T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANKARA ŞEHİR HASTANESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

# YÜKSEK YOĞUNLUKLU TEDAVİ EDİCİ ULTRASON'UN (HITU) İNVİTRO GLİAL TÜMÖR HÜCRE KÜLTÜR ORTAMINDA ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

**Dr. Kaan Tuğberk ÖZDEMİR**

Ankara, 2021

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANKARA ŞEHİR HASTANESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

# YÜKSEK YOĞUNLUKLU TEDAVİ EDİCİ ULTRASON'UN (HITU) İNVİTRO GLİAL TÜMÖR HÜCRE KÜLTÜR ORTAMINDA ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

**Dr. Kaan Tuğberk ÖZDEMİR**

**Tez Danışmanı**
**Prof. Dr. Gıyas AYBERK**
**Doç. Dr. Atilla KAZANCI**

Ankara, 2021

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

07.02.2021

Dr. Kaan Tuğberk ÖZDEMİR

## ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitim süresince; mesleki beceri ve yeteneklerimi geliştirmemde bilgi ve deneyimini esirgemeyen, maddi ve manevi her konuda bana destek olan, yanında çalışmaktan onur ve gurur duyduğum, hiçbir zaman sabır, özveri ve hoşgörüsünü benden esirgemeyen, öğrencisi olmaktan ve birlikte çalışmaktan her zaman onur ve mutluluk duyduğum çok değerli hocam ve tez danışmanım, Prof. Dr. Gıyas AYBERK ve Atilla KAZANCI'ya, değerli bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, uzmanlık eğitimim sırasında değerli katkılarından dolayı Prof. Dr. Ömer Faruk TÜRKOĞLU'na, Prof. Dr. Pınar ÖZIŞIK, Doç. Dr. Ahmet Gürhan GÜRÇAY'a, Doç. Dr. Oktay GÜRCAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Ercan BAL'a , Op. Dr. Naci ALTUNDAL'a, Dr. Öğr. Üyesi Harun DEMİRCİ, Op. Dr. Burak BAHADIR'a, Op. Dr. Özgür ÖZATEŞ'e, Op. Dr. Hümeyra KULLUKÇU ALBAYRAK'a, Prof. Dr. Murad BAVBEK'e, Op. Dr. H. Tayfun BALIM'a, Op. Dr. Hakan TOSUN'a ve birlikte çalıştığımız bütün hocalarıma saygı ve teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ayrıca benden yardımlarını ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Beyin ve Sinir Cerrahi Anabilim Dalında çalışan çok kıymetli mesai arkadaşlarıma ve kıdemlilerime; Op. Dr. Cevat AKINCI'ya, Op. Dr. İsmail BOZKURT'a, Op. Dr. Pınar ÖZDEMİR'e, Op. Dr. Can KÜÇÜKYILDIZ'a, Op. Dr. S. Kürşat ŞİMŞEK'e, Dr. H. Anıl ÖZMAT'a, Dr. S. Taha ASLAN'a, Dr. Mustafa ÖZKAN'a, Dr. Kadir ÇETİNKAYA'ya, Dr. Yusuf KÜÇÜK'e, Dr. Dila GENCEROĞLU'na, Dr. F. Betül SAYLAK'a, Gülşah KARAARSLAN'a, Esin ÇAKMAK LAÇİNOK'a, Alaattin BİLİCİ'ye sevgi ve saygılarımla teşekkür ederim.

Doğduğum andan itibaren bu günlere gelmemde en büyük emeğe sahip, her zaman arkamda olduklarını hissettiğim çok kıymetli fedakar anneme, babama ve kardeşime, yine bu sürecin her aşamasında bana destek olan sabır ve sevgisini her zaman en yakından hissettiğim çok kıymetli eşim, yol arkadaşım Çağla ÖZDEMİR'e, biricik oğlum Kaan ÖZDEMİR'e teşekkürü bir borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

**BEYAN** ..... **ii**
**ÖNSÖZ** ..... **iii**
**İÇİNDEKİLER** ..... **iv**
**ÖZET** ..... **v**
**ABSTRACT** ..... **vii**
**SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ** ..... **ix**
**ŞEKİLLER DİZİNİ** ..... **x**
**TABLOLAR DİZİNİ** ..... **xi**
**RESİMLER DİZİNİ** ..... **xii**
**1. GİRİŞ** ..... **1**
**2. GENEL BİLGİLER** ..... **5**
2.1. Kanser Oluşum Mekanizmaları ..... 5
2.2. Beyin Tümörleri ..... 9
2.2.1. Risk Faktörleri ..... 9
2.2.1.1. Biyolojik ve Genetik Risk Faktörleri ..... 9
2.2.1.1.1. Nörokütanöz Kanser Sendromlar ..... 9
2.2.1.1.1. Familyal Kanser Sendromları ..... 14
2.2.1.2. Çevresel Risk Faktörleri ..... 16
2.2.1.3. Davranışsal Risk Faktörleri ..... 16
2.2.3. Epidemiyoloji ..... 17
2.2.4 Beyin Tümörlerinin Sınıflama ve Histopatolojisi ..... 18
2.2.5 Beyin Tümörleri ve Tümör Kök Hücreleri ..... 28
2.2.6 Beyin Türmörlerinin Tedavileri ..... 29
**3. GEREÇ VE YÖNTEM** ..... **37**
**4. BULGULAR** ..... **41**
**5. TARTIŞMA** ..... **47**
**6. SONUÇ** ..... **52**
**7. KAYNAKÇA** ..... **54**

## ÖZET

**Amaç:**

Beyin tümörleri, toplumda sık görülen, cerrahi girişim, radyoterapi ve kemoterapinin uygulanmasına rağmen hastanın yaşam süresinin fazla uzatılamadığı patolojilerdir. Yüksek risk barındıran ve hastanın yaşam kalitesini etkileyen radyoterapi gibi tedavi yöntemleri, ciddi komplikasyonlara hatta hayati risklerin ortaya çıkmasına neden olabilir. Bu olumsuz etkiler hem hastanın yaşam konforunu düşürmekte hem de sosyal çevresinde ciddi sorunlar yaratmaktadır. Ayrıca oluşan komplikasyonların tedavisi de ciddi bir maliyete yol açmakta ve kısıtlı bütçe imkanlarına sahip ülkelerdeki kurumların, bu mali yükün altından kalkmasını güçleştirmektedir.

Radyoterapi gibi uygulama sonrası komplikasyonları yüksek olan tedavi yöntemlerine alternatif geliştirilmesi, bahsedilen sorunların kısmen azalmasına neden olacaktır. Bu çalışmada, non-invaziv yeni bir tedavi yöntemi olan ve radyoterapi gibi erken ve geç komplikasyonlara yol açmayan Yüksek Yoğunluklu Tedavi Edici Ultrason'un (HITU), laboratuvar ortamında uygulamadan sonra bu hücrelerin yapısal bütünlüğüne ve bunda rol alan olası moleküler yollara etkisini inceledik.

**Gereç ve Yöntem:**

Glioblastoma hücreleri kültür yoluyla çoğaltıldıktan sonra, eşit miktarda 6 gruba ayrıldı. Birinci, ikinci ve üçüncü gruplara herhangi bir tedavi verilmedi. Bu üç grup inkübatörden hemen sonra, 4-6 saat ve 24 saat geçtikten sonra üç farklı aşamada sırasıyla mikroskobik inceleme, flow sitometri ile hücre sayımı ve ATP proliferasyon kiti ile ATP aktivitesi ve hücre canlılığı incelemelerine tabi tutuldu. Dört, beş ve altıncı gruplara ise HITU uygulaması sonrasında yine inkübatörden hemen sonra, 4-6 saat ve 24 saat geçtikten sonra üç farklı aşamada sırasıyla mikroskobik inceleme, flow sitometri ile hücre sayımı ve ATP proliferasyon kiti ile ATP aktivitesi ve hücre canlılığı incelemelerine tabi tutuldu. HITU uygulanan ve hiçbir tedavi uygulanmayan gruplar karşılaştırıldı.

**Bulgular:**

HITU uygulanan hücre gruplarında uygulamanın hemen sonrasında anlamlı bir değişiklik izlenmezken 4-6 saat ve 24 saat sonrasındaki yapılan faz kontrast mikroskobu incelemesinde tümör hücrelerinin yüzeye tutunmadığı ve hücrelerin sayısında anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi. Tedavi uygulanan ve uygulanmayan gruplar karşılaştırıldığında, tedavi uygulanan grupta flow sitometri ile hücre sayımı yapılarak canlı hücre sayısının zamanla azaldığı görüldü. ATP proliferasyon kiti ile ATP aktivitesi ve hücre canlılığı incelemesi yaptığımzı gruplarda ATP florasans yoğunluğunun zamanla hücre sayısıyla birlikte anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi.

**Sonuç:**

HITU uyguladığımız 3 grupta da yapılan mikroskobik inceleme, flow sitometri ile hücre sayımı ve ATP aktivitesi incelemeleri sonucunda, hücrelerin canlılıklarını devam ettirmedikleri gözlemlenmiştir. Kontrol gruplarıında ise hücre canlılığının devam ettiği mikroskobik inceleme, flow sitometri ve ATP aktivitesiyle gözlendi. Bu çalışma HITU'nun, noninvaziv bir tedavi yöntemi olarak Glioblastom hücrelerine lethal etkisi mikroskobik ve moleküler düzeyde gösterilmiştir.

## ABSTRACT

**Purpose:**

Brain tumors are common pathologies in the society, in which the life expectancy of the patient cannot be extended despite the application of surgical intervention, radiotherapy and chemotherapy. Radiotherapy-like treatment methods, which have high risks and affect the quality of life of the patient, may cause serious complications and even life risks. These negative effects both reduce the life comfort of the patient and cause serious distress in his social environment. In addition, the treatment of complications causes a serious cost and makes it difficult for institutions in countries with limited budgetary resources to cope with this financial burden.

Developing alternatives to treatment methods with high post-application complications such as radiotherapy will partially reduce the mentioned problems. In this study, we examined the effect of High Intensity Area Ultrasound (HIFU), which is a new non-invasive treatment method and does not cause early and late complications such as radiotherapy, on the structural integrity of these cells and the possible molecular pathways involved in this after laboratory application.

**Equipment and Methods:**

After the glioblastoma cells were grown by culture, they were divided into 6 groups in equal amounts. No treatment was given to the first, second and third groups. These three groups were subjected to microscopic examination, cell count by flow cytometry and ATP activity and cell viability by ATP proliferation kit, respectively, at three different stages, immediately after the incubator, after 4-6 hours and finally after 24 hours. In groups four, five, and six, after HIFU application, it was followed by microscopic examination, cell count with flow cytometry and ATP proliferation kit in three different stages: immediately after the incubator, after 4-6 hours and finally after 24 hours. vitality was subjected to examinations. HIFU and no treatment groups were compared.

**Results:**

While no significant change was observed in the cell groups treated with HITU immediately after 4-6 hours and 24 hours after the phase contrast microscopy examination, it was observed that the tumor cells did not adhere to the surface and there was a significant decrease in the number of cells. When the treated and untreated groups were compared, it was observed that the number of viable cells decreased over time by counting cells with flow cytometry in the treated group. It was observed that the ATP fluorescence density decreased significantly with the number of cells over time in the groups where ATP activity and cell viability were analyzed with the ATP proliferation kit.

**Conclusion:**

As a result of microscopic examination, flow cytometry cell count and ATP activity studies in all 3 groups where we applied HITU, it was observed that the cells did not maintain their vitality. In the control groups, continued cell viability was observed by microscopic examination, flow cytometry and ATP activity. In this study, the lethal effect of HITU on Glioblastoma cells as a noninvasive treatment method has been demonstrated at microscopic and molecular level.

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

**ABD** : Amerika Birleşik Devletleri
**BT** : Bilgisayarlı tomografi
**CBTRUS** : The Central Brain Tumor Registry of the United States
**EGFR** : Epidermal growth faktör reseptör
**ESWL** : Ekstra Corporeal Shock Wave Lithotripsy
**FDA** : Food and Drug Administration
**GBM** : Glioblastom
**HIFU** : High İntensity of Focused Ultrasound
**HITU** : High İntensity of Therapeutical Ultrasound
**IARC** : International Agency for Research on Cancer
**IDH** : İzositrat Dehidrogenaz
**KPS** : Karnovsky Performans Skoru
**KT** : Kemoterapi
**MGMT** : Metilguanin metiltransferaz
**MLH** : MutL Homolog
**MR** : Magnetic rezonans
**NF** : Nörofibromatozis
**PMS** : Postmeiotic segregration
**PTCH** : Patched Homolog
**RT** : Radyoterapi
**RAS** : Reticulo-activating system
**SEGA** : Subepandimal giant cell astrositoma
**SRC** : Stereotaktik radrocerrahi
**SVZ** : Supraventriküler zone
**SSS** : Santral Sinir Sistemi
**TCGA** : The Cancer Genom Atlas
**TSC** : Tüberoskleroz
**US** : Ultrasound
**VEGF** : Vasculo-endothelial growth factor
**VHL** : Von Hippel Lindau
**WHO** : Dünya Sağlık Örgütü

## ŞEKİLLER DİZİNİ

**Şekil 1.** DNA harabiyeti ve epigenetik defektlerin, karsinogenezdeki rolü ...6
**Şekil 2**: Glioblastom subtiplerinde genetik ekspresyon ve değişimler …..... 23
**Şekil 3:** Kombine glioma örneklerinde glioma moleküler gruplarının dağılımı ……...……..25
**Şekil 4:** Kompresyon ve ekspansiyon sırasında kavitasyon oluşumu…….. 34
**Şekil 5:** ATP kiti uygulaması sonrasında hücre sayısı ve florasans yoğunluğu ……44
**Şekil 6:** Flow sitometri ile hücre sayım grafiği ……... 44

## TABLOLAR DİZİNİ

**Tablo 1.** Farklı kanser gelişim teori ve hipotezlerinde ileri sürülen lehte ve aleyhte görüşler …….. 7
**Tablo 2.** Beyin Tümörleriyle ilgili Nörokütanöz Sendromlar……..… 10
**Tablo 3.** Nörofibramatöz Tip 1 tanı kriterleri…….……..…… 11
**Tablo 4.** Nörofibramatöz Tip 2 tanı kriterleri…….……..…… 11
**Tablo 5.** Tüberoskleroz tanı kriterleri…….……..…… 13
**Tablo 6**. WHO 2007 malign gliomların histolojik olarak sınıflandırılması……..... 18
**Tablo 7**. 2016 WHO Erişkin Gliomaların Sınıflaması…….…… 20
**Tablo 8.** Gliomagenezis……..…… 26
**Tablo 9:** Anaplastik glioma tedavi şeması…….. 30
**Tablo 10:** Glioblastom tedavi şeması……..…… 31
**Tablo 11:** Flow sitometri ölçümü sonrası hücre sayıları…… 43
**Tablo 12:** Tekrarlı Anova istatistiksel analizi …… 45
**Tablo 13:** Shapiro-Wilk normallik ve bağımlı t testi ……..…….. 46

## RESİMLER DİZİNİ

**Resim 1.** HITU ve glioblastom hücre hatları içeren deney düzeneği ……... 39
**Resim 2.** Kontrol grubu a1 mikroskop görüntüsü……. 41
**Resim 3.** Kontrol grubu a2 mikroskop görüntüsü …… 41
**Resim 4.** Kontrol grubu a3 mikroskop görüntüsü……. 42
**Resim 5.** e1 grubunun mikroskop altındaki görüntüsü…….…… 42
**Resim 6.** f1 grubunun mikroskop altındaki görüntüsü…..……. 43

# GİRİŞ

Primer santral sinir sistemi (SSS) tümörleri, SSS'i içinde yerleşen, bu yapının kılıf veya sinirlerini de içeren hücrelerden kaynaklanan tümörlerdir. Primer SSS tümörleri oldukça heterojen bir gruptan oluşur ve 2016 WHO sınıflamasında yaklaşık 17 ana başlık altında 143 farklı histolojik subtipi olan tümör bulunmaktadır (1). Bu tümörlerin herbirinin tedavileri ve prognozları oldukça farklıdır. Primer SSS tümörlerinin %30-43.5'ğunu nöroepitelyal tümörler oluşturmaktadır (2, 3). Primer SSS tümörleri benign veya maligndir. Yüksek greydli nöroepitelyal tümörlerin morbidite ve mortalitesi oldukça yüksektir. Yüksek greydli tümörler arasında en sık glioblastomaya rastlanır ve malign tümörlerinin %48.3'ünü oluşturmaktadır (1). Çocukluk çağında en sık rastlanan malign tümör, embriyonel tümörlerdir (4). Metastatik beyin tümörleri de beynin malign glial tümörlerle birlikte en sık görülen sekonder malign tümörlerindendir (7). Prevalansı %8-9.5 arasında, insidansı 8.3-14.3/$10^5$/yıl değişmektedir (7).

The Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS) verilerine göre (2012-2016) primer beyin ve ve diğer SSS'i tümör insidansı Amerikada 23.4/$10^5$/yıl, Avrupada 7.3-11.6/$10^5$/yıl olarak bildirilmiştir (2, 3). Çocuk ve adolesanlarda malign ve malign olmayan beyin ve diğer SSS'i tümör insidnsı 6.06/$10^5$/yıl olarak saptanmıştır (2). 2016'da dünya çapında 330.000 SSS kanser vakası ve 205.000 buna bağlı ölüm tespite edilmiştir ve 1990 ve 2016 yılları arasında yaş standardize edilmiş insidansı global olarak artmış ve %17.3'e dek çıkmıştır (4). Batı Asya, Batı Avrupa ve Günay Asya her iki cinsiyette kanser vakalarının en fazla arttığı bölgelerdir (4).

Primer ya da metastatik beyin tümörü tedavisinde ilk olarak semptomlarının tedavisi gerekmektedir. Bu amaçla steroidler ve antiepileptikler öncelikle başlanmalıdır. Ancak beyin tümörlerinin tedavisinde altın standart cerrahi eksizyondur. Tümörün fonksiyonel alanlarda yerleşmesi ya da derin yerleşimi, cerrahi girişimi herzaman olanaklı kılmamaktadır ya da subtotal rezeksiyon yapılmasını gerektirmektedir.

Primer ya da metastatik malign beyin tümörlerinde cerrahi eksizyon dahil çeşitli tedavi yöntemlerine rağmen yaşam süresi oldukça kısadır. Örneğin glioblastomalı bir hastanın radyoterapi (RT) ve kemoterapiye (KT) rağmen yaşam süresi 2 yıldan az, anaplastik gliomalarda ise bu süre 2-5 yıl arasında değişmektedir (8). Hastanın kalan yaşam süresini kaliteli geçirmesi için progresyonsuz sağ kalım ve yaşam kalitesinin yüksek olması tedavi sürecinin temel hedefini oluşturmaktadır.

Gerek konvansiyonel RT, gerekse stereotaktik radyocerrahi (SRC) yötemleri, günümüzde malign beyin tümörlerinin tedavisinin ayrılmaz bir parçasını oluşturmaktadır. Ancak KT ve RT gibi yardımcı tedavi yöntemlerinin ciddi yan etkileri vardır, masum tedavi yöntemleri değildir. RT'nin radyasyon toksitesi olarak bilinen; akut, subakut ve geç dönemlerde ortaya çıkan ciddi yan etkileri mevcuttur (9). Özellike geç dönemde ortaya çıkan komplikasyonları, radyasyon nekrozu ya da radyasyon myelopatisi olarak adlandırılır (9). Radyasyon nekrozunun insidansı tam olarak bilinmese de, uygulanan doz ve hastanın takip süresine göre %5-50 arasında değişmektedir (9). Lökoensofalopati ya da radyasyon nekrozu gibi ciddi komplikasyonların olması, RT'nin anaplastik glial tümör gibi Gr III lezyonlarda ya da cerrahi morbiditenin yüksek olması nedeniyle opere edilemeyen menenjiomlarda olduğu gibi, tedavi sonrası uzun yaşam beklentisi olan hastalara uygulanması, kalan yaşam süresinde RT komplikasyonlarının görülmesine neden olur.

Özellikle çocukluk yaş grubunda RT, cerrahi ve KT'nin başarısız olduğu durumlarda kullanılır. Birçok otör RT'nin 5 yaşından sonra uygulanmasını ve NF1'li hastalara uygulanmamasını önermektedir (10, 11). NF1 hastalığı olup da RT uygulanan hastalarda, NF1 ve RT uygulanmayanlara göre sekonder malignansi gelişmesinin rölatif riski 3.04 olarak bildirilmiştir (9). Çocukluk çağı tümörlerinde RT'nin belli bir yaşın üzerinde uygulanabilmesi ve uygulanması halinde ciddi sorunların ortaya çıkmasına ve yaşam kalitesinin düşmesine yol açar. Yaş sınırının altında olan çocuk hastalara uygulanamaması da tedavide ciddi bir boşluğun ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

RT'nin ciddi yan etkilerinin olması, tekrarlayan tümörlerde sınırlı doz uygulaması ya da uygulanamaması nedeniyle, RT yerini alabilecek alternatif tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır.

Ses bilimi olarak da bilinen akustiğe ilgi, MÖ 6. YY'da Pisagor'un 'Telli Enstrümanların Matematiği' adlı eseri ile başlamıştır. Ultrasound, frekansı insan kulağının işitme sınırları dışında kalan yüksek frekanslara verilen isimdir. Ultrasoundun ilk teknolojik uygulaması, 1917'de Paul Langevin tarafından denizaltıların ultrasonik yöntemlerle tespiti üzerine geliştirilmiştir. 1880'de Jacques ve Pierre Curie trarafından keşfedilen piezoelektrik etkisi, ultrasonık ses dalgaları oluşturmak ve onu saptamak için geliştirilen transducerların kullanıma girmesiyle daha da gelişmiştir. Tanı amaçlı ultrasonografi yaklaşık 50 yıldır tıpta kullanılmaktadır. Ucuz ve taşınabilir olması, ve gerçek zamanlı görüntü vermesi nedeniyle, tıbbi tanı yöntemleri arasında manyetik rezonans (MR) ve bilgisayarlı tomografiye (BT) göre oldukça ucuz ve kaliteli bir alternatiftir. Tümör ablasyon amaçlı olarak, yoğunlaştırılmış ultrasonografi yöntemi ilk kez 1954 yılında Lindstrom ve Fry (12) tarafından kullanılmış, ancak teknik yetersizlikler gelişmesine engel omuştur. 1980 yılında yoğunlaştırılmış ultrasonik dalgalar prensibine dayalı olarak taş kırma cihazı (ESWL) ilk kez geliştirilmiş ve 1984 yılında FDA'den onam almıştır (12). 1990 sonrasında MR teknolojisinin hızla gelişmesi, hedeflenen dokuda ısı ölçümünü olanaklı kılmış ve yoğun alan odaklı ultrasound (HIFU) teknolojisinin tümör tedavisinde yeniden gündeme gelmesine neden olmuştur. Yüksek akustik yoğunluğun dokudaki etkisi, akustik enerjinin emilimine bağlı olarak oluşan yüksek ısıya bağlı oluşan koagulasyon nekrozu HIFU tedavisinin temel etki mekanizmasını oluşturmaktadır (13).

2006 yılında Murat ve arkadaşları (13), HIFU tedavisini protat kanserli hastalara uygulamışlar ve tümörün küçüldüğünü, hiçbir yan etkiye rastlanmadığını bildirmeleri üzerine Avrupa'da tedavi seçenekleri arasına girmesine yardımcı olmuşlardır. Mottet ve arkadaşları (18), prostat kanseri olan hastaya herhangi bir anestezi veya cerrahi girişim uygulamadan hastanın MR altında kanserli hücrelerin olduğu kısma HIFU uygulandığında, o bölgedeki kontrollü ısı artışıyla tümör hücrelerinin öldüğünü çalışmalarında göstermiş olup, 2014 yılında prostat kanseri için bir uygulama kılavuzu nitetliğinde yayın çıkarmışlardır. Aynı ekip, Amerika FDA onayını alarak bu yöntemin non-invaziv tedavi yöntemleri arasına girmesini sağlamıştır. "Sonablate 200" adlı cihaz Avrupa'da benin prostat hiperplazisi için CE onayını almıştır (16). Ülkemizde de bazı merkezlerde şu anda prostat kanseri için tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır.

Prostat kanserindeki başarılı çalışmalar sonucu kemik, karaciğer ve akciğer kanseri için, kanama kontrolü için, abdominal ve jinekolojik patolojiler için de çalışmalar başlatılmıştır (19, 20, 21, 22, 23). 2014 yılında Amerika'da Pawel Piotr Dobrakowski ve arkadaşları (24), Parkinson hastalığında HIFU ile MR eşliğinde lezyon oluşturmuşlardır. Bugün Parkinson hastalığı için FDA tarafından onaylanmış bir tedavi yöntemidir. Çeşitli hareket bozuklukları ve pskyatrik hastalıklarda kullanımı ile ilgili çeşitli çalışmalar da yapılmış ve devam etmektedir (25, 26).

Coluccia ve arkadaşları (27), akciğer kanseri ve beyin metastazı olan hastada HIFU kullanarak radyolojik olarak tümörün küçüldüğünü göstermişlerdir. Daha sonraki çalışmalarla metastatik beyin tümör ablasyonunda başarılı sonuçları, HIFU'nun beyin tümörlerinde kullanılmasını araştıran çalışmalarda artışa yol açmıştır (28). 2014 yılında Zürih'te yapılan çalışmada üç yüksek greydli beyin tümörüne uygulanmış ve HIFU'nun güvenle uygulanabileceği ve hasta için yararlı olduğu bildirilmiştir (24). Yapılan birçok çalışmada HIFU'nun metastatik ya da malign beyin tümörlerinde kullanımıyla iyi sonuçların elde edilmesine bağlı olarak, 18.07.2019 tarihinde FDA onayına başvurulmuştur.

Yaptığımız çalışmada HIFU'nun çalışma prensibiyle aynı olan Yüksek Yoğunluklu Tedavi Edici Ultrason'un (HITU) laboratuvar ortamındaki glioblastom hücrelerinin canlılığı üzerine etkisini mikroskobik ve moleküler düzeyde değerlendirmeyi planladık.

## GENEL BİLGİLER

### KANSER OLUŞUM MEKANİZMALARI

1858'de Rudolph Wirchow, kanserin vücudun kendi hücrelerinden oluştuğunu ileri sürmesinden beri, kanserin gelişimiyle ilgili çok çeşitli teoriler ileri sürülmüştür. Kanser, hücrenin büyüme ve farklılaşmasını sağlayan genomik kontrolün kaybolmasına bağlı, hücrenin anormal çoğalması ve yayılımı sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır (29). Hücrenin büyümesi, bölünmesi ve ölümü artık kontrolsüz olmaktadır (30, 31).

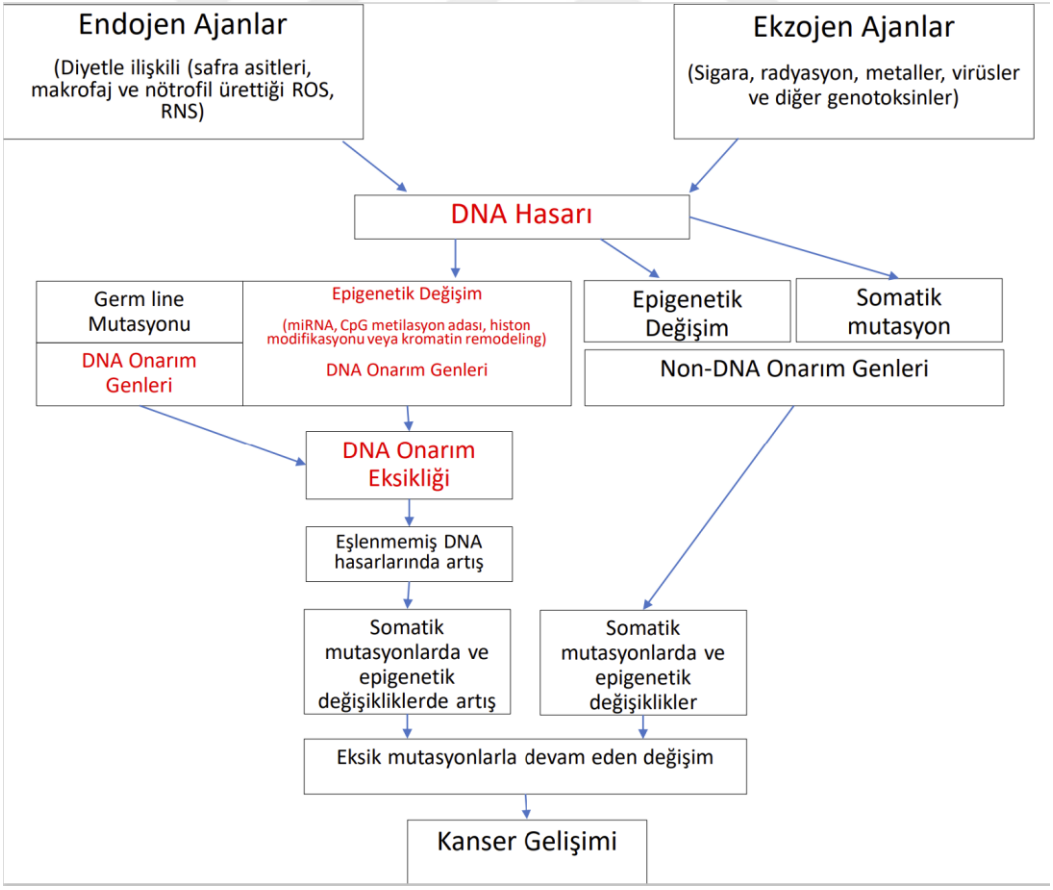
Bir hücrenin kanser hücresi haline gelmesi çok basamaklı bir süreçtir ve malign progresyon olarak adlandırılır (32, 33). Genetik değişimler farklı basamaklarda ve farklı mekanizmalarla ortaya çıkmaktadır. Örneğin tüm kromozom kaybı ya da kazancı mitoz evresinde ortaya çıkarken, daha sık rastlanan mutasyonlar ise genomik DNA'nın nukleotid sekansındaki değişikliklere bağlıdır.

Genetik mutasyonlar gibi mekanistik yollarla kanser gelişimini açıklamaya çalışan teorilerde, onkogenlerin oluşumu ve tumör supresör genlerin baskılanması kanser oluşumunda ana etken olarak ileri sürülür. Onkogenler hücre büyüme ve çoğalmasına neden olurken, tümör supresör genler kanser hücre bölünmesini baskılayan genlerdir (32, 33). Onkogenik etki altında olan bir hücre p53 gibi apoptotik tümör süpresör genlere karşı duyarsızdır (32, 33). Kanser hücrelerinde teleomeraz aktivasyon artışı ile sınırsız çoğalma potansiyeline mevcuttur (32, 33). "E-cadherin inaktivasyonu" doku invazyonu ve metastaza yol açarken VEGF ekspresyonu ile yeni damarlar oluşturur (32, 33). Tüm bunlar kanserin gelişebilmesi için birçok gende mutasyonun olması gerektiğini göstermektedir (34). Buna kanserin klonal evolüsyonu denir ve tümör içerisinde görülen heterojeniteyi açıklar.

Son yıllarda kanser gelişimine yol açan progresif genetik mutasyonların yanında epigenetik değişikliklerin de rol aldığı saptanmıştır. Epigenetik, DNA diziliminde değişiklik yapmayan, fakat aktarılabilen gen değişikliklerini ve gen ekspresyon mekanizmalarını inceleyen bir bilimdir. DNA metilasyonu, histon modifikasyon ve nukleozom pozisyonundaki değişiklikler, epigenetik mekanizmaların ana unsurlarını oluşturmaktadır (35). Bu mekanizmalar DNA ve miRNA ekspresyonu, DNA-protein etkileşimleri, selüler diferansiasyon,

embriyogenezis ve X kromozom inaktivasyonu gibi önemli hücresel fonksiyonlarda yer almaktadır (35). Yanlış zamanda yanlış bir yerde oluşan bir epigenetik değişiklik birçok hastalığın çıkmasına neden olur. DNA metilasyonuyla kanser ilişkisini gösteren çok açık neden sonuç ilişkisi mevcuttur, örneğin DNA'nın hipermetilasyonu tümorogenezisi başlatan epigenetik değişikliklerdendir (35).

DNA hücre içi serbest oksijen radikalleri ve dış toksik ajanlar tarafından sürekli saldırı altındadır. Bu etkilerin ortadan kaldırılması ve DNA diziliminin yeniden sağlanmasında DNA onarım genlerinin rolü oldukça fazladır (36). Yaklaşık 130 civarında DNA onarım geni bulunmakta ve bu sayı her geçen gün artmaktadır (36). DNA onarım genlerindeki epigenetik değişimler, DNA onarım genlerinin yeterli işlev görememesi, genetik mutasyona ve kanser gelişimine neden olmaktadır. Bu değişiklikler kanser progresyonunun erken döneminde görülür ve kanserin karakteristik özelliği olan genetik instabiliteden sorumludur (37). Şekil 1'de DNA harabiyeti ve epigenetik değişimlerin karsinogenezdeki rolü görülmektedir.




**Şekil 1:** DNA harabiyeti ve epigenetik defektlerin, karsinogenezdeki rolü (37).

Yukarıda bahsedilen genetik temelli mekanistik hipotezler günümüzde kanser araştırmalarında itici güç olsa da genel olarak kanserin nasıl ortaya çıktığıyla ilgili çok çeşitli teoriler ortaya atılmıştır, tablo 1'de bu teoriler toplu olarak görülmektedir. Genel olarak günümüzde tek bir nedenin kanser oluşumuna neden olmadığı, birbirlerini tetikleyen değişikliklerin sonunda kanser gelişimine yol açtığı şeklindedir.

| | | |
|---|---|---|
| -Mutasyon teorisi | -birçok kanserde mutasyon saptanması -herediter kanserlerin varlığı -deney hayvanlarda indüklenmiş mutasyonların kanser oluşturması -mutasyonun aneploidi yapıp kanser oluşturması | -normal dokularda da mutasyon gürülür fakat kanser gelişmez -kanserin, kanserli dokuyla ilgili mutasyon olmaksızın gelişimi -fizyolojik mutasyon hızı kanser gelişimini açıklamaz -mitokondrial ve nukleus trsansfer deneylerini açıklayamaz |
| -Kromozomal imbalans -Spesifikasyon teorisi -Anoploidi ve kromozomal insabilite | -birçok tümörde anoploidi gözlenir -prekanser dokularda anoploidi + (kronik infeksiyon, kronik inflamasyon) | -tümör içindeki her hücre inflamasyon göstermez -normal beyinde yapısal anoploidi mevcuttur -mitokondri ve nukleus transfer deneylerini açıklayamaz |
| -Mitokondrial disfonksiyon, enerji kaybı (Warburg etkisi) | -tüm tümörlerde görülür -mitokondri disfonksiyonu kanser oluşumuna neden olur -mitokondriyal toksik ajanlar kansere yol açar | -herediter kanser sendromlarında mitokondrial disfonksiyon ilk basamak değildir -mitokondriopatilerde kanser insidansı artmaz -mitokondriye tpksik ajanlar kansere yol açmaz |
| -Çevre ve madde | -hormonlar ya da pH değişimleri gibi mikroçevre değişimleri kanser oluşumuna yol açar | -mikroçevre değişimleri herediter kanser sendromlarında ilk basamak değildir, mutasyonlar ilk basamağı oluşturur |

**Tablo 1:** Farklı kanser gelişim teori ve hipotezlerinde ileri sürülen lehte ve aleyhte görüşler (38)

Genel olarak kanserli hücrelerin altı genel özelliği bulunmaktadır (32, 33);

-hücre büyüme ve gelişmesi için uygun sinyallerin olmaması

-bunlara karşı sinyallerin olmasına rağmen büyüme ve bölünmenin devam etmesi

-apoptozun ortadan kalkması

-sınırsız sayıda hücre çoğalması

-anjiogenezis

-doku invazyonu ve metastaz gelişimi.

1980'lere dek kanser odaklı yaklaşımlar araştırmaların hedefi iken, bu yıldan sonra tümör mikroçevresinin (TMÇ) kanser progresyonunu etkilemesi nedeniyle bu alanda yapılan araştırmalar hız kazanmıştır. TMÇ'i hücre tarafından üretilen proteinlerin yapısı ve işlev görmesi için önemlidir ve bu ortamdaki modifikasyonlar proliferasyon aktivasyon ve inhibisyonunda önemli etkileri vardır (38). TMÇ'i kanser hücrlerinin ekstraselüler matriks (ESM), konakçı ana hücreleri ve burada toplanmış hücreler ve solubl faktörlerle etkileşim içinde bulunduğu bölgedir (39). Bu alandaki iki yönlü etkileşim sonucu ESM, konakçı hücreler ve tümör hücrelerinin fenotipleri değişir. Böylece tümörün yaşama şansı pozitif ya da negatif yönde etkilenir (39). Tümörün erken evrelerinde TMÇ'i anti-kanser özellikler gösterirken geç evrelerde tümörü destekleyici işlevler kazanır (39). TMÇ'sini etkileyebilecek tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi, yaygın metastazı olan hastalarda tümör gelişimini kısmen önleyebilir ve surveyi uzatır. Literatürde TMÇ'ine yönelik birçok yötem tanımlanmıştır (Maman). Bunlardan biri de tümör çevresinde oluşturulan hiperterminin pH'yı daha da düşürerek hem hipertermi hem de diğer tedavi yöntemlerine tümörün daha duyarlı hale gelmesine yol açar (39). Hipertermide kullanılacak noninvazif araçlardan biri de HIFU'dur.

## BEYİN TÜMÖRLERİ

Beyin tümörleri, orijinlerine göre primer ve sekonder beyin tümörleri olarak iki başlık altında incelenebilir. Beyin tümörlerinin yaklaşık olarak %75'i supratentoryal, %25'i infratentoryal yerleşimlidir (1, 40, 41, 42).

Beyin tümörlerinin oluşumunda daha önce bahsedilen mekanizmaların hepsi geçerlidir. Tümör oluşumunda uzun yıllardır yapılan çalışmalar sonucunda DNA hasarı, yanlış kodlanan proteinler, hücre içi sinyallerin amplifikasyonu, apopitoz düzenlenmesi gibi mekanizmalardaki sorunlar tespit edilmiştir. Bu bozukluklar hangi hücre tipinde gerçekleşmişse çoğalarak beyinde iyi veya kötü huylu kitleye sebep olurlar.

Beyin tümörlerinin gelişiminde multipl risk faktörleri bulunmaktadır;

A-biolojik ve genetik risk faktörleri

B-çevresel ve davranışsal risk faktörleri

C- Irk ve coğrafyadır.

### A-Biolojik ve Genetik Risk Faktörleri

Genetik risk faktörleri arasında nörokutanöz sendromlar ve ailevi kanser sendromları beyin tümörlerine yatkınlık kazandırmaktadır (43). Bu sendromlarda tümör supresör genlerin mutasyonu, hastalığın ortaya çıkmasına neden olur.

#### a-)Nörokutanöz kanser sendromları

Nörokutanöz hastalıklarla birlikte görülen kanserler, çocukluk çağı kanserlerinin %10'unu oluşturur (44). Beyin ve cilt, ektodermal orijinli olduğu için genetik kökenli hastalıklar heriki dokuyu da ilgilendirir. Nörokutanöz sendromların çoğu otozomal dominant geçişlidir ve genetik bozukluklar, tümör süpresör genleri ilgilendirir ve germline mutasyon tümör gelişimine eğilimi arttırır (44). Tümörler vücudun birçok yerinde ve yaşam boyu gelişme şansına sahiptir. Tablo 2'de nörokutanöz sendromlar ve birlikte görülen tümör tipleri belirtilmiştir.

| Sendrom | Kromozom | Gen | Protein | Kalıtım | SSS Tümörleri |
|---|---|---|---|---|---|
| Nörofibramatöz tip 1 | 17qI | NF 1 | Nörofibromin | OD | Optik yol ve diğer beyin tm. |
| Nörofibramatöz tip 2 | 22q | NF 2 | Merlin/Schwannomin | OD | Vestibüler schwannom, menenjiyom, ependimom |
| Schwannomatozis | 22q | SMARCB1 | SWI/SNF Protein Kompleksi | OD | NonVestibüler schwannom, menenjiyom, ATRT |
| Tüberoskleroz | 9q34, 16pI3.3 | TSC1, TSC2 | Hamartin, Tuberin | OD | Astrositom, kortikal tüber, epandimom, ganglionörom |
| Von Hippel Lindau | 3p25 | VHL | pVHL | OD | Hemanjiyoblastom |
| Nevoid Bazal Hücre Karsinomu | 9q22.3 | PTCH | Sonic Hedgehog | OD | Medulloblastom |

**Tablo 2:** Beyin tümörleriyle ilgili nörokütanöz sendromlar

**NF tip 1**: Otozomal dominant geçişli ve 3500 canlı doğumda bir görülür (11). Tablo 3'de NF1'in tanısal kriterleri görülmektedir (11). NF1-hastalarında benign ve malign tümör gelişme riski mevcuttur. NF1'li çocukların %20'sinde SSS'i tümörü görülür; özellikle anterior optik yolları tutan benign optik yol tümörleri. Bu tümörler sporadik olanlardan daha az agresif seyreder ve bu tümöre sahip olan hastaların yaklaşık yarısında semptom veya bulgular gelişir.

NF1'li çocuklarda görülen beyin sapı tümörleri de iyi seyirlidirler. Her iki tip tümörde daima pilositik astrositomdur (11). NF1 hastalarında yüksek greydli malign tümörler de gelişebilir. Rosenfeld ve arkadaşlarının (11), serisinde 4 hastada yüksek greydli tümör gelişmiş ve bunlardan biri daha önce RT tedavisi almıştır (11). Bu hastalara RT verilmesi sekonder malignansilere yol açar ve bu oran oldukça yüksektir (11). NF'de tümör supresör gen olan nörofibrominin olmaması RAS yolağının aktivasyonuna yol açar ve tümör gelişimi ile sonuçlanır. NF1'li hastalarda RT'nin oldukça dikkatli kullanılması gerekmektedir.

| Nörofibramatöz Tip 1: Tanı Kriterleri (En az 2 kriter olmalı) |
| --- |
| -Prepubertal çapı >5 mm, postpubertal >15 mm 6 ve üstünde cafe au lait lekeleri<br><br>-2 veya üstünde nörofibroma tipi veya 1 plexiform nörofibroma<br><br>-Aksiller veya inguinal çillenme<br><br>-Optik sinir gliomu<br><br>-2 veya daha çok Lisch nodülü (iris hamartomu)<br><br>-1 veya fazla kemik lezyonu (sfenoid kanat displazisi veya uzun kemiklerde korteksin incelmesi<br><br>-Üstteki kriterli sağlayan 1. derece akrabası ve nörofibramatöz tip 1 olan |

**Tablo 3**: Nörofibramatöz Tip 1 tanı kriterleri

**NF tip II:** 30.000 canlı doğumda bir görülür (44). Tanı kriterleri tablo 4'de görülmektedir.

| **Nörofibramatöz Tip2: Tanı Kriterleri** |
|---|
| Kesin tanı kriterleri;<br><br>-Bilateral Vestibüler Schwannom veya<br><br>-1.derece nörofibramatöz tip 2 akraba ile<br><br>a-)30 yaşından küçük tek taraflı vestibüler schwannom veya<br>b-)Menenjiyom, gliom, posterior subkapsüler lens opasitesinden 2 tanesine sahip olma |
| Şüpheli kriterler<br><br>-30 yaşından küçük tek taraflı vestibüler schwannom ve menenjiyom, gliom, posterior subkapsüler lens opasitesinden 1 tanesine sahip olma<br><br>-Multiple menenjiyomlar ve scwhannom, gliom veya posterior lens opasitesi |

**Tablo 4**: Nörofibramatöz Tip 2 tanı kriterleri

SSS'inde en sık rastalanan lezyonlar;

-bilateral vestibuler schwannoma, %90-95 30 yaş civarında görülür

-diğer kranial sinirlerin schwannomları, %24-51

-intrakranial menenjiomlar, %44-77

-spinal intra ve ekstrameduller tümörlerdir,%63-90 (44).

NF2 geni Kr 22'de bulunur ve schwannomin ya da merlin denen bir tümör supresör protein ekspresyonuna neden olur. Yokluğunda mTOR yolunun amplifikasyonuna bağlı olarak schwannom ya da memenjiom gelişir.

Schwannomatosis, omurilikte multipl schwannomalarla giden bir patolojidir, NF3 olarak da bilinir (42). SMARCB1 geni schwannomatosisde majör predispozan gen olarak tanımlanmıştır ve NF2 geninin yakınlarında Kr22'de yerleşmiştir (44). SMARCB1 germline mutasyonu familyal schwannomatozislerin %40-50'sinde,

sporadik olanların %10'unda görülür (42). Bu genin (INI1 geni olarak da bilinir) hücre siklusu, büyüme ve diferansiasyonda rolü vardır. Bu gen mutasyonunun olmadığı olgularda LZTR1 multipl otozomal dominant schwannomun geçişinde rol oynamaktadır (44).

**Tuberous Sclerosis:** 1/6000 canlı doğumda bir görülür. Tanısal kriterleri tablo 5'de görülmektedir. Bu hastalarda kortikal tuber/hemartomlar, subepandimal nodül ve subepandimal giant cell astrositoma (SEGA) gelişme riski vardır (44). Kortikal tuberler iyi huylu hemartomlardır ve patolojik nöronal migrasyon ve hastalıklı diferansiasyona bağlı olarak gelişir. SEGA tuberosklerozlu hastalarda sık rastlanır ve genellikle ilk 2 dekadda görülür. 10mm'den büyük olması, yerleşim yeri, büyümesi ve hidrosefali yapması, SEGA'un subepandimal nodülden ayırt edilmesini sağlar. TSC1 veya TSC2 geninde mutasyon vardır ve mutasyonların %80'i de nova mutasyondur.

MR ile 1 veya 3 yıl aralıklarla izlenmelidir.

| **Tüberoskleroz Tanı Kriterleri** |
|---|
| Tanı için 2 majör ve 2 minör kriter gerekir. Şüpheli için 1 majör, 1 minör veya 1 majör 2 minör |
| Majör kriterler<br>1. Cilt belirtileri ( Fasial anjiyofibrom, ungual fibrom, >3 hypomelanotic macules, shagreen lekeleri<br>2. Beyin ve göz lezyonları (kortikal tüber, subependimal nodüller, subependimal dev hücreli astrositoma, multiple retinal nodüler hamartomlar)<br>3. Diğer organlarda tümörler (kardiak, rabdomiyom, lenfanjiyoleiyomyomatozis, renal anjiyomyolipom) |
| Minör Kriterler<br>1. Dental enamel çukurlar<br>2. Rektal polipler<br>3. Kemik kistleri<br>4. Serebral beyaz madde göç anomalileri<br>5. Gingival fibroma<br>6. Nonrenal hamartomlar<br>7. Retinal akromik lekeler<br>8. Confetti cilt lezyonları<br>9. Multiple renal kistler |

**Tablo 5**. Tüberoskleroz tanı kriterleri

**Von Hippel Lindau Hastalığı:** VHL genindeki germ line mutasyona bağlıdır ve 1/35.000 canlı doğumda bir görülür. Bu hastalarda beyinde ve spinal kordda hemanjioblastom, clear cell renal Ca ve feokromasitoma sık görülür (42). Hemanjioblastomalar rölatif nadir olsa de yavaş büyürler ve serebellumda daha sık yerleşirler. Serebellar hemanjioblastomlu hastaların %30'unda VHL hastalığı vardır ve VHL hastalığı olanların %60'ı serebellar hemanjioblastom şikayeti ile başvururlar. Semptomatik vakalarda hemanjioblastomun cerrahi olarak çıkartılması gerekir ve rekkürens oranı %17'lere dek çıkar.

**Familyal Kanser Sendromları**

**Li-Fraumeni Sendromu:** Ailelerin %70'inde p53 geninde germline missense mutasyon mevcuttur (43). Inaktive edici mutasyon, apoptoz ve DNA onarımını kontrol eden p53 inaktivasyonuna neden olur (43). Li-Fraumeni sendromlu hastaların %10'unda 45 yaşından önce glial tümör gelşme riski vardır. Hastaların %5'inde de nöroektodermal tümör, koroid pleksus karsinomu ve medulloblastom geliştiği bilinmektedir. Li-Fraumeni sendromlu hastaların %57'sinde primer kanser gelişiminden sonra sekonder-kanser gelişme riski mevcuttur (43).

**Gorlin Sendromu:** Nevoid basal cell karsinoma sendromu olarak da bilinir. Otozomal dominant ve 1/50.000 doğumda bir görülür. %30'u de novo mutasyonlara bağlıdır. Yüzde 85'i dokuzuncu kromozomdaki (9q) patched homolog 1 gene (PTCH1) anomalisine bağlıdır (46). Bu genin ürünü transmembran proteindir ve SHH'lara bağlanır. SHH sinyalizasyonu, embriyolojik diferansiasyonda rol alır ve bu yolağın aktivasyonu, tümör gelişimine yol açar. Gelişimsel anomaliler, multipl bazal hücreli karsinom ve diğer tümörlerle birliktedir. Bu hastalarda medulloblastom ve menejiom daha sık görülür. Yaşam boyu medulloblastom gelişme riski %3-5 civarındadır (46). Gorlin sendromuyla birlikte olan medulloblastomlar daha genç yaşta görülür ve desmoplastik tiptedir. RT'ye sekonder bazal hücreli karsinom gelişme riski olduğundan bu hastalara RT verilmesi sakıncalı olabilir.

**Turcot Sendromu:** Kolorektal karsinom ve nöroepitelyal tümörlerle gider (astrositom, medulloblastom, epandimom, pineoblastom, gangliogliom). Turco tip I glioblastoma ve familyal adenomatöz polipozisle birlikte değil fakat herediter nonpolipozis kolorektal karsinom ile gider. DNA mismatch repair gene postmeiotic

segregation 2 (PMS2), MutL homolog1 (MLH1), MutS homolog2 (MLH2) genlerinde germline mutasyon mevcuttur (46). Turco 1 sendromu, medulloblastom ve familyal adenomatöz polipozisi olan hastalarda görülür. Adenomotoz polipozis kolon geninde mutasyon mevcuttur. Turco sendromunda medulloblastom, glioblastom ve anaplastik astrositom, beyin tümörlerinin %95'ini oluşturur. Medulloblastom 10, glioblastom 30 yaştan önce görülür.

**Cowden Sendromu ve Lhermitte-Duclos Hastalığı:** Cowden sendromu, 10q kormozomdaki fosfataz ve tensin (PTEN) geninin germline mutasyonuna bağlı otozomal dominant bir hastalıktur (44). Hücre siklus arresti ve apoptozla ilgilidir. Insidansı 1/250.000 canlı doğumdur. Beyin tümörlerinden menejiomlar daha sık görülür.

Lhermitte-Duclos hastalığı ise displastik serebellar gangliositom olarak bilinir, tam sıklığı bilinmese de Cowden sendromuyla birlikte görülür (46). Büyük anormal hücrelerin çoğalmasına bağlı olarak serebellar folyaların genişlemesi ile karakterizedir. Herediter kanser sendromlarının önemi aşağıdaki nedenlere bağlıdır (47):

-Aynı ailede 2 ve üzerinde bireyde aynı tip kanserlerin görülmesi,

-Birkaç nesil boyunca aynı hastalığa rastlanır.

-Bu tip sendromlara bağlı kanserler daha erken yaşlarda görülür.

-Aynı kişide farklı tip kanserler gelişebilir.

-Bilateral kansere rastlanabilir.

-Meme kanseriyle ilişkili olabilir.

-Vücudun belirli bölgelerinde aşırı gelişme ve/veya vücudunun bir yarısının gelişmesi gibi fenotipik bulgular olabilir.

-Feokromasitoma ve renal hücreleri karsinom ve benzer santral sinir sistemi dışı tümörler ile birlikte olabilir.

Bazı ailelerde kalıtsal bir yatkınlık olmasa da ailede beyin tümör vakalarının fazla olduğu görülmüştür. Bunun nedeni aile bireylerinin aynı çevresel etkilere maruz kalması ve ortak genetik yapıya sahip olmalarındandır (44).

**b-)Yaşlılık:** İleri yaş, kanser gelişimine yol açan en önemli biolojik risk faktörlerindendir ve tanı alan hastaların ortalama 66 yaşında olduğunu gözlenir (48).

Yeni kanser vakalarının %25'i 65-74 yaş arasında tanı almaktadır (49). Bunun nedeni oluşan mutasyonların yaş ilerledikçe birikimidir. Ortalama tanı koyulma yaşı, meme kanseri için 61, prostat için 66, kolorektal kanser için 68, akciğer kanseri içinse 70 yaş civarıdır (50). Ayrıca puberte, immün faktörlerin de kanser gelişiminde etkisinin önemli olduğu bilinmektedir (44).

**B-) Çevresel Risk Faktörleri**

International Agency for Research on Cancer (IARC), kansere neden olan birçok etken tanımlamıştır bunlar arasında; güneş ışığı sigara, bazı ilaçlar, hormonlar, alkol, parazitler, funguslar, bakteriler, tuzlu balık, kereste tozu, ve bazı bitkiler sayılabilir (51). Ayrıca elektromanyetik alana maruz kalma, bazı meslekler (itfaiyeci, apartman görevlisi, hava araçları teknisyenleri gibi) ve hava kirliliği önemli rol oynamaktadır (52). X ışınları, gamma ışınları, radon ve diğer yüksek enerjili iyonize radyasyon, hücrelerin DNA'sında mutasyona sebep olarak, apopitoz gibi başlıca hücre ölüm mekanizmalarını engelleyerek kansere sebep olmaktadır (53).

**Davranışsal Risk Faktörleri**

Davranışsal risk faktörleri arasında da sigara ve alkol kullanımı, dolayısıyla N-nitroz bileşiklerine maruz kalma önemlidir (53). Obesite, sedanter yaşam, kırmızı et tüketimi, beta karoten, işlenmiş gıdalar, şişmanlık ve emzirmeme gibi faktörler de kanser etiolojisinde yer almaktadır (51, 54, 55, 56, 57, 58). Davranışsal önemli risk faktörleri arasında bulunan nedenler;

**-Tütün ve Kanser:** Tütün ve ürünlerini düzenli kullanan veya kullanılan ortamda bulunan insanların kansere yakalanma riski oldukça fazladır (59). Tütündeki kanserojenler DNA'ya zarar vermektedir (60). Akciğer kanseri başta olmak üzere, mesane, kan (AML), serviks, kolon ve rektum, özafagus, böbrek ve renal pelvis, karaciğer, bronş ve trakea, ağız, pankreas, mide ve larinks kanserlerine sebep olmaktadır (61).

**-Alkol**: Alkol kullanımı ağız, özefagus, larinks, karaciğer ve meme kanserini riskini artırmaktadır (62). Alkol vücudumuzda asetaldehide yıkılarak DNA'ya zarar verir ve DNA onarımına engel olur (63). Daha sonrasında ise DNA kontrolsüz bir şekilde davranmaya başlar. Östrojen seviyesini arttırarak meme kanserine sebep olur

(64). A, B, C, D, E vitaminlerinin emilimini vücutta metabolik yollarda kullanılmalarına engel olur (65).

**-Diyet:** Beslenmenin kanser riskinin arttırdığına ve azalttığına dair birçok çalışma yapılmıştır ve yapılmaya devam etmektedir. Tütün ürünleri ve bazı gıdalarda bulunan akrilamidin, alkolün, antioksidanların, yapay tatlandırıcıların, kalsiyumun, kavrulmuş etin, turpgillerin, flor içeren gıdaların, çayın, vitamin D ve daha bir çok ürünün vücutta belli organlarda birikerek hücresel düzeyde DNA'nın ve proteinlerin yapısını bozarak, hücrenin normal yapısını bozduğu ve kontrolsüz şekilde büyümesine sebep olduğu ve kanser hücresine dönüştüğü gösterilmiştir (66, 67, 68, 69, 70, 71, 72).

**-Hormonlar:** Kadın seks hormonu olan östrojen, karsionojen olarak da görev yapmaktadır. Östrojen kadınlarda meme kanseri ve endometiral kanser riskini artırmaktadır (73). Östrojen, karsinogenez ve anjiyogenezi artırarak kanser oluşumda etkili olmaktadır (74).

**C-)Irk ve coğrafya:** Irk, yaşanılan coğrafik çevreye göre de SSS'i kanser sıklığında farklılık görülür (75). Beyaz ırkta Asya ve Afrikada yaşayanlara göre daha sıkrastlanmaktadır (75). Son yıllarda yapılan çalışmlarda Batı Asya, Batı Avrupa ve Güney Asyada insidansının arttığı bildirilmektedir (75). Farklı toplumların farklı geniş skalalı genetik yatkınlıkları, tümörlerin toplumlar arasında farklı sıklıkta görülmesine neden olur.

### 2.2.3. Epidemiyoloji

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre ölümlerin en sık ikinci sebebi kanser olarak belirlenmiştir ve 2018 yılında dünya genelinde 9.6 milyon ölüme sebep olmuştur. Kanser hastalarının yaklaşık altıda biri ölümle sonuçlanmıştır (76).

Gelişmiş ülkelerde en sık görülen kanser türleri arasında akciğer, meme, prostat ve kolorektal tümörler yer alırken, gelişmekte olan ülkelerde kanser türleri arasında karaciğer, serviks ve özafagus kanserleri yer alır (77).

The Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS) verilerine göre 2012-2016 yılları arasında yapılan çalışmada, primer beyin ve ve diğer SSS'i tümör insidansı Amerikada 23.4/105/yıl, Avrupada 7.3-11.6/105/yıl olarak

bildirilmiştir (2, 77). Çocuk ve adolesanlarda malign ve malign olmayan beyin ve diğer SSS'i tümör insidnsı 6.06/105/yıl olarak saptanmıştır (2). Malign primer beyin ve diğer santral sinir sistemi (SSS) tümör insidansı 7.08/105/yıl olarak bilidirilmiştir (2). Fransa'da ulusal düzeyde yapılan bir çalışmada malign SSS'i tümörlerinin yıllık insidans 6.16/105 olarak saptanmıştır (5). Tüm beyin ve diğer SSS'i tümörlerinin %30.2'si malign, %69.8'i malign değildir (2). CBTRUS verilerine göre en sık rastlanan beyin ve diğer SSS'i tümörleri arasında glioblastoma bulunmaktadır olarak saptanmıştır, tüm tümörlerin %14.6'sını ve malign tümörlerin %48,3'ünü oluşturmaktadir (2). Diğer malign tümörler arasında diğer malign gliomlar (%9.8), diğer malignansiler (%5.4) ve malign menenjiomlar (%0.4) bulunmaktadır. Primer SSS tümörleri, tüm beyin tümörlerinin yaklaşık %85-90'ını oluştururken, metastatik tümörlerin insidansı %8-10 arasındadır (78). Çocukluk çağında SSS tümör insidansı $3.36/10^5$/yıl olarak bildirilmiştir ve malign embriyonal tümörler en sık rastalan grubu oluşturur (6).

## GLİAL TÜMÖRLERİNİN SINIFLAMA VE HİSTOPATOLOJİSİ

2007 WHO rehberinde gliomlar sınıflandırılmış ve morfolojik kriterlerine göre Gr II-IV olarak sınıflandırılmıştır (tablo 6) (79).

| **SSS'i Tümörlerinin Histolojik Sınıflaması** | | | |
|---|---|---|---|
| **Grade I** | **Grade II** | **Gr III** | **Gr IV** |
| -düşük proliferatif potansiyel<br>-cerrahi rezeksiyon sonrası olasılıkla kür | -atipi ve hiperkromazi mevcut<br>-infiltratif fakat proliferatif potansiyeli var<br>-rekkürens ya da yüksek greydlere değişim gözlenir | -atipi<br>-anaplazi<br>-mitoz | -atipi<br>-anaplazi<br>-mitoz<br>-vasküler proliferasyon ve/veya nekroz |

**Tablo 6.** WHO 2007 malign gliomların histolojik olarak sınıflandırılması

2007'de yayınlanan WHO sınıflamasında patologlar arasında değerlendirmede büyük farklılıklar gözlenmiştir (80). Bu nedenle nöropatologlar klinik olarak ilgili subgrupları daha iyi karakterize etmek için yeni belirteçler aramaya başladılar (81). 2008'de yayınlanan The Cancer Genom Atlas (TCGA), glioblastomaların çoğunda üç ana yolakta genetik değişim saptamıştır;

-**reseptör tirozin kinaz (TRK)-RAS-fosfoinozitid 3 Kinaz (PI3K)** (%88),

-**P53** (%87),

-**retinoblastom protein** (%78) (The Cancer Genome Atlas).

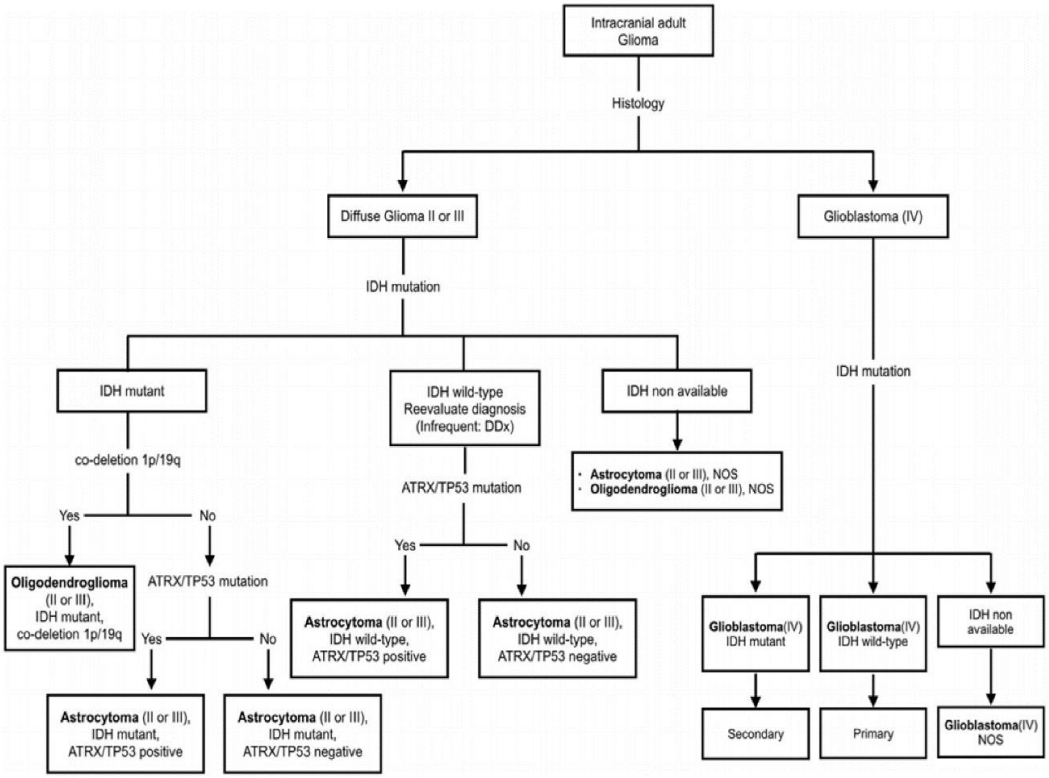
Bunlardan TRK yolağı hücre çoğalmasını tetiklerken, son ikisi tümör supresör genlerdeki mutasyonlarla ilgilidir ve tümör fenotipi hakkında bilgi vermez.

2015 yılında iki grup gliomaların subtiplerinin daha açık sınıflanabilmesi ve gözlemciler arası yorumları ortadan kaldırmak için moleküler ve kromozomal tanımlamalar yaptılar (Cancer Genome Atlas, 82).

Birinci grup **TERT promoter mutasyonu** (telomerase reverse transkriptazı), **izositrat dehidrogenez1/2 (IDH) mutasyonu** ve **1p, 19q kodelesyonunu** temel alarak hastaları survey, tanı yaşı, germline riskli allel, diğer kromozom mutasyon ve kopya sayı değişikliklerine göre beş gruba ayırdı (82). Sadece TERT promoter mutasyonu olan Gr II-III astrositomların glioblastoma gibi davranmaları dikkat çekiciydi (82).

The Cancer Genom grubunun çalışması, IDH mutasyonu, TP 53 mutasyonu ve ve 1p/19q delesyonu temel alarak üç farklı subgrup tanımladı.

Bu moleküler belirteçler ışığında 2016 yılında beyin tümörleri, WHO tarafından yeniden sınıflandırılmış ve tümörlerde histolojik özelliklerin yanında genotipik ve fenotipik özellikleri de sınıflamada göz önüne alınmıştır (1). 2016 WHO erişkin gliomaların sınıflaması tablo 7'de görülmektedir. Bu sınıflamanın iki yeniliği oligoastrositom diye ayrı bir grubun olmaması ve moleküler ve histolojik bulguların yetersizliği halinde moleküler belirteçlerin tanıda belirleyici olmasıdır.




**Tablo 7**: 2016 WHO Erişkin Gliomaların Sınıflaması

Buna göre beş farklı diffüz glioma sınıflaması ile birlikte gliomalar 7 gruba ayrıldı;

I-) Glioblastoma IDH wild: ileri yaşta ve en kötü prognoza sahip.

II-) Glioblastoma IDH mutant: daha genç yaş ve kısmen iyi prognoza sahip.

III-) Diffüz astrositom IDH wild: 52 yaş civarında, prognoz GBM'a benzer.

IV-) Diffüz astrositom IDH mutant: 36 yaş civarında , ortalama survey 9.3 yıl.

V-) Oligodendrogliom vaya anaplastik oligodendrogliom IDH mutant ve 1p/19q

deleted: oligodendrogliom ortalama 44 yaş civarında ve ortalama yaşam 17.5 yıl.

VI-)-Moleküler belirteç göstermeyen diffüz gliomlar (Not otherwise specialized, NOS)

VII-)-Diffüz orta hat gliomları H3 K27M mutant: bu gliomalar daha önce herhangi bir greydli astrositom olarak tanımlanıyordu, fakat ilk defa pontin diffüz gliomlu pediatrik hasta grubunda tanımlanmıştır. Histon 3'ü kodlayan H3F3A, HIST1H3B, HIST1H3C veya HIST1H3I genlerinde 27. pozisyondaki lizinin methioninle yer değiştirmesi sonucu fonksiyonunun artması ile gider. Erişkinlerde genç yaşlarda görülen kord, talamus ve beyin sapı tümörlerinde de görülür. Düşük greydli olsalar da prognozları kötüdür (80).

Yukarıda da bahsedildiği gibi günümüzde gliomalarda kullanılan moleküler belirteçler, IDH mutasyonu, 1p 19q delesyonu, TERT promoter gen metilasyonudur (82). Bu üç belirtecin tanısal, prognostik ya da prediktif değerleri oldukça yüksektir. Moleküler belirteçlerle ilgili yapılan çalışmalar hergeçen gün artmakta ve yeni subgrup sınıflamalarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

**IDH:** IDH 1 ve 2 olmak üzere iki tipi vardır. Mutasyon durumuna göre mutant, nonmutant ya da sınıflandırılamamış (NOS) olarak saptanır. IDH mutasyonu gliamogenezisisn ilk aşamasında görülen bir mutasyondur. Bu mutasyonlar sadece IDH fonksiyonunu bozmakla kalmaz, bazı işlevlerde fonksiyon kazancına yol açar. IDH mutasyonu alfa-ketoglutaratın (aKG), 2 hidroksi glutarata (2HG) çevrilmesini katalize eder ve 2HG birikimine neden olur ve son ürün bir onkometabolittir (83). 2HG, ten-eleven transkriptaz 2 (TET2) gibi aKG-bağımlı epigenetik modifiye edicilerin inhibisyonuna neden olur ve bu da CpG island metilatör fenotipin (G-CIMP) oluşumuna ve histon metilasyonuna neden olur. G-CIMP oluşumu kromozomal instabiliteye yol açan önemli bir faktördür (83). Ayrıca hipoksi inducible faktörün (HIF) konsantrasyonunun azalmasına neden olup hücre çoğalmasını proveke eder (83).

Glioma sınıflamasında tümörün IDH mutant ya da non-mutant olması kullanılan belirteçlerden biridir. IDH mutant gliomalar Gr II-III gliomlar ve sekonder GBM'dir. IDH mutant tümörlerin prognozları IDH-wild tiplere göre daha iyidir. IDH-wild tip gliomaların gelişiminde mutasyonun rolü yoktur, daha çok G-CIMP rol oynamakta ve bu tümörler arasında pilositik astrositom ve primer GBM

bulunmaktadır. IDH mutant GrII bir tümörün RT ya da KT ile tedavi edilmesi uygun değildir (83). IDH mutant tümörlerde prognozu, fenotipik olarak G-CIMP +'liği (DNA'nın metilasyon durumu, hipermetilasyonu) gibi spesifik epigenetik modifiye edici faktörler de etkiler. Bu özellikler tümörün tedavi edici girişimlere daha iyi yanıt vereceğini gösterir. IDH wild ve G-CIMP - tümörlerde tedaviye yanıt yoktur.

IDH ayrıca diffüz gliomun gliozisten ayırt edilmesini de sağlar (83).

IDH mutasyonları GBM'ların sadece belli bir formunda saptandığından 2010'da ekspresyon temelli bir subtipleme geliştirilmiştir; pronöral, nöral, klasik ve mezenkimal glioblastoma (84). Bunların genotipik özellikleri aşağıdaki gibidir;

-**Klasik tip:** Kr7 amplifikasyonu ve Kr 10 kaybı, %100

EGFRvIII, %93

Tp53 nonmutant

Fokal 9p homozigot delesyon--> NES (kök hücre belirteci), NOTCH

ve SHH yolaklarınının ekspresyonları oldukça artmıştır.

-**Mezenkimal tip:** 17q homozigot delesyonu (NF1 Geni) %53

PTEN mutasyonu

NF-$_k$B (TNF süperailesinden) yüksekliği, inflamatuar infiltrasyona bağlı olarak nekrozun yüksek olduğunu gösterir.

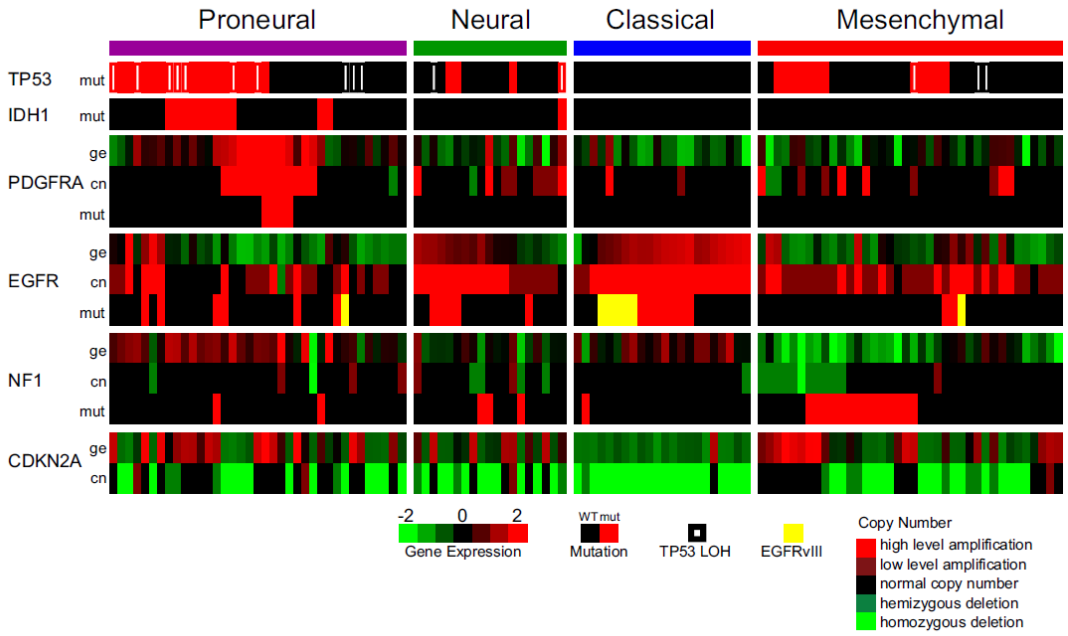
CH13L1 ve MET gibi mezenkimal belirteçler ve CD44 ve MERTK gibi astrositik belirteçler, epitelyalden mezenkimal tipe transisyonu gösterir.

-**Pronöral tip:** PDGFRAdeğişimi

IDH1 nokta mutasyonu

**-Nöral tip:** NEFL, GABRA1, SYT1 ve SLC12A5 gibi nöronal belirteçlerle karakterize.

Şekil 2'de glioblastoma subtiplerinde genetik ekspresyon ve değişimler toplu halde görülmektedir.




**Şekil 2**: Glioblastom subtiplerinde genetik ekspresyon ve değişimler (TCTGA'dan alınmıştır).

Mutasyonlar (mut) kırmızı hücre, beyaz çizgi heterozigozite kaybı, sarı hücreler EGFRvIII mutasyonu. Copy number anomalileri (cn) homozigot delesyon için açık yeşil, hemizigot delesyonlar yeşil, siyah kopyalama sayısı normal, kırmızı düşük düzeyli amplifikasyon, açık kırmızı yüksek düzeyli amplifikasyon. Siyah hücre: değişim saptanmamış.

**1p-19q delesyonu:** Sıklıkla oligodendroglial histoloji ile birliktedir ve nadiren diğer tümör tiplerinde görülür**.** CIC gen mutasyonu 1p-19q delesyonu olan oligoastrositomlarda görülmez. Daha az sıklıkla 1p üzerinde bulunan FUBP1 geninde de mutasyon mevcuttur. 1p-19q delesyonu olan tümörler RT ya da alkilleyici ajanlarla tedaviye daha iyi yanıt verirler.

Bu nedenle 1p ve 19q delesyonunun prognostik önemi vardır; bu tümörler KT'den yaralanır ve daha iyi bir prognoza sahiptir.

**Metilasyon durumu:** IDH mutasyonu aKG-bağımlı epigenetik modifiye edicilerin inhibisyonuna neden olur ve CpG island metilatör fenotipin (GCMP island) oluşumuna neden olur.

Ceccarelli ve arkadşlarının (85) çalışmasında DNA metilasyonuna göre altı farklı tip glioma tanımladılar;

**-IDH mutant gliomalar**:

1. LGm1(1p/19q delesyonu), %18

2. LGm2 (1p/19q wild) (G-CIMP high) %25 (yüksek metilasyon)

3. LGm3 (1p/19q wild) (G-CIMP düşük), %3

LGm1 ve 2 benzer prognoza sahipken LGm3 prognozu daha iyidir.

**-IDH wild tip gliomalar:**

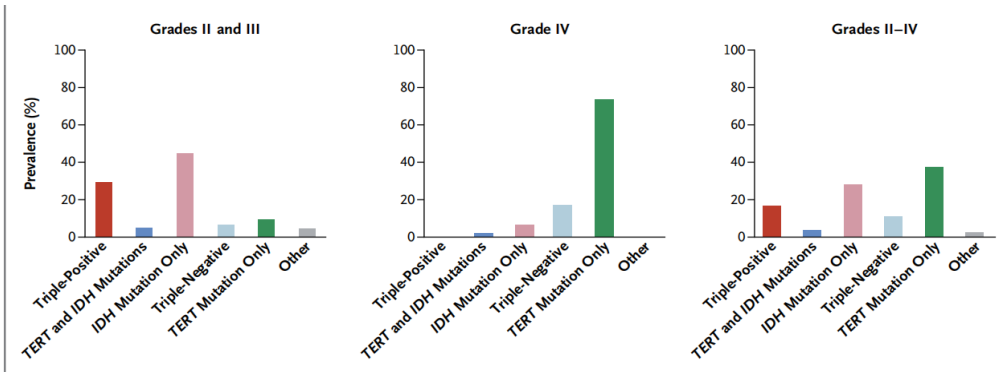
4. LGm4, klasik gene ekspresyonu, %18

5. LGm5 gliomlar, mezenkimal gen ekspresyonu gösterir, %27

6. LGm6 gliomlar, belirgin metilasyon ve stabil telomeraz, %9, pilositik astrositomlar gibi seyrederler.

**TERT promoter gen mutasyonu:** GBM IDH wild tipte %75, astrositom IDH wild tipte %12 TERT mutasyonu görülür. TERT mutasyonu olanlarda survey daha iyidir. IDH mutant ve 1p/19q delesyonu olan hastalarda TERT mutasyonu %94, ATRX mutasyonu %2 görülür ve TERT mutasyonunun survey bakımından pozitif bir gösterge olduğunu gösterir.

Nejmoa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada tümör greydi ve tümör belirteçleri arasındaki ilişkiler şekil 3'de gösterilmiştir.




**Şekil 3:** Kombine glioma örneklerinde glioma moleküler gruplarının dağılımı

Görüldüğü gibi GBM'lerde üçü de negatif iken, üçü de pozitif olan gliomaların tümü oligodendrogliom ya da mikst oligoastositomdur. TERT ve IDH mutant olanlarla sadece IDH mutant olan tümörlerin büyük kısmı Gr II veya III astrositom ya da mikst oligoastrositomadır. Sadece TERT mutasyonu olan tümörlerin %85'i GBM'dir.

**ATRX Muatsyonu:** TP53 ve IDH 1 mutasyonlarıyla birliktedir. ATRX mutastonu aynı zamanda tümörün astrositik kökenli olduğunu gösteren bir moleküler belirteçtir (diffüz, anaplasti astrositom ve oligoastrositom). ATRX mutasyonu 1p,19q delesyonu ile birlikteliği, IDH mutant gliomalar içinde bir spektrum oluşumuna ve uzun vadede spesifik tedaviler için hastaların stratifikasyonuna yardım eder (81) . ATRX mutasyonu, GBM-->IDH wild (%3), astrositom IDH wild (%12) görülür. IDH mutant GBM ve astrositom grubunda ATRX mutasyonu daha fazla görülür (%63 ve 78) (80). Bu gruplarda ATRX mutasyonunun surveyle ilişkisi yoktur.

**MGMT promoter metilasyonu:**MGMT DNA onarım proteinidir ve KT'nin yol açtığı guanin-$0^6$ alkilasyonunu onarır ve alkilleyici ajanın sitotoksisitesini ortadan kaldırır (83). MGMT protein konsantrasyonunun azalması DNA onarımının azalması demektir ve hasta KT'den daha fazla yarar görür. Buna da MGMT geninin metilasyonu yol açar (G-CIMP). KT ile tedaviye daha iyi cevap verirler. İyi bir prognostik göstergedir. IDH wild gliomlar TERT mutasyonu ve MGMT promoter metilasyonu ile birlikteyse %75 tedaviden faydalanır (85).

2016 yılında daha fazla subtip belirlemek için c-IMPACT-NOW konsorsiyumu yeni önerilerde bulunmuştur (86, 87, 88). Buna göre IDH wild diffüz astrositomlar ayrıca EGFR amplifikasyonu, Kr 7 kazanımı, Kr 10 kaybı ve TERT

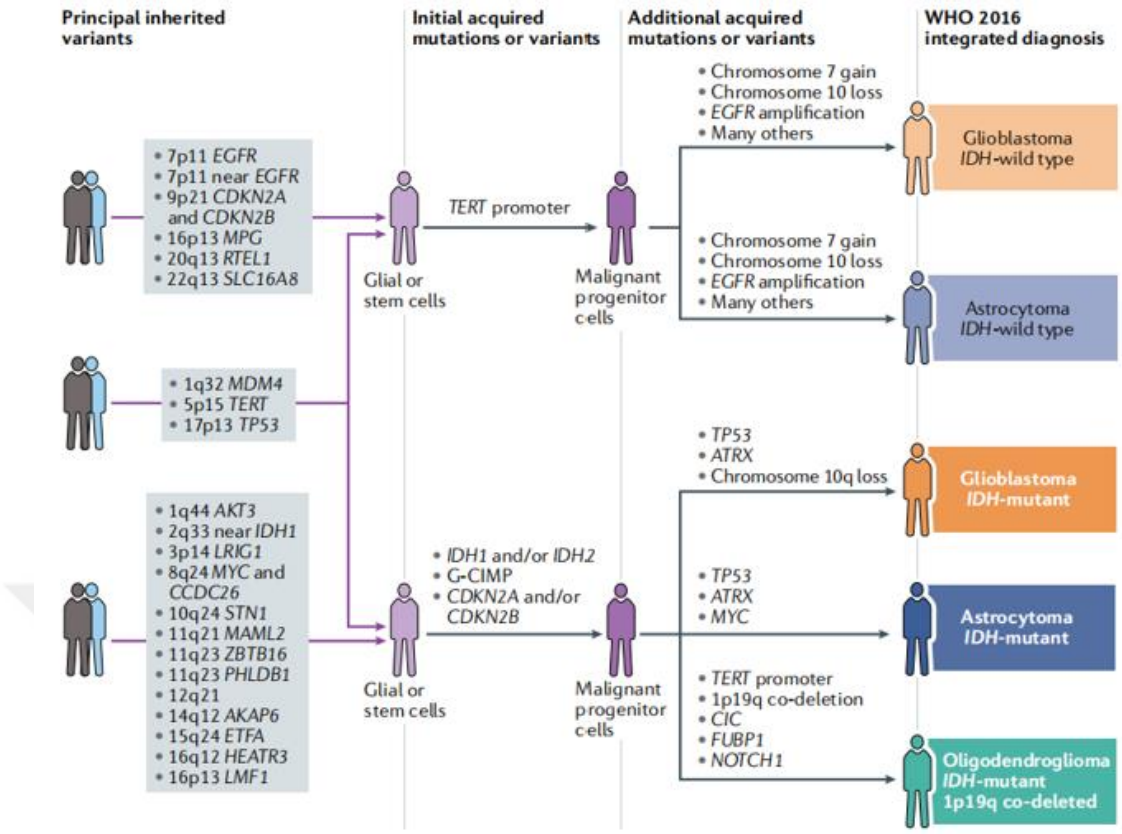
promoter mutasyonu bakımından incelenmelidir. Bunun dışında 2016 yılındaki sınıflamada belirtilmeyen diğer belirteçlerin de daha alt grupların saptanması için incelenmesinin yararlı olacağı bildirilmiştir.

**H3F3A mutasyonu:** Histon metilasyonu, pediatrik tümörlerin %15'inde, yetişkin yüksek greydli tümörlerin %8'inde görülür. H3F3A mutant tümörler global DNA hipometilasyonu gösterir ve IDH1 mutasyonuyla birliktedir. H3F3a mutant tümörler farklı anatomik bölgelerde tümör oluşumuna neden olurlar ve OLIG1, OLIG2 ve FOXG1 gibi transkripsiyon faktörlerinin over ekspresyonuna neden olurlar (83).

**EGFRvIII:** Primer GBM'ların %20-25'i delesyon mutant EGFR genine sahiptir ve EGFRvIII olarak adlandırılır. Bu mutasyonu taşıyan hastalarda prognoz daha kötüdür. EGFRvIII'nin özelliği kuvvetli bir epitop olması nedeniyle gelecek çalışmalarda kullanılabilir (83).

**BRAF füzyon ya da nokta mutasyonu:** 7q34'de BRAF'ın tandem duplikasyonu KIAA1549-BRAF gen füzyonuna yol açar ve pilositik astrositomum yüksek greydli astrositik tümörlerden ayırt edilmesini sağlar. BRAF missense mutasyonu BRAFVal600Glu nokta mutasyonudur. Pleomorfik ksantoastrositomların 2/3'ünde pozitiftir. BRAF mutasyonları onkojenik aktivasyonlarını MAPK yolağını aktive ederek gösterir. 2

Tüm bu bilgilerin ışığında Molinaro ve arkadaşları (80), glioma gelişimiyle ilgili aşağıdaki şemayı hazırlamıştır




**Tablo 8:** Gliomagenezis

Subventriküler zon (SVZ) lateral ventriküllerin dış duvarlarında bulunur. Erişkin beyninde SVZ nörogenezis ve self-renewing nöronların bulunduğu yerdir (89). Dentate gyrusun subgranular zonu ile birlikte SVZ adult nörogenezisde nöral kök hücre kaynağıdır. Kök hücre ve nöral progenitor hücreler arasındaki balans, epidermal growth faktör reseptör (EGFR) sinyal yolakları ve NOTCH sinyalizasyonuyla düzenlenir (90). NOTCH sinyalizasyonu nöral kök hücrelerinin kimliğini ve çoğalmasını sağlarken, EGFR nöral progenitör hücrlerin proliferasyon ve migrasyonunu sağlar (90). Epigenetik DNA modifikasyonu, nöral kök hücrelerin diferansiasyonu sırasında çok ömemli role sahiptir. DNA'da sitozinin 5-metil sitozine çevrilmesi DNA metiltransferaz3A tarafından gerçekleştirilir ve SVZ'da önemli bir epigenetik modifikasyonu oluşturu (90). Günümüzde SVZ'un beyin tümör kök hücrelerinin proliferasyonunda rol oynadığını ileri sürmüştür (92). Parent ve arkadaşlarının (92), ratlarda oluşturduğu epilepsi modelinde, subvetriküler zondan kök hücrelerin hareket ettiği ve epileptojenik bölgede toplandığı gösterilmiştir. Steindler ve arkadaşları (93), 2002 yılında ilk kez kortikal glioma örneklerinden nöral kök hücre benzeri hücreleri ayırt etmişlerdir (93). Bu hücrelerin varlığı tümör dokusunda görülen heterojeniteyi ve tedaviye dirençli olmalarını açıklamaktadır. Beyin tümör kök hücrelerin varlığının saptanması da, beyin tümörlerinin tedavisinde yeni ufukların açılmasına neden olmuştur.

## BEYİN TÜMÖRLERİNİN TEDAVİSİ

Beyin tümörlü bir hastanın öncelikle semptomlarının tedavisi gerekmektedir. Bu amaçla antiödem, gerekiyorsa antiepileptik ve diğer semptomatik tedavilerin uygulanması gerekmektedir. Cerrahi eksizyon beyin tümörlerinin tedavisinde altın standarttır.

Cerrahinin amacı; 1-)doku tanısı elde etmek,

2-)kitle etkisini

3-)tümör yükünü azaltmak

4-)yaşam süresi ve kalitesini arttırmaktır.

Malign glial tümörlerin aşırı rezeksiyona rağmen komplet eksizyonu, tümörlerin invazif ve infiltratif olması nedeniyle mümkün olmamaktadır. Ayrıca beynin fonksiyonel alanlarına da yerleşerek tam bir eksizyonun yapılamasını engeller (94). Yüksek greydli glial tümörlerde cerrahi sonrası RT ve KT gibi adjuvan tedavi uygulamaları rutindir. Günümüzde hastanın yaşam süresini etkileyen en önemli faktörler yaş, Karnovsky Performans skoru (KPS), tümör boyut ve yeri ve rezeksiyon derecesidir (95, 96). Ancak cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi modern tedavi yöntemlerine rağmen GBM'li hastaların yaşam süreleri 2 yıldan az, anaplastik gliomlarda ise bu süre 2-5 yılarasında değişmektedir (8).

Moleküler genetik yöntemlerin gelişmesi, tümörlerin subtiplerini belirleyen belirteçlerin varlığı ya da yokluğu, tedavi algoritmalarında değişikliklerin çıkmasına neden olmuştur. Moleküler belirteçlerin prognostik ve tedavi şemasının belirlenmesi açısından önemi büyüktür ve diğer belirteçlerle birliktelikleri aşağıdaki gibidir;

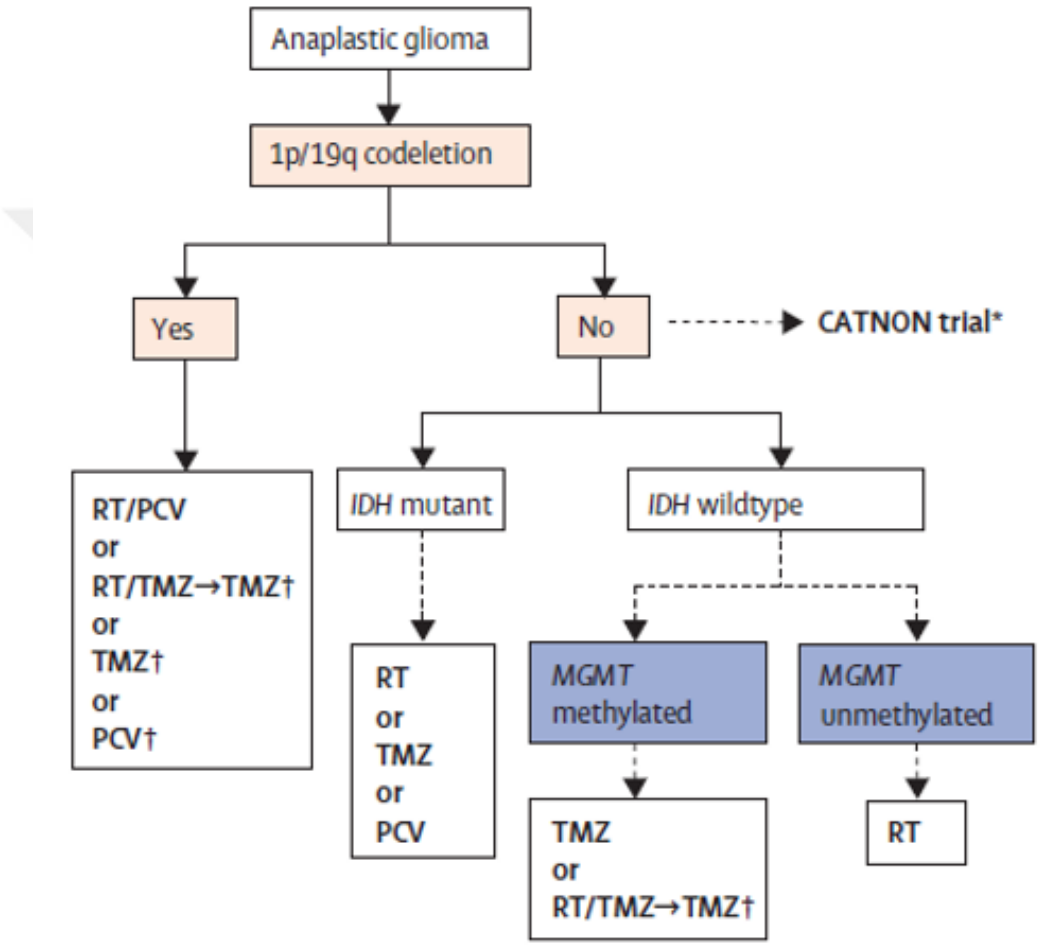
-IDH mutant tümörler sıklıkla MGMT promoter metilasyonu gösterir (%90), IDH wild tiplerde %40 pozitiftir .

-1p-19q delesyonu gösteren tümörler IDH mutanttır.

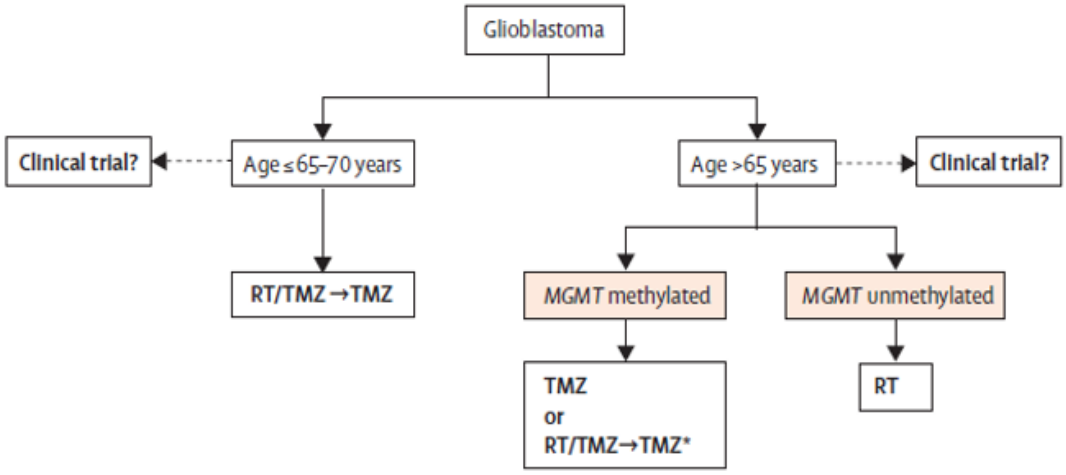
-IDH mutant/G-CIMP + anaplastik tümörlerde MGMT promoter metilasyonu pozitiftir, ancak %40-50'si G-CIMP negatiftir ve primer GBM gibi hareket ederler.

MGMT metilasyonu G-CIMP fenotipinin bir parçasıdır. G-CIMP, primer GBM'de nadir görülür.

Yukarıda bahsedilen biyolojik belirteçlerin hasta yönetimine eklenmesi ile anaplastik glial tümörlerin ve GBM'nin tedavi algoritmalarında da değişiklikler olmuştur. Tablo 9 ve 10'da anaplastik gliom ve GBM'nin biomarker temelli tedavi algoritması görülmektedir (83, 86)




**Tablo 9:** Anaplastik glioma tedavi şeması




**Tablo 10:** Glioblastom tedavi şeması

Günümüzde RT, KT ile birlikte cerrahi tedavi sonrası uygulanan önemli destek tedavilerindendir. Ancak herikisinin de bilinen belirgin komplikasyonları mevcuttur. RT'nin toksik etkileri akut, subakut ve geç dönemde olmak üzere üç gruba ayrılır ve hastaların %5-50'sinde görülür (9). Radyasyon hasarı 50 Gy gibi düşük dozda bile oluşabilir ve birlikte KT uygulanması radyasyon hasarı görülme riskini arttırır (9). Oluşan radyasyon hasarının etiolojisinde üç mekanizma sorumludur;

1-) direkt glial/oligodendroglial hücre ve nöral kök hücre hasarı

2-) endotelyal hücre ve kan-beyin bariyeri harabiyeti

3-) immün cevap yatmaktadır (7).

Verilen benzer dozlar her hastada radyasyon nekrozuna neden olmamakta ve bunun nedenleri ile ilgili çeşitli teoriler ileri sürülmüştür; DNA onarım enzimlerindeki harabiyet ve single nucleotid pleomorfizmi son yıllarda araştırılan iki önemli teoridir (7). Diabet, hipertansiyon, hasta yaşı gibi faktörlerinde radyasyon nekrozuna zemin hazırladığı bilinse de kanıt düzeyleri yüksek değildir.

Glioblastoma ve diğer beyin tümörlerinin tedavi giderleri, sosyal ve ekonomik olarak sağlık sistemlerinde ciddi bir fatura yaratmaktadır. Beyin tümörlü bir hastanın tedavisinde direkt maliyetin ayda 8.478 dolar civarında olduğu saptanmıştır (97). İş kaybı, erken emeklilik gibi indirekt kayıpların da İsveç'te 197.7 milyon dolar civarında olduğu bildirilmiştir (97). Bu nedenle ekonomik analizler, en uygun ve komplikasyonu daha az olan tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ve kullanılması gereğini zorunlu kılmaktadır.

HIFU, RT temelli tedavi yöntemlerinin en sık rastalan komplikasyonlarından olan akut, subakut ve geç radyasyon komplikasyonlarına neden olmamakta aynı zamanda etkin bir tedavi sağlamaktadır (98, 99). Temel etki mekanizması, uygulama bölgesinde hızla ısı artışı–yaparak protein denatürasyonu sonucu tümör hücrelerinin ölümüne yol açmasıdır (100, 101).

Uygulanmasının kolay ve ciddi yan etkisinin olmaması sebebiyle kısa sürede dünya çapında tedavide tercih edilir bir seçenek olacağı ön görülmektedir.

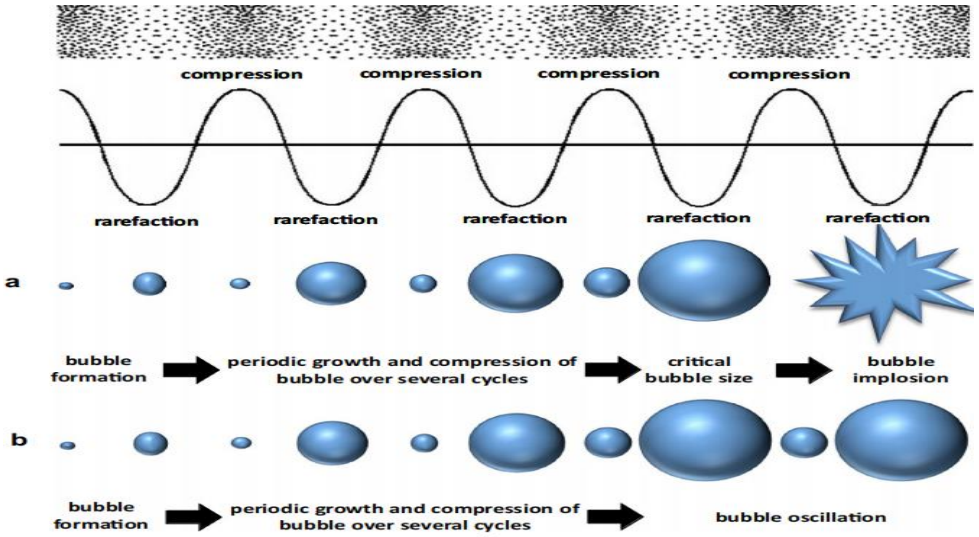
HIFU'nun tanısal ultrasonografilerden farkı, yüksek yoğunluklu ultrasonik dalgaları foküsleyebilen bir transducera sahip olmasıdır. HIFU'nun çalışma prensibi termal etki yaratacak şekilde transduserda oluşturulan ultrasonik dalgaların, akustik lensler kullanılarak, tıpkı mercek gibi bir araya gelmesi prensibine dayanmaktadır (şekil 5). Geleneksel olarak akustik lensler kullanılmış olsa da günümüzde pozisyonu kolaylıkla değştirilebilen aşamalı dizi (phased array) tekniği kullanılmaktadır. HIFU transducerı, fokal bir bölgeye 100-10.000W/$cm^2$ güç uygulayabilir ve bunun tepe kompresyon basıncı 30MPa, sönüm basıncı 10MpA'e dek çıkar (12). Yüksek akustik yoğunluğun dokudaki etkisi, akustik enerjinin emilimine bağlı olarak yüksek ısı artışı sonucu olan koagulasyon nekrozudur. Foküslenme sayesinde 1 mm çapında, 9 mm uzunluğunda bir lezyon oluşur (12). Eğer sonikasyon sırasında mikrobaloncuklar içeren ultrasonik kontrast madde kullnılırsa, ablasyon sırasında kullanılan zaman-ortalama güç gereksini azalır (102). Termal etkilerin yanında mekanik etkileri de vardır; oluşan kavitasyon, mikro akım ve radyasyon güçleri ilgili dokuda mekanik destrüksiyona yol açar.

HIFU'nun oluşturduğu termal enerji, uygulama bölgesinde 1 sn'den az bir sürede ısının $60^{0}$'ye çıkarak koagulasyon nekrozu sonucu hücrenin ölümüne yol açar (13). Kan akımının termal enerjiyi soğurmasına bağlı olarak HIFU büyük damarlara yakın olan lezyonlarda damara kısa ya da uzun vadede zarar vermeden uygulanmasını sağlar (13).

Uygulama sonrası akut inflamatuar reaksiyon gelişir, hücreler bazal membranlarından ve birbirlerinden ayrılırlar. Bunu kronik inflamasyon ve yeniden şekillenme fazı izler ve yaklaşık 3 ay kadar süren rejenerasyon, proliferasyon, migrasyon, fibroblast infiltrasyonu ve doku artıklarının kaldırılması fazı izler (102).

sonunda lezyon granulasyon dokusuyla kaplanır ve skar dokusu oluşur. Oluşan lezyon ve sağlam doku arasında keskin bir sınır mevcuttur.

HIFU'nun mekanik etkileri kavitasyon, mikro-akım oluşturma ve radyasyon güçleridir (13). Kavitasyon, ultrasonik dalganın yayılımı sonucu dokunun sürekli kompresyon ve ekspansiyonuna bağlı olarak gelişen, akustik alanda oluşan gaz kavitesine verilen isimdir; stabil ve inertial olmak üzere iki tipi vardır (13). Stabil kavitasyon düşük yoğunluklu ultrasonik uygulamalarda görülürken, oluşan gazın stabil osilasyonuna bağlıdır. Yeterince güçlü ultrasonik dalgalar, ekspansiyon fazında intermoleküler bağlayıcı güçlerden daha fazla güç oluşturur ve gaz baloncuklarının oluşumuna yol açar (103). Gaz baloncuklarının oluşumu görüldüğünde buna rezonans boyutu denir (103). Rezonans boyutu oldukça unstabildir ve kolaylıkla birkaç akustik siklusta patlayabilir ve inertial kavitasyon fazına geçer (103). İnertial kavitasyon ise destrüktiftir, ekspansiyon sırasında oluşan güç intermoleküler bağlayıcı güçlerin çok üstüne çıkar ve gaz kavitesi ultrasonik dalganın etkisiyle giderek büyür ve doku kollabe olduğunda patlamasına neden olur (1013. Inertial kavitasyon sırasında oluşan ışık ve gazın sıcaklığı 1000 $^{0}$C'ye dek çıkabilir (103). ayrıca serbest radikaller ve ışık oluşumuna (sonoluminesans) neden olur. Şekil 4'de stabil ve inertial kavitasyonların oluşumu görülmektedir. Bu sırada mikroçevrede 20-30.000 barlık bir basınç ve yüksek ısı oluşur (13). Eğer balon kollapsı hücre membranı gibi fiziksel bir sınıra yakın olursa, asimetrik kollaps oluşur ve bu da yüksek akımlı likit jet akımların oluşumuna yol açar ve hızı 111m/sn'ye dek çıkar. Stabil kavitasyon oluşumu sırasında oluşan gazın etrafındaki sıvılarda da mikro-akım oluşur ve hücre membranlarında bir gerilme kuvvetinin ortaya çıkmasına neden olur, bu da HIFU'nun hücre içine ilaç ya da genetik materyalin uygulanabilmesi için kullanılabilir (13). Akustik dalganın absorbsiyon ya da refleksiyonuna göre radyasyon gücü gelişir. Eğer uygulama likit bir alanda yapılıyorsa dalga kolayca hareket eder ve mikroskopik bir akımın oluşumuna yol açar ve bu da hücrelerde apoptoza yol açar. Apoptoz, HIFU'nun önemli ve geç dönemde oluşan bir biolojik etkisidir.




**Şekil 4:** Kompresyon ve ekspansiyon sırasında kavitasyon oluşumu; inertial kavitasyon (a), stabil kavitasyon (b) (103).

Termal ablasyon dışında foküslenmiş ultrasonik dalgalar, düşük yoğunlukta (0,125-3W/cm$^2$), mekanik etkilerinden yararlanılarak kanser tedavisinde farklı şekillerde de kullanılabilir;

**-İmmün yanıt:** tümör dokusunun sono-modifikasyonu, meknizması tam anlaşılamamış olsa da tümör immünojitesini ve konakçının immün yanıtının artmasına neden olur (104).

Oldukça komplike olsa da bunun olası nedenleri;

-tümörün koagulasyon nekrozunun immün sistem yanıtının düzelmesini sağlaması,

-tümörden salınan immunosupresif maddelerin ortadan kalkması,

-ultrasonik radyasyonun, tümör hücrelerinin biofiziksel özelliklerinin değişmesine bağlı olarak, savunma hücreleri üzerindeki etkilerinin ortadan kalkmasıdır (104).

**-Kan-beyin bariyerinin (KBB) açılması:** SSS'de ilaçların sinir dokusu içine girmesi, kan-beyin bariyeri nedeniyle önemli bir sorundur. İlaçların molekül ağırlıklarına göre KBB'ini açmada stabil ya da inertial kavitasyon kullanılabilir. Tümör tedavisinde kullanılan KT ajanların molekül ağırlıkları 400-500 kD arasında

olduğundan inertial kavitasyon oluşturarak ilaçların KBB'ini geçmesi sağlanabilir. Beyin tümörlerinde vasküler permiabilite heterojenite gösterir ve yapılan çalışmalarda tümörün merkezindeki ilaç konsantrasyonu ile tümör çevresindeki ilaç konsantrasyonları arasında 40 kat fark olduğu gösterilmiştir (105). İlaçların homojen dağılımının sağlanmasında KBB'inin açılarak ilaç dağılımının etkili düzeyde sağlanması önemlidir. Çalışmalarda 1.0-3.3 MPa sonikasyonlarda 100 milisaniyelik burst süresinde bunun sağlanabildiği gösterilmiştir, bu sırada oluşan ısı artışı 5 $^{0}$C'den fazla değildir ve bu ısı artışının çevre nöronlarda histolojik bir harabiyete yol açmadığı gösterilmiştir (106). Frekansın azaltılmasıyla sonikasyon 0.4MPa'ye dek düşürülebilir (107). 200-300 kHz gibi düşük bir frekansta KBB'inin açılabildiği gösterilmiş ve intakt kafatasından sonik sapmalar olmadan geçebildiği bildirilmiştir (108). KBB'inin yaklaşık 5-24 saat içinde eski haline geldiği bildirilmiştir (108, 105).

KBB'inin açılmasının farklı nedenleri olabilir;

-sonikasyon öncesi verilen ultrasonik kontrast içinde oluşan baloncukların kollapsına bağlı olarak yüksek ısı, mikrojet ve şok akımlara bağlı olarak KBB'inin açılması,

-oluşan serbest radikaller,

-P-glikoprotein drug efluxun supresyonu,

-transsinostozun artması,

-damarların ultrasonik kontrast maddedeki baloncukların kollabe olmadan damar duvarıyla etkileşimine bağlı olabilir (105, 109).

Yapılan çelışmlarda HIFU uygulamaları sonrası beyin tümör tedavisinde kullanılan birçok ajanın tümör doku konsantrasyonlarının arttığı gösterilmiştir (105).

**-Viral terapiler:** viral tedavi yöntemleri tümör tedavisinde giderek popüler hale gelmektedir fakat viral vektörlerin tümöre ulaşmasında KBB yine sorun olarak karşımıza çıkmakta ve bu sorun KBBi açılarak çözülebilir.

**-Hücre tedavisi:** gliomalarda da şimerik antijen reseptör T hücre tedavisi sık kullanılmaya başlanmıştır. Intraventriküler olarak verilmesi gerekmektedir, ancak ultrasonil olarak KBB'i aşılarak sorun çözülebilir.

**-Immunomodulasyon:** tümör hücrelerinin ultrasonik olarak destrüksiyonu, tümörün antijen epitoplarını açığa çıkarır, heat şok protein ve adenozin trifosfatı aktive eder. Hastanın kendi immün sistemini aktive eder ve tümör immünojenitesini arttırır.

**-Likid tümör biopsisi:** tümör hücrelerinin sonikasyonu sonucu açığa çıkan miRNA gibi tümör belirteçleriyle tümör fenotipinde oluşan değişikliklerin izlenmesi (13).

Yukarıda kabaca bahsedilen HIFU'nun biolojik etkileri termal etkileri ve kavitasyon oluşumuyla tümör dokusunun ablasyonuna yol açar. Tümör ablasyon etkileri yanında kanser tedavisinde tümör mikroçevresinin ablasyonu, tümör dokusuna ilaç ya da genetik materyalin iletilmesinde ve serebrovasküler olaylarda kan pıhtısının ortadan kaldırılması gibi birçok nöroşirürjikal hastalıkta kullanılabilme olasılığı mevcuttur.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada, ATCC firmasından -80 derecelik sıvı nitrojen tankında depo edilmiş ve dondurulmuş biçimde taşınan 60 yaşındaki kadın hastanın Glioblastom hazır hücre hatları kullanıldı (ATCC CRL-3412, USA). Bu çalışma deneyleri laboratuvar ortamında yapılmıştır.

HITU'nun deney düzeneğinde kullanılan malzemelerin marka ve özellikleri aşağıdaki gibidir:

-Test havuzu, 800x800x800mm ölçülerinde 10mm şeffaf akrilik levhadan su sızdırmaz şekilde yapıldı. Test havuzu içinde test parçaları ve ölçüm sensorlerinin stabil şekilde askıda kalmasını sağlamak amacı ile 80x40mm ölçülerinde sigma alüminyum profil ile sabitleme çerçvesi yapıldı.

-Doku flaskını steril durumda atış yapılmasını olanak sağlayacak şekilde 100mm kalınlıkta akrilik levhaya flask ölçüsünde kanal açıldı. Flask zemini fokal noktada olacak şekilde z-ekseninde ayarlandı.

-Test havuzunun zemin düzlemine HIFU trasducer'i yerleştirildi. Transducer kablolarının geçişi için test havuzu zeminine delik açıldı. Transducer sabitlendikten sonra delik silikon yardımı ile su sızdırmazlığı sağlandı.

-Test havuzu, gazlarından arındırılmış su ile doldurudu ve su sıcaklığı 36.5°C'de sabitlendi. Su sıcaklığı ölçümünde kalibrasyonlu PCE Instruments, "Water Analysis Meter PCE-T 318 Thermometer" (PCE Instruments) kullanıldı. Suyun degas iletkenlik değeri Hann Instruments, Hanna Dist 4 İletkenlik Ölçüm Cihazı - HI 98304 ile 0.1µS/cm olarak ölçüldü (Hann Instruments).

-HIFU transduceri, açıklık çapı 180mm, tek elementli, konkav piezo kompozit, 120mm odak uzaklığı olan, 1MHz frekanda elektriksel gücü 1000Watt kullanıldı (H-149 – özel tasarım, Sonic Concepts, Inc. Bothell, WA, USA).

HITU'nun deney düzeneği;

Hücre hattı uygun ısıda çözüldükten sonra flow sitometri cihazına koyularak yaklaşık olarak eşit miktarda bölündü (102). Hücre kültürü için 6 tane 75 $cm^2$ flask kullanıldı (Nest Scientific 708003). Bu flaskların yüzeyleri hücrelerin tutunması için

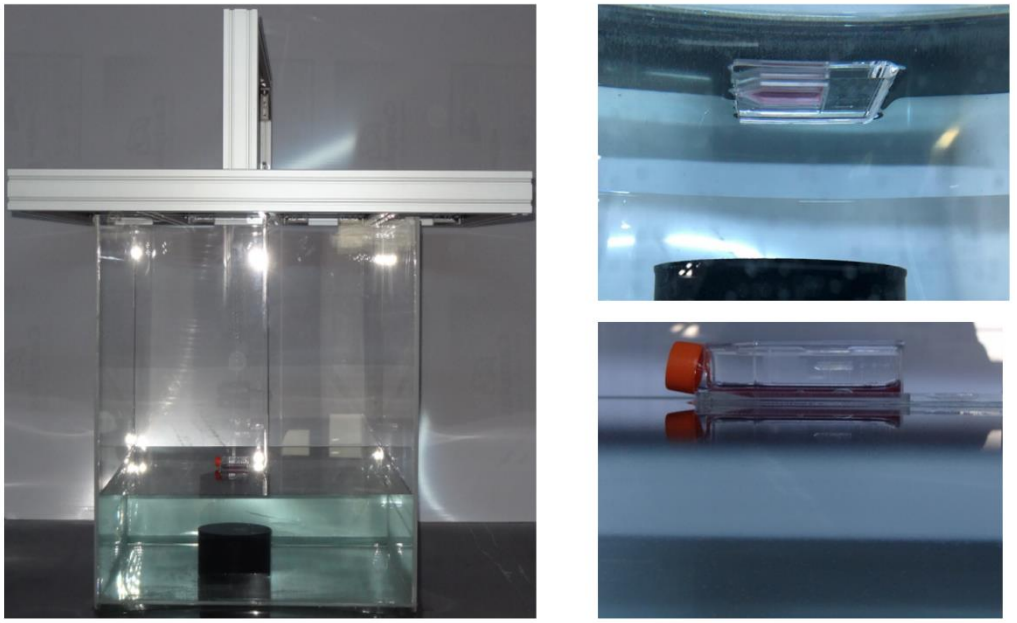
polimerik protein veya peptidle kaplanarak, okside edildi (103). Bu sayede hücrelerin ekstrasellüler matriks proteinleri yüzeye tutunmalarını sağlandı (108, 112). M. Arora' nın (113) 2017 yılındaki derlemesinden alınan protokollere göre beslenme sıvıları ve hücreler için gerekli diğer malzemeler flaskın içine eklenerek, glioblastoma hücreleri kültüre edilmek üzere ekildi (113, 114). Flasklar inkübatöre koyuldu. Ertesi gün çok fazla hareket ettirilmeden faz kontrast mikroskop altında hücrelerin yüzeye tutunduğu gözlendi. Flasklar tekrar inkübatöre koyularak 37 derece, %5 $CO_2$ miktarı ayarlanarak çoğalmaları için 72 saat bekletildi (115). Sonra flasklar inkübatörden çıkarılarak, mikroskop altında hücrelerin çoğalıp çoğalmadığı gözlemlendi. 6 tane ana grubumuz ekildikleri flasklardan kaldırılarak S. Fedoroff ve A. Richardson'ın (115) yöntemi ile flow sitometri cihazında sayıldıktan sonra kendi içlerinde 3'er gruba ayrıldı. 2 grup 25 $cm^2$'lik flasklara ilk grup 3'e ayrılarak ikinci grup ise 6'ya ayrılarak her birine 500000 hücre tekrar ekilerek inkübatöre koyuldu. 3. Grup ise 6 tane 96' kuyucuklu plate içine her bir kuyucuğa 10 bin hücre ekilerek inkübatöre koyuldu. 24 saat sonra inkübatörden çıkarılıp mikroskop altında hücrelerin yüzeye tutunduğu gözlendi. 72 saat sonra hücreler işleme hazır hale getirilmiştir.

-3 tane ana grup kontrol grubu olarak değerlendirilmek üzere planlandı. Diğer 3 ana gruba ise HITU uygulanmıştır. HITU'yu Jacquleyn MacDonell ve ekibi 2018'de beyin tümörlü bir hastada tümörün olduğu lokalizasyonda yaklaşık 2 $cm^3$ bir alana 180 saniye 4-W akustik çıkış gücü uygulamışlar ve uyguladıkları alanda ısı artışıyla ablasyonu sağlamışlardır (28).

-Flaskın yerleştirileceği platformda 45msec pulse genişlikleri ile 100msec aralıklarla 50 pulse atıldı ve fokal noktada sıcaklık 58°C ölçüldü.

-Steril flask, su yüzeyine temas edecek şekilde yerleştirildi. Fokal noktada bulunan flask zeminine 45msec. pulse genişliğinde 100msec aralıklı 50 pulse atıldı.

Resim 1 de deney düzeneği ve glioblastom hücrelerinin olduğu flask gösterilmiştir.



**Resim 1:** HITU ve glioblastom hücre hatları içeren deney düzeneği

Her grubun inkübatörden hemen çıkarıldıktan sonra, 4-6 saat sonra ve 24 saat sonra; mikroskobik inceleme, flow sitometri ile hücre sayımı ve "ATPlite 1Step Luminescence Assay System" kiti ile hücrelerin ATP aktivitesine ve hücre canlılığına bakıldı.

Deneyde 6 grup kullanılmıştır ve grupların özellikleri aşağıdaki gibidir:

-Grup 1 (Kontrol grubu): Kendi içerisinde a1, b1, c1 olarak adlandırılarak 3 adet 25 cm²'lik flaskta hiçbir tedavi uygulanmayıp, inkübatörden çıkarıldıktan hemen sonra, 4-6 saat sonra ve 24 saat sonra faz kontrast mikroskop altında incelemeleri yapılmıştır (116). İnceleme sırasında hücrelerin yüzeye tutunup tutunmaması, bu hücrelerin mikroskobik olarak görüntülenmesi ve tutunan hücrelerin morfolojik yapısı, glioblastom hücre hatları üzerine yapılmış çalışmalar ile karşılaştırılmıştır (116).

-Grup 2 (Kontrol grubu) : Kendi içerisinde a2, b2, c2 olarak adlandırılarak 3 adet 25 cm²'lik flaskta hiçbir tedavi uygulanmayıp, inkübatörden çıkarıldıktan hemen sonra, 4-6 saat sonra ve 24 saat sonra flow sitometri cihazına koyulan hücreler bir akış kanalı boyunca geçerken tek tek deteksiyonu ve ayrışımı sağlanarak hücre sayımı yapılmıştır (102).

-Grup 3 (Kontrol grubu) : Kendi içerisinde a3, b3, c3 olarak adlandırılarak 96'lık 3 plate olmak üzere 3 gruba bölündü. Bu gruplara hiçbir tedavi uygulanmayıp,

inkübatörden çıkarıldıktan hemen sonra, 4-6 saat sonra ve 24 saat sonra "ATPlite 1Step Luminescence Assay System" kiti ile hücrelerin ATP aktivitesine ve hücre canlılığına bakıldı. Bu kit içerisinde yapılacak işlemler, Michael E. Sughrue ve arkadaşları (117) tarafından belirlenen prosedürlere göre yapılmıştır.

-Grup 4 (HITU uygulanan grup): Grup 1'deki flasklar d1, e1, f1 olarak adlandırılarak 3 HITU uygulandıktan hemen sonra, 4-6 saat sonra ve 24 saat sonra mikroskop altında incelemeleri yapılmıştır.

-Grup 5 (HITU uygulanan grup): Kendi içerisinde d2, e2, f2 olarak adlandırılarak 3 adet 25 $cm^2$'lik flaskta HITU uygulandıktan hemen sonra, 4-6 saat sonra ve 24 saat sonra flow sitometri cihazı ile hücre sayımı yapılmıştır.

-Grup 6 (HITU uygulanan grup): Kendi içerisinde d3, e3, f3 olarak adlandırılarak adlandırılarak 96'lık plate olmak üzere 3 gruba bölündü. Bu gruplara HITU uygulandıktan hemen sonra , 4-6 saat sonra ve 24 saat sonra ATP kiti ile hücrelerin ATP aktivitesine ve hücre canlılığına bakıldı.

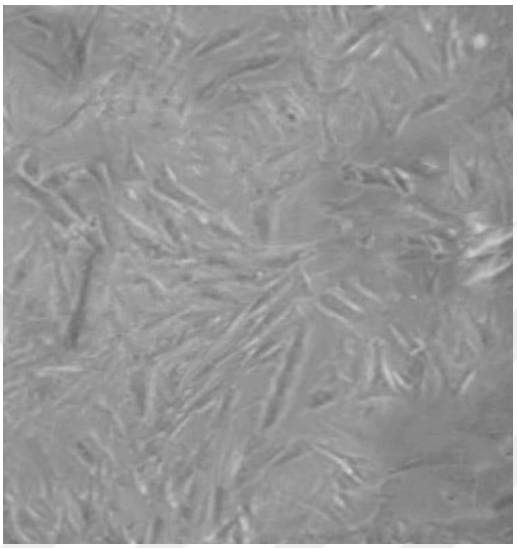
**İstatistiksel İnceleme;**

Verilerin tanımlayıcı istatistiklerinde ortalama, standart sapma, medyan en düşük, en yüksek, frekans ve oran değerleri kullanılmıştır. Flasklardaki hücrelerin flow sitometri cihazında sayıldıktan sonraki analizi için Tekrarlı Anova istatistiksel yöntemi kullanılmıştır (118). p değeri < 0.05 olduğunda Ho hipotezi reddedilir. ATP kiti ile yapılan hücre sayımı ve florasans yoğunluğu için Shapiro-Wilk normallik testi ve bağımlı t testi kullanılmıştır (119, 120). p değeri < 0.05 olduğundan Ho hipotezi reddedilir. Analizlerde SPSS version 16.0 programı kullanılmıştır.

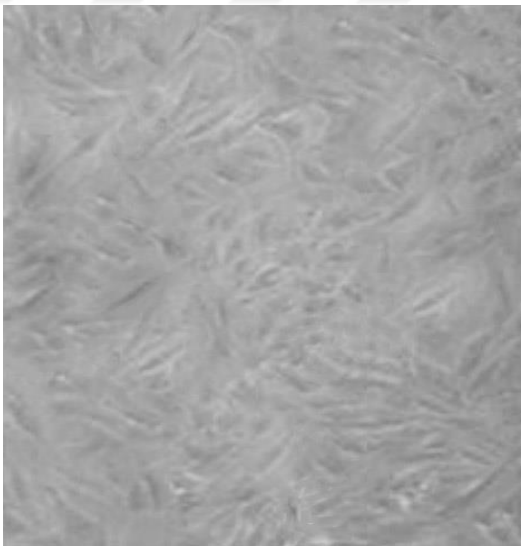
## BULGULAR

### 1. Mikroskopik Değerlendirme

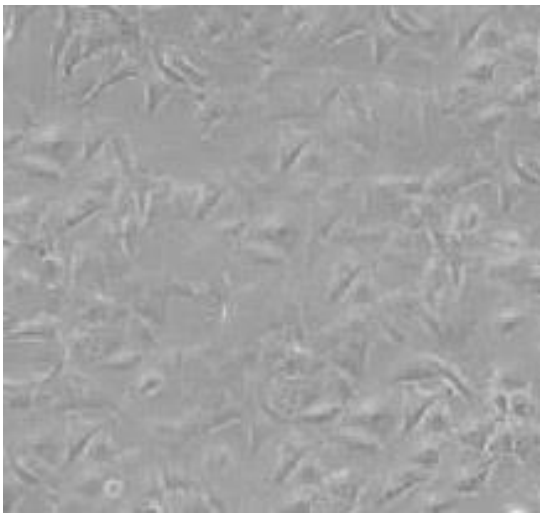
Kontrol gurubu—olarak belirlenen Grup 1 için uygulama öncesinde inkübatörden çıkarıp hemen (a1) (Resim 2), 4-6 saat sonra (b1) (Resim 3) ve 24 saat sonra (c1) (Resim 4) faz kontrast mikroskop altında görüntülendi. Flask yüzeyine tutunan ve tipik glioblastom fenotipleri kayıt altına alındı.



**Resim 2:** Kontrol grubumuzun (a1) inkübatörden çıkarıldıktan sonra hemen sonraki görüntüsü



**Resim 3:** Kontrol grubumuzun (b1) 4-6 saat sonraki sonraki görüntüsü

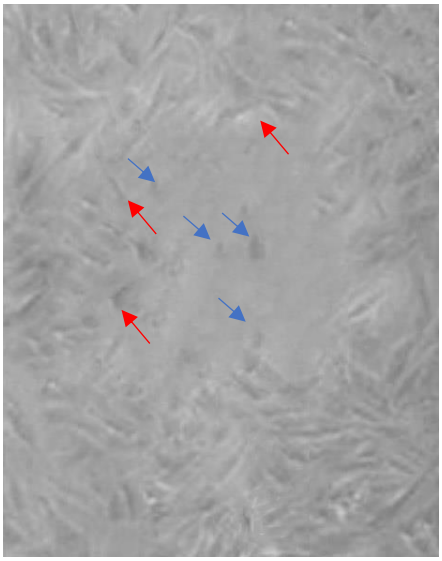


**Resim 4:** Kontrol grubumuzun (c1) 24 saat sonraki sonraki görüntüsü

HITU uygulandıktan sonraki Grup 4 olarak belirlediğimiz gruplarda;

a1 olarak belirlediğimiz HITU uygulandıktan hemen sonra mikroskop altında baktığımızda, hücrelerde gözle görülebilir bir değişiklik saptanmamıştır.

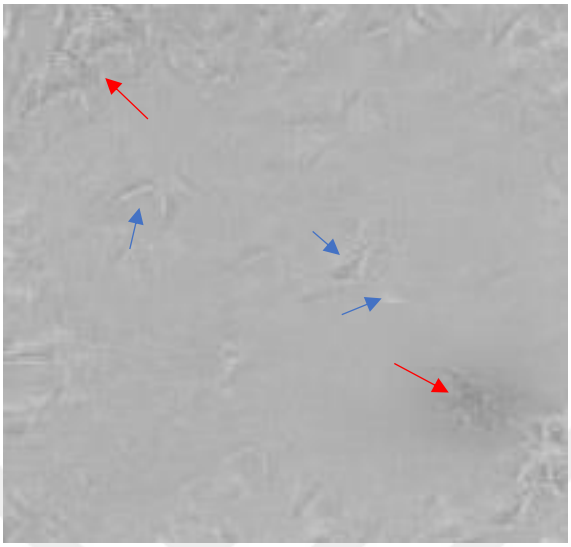
"e1", b1 olarak belirlediğimiz HITU uygulandıktan 4-6 sonra mikroskop altında baktığımızda, uygulanan kısımda yüzeye tutunan hücrelerde azaldığını, uygulanan kısım ve yakın çevresindeki hücrelerin morfolojilerinde değişiklikler gözlemledik (resim5).



**Resim 5:** e1 olarak belirlediğimiz grubumuza HITU uygulandıktan sonra hücrelerin şekillerindeki değişiklik (kırmızı oklar) ve uygulanan bölümlerdeki hücre kalıntıları (mavi oklar) görmekteyiz.

"f1", c1 olarak belirlediğimiz HITU uygulandıktan 24 sonraki mikroskop altındaki incelememizde, uygulama yaptığımız bölgede yüzeye yapışan hücre

kalmadığını, beslenme sıvısı içerisinde yüzen hücrelerde ciddi bir artış olduğunu gözlemledik. Yüzeye tutunan çok az sayıdaki hücrelerin şekillerinde, normal glioblastom hücre şekilleriyle kıyasladığımızda gözle çok net görebildiğimiz şekil bozukluklarını tespit ettik (resim6).



**Resim 6:** f1 olarak belirlediğimiz grubumuza HITU uygulandıktan 24 saat sonra çoğalan hücreleri (kırmızı oklar) görmemize rağmen genel hücre sayısında azalma ve hücre artıklarını (mavi oklar) görmekteyiz.

2. **Flow Sitometre Ölçümleri**

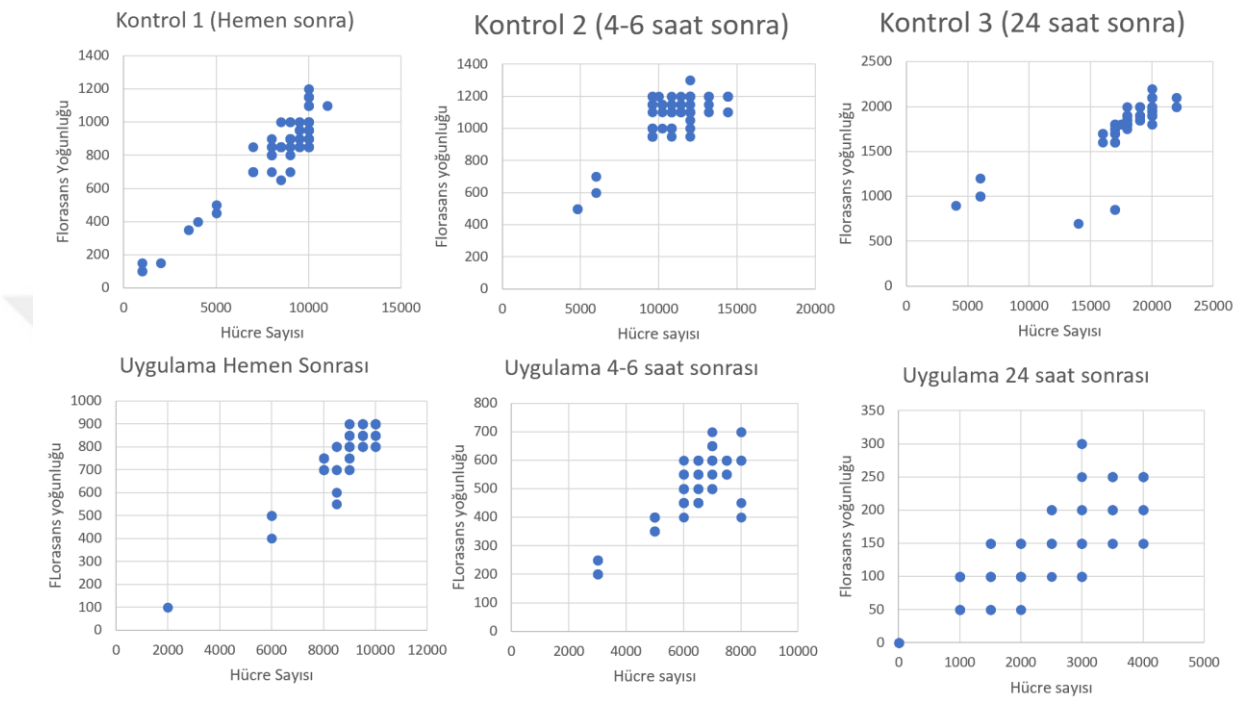
Flasların içine yaklaşık olarak eşit miktarda koyduğumuz en baştaki hücrelerin sayısı, herhangi bir işlem yapmadığımız inkübatörden çıkardıktan sonraki Grup 2 (a2, b2, c2) olarak belirlediğimiz ve HITU uyguladıktan hemen sonraki (d2), 4-6 saat sonraki (e2) ve 24 saat sonrasındaki (f2) Grup 5 olarak belirlediğimiz gruplardaki hücre sayıları flow sitometri cihazında sayılmış olup, aşağıda tablodaki gibidir:

| | Flasklara koyulan hücre sayısı | İnkübatörden hemen sonra/uygulama yapıldıktan sonraki hücre sayısı | 4-6 saat sonraki hücre sayısı | 24 saat sonraki hücre sayısı |
|---|---|---|---|---|
| a2 (kontrol) | 500000 | 500000 | 600000 | 1000000 |
| b2 (kontrol) | 500000 | 490000 | 580000 | 980000 |
| c2 (kontrol) | 500000 | 500000 | 580000 | 970000 |
| d2 | 500000 | 480000 | 440000 | 550000 |
| e2 | 500000 | 460000 | 390000 | 450000 |
| f2 | 500000 | 490000 | 420000 | 500000 |

**Tablo 11:** Flow sitometri ölçümü sonrası hücre sayıları

### 3. ATP Ölçümü

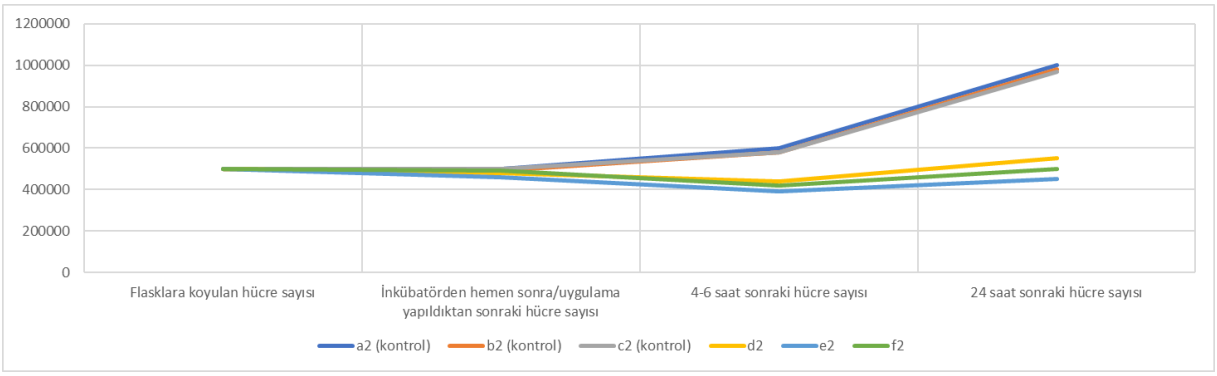
Kontrol grubu olarak planladığımız 3. Grup (a3, b3, c3), hücre hatları ile HITU uyguladıktan hemen sonraki (d3), 4-6 saat sonraki (e3) ve 24 saat sonrasındaki (f3) Grup 6 olarak belirlediğimiz gruplardaki, ATP kiti ile yaptığımız ölçümler Şekil 5'te yer almaktadır:




**Şekil 5:** ATP kiti uygulaması sonrasında hücre sayısı ve florasans yoğunluğu

### 4. İstatistiksel İnceleme

Flow sitometri ile ölçülen flaskların grafiği Şekil 6'te gösterilmiştir. Tekrarlı Anova istatistiksel analizi ise HITU uygulandıktan sonraki hücre sayısına olan etkisini kullandığımız yöntem olup Tablo 12'de açıklanmıştır.




**Şekil 6:** Flow sitometri ile hücre sayım grafiği

| ÖZET | Flasklara koyulan hücre sayısı | İnkübatörden hemen sonra/uygulama yapıldıktan sonraki hücre sayısı | 4-6 saat sonraki hücre sayısı | 24 saat sonraki hücre sayısı | Toplam |
|---|---|---|---|---|---|
| Kontrol | | | | | |
| Say | 3 | 3 | 3 | 3 | 12 |
| Toplam | 1500000 | 1490000 | 1760000 | 2950000 | 7700000 |
| Ortalama | 500000 | 496666.7 | 586666.7 | 983333.3 | 641666.7 |
| Varyans | 0 | 33333333 | 1.33E+08 | 2.33E+08 | 4.39E+10 |
| Uygulama | | | | | |
| Say | 3 | 3 | 3 | 3 | 12 |
| Toplam | 1500000 | 1430000 | 1250000 | 1500000 | 5680000 |
| Ortalama | 500000 | 476666.7 | 416666.7 | 500000 | 473333.3 |
| Varyans | 0 | 2.33E+08 | 6.33E+08 | 2.5E+09 | 1.88E+09 |
| Toplam | | | | | |
| Say | 6 | 6 | 6 | 6 | |
| Toplam | 3000000 | 2920000 | 3010000 | 4450000 | |
| Ortalama | 500000 | 486666.7 | 501666.7 | 741666.7 | |
| Varyans | 0 | 2.27E+08 | 8.98E+09 | 7.12E+10 | |

ANOVA

| Varyans Kaynağı | SS | df | MS | F | P-değeri | F ölçütü |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Örnek | 1.7E+11 | 1 | 1.7E+11 | 361.0973 | 2.1E-12 | 4.493998 |
| Sütunlar | 2.72E+11 | 3 | 9.07E+10 | 192.6726 | 9.14E-13 | 3.238872 |
| Etkileşim | 2.24E+11 | 3 | 7.48E+10 | 158.8319 | 4.08E-12 | 3.238872 |
| İçinde | 7.53E+09 | 16 | 4.71E+08 | | | |
| Toplam | 6.74E+11 | 23 | | | | |

**Tablo 12:** Tekrarlı Anova istatistiksel analizi ile hücre sayılarının incelenmesi

HITU uygulaması ile geçen süre arasında ilişki olup olmadığı Tablo 12'de gösterilmiştir.

-Ho hipotezi kurulur.

-Ho: Uygulama ile süre arasında anlamlı bir ilişki yoktur.

-p değeri < 0.05 olduğundan Ho hipotezi reddedilir. Uygulama ile geçen süre arasında anlamlı bir ilişki vardır.

-Kontrol grubu ile uygulama gruplarında, uygulama sonrası geçen sürelere göre hücre sayısı ortalamalarına baktığımızda ise uygulama yapıldıktan sonra kontrol grubunda süre geçtikçe ortalama hücre sayısının arttığını görüyoruz. Ama uygulama yaptığımız gruptaki hücrelerin kontrol grubumuza göre anlamlı bir şekilde daha az arttığını kullandığımız istatistiksel yöntemle göstermiş olduk.

ATP ölçüm kiti ile yapılan çalışma sonrası istatistiksel analizler Tablo 13'de gösterilmiştir.

6 deney durumu için de verilerin normal dağılıp dağılmadığı test edildiğinden

-Shapiro-Wilk normallik testi kullanılmıştır.

-Ho yokluk hipotezleri kurulur.

-Ho: Veriler normal dağılıma uygundur.

-Test sonuçlarına baktığımızda p value < 0.05 olduğundan dolayı Ho hipotezi reddedilir. Veriler normal dağılıma uygun değildir.

-Verilerin normal dağılıma uygun olmaması analiz için parametrik olmayan yöntemler kullanacağımız anlamı taşımaktadır.

-Veri setimiz için bağımlı t testi kullanılmıştır.

**t-Test: Ortalamalar İçin İki Örnek (Hemen Sonra)**
**Hücre Sayısı**

| | kontrol1 | uygulama1 |
|---|---|---|
| Ortalama | 8796.875 | 8968.75 |
| Varyans | 4255674 | 1356908 |
| Gözlem | 96 | 96 |
| Pearson Korelasyonu | 0.306151 | |
| Öngörülen Ortalama Farkı | 0 | |
| df | 95 | |
| t Stat | -0.82753 | |
| P(T<=t) tek-uçlu | 0.205005>0.05 | |
| t Kritik tek-uçlu | 1.661052 | |
| P(T<=t) iki-uçlu | 0.410009 | |
| t Kritik iki-uçlu | 1.985251 | |

**t-Test: Ortalamalar İçin İki Örnek (4-6 saat sonra)**
**Hücre Sayısı**

| | Kontrol2 | uygulama2 |
|---|---|---|
| Ortalama | 11135.42 | 6203.125 |
| Varyans | 3208838 | 1703043 |
| Gözlem | 96 | 96 |
| Pearson Korelasyonu | 0.148412 | |
| Öngörülen Ortalama Farkı | 0 | |
| df | 95 | |
| t Stat | 23.5305 | |
| P(T<=t) tek-uçlu | 1.03E-41<0.05 | |
| t Kritik tek-uçlu | 1.661052 | |
| P(T<=t) iki-uçlu | 2.07E-41 | |
| t Kritik iki-uçlu | 1.985251 | |

**t-Test: Ortalamalar İçin İki Örnek (24 saat sonra)**
**Hücre Sayısı**

| | kontrol3 | uygulama3 |
|---|---|---|
| Ortalama | 17755.21 | 2447.917 |
| Varyans | 11715762 | 1176206 |
| Gözlem | 96 | 96 |
| Pearson Korelasyonu | 0.497727 | |
| Öngörülen Ortalama Farkı | 0 | |
| df | 95 | |
| t Stat | 49.45593 | |
| P(T<=t) tek-uçlu | 6.67E-70<0.05 | |
| t Kritik tek-uçlu | 1.661052 | |
| P(T<=t) iki-uçlu | 1.33E-69 | |
| t Kritik iki-uçlu | 1.985251 | |

**t-Test: Ortalamalar İçin İki Örnek (Hemen sonra)**
**Florasans Yoğunluğu**

| | kontrol1 | uygulama1 |
|---|---|---|
| Ortalama | 860.4167 | 794.7917 |
| Varyans | 44521.93 | 15183.11 |
| Gözlem | 96 | 96 |
| Pearson Korelasyonu | 0.419118 | |
| Öngörülen Ortalama Farkı | 0 | |
| df | 95 | |
| t Stat | 3.302336 | |
| P(T<=t) tek-uçlu | 0.000676<0.05 | |
| t Kritik tek-uçlu | 1.661052 | |
| P(T<=t) iki-uçlu | 0.001352 | |
| t Kritik iki-uçlu | 1.985251 | |

**t-Test: Ortalamalar İçin İki Örnek (4-6 saat sonra)**
**Florasans Yoğunluğu**

| | Kontrol2 | uygulama2 |
|---|---|---|
| Ortalama | 1083.854 | 494.7917 |
| Varyans | 18499.73 | 14814.69 |
| Gözlem | 96 | 96 |
| Pearson Korelasyonu | 0.064809 | |
| Öngörülen Ortalama Farkı | 0 | |
| df | 95 | |
| t Stat | 32.69177 | |
| P(T<=t) tek-uçlu | 8.76E-54<0.05 | |
| t Kritik tek-uçlu | 1.661052 | |
| P(T<=t) iki-uçlu | 1.75E-53 | |
| t Kritik iki-uçlu | 1.985251 | |

**t-Test: Ortalamalar İçin İki Örnek (24 saat sonra)**
**Florasans Yoğunluğu**

| | Kontrol3 | uygulama3 |
|---|---|---|
| Ortalama | 1780.729 | 146.875 |
| Varyans | 88124.73 | 5042.763 |
| Gözlem | 96 | 96 |
| Pearson Korelasyonu | 0.239291 | |
| Öngörülen Ortalama Farkı | 0 | |
| df | 95 | |
| t Stat | 55.53978 | |
| P(T<=t) tek-uçlu | 1.57E-74<0.05 | |
| t Kritik tek-uçlu | 1.661052 | |
| P(T<=t) iki-uçlu | 3.14E-74 | |
| t Kritik iki-uçlu | 1.985251 | |

**Tablo 13:** Shapiro-Wilk normallik ve bağımlı t testi ile HITU uygulaması sonrası hücre sayısı ve ATP florasans yoğunkluğu arasındaki ilişki azalmıştır.

-Kontrol ve uygulama gruplarından HITU uygulamasından hemen sonra alınan hücre sayısı ölçümlerinden belirgin fark yoktur, florasans yoğunluğu ölçümlerinde anlamlı bir fark vardır. Burada HITU uygulaması sonrası değerlerinde düşme söz konusudur.

-Kontrol ve uygulama gruplarından HITU uygulamasından 4-6 saat sonra alınan hücre sayısı ölçümlerinde anlamlı bir fark mevcuttur. Hücre sayısında düşüş söz konusudur. Florasans yoğunluğu ölçümlerinde anlamlı bir fark mevcuttur. Uygulama grubu ortalaması daha düşüktür.

-Kontrol ve uygulama gruplarından HITU uygulamasından 24 saat sonra alınan hücre sayısı ölçümlerinde anlamlı bir fark mevcuttur. Hücre sayısı kontrol grubunun yaklaşık 7 kat daha azdır. Florasans yoğunluğu ölçümlerinde anlamlı bir fark mevcuttur. Uygulama grubu ortalaması daha düşüktür.

# TARTIŞMA

Teknolojinin gelişmesiyle birlikte tıpta tanı ve tedavi yöntemleri arasına daha az morbiditesi olan ve daha az invaziv işlemler hastaların yaşam kalitesini arttırmakta ve tedavi masraflarının azalmasını sağlamaktadır. Özellikle temel bilimlerdeki gelişmeler, multidisipliner çalışmalarla sağlık sektörüne uygulanarak hastaların yaşam süre ve konforları uzatılmaktadır.

Beyin tümörlü bir hastanın öncelikle semptomlarının tedavisi gerekmektedir. Bu amaçla antiödem, gerkiyorsa antiepileptik ve diğer semptomatik tedavilerin uygulanması gerekmektedir. Cerrahi eksizyon beyin tümörlerinin tedavisinde altın standarttır. Cerrahinin amacı; doku tanısı elde etmek, kitle etkisini ve tümör yükünü azaltmak ve yaşam süresi ve kalitesini arttırmaktır. Malign glial tümörlerin aşırı rezeksiyona rağmen komplet eksizyonu, tümörlerin invazif ve infiltratif olması ve tümör kök hücrelerin varlığı nedeniyle mümkün olmamaktadır. Bazan beynin fonksiyonel alanlarına yerleşerek tam bir eksizyonun yapılamasını engeller (2). Yüksek greydli glial tümörlerde cerrahi sonrası radyoterapi ve kemoterapi gibi adjuvan tedavi uygulamaları rutindir. Günümüzde hastanın yaşam süresini etkileyen en önemli faktörler yaş, Karnovsky Performans skalası (KPS), tümör boyut ve yeri ve rezeksiyon derecesidir (95, 96).

Günümüzde RT, KT ile birlikte cerrahi tedavi sonrası uygulanan önemli destek tedavilerindendir. Ancak herikisinin de bilinen belirgin komplikasyonları mevcuttur. RT'nin toksik etkileri akut, subakut ve geç dönemde olmak üzere üç gruba ayrılır ve hastaların %5-50'sinde görülür (9). Radyasyon hasarı 50 Gy gibi düşük dozda bile oluşabilir ve birlikte KT uygulanması radyasyon hasarı görülme riskini arttırır (9). Oluşan radyasyon hasarının etiolojisinde üç mekanizma sorumludur;

1-) direkt glial/oligodendroglial hücre ve nöral kök hücre hasarı
2-) endotelyal hücre ve kan-beyin bariyeri harabiyeti
3-) immün cevap yatmaktadır (9).

Glioblastoma ve diğer beyin tümörlerinin tedavi giderleri, sosyal ve ekonomik olarak sağlık sistemlerinde ciddi bir fatura yaratmaktadır. Beyin tümörlü

bir hastanın tedavisinde direkt maliyetin ayda 8.478 dolar civarında olduğu saptanmıştır (97). İş kaybı, erken emeklilik gibi indirekt kayıpların da İsveç'te 197.7 milyon dolar civarında olduğu bildirilmiştir (97). Bu nedenle ekonomik analizler en uygun ve komplikasyonu daha az olan tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ve kullanılması gereğini zorunlu kılmaktadır.

19. Yüzyıldan beri tanı için kullanılan ultrasonografi, son yıllarda teknojinin gelişmesiyle ultrasonografik ses dalgalarının mekanizması ve bu dalgaların tedavide nasıl kullanılabileceğinin daha iyi anlaşılmasını sağlamış ve non-invazif ve komplikasyonlar açısından RT'ye alternatif bir tedavi yöntemi olarak gelişimini sürdürmektedir (118).

HIFU teknolojisi, ultrasonik dalgaların belli bir noktaya odaklanarak, o noktadaki ısının kontrollü bir şekilde ayarlanabilmesine olanak sağlar (120, 121). MR kılavuzlu HIFU prosedüründe, sonikasyon adı verilen bir teknik olan ultrason ışınları ile küçük bir hedef ısıtılır. Sıcaklığa maruz kalan doku alanı ve bu ısıya maruz kalma uzunluğu, termal lezyonun boyutunu belirleyen eşdeğer bir termal doz tanımlar (13). HIFU tedavisinde, vücuttaki çeşitli tümör tiplerinin lokal ablasyon tedavisi için 100-10.000 W / cm2'lik bir yoğunluk (ISATA) kullanılarak odaklanmış ultrasonografi uygulanır (13). Bu tekniğin temel amacı, çevre dokulara zarar vermeden önemli biyolojik reaksiyonları (pıhtılaşma nekrozu) indüklemek için hedef bölgedeki enerji birikimini en üst düzeye çıkarmaktır. Transkraniyal tedavi için, ultrasonik enerjiyi (noninvaziv uygulamalar için genellikle 1-3 MHz) hedef dokuya dönüştürmek ve lokal doku yıkımı üretmek için odaklanmış bir piezoelektrik dönüştürücü ultrasonik dalga oluşturmak için kullanılır (13). "Odak bölgesi", ultrason yoğunluğunun (enerji / birim alan) bir lezyon oluşturacak kadar yüksek olduğu alan olarak tanımlanabilir (14). Bu lezyonlar elipsoidal, 8-15 mm uzunluğunda ve 1-2 mm çapındadır. HIFU uygulaması sabit (termal) veya değişken (akustik kavitasyon) olabilir. Ultrason, dokudaki moleküllerin titreşimine neden olarak sürtünme ısısı üretir; 2 saniyeden fazla tutulan> 56 ° C'lik bir sıcaklık pıhtılaşma ve nekroza yol açar (14, 15).

Termal hasar, planlanmamış hücre ölümüne yol açar. Hedeflenen hücreler ana hatlarını korur, proteinleri pıhtılaşır ve metabolik aktiviteleri durur. Yumuşak dokularda HIFU lezyonları, nekrotik bir merkez ve fonksiyonel olarak bozulmuş

glikojen fakir hücreler arasında bir sınır gösterir, bu da sonunda etkilenen ve etkilenmeyen dokular arasında, uygulamadan 48 saat sonra "ada ve hendek" sunumu olarak tarif edilir (15). Hücrelerin bazal membranlarından ve birbirlerinden ayrılmasıyla yoğun bir akut enflamatuar yanıt ortaya çıkar. Bunu, hücresel rejenerasyon, proliferasyon, migrasyon, fibroblast infiltrasyonu ve 3 aya kadar süren kalıntıların giderilmesini içeren kronik inflamasyon ve yeniden modelleme takip eder. Daha sonra bu lezyonlar granülasyon dokusu ile kapsüllenir ve sonunda skar oluşumuna yol açar.

HIFU, RT temelli tedavi yöntemlerinin en sık rastalan komplikasyonlarından olan akut, subakut ve geç radyasyon komplikasyonlarına neden olmayarak, gereğinde tekrarlanabilmekte, çocuklara uygulanabilmekte ve aynı zamanda etkin bir tedavi sağlamaktadır (128, 129). Temel etki mekanizması, uygulama bölgesinde ısı artışına neden olarak protein denatürasyonu sonucu tümör hücrelerinin ölümüne yol açmasıdır (130, 131).

Klinik tıpta ultrason en yaygın olarak görüntüleme ile ilişkilidir, ancak beyin tümörlerinin termal ablasyonu dahil olmak üzere bir dizi biyolojik etki sağlamak için kullanılabilir. Terapötik ultrason yıllardır incelenmiştir, ancak sadece son on yılda HIFU teknolojisi klinik benimsenme için güvenli ve pratik bir noktaya ulaşmıştır. HIFU ile ultrasonografi ses dalgaları intrakranial olarak odaklanabilir ve beyinde bir milimetre hassasiyet ile lezyonlar oluşturmak için görüntü rehberliği ve gerçek zamanlı termometri için MRI ile uygulanabilir (25). Bu teknolojiyi kullanarak gerçek non-invaziv intrakraniayal tümör tedavisi tümör hücrelerin termal enerji ile yok edilmesi ile gerçekleştirilebilir. Odaklanmış ultrasonun ablatif yeteneklerini kan-beyin bariyeri bozulması ve radyosensitizasyon gibi diğer benzersiz etkileri ile birleştirmek, sonunda mevcut glioma tedavisi paradigmasının değişmesine neden olabilir. Uygulanmasının kolay, kanser tedavileri düşünüldüğünde harcanan masraflara göre daha ekonomik olması, ve ciddi yan etkisinin olmaması sebebiyle kısa sürede dünya çapında tedavide tercih edilir bir seçenek olacağı ön görülmektedir.

Çalışmamızda henüz yeni bir teknoloji olan Yüksek Yoğunluklu Tedavi Edici Ultrason'un in vitro glioblastom hücre hatları üzerine etkilerini mikroskobik, metabolik ve sayısal veriler üzerine gösterilmiştir. Kontrol grupları ve HITU

uygulayacağımız flaskalara ortalama 500 biner hücre koyduktan sonra, HITU uyguladığımız hücre gruplarında, hemen sonrasında anlamlı bir değişiklik olmazken, 4-6 saat sonraki HITU uyguladığımız gruplardaki hücre sayılarının, kontrol gruplarına göre 150-200 bin hücre kadar daha az olduğu ve 24 saat sonraki uygulama gruplarındaki hücrelerin kontrol gruplarına göre 420-550 bin hücre kadar az olduğu Şekil 6'da gösterilmiş olup, Tablo 12'de istatistiksel analizi yapılarak HITU uygulama gruplarında hücre sayılarının azaldığına dair anlamlı veriler elde edilmiştir.

Mikroskopik olarak değerlendirildiklerinde alınan görüntüler ve HITU uygulaması sonrası alınına görüntüler karşılaştırıldığında; uygulama yapılan gruplarda 4-6 saat sonra ve 24 saat sonra gözlem yapıldığında bazı hücrelerin flask yüzeyine tutunamayıp görüntülerde gözükmemesi, hücrelerin öldüğünün göstergesidir. Bazı hücre yapılarının ise bozulduğu, düzensizleştiği 4-6 saat ve 24 saat sonraki incelemelerde gösterilmiştir.

Hücrelerin yaşadığını veya öldüğünü tespit edebilmek için kullanılan flow sitometri cihazında yapılan ölçümler sonucunda ilk 4-6 saat ve 24 saat sonrasında yapılan incelemede hücre sayılarındaki istatistiksel olarak anlamlı bulunan azalış, hücrelerin HITU uygulaması sonucu öldüğünün bir başka yöntemi olarak gösterilmiştir.

Hücrelerin canlılığı için ATP üretimi yaşam için gereklidir. ATP, hücredeki hemen hemen hücrenin işleyişindeki bütün olaylarda temel enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. ATP üretmeyen bir hücrenin öldüğü bilinmektedir. Kanser hücreleri için de durum bundan farklı değildir. Normal hücrelerden daha fazla ATP üretimi ve harcamasına ihtiyaç duyan kanser hücrelerinde, ATP'nin önemi daha da artar. Çalışmamızda HITU uyguladığımız kanser hücre hatlarındaki ATP ölücümü için florasans yoğunluğu düzeylerine bakılmış olup şekil 5'te gösterilmiştir. Tablo 13'te HITU uygulamasından hemen sonra, 4-6 saat sonra kontrol grubuyla birlikte karşılaştırıldığında ortamdaki florasans yoğunluğu miktarındaki anlamlı ölçüde azalma tespit edilmiştir. 24 saat sonra uygulama yaptığımız hücre hatlarına bakıldığında hücre sayısıyla orantılı olarak anlamlı bir florasans yoğunluğunda azalmanın tespit edildiği dolayısıyla hücre sayısı ve ATP miktarındaki azalma çalışmamızda gösterilmiştir.

Yaptığımız çalışmada HITU'yu in vitro ortamda glioblastom hücre hatları üzerinde belirli bir bölgeye uyguladığımız zaman olabilecek sonuçları mikroskobik, sayısal olarak ve canlılık aktivitesi olarak düşündüğümüz ATP üretime dayalı olarak moleküler anlamda göstermiş olduk. HITU'nun bu etkinliğinin literatüre katacağı zenginliğin yanında, sonraki hayvan deneylerine öncülük edebilecek bir tedavi yöntemi olduğunu çalışmamızda belirli parametrelerle tespit edebildik.

Aldığımız sonuçlara göre HITU'nun glioblastom hücreleri üzerindeki etkisi, kanser hücrelerinin ölmesiyle sonuçlanmıştır. Sonraki çalışmalarımızda hayvan geçilmesi planlanarak çalışma sona erdirilmiştir.

## SONUÇ

Çalışmamızda Yüksek Yoğunluklu Tedavi Edici Ultrason'un, laboratuvar ortamında hücre kültürü yapılmış glioblastom üzerine mikroskobik, metabolik ve sayısal olarak canlılığı üzerine etkilerine bakılmıştır.

Mikroskopik olarak değerlendirildiğinde, uygulama yaptığımız hücre hatlarının zamanla tutunduğu yüzeyden ayrılarak öldüğü gözlemlenmiştir. Protein denatürasyonu sonucunda protein yapıdaki hücre zarı ve hücre iskeleti elemanlarındaki hasara bağlı hücrelerin yüzeye tutunması ve hücre zarlarının parçalanması ile hücre ölümü gerçekleşmektedir (132). Uygulama yapılmayan bölgedeki hücrelerin ise yüzeye tutunarak, yaşamaya devam ettiği faz kontrast mikroskop altında gösterilmiştir. Kontrol gruplarımızdaki glioblastom hücrelerimiz ile HITU uygulaması sonrasındaki hücreler karşılaştırıldığında; uygulama hemen sonrasında mikroskopla aynı yere bakıldığında mikroskop altında bir fark saptanmamış olup, 4-6 saat sonra bakıldığında bir miktar hücre sayısında azalma ve görülen hücrelerin de çeperlerinin değişiklik gösterdiği ve hücrelerdeki şekil bozukluğu gözlemlenmiştir.

HITU uygulanan ve uygulanmayan kontrol hücre hatlarındaki Glioblastom hücrelerinin işlemden hemen sonra, 4-6 saat sonra ve 24 saat sonraki Flow sitometri cihazındaki incelemelerinde; işlem yaptığımız gruplarda hemen sonrasında hücre sayısında anlamlı bir fark izlenmezken, 4-6 saat sonrasında ve 24 saat sonrasında yapılan hücre sayımında hücrelerin azalmış olduğu veriler tespit edilmiş olup, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Hücrelerin ATP üretimine bağlı yapılan testte ise uygulama yaptığımız hücre hatlarındaki hücrelerin, ATP üretimindeki mekanizmalarda görev alan enzimlerinin protein yapıda olması sebebiyle hasar görüp, ATP üretimini azalttığı ve hücrelerin canlılığı için gerekli olan ATP' nin azalması dolayısıyla hücrelerin canlılıklarını yitirdikleri gözlemlenmiştir. ATP'nin ölçümü bir ATP kiti ile yapılmıştır. 96'lık kuyucuklara ekilen hücreler ile yapılabilen testte florasans yoğunluğuna bakılarak hücrelerdeki ATP miktarları karşılaştırılmıştır. HITU uygulamasından hemen sonra hücre sayısında anlamlı bir değişiklik olmazken florasans yoğunluğundaki azalma, 4-

6 saat ve 24 saat sonraki ölçümlerdeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

HITU'nun glioblastom hücreleri üzerine etkileri bizim çalışmamızda olduğu gibi başka çalışmalarla da gösterilmiştir (132). Bu çalışmalar, yapılacak hayvan ve insan deneylerine öncü olup, HITU gelecekte beyin tümörlerinin tedavi seçenekleri arasında yer alacaktır.

## KAYNAKÇA


1. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 2016 Jun;131(6):803-20.

2. Quinn T. Ostrom, Gino Cioffi, Haley Gittleman, Nirav Patil, Kristin Waite, Carol Kruchko, and Jill S. Barnholtz-Sloan CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012–2016 *Neuro Oncol.* 2019 Nov 1;21(Suppl 5):v1-v100.

3. Emanuele Crocetti, Annalisa Trama , Charles Stiller, Adele Caldarella, Riccardo Soffietti, Jana Jaal, Damien C. Weberf, Umberto Ricardi, Jerzy Slowinski, Alba Brandesi Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe, European Journal of Cancer (2012) 48, 1532-1542.

4. C. Fitzmaurice, et al. Global, regional, and national burden of brain and other CNS cancer, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 2019 Apr;18(4):376-393.

5. Elisa Baldin, Stefania Testoni, Silvia de Pasqua, Salvatore Ferro, Fiorenzo Albani, Agostino Baruzzi, Roberto D'Alessandro Incidence of neuroepithelial primary brain tumors among adult population of Emilia-Romagna Region, Italy. *Neurol Sci*. 2017 Feb;38(2):255-262.

6. Emily V. Walker and Faith G. Davis; CBTR founding affiliates. Malignant primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in Canada from 2009 to 2013. *Neuro-Oncology* 21(3), 360–369, 2019.

7. Manuel Valiente, Manmeet S. Ahluwalia, Adrienne Boire, Priscilla K. Brastianos, Sarah B. Goldberg, Eudocia Q. Lee, Emilie Le Rhun, Matthias Preusser, Frank Winkler, and Riccardo Soffietti. The Evolving Landscape of Brain Metastasis. *Trends Cancer.* 2018 Mar;4(3):176-196.

8. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):987-96.

9. Gazanfar Rahmathulla, Nicholas F. Marko c, Robert J. Weil. Cerebral radiation necrosis: a review of the pathobiology, diagnosis and management considerations. *Journal of Clinical Neuroscience* 20 (2013) 485–502.

10. Massimi L, Tufo T, Di Rocco C. Management of optic-hypothalamic gliomas in children: still a challenging problem. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2007 Nov;7(11):1591-610.

11. Rosenfeld A, et al. Neurofibromatosis type 1 and high-grade tumors of the central nervous system. *Childs Nerv Syst.* 2010. PMID: 19937438.

12. Theodore J. Dubinsky, High-Intensity Focused Ultrasound: Current Potential and Oncologic Applications. *AJR Am J Roentgenol.* 2008. PMID: 18094311 Review.

13. Yu-Feng Zhou, High intensity focused ultrasound in clinical tumor ablation. *World J Clin Oncol*. 2011 January 10; 2(1): 8-27.

14. William G Pitt, Ultrasonic drug delivery – a general review. *Ashley Publications* Ltd 2014.

15. Laurence Lagneaux, Ultrasonic low-energy treatment: A novel approach to induce apoptosis in human leukemic cells. *Experimental Hematology* 30 (2002) 1293–1301.

16. Rowland Illing, Sonablate-500: transrectal high-intensity focused ultrasound for the treatment of prostate cancer. *Expert Rev Med Devices* 2006 Nov;3(6):717-29.

17. Kenneth M. Kernen, Use of high-intensity focused ultrasound in the treatment of both benign and malignant prostatic disease. Proceedings Volume 3907, Lasers in Surgery: Advanced Characterization, *Therapeutics, and Systems X;* (2000).

18. Mottet N, Bastian PJ, Bellmunt J, et al. Guidelines on prostate cancer. *Eur Urol*. 2014.

19. Yi-Hsuan Hsiao, Clinical Application of High-intensity Focused Ultrasound in Cancer Therapy. *J Cancer*. 2016; 7(3): 225–231.

20. Tanter M, Aubry J-F, Pernot M, Marquet F, Fink M. Compensating for bone inter faces and respiratory motion in high intensity focused ultrasound. *Int J Hyperther*. 2007.

21. Shi XG, Martin RW, Rouseff D, Vaezy S, Crum LA. Detection of high-intensity focused ultrasound liver lesions using dynamic elastometry. *Ultrasonic Imaging*. 1999;21:107–126.

22. Vaezy S, Zderic V. Haemorrhage control using high intensity focused ultrasound. *Int J Hyperther*. 2007.

23. Leslie T, Kennedy JE. High intensity focused ultrasound in the treatment of abdominal and gynaecological diseases. *Int J Hyperther*. 2007.

24. Pawel Piotr Dobrakowski, MR-Guided Focused Ultrasound: A New Generation Treatment of Parkinson's Disease, Essential Tremor and Neuropathic Pain. *Interventional Neuroradiology* 2014.

25. Ernst Martin, Clinical neurological HIFU applications: the Zurich experience. *Translational Cancer Research*. 2014 3(5):449-458.

26. Pejman Ghanouni, Transcranial MRI-Guided Focused Ultrasound: A Review of the Technologic and Neurologic Applications. *AJR Am J Roentgenol* 2015 Jul;205(1):150-9.

27. Daniel Coluccia, First noninvasive thermal ablation of a brain tumor with MR-guided focused ultrasound. *Journal of Therapeutic Ultrasound volume 2*, (2014). 10.1186/2050-5736-2-17.

28. Jacquelyn MacDonell, Magnetic resonance–guided interstitial high-intensity focused ultrasound for brain tumor ablation. *Neurosurg Focus*. 2018 Feb;44(2):E11.

29. The Development and Causes of Cancer. *The Cell: A Molecular Approach*

30. Rous P. A transmissible avian neoplasm (sarcoma of the common fowl.). *The Journal of Experimental Medicine*, plates LXVI-LX, June 13, 1910.

31. Spector, D., Varmus H.E., and Bishop J.M. Nucleotide sequences related to the transforming gene of avian sarcoma virus are present in DNA of uninfected vertebrates. *Proc. Natl. Acad.* Sci. USA, 75 (9):4102-4106, 1978

32. Hanahan D., and Weinberg RA. *The hallmarks of cancer. Cell*, 100:57-70, 2000.

33. Hanahan D., and Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation. Cell*, 144(5):646-74, 2011.

34. Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001 Nov;1(2):157-62.

35. Anna Portela & Manel Esteller Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.* 2010 Oct;28(10):1057-68.

36. R D Wood, M Mitchell, J Sgouros, T Lindahl Human DNA repair genes. *Science*. 2001 Feb 16;291(5507):1284-9.

37. Christoph Lahtz, Gerd P Pfeifer. Epigenetic changes of DNA repair genes in cancer. *J Mol Cell Biol.* 2011 Feb;3(1):51-8.

38. Rainer G. Hanselman and Cornelius Welter, Origin of Cancer: An information, Energy, and Matter Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2016, 10.3389.

39. Maman S, Witz IP, A history of exploring cancer in context, *Nat Rev Cancer*. 2018. PMID: 29700396 Review.

40. Burger P et al. In: Kleihues P, Cavenee WK (eds) Tumours of the CNS. *IARC Press*, Lyon, 2000. pp 45–51.

41. Cha S. Update on brain tumour imaging: from anatomy to physiology. *AJNR Am J Neuroradiol*. (2006) 27:475–487

42. Kleihues P, Cavenee W. Tumours of the nervous system; pathology and genetics: world health organization international classification of tumours. *IARC Press*, Lyon (2000).

43. Hottinger AF, Khakoo Y., Neurooncology of Familial Cancer Syndromes, *J Child Neurol*. 2009 Dec;24(12):1526-35. doi: 10.1177

44. Karlyne M. Reilly, Brain Tumor Susceptibility: the Role of Genetic Factors and Uses of Mouse Models to Unravel Risk, *Brain Pathol*. 2009 January ; 19(1): 121–131.

45. Ullrich NJ. Neurocutaneous Syndromes and Brain Tumors. *J Child Neurol*. 2016 Oct;31(12):1399-411.

46. Hottinger AF, et al. Neurooncology of Familial Cancer Syndromes. *J Child Neurol*. 2009 Dec;24(12):1526-35.

47. Durmaz A, Durmaz B, Kadioglu B, Aksoylar S, Karapinar D, Koturoglu G, Orman MN, Ozkinay F, Cogulu O. The Association of minor congenital anomalies and childhood cancer. *Pediatr Blood Cancer*. 2011 Jul 1;56(7):1098-102.

48. NCI's Surveillance, Epidemiology, and End Results program. 2018

49. Age: the biggest cancer risk factor, *Cancer Research* UK, 2018

50. Mary C. White, ScD, Dawn M. Holman, MPH, Jennifer E. Boehm, MPH, Lucy A. Peipins, PhD, Melissa Grossman, MPH, and S. Jane Henley, MSPH Age and Cancer Risk A Potentially Modifiable Relationship. *Am J Prev Med*. 2014 Mar; 46(3 0 1): S7–15.

51. Clarke Brian Blackadar, Historical review of the causes of cancer. *World J Clin. Oncol*. 2016 Feb 10; 7(1):54-86.

52. Connelly JM, et al. Environmental Risk Factors for Brain Tumors. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2007 May;7(3):208-14.

53. Thompson BC. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995;267:1456–1462.

54. Chlebowski RT, Blackburn GL, Thomson CA, et al. Dietary fat reduction and breast cancer outcome: Interim efficacy results from the Women's Intervention Nutrition Study. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98:1767–1776.

55. Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. Moderate alcohol consumption and the risk of breast cancer. *N Engl J Med*. 1987;316:1174–1180.

56. Allen NE, Beral V, Casabonne D, et al. Moderate alcohol intake and cancer incidence in women. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101:296–305.

57. Jeffrey M. Peters and Frank J. Gonzalez. The Evolution of Carcinogenesis. *Toxicol Sci*. 2018 Oct; 165 (2): 272-276.

58. Doll R, Peto R. Cigarette smoking and bronchial carcinoma: Dose and time relationships among regular smokers and lifelong non-smokers. *J Epidemiol Comm Health*. 1978;32:303–313.

59. Robert N. Proctor Tobacco and the global lung cancer epidemic. *Nature Reviews Cancer* volume 1, pages82–86(2001).

60. Gerd P Pfeifer, Mikhail F Denissenko, Magali Olivier, Natalia Tretyakova, Stephen S Hecht & Pierre Hainaut Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers *Oncogene volume* 21, pages7435–7451(2002).

61. P. Vineis, M. Alavanja, P. Buffler, E. Fontham, S. Franceschi, Y. T. Gao, P. C. Gupta, A. Hackshaw, E. Matos, J. Samet Tobacco and Cancer: Recent Epidemiological Evidence JNCI: *Journal of the National Cancer Institute*, Volume 96, Issue 2, 21 January 2004, Pages 99–106.

62. Alcoholic drinks and the risk of cancer. *World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research*. Continuous Update Project Expert Report 2018.

63. P. J. Brooks DNA Damage, DNA Repair, and Alcohol Toxicity—A Review. Alcoholism Clinical and Experimental Research.

64. Reiko Suzuki, Motoki Iwasaki, Manami Inoue, Shizuka Sasazuki, Norie Sawada, Taiki Yamaji, Taichi Shimazu, Shoichiro Tsugane, Alcohol consumption-associated breast cancer incidence and potential effect modifiers: the Japan Public Health Center-based Prospective Study, *International Journal of Cancer*, (2009).10.1002/ijc.25079, 127, 3, (685-695).

65. Joseph J. Vitale, Joanne Coffey Alcohol and Vitamin Metabolism. The Biology of Alcoholism.

66. Bowman SA, Clemens JC, Friday JE, Thoerig RC, and Moshfegh AJ. 2014. Food Patterns Equivalents Database 2011-12: Methodology and User Guide

[Online]. Food Surveys Research Group, *Beltsville Human Nutrition Research Center*, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Beltsville, Maryland.

67. Section on Breastfeeding, American Academy of Pediatrics. AAP Policy Statement: Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics* 2012;129(3):e827-e841.

68. For additional information and technical tables, see: U.S. Department of Agriculture. *Center for Nutrition Policy and Promotion*. USDA Food Patterns.

69. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Office of Surgeon General. How tobacco smoke causes disease: the biology and behavioral basis for smoking-attributable disease: a report of the Surgeon General. Atlanta: *Centers for Disease Control and Prevention* (US); 2010.

70. Sellers TA, Kushi LH, Cerhan JR, et al. Dietary folate intake, alcohol, and risk of breast cancer in a prospective study of postmenopausal women. *Epidemiology*. 2001;12:420–428.

71. Cho E, Smith-Warner SA, Spiegelman D, et al. Dairy foods, calcium, and colorectal cancer: A pooled analysis of 10 cohort studies. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96:1015–1022.

72. Wei MY, Garland CF, Gorham ED, et al. Vitamin D and prevention of colorectal adenoma: A meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17:2958–2969.

73. Robert Hoover, M.D., Laman A. Gray, Sr., M.D., Philip Cole, M.D., and Brian MacMahon, M.D. Menopausal Estrogens and Breast Cancer *N Engl J Med* 1976; 295:401-405.

74. James D. Yager, Ph.D., and Nancy E. Davidson, M.D. Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer *N Engl J Med* 2006; 354:270-282

75. GBD 2016 Brain and Other CNS Cancer Collaborators. Global, regional, and national burden of brain and other CNS cancer, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol*. 2019 Apr;18(4):376-393.

76. Global Initiative for Cancer Registry Development. *International Agency for Research on Cancer*

77. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11

78. Patrick N. Harter, Yannick Braun, Karl H. Plate. Classification of meningiomas-advances and controversies. *Chinese Clinical Oncology*. 2017. 10.21037/cco.2017.05.02.

79. Candece L Gladson, Richard A Prayson, Wei Michael Liu. The pathobiology of glioma tumors. *Annu Rev Pathol*. 2010;5:33-50.

80. Molinaro AM, Taylor JW, Wiencke JK, Wrensch MR. Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma. *Nat Rev Neurol*. 2019 Jul;15(7):405-417.

81. Weistler AM

82. Eckel-Passow JE, et al. Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. N Engl J Med. 2015 Jun 25;372(26):2499-508.

83. Michael Weller, Stefan M Pfister, Wolfgang Wick, Monika E Hegi, Guido Reifenberger, Roger Stupp. Molecular neuro-oncology in clinical practice: a new horizon. *Lancet Oncol*. 2013 Aug;14(9):e370-9.

84. Roel G W Verhaak et al. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010 Jan 19;17(1):98-110.

85. Michele Ceccarelli et al. Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell*. 2016 Jan 28;164(3):550-63.

86. Brat DJ, Aldape K, Colman H, Holland EC, Louis DN, Jenkins RB, Kleinschmidt-DeMasters BK, Perry A, Reifenberger G, Stupp R, von Deimling A, Weller M. cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for "Difuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV". *Acta Neuropathol*. 2018 Nov;136(5):805-810.

87. Louis DN, Giannini C, Capper D, Paulus W, Figarella-Branger D, Lopes MB, Batchelor TT, Cairncross JG, van den Bent M, Wick W, Wesseling P. cIMPACT-NOW update 2: diagnostic clarifcations for difuse midline glioma, H3 K27M-mutant and difuse astrocytoma/anaplastic astrocytoma, IDH-mutant. *Acta Neuropath*ol. 2018 Apr;135(4):639-642.

88. David N Louis, Pieter Wesseling, Werner Paulus, Caterina Giannini, Tracy T Batchelor, J Gregory Cairncross, David Capper, Dominique Figarella-Branger, M Beatriz Lopes, Wolfgang Wick, Martin van den Bent. cIMPACT-NOW update 1: Not Otherwise Specifed (NOS) and Not Elsewhere Classifed (NEC). *Acta Neuropathol*. 2018 Mar;135(3):481-484.

89. D A Lim, A Alvarez-Buylla. Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999 Jun 22;96(13):7526-31.

90. Adan Aguirre, Maria E Rubio, Vittorio Gallo. Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal. *Nature*. 2010 Sep 16;467(7313):323-7.

91. Wang Q, Hu B, Hu X, et al. Tumor evolution of glioma-intrinsic gene expression subtypes associates with immunological changes in the microenvironment. *Cancer Cell*. 2017;32(1):42–56 e46 (35).

92. Jack M Parent, Nicolas von dem Bussche, Daniel H Lowenstein. Prolonged Seizures Recruit Caudal Subventricular Zone Glial Progenitors Into the Injured Hippocampus. *Hippocampus*. 2006;16(3):321-8.

93. Tatyana N Ignatova, Valery G Kukekov, Eric D Laywell, Oleg N Suslov, Frank D Vrionis, Dennis A Steindler. Human Cortical Glial Tumors Contain Neural Stem-Like Cells Expressing Astroglial and Neuronal Markers In Vitro. *Glia*. 2002 Sep;39(3):193-206.

94. An Claes. DiVuse glioma growth: a guerilla war. Acta Neuropathol (2007) 114:443–458.

95. Matthew J. McGirt, M.D., Kaisorn L. Chaichana, B.S., Muraya Gathinji, M.S., Frank J. Attenello, M.S., Khoi Than, M.D., Alessandro Olivi, M.D., Jon D. Weingart, M.D., Henry Brem, M.D., and Alfredo Quiñones-Hinojosa, M.D. Independent association of extent of resection with survival in patients with malignant brain astrocytoma *J Neurosurg* 2010. 10:156–162.

96. Kathleen R. Lamborn. Prognostic factors for survival of patients with glioblastoma: Recursive partitioning analysis. *Neuro Oncol*. 2004.

97. Jeffrey J. Raizer, MD, Karen A. Fitzner, PhD, Daniel I. Jacobs, MPH, Charles L. Bennett, MD, PhD, MPP, Dustin B. Liebling, Thanh Ha Luu, MD, Steven M. Trifilio, RPh, Sean A. Grimm, MD, Matthew J. Fisher, Meraaj S. Haleem, Paul S. Ray, DO, MA, Judith M. McKoy, Rebecca DeBoer, MD, MA, Katrina-Marie E. Tulas, Mohammed Deeb, and June M. McKoy, MD, MPH, JD, MBA Economics of Malignant Gliomas: A Critical Review. *Health Care Delivery*, 2014.

98. Gallay MN, Moser D, Rossi F, Pourtehrani P, Magara AE, Kowalski M, et al. Incisionless transcranial MR-guided focused ultrasound in essential tremor: cerebellothalamic tractotomy. *J Ther Ultrasound*. 2016;4(1):5.

99. Zesiewicz TA, Elble RJ, Louis ED, et al. Evidence-based guideline update: treatment of essential tremor: Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. Neurology. 2011;77:1752–1755.

100. Lipsman N, Schwartz ML, Huang Y, et al. MR-guided focused ultrasound thalamotomy for essential tremor: a proof-of-concept study. *Lancet Neurol*. 2013;12:462–468.

101. Coluccia D, Fandino J, Schwyzer L, O'Gorman R, Remonda L, Anon J, : First noninvasive thermal ablation of a brain tumor with MR-guided focused ultrasound. *J Ther Ultrasound* 2014. 2:17.

102. Quadri SA, et al. , High-intensity focused ultrasound: past, present, and future in neurosurgery, *Neurosurg Focus*. 2018. PMID: 29385923 Review.

103. Zahra Izadifar, Paul Babyn & Dean Chapman, Ultrasound Cavitation/Microbubble Detection and Medical Applications, *Journal of Medical and Biological Engineering* volume 39, pages259–276(2019)

104. Wu F, Wang ZB, Lu P, Xu ZL, Chen WZ, Zhu H, Jin CB, Activated anti-tumor immunity in cancer patients after high intensity focused ultrasound ablation, *Ultrasound Med Biol*. 2004 Sep;30(9):1217-22. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2004.08.003.

105. Adomas Bunevicius et al., Focused Ultrasound Strategies for Brain Therapy, *Operative Neurosurgery*, 2019, 10.1093.

106. K Hynynen et al. , Noninvasive MR Imaging–guided Focal Opening of the Blood-Brain Barrier in Rabbits, *Radiology*, 2001, 10.1148

107. K Hynynen et al. , Local and reversible blood–brain barrier disruption by noninvasive focused ultrasound at frequencies suitable for trans-skull sonications, *Neuroimage*, 2005, 10.1016.

108. K Hynynen et al. , Focal disruption of the blood–brain barrier due to 260-kHz ultrasound bursts: a method for molecular imaging and targeted drug delivery, *J Neurosurgery*, 2006, 10.3171.

109. McDannold N, Vykhodtseva N, Raymond S, Jolesz FA, Hynynen K., MRI-guided targeted blood-brain barrier disruption with focused ultrasound: histological findings in rabbits, *Ultrasound Med Biology*, 2005, 10.1016

110. Takahiro Yamahara, Morphological and flow cytometric analysis of cell infi ltration in glioblastoma: a comparison of autopsy brain and neuroimaging. *Brain Tumor Pathol* (2010) 27:81–87

111. Gizem Oyman, Caner Geyik, Rukiye Ayranci, Metin Ak, Dilek Odaci Demirkol, Suna Timur and Hakan Coskunol. Peptide-modified conducting polymer as a biofunctional surface: monitoring of cell adhesion and proliferation. *RSC Advances Issue* 96, 2014

112. Yasushi Tamada, Yoshito Ikada. Effect of Preadsorbed Proteins on Cell Adhesion to Polymer Surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science Volume* 155, Issue 2, February 1993, Pages 334-339

113. Juergen Groll, Joerg Fiedler, Erika Engelhard, Thomas Ameringer, Stefano Tugulu, Harm-Anton Klok, Rolf E. Brenner, Martin Moeller. A novel star PEG–derived surface coating for specific cell adhesion. *Journal of Bİomedical Materials Research*, 20 jully 2005.

114. Meenakshi Arora. Cell Culture Media: A Review. *Labome The World of Laboratories*, 2017

115. Pítia Flores Ledur. Culture conditions defining glioblastoma cells behavior: what is the impact for novel discoveries? Oncotarget. 2017 Sep 15; 8(40): 69185–69197.

116. S. Fedoroff ve A. Richardson. Protocols for Neural Cell Culture Third Edition. 2001.

117. Camila ML Machado, André Schenka, José Vassallo, Wirla MSC Tamashiro, Estela M Gonçalves, Selma C Genari & Liana Verinaud. Morphological characterization of a human glioma cell line. Cancer Cell International volume 5, Article number: 13 (2005).

118. Michael E. Sughrue, Martin J. Rutkowski, Ari J. Kane, and Andrew T. Parsa. Human glioma demonstrates cell line specific results with ATP-based chemiluminescent cellular proliferation assays. *J Clin Neurosci.* 2010 Dec; 17(12): 1573–1577.

119. H. J. Keselman, James Algina, Rhonda K. Kowalchuk. The analysis of repeated measures designs: A review. *British Journal of Mathematical and Statistical Psychology* 2010.

120. Z Hanusz, J Tarasinska, W Zielinski. Shapiro-Wilk test with known mean. *REVSTAT-Statistical Journal*, 2016

121. M Greiner, D Pfeiffer, RD Smith- Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Preventive veterinary medicine.* 2000.

122. Minardi Joseph, et al. "Bedside ultrasound: advanced technology to improve rural healthcare." *West Virginia Medical Journal*, vol. 109, no. 4, 2013, p. 28+. Accessed 29 Oct. 2020

123. RL Clarke, GR Ter Haar Temperature rise recorded during lesion formation by high-intensity focused ultrasound Ultrasound in medicine & biology, 1997 – *Elsevier*

124. Parker KJ Effects of heat conduction and sample size on ultra-sonic absorption measurements. *J Acoust Soc Am*. 1985; 77: 719-725

125. Foster RB Bhirle R Sangvi NT Fry FJ Donohue JP High-intensity ultrasound in the treatment of prostatic disease.*Eur Urol*. 1993; 23: 29-33.

126. Benjamin J. Challacombe Declan G. Murphy Rhana Zakri Declan J. Cahill High-intensity focused ultrasound for localized prostate cancer: initial experience with a 2-year follow-up *BJUI International* 2009

127. Jagannathan J, Sanghvi NT, Crum LA, Yen CP, Medel R, Dumont AS, et al. High-intensity focused ultrasound surgery of the brain: part 1--A historical perspective with modern applications. *Neurosurgery.* 2009;64(2):201–210.

128. C Chaussy, S Thüroff Results and side effects of high-intensity focused ultrasound in localized prostate cancer *Journal of Endourology*, 2001

129. A Shehata Elhelf, H Albahar, U Shah, A Oto, E Cressman, M Almekkawy High intensity focused ultrasound: The fundamentals, clinical applications and research trends. *Diagn Interv Imaging.* 2018 Jun;99(6):349-359.

130. Canney MS, Chavrier F, Tsysar S, Chapelon JY, Lafon C, Carpentier A: A multi-element interstitial ultrasound applicator for the thermal therapy of brain tumors. *J Acoust Soc* Am 134:1647–1655, 2013

131. Qian Zhang, Yizhe Wangb, Wenzheng Zhou, Ji Zhang, and Xiqi Jian Numerical simulation of high intensity focused ultrasound temperature distribution for transcranial brain therapy AIP Conference Proceedings 1816, 080007 (2017)Pítia Flores Ledur. Culture conditions defining glioblastoma cells behavior: what is the impact for novel discoveries? *Oncotarget*. 2017 Sep 15; 8(40): 69185–69197.

132. Joshua D. Frenster, Shivang Desai & Dimitris G. Placantonakis. In vitro evidence for glioblastoma cell death in temperatures found in the penumbra of laser-ablated tumors. *International Journal of Hyperthermia*, 20 May 2020.