

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
RADYASYON ONKOLOJİSİ ANABİLİM DALI**

**FARE MELANOM TÜMÖR MODELİNDE RADYOTERAPİDE
KULLANILAN FARKLI DOZ HIZLARININ TÜMÖR
MİKROÇEVRESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

DR. MELEK TUĞÇE YILMAZ ASLAN

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

ANKARA

2022

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
RADYASYON ONKOLOJİSİ ANABİLİM DALI**

**FARE MELANOM TÜMÖR MODELİNDE RADYOTERAPİDE
KULLANILAN FARKLI DOZ HIZLARININ TÜMÖR
MİKROÇEVRESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

DR. MELEK TUĞÇE YILMAZ ASLAN

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Pervin Hürmüz**

**ANKARA
2022**

TEŞEKKÜR

Öncelikle, başta anabilim dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Gökhan Özyiğit olmak üzere, değerli hocalarım Prof. Dr. Fadıl Akyol, Prof. Dr. Faruk Zorlu, Prof. Dr. Murat Gürkaynak, Prof. Dr. Ferah Yıldız, Prof. Dr. Mustafa Cengiz, Prof. Dr. Gözde Yazıcı, Prof. Dr. Melis Gültekin, Prof. Dr. Pervin Hürmüz ve Doç. Dr. Sezin Yüce Sarı'ya eğitim sürecime yaptıkları tüm katkılar için sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Bu zorlu eğitim sürecinde, işinin ehli bir radyasyon onkoloğu olmayı öğrenirken her daim hocalarımla sevgisini ve desteğini hissetme şansına sahip oldum, sonsuz minnettarım.

Bu çalışmanın fikrini oluşturan, ilk anından itibaren her aşamasında koşulsuz destek olan ve tüm zorlukları kolaylıkla aşmamı sağlayan çok değerli tez danışmanım Prof. Dr. Pervin Hürmüz'e,

Bu çalışma sayesinde tanışma şansına eriştiğim, engin bilgisi ile bana her zaman yol gösteren, bana en yoğun vaktinde bile zaman ayıran sayın Prof. Dr. Aytekin Akyol'a,

Uzmanlık eğitimimin başından itibaren yol arkadaşı olduğumuz, her daim desteğini ve sevgisini hissettiğim canım kıdemlim Uz. Dr. Ayşenur Elmalı'ya,

Berber çalışma fırsatını yakaladığım, hastaneyi daha güzel bir yer haline getiren başta asistan arkadaşlarım olmak üzere, medikal fizik uzmanı, hemşire, tekniker, tıbbi sekreter tüm iş arkadaşlarıma,

Bu süreçte tecrübesini ve bilgisini benimle paylaşan Öğr. Gör. Dr. Fazlı Yağız Yedekçi'ye, Doç. Dr. İlyas Onbaşlar'a, Veteriner Hekim Ayşenur Gök'e, Prof. Dr. Sevtap Aydın Dilsiz'e, Doç. Dr. Gürcan Günaydın ve Dr. Emre Gedik'e,

Her zaman koşulsuz sevgisini ve desteğini hissettiğim canım anneme, canım babama, biricik kız kardeşime ve son olarak sadece uzmanlık sürecinde değil hayatımın her aşamasında en büyük destekçim olan, varlığı ile hayatımı güzelleştiren canım eşim Uz. Dr. Mert Aslan'a, tüm kalbimle teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu proje 121S247 proje numarası ile Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), ARDEB 1002- Hızlı Destek Programı tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Melek Tuğçe Yılmaz Aslan, Fare Melanom Tümör Modelinde Radyoterapide Kullanılan Farklı Doz Hızlarının Tümör Mikroçevresi Üzerine Etkileri, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Radyasyon Onkolojisi Uzmanlık Tezi, Ankara, 2022. Radyoterapide (RT) doz hızı hücre sağ kalımını etkileyen önemli bir değişkendir. Doz hızının, tümör hücreleri üzerine etkileri iyi tanımlanmış olsa da kanser prognozu, rekürrensi ve tedavi yanıtında önemli olan tümör mikroçevresi (TMÇ) üzerine etkileri bilinmemektedir. Bu çalışmada, eksternal RT uygulamalarında sık kullanılan 3 farklı doz hızının TMÇ üzerine etkileri araştırmak amacı ile sinjenik tümör modeli oluşturuldu. Bu modeli oluşturmak için 54 adet 6-8 haftalık C57BL/6 fare ve B16-F10 hücre dizisi kullanıldı. Farelerin flankına ekilen tümör günlük olarak takip edildi. En az 0,5 cm çapa gelen tümörlere 2 farklı dozda (2 ve 10 Gy) ve 3 farklı doz hızında (1 Gy/dk, 6 Gy/dk, 14 Gy/dk) RT uygulandı. RT sonrası 7. günde farelerin kanları ve tümör dokuları hasat edildi. Tek hücre jel elektroforezi ile kan mononükleer hücrelerinde DNA kırığı miktarı ölçüldü, tümör dokusunda ise TMÇ histomorfolojik özellikleri incelendi. Yüksek doz RT alan kolda, daha küçük tümör boyutu ($p<0.01$), TMÇ’de kanser hücrelerinde azalmış mitoz ($p=0.01$) ve artmış pleomorfizm ($p<0.01$) gözlemlendi. Yüksek ve düşük doz alan kollardaki DNA hasar miktarı benzerdi ($p=0.65$). Her bir doz için, 3 farklı doz hızında tümör boyutu, DNA kırık miktarı ve TMÇ histomorfolojik özellikleri arasında fark bulunmadı. Bu çalışma ile malign melanom tümör modelinde, klinikte kullanılan farklı doz hızlarının TMÇ’de farklı etkiye sebep olmadığını gösterildi.

Anahtar kelimeler: Doz hızı, eksternal radyoterapi, malign melanom, tümör mikroçevresi

Bu proje Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), Araştırma Destek Programları Başkanlığı (ARDEB) 1002- Hızlı Destek Programı tarafından “121S247” proje numarası ile desteklenmiştir.

ABSTRACT

Melek Tugce Yilmaz Aslan, Effects of Different Dose Rates on Tumor Microenvironment in a Mouse Melanoma Tumor Model, Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in Radiation Oncology, Ankara, 2022. The dose rate is an important variable that affects cell survival. With the introduction of modern accelerators and treatment techniques with high dose rate capacity, it has become important in external radiotherapy (RT) applications. Although the effects of dose rate on tumor cells are well defined, Its impact on the tumor microenvironment (TME), which is important phenomenon in cancer prognosis, recurrence, and treatment response, is unknown. An efficacy study of RT delivering 2 Gy and 10 Gy at 3 different dose rates (1 Gy/min, 6 Gy/min, 14 Gy/min) was performed in immunocompetent C57BL/6 mice carrying B16-F10 syngeneic tumors. On day 7 post-RT, the blood and tumor tissues of mice were harvested. The amount of DNA breakage in blood mononuclear cells and the histomorphological features of TME in tumor tissue were examined. Smaller tumor volume ($p<0.01$), decreased mitosis ($p=0.01$) and increased pleomorphism ($p<0.01$) in cancer cells were observed in the arm that received high-dose RT. The amount of DNA damage in the high and low dose arms was similar ($p=0.65$). No difference was found in terms of tumor growth, amount of DNA breakage, and TME histomorphological features at 3 different dose rates for each dose. With this study, we show that different dose rates do not cause different effects on TME in the malignant melanoma tumor model.

Key Words: Dose rate, radiotherapy, malign melanoma, tumor microenvironment

This project was supported by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBİTAK), 1002 - Short Term R&D Funding Program with the project number “121S247”.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER	xi
TABLolar	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Tümör Mikroçevresi	3
2.1.1 Kanser Hücreleri ve Kanser Kök Hücreleri	3
2.1.2 Endotelyal Hücreler	4
2.1.3 Perisitler	4
2.1.4 İmmün İnflamatuar Hücreler	5
2.1.5 Kanser Asosiye Fibroblastlar	6
2.1.6 Kanser Stromasının Kök Hücreleri (Mezenkimal Kök Hücreler)	7
2.1.7 Tümör Mikroçevresinin Ekstraselüler Matriksi	7
2.2 Melanom ve Melanom Tümör Mikroçevresi	8
2.3 Tümör Mikroçevresinin Sinjenik Fare Tümör Modeli ile İncelenmesi	11
2.3.1 Hücre Kültürü Kaynaklı Xenograftlar	11

2.3.2 Sinjenik Tümör Modelleri	12
2.3.3 Hasta Kaynaklı Xenograftlar	12
2.3.4 Kimyasal İndüklenilmiş Tümör Modelleri	12
2.3.5 Genetik Olarak Modellenmiş Tümör Modelleri	13
2.4 Radyasyonun Hücresel Etkileri	13
2.4.1 Direkt Etki, İndirekt Etki ve DNA Hasar Tipleri	13
2.4.2 Radyasyonun Hücre Ölüm Mekanizmaları	15
2.5 Radyoterapinin Tümör Mikroçevresi Üzerine Etkileri	16
2.5.1 Doğal ve Adaptif İmmün Yanıt Üzerine Etkileri	17
2.5.2 T Lenfosit Aktivasyonu	17
2.5.3 İmmün Hücrelerinin Tümör İnfiltrasyonunun Sağlanması	18
2.5.4 Radyoterapi Sonrası Tümör Mikroçevresinin Sistemik Etkileri	18
2.5.5 Radyoterapi Sonrası İmmünsüpresif Yolaklar	18
2.5.6 Radyoterapi Sonrası Tümör Vasküler Yapısı	19
2.6 Farklı Dozların Tümör Mikroçevresine Farklı Etkileri	20
2.7 Radyoterapide Doz Hızının Önemi	21
2.9 Amaç	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1 Çalışmanın Türü, Evreni, Etik Kurul İzni ve Proje Desteği	24
3.2 Kimyasal Maddeler, Aletler, Cihazlar	24
3.3 Hücre Kültürü ve Pasajlanması	26
3.4 Çalışmada Kullanılan Deney Hayvanı Özellikleri	28
3.5 Sinjenik Tümör Modelinin Oluşturulması	29
3.5.1 B16-F10 Hücrelerinin Hazırlanması	29
3.5.2 B16-F10 Hücrelerinin Fareye İnokulasyonu	30
3.5.3 Deney Gruplarının Oluşturulması	30

3.6 Radyoterapi Uygulaması	36
3.7 Deney Hayvanlarının Takibi	39
3.8 Hayvanların Sakrifikasyonu ve Kan-Doku Toplanması	40
3.9 Dokuların Histolojik Olarak İncelenmesi	43
3.10 Tek Hücreli Jel Elektroforezi (Comet Analizi)	44
3.11 İstatistiksel Analiz	45
4. BULGULAR	46
4.1 Deney Esnasında Gözlenenler	46
4.2 Tek Hücre Jel Elektroforezinin Sonuçlarının Değerlendirilmesi	53
4.3 Histopatolojik Bulgular	56
5. TARTIŞMA	64
5.1 Kısıtlılıklar	69
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
KAYNAKLAR	72
EKLER	
EK 1. ETİK KURUL ONAY BELGESİ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMP	: Adenin Monofosfat
aSMA	: Alfa Düz Kas Aktini
ATM	: <i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
cGAS	: Guanin Adenin Monofosfat Sentetaz
dsDNA	: Double Strand Deoksiribo Nükleik Asit
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
ECM	: Ekstraselüler Matriks
EGF	: Epitelyal Büyüme Faktörü
EMT	: Epitelden Mezenkimal Hücreye Dönüşüm
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i>
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
GAMP	: Guanin Adenin Monofosfat
GMP	: Guanin Monofosfat
GTV	: <i>Gross Tumor Volume</i>
HBSS	: Hanks' Balanced Sats with Ca & Mg
HIF	: Hipoksi ile İndüklenen Faktör
HMGB1	: <i>High Mobility Group Box-1</i>
HRR	: <i>Homologous Recombination</i> Tamir Mekanizması
HSP	: Heat Shock Protein
IFN-gama	: İnterferon gama
IL	: İnterlökin
İR	: İyonize Radyasyon
KAF	: Kanser Asosiye Fibroblast
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
NHEJ	: <i>Non-homologous End Joining</i> Tamir Mekanizması
NK	: <i>Natural Killer</i> Hücreler
PD-1	: <i>Programmed Death-1</i>
PD-L1	: <i>Programmed Death-Ligand 1</i>
PDGF	: Platelet Derive Büyüme Faktörü

PTV	: <i>Planning Target Volume</i>
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RT	: Radyoterapi
STING	: <i>Stimulator of Interferon Genes</i>
TAA	: Tümör Asosiye Antijenler
TAM	: Tümör Asosiye Makrofaj
Treg	: T regulatuar Hücre
TGF-beta	: Transforme Edici Büyüme Faktörü beta
TKR	: Tirozin Kinaz Reseptör
TMÇ	: Tümör Mikroçevresi
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
Şekil 1. 1. Tümör Mikroçevresi.	2
Şekil 2. 1. İmmün eliminasyonun 3 fazı.	9
Şekil 2. 2. Radyasyonun direkt ve indirekt etkileri.	15
Şekil 3. 1. B16-F10 malign melanom hücrelerinin morfolojisi.	27
Şekil 3. 2. B16-F10 hücrelerinin melanin pigmenti.	27
Şekil 3. 3. C57BL/6 türü, 8 haftalık erkek siyah fare.	28
Şekil 3. 4. Hücrelerin HBSS (<i>Hanks' Balanced Salts</i>) içerisinde görünümü.	29
Şekil 3. 5. Farelere subkutan tümör inokulasyonu işlemi.	30
Şekil 3. 6. Birinci deney grubu büyüme grafikleri.	32
Şekil 3. 7. İkinci deney grubu, altı farenin sağ kalım grafiği.	33
Şekil 3. 8. Melanom hemoatoksilen&eoizin (H&E) ile histopatolojik görüntüsü.	33
Şekil 3. 9. Üçüncü basamak deney düzeneği.	35
Şekil 3. 10. Tümör boyutları RT için hazır hale gelmiş bir fare.	36
Şekil 3. 11. BT simülasyon işlemi.	37
Şekil 3. 12. Sağ flanktaki tümör konturu ve beam eye view görüntüsü.	38
Şekil 3. 13. Tedavi plan görüntüsü.	38
Şekil 3. 14. Tedavi masasındaki tedavi pozisyonunda fare.	39
Şekil 3. 15. Tümör boyutunun vernier ölçeği ile takibi.	40
Şekil 3. 16. İntrakardiyak kan alımı.	41
Şekil 3. 17. Sağ flanktan hasat edilen tümör dokusu.	42
Şekil 3. 18. Torakal ve abdominal insizyon ile iç organ metastazının incelenmesi.	42
Şekil 3. 19. Tam kan örneğinin tek hücre jel elektroforezi görüntüleri.	44

TABLÖLAR

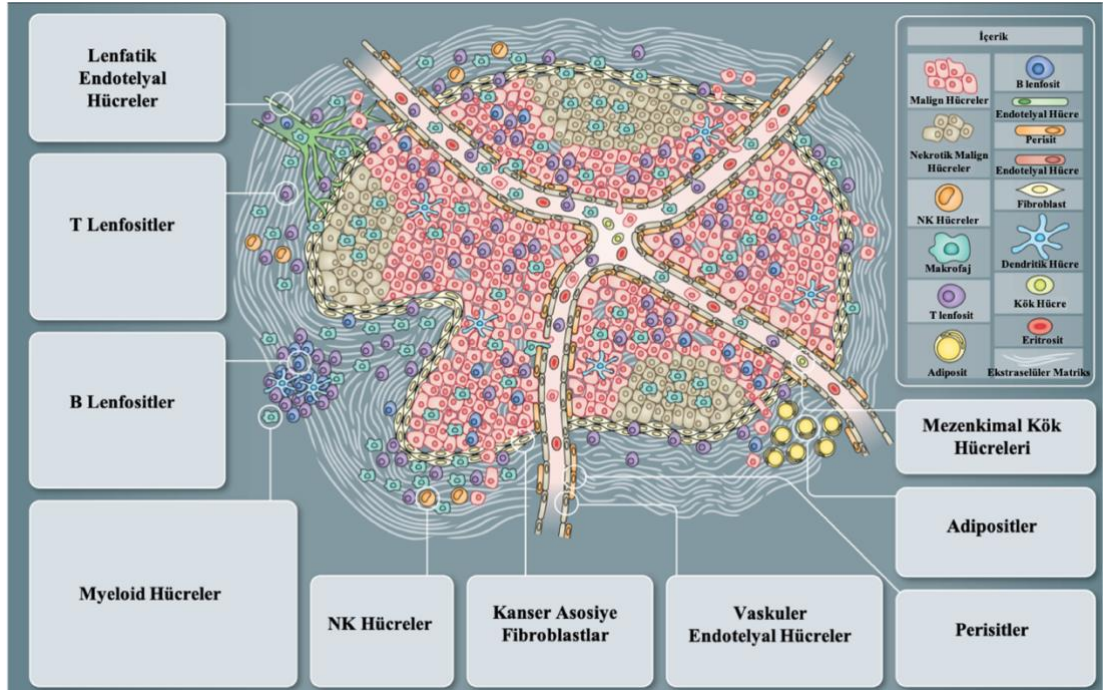
Tablo	Sayfa
Tablo 3. 1. Kimyasal Maddeler, Aletler ve Cihazlar.	24
Tablo 4. 1. Deney gruplarına atanan fare küpe numaraları.	46
Tablo 4. 2. Deney kollarına göre ortanca başlangıç ve bitiş ağırlıkları.	48
Tablo 4. 3. Gruplara göre sağ kalım, tümör oluşturma ve RT alma günü.	48
Tablo 4. 4. Sakrifikasyon sonrası tümörde ölçülen en uzun çap.	53
Tablo 4. 5. Her bir kan örneği için elde edilen comet kuyruk yoğunluğu.	54
Tablo 4. 6. Comet Kuyruk değerleri.	55
Tablo 4. 7. Her bir fareye ait 10 büyük büyütme alanındaki (BBA) mitoz sayısı.	57
Tablo 4. 8. Her bir fareye ait 10 büyük büyütme alanındaki (BBA) mitoz sayısı.	59

1. GİRİŞ

Tümör mikroçevresi (TMÇ), tümörün yaşadığı ve immün sistemden kaçtığı ekosistemi temsil eder. TMÇ, karsinogenezin tüm basamaklarında, tümörün gelişimini destekleyen dinamik bir ağ olarak tanımlanmaktadır¹. Son dönemde, kanserin fenotipik özelliklerini daha iyi tanımlamak ve gidişatını tahmin etmek amacıyla dikkatleri üzerine toplamıştır. Bu konsept; kanser hücrelerinin yaşamını, proliferasyonunu, çeşitli tedavilere yanıtını ve metastaz kapasitesini sadece genetik özellikleri ile tanımlamaz, kanser hücrelerini çevredeki hücreler ile birlikte bir bütün olarak değerlendirir.

TMÇ; kanser hücreleri, kanser kök hücreleri, stromal hücreler, immün hücrelerden ve bu hücreleri çevreleyen ekstraselüler matriksten oluşan organize ve dinamik bir ağdır² (Şekil 1.1.). Bu hücrelerarası etkileşimlerin ve hücre sekresyonlarının tümör yanıtında ve tedavi direncinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Bu konseptin temeli 1880'lerde Paget tarafından "tohum ve toprak (*seed and soil*)" teorisi ile atılmıştır. Paget, tümör hücrelerinin başlangıcı ve progresyonunun sadece "tohumun" kendisine bağlı olmadığını, onu besleyen ve destekleyen "toprağın" da kanser gelişiminde önemli olduğunu öne sürmüştü³.

Radyoterapi (RT), iyonize radyasyonun (İR) kullanıldığı bir tedavi yöntemidir. Kanser hastalarının yarısından fazlası, hastalık sürecinde küratif veya palyatif olarak RT almaktadır. RT uygulamasında tedavi sonucunu etkileyen birçok parametre vardır. Bu değişkenler örnek olarak: uygulanacak toplam doz, toplam dozun ne kadar fraksiyona bölüldüğü, fraksiyon başına düşen doz ve bu dozun verilme süresi verilebilir. Literatürde "dose rate" olarak adlandırılan doz hızı, birim zamanda verilen radyasyon miktarı olarak tanımlanır ve birimi Gy/dk'dır. Literatürde doz hızının tümör kontrolü ve normal doku üzerindeki etkileri ile ilgili veriler mevcuttur; ancak tümörün tedaviye yanıtı ve direncini etkileyen temel öğelerden biri olan TMÇ üzerinde olan etkisi ile ilgili veriler oldukça sınırlıdır. Çalışmamız; tümör hücrelerinde farklı biyolojik etkilere sebep olan farklı doz hızlarının, TMÇ üzerinde oluşturduğu etkilerini incelemek ve doz hızları arasında farklılık saptanması durumunda en ideal immün yanıt sunan doz hızı şemasını tespit etmek amacı ile tasarlandı.



Şekil 1. 1. Tümör Mikroçevresi (Balkwill F. ve ark., 2012'den⁴ uyarlandı.).

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Tümör Mikroçevresi

2.1.1 Kanser Hücreleri ve Kanser Kök Hücreleri

Kanser hücreleri, kanserin yapıtaşını oluşturan hücrelerdir. Onkojenik ve tümör baskılayıcı mutasyonları taşıyarak tümörün oluşumunu ve progrese olmasını sağlarlar. Bu hücreler özellikle tümörün ileri aşamalarına kadar, görece homojen dağılımlı hücreler olarak bilinirler. Ancak tümör ilerledikçe, proliferasyon artışı ve buna bağlı olarak genetik instabilite ile tümör hücreleri heterojen hale gelirler. Bu nedenle çoğu tümör, değişik vaskülarite, inflamasyon ve invazivliğe sahip hücre alt popülasyonlarından oluşur⁵.

Kanser kök hücreleri ise, yeni tümör hücreleri oluşturma kapasitesine sahip hücrelerdir. Bu fonksiyonlarının yanı sıra normal dokularda bulunan kök hücre yüzey belirteçlerini de taşırlar⁶. Kanser kök hücreleri, ilk defa hematolojik malignitelere tanımlanmışlardır⁷. Daha sonra, başta meme kanseri ve nöro-ektodermal tümörler olmak üzere solid tümörlerde tanımlanmış olan bu hücrelerin kökeni tam olarak aydınlatılmamış olmak ile birlikte, tümörden tümöre farklılık gösterebilir⁸. Bazı tümörlerde, normal doku kök hücrelerinin onkojenik transformasyon geçirerek kanser kök hücrelerini oluşturduğu düşünülmekte iken; bazı tümörlerde onkolojik mutasyon geçirmiş parsiyel diferansiye progenitor hücrelerin, kök hücre karakterine dönüştüğü düşünülmektedir⁵. “Epitelden mezenkimal hücreye dönüşüm” (*Epithelial to mesenchymal transition, EMT*) evrimsel olarak korunmuş gelişme süreçlerinden biridir⁹. Embriyonik gelişim sürecinde, bazı diferansiye polarize epitel hücreleri, EMT olarak adlandırılan morfolojik değişim ile mezenkimal hücrelere dönüşmektedirler. Bu morfolojik değişim, hücreler arası adezyon moleküllerinin yok olmasını ve epitel hücrelerinde bulunan apiko-bazal polarizasyonun kaybını kapsar. Böylelikle invaziv karaktere sahip, göç edici mezenkimal hücreler elde edilir. Bu değişim transforme edici büyüme faktörü beta (*transforming growth factor beta- TGF-β*) ve tirozin kinaz reseptör (TKR) ligandı ile, kompleks sinyal yolları üzerinden, gen ekspresyonunda değişim ile sağlanmaktadır¹⁰. Tümörlerde ise bu yolağın aktivasyonunun kanser kök hücresi oluşumuna sebebiyet verdiği düşünülmektedir. Kanser kök hücreleri bu sayede

kendini yenileme özelliği kazanırlar ve normal doku kök hücrelerinin taşıdığı kök hücre antijenlerini taşırlar.

Kanser kök hücreleri tümörün tedavi yanıtında anahtar rol oynayan hücrelerden biridir. Bu hücrelerin, kemoterapötik ajanlara kanser hücrelerinden daha dirençli olduğu gösterilmiştir¹⁰. Çeşitli modaliteler ile başarılı tümör tedavileri sonrası yaşanan geç dönem rekürrensler, bu hücrelerin kanıtı olarak gösterilebilir. Yine kanser dormansisinin arkasında bu hücrelerin olduğu düşünülmektedir. Tüm bu veriler göz önüne alındığında kanser kök hücrelerinin hem tedavi rezistansı hem de başarılı tedavi sonrası kanser rekürrensinde rol oynayan temel hücre olduğu söylenilebilir.

2.1.2 Endotelyal Hücreler

TMÇ'deki hücre heterojenitesinin büyük bir kısmını stromal hücrelerin çeşitliliği oluşturmaktadır. Endotelyal hücreler ise, tümörün beslenmesini sağlayan damarları oluşturan en önemli stromal hücrelerden biridir. Bu hücreler anjiyojenik uyarılma (*angiogenic switch*) ile vasküler-endotelyal büyüme faktörü (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), *angiopoietin* ve fibroblast büyüme faktörü (*fibroblast growth factor*, FGF) sinyalleri üzerinden tümör damar mimarisini oluşturma amacı ile aktive olurlar¹¹⁻¹³.

Tümör damar mimarisi yapı ve fonksiyon olarak anormal bir yapıdır. Örneğin damarlar heterojen ve kaotik dallanmalar gösterirler. Damar lümenleri asimetrik ve sızdıran bir yapıdadır. Bu sızdıran yapı interstisyel basıncın artışına, eşit olmayan kan akışına ve homojen olmayan oksijenasyona neden olmaktadır. Bu da tümöre hipoksi olarak geri dönmektedir¹⁴.

2.1.3 Perisitler

Perisitler, parmaksı projeksiyonlar ile vasküler yapıların endotelyal kanalını saran özelleşmiş mezenkimal hücrelerdir. Normal dokularda, endotel hücrelerine parakrin destek sağlarlar. Endotel hücreleri ile iş birliği yaparak kan basıncına dayanıklılık sağlayan ve endotellerin tabanını oluşturan vasküler bazal membran oluşumuna katkı sağlarlar. Tümörlerde, perisit tarafından salgılanan platelet derive büyüme faktörü (*platelet derived growth factor*, PDGF) reseptörünün farmakolojik

inhibisyonu ile tümör damar yapısı çevresinde daha az perisit ve tümör damar yapısında destabilizasyon gözlenilmiştir¹⁵.

2.1.4 İmmün İnflamatuvar Hücreler

TMÇ hücre çeşitlerinin bir diğer alt grubu da immün inflamatuvar hücrelerdir. Bu hücreler TMÇ'de, tümörü destekleyici veya tümöre karşı savaşan görevlerde çalışıyor olabilirler⁵. Tümöre karşı savaşan sitotoksik T hücreleri ve doğal öldürücü hücreler (*natural killing cells, NK*) doğal hayatın akışına uygun davranışlar da tümörü destekleyen immün hücrelerinin varlığı bir hayli şaşırtıcıdır. Bu hücreler ile ilgili ilk kanıtlar 1990'ların başında elde edilmeye başlanmıştır. Bu hücrelerin olabileceği fikrinin kökleri kronik inflamasyonun tümöre neden olduğu ve tümörün aslında hiç iyileşmeyen bir yara olduğu konseptine dayanmaktadır^{16,17}.

Tümörü destekleyici immün sistem elemanlarına baktığımızda; makrofaj alt tiplerinin, mast hücrelerinin, nötrofillerin, B ve T hücrelerinin bu grupta yer aldığını görmekteyiz¹⁸⁻²⁰. Bu hücreler ile yapılan çalışmalar, hücrelerin tümörü desteklemek amacıyla salgıladığı sinyal moleküllerini de açığa çıkartmaktadır. Bu moleküllere örnek olarak: epidermal büyüme faktörü (*epidermal growth factor, EGF*), VEGF, FGF-2, kemokinler, sitokinler verilebilir. Bunların yanı sıra damarlanmayı ve invazyonu arttırıcı, ekstraselüler matriksi (*extracellular matrix, ECM*) yıkıcı enzimlerin de (matriks metalloproteinazlar, sistein katepsin proteazlar ve heparanazlar vb.) bu hücrelerden salgılandığı bilinmektedir²¹. Bu hücrelerin, salgıladıkları moleküllere uygun olarak tümör damarlanmasını arttırdıkları, tümör hücrelerinin çoğalmasına yardımcı oldukları, tümörün doku invazyonuna yardımcı oldukları ve metastatik sürece geçmekte rol oynadıkları gösterilmiştir¹⁹.

TMÇ'de farklılaşmış immün hücrelerin yanı sıra, henüz farklılaşmasını tam tamamlamamış myeloid progenitör hücreler de bulunmaktadır²². Bu hücrelerin de tümör destekleyici etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Özellikle bu etkiyi, sitotoksik T hücreleri ve NK hücreleri baskılayarak elde ederler²³.

T hücrelerine ayrıntılı bakıldığında, TMÇ'de birçok çeşit T hücrelerinin olduğu görülmektedir. Bu çeşitli T hücre popülasyonları, TMÇ içerisinde tümöre infiltre, tümör sınırında ve tümörü drene eden lenf nodlarında bulunabilirler. Bunlar arasında sitotoksik CD8+ hücreleri iyi prognozla ilişkilidirler²⁴. Bu hücreler antijen ile tanışmış

tecrübeli hücrelerdir ve bu tanıdıkları tümör hücrelerini öldürme kapasitesine sahiptirler. Sitotoksik CD8+ T hücreleri, CD4+ yardımcı T hücreleri-1 ile desteklenirler. Bu hücreler interlökin-2 (IL-2) ve interferon-gama (IFN-gama) sitokinlerini salgırlar ve TMÇ’de bu hücrelerin bol oluşu yine iyi prognoz ile ilişkilendirilmektedir²⁴. Bir diğer CD4+ popülasyonu olan yardımcı T hücreleri-2 ise; interlökin 4 (IL-4), interlökin 5 (IL-5), interlökin 13 (IL-13) salgırlar. Bu sitokinler B hücre yanıtını desteklerler. Bu hücrelerin tümör gelişimini destekleyici hücreler oldukları düşünülmektedir²⁴. Tümör destekleyici hücre olarak en sık adından söz edilen hücre ise T regülatuar (Treg) hücrelerdir. Bu hücreler FOXP3 ve CD25 ekspres ederler²⁵. Treg hücrelerin, interlökin-10 (IL-10) ve TGF-beta sitokinleri ve sitotoksik T lenfosit antijeni-4 üzerinden immün baskılayıcı fonksiyonları vardır. Bu hücreler kötü prognoz ile ilişkilendirilmişlerdir²⁶.

B lenfosit hücreleri ise tümörün sınırında, daha sık olarak da tümörü direne eden lenf nodlarında bulunurlar. B hücre infiltrasyonunun meme ve over kanserlerinde iyi prognoza neden olduğu gösterilmiştir^{27,28}.

NK hücrelerinin ise TMÇ’de bulunmalarına rağmen tümör hücreleri ile etkileşim halinde olmadıkları gösterilmiştir⁴. TMÇ’de buldukları halde bu hücrelerin anerjik fenotipe olduğu ve bu duruma TGF-beta’nın neden olduğu düşünülmektedir²⁴.

Tümör asosiyel makrofajlar (TAM) birçok insan ve deneysel fare tümör modelinde sıkça rastlanılan hücre popülasyonlarıdır ve çoğunlukla etkileri tümör destekleyicidir²¹. Bu hücrelerin özellikle hipoksik çevrede toplandıkları ve tümörün nekrotik parçalarında belirgin oldukları görülmüştür. Bu nekrotik bölgelerin VEGF salgılayarak TAM çektikleri düşünülmektedir²². Bu hücreler çekildikleri nekrotik bölgelerde, anjiyogeneze katkıda bulunurlar²⁹. Kötü prognozla ilişkilendirilmişlerdir ve tümörlerde migrasyon, invazyon ve metastaza yol açabilmektedirler⁴.

2.1.5 Kanser Asosiyel Fibroblastlar

Fibroblastlar, TMÇ’de her bir karsinom için ayrı oranda bulunsalar da birçok kanser türünde tümör stromasının en sık görülen hücresidir. “Kanser asosiyel fibroblast (KAF)” terimi 2 hücre için kullanılmaktadır. İlki, normal fibroblastlar gibi ECM’nin destek moleküllerini üreten hücreler, diğeri ise myofibroblastlardır. Myofibroblastlar

membranlarından alfa-düz kas aktini (*alpha smooth muscle actin, aSMA*) antijeni taşımaları ile ayırt edilirler. Sağlıklı epitel hücrelerinde seyrek olarak bulunurlar ancak yara iyileşmesi sürecinde geçici olarak miktarları artar⁵.

Myofibroblastların, tümör fenotipi oluşturmada yardımcı hücreler olduğu; kanser hücrelerinin çoğalması, damarlanması, invazyon ve metastaz özelliklerini indüklediği gösterilmiştir^{15,30}. ECM salgılayan bu hücreler, karsinomlarda bulunan desmoplastik stromanın (ECM’de fazlaca fibril olması) oluşmasını sağlarlar. Bu hücrelerin tümörlerdeki diğer etkileri hala çalışma konusudur.

2.1.6 Kanser Stromasının Kök Hücreleri (Mezenkimal Kök Hücreler)

Mezenkimal kök hücre, çeşitli mezenkimal hücrelere dönüşme potansiyeli olan (osteoblast, kondrosit, adiposit, kas hücresi, perisit, fibroblast ve hatta nöron) hücrelere verilen addır. Bu hücreler kemik iliğinde oldukça nadir bulunan hücrelerdir ve hematopoietik kök hücrelerin mikroçevresinde bulunarak çoğalmalarını kontrol ederler³¹.

Tümörle ilişkili stromal hücrelerin: halihazırda var olan stromal hücrelerin çoğalması, komşu normal dokudaki stromal kök hücrelerin çoğalması ya da kemik iliği kök hücrelerinin farklılaşması ile oluştuğu düşünülmektedir. Özellikle kemik iliği kök hücrelerinin TMC’deki stromal hücrelerin ana kaynağı olduğu savunulmaktadır³¹. Bu hipotezde, mezenkimal kök hücreleri ve öncü hücreler kemik iliğinden, VEGF gibi faktörler aracılığı ile TMC’ye yönlendirilirler. Bu hücreler TMC’de çeşitli stromal hücre tiplerine farklılaşmaktadırlar. Bazı hücreler ise farklılaşmamış fazda kalarak kök hücre gibi davranırlar. Bu durum fare tümör modellerinde kemik iliği kaynaklı mezenkimal hücrelerin yeşil floresan protein ile işaretlenerek TMC’de işaretli hücrelerin gözlenmesi ile gösterilmiştir^{32,33}.

2.1.7 Tümör Mikroçevresinin Ekstraselüler Matrisi

ECM, TMC’deki hücrelere fiziksel destek sağlayan yapıdır. Sadece fiziksel destek özelliği olmayan bu kompleks yapı, aynı zamanda tümörün gelişimi ve yayılımında dinamik bir rol oynamaktadır. TMC’ye hücre giriş çıkışının hücre adezyon molekülleri aracılığı ile düzenlenmesini sağlar⁴. ECM, ayrıca anahtar büyüme

faktörlerini, kemokinleri, anjijyojenik faktörleri barındırır. Bu faktörler hücre reseptörleri ile etkileşime geçerek her hücrenin kendi görevini yapmasını düzenler.

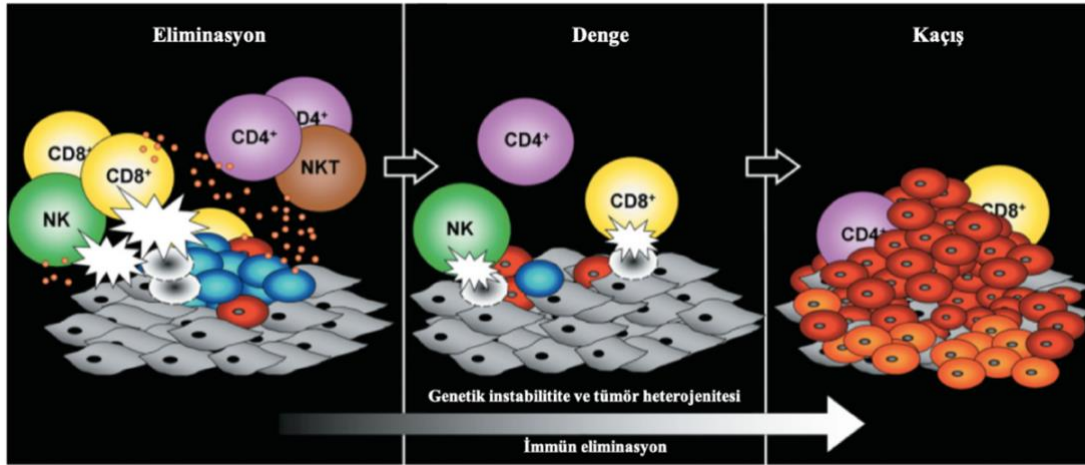
Tümörler genelde çevre dokudan daha katı bir yapıya sahiptirler. Bu özelliklerini KAF'lar tarafından bolca üretilen ECM depolanmasına borçludurlar. Kolajen ve elastin fiberler lizil oksidaz ile yeniden düzenlenir ve daha büyük ve sert fibriller haline getirilirler³⁴. Matriks metalloproteinazlar ise ECM proteinlerini yıkarak ECM'nin yeniden modellenmesine katkıda bulunurlar.

2.2 Melanom ve Melanom Tümör Mikroçevresi

Kutanöz melanom cilt kanserleri arasında en öldürücü olan tiptir ve sıklığı son on yılda belirgin artış göstermiştir³⁵. Yeni gelişen immünoterapi protokolleri ve tedaviler ümit verici olsa da malign melanom hala oldukça kötü prognoza sahip bir hastalık kategorisindedir. Prognoz; tümör kalınlığı, ülserasyon gibi primer lezyonun fiziksel paternlerine ve lenf nodu tutulumu gibi tümörün metastaz yapma kapasitesine bağlıdır. Melanom hücreleri ve melanom TMC'sinde yer alan hücreler arasındaki etkileşim, tümör proliferasyonu, farklılaşması ve progresyonundan yani tümör biyolojisinde anahtar rol oynamaktadır³⁶. Bir yandan da bu hücreler, diğer tümörlerden farklı immünojenik profile sahip oldukları için; TMC ve kanser hücreleri arasındaki iletişimi incelemek için uygun hücre türü olarak karşımıza çıkmaktadırlar.

Melanomagenez esnasında, hücre proliferasyonu ve apoptozis immün sistem düzenlemesi altındadır ve bu süreç birbiri içerisine geçmiş 3 fazdan oluşmaktadır (Şekil 2.1.). Bu fazlar: eliminasyon, denge ve kaçış fazlarıdır³⁷. Eliminasyon; TMC ve perifer normal dokulardaki NK, dendritik hücreler, B ve T hücreleri tarafından oluşturulan anti-melanom sitotoksik süreci kapsar. Denge süreci ise, kanser hücresi immünojenitesinin indüklendiği daha uzun bir süreci kapsamaktadır. Bu süreçte, tümör hücrelerinin bir yandan immün sistem tarafından eliminasyonu gerçekleşirken bu eliminasyona dirençli varyantların hakimiyeti kurulmuş olur. Denge fazında tümör hücrelerinin çoğalması ve adaptif immün sistem tarafından eliminasyonu birbirine dengeli olarak ilerler. İmmün sistemin fonksiyonel olarak bu dengede geri kalması; melanom hücrelerinden kaynaklanan sürekli antijen maruziyetinin inhibitör kontrol noktalarını aktive etmesi ile elde olur. Benzer şekilde melanom TMC'sinin TAM, Treg ve myeloid kökenli tümör baskılayıcı hücrelerden zenginleşmesi de T hücrelerinin

defektif sitotoksik faaliyetlerine katkıda bulunur. Bu faz ise immün sistemden kaçışı temsil eden fazdır³⁶.



Şekil 2. 1. İmmün eliminasyonun 3 fazı (Dunn G. ve ark., 2002'den³⁷ uyarlandı.).

Melanom, en immünojenik tümörlerden biridir. Melanomun TMC'si, birçok çeşit immün sistem hücrelerini (mast hücreleri, nötrofiller, dendritik hücreler, B lenfositler, T lenfositler, makrofajlar) içermektedir. Melanom TMC'si ile en fazla etkileşime geçen hücreler TAM'lardır³⁸. TAM'lar TMC'yi iki farklı türleri ile etki altında bırakabilirler. Eğer M2 tipine polarize olurlarsa, ki bu tip tümör oluşumunu destekleyen fenotiptir, ECM'nin yeniden modellenmesine katkı sağlarlar. Aynı zamanda, tümör büyümesinde, anjiyogeneze, anti tümör aktivitesinin baskılanmasında, kemokin-sitokin ve büyüme faktörü salgılanmasında görev alırlar³⁹. TAM'lar M1 tipine polarize olurlarsa, ki bu fenotip anti tümöral özelliklere sahip fenotiptir, reaktif oksijen (ROS) ve nitrojen türlerinin oluşumuna sebep olurlar. M1 tipi; tümör hücrelerinin fagositozunda, sitotoksik T hücrelerinin aktivasyonunda, proinflatuar sitokin ve kemokinlerin salgılanmasında görev alırlar⁴⁰.

KAF'lar melanom TMC'sinde önemli rol oynayan diğer hücrelerdendir. Tümör oluşumu ve tümörün çoğalmasının desteklenmesi önemli görevlerindedir. Bu hücreler ECM oluşumuna aktif olarak katkı sağlarlar, FGF ve TGF-beta gibi parakrin büyüme faktörlerinin salgılanmasını sağlarlar. Fibroblastlar perisitlere diferansiye olabilmektedirler, bu hücreler ise endotel hücreleri ile etkileşime geçerek anjiyogenezi indükler. Melanom hücrelerinden salgılanan PDGF, KAF'ları stimüle ederek bu hücrelerden insülin benzeri büyüme faktörü 1'in salgılanmasını sağlar ve parakrin

yolla melanom hücrelerinin proliferasyonunu stimüle edilir. Aktive KAF'lar endotelin ve FGF ile de melanom büyümesine sebep olabilmektedirler⁴¹.

Melanom ECM'si desmoplastik ya da miksoid (ECM'de proteoglikanın fazlaca olması) tipte olabilmektedir⁴². Melanom stromal reaksiyonunu, kolajen ve elastinin proteoliz ile yeniden modellenmesi, anjiyogenezin sağlanması ve tümörün invaziv kenarının lenfositler tarafından infiltre edilmesi oluşturur. Melanom kanser hücreleri aktif bir şekilde TMC'leri ile iletişim halindedirler. Bu etkileşim sadece hücre-hücre interaksyonu ile oluşmaz; hücre ECM etkileşimleri, hücre sitokin ve büyüme faktörleri etkileşimi de oldukça sık görülmektedir.

Melanom hücreleri tüm TMC'nin yapısına etki eden bir metabolik yeniden programlanma kabiliyetine sahip hücrelerdir. Melanom hücrelerinde baskın solunum yolağı olan laktat, bu yeniden modellemede oldukça etkin bir son üründür. Laktat, proinflatuar sinyalleri baskılayarak daha önce bahsedilmiş olan M1 TAM'ların M2 fenotipine dönüşümünden sorumludurlar. Bu durum tümör gelişimine katkı sağlar⁴³. Laktat dehidrogenaz (LDH) enzimi de laktat oluşumundan sorumlu bir enzim olduğundan; LDH'si fazla olan hücrelerin kötü prognoz göstermesi bu fenomen ile açıklanabilir. Laktat bunun haricinde dendritik hücrelerin maturasyonunun inhibisyonundan da sorumludur. Bu durum, immün süpresif bir sitokin olan IL-10 miktarının TMC'de artışına yol açar ve anti-tümöral yanıtın daha da artmasına sebep olur⁴⁴. Dendritik hücrelerin kendilerine antijen sunması ile, tümöre karşı bir tehdit haline gelen CD8+ hücrelerin oluşumu ise sekteye uğrar. Kanser hücrelerinin öldürülmesinde anahtar rol oynayan CD8+ T hücrelerinin, tümöre karşı olgunlaştırılmaması, tümöre karşı oluşturulan immün yanıt için büyük bir kayıptır⁴⁵. Laktat CD8+ T hücrelerinin olgunlaşmasını önlerken, bir yandan da bu hücreleri anerjik duruma sokarak hücrelerin etkin bir şekilde çalışmasına engel olur⁴³. Glikozdan düşük, laktattan zengin melanom TMC'sinde sitotoksik T hücreleri fonksiyon gösteremezken, tümörü destekleyen Treg'ler baskın popülasyon haline gelir. TMC'de laktat kadar önemli olan diğer metabolitler triptofan ve adenzindir. Triptofan, yardımcı T-1 hücrelerinin IFN-gama salgılaması aşamasında ortaya çıkar ve kinürenine metabolize olur. Kinürenin de laktata benzer şekilde, M2 fenotipte TAM oluşumu ve Treg'lerin aktive olması gibi etkiler yapar⁴⁶. Melanom hücresi immün kaçışında etken maddelerden birisi de adenzindir. Ekstraselüler adenzin, A2A

adenozin reseptör üzerinden immün süpresif etkileri aktive etmektedir. Myeloid kökenli süpresör hücreler ve Treg'ler yine adenozin sayesinde aktive olur⁴⁷.

2.3 Tümör Mikroçevresinin Sinjenik Fare Tümör Modeli ile İncelenmesi

Kompleks bir yapı olan kanserin biyolojik davranışının anlaşılması ve çeşitli tedavi modalitelerinin tümör üzerinde oluşturduğu etkilerin incelenmesi için hayvan tümör modelleri kullanılmaktadır. Bu amaçla fare, insan fizyolojisinin biyolojik taklitçisi olarak en sık kullanılan deney hayvanı cinsidir. Fareler, gerek insanlarla olan embriyonel gelişim basamaklarındaki benzerlikler gerekse benzer kompleks düzenleyici mekanizmaları nedeniyle kanser çalışmaları için uygun deney hayvanlarıdır. Daha da önemlisi fare ve insan genomları arasındaki yüksek derecedeki benzerlik, genlerin işleyişi arasında kesişime neden olmaktadır⁴⁸. Bu benzerliklerin yanında farelerin kısa hayat döngüleri kanserin oluşumu ve gelişimini çalışmak için kolaylık sağlamaktadır. Farelerin küçük ve manipüle edilmesi kolay hayvanlar olması da ideal laboratuvar hayvanı olmalarına katkı sağlayan faktörlendir⁴⁸.

Fare kanser modeli oluşumu için laboratuvarında uygulanan yaklaşımlar beş kategoride incelenebilir. Bunlar: Hücre kültürü kaynaklı xenograflar, sinjenik tümör modelleri, hasta kaynaklı xenograflar, kimyasal olarak indüklenmiş ve genetik olarak modellenmiş tümör modelleridir.

2.3.1 Hücre Kültürü Kaynaklı Xenograflar

Hücre kültürü kaynaklı kanser modeli ilk defa 1980'lerde Fidler ve arkadaşları tarafından literatüre sunulmuştur⁴⁹. İmmün yetmezliği olan farelere subkutan kanser hücrelerinin enjekte edildiği xenograft model, hem uygulama kolaylığı hem de tümör büyümesinin rahat izlenmesi nedeni ile en sık kullanılan fare tümör modeli olmuştur⁵⁰. Tümörün köken aldığı organda oluşturulan modeller ile, tümörün organa spesifik TMC etkileşimleri, invazyon özellikleri ve orijinal metastaz yolları incelenmiş olur. Her ne kadar bu tümör modeli kanser dinamiklerini incelemeye mükemmel bir yöntem gibi görünse de kanser hücrelerinin gösterdiği yüksek genetik instabilite; petri kabında birçok kere pasajlanarak elde edilen kanser hücrelerinin orijinal hücreden farklı özellikler göstermesine neden olabilmektedir. Preklinik ilaç geliştirme ve tedaviye

direnç çalışmalarında ise bu önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Yine immün yetmezliğe sahip farelerde, tümör modellerinde TMC'yi incelemek mümkün olamamaktadır⁴⁸.

2.3.2 Sinjenik Tümör Modelleri

Hücre kültürü kaynaklı xenograft tümör modellerindeki orijinal immün sistemi taklit edememe ve buna bağlı olarak TMC'yi gözlemlememe sorununun üstesinden gelebilmek için sinjenik tümör modelleri oluşturulmuştur. Bu tümör modeli, fareye uygun “*major histocompatibility complex (MHC)*”e sahip tümör hücresinin, çoğunlukla subkutan olarak fareye inoküle edilmesi ile elde edilir. Yani fareye inoküle edilen tümör hattı, orijinal fare tümöründen elde edilmiş hücre hattıdır⁴⁸. Bu sayede, kanser hücreleri ve konak immün sistem arasındaki etkileşimler ve TMC incelenme şansı bulabilmektedir. İmmünoterapi ve TMC inceleyen çalışmalarda sıklıkla uygulanan tümör modeli yöntemi sinjenik tümör modelleridir. TMC'nin doz hızı ile etkileşimini inceleyen çalışmamızda, bu nedenlerle B16-F10 melanom hücreleri ile sinjenik tümör modeli oluşturulmuştur.

2.3.3 Hasta Kaynaklı Xenograftlar

Bu tümör modeli, hücre kültürü kaynaklı tümör modellerindeki sorunların üstesinden gelinebilmesi için 1984 yılında Fiebig tarafından ortaya atılmıştır⁵¹. Bu model, insandan cerrahi veya biyopsi yolu ile elde edilen küçük tümör parçasının (2-3 mm³), konak immün yetmezliği olan fareye ortotopik yahut heterotopik transplante edilmesi ile oluşturulmaktadır. Bu modeller her ne kadar elde edilmesi zor modeller gibi görünse de tümörün fizyolojik dinamiklerinin incelenmesi açısından, orijinal tümörle birebir aynı hücre kullanıldığından, daha avantajlı modeller gibi gözükmektedir. Bu modellerle ilgili temel endişe ise insan kaynaklı TMC'nin farede doğal akışına uygun çoğalamaması ve TMC'nin sağlıklı olarak incelenemesidir⁴⁸.

2.3.4 Kimyasal İndüklenilmiş Tümör Modelleri

Kimyasal kaynaklı modeller farenin çeşitli karsinojenik kimyasal ajanlara maruz bırakılarak tümör modeli oluşturulmasına dayanmaktadır. Bu modeller tümör dinamiklerinin incelenmesi için ideal modeller gibi görünse de, laboratuvar

koşullarında oluşturulmalarının zorluğu bu yöntemin kullanılmasının önündeki temel engeldir⁴⁸.

2.3.5 Genetik Olarak Modellenmiş Tümör Modelleri

Genetik olarak Modellenmiş tümör modelleri ise, fare gamet hattında mutasyon oluşturularak elde edilen özel kansere yatkın fare türlerinin oluşturulduğu sofistike bir yöntemdir. Diğer yöntemlerin aksine maliyetli ve yüksek teknoloji gerektiren bir tümör modeli olarak karşımıza çıkmaktadır⁴⁸.

2.4 Radyasyonun Hücresel Etkileri

Radyasyonun hücre ile etkileşimi ile önce fiziksel olaylar kaskadı, sonrasında biyolojik olaylar kaskadı oluşur. İlk iyonizasyon 10^{-15} sn'de meydana gelir. İyonizasyon ile gerçekleşen elektron salınımı sonucu oluşan ilk serbest radikallerin yaşam periyodu 10^{-10} sn'dir. Bu olaylar sonucunda direkt etki ve indirekt etki ile deoksiribonükleik asit (DNA) radikalleri oluşur. Kimyasal bağların kopması sonucu meydana gelecek biyolojik etkiler için ise saatler, haftalar, aylar gerekebilir. Eğer sonuç olarak hücre ölümü elde edilecek ise, saatler veya günler içerisinde hasarlı hücre bölünme girişiminde bulunduğu elde edilebilir. Lakin, onkogenik bir sonuç elde edilecek ise bu sürecin gelişimi yılları bulabilir. Kalıtsal bir değişiklik için ise sonuçların eldesi birkaç jenerasyon geçmesini gerektirebilir.

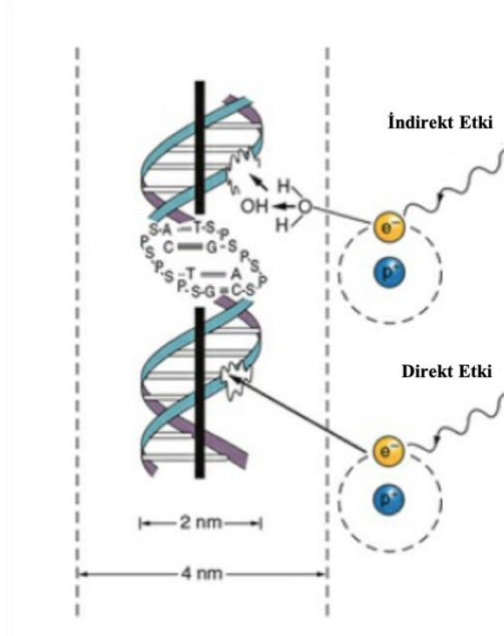
2.4.1 Direkt Etki, İndirekt Etki ve DNA Hasar Tipleri

Radyasyonun biyolojik etkileri, hücre çekirdeğinde bulunan DNA'ya yapılan hasar üzerinden gerçekleşmektedir (Şekil 2.2.). Radyasyon, hücreler ile etkileşime girdiğinde öncelikle sekonder elektronlar oluşur. Hücredeki atomlar, iyonize ya da eksite olarak biyolojik değişiklikler ile sonuçlanacak olaylar kaskadını başlatırlar. Bu etki radyasyonun "direkt etkisi" olarak adlandırılır. Nötronlar, alfa parçacıkları gibi radyasyon çeşitlerinde, yani lineer enerji transferi (LET) yüksek olan radyasyon tiplerinde baskın radyasyon etkisidir.

Radyasyon direkt etkinin yanı sıra, hücredeki diğer atom ve moleküller ile etkileşime geçerek (özellikle su ile) serbest radikal oluşturularak hücre içerisindeki kritik yapılar ile etkileşime geçebilir. Serbest radikal, dış katman orbitalinde eşleşmemiş

elektron taşıyan atom veya moleküle verilen isimdir. Bu durum yüksek oranda kararsızlık ile ilişkilidir. Bu olay sıklıkla su molekülü ile gerçekleşir. Su molekülü, radyasyon ile etkileşime geçtiğinde, “hidroksil” serbest radikalini oluşturur. Bu serbest radikalın, 2 nanometre (nm) boyutundaki DNA ile etkileşime geçebilmesi için DNA'nın 4 nm periferinde yer almalıdır. Difüzyon yolu ile DNA'ya yaklaşan bu son derece reaktif moleküller DNA ile kimyasal etkileşime girerek bağların kopmasına ve kimyasal değişikliklere sebep olurlar.

Radyasyonun DNA üzerindeki hasarını letal hasar, subletal hasar ve potansiyel letal hasar olarak üç sınıfta inceleyebiliriz. Letal hasar, hücreyi direkt öldürme yetisine sahip, tamir edilemez, asimetrik çift zincir kırık hasarları (anafaz köprüsü, *ring* ve *dicentric* aberrasyonlar) anlamına gelmektedir. Subletal hasar ise letal hasar oluşturmayan ancak daha fazla İR etkileşimi ile letal hale gelebilecek, tek zincir kırık hasarlarını temsil etmektedir. Elkind ve Sutton tarafından ortaya konan bu mekanizma, bir hücre popülasyonunun iki fraksiyonda ışınlanması sırasında, fraksiyonlar arası süre uzatıldığında yaşayan hücre oranının artması gözlemine dayanır⁵². Subletal hasar tamiri, sağ kalım eğrisinde omuz gösteren, yani β değeri sıfırdan farklı hücrelerde gösterilebilmektedir. Bir dokunun α/β oranı ne kadar küçük ise, o kadar sağ kalım eğrisinin omzu genişleyecek, o kadar subletal hasar kabiliyeti artacak ve o kadar radyasyon direncine sahip olacaktır. Bu tamir mekanizması farklı doz hızlarına farklı yanıt verilmesinin de altında yatan temel mekanizmasını oluşturmaktadır. Potansiyel letal hasar ise, kötüleşen çevre koşullarında bölünme fonksiyonunu durduran hücrenin, subletal hasar tamiri kabiliyetinin artması ile sağ kalım fraksiyonunun artması olayıdır.



Şekil 2. 2. Radyasyonun direkt ve indirekt Etkileri (Hall E.'den⁵³ uyarlandı.).

2.4.2 Radyasyonun Hücre Ölüm Mekanizmaları

Hücre döngüsü iki ana bileşenden oluşan, son derece kontrollü bir süreçtir. Temel olarak interfaz (G1, S, G2) ve mitozdan oluşur. Hücre interfaz sırasında organel sayısını çoğaltır (G1), DNA miktarını iki katına çıkarır (S) ve bölünmeye hazır hale gelir (G2). Radyasyona bağlı DNA hasarı, “*ataxia telangiectasia mutated (ATM)*” kinaz ve “*ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR)*” tarafından fark edilerek, radyasyona bağlı hasara karşı cevap kaskadı başlatılır⁵⁴. Bu durum hücre döngüsünün durmasına ve “*non-homologous end joining (NHEJ)*” ve “*homologous recombination (HRR)*” hücre hasar tamir mekanizmalarının aktive olmasına neden olur. NHEJ tüm hücre döngüsü boyunca aktive ancak hataya meyilli bir tamir mekanizmasıdır. HR ise sadece G2 ve S fazında aktif olan ve sağlam bir kız kardeş kromatid gerektiren bir mekanizmadır. Eğer hasar tamir edilemeyecek kadar ağırsa birazdan bahsedilecek mekanizmalar ile hücre ölüme gider. Bu ölüm interfazda veya mitotik fazda gerçekleşebilir.

“Mitotik katastrof ve mitotik ölüm” mitozu tamamlayamayacak kadar hasar almış hücrelerin, mitoz arresti, regüle hücre ölümü ve hücre yaşlanması (*senescence*) ile kontrollü bir şekilde ölümüdür. Mitotik katastrofa uğrayan hücreler, bölünmeye devam edemezler. Bu mekanizmanın başlangıcı ve sonlanmasının mekanizması tam

olarak aydınlatılamamakla birlikte, hücrelerin bu mekanizmayı tetiklemeleri için birkaç bölünme döngüsü ile yeterli genetik hasar oluşturmaları gerekebilir⁵⁵.

“Apoptoz” ise yüksek derecede kontrol altında yönetilen bir hücre ölüm sürecidir. Karakteristik morfolojik ve moleküler özelliklere sahiptir. İntrinsik (mitokondrial) apoptotik yolak DNA hasar tamir mekanizmaları tarafından aktive edilir. Bu süreçte yer alan en önemli gen p53’tür. Ekstrinsik yolda ise, tümör nekroz faktörü (TNF) hücre membran reseptörlerine tutunarak apoptoz kaskadını başlatır. İR’ye maruz bırakılan hücreler bu membran reseptör sayılarını arttırarak apoptoza yatkın hale gelebilirler. Üçüncü yolak ise seramid yolağıdır ve asid sfingomyelinazın radyasyon ile aktive olması ve sfingomyelinin seramide yıkılması ile başlatılır⁵⁵.

“Nekroz” ise apoptozun tam aksine regülasyon altında olmayan, kaotik bir ölüm şeklidir. Radyasyon sonrası hücrede ve TMC’de gelişen pH değişimleri, iyonik dengesizlikler gibi uç çevresel değişiklikler nedeni ile ortaya çıkabilir. Apoptoza benzer şekilde spesifik bir morfolojisi vardır⁵⁵.

“Hücre yaşlanması” ise hücre döngüsünün kalıcı olarak durmasına işaret eder. Bu durumda hücreler metabolik olarak aktif olsalar bile çoğalamayacakları için ölü kabul edilirler. Radyasyon kaynaklı hücre yaşlanması; DNA hasarı, buna bağlı gelişen p53 ve Retinoblastom (Rb) yolaklarının aktive olması ise hücre döngüsü bloklanması ile meydana gelir.

“Otofaji” ise hücre stres nedeni ile hücre sitoplazmasında sekestre edilmiş olan litik enzimlerin salıverilmesidir. Bir çeşit hücrenin kendi kendini sindirmesi olarak tanımlanabilir. Radyasyon nedeni ile ortaya çıkan otofajide tam mekanizma hala tam olarak bilinmese de mTOR ve ATG yolaklarının bu süreçte rol aldığı düşünülmektedir⁵⁵.

Son zamanlarda bu ölüm çeşitleri haricinde “nekroptoz” ve “ferroptoz” gibi yeni ölüm mekanizmaları keşfedilmiştir ancak bunların ne kadar oranda hücre ölümüne rol aldıkları henüz tartışma konusudur^{56,57}.

2.5 Radyoterapinin Tümör Mikroçevresi Üzerine Etkileri

Radyasyon, hücrelerin direkt destrüksiyonu yanı sıra, immün sistemi de aktifler. Bu fenomen “in situ aşılama (*in situ vaccination*)” olarak adlandırılmaktadır⁵⁸. Kanserle immün sistem uyarılması yolu ile savaşmak son dönemde oldukça popüler

bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu noktada RT, birçok immün yolağın modülatörü olarak devreye girmektedir. Bu yolaklar: antijen salınımı ve tanıtılması, T lenfositlerin aktivasyonu, tümör içerisine T tümör hücrelerinin daveti ve çoğaltılması, tümörün T lenfositler tarafından tanınması ve öldürülmesidir. T hücreler tarafından öldürülen hücrelerden salınan antijenik faktörler “radyasyon ile ilişkili antijenik proteinler” olarak isimlendirilirler. RT ile T hücre aktivasyonu, immünojenik hücre ölümüne sebep olur ve böylelikle tümör asosiye antijenler (TAA) salınır. TAA’lar immün sistem ve tümör arasındaki diyalogu başlatırlar⁵⁹.

2.5.1 Doğal ve Adaptif İmmün Yanıt Üzerine Etkileri

RT; NK hücre aktivasyonu, tümör infiltre eden sitotoksik CD8+ T hücre aktivasyonunu, M1 TAM aktivasyonunu ve Fas ve IFN-gama salınımını ve PD-1/PD-L1 (*programmed death-1/ programmed death-ligand 1*) yolağını inhibisyonunu sağlayıp TMÇ’de Treg hücre popülasyonunun düşmesini sağlayarak immün sistemi aktifleyici etkilerde bulunur. TMÇ’nin transformasyonu RT’nin indirekt bir etkisidir. Ayrıca, RT hücre membranındaki MHC sayısını artırır. Antijen sunan dendritik hücrelerin aktivasyonu da RT sonrası salgılanan çeşitli faktörler ile artar. Bu faktörler: adozin trifosfat (ATP), “*high mobility group box 1* (HMGB1) proteinleri, ısı şok proteinleri (*heat shock proteins – HSPs*)’dir. ATP aynı zamanda tümör yerine, monositleri davet eden bir faktördür. HSP70 sitoplazmadan ECM’ye transfer edilerek monosit TAM ve dendritik hücrelerin aktivasyonuna sebep olur⁵⁹.

2.5.2 T Lenfosit Aktivasyonu

Aktive edilmiş dendritik hücreler, lenf nodlarına göç ederek T hücrelerini aktive ederler. RT ile artan MHC-1, TAA ve Fas/Fas ligand yolakları ile tümör hücreleri, sitotoksik T lenfosit saldırısına açık hale getirilir. Yine ölen hücrelerden salınan HMGB1, T hücrelerini aktive eder. T hücrelerini tümör sahasına çeken diğer faktörler ise pro-inflamatuar faktörler olan interferonlar ve kemokinlerdir. RT, C-X-C motif ligand (CXCL)9 ve CXCL16 kemokinlerinin salınımına sebep olarak CD8+ ve CD4+ T lenfositlerini tümör yerine davet eder. Ayrıca indüklenen “stimulator of interferon genes (*STING*)” yolağı ile artan IFN, CD8+ hücreler üzerinde etkili bir diğer sitokindir. STING proteini, siklik guanin adenin monofosfat (GAMP) sentetaz (cGAS)

tarafından oluşturulan siklik guanin monofosfat – adenin mono fosfat (GMP-AMP) ile aktive edilir; cGAS sitoplazmadaki radyasyon tarafından oluşturulan *double strand DNA (dsDNA)* fragmanlarını tespit ederek aktive olur. Aktive olan Tip 1 IFN, dendritik hücreleri stimüle eder; böylelikle T hücreleri aktive olur ve hem radyasyon verilen saha hem de lenf nodlarında immün sistem stimüle edilmiş olur⁵⁹.

2.5.3 İmmün Hücrelerinin Tümör İnfiltrasyonunun Sağlanması

RT, tümörde lökosit infiltrasyonunu üç temel mekanizma ile gerçekleştirir. İlki vasküler yapının değiştirilmesi, ikincisi adezyon moleküllerinin ekspresyonunun artırılması ve son olarak kemokin sekresyonunun artırılmasıdır. Öncelikle inflamatuvar sitokinler ile (IL-1, TNF, tip 1 ve 2 IFN vb.) lökositler tümör yerine çağrılır. RT ile bozulmuş ve sızdırmaya meyilli hale gelmiş damar yapısı ve yine RT ile artırılmış adezyon molekülleri ile lökositlerin kolaylıkla TMCÇ'ye geçmeleri sağlanır. RT ile artırılan adezyon molekülleri hücreler arası adezyon molekülü-1 (*intercellular adhesion molecule, ICAM-1*) ve damar-hücre adezyon molekülü (*vascular cell adhesion molecule, VCAM-1*)'dür. Ayrıca RT ile ortaya çıkan ROS nedeni ile hızlı ve fazla nötrofil akümülyasyonu da gerçekleşir⁵⁹.

2.5.4 Radyoterapi Sonrası Tümör Mikroçevresinin Sistemik Etkileri

TMCÇ, RT'ye lokal etkilerle yanıt verdiği gibi sistemik etkiler ile de yanıt verebilir. Bu nedenle RT'nin tedavi sahası dışındaki tümör hücrelerine de etkileri olabilir. Bu etkiler “*by-stander etki*” ve “*apiskopal etki*” olarak iki başlıkta değerlendirilebilir. By-stander etki, RT sonrası hücrelerin çevrelerindeki radyasyona maruz kalmamış hücrelere de sinyal yolları ile etki etmesi anlamına gelmektedir. Apiskopal etki ise, RT sahasına uzak bir noktadaki radyasyona bağlı etki anlamına gelmektedir⁶⁰. Lokal antijen salınımı ile aktive edilen NK hücreleri, sitotoksik T hücreleri ve yardımcı T hücreleri, RT uygulanan alan dışındaki tümör hücrelerini de hedef alabilmektedir.

2.5.5 Radyoterapi Sonrası İmmünsüpresif Yollar

Paradoksal olarak, RT sonrası TMCÇ'de immün stimülasyona yol açan bazı yollar aynı zamanda immünsüpresif davranışa da yol açabilmektedir. Bunlar; aktive

olan STING yolağının mezenkim kök hücrelerinin sayısını arttırması, cGAS-STING DNA tespit edici yolağının bir yandan dendritik hücrelerde IL-1 beta'yı azaltarak antijen sunumunu inhibe etmesi, tip 1 ve 2 interferon salınımının PD-L1 ekspresyonunu arttırarak T ve NK hücrelerinin faaliyetlerini inhibe etmesi olarak örneklenebilir. Pro-inflamatuar faktörler, tümör proliferasyonu arttırıcı etkileri, genomik instabilite ve somatik hipermutasyonu tetiklemesi ile tümör progresyonuna neden olabilir. Bu süreçlerde, immünsüpresif hücreler de görev almaktadır. Bu hücreler Treg'ler, dendritik hücreler, TAM'lar, mezenkimal kök hücrelerdir. TGF beta, radyosensitiviteyi azaltarak tümör hücrelerinin RT'ye yanıtını, dolayısı ile in situ aşılama sürecini sekteye uğratar. Bununla birlikte Treg popülasyonunu arttırır ve NK ve T hücre popülasyonlarını azaltır⁵⁹.

RT sonrası saatler içerisinde granülosit makrofaj koloni stimüle eden faktör aktivasyonu gerçekleşir. Bu faktör kemik iliğindeki mezenkimal kök hücrelerin periferik dolaşıma sonrasında da tümör alanına çekilmesini sağlayan bir faktördür. RT, klasik bir mezenkimal kök hücre indükleyici olan C5a kemokinini de arttırır. Mezenkimal kök hücreler radyoprotektif etkiler gösteren hücrelerdir. Bu hücreler, TMÇ'de granülosit ve TAM'lara evrilirler. TAM'lar ise M1 yahut M2 alt tiplerine farklılaşma gösterebilir. RT sonrası apoptotik hücreler, M2 fenotipindeki TAM'ları aktive ederek TGF beta ve IL-10 gibi anti-inflamatuar sitokin salınımını tetiklerler. Bu durum anti-tümöral etkinin baskılanmasına sebep olmaktadır. Yine RT sonrası oluşan hipoksi, hipoksi ile indüklenen faktör alfa (*hypoxia induced factor alpha*- HIF alfa) salınımına, buna bağlı olarak PD-L1 artışına neden olur. Yine RT ile indüklenen Treg hücreleri RT'nin etkinliğini etkileyen önemli hücrelerdendir. Hücrelerden salınan adozin bu indüklemeye etkili olan faktördür. Yine TGF-beta da hem Treg infiltrasyonunu hem de radyorezistansı arttırır⁵⁹.

2.5.6 Radyoterapi Sonrası Tümör Vasküler Yapısı

TMÇ'de damarların yapısının değişimi, RT'nin TMÇ'ye önemli etkilerinden biridir. Tümörlerde yeni oluşan vasküler yapılar sıklıkla bazal membrandan ve perisitlerden yoksun bu nedenle de daha geçirgen, sızdırıcı ve RT'ye duyarlıdır. RT bu yeni oluşturulmuş damarları, endotel hücresi hasarı ile daha sızdırıcı hale getirir, hali hazırda var olan ve bazal membranı bulunan vasküler yapılarda ise endotel

hücrelerin bazal membrandan ayrılması ve hücrelerin apoptozise gitmesine sebep olur. RT'nin sebep olduğu apoptozis vasküler yapının kesintiye uğramasına ve tümör hücre hasarına neden olmaktadır. Endotel hücrelerinde apoptozis haricinde hücre yaşlanması da RT sayesinde gerçekleşebilir. Bu olayda, endotel hücreleri fonksiyonel değişim, anjiyogenezin azalması ve oksidatif stres ve inflamasyonun artması gibi değişimlere uğrarlar. Hem apoptotik hem de yaşlı endotel hücreleri salgıladıkları sitokinler ile vasküler disfonksiyona katkıda bulunurlar⁶¹.

RT sonrası gelişen yıkıcı etkiler karşısında, tümörlerden yaşama döngülerini destekleyici sitokinler salgılanır. Bu sitokinler, endotel hücrelerin apoptozisi, vasküler yıkım ve anti-kanser RT etkilerini durdurmaya çalışır. Bu süreçler: integrin ekspresyonunun artırılması, Akt fosforilasyonu, VEGF reseptör 2'nin ekspresyonunun artırılması ve FGF'nin salınımının artırılmasıdır. Adezyon moleküllerinin artırılması ile tümöre monositler davet edilerek RT'nin yaptığı hasar onarılmaya çalışılır. RT'nin etkileri ve RT'nin etkilerinden korunmak için yapılan bu etkiler metastatik süreçlerin hızlanmasına yol açabilir⁶².

Radyasyona maruz kalmış dokuda yeni oluşan hücrelerin yapısında da aksaklıklar bulunur. RT'nin etkisi ile yıkıma uğrayan vasküler yapılar nedeni ile, var olan vasküler yapılar arasındaki mesafe artar ve buna bağlı olarak doku perfüzyonu azalır. Vasküler yapılar daha kalın ve ateroskleroza yatkın hale gelirler. Bunları tromboz, fibroz ve damarda medial nekroz, telenjektazi oluşumu, kapiller destrüksiyon takip eder. Tüm bu damar yıkımı esnasında, anjiyogenez de inhibe edilir. RT sonrası oluşan bu perfüzyon eksikliği hipoksiye neden olur. Hipoksi oksijene bağlı RT DNA hasarını azaltır ve radyasyon direncinde hayati önem taşımaktadır⁵⁹.

2.6 Farklı Dozların Tümör Mikroçevresine Farklı Etkileri

RT'de tedavinin verilmiş biçimi spesifik immün cevap oluşumunda anahtar etkiye sahip olabilmektedir. RT'nin immün sistem üzerindeki etkilerinin doza, sistemik tedavi ile birlikte zamanlamasına ve radyasyona maruz bırakılan hacme göre değişebildiği literatürde prelinik çalışmalar ile gösterilmiştir⁶³. İmmün çevrede RT dozunun düşük veya yüksek olmasına göre farklı tipte immün hücreleri tümöre davet edilir ve aktive edilir. T hücrelerinin radyosensitivitesi buldukları faza bağlı olarak değişir. Antijen tanıtılmamış, aktive olmamış T hücreleri daha radyosensitif iken, Treg

hücreleri en radyorezistan T hücre klonunu oluşturmaktadır. B hücreleri ise radyasyona oldukça duyarlı hücrelerdir⁶⁴.

Düşük doz RT efektif bir anti-tümör cevap oluşturamıyor gibi gözükmektedir; ancak 2 Gy ve altı dozlarda TMC'de Treg hücre sayısının azaldığı ve sitotoksik T hücrelerinin sayısının arttırdığı gösterilmiştir. Endotel hücrelerinde ise ICAM-1 ve e-selektin ekspresyonunun artması TMC'ye immün hücre geçişinin arttırmaktadır. Tek doz 2 Gray (Gy) RT ile, TMC'ye CD8+ ve CD4+ T hücrelerinin daveti sağlanabilir⁵⁹.

Yüksek doz RT'nin ise, özellikle 8-10 Gy dozlar ve üzerinde, daha etkili bir immün yanıt oluşturulduğu gösterilmiştir. Düşük doz RT'nin baskın olarak apoptozisi indüklediği, yüksek dozların ise nekroza sebep olduğu düşünülmektedir. Hipofraksiyone RT rejimlerinde yapıldığı gibi, fraksiyon başına yüksek dozlarda RT verilmesi immünojenik hücre ölümüne neden olmaktadır. Antijen sunan hücrelerin sayısı artırılarak tümörün daha çok immün hücre ile infiltre edilmesi sağlanır. Endotel hücrelerinde ise yine doza bağlı etkiler görülür, düşük doz RT'de endotel hücreleri yaşamını sürdürerek hücre yaşlanması fazına girerler, yüksek dozlarda ise apoptozis tetiklenir. Yine düşük doz RT vasküler yapıların stabilitesinde değişikliğe neden olmaz bu da tümörün T hücre infiltrasyonunu kolaylaştırır, yine düşük dozlarda anjiyogenez ve yeni damar yapımı aktiflenir. 5-10 Gy ve üzeri dozlarda ise damar yıkımı gerçekleşir. Bu durum tümör perfüzyonunu ve oksijenlenmesini zora sokar. Tümör hücreleri ölür ve tümör volümünde küçülme yaşanır ancak; hipoksi de bu durumla beraber gelir. Hipoksi ise radyasyon direncinin önünü açar⁵⁹.

Farklı dozlarda olan TMC'deki kompleks ve değişik etkileşimler literatürde prelinik çalışmalar ile ispatlanmıştır. Ancak RT'nin önemli bir değişkeni olan doz hızının TMC üzerindeki etkileri ile ilgili sınırlı veri mevcuttur.

2.7 Radyoterapide Doz Hızının Önemi

Doz hızı, birim zamanda verilen radyasyon miktarı olarak tanımlanır ve birimi Gy/dk'dır. Bu kavramın memeli hücreleri sağ kalım grafiği üzerindeki etkileri 1970'lerden itibaren çalışılmaktadır. Radyasyon Onkolojisi'ndeki yeni gelişmeler ve yeni teknolojik cihazlar, yüksek doz RT'nin daha kısa zamanda verilmesine olanak sağlamaktadır. Özellikle *flattening filter free* (FFF) tedavi sistemlerinin hayatımıza girmesi, klasik eksternal RT şemalarında daha yüksek doz hızı ile tedavi vermeyi

olanaklı kılınmıştır. Her ne kadar doz hızının tümör kontrolü üzerinde etkileri üzerine literatürde tartışılabilir veriler bulunsa da genel kanı RT'nin hücre öldürme etkisinin doz hızı düştükçe azaldığı yönündedir^{65,66}. Mekanizması klasik olarak uzun RT maruziyetinin subletal hasar tamirine olanak sağlamasına dayanmaktadır. Özellikle subletal tamir yetisi oldukça fazla olan, α/β değeri düşük melanom gibi tümörlerde doz hızı etkisinin belirgin olması beklenmektedir. Literatürde doz hızının tümör kontrolü ve normal doku üzerindeki etkileri ile ilgili veriler sınırlı olmakla birlikte doz hızının, tümörün tedaviye yanıtı ve dirençliliğini etkileyen temel öğelerden biri olan TMC üzerinde olan etkilerini araştıran çalışma yok denecek kadar azdır.

Literatürde hücre serileri üzerine yapılan çalışmalarda, yüksek doz hızının bahsedilen hücre tamir mekanizmalarını etkileyerek tümör hücre serileri üzerinde daha letal etki yaptığı da gösterilmiştir⁶⁷. Doz hızının tümör hücreleri üzerine etkilerini inceleyen çalışmaların çoğu prelinik çalışmalardır. Mu ve arkadaşlarının, kemirgen fibroblastları üzerinde yaptığı bir çalışmada 2 Gy doz, farklı doz hızlarında verilmiştir. Düşük doz hızında, yani fraksiyon süresinin uzadığı kolda, DNA tamiri sebebi ile daha az ölümcül etki görülmüştür. Bu etki literatürde düşük doz hızının “koruyucu” etkisi olarak geçmektedir ve tümör dokusu için de düşük doz hızlarında tehlike arz etmektedir⁶⁸. Moiseenko ve arkadaşları da kemirgen ve hücre serilerinde düşük doz hızının koruyucu etkisini göstermiştir⁶⁹. Benzer olarak Ogino ve arkadaşları düşük doz hızının yüksek doz hızına göre daha az letal etkisini göstermiştir⁷⁰. Cron ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptığı çalışmada ise, düşük doz hızlı brakiterapi esnasında parsiyel oksijen basıncı ve perfüzyon değişiklikleri incelenmiştir. Ancak bu çalışmada TMC'nin morfolojik değişimleri ve hücresel elemanları değerlendirilmemiştir⁷¹.

1985 yılında Metting ve arkadaşları tarafından, heybeli sıçan over hücrelerinde yapılan bir çalışmada, 1 Gy/dk altında farklı doz hızlarının sağ kalım üzerinde etkisine bakılmış ve doz hızı azaldıkça sağ kalımın azaldığı görülmüştür⁷². Marchese ve arkadaşları ise, farklı doz hızlarının 6 farklı insan hücre hattında (melanom, osteosarkoma, meme, kolon, nöroblastom, fibroblastom) etkisine bakmışlardır. Tüm hücre tipleri için yüksek doz hızında RT'nin daha düşük sağ kalıma sebep olduğu gösterilmiştir⁷³. Bu çalışmalar tüm hücre tipleri için, malign ya da normal doku fark etmeksizin doz hızı arttıkça sağ kalımın azaldığına yönelik kanıt oluşturmaktadır.

Tüm bu veriler, farklı doz hızlarının TMÇ’de farklı etkilere neden olabileceğini düşündürmektedir. Projemiz kapsamında yapılan çalışmalar bu temele dayandırılmıştır.

2.9 Amaç

Literatürde doz hızının tümör kontrolü ve normal doku üzerindeki etkileri ile ilgili veriler sınırlı olmakla birlikte doz hızının, tümörün tedaviye yanıtı ve dirençliliğini etkileyen temel öğelerden biri olan TMÇ üzerinde olan etkisi ile ilgili yeterli veri bulunmamaktadır. Çalışmamız; tümör hücrelerinde farklı etkiler oluşturan farklı doz hızlarının, TMÇ üzerinde oluşturduğu etkileri incelemek ve doz hızları arasında farklılık saptanması durumunda en ideal immün yanıt sunan doz hızı şemasını tespit etmek amacı ile tasarlandı.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Çalışmanın Türü, Evreni, Etik Kurul İzni ve Proje Desteği

“Fare Melanom Tümör Modelinde Radyoterapide Kullanılan Farklı Doz Hızlarının Tümör Mikroçevresi Üzerine Etkileri” isimli çalışmamız prelinik deneysel (in vivo) bir çalışma olarak tasarlandı. Çalışmanın evreni malign melanom tümör modeli oluşturulmuş C57BL/6 türü farelerdir.

Çalışmamız için, 20.08.2020 tarihinde “Hacettepe Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu” tarafından “2020/07-01” karar numarası ile etik kurul onayı alındı. Etik kurul Onayı Ek 1.’de sunulmuştur.

Etik kurul onayı sonrası, proje desteği için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), Araştırma Destek Programları Başkanlığı (ARDEB) 1002- Hızlı Destek Programı’na başvuruldu. 19.04.2021’de “121S247” proje numarası ile onay alındı.

3.2 Kimyasal Maddeler, Aletler, Cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddelerin, aletler ve cihazların adları ve üretildikleri firmaların adları aşağıda sıralanmıştır (Tablo 3.1).

Tablo 3. 1. Kimyasal Maddeler, Aletler ve Cihazlar.

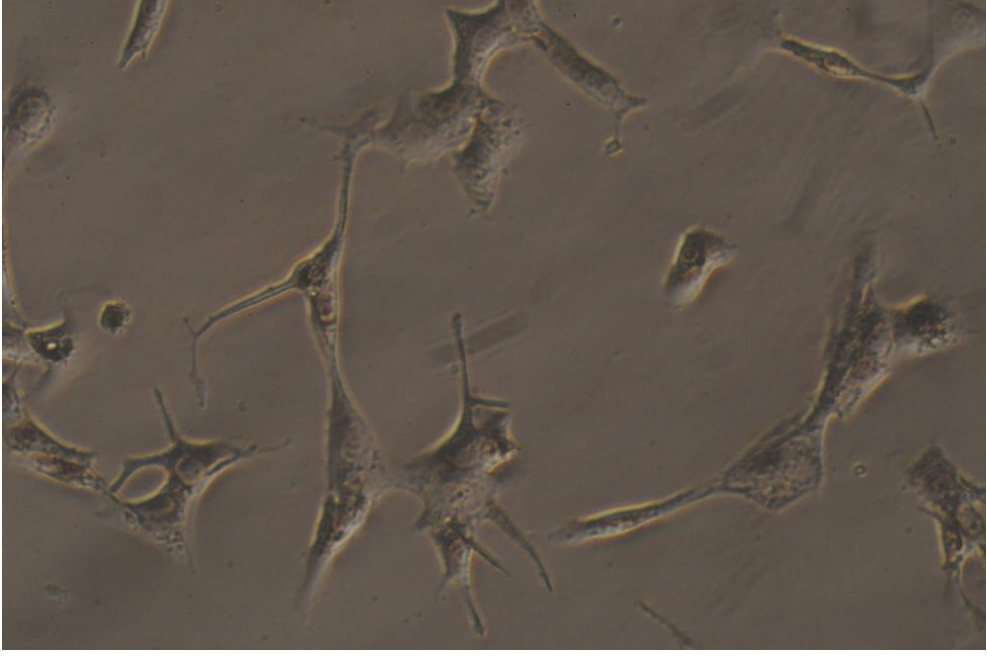
Ürün Adı	Üretici Adı
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>) Medium	Biological Industries
FBS (Fötal Dana Serumu)	Biological Industries
Penisilin/Streptomisin	Biological Industries
Sodyum Pirüvat Solusyonu	Biological Industries
Tripsin EDTA (etilendiamin tetraasetik asit) Solusyonu A (0.25%), EDTA (0.02%)	Biological Industries
EZ-PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) Mikoplazma Kiti	Biological Industries
PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)	Biological Industries
Tripan Mavisi	Sigma Aldrich
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Serva

HBSS (<i>Hanks' Balanced Salts, with Ca & Mg, w/o Phenol Red</i>)	Capricorn SCI
Kristal Sodyum Klorid	Serva
EDTA (Etilendiamid tetrasetik asit)	Serva
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>) tabletleri	Biomatik
Tris	Serva
Faz/Kontrast Mikroskop	Olympus
Etüv	Heraeus
Santrifüj	Heraeus
-80 Derin Dondurucu	Thermo Electron
-196 Sıvı Azot Tankı	Taylor Wharton
Buz Makinası	Scotsman AF200
Su Banyosu	GFL
+4°C Soğuk Oda	Alarko Carrier
+4°C Buzdolabı	Bosch
-20°C Derin Dondurucu	Bosch
Thoma Lamı	Neubauer
Toshiba Aquilion LB Bilgisayarlı Tomografi Simulator	Toshiba
Elekta Versa HD™ Lineer Akselator	Elekta
Formaldehit %10 (Tamp. pH: 6,9 - 7,1)	Tekkim
RNAlater Solution	İnvitrogen
Sitrat Tampon Çözeltisi (10X)	Thermo Scientific
Hidrojen Peroksit %30	Tekkim
Metanol	Merck, Ünitay
DAB (3,3'-Diaminobenzidine) kromojen-substrat sistemi	Thermo Scientific
<i>DPX (Digital Picture Exchange) Mounting Medium</i>	BIOSTAIN
Ksilen	BIOSTAIN
<i>UltraVision Polyvalent (Rabbit-Mouse) HRP Kit</i>	Thermo Scientific
anti-SOX-10 (<i>Sry-related HMg-Box gene 10</i>) antikoru	BioLegend

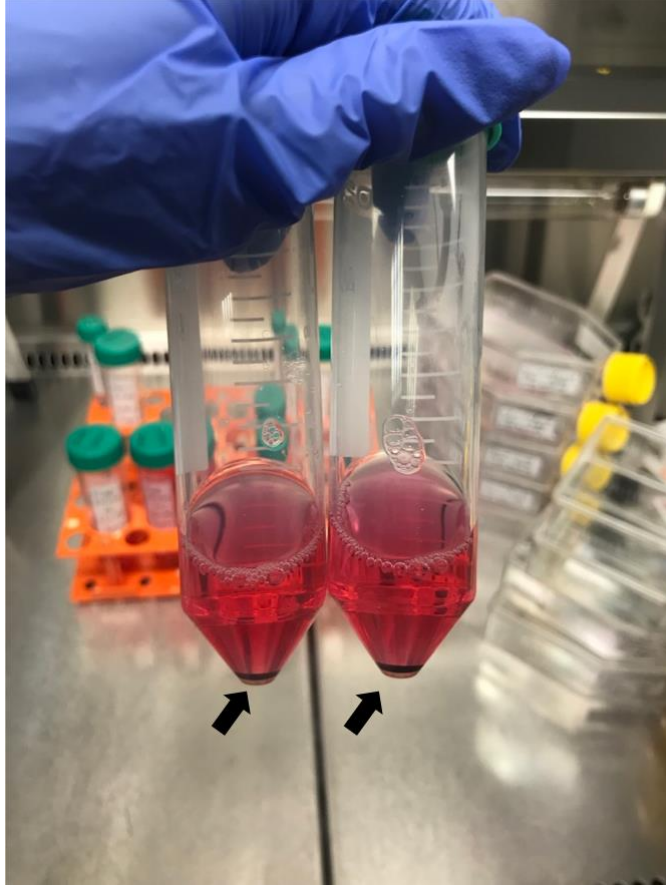
Anti-aSMA (<i>anti-smooth muscle antigen</i>) antikor	Abcam
<i>Large Volume Mayer's Hematoxylin</i>	Thermo Scientific
Petri kabı	ISOLAB
Enjektör (5 ml)	Ayset, Hayat
50 ml' lik falkon	Biologix
Bistüri ucu (Boy: 21)	Plasmed
Lamel	ISOLAB
Eppendorf (1,5 ml)	LP-İtaliana SPA

3.3 Hücre Kültürü ve Pasajlanması

Tez kapsamında fare malign melanom hücre dizisi olan B16-F10 kullanıldı (Şekil 3.1.). B16-F10 hücreleri ATCC®'den temin edildi. Hücreler 25 cm² ve 75 cm² flask içerisinde çoğaltılarak kullanıldı. Besi yeri için, %10'luk fötal dana serumu (FBS), %1 Penisilin/Streptomisin, %1 sodyum piruvat içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) kullanıldı. Hücreler 37°C %5 CO₂'lik etüvde muhafaza edilerek çoğaltıldı. Hücrelerin her 2-3 günde bir besiyeri değiştirildi, tek tabaka halinde büyüyen hücrelerin flaskı doldurma oranları \geq %70'e ulaştığında tripsinizasyon yöntemi uygulanarak pasajlama yapıldı. Hücrelerin flasktaki doluluk oranı faz/kontrast mikroskobu ile her gün takip edildi. Hücreler teslim alınıp çoğaltıldıktan sonra, kriyovial başına 1×10^6 hücre/ml konsantrasyonda sıvı azot tankında saklanılmak üzere donduruldu. Deneyde 6. ve 10. pasajlar arasındaki hücreler kullanıldı. Kullanılan hücrelerin melanin pigmentlerini korumasına önem verildi (Şekil 3.2.). Uygun pasaj sayısına ve flaskta uygun konfluense (%50-70) ulaşan hücreler tripsin ile kaldırılıp tripan mavisi ile boyandı, *Thoma* Lamı yardımı ile ışık mikroskobu ile sayıldı. Uygun konsantrasyon sağlanarak deneylerde kullanıldı.



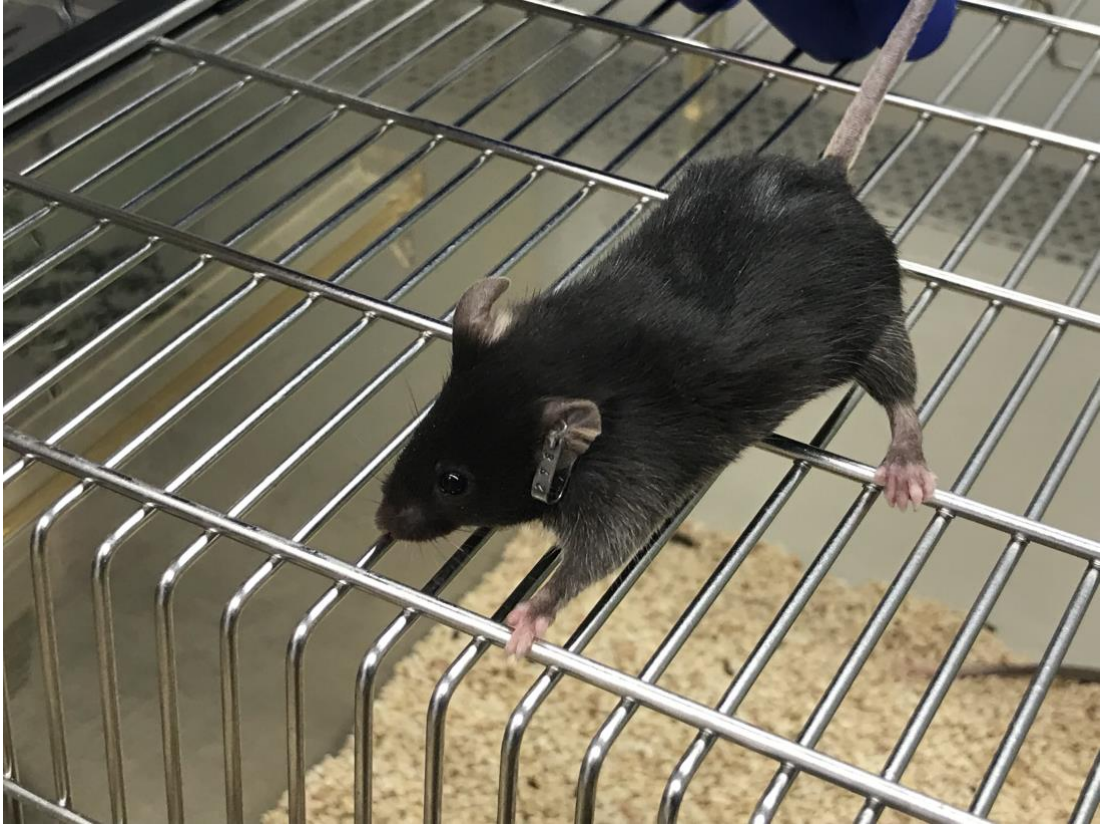
Şekil 3. 1. B16-F10 malign melanom hücrelerinin morfolojisi (faz-kontrast ışık mikroskobu ile 40X büyütmede).



Şekil 3. 2. B16-F10 hücrelerinin melanin pigmenti.

3.4 Çalışmada Kullanılan Deney Hayvanı Özellikleri

Çalışma kapsamında Hacettepe Üniversitesi Transgenik Hayvan Teknolojileri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden inbred 6-8 haftalık 54 adet C57BL/6 türü erkek fare temin edildi (Şekil 3.3.). İmmün kompetan olan bu fareler B16-F10 malign melanom hücreleri ile sinjenik tümör modeli oluşturulması için kullanıldı. Satın alınan fareler uygun yaşa geldiğinde deneye dahil edildi. Fareler, 21-24 °C oda sıcaklığında, 12 saat gece 12 saat gündüz ritminde, %50 nem oranında tutuldu ve standart yem ve su ile *ad libitum* beslenildi. Deney hayvanları barındırılması; hayvanlara tümör ekilmesinden hayvanların sakrifikasyonuna kadar geçen sürede Hacettepe Üniversitesi Transgenik Hayvan Teknolojileri Merkezi laboratuvarlarında gerçekleştirildi.



Şekil 3. 3. C57BL/6 türü, 8 haftalık erkek siyah fare.

3.5 Sinjenik Tümör Modelinin Oluşturulması

3.5.1 B16-F10 Hücrelerinin Hazırlanması

Etüvde çoğaltılan ve muhafaza edilen, 75 cm²'lik flasklara ekilen B16-F10 hücrelerinin farelere inokulasyona uygun hale gelmesi için logaritmik büyüme fazında olmalarına dikkat edildi. Flasklar %50-70 konfluent iken subkutan tümör enjeksiyonu yapıldı. Konfluensi uygun hale gelen hücreler tripsinizasyon yöntemi ile kaldırılıp hücrelere hücre kültürü medyası eklendi. Pipetizasyon ile tek hücre süspansiyonu oluşturulduktan sonra, tripan mavisi ile boyanarak hücre sayısı ve yoğunluğu belirlendi. Viabilitenin %90 ve üzeri olmasına dikkat edildi. Süspansiyon santrifüj (2000 rpm'de 5 dakika) edilerek oluşan hücre çökeltisi 100 mikrolitrede 1 milyon hücre olacak konsantrasyonda +4°C HBSS (*Hanks' Balanced Salts, with Ca & Mg, w/o Phenol Red*) kullanılarak seyreltildi (Şekil 3.4.). Hücreler buz üzerinde olabilecek en kısa sürede ekim işleminin yapılacağı laboratuvara taşındı.



Şekil 3. 4. Hücrelerin HBSS (*Hanks' Balanced Salts*) içerisinde görünümü.

3.5.2 B16-F10 Hücresinin Fareye İnokulasyonu

6-8 haftalık C57BL/6 türü fareler ekim için inhale sevofluran anestezi ile uyutularak hazır hale getirildi. Farelerin tümör ekilecek olan sağ flankındaki kürk 1-2 damla %70 etanol ile ıslatılarak aşağı doğru tarandı ve sonrasında iki yana ayrılarak cildin görünmesi sağlandı. Sağ flanktaki gevşek cilt derisi kaldırılarak insülin enjektörü ile 100 mikrolitre HBSS içerisindeki 1 milyon B16-F10 hücresi subkutan olarak enjekte edildi (Şekil 3.5.). Enjeksiyon sonrası cilt altında kabarcık oluşup oluşmamasına dikkat edildi. Kabarcık oluştu ise enjeksiyon başarılı olarak düşünüldü.



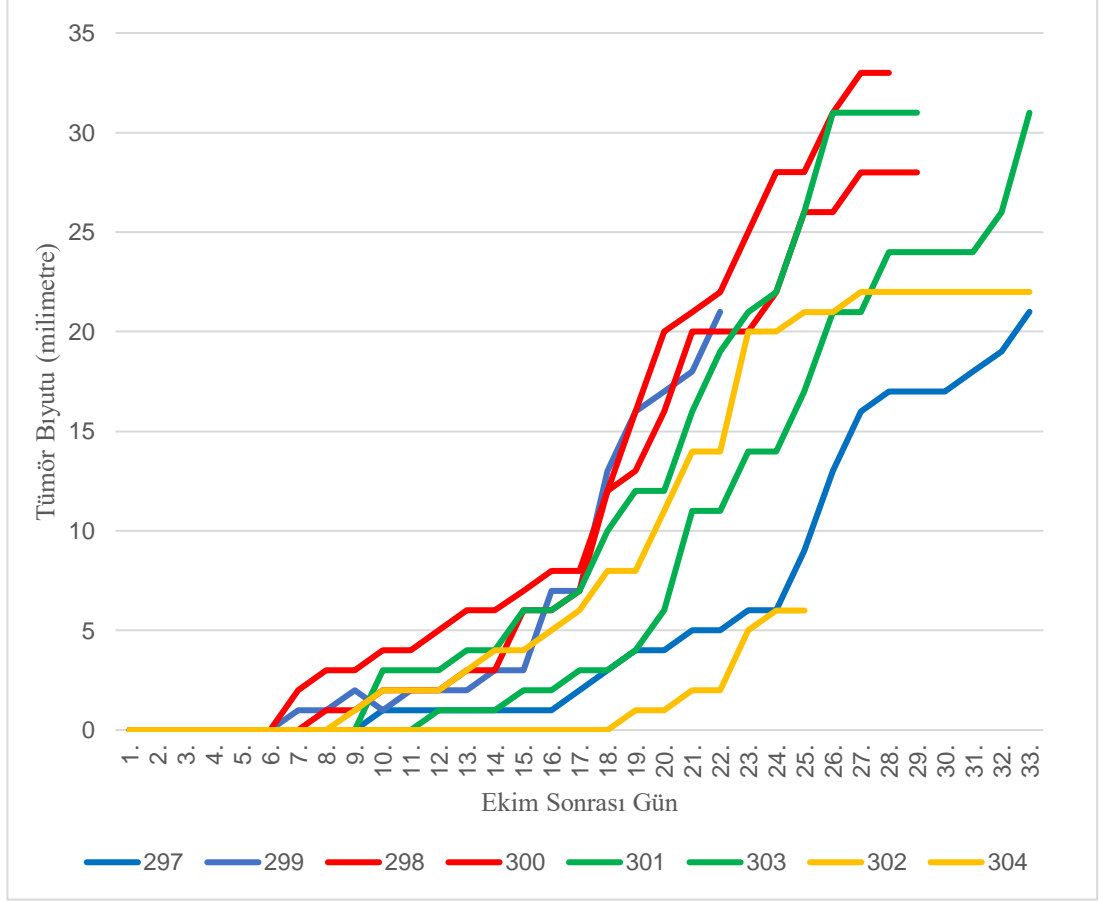
Şekil 3. 5. Farelere subkutan tümör inokulasyonu işlemi.

3.5.3 Deney Gruplarının Oluşturulması

Deney 3 basamakta planlandı. İlk basamakta farelere ekilecek optimum tümör hücresi sayısının belirlenmesi, ikinci basamakta seçilen optimum tümör sayısı ile

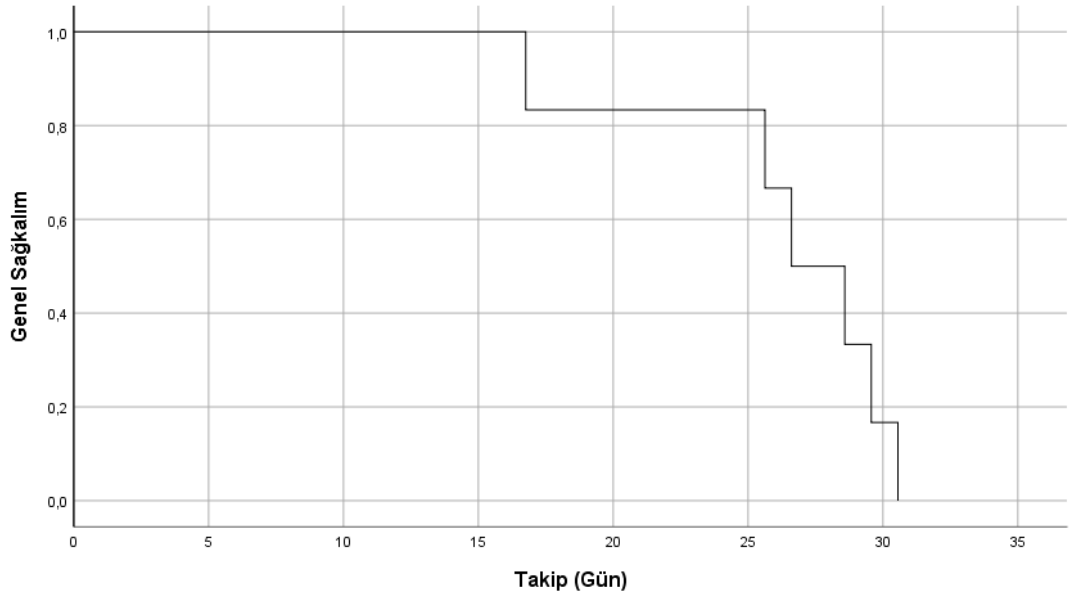
farelerin yaşam süresinin belirlenmesi ve tümör modelinin optimize hale getirilmesi, üçüncü basamakta ise optimize edilen tümör modeli ile RT uygulamalarının yapılması amaçlandı.

İlk basamakta, 8 adet fareye -farelerin ayırt edilebilmesi amacı ile- küpeleme (küpe no: 297- 304 arası) işlemi yapıldı. Fareler 4 gruba ayrılarak, 4 farklı hücre sayısında B16-F10 hücreleri sağ flanka subkutanöz yukarıda tarif edildiği şekilde ekildi. İlk gruba 2 milyon (küpe no: 297 ve 299; şekil 3.6.'da mavi grafik), 2. gruba 1 milyon (küpe no: 298 ve 300; şekil 3.6.'da kırmızı grafik), 3. gruba 500 bin (küpe no: 301 ve 303; şekil 3.6.'da yeşil grafik) ve 4. gruba 250 bin (küpe no: 302 ve 304; şekil 3.6.'da sarı grafik) hücre ekildi. Bu farelerin tümör oluşturma süreleri ve yaşam sürelerini izlemek amaçlandı. İlk tümör oluşumu 7. günde 2 milyon ve 1 milyon hücre ekilen iki farede (küpe no: 299 ve 300) görüldü ve farelerin hepsinde tümör oluşumu gözlemlendi. Farelerin ilk tümörü gösterme zamanları hücre sayıları ile ters orantılı olarak değiştiği gözlemlendi (Şekil 3.6.). Büyüme grafiği incelendiğinde farklı doz ekilen farelerden toplam deney süresi, benzer sürede tümör çıkarma ve tümör boyutunun benzer gitmesi değerlendirildiğinde en uygun olan hücre sayısının 1 milyon olduğuna (bkz: Şekil 3.6., 298 ve 300 küpe numaralı farelerin grafiği) karar verildi ve deneyin bundan sonraki basamağına 1 milyon hücre ekilmesi kararı ile devam edildi.

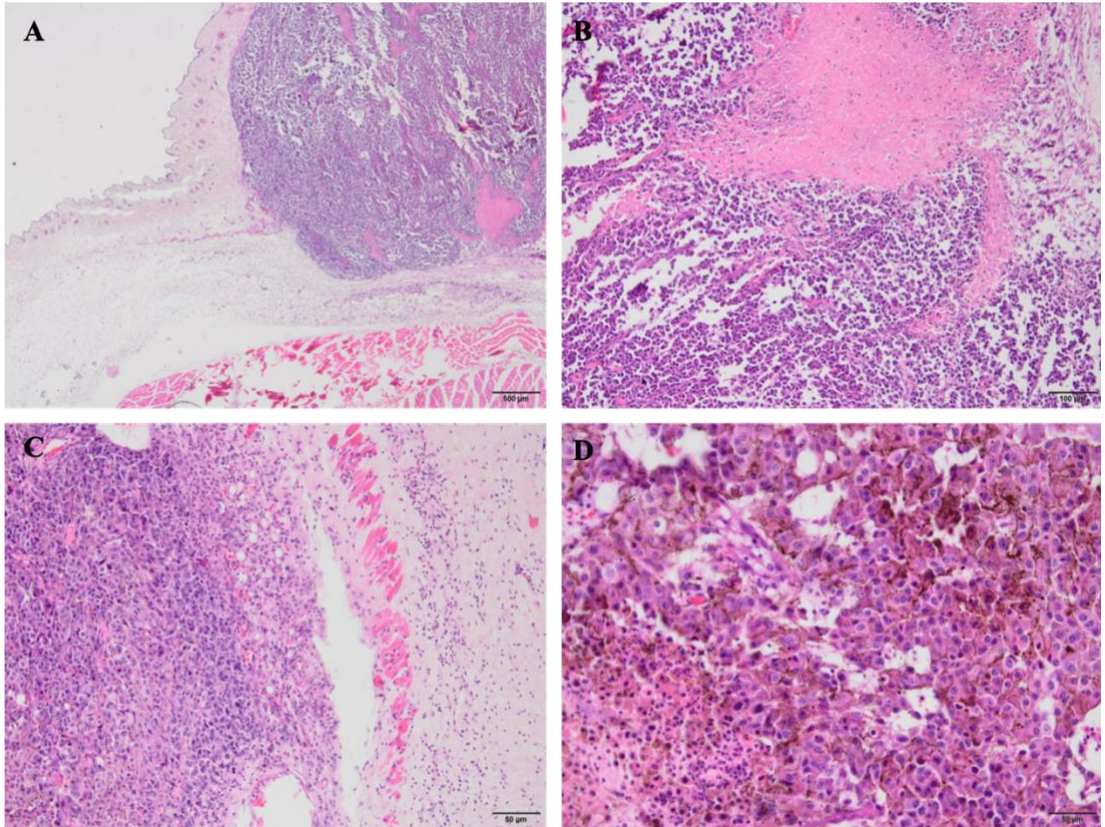


Şekil 3. 6. Birinci deney grubu büyüme grafikleri.

İkinci basamakta, 4 adet fareye 1 milyon hücre ekilerek optimal sakrifikasyon zamanını belirlemek amaçlandı. Bu doğrultuda, ilk basamakta 1 milyon hücre ile takip edilen 2 fareye (küpe no: 298 ve 300) ek, 4 fareye daha küpeleme yapıldı ve (küpe no: 409, 410, 411 ve 412) 1 milyon hücre ekildi. Fareler ilk basamaktan elde edilen veriler ile beklenildiği üzere ilk tümör oluşumlarını 7. günde gösterdiler ve tümör ekimi sonrası 17-30 gün arası değişen sürelerde hayatta kaldılar. Bu deney sonucunda C57BL/6 türü fareler ile oluşturulan B16-F10 malign melanom modelinde, farelerin ortalama 8. günde ilk tümör oluşumlarının palpe edilebildiği, RT uygulanacak olan 5-10 milimetre arası tümör boyutuna ortalama 13. günde geldikleri ve tümör ekimi sonrası ortalama 27 gün hayatta kaldıkları görüldü (Şekil 3.7.). Bu sonuçlar ile deney optimizasyonu sağlandı ve 3. basamak RT işlemlerine hazır hale gelindi. Üçüncü basamak için sakrifikasyon zamanı RT sonrası 7. gün olarak belirlendi. İlk iki basamak ön deney gruplarının tümör histopatolojileri de incelendi ve ekilen tümör ile oluşan melanom hücreleri histopatolojik olarak da verifiye edildi (Şekil 3.8.).

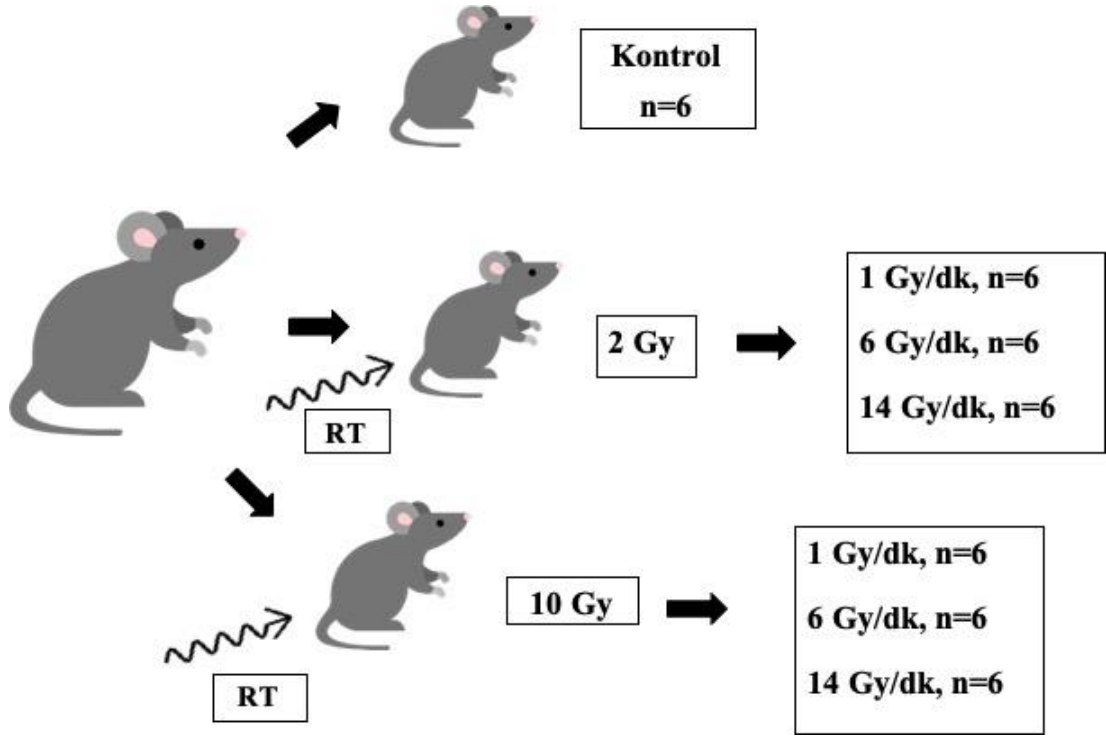


Şekil 3. 7. İkinci deney grubu, altı farenin sağ kalım grafiği.



Şekil 3. 8. Melanom hemoatoksilen&eoizin (H&E) ile histopatolojik görüntüsü (A: Melanom hücreleri, B: melanomda coğrafik nekroz C: Subkutan dokulara invaze melanom hücreleri, D: Melanin pigmenti).

Üçüncü basamak deneylerde ise optimize edilen deney modeli ile 42 fare üzerinde RT planlandı. Bu basamakta fareler 1'i kontrol grubu olmak üzere, 6'şar fareden oluşan 7 gruba ayrıldı (Şekil 3.9.). İlk grup tümör ekilecek ancak RT uygulanmayacak kontrol grubudur. Diğer gruplar 2 Gy ve 10 Gy kollarına randomize edildi ve bu kollar da 1 Gy/dk, 6 Gy/dk, 14 Gy/dk olmak üzere 3 farklı doz hızı grubuna randomize edildi. Bu basamak tekrarlayan 3 aşama olarak hayata geçirildi. İlk grupta 17 fare küpelendi (küpe no: 456-472), bu farelerin 3'ü 2 Gy, 1 Gy/dk doz hızı grubuna (küpe no: 457-459-461); 2'si 2 Gy, 6 Gy/dk doz hızı grubuna (küpe no: 463-465); 2'si 2 Gy, 14 Gy/dk doz hızı grubuna (küpe no: 467-469); 3'ü 10 Gy, 1 Gy/dk doz hızı grubuna (küpe no: 456-458-460); 2'si 10 Gy, 6 Gy/dk doz hızı grubuna (küpe no: 462-464), 2'si 10 Gy, 14 Gy/dk doz hızı grubuna (küpe no: 466-468); 3'ü kontrol grubuna atandı. İkinci grupta 13 fare küpelendi (küpe no: 477-489), bu farelerin 2'si 2 Gy, 1 Gy/dk doz hızı grubuna (küpe no: 477- 479); 2'si 2 Gy, 6 Gy/dk doz hızı grubuna (küpe no: 481- 483); 2'si 2 Gy, 14 Gy/dk doz hızı grubuna (küpe no: 485- 487); 2'si 10 Gy, 1 Gy/dk doz hızı grubuna (küpe no: 478-480); 2'si 10 Gy, 6 Gy/dk doz hızı grubuna (küpe no: 482-484), 2'si 10 Gy, 14 Gy/dk doz hızı grubuna (küpe no: 486-488); 1'i kontrol grubuna atandı. Üçüncü grupta ise 12 fare küpelendi (küpe no: 490-501), bu farelerin 1'i 2 Gy, 1 Gy/dk doz hızı grubuna (küpe no: 491); 2'si 2 Gy, 6 Gy/dk doz hızı grubuna (küpe no: 493- 495); 2'si 2 Gy, 14 Gy/dk doz hızı grubuna (küpe no: 497- 499); 1'i 10 Gy, 1 Gy/dk doz hızı grubuna (küpe no: 490); 2'si 10 Gy, 6 Gy/dk doz hızı grubuna (küpe no: 492-494), 2'si 10 Gy, 14 Gy/dk doz hızı grubuna (küpe no: 496-498); 2'si kontrol grubuna atandı.



Şekil 3. 9. Üçüncü basamak deney düzeneği.

Tümörün RT zamanı, tümörün rahatlıkla palpe edilerek RT için uygun bir şekilde alan lokalizasyonun en erken dönemde yapılacağı 0,5 cm çap/65 mm³ hacim olarak belirlendi. Literatürdeki fare modellerindeki örneklerde de RT'nin 50 mm³-100 mm³ tümör hacmine ulaşıldığında yapıldığı gözlenmektedir^{90,91}. Bu basamaktaki 42 fareye tümör boyutu en büyük çapta 5-10 mm arasına gelince RT uygulandı (Şekil 3.10.). Fareler RT sonrası 7. günde sakrifiye edildi, intrakardiyak kan alımı ve doku hasadı işlemi gerçekleştirildi.



Şekil 3. 10. Tümör boyutları RT için hazır hale gelmiş bir fare.

3.6 Radyoterapi Uygulaması

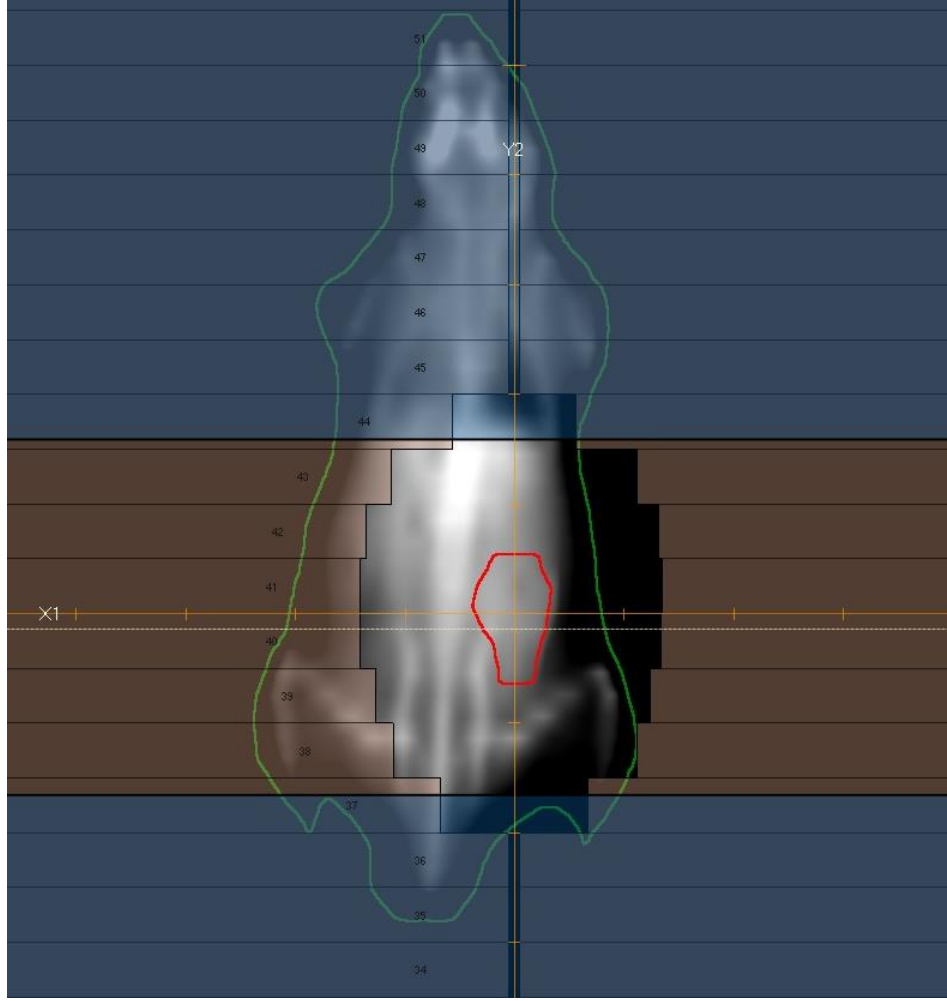
Tümörü RT için uygun olan boyuta gelen fareler uygun taşıma kutularında, hareketleri kısıtlanmadan, uygun havalandırma ve ısı aralıkları sağlanarak Hacettepe Üniversitesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalına taşındı. Fareler hem bilgisayarlı tomografi (BT) simülasyon işlemi hem RT işlemi boyunca inhale sevofluran ile uyutuldu. Bu işlemler ağrı oluşturmeyen işlemlerdir ancak farelerin hareketsiz kalmaları gerekmektedir. Hem BT çekimi hem de RT uygulaması boyunca fareler kameralardan takip edildi.

RT uygulamasının gerçekleştirilebilmesi için öncelikle farelerden birine prone pozisyonda Toshiba Aquilion LB BT Simülatör (Toshiba Medikal Sistemleri, Otowara, Japonya) planlama BT çekildi (Şekil 3.11). BT kesitleri RayStation v.8.1.0 (RaySearch Lab., Stokholm, İsveç) tedavi planlama sistemine (TPS) aktarılarak hedef tedavi hacmi (*Gross tumor volume*, GTV) belirlendi (Şekil 3.12.). Hedef hacim olarak

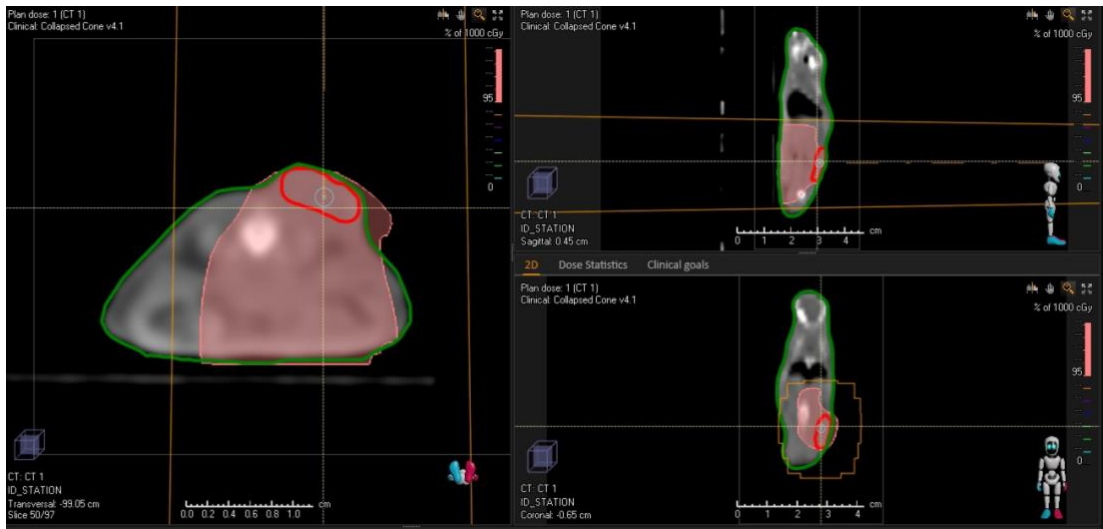
sağ flanktaki subkutan yerleşimli kitle konturlandı. Belirlenen bu GTV'ye, 1 cm emniyetle “*planning target volume*” (PTV) oluşturuldu. Reçetelendirilen doz, %95 izodoza normalize edilerek tek alandan, 0.5 cm bolus ile tek fraksiyonda 2 Gy (1Gy/dk, 6 Gy/dk ve 14 Gy/dk farklı doz hızlarında) ve tek fraksiyonda 10 Gy (1Gy/dk, 6 Gy/dk ve 14 Gy/dk farklı doz hızlarında) RT planlaması yapıldı (Şekil 3.12. ve 3.13.).



Şekil 3. 11. BT simülasyon işlemi.

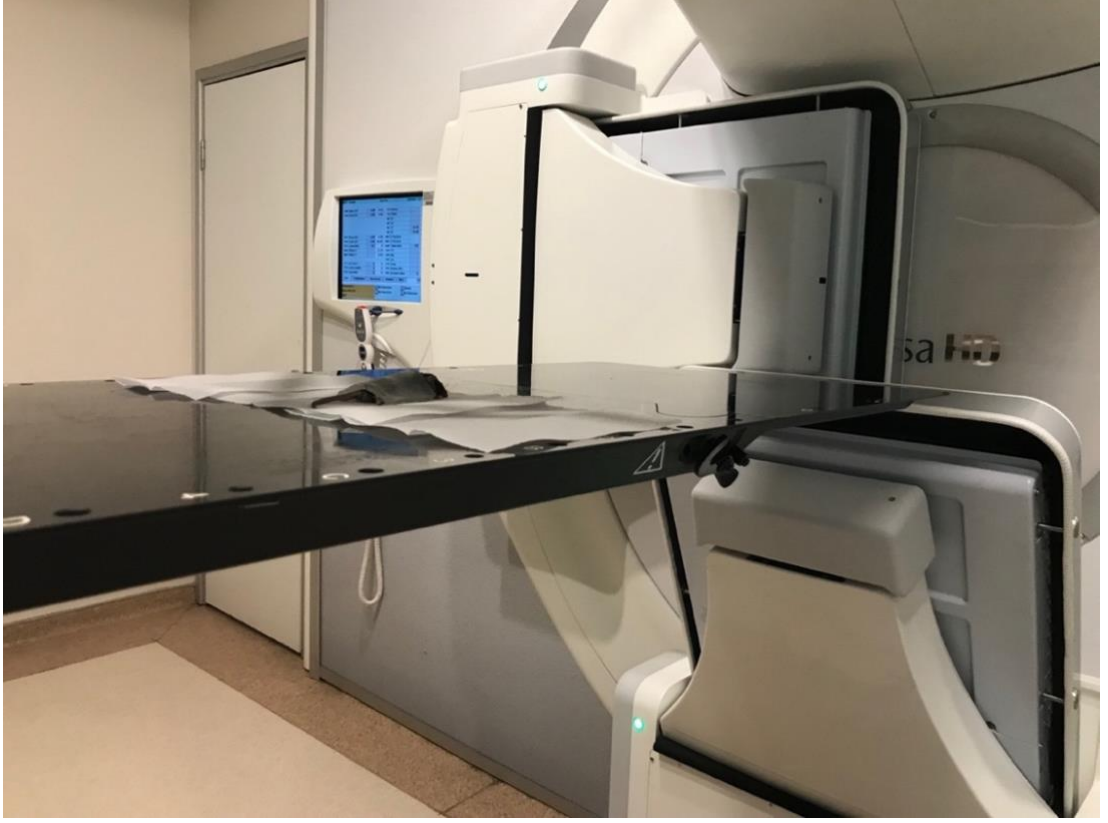


Şekil 3. 12. Sağ flantaki tümör konturu ve beam eye view görüntüsü.



Şekil 3. 13. Tedavi plan görüntüsü.

RT uygulaması, Hacettepe Üniversitesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalında Elekta Versa HD™ lineer hızlandırıcı kullanılarak yapıldı (Şekil 3.14.). Setup doğrulaması “*cone beam CT*” ile yapıldı. RT sonrası fareler uygun taşıma koşullarında barınma alanlarına geri götürüldü.



Şekil 3. 14. Tedavi masasındaki tedavi pozisyonunda fare.

3.7 Deney Hayvanlarının Takibi

Deney hayvanları ilk tümör ekiminden itibaren günlük takip edildi. Tümör boyutu ise ilk tümör oluşumu palpe edildikten sonra, günlük *vernier* ölçeği ölçümleri ile takip edildi (Şekil 3.15.). Deney hayvanları tümör ekimi esnasında ve sakrifikasyon esnasında olmak üzere 2 sefer tartıldı. Günlük takipler esnasında davranış, aktivite ve postür kontrolü yapıldı, hayvanlar lokalize ağrı ve rahatsızlık açısından gözlemlendi. Yine işlem yapılan sağ flankta gözlemlenecek herhangi bir enfeksiyon bulgusu da takip edildi. Deney hayvanlarının düzgün yürüyememesi, düzgün su ve gıda alamaması, uyarılara belirgin derecede azalmış yanıtının olması durumunda çalışmadan çıkarılması planlandı. Çalışmamızın RT uygulanan kolunda deney süresi,

ön grup ile optimize edilerek belirlendiği için bu grupta tümör nedeni ile hayvanın deney bitiminde önce sonlanmasını gerektirecek bir durum ile karşılaşılması.



Şekil 3. 15. Tümör boyutunun vernier ölçeği ile takibi.

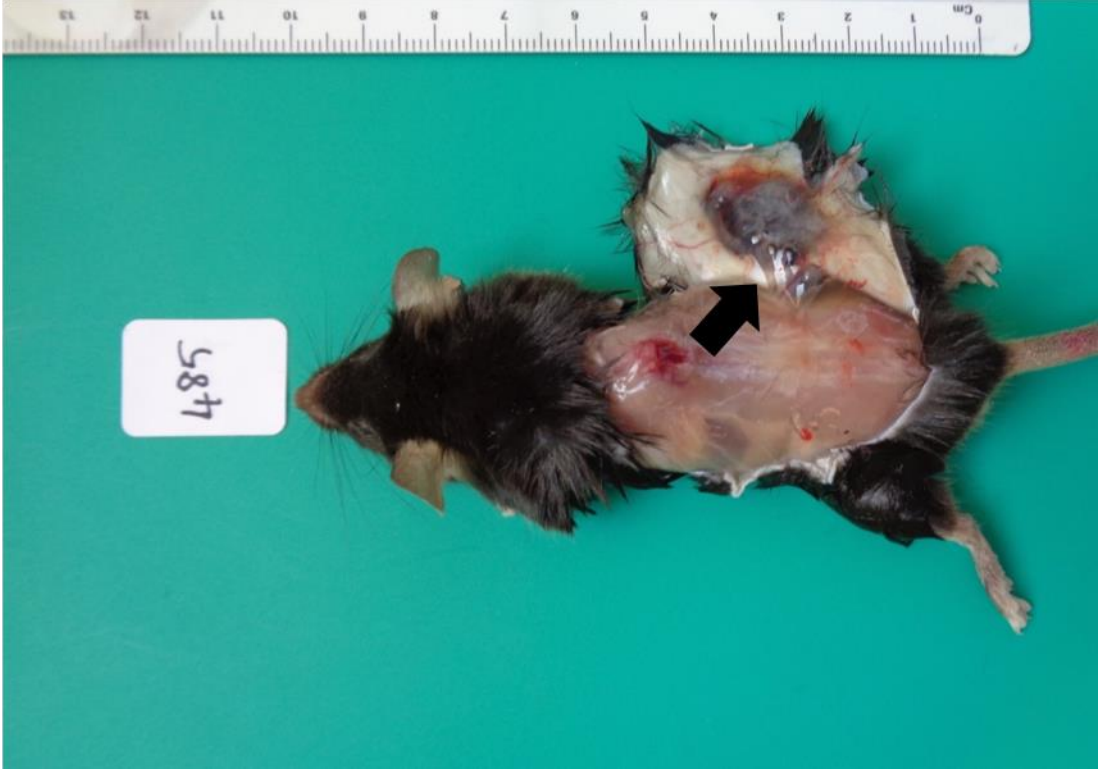
3.8 Hayvanların Sakrifikasyonu ve Kan-Doku Toplanması

RT sonrası 7. günde sakrifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Sakrifikasyon işlemi için deney hayvanları operasyon odasına alındı. Öncelikle intrakardiyak kan alımı işleminin gerçekleştirilebilmesi için fareler inhale sevofluran ile anestezide alındı. Supin pozisyonda 5 ml hacimli enjektör kullanılarak ksifoterna orta hattının solundan öncelikle kalp atımı hissedilerek 20 derece açı ile kalbe girilerek intrakardiyak kan alımı gerçekleştirildi ve daha önceden içerisine 0,5 ml heparin eklenerek hazırlanan tüplere alındı (Şekil 3.16).

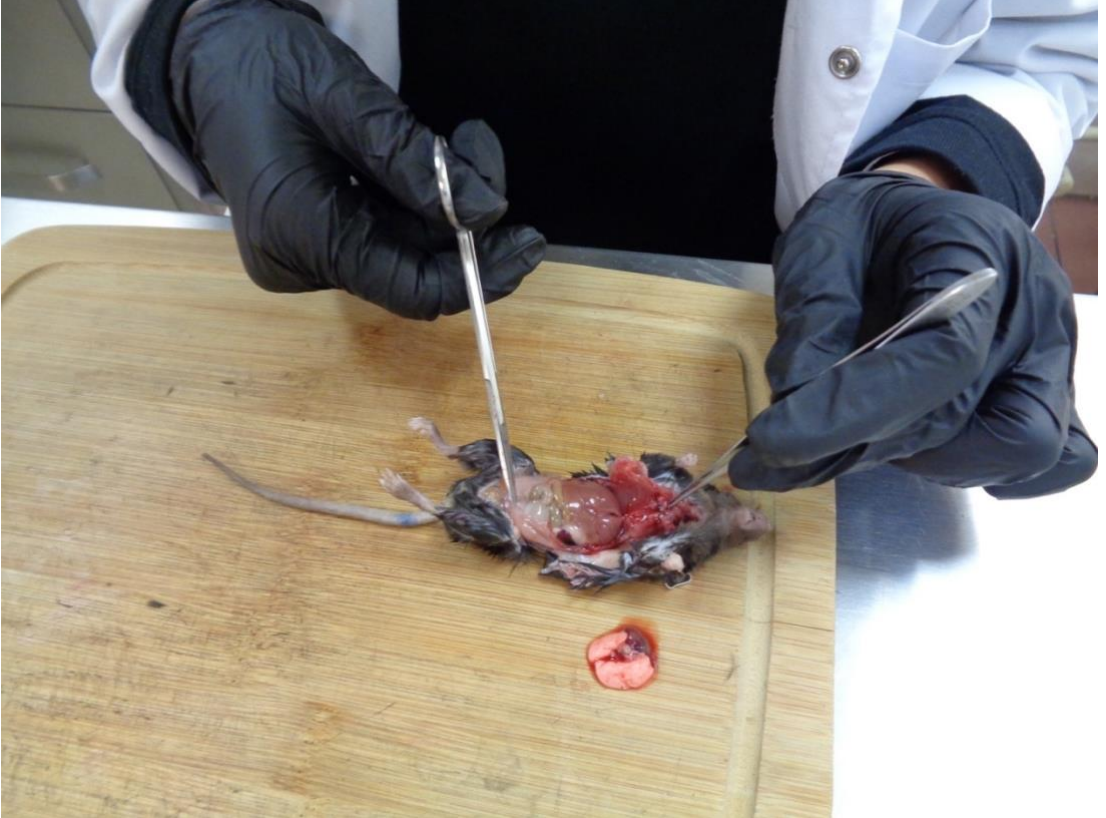


Şekil 3. 16. İntrakardiyak kan alımı.

Kalpten kan alımı işlemi tamamlandıktan sonra servikal dislokasyon yöntemi ile fareler sakrifiye edildi. Öncelikle sağ flanktaki tümör diseke edilerek %10'luk tamponlu formalin solüsyonuna alındı. Tümörden alınan diğer parça ise -80°C 'de donduruldu. Bütün farelere torakal insizyon ve abdominal insizyon yapılarak akciğer ve karaciğer metastazları açısından değerlendirildi. Metastaz varlığında bu organlar da hasat edilerek formalin solüsyonuna alındı. Ayrıca tüm farelerden dalak dokusu alınarak formalin solüsyonuna konuldu (Şekil 3.17. ve 3.18.).



Şekil 3. 17. Sağ flanktan hasat edilen tümör dokusu.



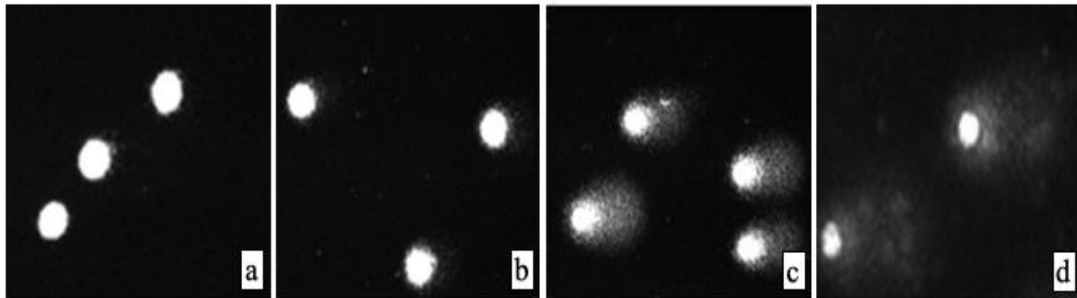
Şekil 3. 18. Torakal ve abdominal insizyon ile iç organ metastazının incelenmesi.

3.9 Dokuların Histolojik Olarak İncelenmesi

Sakrifikasyon aşaması sonrasında, hasat edilen tümör dokusu morfolojik olarak incelendi. Tümör örneklerinin boyutları ölçüldükten sonra yarısı histomorfolojik inceleme yapılmak için %10'luk tamponlu formalin solüsyonuna alınarak tespit edildi. Kalan diğer yarısı ise uygun şekilde dondurularak -80°C saklandı. Formalin fiksasyonu yapılan örnekler bir gece tespit edildikten sonra parafin bloklar hazırlanarak H&E boyaması yapıldı. H&E boyalı kesitler ışık mikroskopunda patolog (Prof. Dr. Aytekin Akyol) tarafından değerlendirildi. Tümördeki coğrafik nekroz, mitotik aktivite, pleomorfizm ve immün infiltrasyon parametreleri morfolojik olarak incelenerek kaydedildi. Daha sonrasında TMÇ için immünohistokimyasal belirteçler yardımıyla profillemeye yapıldı. Bu kapsamda vasküler yapılar, immün hücre profili (CD8, MPO, CD68) tümör stroması ise aSMA boyamaları yapılarak semikantitatif olarak değerlendirildi. Bu işlemde parafin bloklardan hazırlanan 4 µm kalınlığındaki boyasız kesitler 60°C'de deparafinize edildi. Daha sonra ksilen ve dereceli alkol solüsyonlarından geçirildikten sonra rehidrasyon yapıldı. Endojen peroksidaz özelliği %3'lük H₂O₂ solüsyonu ile ortadan kaldırılıp uygun solüsyonla antijen geri çağırma işlemi yapıldı. Primer antikorlar kesitlere uygun titrasyonda damlatıldı ve 1 saat süre ile oda sıcaklığında muamele edildi. Bu işlemden sonra sekonder antikor ve streptavidin biotin peroksidaz metodu kullanılarak işaretleme tamamlandı. Reaksiyonun son aşamasında DAB (3,3'-Diaminobenzidine) kullanılarak ışık boyama ortaya çıkarıldı. Zıt boyama için Hematoksilen kullanıldıktan sonra slaytlar ılık musluk suyunda yarım saat yıkandı. Dehidrasyon için dereceli alkolden geçirilen slaytlar, ksilen solüsyonunda bekletildikten sonra balsam ile kapatılarak mikroskopik olarak değerlendirildi. Örneklerdeki iç kontroller kullanılarak boyamanın validasyonu sağlandı ve TMÇ belirteçleri boyanma şiddeti ve yaygınlığına göre semikantitatif olarak değerlendirildi. Bu kapsamda hem boyanan hedef hücreler oran skoru olarak (%) hem de yoğunluk skoruna (negatif; 0, zayıf;1, orta; 2 ve kuvvetli;3) göre değerlendirildi. İmmünhücreler için yapılacak boyamalarda ise TMÇ'deki en yoğun boyanan alanlar göz önüne alınarak 10 Büyük Büyütme Alanındaki (BBA; 40X) pozitif hücrelerin toplamı her bir örnek için sayılarak kaydedildi.

3.10 Tek Hücreli Jel Elektrofrez (Comet Analizi)

Bu analiz için hayvanlar sakrifiye edildikten sonra, heparinize tam kanda farklı radyasyon doz hızlarının DNA üzerine direkt etkisinin değerlendirilmesi ve DNA hasarının saptanması amacı ile bu yöntem uygulandı. Tek hücre jel elektrofrez yönteminin basamakları: hücrelerin izole edilmesi, lamların hazırlanması, lizis, alkali ortamda elektrofrez, nötralizasyon, DNA'nın boyanma ve görüntülenmesi, comet kuyruk yoğunluğu ölçümü ve DNA hasarının belirlenmesi işlemlerinden oluşur. Öncelikle tek hücre jel elektrofrez analizi için, hücre materyal hazırlandıktan sonra mikroskop lamları hazırlandı. Alkali ortamda DNA superkoil sağlandıktan sonra elektrofrez ve nötralizasyon işlemi yapıldı. DNA boyanması sonrası, comet kuyruk yoğunluğu ölçümü ve DNA hasarının belirlenmesi işlemi gerçekleştirildi. Bu işlemde, öncelikle tam kan örneklerinde DNA hasar çalışması için heparinize kan kültür ortamına alındı ve düşük erime noktalı agaroz ile karıştırılarak kullanıldı. Mononükleer hücre fraksiyonları histopak ile izole edildikten sonra kullanıldı. Sonrasında agaroz jel mikroskop lamlarına yayılarak "ön kaplama" işlemi gerçekleştirildi. Ertesi gün agaroz ile karıştırılan hücreler bu lamların üzerine yayıldı. Agaroz jel donduktan sonra yüksek konsantrasyonda tuz ve deterjan içeren lizis çözeltisinde bir saat bekletilmiş ve çözeltiliye %10 oranında dimetil sülfoksit eklendi. Hazırlanmış olan preparatlar çift sarmal DNA yapısının açılması için elektrofrez öncesinde yüksek alkali özellikteki (pH>13) elektrofrez tamponunda inkübe edildi. Jel içinde oluşan tek zincir DNA alkali koşullarda elektrofrez tabi tutularak comet oluşumu sağlandı. Jel pH'sının nötralizasyonu için lamlar uygun bir tamponla (pH 7,5) yıkandıktan sonra lamlar boyanarak comet kuyruk yoğunlukları ölçüldü (Şekil 3.19.).



Şekil 3. 19. Tam kan örneğinin tek hücre jel elektrofrez görüntüleri (a: hasarsız, b: az hasarlı, c: hasarlı, d: çok hasarlı).

3.11 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 23 yazılımı kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntemlerle (Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk testleri) incelendi. Tanımlayıcı analizler normal dağılmayan değişkenler için ortanca ve minimum-maksimum değerler kullanılarak verildi. Gruptaki hayvan sayıları Power analizi yapılarak %5 yanılma, %80 çalışma gücü amaçlanarak belirlendi. Standart sapma için literatürdeki çalışmalar baz alındı. Farklı doz hızlarına bağlı farklılıklar Kruskal-Wallis testi kullanılarak karşılaştırıldı. İkişerli karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı ve Bonferroni düzeltmesi kullanılarak değerlendirildi. Tek hücre jel elektroforezi sonuçları tek yönlü ANOVA testi kullanılarak karşılaştırıldı. Varyansların homojenliği Levene testi ile değerlendirildi. Gruplar arasında anlamlı farklılık bulunan durumlarda, ikişerli post-hoc karşılaştırmalar LSD testi yapılarak karşılaştırıldı. Tedavi sonrası histopatolojik değişimler regresyon analizi kullanılarak değerlendirildi. P değerinin 0,05'in altında olduğu değerler anlamlı olarak kabul edildi.

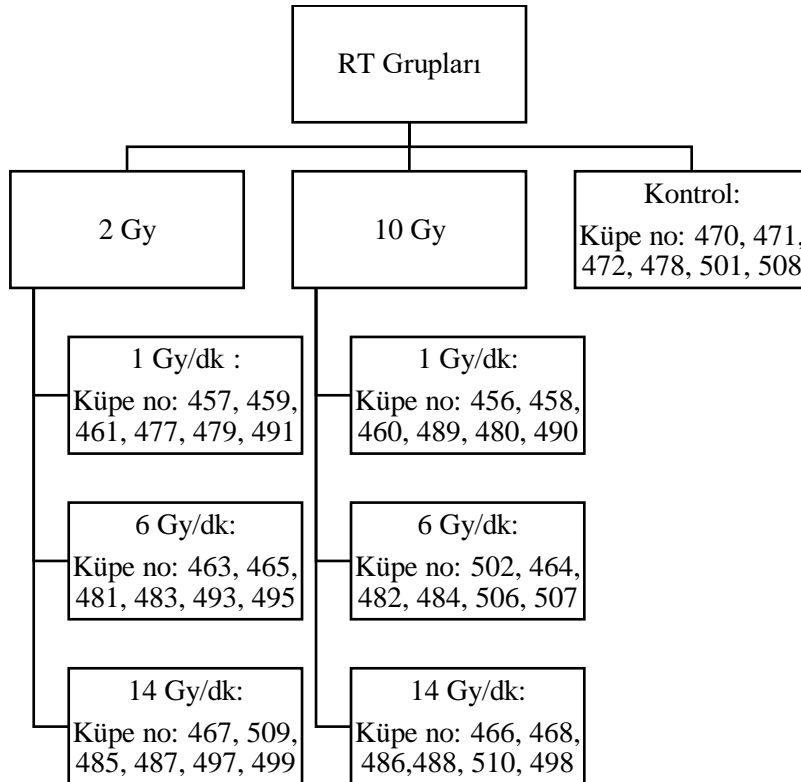
4. BULGULAR

4.1 Deney Esnasında Gözlenenler

Ön deneyler sonucunda, RT uygulanacak olan fareler için deney süresi optimize edildi. Buna göre C57BL/6 türü fareler ile oluşturulan B16-F10 malign melanom modelinde, farelerin ortanca 8. günde ilk tümör oluşumlarının palpe edilebildiği, RT uygulanacak olan 5-10 milimetre arası tümör boyutuna ortanca 13. günde geldikleri ve tümör ekimi sonrası ortanca 27 gün hayatta kaldıkları görüldü. RT uygulanan üçüncü basamak için sakrifikasyon zamanı RT sonrası 7. gün olarak belirlendi.

Üçüncü RT grubu 3 farklı birbiri içerisinde tekrarlayan deney şeklinde planlandı. Birinci grupta 17 fareye tümör ekilimi yapıldı, ön deney ile optimizasyon sağlandığı için beklenildiği üzere, tüm farelerde tümör oluşumu gözlemlendi. İkinci tekrarlayan grupta 13 fareye tümör ekilimi yapıldı ve tüm farelerde tümör oluşumu izlendi. Üçüncü grup için ise 12 fareye tümör ekilimi yapıldı. Deney gruplarına atanan farelerin küpe numaraları Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4. 1. Deney gruplarına atanan fare küpe numaraları.



Tüm hayvanlar RT'yi iyi tolere etti ve RT sonrasında belirgin bir yan etki gözlenmedi. Sadece 1 farede (küpe no: 495), tümörün progresyonu nedeni ile RT sonrası 6. günde hareketlerde kısıtlılık, yürümede bozukluk ve uyarılara azalma tespit edildi. Bu nedenle bu fareye RT sonrası 6. günde ötenazi uygulanıldı. Diğer 41 fareye planlanan protokole uygun olarak RT sonrası 7. günde sakrifikasyon işlemi gerçekleştirildi.

Tüm farelerin sakrifikasyon esnasında iç organları metastaz açısından değerlendirildi. İki farede (küpe no: 459 ve 491) akciğer metastazı gözlendi (Şekil 4.1.). İki fare de 2 Gy doz, 1 Gy/dk koluna aitti. Başka farelerde ve başka organlarda metastaz gözlenmedi.



Şekil 4. 1. Akciğer metastazı.

Farelerin ağırlıkları tümör ekilme günü ve sakrifikasyon zamanı ölçüldü. Buna göre tüm grup için ortanca deneye başlama ağırlığı ortanca 25,35 gram (20,76- 29,53) ve ortanca deneyi bitirme ağırlığı 30,29 gram (25,10- 37) idi. Hiçbir farede kilo kaybı ve buna bağlı olarak zamanında önce sakrifikasyon gerekliliği gözlenmedi. Her bir

deney kolu için ortanca deneye başlangıç ve deneyi bitiriş ağırlıkları Tablo 4.2.'de sunulmuştur.

Tablo 4. 2. Deney kollarına göre ortanca başlangıç ve bitiş ağırlıkları.

RT Grubu	Deneye başlangıç ağırlığı, ortanca (min-maks)	Deneyi bitiriş ağırlığı, ortanca (min-maks)
2 Gy, 1 Gy/dk	25.58 gr (23.61- 27.84)	34.31 gr (28.36- 37)
2 Gy, 6 Gy/dk	25.97 gr (20.76- 27.37)	30.66 gr (26.70- 31.16)
2 Gy, 14 Gy/dk	24.93 gr (23.59- 29.49)	31.9 gr (28.5- 35.78)
10 Gy, 1 Gy/dk	25.13 gr (23.81- 29.53)	28.92 gr (26.66- 33.70)
10 Gy, 6 Gy/dk	25.65 gr (23.33- 26.89)	29.64 gr (25.10- 31.50)
10 Gy, 14 Gy/dk	24.15 gr (23.95- 25.38)	27.91 gr (25.6- 30.32)
Kontrol	26.61 gr (24.98- 28.8)	35.21 gr (28.6- 36.05)

RT: Radyoterapi, min: minimum, maks: maksimum

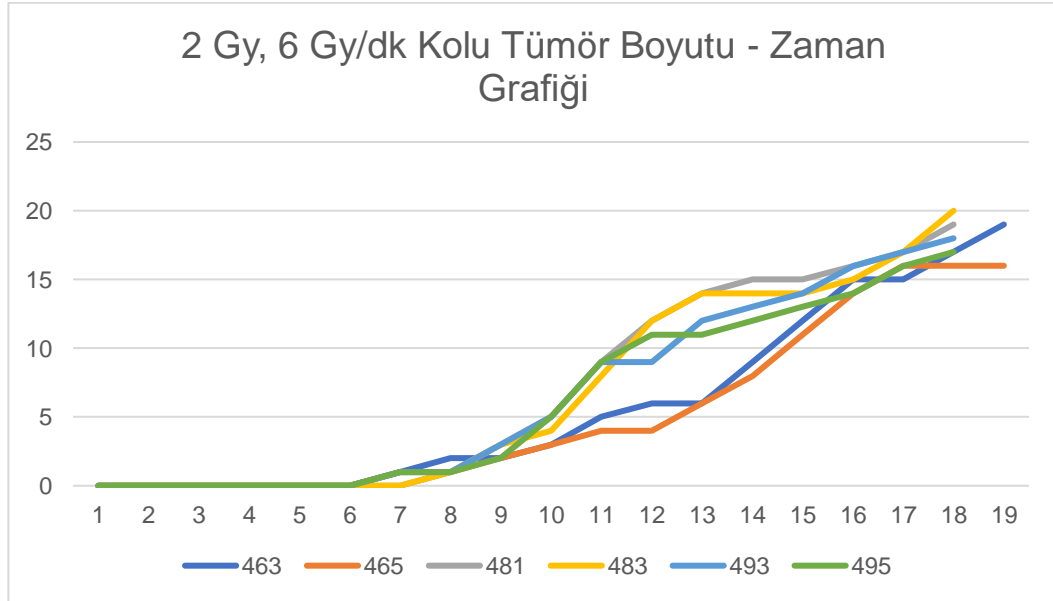
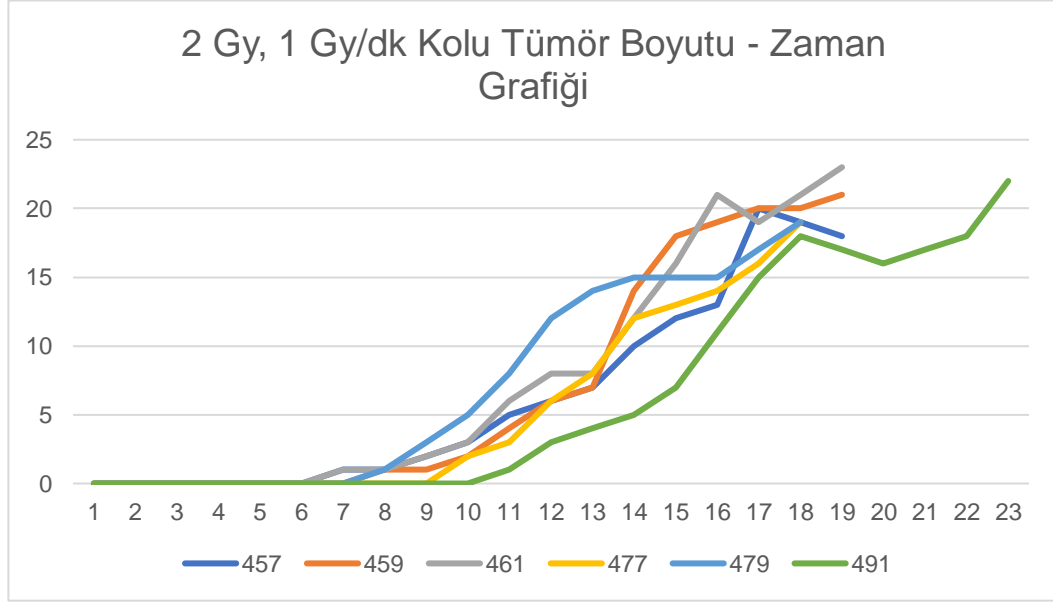
Tüm deney grubunda, farelerin ilk tümör oluşturduğu gün ve RT aldıkları gün ön deney grubu ile uyumlu olarak bulundu. Tüm deney grubu için sağ kalım günü ortanca 20 gün (19-25 gün), ortanca RT alma günü 14. gün (12-18 gün) ve ortanca tümör oluşturma günü 8. gün (6-13 gün) idi. Her bir deney kolu için bu değerler Tablo 4.3.'te sunulmuştur.

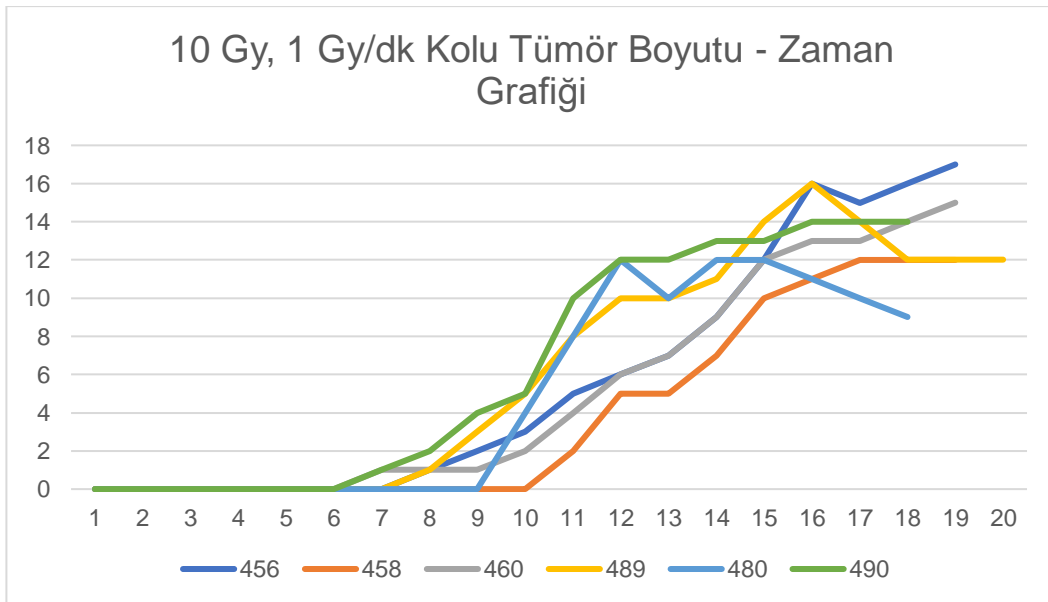
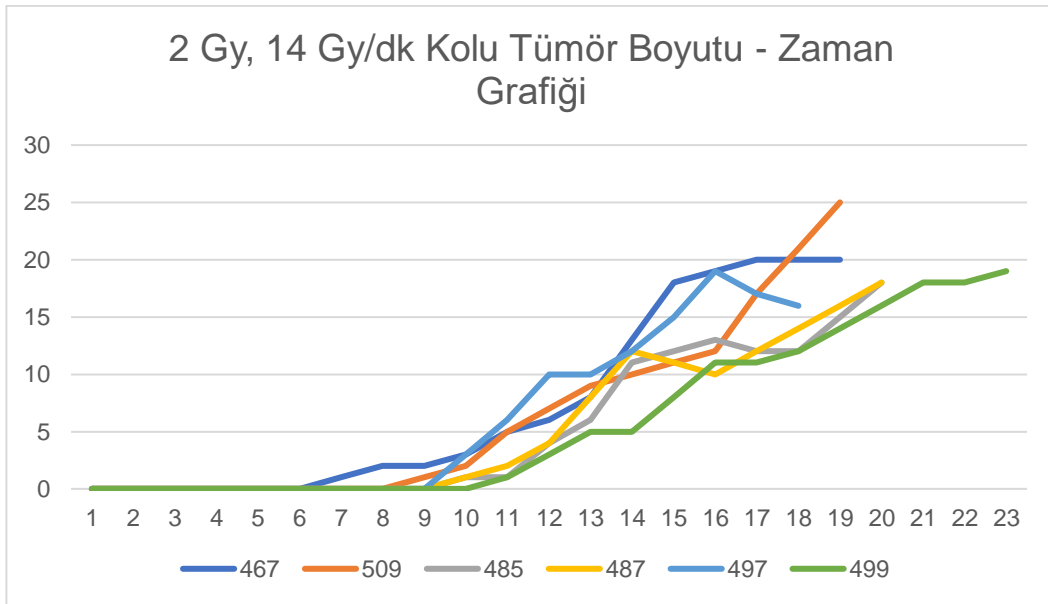
Tablo 4. 3. Gruplara göre sağ kalım, tümör oluşturma ve RT alma günü.

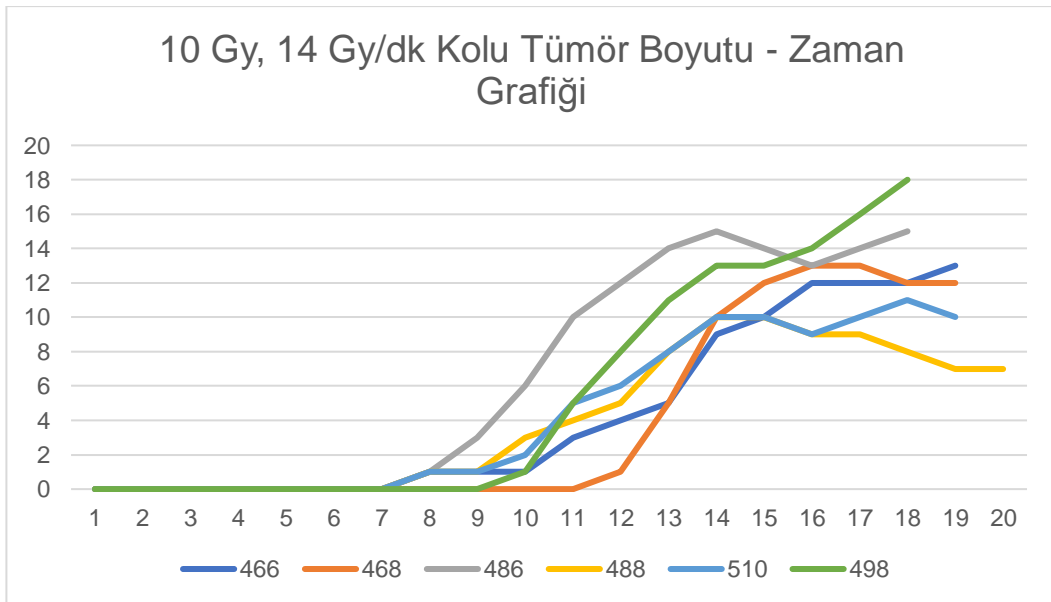
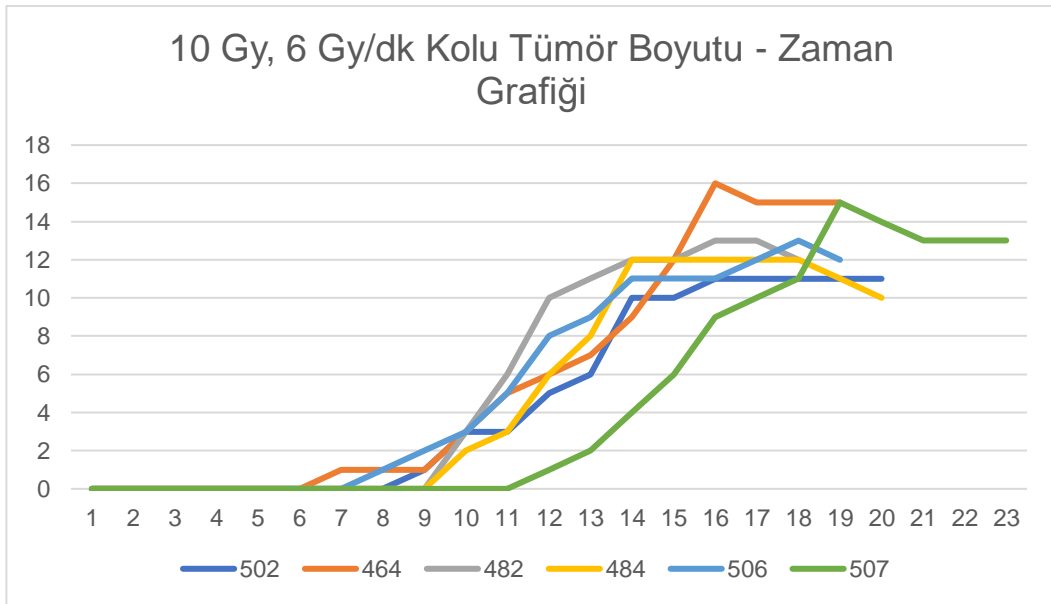
RT Grubu	Sağ kalım, ortanca (min-maks)	RT günü, ortanca (min-maks)	İlk Tümör Oluşumu, ortanca (min-maks)
2 Gy, 1 Gy/dk	20.5 (19-24)	13,5 (12-17)	8 (8-11)
2 Gy, 6 Gy/dk	19.5 (19-21)	13 (12-14)	7 (7-8)
2 Gy, 14 Gy/dk	21 (20-24)	14 (13-17)	10 (7-11)
10 Gy, 1 Gy/dk	20 (19-21)	13 (12-14)	8 (7-11)
10 Gy, 6 Gy/dk	21 (19-25)	14 (12-18)	9,5 (7-12)
10 Gy, 14 Gy/dk	21 (19-21)	14 (12-14)	8 (8-12)
Kontrol	20 (19-24)	-	9 (6-13)

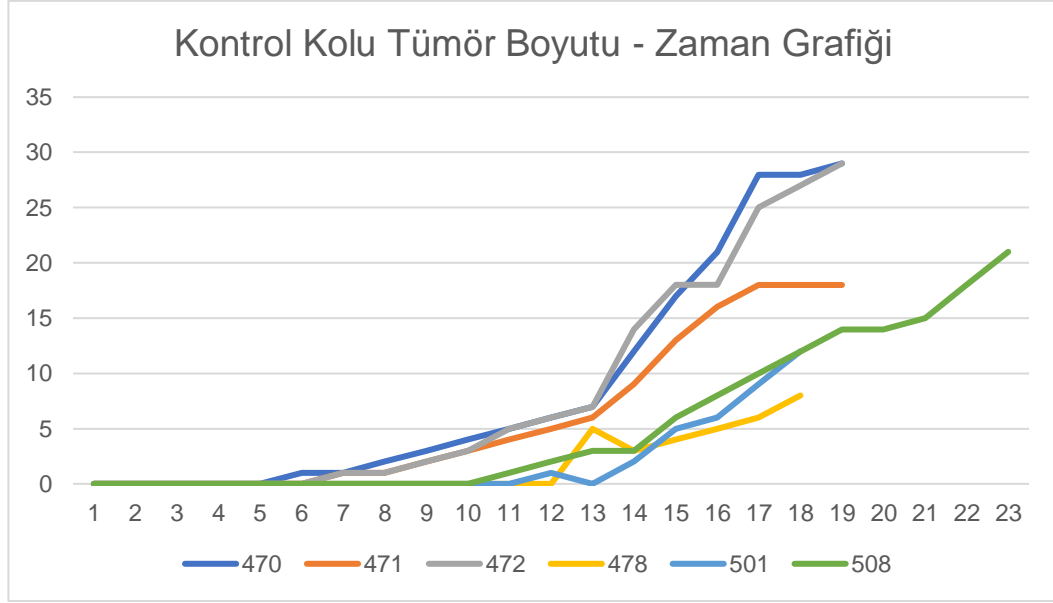
RT: Radyoterapi, min: minimum, maks: maksimum

Tüm deney süresince farelerin tümör boyutları günlük ölçümler ile takip edildi. Buna göre her bir kol için en büyük çap baz alınarak oluşturulmuş tümör boyutu-zaman grafikleri, aşağıda sırası ile sunulmuştur (Şekil 4.2).









Şekil 4. 2. Her bir deney kolu için tümör boyutu zaman grafikleri.

Farelerin her birinin sakrifikasyon esnasında hasat edilen tümörlerinin en büyük çapı ölçüldü (Şekil 4.3). Bu ölçümlere göre elde edilen ortalama tümör boyutları her bir kol için Tablo 4.4'te sunulmuştur.



Şekil 4. 3. Hasat edilen tümör ölçümü.

Tablo 4. 4. Sakrifikasyon sonrası tümörde ölçülen en uzun çap.

RT Grubu	Ortanca tümör boyutu (min-maks)
2 Gy, 1 Gy/dk	29.5 mm (24- 29)
2 Gy, 6 Gy/dk	23 mm (16- 37)
2 Gy, 14 Gy/dk	26 mm (22,5- 37)
10 Gy, 1 Gy/dk	19.5 mm (16-25)
10 Gy, 6 Gy/dk	15.5 mm (13-27)
10 Gy, 14 Gy/dk	16 mm (10-26)
Kontrol	31.25 mm (16-38)

RT: Radyoterapi, min: minimum, maks: maksimum

2 Gy grubu kendi içerisinde değerlendirildiğinde, üç farklı doz hızı için tümör boyutunda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0.12$). Aynı değerlendirme 10 Gy grubunda yapıldığında da üç farklı doz hızı için tümör boyutları arasında anlamlı fark elde edilmedi ($p=0.21$). 2 Gy, 10 Gy ve kontrol grubu karşılaştırıldığında; bu üç grup arasında tümör boyutu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0.01$). 10 Gy kolunda tümör boyutu 2 Gy koluna göre daha küçüktü ($p<0.01$). 2 Gy kolunun tümör boyutu açısından kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı farkı gözlenmedi ($p=0.53$); ancak 10 Gy kolu kontrol grubundan anlamlı olarak daha küçüktü ($p=0.007$).

4.2 Tek Hücre Jel Elektroforezinin Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Bu teknik ile her bir kan örneği için elde edilen 2 farklı lamda, 2 farklı comet kuyruk yoğunluğu ölçülmüş ve DNA hasar miktarı ile körele olan bu yoğunlukların ortalaması ile o örnek için olan comet kuyruk yoğunluğu elde edilmiştir. Her bir örnek için elde edilen kuyruk yoğunlukları Tablo 4.5.'te sunulmuştur.

Tablo 4. 5. Her bir kan örneği için elde edilen comet kuyruk yoğunluğu.

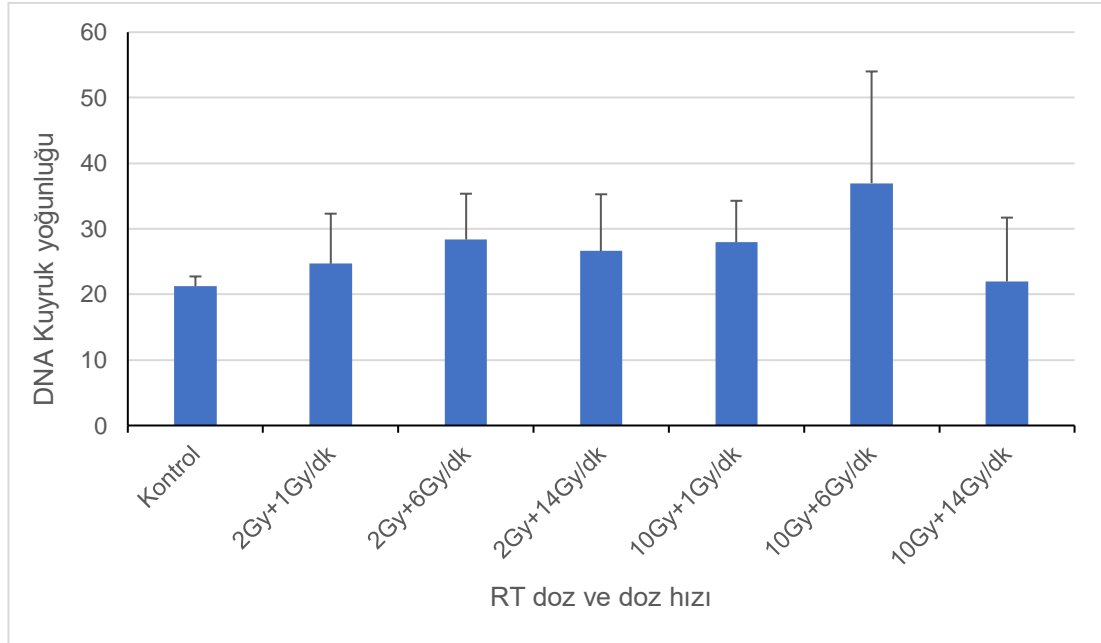
Örnek No	Ait Olduğu Deneş Kolu	Comet Kuyruk Yoğunluğu-1	Comet Kuyruk Yoğunluğu-2	Comet Kuyruk Yoğunluğu-Ortalama
470	Kontrol	21.21247	18,04183	19.62715
471	Kontrol	21.94687	24,28646	23.11666
472	Kontrol	21.48067	19,73341	20.60704
478	Kontrol	4.951522	4,607085	4.779303
501	Kontrol	17.16269	26,12192	21.6423
508	Kontrol	43.25001	37,99325	40.62163
457	2 Gy, 1 Gy/dk	18.15807	15,79526	16.97667
459	2 Gy, 1 Gy/dk	21.57785	26,52388	24.05087
461	2 Gy, 1 Gy/dk	17.3766	24,92519	21.15089
477	2 Gy, 1 Gy/dk	-	37,35509	37.35509
479	2 Gy, 1 Gy/dk	64.28542	64,5408	64.41311
491	2 Gy, 1 Gy/dk	16.49939	31,19635	23.84787
463	2 Gy, 6 Gy/dk	27.1603	27,7076	27.43395
465	2 Gy, 6 Gy/dk	41.16031	34.02254	37.59142
481	2 Gy, 6 Gy/dk	35.61457	36.76683	36.1907
483	2 Gy, 6 Gy/dk	25.89919	20.03713	22.96816
493	2 Gy, 6 Gy/dk	18.90969	31.77897	25.34433
495	2 Gy, 6 Gy/dk	19.8161	21.55923	20.68767
467	2 Gy, 14 Gy/dk	40.26783	37.22947	38.74865
485	2 Gy, 14 Gy/dk	29.61334	19.88088	24.74711
487	2 Gy, 14 Gy/dk	23.08076	20.23321	21.65698
497	2 Gy, 14 Gy/dk	17.13089	22.26599	19.69844
499	2 Gy, 14 Gy/dk	18.51537	18.93477	18.72507
509	2 Gy, 14 Gy/dk	34.3773	37.81327	36.09529
456	10 Gy, 1 Gy/dk	23.74473	12.01228	17.87851
458	10 Gy, 1 Gy/dk	29.3596	28.10995	28.73478
460	10 Gy, 1 Gy/dk	27.92273	23.7355	25.82911
480	10 Gy, 1 Gy/dk	47.60971	20.13539	33.87255
489	10 Gy, 1 Gy/dk	40.34836	30.37972	35.36404
490	10 Gy, 1 Gy/dk	25.83921	26.25237	26.04579

464	10 Gy, 6 Gy/dk	30.80232	21.76849	26.2854
482	10 Gy, 6 Gy/dk	16.70483	20.1391	18.42197
484	10 Gy, 6 Gy/dk	23.02476	18.30267	20.66371
502	10 Gy, 6 Gy/dk	51.16836	58.31017	54.73926
506	10 Gy, 6 Gy/dk	46.90788	47.21525	47.06157
507	10 Gy, 6 Gy/dk	62.57379	46.67608	54.62493
466	10 Gy, 14 Gy/dk	18.91401	17.79153	18.35277
468	10 Gy, 14 Gy/dk	13.44231	15.07286	14.25758
486	10 Gy, 14 Gy/dk	4.045454	10.30728	7.176365
488	10 Gy, 14 Gy/dk	27.79059	32.64947	30.22003
498	10 Gy, 14 Gy/dk	25.87423	19.4534	22.66382
510	10 Gy, 14 Gy/dk	36.02593	52.77507	44.4005

Her bir grup için kuyruk yoğunluklarının ortalama değerleri, minimum-maksimum değerleri ve standart sapmaları Tablo 4.6.'da ve Şekil 4.4'te sunulmuştur.

Tablo 4. 6. Comet kuyruk yoğunluğu değerleri.

Grup	Comet Kuyruk Yoğunluğu (ortalama)	Standart Sapma	Minimum	Maksimum
Kontrol	21.24829	1.49280	19.63	23.12
2Gy, 1Gy/dk	24.676278	7.64104	16.98	37.36
2Gy, 6Gy/dk	28.369371	6.99181	20.69	37.59
2Gy, 14Gy/dk	26.611923	8.66328	18.73	38.75
10Gy, 1Gy/dk	27.954128	6.32802	17.88	35.36
10Gy, 6Gy/dk	36.966141	17.04915	18.42	54.74
10Gy, 14Gy/dk	21.971235	9.74370	10.31	36.03



Şekil 4. 4. Kuyruk değerleri ortalama, minimum- maksimum ve standart sapma değerleri.

Farklı dozlar için kan mononükleer hücrelerdeki hasar karşılaştırıldığında, kontrol kolundaki hasar istatistiksel anlamlı olarak 2 Gy ($p=0.076$) ve 10 Gy ($p=0.04$) kolundan daha az idi. Kontrol grubu RT almayan grup olduğundan hasarın RT kollarına göre daha az olması beklenen bir durumdur. 2 Gy ve 10 Gy kolları arasında DNA hasar farkı gözlenmedi ($p=0.65$).

Her bir doz kolu kendi içerisinde doz hızları açısından değerlendirildi. 2 Gy kolunda, 1 Gy/dk, 6 Gy/dk ve 14 Gy/dk kolları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p=0.79$). 10 Gy kolunda ise 1 Gy/dk kolu ile diğer iki doz hızı kolu arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p=0.24$, $p=0.5$) ancak 6Gy/dk kolunun 14 Gy/dk koluna oranla daha fazla DNA hasarı oluşturduğu görüldü ($p=0.07$).

4.3 Histopatolojik Bulgular

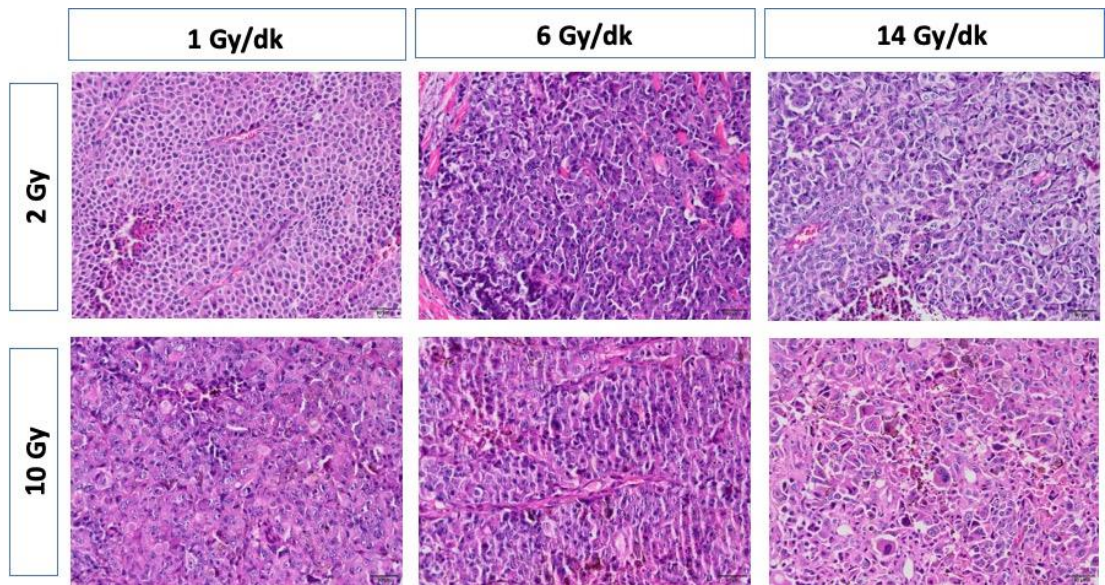
Hasat edilen tümörlerden hazırlanan preparatlar Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim dalında değerlendirildi. H&E boyaması yapılan parafin bloklar; farklı doz ve doz hızlarına ait gruplardaki melanom morfolojisi, mitotik aktivite, pleomorfizm, nekroz açısından histomorfolojik olarak incelendi (Şekil 4.5.).

Her bir fareye ait 10 büyük büyütme alanındaki (BBA) mitoz sayısı ve pleomorfizm skoru (skor 1, 2 ve3) ayrıntıları Tablo 4.7.'de verilmiştir.

Tablo 4. 7. Her bir fareye ait 10 büyük büyütme alanındaki (BBA) mitoz sayısı ve pleomorfizm skoru.

Örnek No	Ait Olduğu Deney Kolu	Mitoz Sayısı (10 BBA)	Pleomorfizm Skoru
470	Kontrol	106	1
471	Kontrol	138	1
472	Kontrol	128	1
478	Kontrol	132	1
501	Kontrol	96	2
508	Kontrol	98	1
457	2 Gy, 1 Gy/dk	72	2
459	2 Gy, 1 Gy/dk	62	2
461	2 Gy, 1 Gy/dk	88	2
477	2 Gy, 1 Gy/dk	112	1
479	2 Gy, 1 Gy/dk	114	2
491	2 Gy, 1 Gy/dk	114	2
463	2 Gy, 6 Gy/dk	66	2
465	2 Gy, 6 Gy/dk	78	2
481	2 Gy, 6 Gy/dk	50	2
483	2 Gy, 6 Gy/dk	-	2
493	2 Gy, 6 Gy/dk	86	2
495	2 Gy, 6 Gy/dk	64	1
467	2 Gy, 14 Gy/dk	56	2
485	2 Gy, 14 Gy/dk	108	1
487	2 Gy, 14 Gy/dk	106	1
497	2 Gy, 14 Gy/dk	120	2
499	2 Gy, 14 Gy/dk	66	2
509	2 Gy, 14 Gy/dk	26	1
456	10 Gy, 1 Gy/dk	62	3
458	10 Gy, 1 Gy/dk	80	3
460	10 Gy, 1 Gy/dk	48	3

480	10 Gy, 1 Gy/dk	34	2
489	10 Gy, 1 Gy/dk	42	3
490	10 Gy, 1 Gy/dk	56	3
464	10 Gy, 6 Gy/dk	64	3
482	10 Gy, 6 Gy/dk	50	3
484	10 Gy, 6 Gy/dk	86	3
502	10 Gy, 6 Gy/dk	48	3
506	10 Gy, 6 Gy/dk	34	3
507	10 Gy, 6 Gy/dk	30	3
466	10 Gy, 14 Gy/dk	70	3
468	10 Gy, 14 Gy/dk	48	3
486	10 Gy, 14 Gy/dk	54	3
488	10 Gy, 14 Gy/dk	28	3
498	10 Gy, 14 Gy/dk	56	3
510	10 Gy, 14 Gy/dk	-	2



Şekil 4. 5. Farklı doz ve doz hızlarına ait melanom morfolojisi (HE, 50um).

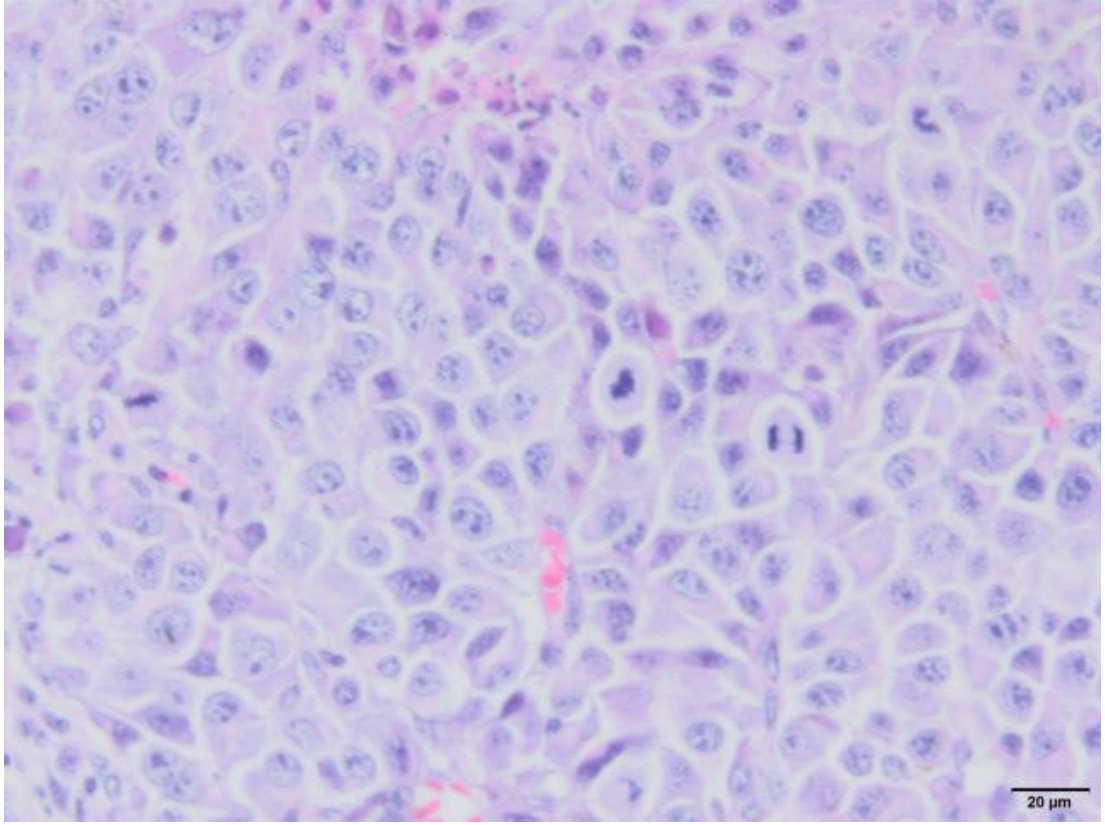
Her bir grup için 10 BBA'daki mitoz sayılarının ortalama değerleri, minimum-maksimum değerleri ve standart sapmaları Tablo 4.8.'de sunulmuştur.

Tablo 4. 8. Her bir fareye ait 10 büyük büyütme alanındaki (BBA) mitoz sayısı ortalama minimum- maksimum ve standart sapma değerleri.

Grup	Mitoz Sayısı (10 BBA, ortalama)	Standart Sapma	Minimum	Maksimum
Kontrol	21.24829	1.49280	19.63	23.12
2Gy, 1 Gy/dk	93.66	23.09	62	114
2Gy, 6 Gy/dk	68.80	13.82	50	86
2Gy, 14 Gy/dk	80.33	36.73	26	120
10Gy, 1 Gy/dk	53.66	16.26	34	80
10Gy, 6 Gy/dk	52	20.63	30	86
10Gy, 14 Gy/dk	51	15.27	28	70

Farklı dozlar ve kontrol grubu için 10 BBA'daki mitoz sayısı karşılaştırıldığında; üç grup arasında mitoz sayıları arasında istatistiksel olarak fark olduğu görüldü ($p < 0.01$). Birbirinden farklı olan bu üç grup kendi içlerinde ikişerli olarak karşılaştırıldığında ise 10 Gy kolundaki mitoz sayısının, 2 Gy kolundaki mitoz sayısından istatistiksel olarak anlamlı olarak daha az olduğu görüldü ($p = 0.001$). Benzer şekilde 2 Gy ve 10 Gy kollarının mitoz sayısı kontrol grubundan farklı idi (sırası ile $p = 0.016$ ve $p < 0.01$).

Her bir doz kolu kendi içerisinde doz hızları açısından değerlendirildi. 2 Gy kolunda; 1 Gy/dk, 6 Gy/dk ve 14 Gy/dk kolları arasında, 10 BBA'daki mitoz sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p = 0.28$). Benzer şekilde 10 Gy kolunda; 1 Gy/dk, 6 Gy/dk ve 14 Gy/dk kolları arasında, 10 BBA'daki mitoz sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p = 0.97$) (Şekil 4.6.).



Şekil 4. 6. Mitotik Figürler (40X Büyük Büyütme Alanı, H&E, 20um).

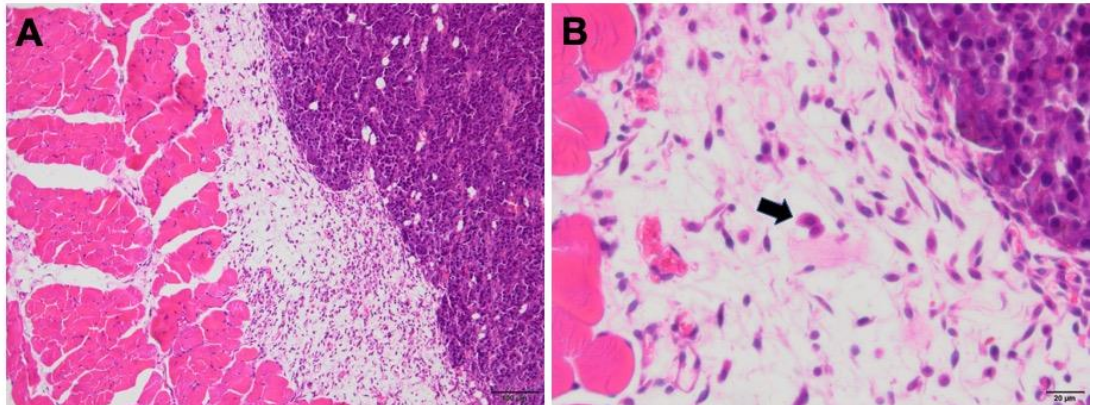
Farklı dozlar ve kontrol grubu için pleomorfizm skoru karşılaştırıldığında ise; üç grup arasında pleomorfizm skorları arasında istatistiksel olarak fark olduğu görüldü ($p<0.01$). Birbirinden farklı olan bu üç grup kendi içlerinde ikişerli olarak karşılaştırıldığında ise 10 Gy kolundaki pleomorfizm skorunun, 2 Gy kolundaki pleomorfizm skorundan istatistiksel olarak anlamlı olarak daha fazla olduğu görüldü ($p<0.01$). 2 Gy kolunun pleomorfizm skoru ile kontrol grubunun pleomorfizm skoru arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmezken ($p=0.04$) 10 Gy kolunun pleomorfizm skoru kontrol grubunun skorundan anlamlı olarak farklı idi (Şekil 4.7.).



Şekil 4. 7. Pleomorfizm skorlarının histomorfolojik görünümleri.

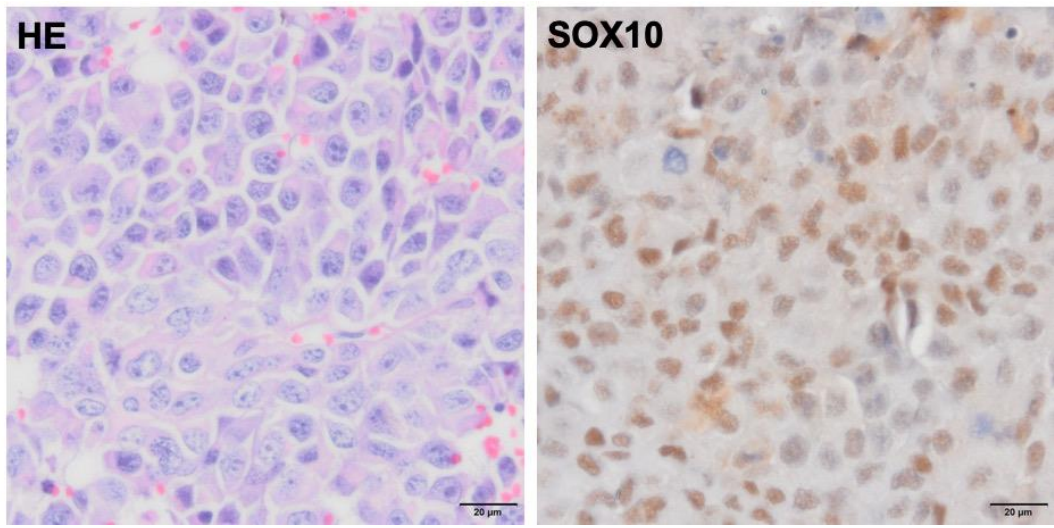
Her bir doz kolu kendi içerisinde doz hızları açısından değerlendirildi. 2 Gy kolunda; 1Gy/dk, 6 Gy/dk ve 14 Gy/dk kolları arasında, pleomorfizm skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p= 0.35$). Benzer şekilde 10 Gy kolunda; 1Gy/dk, 6 Gy/dk ve 14 Gy/dk kolları arasında, pleomorfizm skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p= 0.58$).

Her bir parafin blok ayrı ayrı incelendiğinde, tüm deney kolları için yaygın coğrafik nekrozlar olduğu görüldü ancak belirgin farklılık izlenmedi. Morfolojik olarak intratümöral belirgin inflamatuvar hücre reaksiyonu izlenmedi. Peritümöral alanda mononükleer hücreler (makrofaj, lenfosit ve plazma hücreleri), mast hücreleri ve fibrovasküler aktivite belirgindi. Özellikle artmış mast hücre reaksiyonu her grupta dikkati çekmiştir (Şekil 4.8.). Deney grupları arasında bu inflamasyonun şiddeti ve hücre yoğunlukları arasında fark gözlenmedi. Tümör stroması farklı deney kollarında benzer olarak değerlendirildi.

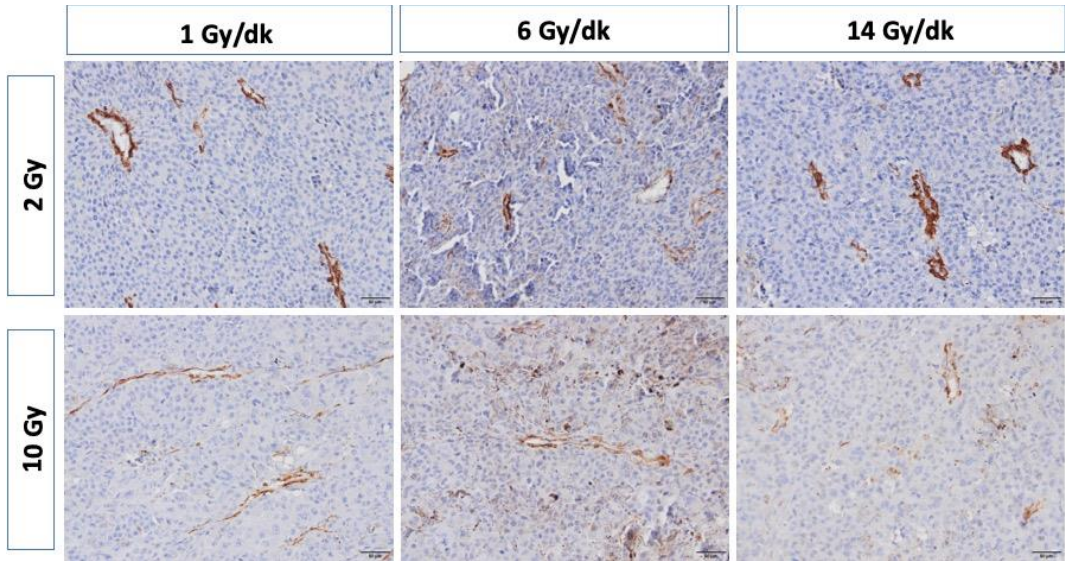


Şekil 4. 8. Peritümöral inflamasyon (A: 100um, B: 20um, siyah ok: mast hücresi).

İmmünohistokimyasal profil incelendiğinde ise hücrelerin, nöral krest gelişimine katılan ve melanositik kökenli hücrelerin belirtilmesi ve ayırt edilmesinde kullanılan SOX-10 ekspresyonu gösterdiği görüldü (Şekil 4.9.). İmmün hücreler için yapılan boyamalarda CD68, CD8 ve MPO ile fare proteinine yönelik spesifik boyanma elde edilememiştir. Preparatlar aSMA ile boyandığında, intratümöral vasküler yapılardaki düz kas pozitifliği izlenildi. Yüksek dozda vasküler yapıların duvarında incelme ve aSMA ile zayıf boyanma mevcut idi (Şekil 4.10.). Ancak farklı doz hızları arasında aSMA boyası ile boyanma paterninde farklılık izlenmedi.

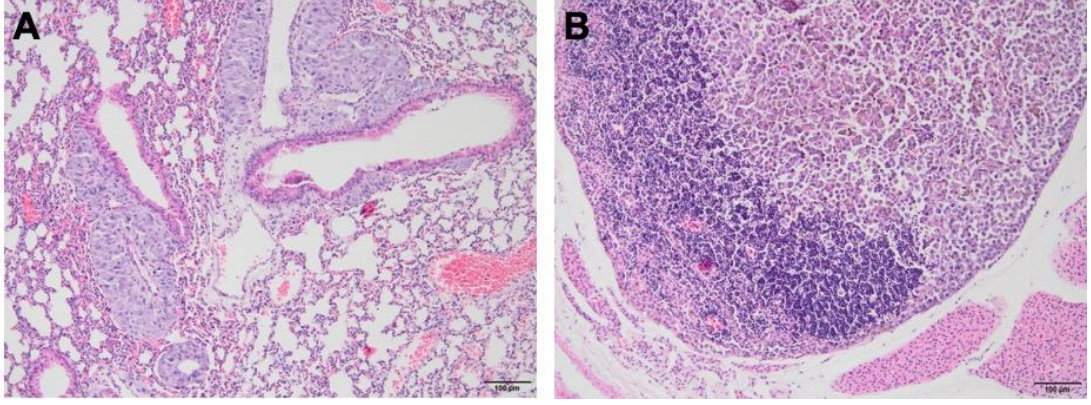


Şekil 4. 9. H&E ve SOX10 (20um).



Şekil 4. 10. Farklı doz ve doz hızlarına ait gruplardaki melanom modelinde a-SMA (1:1.000 dilüsyon) immünohistokimyasal boyanma özellikleri (50um).

İki Gy doz, 1 Gy/dk kolun ait olan iki farede (459 ve 491) akciğer metastazı gözlemlendi. Akciğer ve lenf nodu metastazı histomorfolojik görünümü şekil 4.11.'de sunulmuştur.



Şekil 4. 11. Akciğer ve lenf nodu metastazı histomorfolojik görünümü (A: akciğer B: lenf nodu).

5. TARTIŞMA

RT’de doz hızı, 1970’lerden itibaren çalışılan, son dönemde ise gerek gelişen teknoloji ile RT cihazlarının yeteneklerinin artması gerekse FLASH-RT gibi yeni RT tekniklerinin gelişmesi ile tekrar RT araştırma sahnesine giren bir parametredir. Hall ve Brenner tarafından özellikle brakiterapi uygulamaları için, 4 ayrı sınıfta tanımlanmıştır⁶⁵. Ancak eksternal RT uygulamaları için uzun bir süre bu etki göz ardı edilmiştir. Özellikle 2000’li yıllarda tedavi planlama sistemlerinin ve FFF’li tedavilerin hayatımıza girmesi ile, 25 Gy/dk’ya kadar yüksek doz hızları klinik kullanıma girmiştir. Günümüz klinik pratiğinde sık kullanılan doz hızlarının karşılaştırıldığı bu çalışmada; kliniğimizde eksternal RT’de uygulanabilen en düşük (1 Gy/dk) ve en yüksek doz hızı (14 Gy/dk) ve rutin klinikte sıklıkla kullanılan doz hızı (6 Gy/dk) kan mononükleer hücrelerdeki DNA kırık miktarı ve TMC’ye etkileri açısından karşılaştırıldı. 2 Gy ve 10 Gy dozlarda, farklı doz hızlarında DNA kırığı miktarında ve TMC histomorfolojik özelliklerinde bir fark saptanmadı.

RT ile indüklenen DNA hasarı zamanla ilgili faktörlerle oldukça ilişkili olduğu bilinmektedir⁹². Bu ilişki temel olarak subletal hasar tamiri ile ilişkilendirilmektedir. RT’nin verilme süresi ve/veya RT fraksiyonları arasındaki zaman uzadıkça, RT’nin neden olduğu DNA tek zincir kırıklarının tamir ihtimali artacak ve verilen İR’nin oluşturduğu hasar miktarı azalacaktır. Bu nedenle doz hızı çalışmalarında da düşük doz hızı ile ışınlanan hücre serilerinde daha düşük sağ kalımlar raporlanmıştır^{72,73}. Wilkins ve arkadaşları tarafından iki farklı melanom hücre hattında (SKMEL3 ve HT144) yapılan bir çalışmada, 150 kV yüksek doz hızlı x-ray (1120 mGy/dk) ve düşük doz hızlı Radyum kaynağı (8,8 mGy/dk) karşılaştırıldığında doz hızı düştükçe klonojenik sağ kalımın azaldığı görülmüştür⁹³. 2000’li yıllarda lineer akseleratör ve FFF ışın demetleri ile yapılan çalışmalarda tutarsız sonuçlar elde edilmiştir. Lohse ve arkadaşları, 2 glioblastom hücre hattında (T98G ve U87-MG) tasarladıkları çalışmada, 4 Gy/dk ve 24 Gy/dk FFF ışın demetleri ile yaptıkları ışınlamada doz hızı arttıkça, klonojenik sağ kalımın azaldığı gösterilmiştir⁹⁴. Bu çalışmalardan farklı olarak Sorensen ve arkadaşları, 56,5 Gy/sn ve 338 Gy/sn doz hızları aralığında, heybeli sıçan akciğer fibroblastı hücre serisi ve insan baş boyun skuamöz hücre serilerinde değişen doz hızının etkisini görememişlerdir⁹⁵. Çalışmamızda benzer şekilde, FFF ışın demetleri ile elde edilen orta seviyeli yüksek doz hızı ve düşük doz hızları arasında

tedavi sonu tümör boyutu, faredeki mononükleer hücre DNA hasarı ve TMÇ histomorfolojik özellikleri açısından fark saptanmadı. İstatistiksel olarak anlamlı elde edilen tek fark 10 Gy dozu 6 Gy/dk ve 14 Gy/dk kolları arasındaki DNA hasar farkıdır ve 6 Gy/dk kolunda daha fazla hasar olduğu görüldü. Bu durum, literatürdeki verilerin aksine düşük doz hızında daha fazla hasar ile karşımıza çıkmıştır ve farenin daha uzun süre ışın demetine maruz kalması dolayısı ile dolaşımdaki kan hücrelerinin hasara maruz kalma olasılığının artması ile ilişkilendirildi. Diğer doz hızları için böyle bir durum gözlenmemekle beraber doz hızının DNA hasarı üzerine etkisi için anlamlı kabul edilmedi. Çalışmamızda farklı doz hızları ile tümör boyutu, DNA hasarı ve TMÇ açısından fark görülmemesi; modern lineer akseleratörlerde elde edilen farklı doz hızlarında FFF ışın demetlerinin hücre sağ kalımı ve TMÇ histomorfolojik özelliklerinde değişikliğe sebep olmadığı şeklinde yorumlanabilir. Yine bu durum, çalışmamızda kullanılan doz hızı skalasında (1 Gy/dk ve 14 Gy/dk arası) gösterilememiş de olabilir. Bu sebeple, karşılaştırılan doz hızları arasındaki farkın daha fazla olmasına imkan tanıyabilecek, daha yüksek doz hızlarına çıkabilen cihazlar kullanılarak deneyin tekrarlanması faydalı olacaktır.

Doz hızının farklı doku tiplerinde farklı etki yapabileceği de literatürdeki tartışma konularından biridir. Özellikle normal doku ve tümör dokusu arasında farklı cevapların olabileceği gösterilmiştir. Fu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, BALB/c farelerde oluşturulan EMT6 fare meme kanseri sinjenik tümör modelinde; tümör hücreleri, kemik iliği ve bağırsak hücreleri farklı doz hızlarında ışınlandığında, kemik iliği hücrelerinde doz hızı düştükçe sağ kalan hücre fraksiyonunun düştüğü; EMT6 hücreleri ve bağırsak hücrelerinde ise doz hızı düştükçe sağ kalan hücre fraksiyonunun arttığı gözlemlenmiştir⁹⁶. Bu durum doz hızı etkisinin normal doku ve tümör hücresi için farklı şekilde ve hatta normal doku içerisinde de farklı doku tiplerine göre farklı tezahür ettiği anlamına geliyor olabilir. Bu durum, her dokunun farklı α/β değerlerine sahip olması ve yine buna bağlı olarak farklı subletal hasar tamir kapasitesine sahip olmasından ileri gelmektedir. Düşük α/β oranına sahip tümörlerin, subletal hasar tamir kapasitesinin yüksek olduğu ve bu nedenle doz hızı etkisinin belirgin bir şekilde izlenebileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda, doz hızı etkisini incelemek amacı ile α/β oranı düşük olan ($\alpha/\beta < 3$) malign melanom hücre hattı seçilmiştir⁹⁷. Ancak oluşturulan tümörün intratümöral inflamasyon azlığı doz hızlarının TMÇ üzerindeki

etkisini gözlemlemeyi zorlaştırmış olabilir. Doz hızı farklı hücre tiplerinde farklı etkilere sebep olabileceğinden çalışma sonuçlarımızın farklı tümör modellerinde verifiye edilmesi faydalı olacaktır.

RT, TMC'yi modüle etme kabiliyeti oldukça yüksek bir tedavi modalitesidir. Özellikle son yıllarda, immünoterapinin onkolojik tedavilere yeni bir bakış açısı getirmesi ile İR'nin bu TMC etkileri oldukça önem kazanmıştır. Kısaca tümöre karşı oluşturulan immün cevabın artırılması ve tümörün immünojenitesini arttırmaya dayalı olan bu yöntemler, immün tedavilerle beraber kullanıldığında artmış tedavi yanıtı ile ilişkilendirilmişlerdir⁹⁸⁻¹⁰⁰. Özellikle immünoterapilere yanıtızsız; TMC'de düşük CD8+ konsantrasyonuna sahip, PD-L1 ekspresyonu düşük, düşük mutasyon yükü olan ve yüksek mitoz sayısına sahip tümörlerde İR tedavinin gidişatında hayati öneme sahip olabilir¹⁰¹. Bu nedenle RT ve immünoterapi birlikte kullanımı için optimal tedavi şeması önemli bir araştırma alanıdır. Bu araştırmalar; optimal doz ve fraksinyasyon şeması, optimal doz hızı, optimal tedavi hacmi, optimal İR tipi (proton, nötron, foton vb.), optimal zamanlama, optimal immünoterapi ajanı gibi alt başlıkları kapsamaktadır. Çalışmalar optimal doz ve fraksinyasyon şemasını bulmak için oldukça yoğunlaşmış görünmektedir. İlk çalışmalar konvansiyonel dozlar için başlamış, kolon kanseri (CT26) fare sinjenik tümör modelinde 5 fraksiyonda toplam 10 Gy tedavinin tümör için T hücre infiltrasyonunu arttırdığı gösterilmiştir⁹⁸. Hipofraksiyone RT rejimlerinde de tümör içi infiltrasyonun arttığı gösterilince, optimal şema aranmaya başlanılmış ve Grapin ve arkadaşları tarafından, yine kolon kanseri (CT26) sinjenik tümör modelinde, 3x8 Gy ve 2x 18 Gy'in 1x16,4 Gy'den daha uzun süreli tümör yanıtına neden olduğu ve hatta farklı fraksinyasyon biçimlerinin farklı hücre tiplerini TMC'ye çağırdığını göstermiştir⁹⁹. Tek fraksiyon tedavi rejimlerinin de TMC'de yoğun CD8+ infiltrasyonuna sebep olabildiği MC38 kolon karsinomu tümör modelinde gösterilmiştir¹⁰². Yine meme (TUBO) ve kolon kanseri tümör modellerinde (MC38) 1x12 Gy ve 1x20 Gy RT'nin PD-L1 ekspresyonunu arttırdığı ispatlanmıştır¹⁰³. Buna zıt olarak, Vanpoullie-Box ve arkadaşları, 12 Gy ve üzeri fraksinyasyon dozlarının artmış Trex aktivasyonu ve intra-sitoplazmik DNA yıkımı nedeni ile azalmış immünojeniteye neden olabileceği gösterilmiştir¹⁰⁴. Literatürdeki bu farklı sonuçların nedeni RT'nin oluşturduğu yanıtın tümör dokusu tipine göre değişmesi olabilir.

Optimal doz hızı araştırmaları ise doz-fraksinyasyon çalışmaları kadar yoğun yrtlmemiştir. Bunun sebebi, geçmişte eksternal RT'nin sınırlı bir doz hızı aralığında verilmesi nedeni ile bunun biyolojik bir etkiye sahip olmayacağı düşüncesi olabilir. Ancak gelişen teknoloji, gelişen ve günlük pratiğimize hızla giren sofistike RT teknikleri bu görüşün sorgulanmasına neden olmuştur. Eksternal RT uygulamalarında doz hızı iki teknik ile arttırılabilir: FFF ışın demetleri ve FLASH-RT¹⁰⁵. FFF tekniği, filtreden geçirilmeyen ışın demetleri ile homojen olmayan bir doz profili eldesi, azalmış saçılım, artmış doz hızı ve kısalımış tedavi süresi ilkelerine dayanır. FFF tedavi teknikleri ile eksternal RT'nin 25 Gy/dk doz hızlarına kadar verilebilmesi; *Volumetric Arc* RT (VMAT) tekniği ile değişken doz hızlarının ve yoğun doz hızı modülasyonun aynı tedavi fraksiyonu içerisinde yapılabilmesi bu yeni tekniklerin olası değişken biyolojik etkinliğini düşündürmektedir. Literatürde geçmişten günümüze farklı doz hızlarının tümör yanıtı üzerine etkileri incelenmiş olsa da; yeni tedavi teknikleri ve FFF ışın demetleri ile yapılan doz hızı modülasyonun TMC zerine etkilerini araştıran çalışma nadirdir. Laurent ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, BALB/c fareler ve CT26 kolon kanseri hücre dizisi ile oluşturulan sinjenik tümör modelinde; 1x16,5 Gy, 24 Gy/dk ve 4 Gy/dk olmak üzere iki farklı doz hızında verilmiş, RT sonrası 7. günde yapılan sakrifikasyonda akım sitometrisi ile TMC'deki immün profile bakılmıştır. İki deney grubu arasında tümör hacimleri ve TMC'deki T lenfositler, CD4+, CD+8, NK ve Treg hücreleri arasında fark gsterilememiřtir¹⁰⁶. Bizim alışmamızda benzer şekilde 3 farklı doz hızının TMC zerine etkilerine bakılmıştır. Çalışmamızda, en yüksek doz hızı kolu olarak kliniğimizde FFF ışın demeti ile ulaşılabilen en yüksek doz hızı olan 14 Gy/dk olarak seçilmiş ve üç deney kolu arasında kanser hücreleri mitoz sayıları, pleomorfizm skorları, nekroz skorları, TMC vasküler stroma ve peritümöral immün hücre profili açısından değişken doz hızlarında fark saptanmamıştır. Bu durum günlük pratikte kullanılan, FFF ve değişken doz hızı ile tedavi veren VMAT tekniklerinin, RT ile sinerjistik çalışan immün yolaqlara yıkıcı etki oluşturmadığı şeklinde yorumlanabilir ve elimizdeki kanıtlarla, günlük pratikte bu teknikler değişken biyolojik etkinlik şüphesi olmadan uygulanabilir. Çalışmamız bu açıdan literatürdeki nc çalışmalardan biridir ancak daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda, peritümöral alanda artmış mast hücre reaksiyonu her grupta dikkati çekmiştir. Mast hücrelerinin genellikle alerjik reaksiyonlardaki rolleri bilinse de son dönemde tümör immünolojisinde önemli rol oynadıkları ile ilgili kanıtlar mevcuttur¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Fare modellerinde mast hücrelerinin, tümör gelişimine yardımcı ve anjiyogenezi arttırıcı roller üstlendiği gösterilmiştir¹¹⁰. İnsan malign melanom hücrelerinde yapılan analizlerde ise, TMC’de yer alan mast hücrelerinin sağlıklı ciltte yer alan mast hücrelerinden farklı olarak tümör büyümesine yardımcı ve anjiyogenezi arttırıcı sitokinler salgılayarak TMC’nin şekillenmesinde önemli rol oynadıkları gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada mast hücre sayısı ile prognozun korele olduğu bulunmuştur¹⁰⁷. Çalışmamızda deney kolları arasında histomorfolojik olarak peritümöral mast hücre yoğunluğu arasında fark görülmesi de farklı doz ve doz hızı kollarındaki mast hücre aktivitesinin farklılığı merak konusudur. Melanomda peritümöral inflamasyonun ana hücrelerinden olduğu gözlemlenen mast hücrelerinin İR’ye yanıtı gelecek çalışmaların konusu olabilir.

Çalışmamızda TMC’deki vasküler yapılanmalar da incelenmiş ve yüksek doz RT alan kolda (10 Gy) vasküler yapıların duvarında inceltme ve a-SMA ile zayıf boyanma bulunmuştur ancak farklı doz hızlarında belirgin bir farklılık izlenmemiştir. Yüksek doz İR’nin intratümöral damarlar üzerindeki etkileri, stereotaktik radyocerrahi (SRC) ve stereotaktik beden radyoterapisinin (SBRT) hızlıca hayatımıza girdiği 2010’lu yıllardan beri araştırma konusu olmuştur. Lineer kuadratik model ile yapılan matematiksel hesaplamalarda, (%10-20 hipoksik hücre fraksiyonu, $\alpha/\beta=10$, *oxygen enhancement ratio*=3, tek fraksiyon nedeni ile reoksijenasyon ve repopulasyon olmadığı varsayılarak) çok daha az lokal kontrol oranı olacağı düşünülürken yapılan klinik çalışmalarda 10 Gy ve üzeri dozlarda, SRS ve SBRT’nin %80 ve üzeri lokal kontrol oranları ile ilişkilendirilmesi, yüksek doz RT’nin sadece DNA hasarı ile hücreleri öldürmediği ve hücre ölümünde farklı mekanizmaların da rol oynayabileceğini düşündürmüştür¹¹¹. Bu mekanizmalar ise immünojenik ölüm ve vasküler hasar temeline dayandırılmıştır. Hayvan tümör modellerinde ve insan xenograft tümör modellerinde yapılan çalışmalarda 10 Gy ve üzere İR uygulandığında, tümör içerisinde fonksiyon gösteren vasküler yapıların RT sonrası saatler içerisinde fonksiyonunu kaybettiği gözlemlenmiştir. Bu durumun muhtemel ani endotel hasarı ve apoptozisi sonrası zaten oldukça kırılgan olan tümör damar yapısının işlememeye

başlamamasından ileri geldiği düşünülmektedir¹¹². Çalışmalar aynı zamanda 10 Gy ve üzeri dozlarda endotel hücre membranında asit sfingomyelinaz (ASMase) aktivitesinin artması sonucunda oluşan seramid, artmış *bcl2* ve *bax* proteinleri ile mitokondrial apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Daha yüksek dozlarda (>17 Gy) ise seramid, seramid sentaz yolağı üzerinden oluşturularak apoptozis yolağı indüklenir¹¹³. Çalışmamızda 10 Gy kolunda görülen zayıf aSMA boyanması, bahsedilen yüksek endotel hasarı ile ilişkilendirildi.

Literatürde doz hızı RT protokollerinde en az standardizasyona sahip RT parametresidir. Bu durum muhtemelen, daha önce de bahsedildiği üzere klinikte kullanılan farklı eksternal RT doz hızlarının muhtemelen biyolojik bir farklılığa yol açmayacağı düşüncesinden kaynaklanmaktadır. Protokollerdeki doz hızının şemalarının belirsizliği, daha önceki doz ve fraksinasyon çalışmalarındaki çelişkili sonuçların sebeplerinden biri olabilir. Bu tez çalışması doz hızının standardize edilmesine dikkat çekilmesi açısından da önemli bir adımdır.

5.1 Kısıtlılıklar

“RT’de farklı doz hızlarının, TMC üzerine farklı etkileri vardır.” hipotezi ile yola çıktığımız çalışmamızda, klinikte sık kullanılan üç farklı doz hızının TMC üzerinde farklı etkilere yol açmadığını gösterdik. Ancak çalışmamızın bazı kısıtlılıkları mevcuttur. Öncelikle, çalışmamızda kliniğimizde ulaşılabilir en yüksek doz hızı olan 14 Gy/dk yüksek doz hızı seçeneği olarak kullanılmıştır. Çalışmamızda kullandığımız doz hızı skalasında TMC’de anlamlı değişiklik elde edilmemiş olsa da bu durum daha yüksek doz hızlarında da değişiklik olmayacağı anlamına gelmemektedir. Çalışmamız 14 Gy’dk’ya kadar olan doz hızında yapılan değişikliklerin TMC’de farklılık yaratmayacağını ispatlamaktadır. Günümüz teknolojisinde FFF ışın demetleri ile 25 Gy/dk’ya kadar doz hızları elde edilebilmektedir. Bu nedenle bu doz hızlarında yapılacak daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda yüksek immünojenite göstermesi ve düşük α/β oranına sahip olması nedeni ile malign melanom hücre hattı kullanılmıştır. Doz hızı etkilerinin tümör tipine göre değişiklik gösterebildiği literatürde ispatlanmıştır. Bizim çalışmamızda

sadece tek bir hücre serisi için sinjenik tümör modeli oluşturulmuştur bu nedenle sonuçlar bu sınırlarda değerlendirilmelidir.

Çalışmamızda sınırlı harcama bütçesi nedeni ile TMC sadece histomorfolojik olarak incelenmiştir. Akım sitometri gibi hücre tipleri ve sayılarının ölçülebildiği sistemler ile TMC hücreleri daha ayrıntılı değerlendirilebilir. Mevcut analizler ile farklı doz hızlarının TMC üzerine farklı etkilerinin olduğu gösterilmedi bu nedenle de immünoterapilerle eşzamanlı kullanımda tercih edilecek doz hızı ile ilgili bir öneride bulunulmamıştır.

Yine çalışmamızda sadece RT ile indüklenen TMC değişikliklerine bakılmıştır, eş zamanlı immünoterapiler ile daha farklı bir TMC dinamiği elde edilebilir. Bu sebeple benzer bir çalışma tasarımında eşzamanlı immünoterapiler ile yüksek doz hızlı RT'nin ve hatta çok yüksek hızlı FLASH-RT gibi tekniklerin TMC üzerindeki muhtemel farklı etkileri çalışılmalıdır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- Düşük doz (2 Gy) ve yüksek doz (10 Gy) RT'nin, tümör boyutu ve TMC histomorfolojisi üzerinde farklı etkileri gözlemlendi. Yüksek doz RT alan kolda, daha küçük tümör boyutu ($p<0.01$), TMC'de kanser hücrelerinde azalmış mitoz ($p=0.01$) ve artmış pleomorfizm ($p<0.01$) vardı. Yüksek doz RT kolunda vasküler yapıların duvarında inceltme ve aSMA ile zayıf boyanma mevcuttu. Yüksek ve düşük doz alan kollardaki DNA hasar miktarı benzerdi ($p=0.65$).
- Malign melanom tümör modelinde, 1 Gy/dk ve 14 Gy/dk arası doz hızı değişiminin tedavi sonu tümör boyutu, kan mononükleer hücrelerde DNA kırık miktarı ve TMC üzerinde bir değişikliğe yol açmadığı gösterildi.
- Çalışmamızda kullanılan doz hızı aralıklarında, klinikte kullanılan FFF demetlerinin tedavilerde yıkıcı bir biyolojik sonuca sebep olmayacağı görüldü. Deneylelerimizde VMAT tekniği kullanılmamış olsa da benzer doz hızı skalasında VMAT tedavilerinin de biyolojik yıkıcı bir etkiye sebep olmayacağı öngörülebilir.
- Doz hızı, geçmişte sadece brakiterapi için yaygın kullanılan bir değişken olsa da günümüzde yüksek teknoloji lineer akseleratörler ile yüksek doz hızlarına çıkmak mümkündür. Bu nedenle, protokollerde atlanan ve standardize edilmeyen bir tedavi değişkeni olmaktan çıkmalıdır.
- Çalışmamızda farklı doz hızlarının TMC üzerine benzer etkiler yaptığı görüldüğü için eşzamanlı immünoterapiler ile en optimal sonucu elde edebilecek doz hızı şeması önerisinde bulunulamadı. Eşzamanlı tedaviler ile doz hızı etkilerini incelemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Hanahan D, Coussens LM: Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 21:309-22, 2012
2. Witz IP: The tumor microenvironment: the making of a paradigm. *Cancer Microenviron* 2 Suppl 1:9-17, 2009
3. Witz IP, Levy-Nissenbaum O: The tumor microenvironment in the post-PAGET era. *Cancer Lett* 242:1-10, 2006
4. Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T: The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci* 125:5591-6, 2012
5. Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-74, 2011
6. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3983-8, 2003
7. Bonnet D, Dick JE: Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3:730-7, 1997
8. Gilbertson RJ, Rich JN: Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nat Rev Cancer* 7:733-6, 2007
9. Thiery JP: Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* 15:740-6, 2003
10. Singh A, Settleman J: EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 29:4741-51, 2010
11. Ahmed Z, Bicknell R: Angiogenic signalling pathways. *Methods Mol Biol* 467:3-24, 2009
12. Dejana E, Orsenigo F, Molendini C, et al: Organization and signaling of endothelial cell-to-cell junctions in various regions of the blood and lymphatic vascular trees. *Cell Tissue Res* 335:17-25, 2009
13. Carmeliet P: VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 69 Suppl 3:4-10, 2005
14. Jain RK: Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307:58-62, 2005
15. Pietras K, Ostman A: Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res* 316:1324-31, 2010
16. Schäfer M, Werner S: Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:628-38, 2008
17. Dvorak HF: Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 315:1650-9, 1986
18. Coffelt SB, Lewis CE, Naldini L, et al: Elusive identities and overlapping phenotypes of proangiogenic myeloid cells in tumors. *Am J Pathol* 176:1564-76, 2010
19. Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z: Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell* 18:884-901, 2010
20. DeNardo DG, Andreu P, Coussens LM: Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev* 29:309-16, 2010

21. Qian BZ, Pollard JW: Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141:39-51, 2010
22. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, et al: The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 8:618-31, 2008
23. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P: Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol* 182:4499-506, 2009
24. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, et al: The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 12:298-306, 2012
25. Hsieh CS, Lee HM, Lio CW: Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nat Rev Immunol* 12:157-67, 2012
26. Campbell DJ, Koch MA: Treg cells: patrolling a dangerous neighborhood. *Nat Med* 17:929-30, 2011
27. Coronella JA, Telleman P, Kingsbury GA, et al: Evidence for an antigen-driven humoral immune response in medullary ductal breast cancer. *Cancer Res* 61:7889-99, 2001
28. Milne K, Köbel M, Kalloger SE, et al: Systematic analysis of immune infiltrates in high-grade serous ovarian cancer reveals CD20, FoxP3 and TIA-1 as positive prognostic factors. *PLoS One* 4:e6412, 2009
29. Lin EY, Li JF, Gnatovskiy L, et al: Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res* 66:11238-46, 2006
30. Räsänen K, Vaheri A: Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp Cell Res* 316:2713-22, 2010
31. Bergfeld SA, DeClerck YA: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev* 29:249-61, 2010
32. Wu X, Hu J, Zhou L, et al: In vivo tracking of superparamagnetic iron oxide nanoparticle-labeled mesenchymal stem cell tropism to malignant gliomas using magnetic resonance imaging: Laboratory investigation. *Journal of Neurosurgery JNS* 108:320-329, 2008
33. Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL, et al: Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells* 27:2614-23, 2009
34. Levental KR, Yu H, Kass L, et al: Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 139:891-906, 2009
35. Siegel RL, Miller KD, Jemal A: Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 69:7-34, 2019
36. Passarelli A, Mannavola F, Stucci LS, et al: Immune system and melanoma biology: a balance between immunosurveillance and immune escape. *Oncotarget* 8:106132-106142, 2017
37. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, et al: Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3:991-8, 2002
38. Kakizaki A, Fujimura T, Furudate S, et al: Immunomodulatory effect of peritumorally administered interferon-beta on melanoma through tumor-associated macrophages. *Oncoimmunology* 4:e1047584, 2015
39. Fujimura T, Kakizaki A, Kambayashi Y, et al: Cytotoxic antimelanoma drugs suppress the activation of M2 macrophages. *Exp Dermatol* 27:64-70, 2018

40. Pathria P, Louis TL, Varner JA: Targeting Tumor-Associated Macrophages in Cancer. *Trends Immunol* 40:310-327, 2019
41. Ruitter D, Bogenrieder T, Elder D, et al: Melanoma-stroma interactions: structural and functional aspects. *Lancet Oncol* 3:35-43, 2002
42. Villanueva J, Herlyn M: Melanoma and the tumor microenvironment. *Curr Oncol Rep* 10:439-46, 2008
43. Romero-Garcia S, Moreno-Altamirano MM, Prado-Garcia H, et al: Lactate Contribution to the Tumor Microenvironment: Mechanisms, Effects on Immune Cells and Therapeutic Relevance. *Front Immunol* 7:52, 2016
44. Nasi A, Fekete T, Krishnamurthy A, et al: Dendritic cell reprogramming by endogenously produced lactic acid. *J Immunol* 191:3090-9, 2013
45. Durgeau A, Virk Y, Corgnac S, et al: Recent Advances in Targeting CD8 T-Cell Immunity for More Effective Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* 9:14, 2018
46. Munn DH, Mellor AL: IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance. *Trends Immunol* 37:193-207, 2016
47. Umansky V, Shevchenko I, Bazhin AV, et al: Extracellular adenosine metabolism in immune cells in melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 63:1073-80, 2014
48. Serpa J: Tumor Microenvironment: The Main Driver of Metabolic Adaptation. *Tumor Microenvironment*, 2020
49. Fidler IJ, Hart IR: Biological Diversity in Metastatic Neoplasms: Origins and Implications. *Science* 217:998-1003, 1982
50. Jung J, Seol HS, Chang S: The Generation and Application of Patient-Derived Xenograft Model for Cancer Research. *Cancer Res Treat* 50:1-10, 2018
51. Fiebig HH, Neumann HA, Henß H, et al: Development of Three Human Small Cell Lung Cancer Models in Nude Mice, in Seeber S (ed): *Small Cell Lung Cancer*. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 1985, pp 77-86
52. Elkind MM, Sutton H: X-Ray Damage and Recovery in Mammalian Cells in Culture. *Nature* 184:1293-1295, 1959
53. Hall EJ, Giaccia AJ: *Radiobiology for the Radiologist*, Wolters Kluwer Health, 2018
54. Maier P, Hartmann L, Wenz F, et al: Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. *Int J Mol Sci* 17, 2016
55. Sia J, Szmyd R, Hau E, et al: Molecular Mechanisms of Radiation-Induced Cancer Cell Death: A Primer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8, 2020
56. Gong Y, Fan Z, Luo G, et al: The role of necroptosis in cancer biology and therapy. *Molecular Cancer* 18:100, 2019
57. Lang X, Green MD, Wang W, et al: Radiotherapy and Immunotherapy Promote Tumoral Lipid Oxidation and Ferroptosis via Synergistic Repression of SLC7A11. *Cancer Discov* 9:1673-1685, 2019

58. Herrera FG, Bourhis J, Coukos G: Radiotherapy combination opportunities leveraging immunity for the next oncology practice. *CA Cancer J Clin* 67:65-85, 2017
59. Jarosz-Biej M, Smolarczyk R, Cichoń T, et al: Tumor Microenvironment as A "Game Changer" in Cancer Radiotherapy. *Int J Mol Sci* 20, 2019
60. Wang R, Zhou T, Liu W, et al: Molecular mechanism of bystander effects and related abscopal/cohort effects in cancer therapy. *Oncotarget* 9:18637-18647, 2018
61. Barker HE, Paget JT, Khan AA, et al: The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. *Nat Rev Cancer* 15:409-25, 2015
62. Nguemgo Kouam P, Bühler H, Hero T, et al: The increased adhesion of tumor cells to endothelial cells after irradiation can be reduced by FAK-inhibition. *Radiat Oncol* 14:25, 2019
63. Chajon E, Castelli J, Marsiglia H, et al: The synergistic effect of radiotherapy and immunotherapy: A promising but not simple partnership. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 111:124-132, 2017
64. Rubner Y, Wunderlich R, Rühle PF, et al: How does ionizing irradiation contribute to the induction of anti-tumor immunity? *Front Oncol* 2:75, 2012
65. Hall EJ: Radiation dose-rate: a factor of importance in radiobiology and radiotherapy. *Br J Radiol* 45:81-97, 1972
66. Ling CC, Gerweck LE, Zaider M, et al: Dose-rate effects in external beam radiotherapy redux. *Radiother Oncol* 95:261-8, 2010
67. Petragnano F, Pietrantonì I, Di Nisio V, et al: Modulating the dose-rate differently affects the responsiveness of human epithelial prostate- and mesenchymal rhabdomyosarcoma-cancer cell line to radiation. *Int J Radiat Biol* 96:823-835, 2020
68. Mu X, Löfroth PO, Karlsson M, et al: The effect of fraction time in intensity modulated radiotherapy: theoretical and experimental evaluation of an optimisation problem. *Radiother Oncol* 68:181-7, 2003
69. Moiseenko V, Duzenli C, Durand RE: In vitro study of cell survival following dynamic MLC intensity-modulated radiation therapy dose delivery. *Med Phys* 34:1514-20, 2007
70. Ogino H, Shibamoto Y, Sugie C, et al: Biological effects of intermittent radiation in cultured tumor cells: influence of fraction number and dose per fraction. *J Radiat Res* 46:401-6, 2005
71. Cron GO, Beghein N, Crockart N, et al: Changes in the tumor microenvironment during low-dose-rate permanent seed implantation iodine-125 brachytherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 63:1245-51, 2005
72. Metting NF, Braby LA, Roesch WC, et al: Dose-rate evidence for two kinds of radiation damage in stationary-phase mammalian cells. *Radiat Res* 103:204-18, 1985
73. Marchese MJ, Zaider M, Hall EJ: Dose-rate effects in normal and malignant cells of human origin. *Br J Radiol* 60:573-6, 1987

74. Hornsey S, Alper T: Unexpected Dose-rate Effect in the Killing of Mice by Radiation. *Nature* 210:212-213, 1966
75. Bourhis J, Montay-Gruel P, Gonçalves Jorge P, et al: Clinical translation of FLASH radiotherapy: Why and how? *Radiother Oncol* 139:11-17, 2019
76. Lin B, Gao F, Yang Y, et al: FLASH Radiotherapy: History and Future. *Frontiers in Oncology* 11, 2021
77. Favaudon V, Caplier L, Monceau V, et al: Ultrahigh dose-rate FLASH irradiation increases the differential response between normal and tumor tissue in mice. *Science Translational Medicine* 6, 2014
78. Montay-Gruel P, Acharya MM, Petersson K, et al: Long-term neurocognitive benefits of FLASH radiotherapy driven by reduced reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116:10943-10951, 2019
79. Montay-Gruel P, Bouchet A, Jaccard M, et al: X-rays can trigger the FLASH effect: Ultra-high dose-rate synchrotron light source prevents normal brain injury after whole brain irradiation in mice. *Radiotherapy and Oncology* 129:582-588, 2018
80. Montay-Gruel P, Petersson K, Jaccard M, et al: Irradiation in a flash: Unique sparing of memory in mice after whole brain irradiation with dose rates above 100Gy/s. *Radiotherapy and Oncology* 124:365-369, 2017
81. Simmons DA, Lartey FM, Schüller E, et al: Reduced cognitive deficits after FLASH irradiation of whole mouse brain are associated with less hippocampal dendritic spine loss and neuroinflammation. *Radiotherapy and Oncology* 139:4-10, 2019
82. Vozenin M-C, De Fornel P, Petersson K, et al: The Advantage of FLASH Radiotherapy Confirmed in Mini-pig and Cat-cancer Patients. *Clinical Cancer Research* 25:35-42, 2019
83. Beyreuther E, Brand M, Hans S, et al: Feasibility of proton FLASH effect tested by zebrafish embryo irradiation. *Radiotherapy and Oncology* 139:46-50, 2019
84. Bourhis J, Sozzi WJ, Jorge PG, et al: Treatment of a first patient with FLASH-radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology* 139:18-22, 2019
85. Zhou G: Mechanisms underlying FLASH radiotherapy, a novel way to enlarge the differential responses to ionizing radiation between normal and tumor tissues. *Radiation Medicine and Protection* 1:35-40, 2020
86. Aykin-Burns N, Ahmad IM, Zhu Y, et al: Increased levels of superoxide and H₂O₂ mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation. *Biochemical Journal* 418:29-37, 2009
87. Spitz DR, Buettner GR, Petronek MS, et al: An integrated physico-chemical approach for explaining the differential impact of FLASH versus conventional dose rate irradiation on cancer and normal tissue responses. *Radiotherapy and Oncology* 139:23-27, 2019
88. Pratz G, Kapp DS: A computational model of radiolytic oxygen depletion during FLASH irradiation and its effect on the oxygen enhancement ratio. *Physics in Medicine & Biology* 64:185005, 2019
89. Buonanno M, Grilj V, Brenner DJ: Biological effects in normal cells exposed to FLASH dose rate protons. *Radiotherapy and Oncology* 139:51-55, 2019

90. 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* 15:5379-88, 2009
91. Schwartz AL, Nath PR, Allgauer M, et al: Antisense targeting of CD47 enhances human cytotoxic T-cell activity and increases survival of mice bearing B16 melanoma when combined with anti-CTLA4 and tumor irradiation. *Cancer Immunol Immunother* 68:1805-1817, 2019
92. Beddok A, Lahaye C, Calugaru V, et al: A Comprehensive Analysis of the Relationship Between Dose Rate and Biological Effects in Preclinical and Clinical Studies, From Brachytherapy to Flattening Filter Free Radiation Therapy and FLASH Irradiation. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 113:985-995, 2022
93. Wilkins RC, Ng CE, Raaphorst GP: Comparison of high dose rate, low dose rate, and high dose rate fractionated radiation for optimizing differences in radiosensitivities in vitro. *Radiat Oncol Investig* 6:209-15, 1998
94. Lohse I, Lang S, Hrbacek J, et al: Effect of high dose per pulse flattening filter-free beams on cancer cell survival. *Radiother Oncol* 101:226-32, 2011
95. Sørensen BS, Vestergaard A, Overgaard J, et al: Dependence of cell survival on instantaneous dose rate of a linear accelerator. *Radiotherapy and Oncology* 101:223-225, 2011
96. Fu KK, Phillips TL, Kane LJ, et al: Tumor and normal tissue response to irradiation in vivo: variation with decreasing dose rates. *Radiology* 114:709-16, 1975
97. van Leeuwen CM, Oei AL, Crezee J, et al: The alfa and beta of tumours: a review of parameters of the linear-quadratic model, derived from clinical radiotherapy studies. *Radiation Oncology* 13:96, 2018
98. Dovedi SJ, Cheadle EJ, Popple AL, et al: Fractionated Radiation Therapy Stimulates Antitumor Immunity Mediated by Both Resident and Infiltrating Polyclonal T-cell Populations when Combined with PD-1 Blockade. *Clin Cancer Res* 23:5514-5526, 2017
99. Grapin M, Richard C, Limagne E, et al: Optimized fractionated radiotherapy with anti-PD-L1 and anti-TIGIT: a promising new combination. *J Immunother Cancer* 7:160, 2019
100. Zhang X, Niedermann G: Abscopal Effects With Hypofractionated Schedules Extending Into the Effector Phase of the Tumor-Specific T-Cell Response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 101:63-73, 2018
101. Galon J, Bruni D: Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat Rev Drug Discov* 18:197-218, 2019
102. Filatenkov 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* 21:3727-39, 2015
103. Deng L, Liang H, Burnette B, et al: Irradiation and anti-PD-L1 treatment synergistically promote antitumor immunity in mice. *J Clin Invest* 124:687-95, 2014
104. Vanpouille-Box C, Alard A, Aryankalayil MJ, et al: DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nat Commun* 8:15618, 2017

105. Boustani J, Lecoester B, Baude J, et al: Anti-PD-1/Anti-PD-L1 Drugs and Radiation Therapy: Combinations and Optimization Strategies. *Cancers (Basel)* 13, 2021
106. Laurent PA, Kownacka A, Boidot R, et al: *In-vivo* and *in-vitro* impact of high-dose rate radiotherapy using flattening-filter-free beams on the anti-tumor immune response. *Clinical and Translational Radiation Oncology* 24:116-122, 2020
107. Bahri R, Kiss O, Prise I, et al: Human Melanoma-Associated Mast Cells Display a Distinct Transcriptional Signature Characterized by an Upregulation of the Complement Component 3 That Correlates With Poor Prognosis. *Front Immunol* 13:861545, 2022
108. Somasundaram R, Connelly T, Choi R, et al: Tumor-infiltrating mast cells are associated with resistance to anti-PD-1 therapy. *Nature Communications* 12:346, 2021
109. Kaesler S, Wölbing F, Kempf WE, et al: Targeting tumor-resident mast cells for effective anti-melanoma immune responses. *JCI Insight* 4, 2019
110. Varricchi G, Galdiero MR, Loffredo S, et al: Are Mast Cells MASTers in Cancer? *Front Immunol* 8:424, 2017
111. Song CW, Kim M-S, Cho LC, et al: Radiobiological basis of SBRT and SRS. *International Journal of Clinical Oncology* 19:570-578, 2014
112. Kolesnick R, Fuks Z: Radiation and ceramide-induced apoptosis. *Oncogene* 22:5897-5906, 2003
113. Balagamwala EH, Chao ST, Suh JH: Principles of radiobiology of stereotactic radiosurgery and clinical applications in the central nervous system. *Technol Cancer Res Treat* 11:3-13, 2012

EKLER**Ek 1. Etik Kurul Onay Belge**