159515. Published 2016 Jul 18. doi:10.1371/journal.pone.0159515

- [251] **Tesniere A, Panaretakis T, Kepp O, et al.** Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ.* 2008;15(1):3-12. doi:10.1038/sj.cdd.4402269
- [252] **Miller YI, Shyy JY.** Context-Dependent Role of Oxidized Lipids and Lipoproteins in Inflammation. *Trends Endocrinol Metab.* 2017;28(2):143-152. doi:10.1016/j.tem.2016.11.002
- [253] **Burnette BC, Liang H, Lee Y, et al.** The efficacy of radiotherapy relies upon induction of type I interferon-dependent innate and adaptive immunity. *Cancer Res.* 2011;71(7):2488-2496. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2820
- [254] **Corrales L, McWhirter SM, Dubensky TW Jr, Gajewski TF.** The host STING pathway at the interface of cancer and immunity. *J Clin Invest.* 2016;126(7):2404-2411. doi:10.1172/JCI86892
- [255] **Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, Blazar BR, Kuchroo VK, Anderson AC.** Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity [published correction appears in *J Exp Med.* 2011 Jun 6;208(6):1331]. *J Exp Med.* 2010;207(10):2187-2194. doi:10.1084/jem.20100643
- [256] **Nishikawa H, Kato T, Tanida K, et al.** CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells responding to serologically defined autoantigens suppress antitumor immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(19):10902-10906. doi:10.1073/pnas.1834479100
- [257] **Liu S, Sun X, Luo J, et al.** Effects of radiation on T regulatory cells in normal states and cancer: mechanisms and clinical implications. *Am J Cancer Res.* 2015;5(11):3276-3285. Published 2015 Oct 15.
- [258] **Filatnikov A, Baker J, Mueller AM, et al.** Ablative Tumor Radiation Can Change the Tumor Immune Cell Microenvironment to Induce Durable Complete Remissions. *Clin Cancer Res.* 2015;21(16):3727-3739. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2824
- [259] **Schaue D, Ratikan JA, Iwamoto KS, McBride WH.** Maximizing tumor immunity with fractionated radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012;83(4):1306-1310. doi:10.1016/j.ijrobp.2011.09.049
- [260] **Brown JM.** Vasculogenesis: a crucial player in the resistance of solid tumours to radiotherapy. *Br J Radiol.* 2014;87(1035):20130686. doi:10.1259/bjr.20130686
- [261] **Chakraborty M, Abrams SI, Camphausen K, et al.** Irradiation of tumor cells up-regulates Fas and enhances CTL lytic activity and CTL adoptive immunotherapy. *J Immunol.* 2003;170(12):6338-6347. doi:10.4049/jimmunol.170.12.6338
- [262] **Dewan MZ, Galloway AE, Kawashima N, et al.** Fractionated but not single-dose radiotherapy induces an immune-mediated abscopal effect when combined with anti-CTLA-4 antibody. *Clin Cancer Res.* 2009;15(17):5379-5388. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0265
- [263] **Chakravarty PK, Alfieri A, Thomas EK, et al.** Flt3-ligand administration after radiation therapy prolongs survival in a murine model of metastatic lung cancer. *Cancer Res.* 1999;59(24):6028-6032.
- [264] **Moncharmont C, Levy A, Gilormini M, et al.** Targeting a cornerstone of radiation resistance: cancer stem cell. *Cancer Lett.* 2012;322(2):139-147. doi:10.1016/j.canlet.2012.03.024

- [265] **Bao S, Wu Q, McLendon RE**, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006;444(7120):756-760. doi:10.1038/nature05236
- [266] **Tang L, Wei F, Wu Y**, et al. Role of metabolism in cancer cell radioresistance and radiosensitization methods. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1):87. Published 2018 Apr 23. doi:10.1186/s13046-018-0758-7
- [267] **Liu R, Fan M, Candas D, Qin L, Zhang X, Eldridge A, Zou JX, Zhang T, Juma S, Jin C, Li RF, Perks J, Sun LQ, Vaughan AT, Hai CX, Gius DR, Li JJ**. CDK1-Mediated SIRT3 Activation Enhances Mitochondrial Function and Tumor Radioresistance. *Mol Cancer Ther*. 2015 Sep;14(9):2090-102. doi:10.1158/1535-7163.MCT-15-0017. Epub 2015 Jul 3. PMID: 26141949; PMCID: PMC4560959.
- [268] **Kunkel M, Moergel M, Stockinger M**, et al. Overexpression of GLUT-1 is associated with resistance to radiotherapy and adverse prognosis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncol*. 2007;43(8):796-803. doi:10.1016/j.oraloncology.2006.10.009
- [269] **Ma I, Allan AL**. The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells. *Stem Cell Rev Rep*. 2011;7(2):292-306. doi:10.1007/s12015-010-9208-4
- [270] **Harada H**. Hypoxia-inducible factor 1-mediated characteristic features of cancer cells for tumor radioresistance. *J Radiat Res*. 2016;57 Suppl 1(Suppl 1):i99-i105. doi:10.1093/jrr/rrw012
- [271] **Li XP, Yang XY, Biskup E**, et al. Co-expression of CXCL8 and HIF-1 $\alpha$  is associated with metastasis and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2015;6(26):22880-22889. doi:10.18632/oncotarget.4412
- [272] **Chaiswing L, Weiss HL, Jayswal RD, Clair DKS, Kyprianou N**. Profiles of Radioresistance Mechanisms in Prostate Cancer. *Crit Rev Oncog*. 2018;23(1-2):39-67. doi:10.1615/CritRevOncog.2018025946
- [273] **Galez C, Totis C, Bisio A**. Radiation Resistance: A Matter of Transcription Factors. *Front Oncol*. 2021;11:662840. Published 2021 Jun 1. doi:10.3389/fonc.2021.662840
- [274] **Aggarwal BB, Kunnumakkara AB, Harikumar KB**, et al. Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship?. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1171:59-76. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04911.x
- [275] **Liu YP, Zheng CC, Huang YN, He ML, Xu WW, Li B**. Molecular mechanisms of chemo- and radiotherapy resistance and the potential implications for cancer treatment. *MedComm (2020)*. 2021;2(3):315-340. Published 2021 Jun 10. doi:10.1002/mco2.55
- [276] **Wu TS, Lin BR, Chang HH, Chang CC** (2015) Radio Resistance Mechanisms of Cancers: An Overview and Future Perspectives. *Biol Med S2*: 002. doi:10.4172/0974-8369.S2-003
- [277] **Türksayar, Oğuzhan**. “İntrakranial Metastazlarda Stereotaktik Radyocerrahi Cevabının Değerlendirilmesinde T1 Perfüzyon MRG.” DoctoralThesis, June 01, 2020. <https://acikbilim.yok.gov.tr/handle/20.500.12812/363465>.
- [278] **Ouellette MM, Zhou S, Yan Y**. Cell Signaling Pathways That Promote Radioresistance of Cancer Cells. *Diagnostics (Basel)*. 2022;12(3):656. Published 2022 Mar 8. doi:10.3390/diagnostics12030656

- [279] **Theys J, Jutten B, Habets R**, et al. E-Cadherin loss associated with EMT promotes radioresistance in human tumor cells. *Radiother Oncol.* 2011;99(3):392-397. doi:10.1016/j.radonc.2011.05.044
- [280] **Piccolo S, Dupont S, Cordenonsi M**. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol Rev.* 2014;94(4):1287-1312. doi:10.1152/physrev.00005.2014
- [281] **Zhang Y, Wang X, Zhou X**. Functions of Yes-association protein (YAP) in cancer progression and anticancer therapy resistance. *Brain Science Advances.* 2022;8(1):1-18. doi:10.26599/BSA.2022.9050008
- [282] **Harvey KF, Zhang X, Thomas DM**. The Hippo pathway and human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(4):246-257. doi:10.1038/nrc3458
- [283] **Tsujiura M, Mazack V, Sudol M**, et al. Yes-associated protein (YAP) modulates oncogenic features and radiation sensitivity in endometrial cancer. *PLoS One.* 2014;9(6):e100974. Published 2014 Jun 27. doi:10.1371/journal.pone.0100974
- [284] **Pan D**. The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev Cell.* 2010;19(4):491-505. doi:10.1016/j.devcel.2010.09.011
- [285] **Fernandez-L A, Squatrito M, Northcott P**, et al. Oncogenic YAP promotes radioresistance and genomic instability in medulloblastoma through IGF2-mediated Akt activation. *Oncogene.* 2012;31(15):1923-1937. doi:10.1038/onc.2011.379
- [286] **286 Gao Y, Zhang W, Han X**, et al. YAP inhibits squamous transdifferentiation of Lkb1-deficient lung adenocarcinoma through ZEB2-dependent DNp63 repression. *Nat Commun.* 2014;5:4629. Published 2014 Aug 13. doi:10.1038/ncomms5629
- [287] **287 Andrade D, Mehta M, Griffith J**, et al. YAP1 inhibition radiosensitizes triple negative breast cancer cells by targeting the DNA damage response and cell survival pathways. *Oncotarget.* 2017;8(58):98495-98508. Published 2017 Oct 20. doi:10.18632/oncotarget.21913
- [288] **288 Sebio A, Lenz HJ**. Molecular Pathways: Hippo Signaling, a Critical Tumor Suppressor. *Clin Cancer Res.* 2015;21(22):5002-5007. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-041
- [289] **Hansen CG, Moroishi T, Guan KL**. YAP and TAZ: a nexus for Hippo signaling and beyond. *Trends Cell Biol.* 2015;25(9):499-513. doi:10.1016/j.tcb.2015.05.002
- [290] **Kim W, Jho EH**. The history and regulatory mechanism of the Hippo pathway. *BMB Rep.* 2018;51(3):106-118. doi:10.5483/bmbrep.2018.51.3.022
- [291] **Yang D, Zhang N, Li M, Hong T, Meng W, Ouyang T**. The Hippo Signaling Pathway: The Trader of Tumor Microenvironment. *Front Oncol.* 2021;11:772134. Published 2021 Nov 11. doi:10.3389/fonc.2021.772134
- [292] **Dupont S, Morsut L, Aragona M**, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature.* 2011;474(7350):179-183. Published 2011 Jun 8. doi:10.1038/nature10137
- [293] **Moon, S., Yeon Park, S. & Woo Park, H**. Regulation of the Hippo pathway in cancer biology. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 2303–2319 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2804-1>
- [294] **Zanconato F, Cordenonsi M, Piccolo S**. YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell.* 2016;29(6):783-803. doi:10.1016/j.ccell.2016.05.005

- [295] **Bae JS, Kim SM, Lee H.** The Hippo signaling pathway provides novel anti-cancer drug targets. *Oncotarget*. 2017;8(9):16084-16098. doi:10.18632/oncotarget.14306
- [296] **Zhang Y, Wang Y, Zhou D, et al.** Radiation-induced YAP activation confers glioma radioresistance via promoting FGF2 transcription and DNA damage repair. *Oncogene*. 2021;40(27):4580-4591. doi:10.1038/s41388-021-01878-3
- [297] **Guttmann DM, Koumenis C.** The heat shock proteins as targets for radiosensitization and chemosensitization in cancer. *Cancer Biol Ther*. 2011;12(12):1023-1031. doi:10.4161/cbt.12.12.18374
- [298] **Almeida MB, do Nascimento JL, Herculano AM, Crespo-López ME.** Molecular chaperones: toward new therapeutic tools. *Biomed Pharmacother*. 2011;65(4):239-243. doi:10.1016/j.biopha.2011.04.025
- [299] **Åkerfelt, M., Morimoto, R. & Sistonen, L.** Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 545–555 (2010). <https://doi.org/10.1038/nrm2938>
- [300] **Sőti C, Nagy E, Giricz Z, Vigh L, Csermely P, Ferdinandy P.** Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. *Br J Pharmacol*. 2005;146(6):769-780. doi:10.1038/sj.bjp.0706396
- [301] **Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G.** Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;286(3):433-442. doi:10.1006/bbrc.2001.5427
- [302] **Giménez Ortiz, A., Montalar Salcedo, J.** Heat shock proteins as targets in oncology. *Clin Transl Oncol* **12**, 166–173 (2010). <https://doi.org/10.1007/s12094-010-0486-8>
- [303] **Miyata Y, Nakamoto H, Neckers L.** The therapeutic target Hsp90 and cancer hallmarks. *Curr Pharm Des*. 2013;19(3):347-365. doi:10.2174/138161213804143725
- [304] **Arya R, Mallik M, Lakhotia SC.** Heat shock genes - integrating cell survival and death. *J Biosci*. 2007;32(3):595-610. doi:10.1007/s12038-007-0059-3
- [305] **Lewis J, Devin A, Miller A, et al.** Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor-kappaB activation. *J Biol Chem*. 2000;275(14):10519-10526. doi:10.1074/jbc.275.14.10519
- [306] **Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, et al.** Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J*. 2000;19(16):4310-4322. doi:10.1093/emboj/19.16.4310
- [307] **Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G.** Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle*. 2006;5(22):2592-2601. doi:10.4161/cc.5.22.3448
- [308] **Aloy MT, Hadchity E, Bionda C, et al.** Protective role of Hsp27 protein against gamma radiation-induced apoptosis and radiosensitization effects of Hsp27 gene silencing in different human tumor cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2008;70(2):543-553. doi:10.1016/j.ijrobp.2007.08.061
- [309] **Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR.** Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci*. 2006;31(3):164-172. doi:10.1016/j.tibs.2006.01.006
- [310] **Abe M, Manola JB, Oh WK, et al.** Plasma levels of heat shock protein 70 in patients with prostate cancer: a potential biomarker for prostate cancer. *Clin Prostate Cancer*. 2004;3(1):49-53. doi:10.3816/cgc.2004.n.013

- [311] **Dote H, Burgan WE, Camphausen K, Tofilon PJ.** Inhibition of hsp90 compromises the DNA damage response to radiation. *Cancer Res.* 2006;66(18):9211-9220. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2181
- [312] **Kabakov AE, Kudryavtsev VA, Gabai VL.** Hsp90 inhibitors as promising agents for radiotherapy. *J Mol Med (Berl).* 2010;88(3):241-247. doi:10.1007/s00109-009-0562-0
- [313] **Choi SH, Lee YJ, Seo WD, et al.** Altered cross-linking of HSP27 by zerumbone as a novel strategy for overcoming HSP27-mediated radioresistance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011;79(4):1196-1205. doi:10.1016/j.ijrobp.2010.10.025
- [314] **Bisht, Kheem & Bradbury, C & Mattson, David & Kaushal, Aradhana & Sowers, Anastasia & Markovina, Stephanie & Ortiz, Karen & Sieck, Leah & Isaacs, Jennifer & Brechbiel, Martin & Mitchell, James & Neckers, Len & Gius, David.** (2004). Geldanamycin and 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin Potentiate the in Vitro and in Vivo Radiation Response of Cervical Tumor Cells via the Heat Shock Protein 90-Mediated Intracellular Signaling and Cytotoxicity. *Cancer research.* 63. 8984-95.
- [315] **de Billy E, Powers MV, Smith JR, Workman P.** Drugging the heat shock factor 1 pathway: exploitation of the critical cancer cell dependence on the guardian of the proteome. *Cell Cycle.* 2009;8(23):3806-3808. doi:10.4161/cc.8.23.10423
- [316] **Sanchez-Martin C, Serapian SA, Colombo G, Rasola A.** Dynamically Shaping Chaperones. Allosteric Modulators of HSP90 Family as Regulatory Tools of Cell Metabolism in Neoplastic Progression. *Front Oncol.* 2020;10:1177. Published 2020 Jul 16. doi:10.3389/fonc.2020.01177
- [317] **Yun CW, Kim HJ, Lim JH, Lee SH.** Heat Shock Proteins: Agents of Cancer Development and Therapeutic Targets in Anti-Cancer Therapy. *Cells.* 2019;9(1):60. Published 2019 Dec 24. doi:10.3390/cells9010060
- [318] **Kang BH.** TRAP1 regulation of mitochondrial life or death decision in cancer cells and mitochondria-targeted TRAP1 inhibitors. *BMB Rep.* 2012;45(1):1-6. doi:10.5483/bmbrep.2012.45.1.1
- [319] **Langendijk JA, Lambin P, De Ruyscher D, Widder J, Bos M, Verheij M.** Selection of patients for radiotherapy with protons aiming at reduction of side effects: the model-based approach. *Radiother Oncol.* 2013;107(3):267-273. doi:10.1016/j.radonc.2013.05.007
- [320] **Osuka S, Zhu D, Zhang Z, et al.** N-cadherin upregulation mediates adaptive radioresistance in glioblastoma. *J Clin Invest.* 2021;131(6):e136098. doi:10.1172/JCI136098
- [321] **Gu S, Ni T, Wang J, et al.** CD47 Blockade Inhibits Tumor Progression through Promoting Phagocytosis of Tumor Cells by M2 Polarized Macrophages in Endometrial Cancer. *J Immunol Res.* 2018;2018:6156757. Published 2018 Nov 7. doi:10.1155/2018/6156757
- [322] **Hatiboglu MA, Kocyigit A, Guler EM, et al.** Gamma knife radiosurgery compared to whole brain radiation therapy enhances immunity via immunoregulatory molecules in patients with metastatic brain tumours. *Br J Neurosurg.* 2020;34(6):604-610. doi:10.1080/02688697.2019.1642445
- [323] **Hatiboglu MA, Kong LY, Wei J, et al.** The tumor microenvironment expression of p-STAT3 influences the efficacy of cyclophosphamide with WP1066 in murine melanoma models. *Int J Cancer.* 2012;131(1):8-17. doi:10.1002/ijc.26307

- [324] **Hatiboglu MA, Kocyigit A, Guler EM, et al.** Thymoquinone Enhances the Effect of Gamma Knife in B16-F10 Melanoma Through Inhibition of Phosphorylated STAT3. *World Neurosurg.* 2019;128:e570-e581. doi:10.1016/j.wneu.2019.04.205
- [325] **Hatiboglu MA, Kocyigit A, Guler EM, et al.** Thymoquinone Induces Apoptosis in B16-F10 Melanoma Cell Through Inhibition of p-STAT3 and Inhibits Tumor Growth in a Murine Intracerebral Melanoma Model. *World Neurosurg.* 2018;114:e182-e190. doi:10.1016/j.wneu.2018.02.136
- [326] **Mukaida N, Sasaki SI, Baba T.** CCL4 Signaling in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1231:23-32. doi:10.1007/978-3-030-36667-4\_3
- [327] **Sektioglu IM, Carretero R, Bulbuc N, et al.** Basophils Promote Tumor Rejection via Chemotaxis and Infiltration of CD8+ T Cells. *Cancer Res.* 2017;77(2):291-302. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-0993
- [328] **Park H, Li Z, Yang XO, et al.** A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 2005;6(11):1133-1141. doi:10.1038/ni1261
- [329] **Lee EJ, Park HJ, Lee IJ, et al.** Inhibition of IL-17A suppresses enhanced-tumor growth in low dose pre-irradiated tumor beds. *PLoS One.* 2014;9(9):e106423. Published 2014 Sep 2. doi:10.1371/journal.pone.0106423
- [330] **Camphausen K, Tofilon PJ.** Inhibition of Hsp90: a multitarget approach to radiosensitization. *Clin Cancer Res.* 2007;13(15 Pt 1):4326-4330. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0632
- [331] **Lauber K, Brix N, Ernst A, et al.** Targeting the heat shock response in combination with radiotherapy: Sensitizing cancer cells to irradiation-induced cell death and heating up their immunogenicity. *Cancer Lett.* 2015;368(2):209-229. doi:10.1016/j.canlet.2015.02.047
- [332] **Sanchez J, Carter TR, Cohen MS, Blagg BSJ.** Old and New Approaches to Target the Hsp90 Chaperone. *Curr Cancer Drug Targets.* 2020;20(4):253-270. doi:10.2174/1568009619666191202101330
- [333] **Gong L, Gu J, Ge J, et al.** Differential radiation response between normal astrocytes and glioma cells revealed by comparative transcriptome analysis. *Onco Targets Ther.* 2017;10:5755-5764. Published 2017 Dec 4. doi:10.2147/OTT.S144002