

**T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI**

ANABİLİMDALI BAŞKANI: Prof. Dr. MEHMET YAŞAR KAYNAR

**GLİAL TÜMÖRLERDE
TİYOREDOKSİN REDÜKTAZ DEĞERLERİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. RAHŞAN KEMERDERE

İstanbul-2008

**T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI**

**GLİAL TÜMÖRLERDE
TİYOREDOKSİN REDÜKTAZ DEĞERLERİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. RAHŞAN KEMERDERE

İstanbul-2008

Tez Danışmanı: Prof. Dr. BÜLENT CANBAZ

Asistanlığım boyunca bana yol gösteren değerli hocalarıma, sevgili asistan arkadaşlarıma, yardımlarını esirgemeyen aileme ve arkadaşlarıma, özellikle tezimin hazırlanmasında yardımcı olan Uzm. Dr. Taner Tanrıverdi, Uzm. Dr. Reza Dashti, Uzm. Dr. Hakan Hanımoğlu ve Uzm. Dr. Seda Ateş'e teşekkür ederim.

**Dr. Rahşan Kemerdere
İstanbul, 2008**

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR.....	2
GİRİŞ	3
GENEL BİLGİLER	5
Glial tümörlerin biyolojisi.....	5
Glioblastom Multiforme.....	13
Tiyoredoksin redüktaz- Tiyoredoksin sistemi ve kanser	21
TrxR / Trx sisteminin biyolojik aktiviteleri.....	23
Kanserde Tiyoredoksinin rolü.....	25
Tedavide Hekzosmonofosfat / TrxR / Trx çiftli reaksiyonlarının hedef olarak kullanılması	26
KLİNİK GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
1. Hasta ve kontrol gruplarının seçimi	28
2. Demografik bilgiler.....	28
3. Örneklerin toplanması ve çalışılması.....	31
4. İstatistiksel analiz	33
BULGULAR.....	34
TARTIŞMA.....	44
SONUÇ.....	48
ÖZET (TÜRKÇE).....	49
ÖZET (İNGLİZCE).....	50
KAYNAKLAR.....	51

KISALTMALAR

GBM: glioblastome multiforme

Trx: tiyoredoksin

TrxR: tiyoredoksin redüktaz

NF : nörofibromatozis

SSS: santral sinir sistemi

HDM: hücre dışı matriks

VEBF: vasküler endotel büyüme faktörü

b-FGF: beta-fibroblast büyüme faktörü

PD-ECGF: platelet kökenli endotel hücre büyüme faktörü

HGF/SF: hepatosit büyüme faktörü/dağılma faktörü

EBFR: epidermal büyüme faktörü reseptörü

DBF: dönüştürücü büyüme faktörü

TBF: transforme edici büyüme faktörü

FBF: fibroblast büyüme faktörleri

İBBF: insulin benzeri büyüme faktörleri

SBF: sinir büyüme faktörü

NT: nörotrofik faktör

PKBF: platelet kökenli büyüme faktörü

RTK: tirozin kinaz reseptörü

CBK: siklin bağımlı kinaz

LOH: heterojenite kaybı

FDG: floro 2 deoksi-D-glukoz

PCV: prokarbazin

HMPs: heksosmonofosfat

G6PD: glukoz -6-fosfataz

ASK-1: apoptoz sinyal regüle edici kinaz

HIF: hipoksi indükte edilebilir faktör

HRE: hipoksiye cevap elementleri

mTOR: mammalian target of rapamycin

MG: Moteksafin Gadolinyum

GİRİŞ

Kötü huylu gliomlar, her yıl yeni teşhis edilen habis primer beyin tümörlerinin yaklaşık % 70'ini oluştururlar (1). Glioblastom multiforme (GBM) habis gliomlar içerisinde en sık görülen ve astrositlerden köken aldığı düşünülen hızlı büyüyen bir beyin tümörüdür. Bu tümörün yetişkin kanser ölümlerinin % 2'sinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. GBM, her yaş grubunda görülebilmeye karşın, 65-74 yaşları arasında görülme sıklığı en yüksek seviyeye ulaşmaktadır ve erkeklerde daha sık görülür (2). Oluş sıklığının değişik etnik grup ve coğrafi koşullarda farklılık gösterdiği düşünülmektedir. Hastaların çoğunda bugüne kadar belirli bir risk faktörü tespit edilememiştir. Her ne kadar bu tümörler “Li-Fraumeni” veya “Nörofibromatoz” gibi genetik hastalıklar ile veya belirsiz ailesel birikim hastalıkları (non-spesifik familial agregasyonlar) ile ilişkilendirilmiş ise de, bu vakalar çok küçük bir hasta grubunu oluşturmaktadır (3). Alerji, astım veya otoimmün hastalıklar GBM'ye karşı bir şekilde koruyucu olabilmektedir (4). Nitratlar, sentetik kauçuk, petrokimyasallar, polivinil klorid ve formaldehit gibi birçok çevresel faktör GBM gelişimi ile zayıf bir şekilde ilişkilendirilmiştir. Bununla beraber, glioblastom gelişiminde kanıtlanmış tek risk faktörü iyonizan radyasyondur (5). Ancak, hastaların sadece küçük bir bölümünde iyonizan radyasyona maruz kalma hikayesi mevcuttur (6).

Kanser gelişimi için, klasik olarak altı temel değişikliğin gerekli olduğu savunulmaktadır (7): 1) Büyüme sinyallerinin aşırı çoğalma için yeterliliği, 2) Büyüme engelleyici sinyallere duyarsızlık, 3) Programlı hücre ölümünden (apoptoz) kaçma, 4) Sınırsız çoğalma potansiyeli ve 5) Solid tümörler için, angiogenezin ve 6) Doku istilasının (invazyon) devamlılığı. Kanser gelişiminde önemli bir rolü olduğu son zamanlarda ortaya atılan tiyoredoksin sisteminin de bu değişikliklerden bir kısmı

üzerinde etkili olduğu ileri sürülmüştür. Teorik olarak, tiyoredoksin sistemi, kanser hücrelerinde normalden fazla salınarak fonksiyonlarındaki artma nedeniyle, ribonükleotid redüktaz enzim sistemlerine elektron vericiliği yapar ve mutajenik, dengesiz deonükleotid protein yapılarının artmasına neden olur. Bu biyolojik döngünün, belirgin genetik değişimlere yol açarak doku büyüme kontrolünün tamamen kaybı ve tedaviye direnç gelişim ile sonuçlandığı düşünülmektedir (8). Tüm bu reaksiyonlar sonucunda habis fenotip gelişimi hızlanabilir. Tiyoredoksin (Trx) ve tiyoredoksin redüktaz (TrxR), büyümenin kolaylaştırılması, apoptoz ve hücre korunması gibi birçok hücre içi olayda görev alan redoks aktif proteinleridir (9). Trx / TrxR sistemi, birçok önemli fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyon ile ilişkilendirilmiştir ve kanser tedavisinde önemli bir hedef olmuştur. Trx salınımı, muhtemelen protein yapı ve fonksiyonundaki değişikliklere bağlı olarak, akciğer, kolorektal, servikal, hepatik ve pankreas kanseri gibi birçok insan kanser türünde artmış olarak bulunmuştur (10, 11, 12, 13). TrxR aktivitesi ve tümör büyümesi arasındaki ilişki ise çok net değildir. Çok az klinik çalışmada, TrxR inhibitörleri kullanılarak bu sistemin beyin tümörleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır (14, 15, 16). Trx / TrxR sisteminin glioblastomlardaki düzeyini belirten bir çalışma ise henüz yayınlanmamıştır.

Bu prospektif klinik çalışmada, histopatolojik olarak GBM tanısı konmuş tümör dokularında ve aynı hastalardan ameliyat öncesi elde edilen serum örneklerinde TrxR aktivitelerinin ölçülmesi amaçlanmıştır. Bu ve bu gibi çalışmaların sonuçları, GBM tedavisinde yeni boyutlara yol açabilecek ve yeni geliştirilecek anti-moleküler ajanlar belki de bu tümörün kontrol altına alınmasını sağlayabilecektir.

GENEL BİLGİLER

1. GLİAL TÜMÖRLERİN BİYOLOJİSİ

Son dört dekadda özellikle moleküler biyolojinin insan genomu üzerindeki çalışmaları sayesinde, beyin tümörlerinin temel biyolojisi daha iyi kavranabilmiştir. Deoksiribonükleik asit (DNA) yapısı düşünüldüğünde, 1953'de Watson ve Crick'in tanımlaması devrim niteliğini taşımaktadır. Genetik kod 1953 yılında protein düzeyinde çözülmeye çalışılıyorken, 1968 yılında büyük DNA moleküllerini daha küçük alt birimlere bölen restriksiyon endonükleazlar tanımlanmıştır. Gen transfer teknikleri 1973 yılında sahaya sokulmuş ve zamanımıza kadar oldukça gelişmiştir. Bugün retroviral, adenoviral ve adenovirus ile ilişkili vektörler aracılığıyla gen transferi yapılabilmektedir. DNA yapısının tanımlanmasından ancak 30 yıl sonra polimeraz zincir reaksiyonu tekniği tanımlanabilmiş ve küçük miktardaki DNA alt gruplarının çoğaltılabilmesi sağlanmıştır. Günümüzde moleküler düzeyde uygulanan tümör tedavilerinin çoğunun temelini oluşturan "tümör baskılayıcı gen ailesi" 1986 yılında tanımlanmıştır. Beyin tümörlerinde önemli tümör baskılayıcı genlere örnek olarak P53, P16, nörofibromatosis tip 1(NF1) ve nörofibromatosis tip 2(NF2) sayılabilir (17). Günümüzde, genetik sendromlara ve tümörlere yönelik gen tedavisi protokolleri birçok hastaya uygulanmaktadır ve başarı oranı arttıkça bu tedavi protokollerinin yaygınlaşacağı bildirilmektedir. Tümör genetiği ve biyolojisi daha fazla anlaşılabilirse ileride daha etkili tedavi stratejileri uygulanabilecektir.

A. İstila (İnvazyon)

Son dekadda, beyin tümörlerinin yakın doku istilasını değişik beyin tümör tiplerinde moleküler düzeyde çalışılmış ve santral sinir sistemi (SSS) tümörlerinin istila mekanizmalarını hedef alan farmakolojik tedavi stratejileri ortaya konulmuştur (18,

19). Eğer tümör hücrelerinin istila etme özelliği durdurulabilir ise habis beyin tümörlerinin tedavisinde çok önemli bir aşama kaydedilmiş olacaktır.

Beyin tümörü istilasını özellikle astrositik tümörlerde önem kazanmaktadır. Bu tümörlerin en malin (kötü huylu) olanı GBM, ortası nekrotik, etrafı ise yanındaki normal parankime infiltre olan, canlı tümör hücreleri ile karakterizedir. Steriotaksi ile tümör sınırının 2 cm uzağından alınan örneklerde bile tümör hücreleri gösterilmiştir(17). Her ne kadar GBM'lerde lokal, özellikle eksizyon kavitesinin etrafında nüks, kural denecek kadar sık gözlenirse de bu tümörlerin SSS dışına yayılımı olmamaktadır. Bu astrositik tümörler özellikle miyelinli aksonları, lokal damarları ve bazal beyin zarlarını takip ederler(20). Miyelinli aksonlara olan yatkınlıkları bu tümörlerin korpus kallozum, optik radyasyon, veya anterior komisürden yayılmasını açıklar niteliktedir.

Genel olarak, tümör hücrelerinin normal beyin parankimine istilasını kompleks bir biyolojik olaydır ve aşağıdaki adımları içerir;

- a. Hücre zarındaki özel hücre yüzey molekülleri ile hücre dışı matrikse (HDM) bağlanma,
- b. Tümör hücreleri tarafından uygun HDM üretilmesi ve bunların birikmesi,
- c. Tümör hücrelerinin HDM'yi ve HDM'nin hücre yüzey reseptörleri ve mikroskelet ile olan bağları koparabilecek proteazları üretmesi ve salıvermesi,
- d. Tümör hücrelerinin serebral HDM'ye aktif translokasyonu (21).

B. Anjiyogenez:

Tümörün 2-3 mm³ ötesine büyüebilmesi için besin ve oksijen sağlayacak ve katabolitleri uzaklaştıracak mikrodamar ağına ihtiyacı vardır. Bu, ancak sürekli yeni kan damarlarının gelişmesi ile olabilmektedir. Tümör oluşumu üzerine yapılan çalışmalar göstermiştir ki, anjiyogenetik işlem tümörün başlangıcından itibaren

süregelir. Son yıllarda anjiyogenetik molekül ve anti-anjiyogenetik ajanlar üzerine yapılan çalışmalar, geleceğin anti-tümör tedavisinin yapıtaşlarından birisi olacağına dair işaretler vermektedir (22). Anjiyogenez mekanizması oldukça karmaşıktır. Özetle, damarın bazal zarı (membranı) lokal olarak parçalanır ve şekil değiştirerek etraf stromaya uzanır. Ardından, HDM'nin parçalanması önemli rol oynar. Vasküler hücre göçü (migrasyonu) gerçekleşir ve hücre göçünü endotel hücre çoğalması izler. Sonuçta bir göç kolonu oluşturulur. Bu aşamadan sonra değişim başlar, hücreler farklılaşır, birbirine sıkıca bağlanır ve yeni kapiller lümen oluştururlar ve kan dolaşımı başlar. Bu arada mezenkimal kökenli perisitler ve düz kas hücreleri gelişir (23).

Beyin tümörlerinde özellikle GBM'lerde gösterilmiş anjiyogenetik moleküllerin bazıları şöyle sıralanabilir: vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), Angiopoitein 1 ve angiopoitein 2, beta-fibroblast büyüme faktörü (*b*-FGF), platelet kökenli endotel hücre büyüme faktörü (PD-ECGF), endotelin-1, ve hepatosit büyüme faktörü/dağılma faktörü (HGF/SF) (24, 25, 26, 27, 28).

C. Çoğalma

Genel olarak hücre bölünmesi (çoğalma) ile programlı hücre ölümü (apoptoz) arasındaki denge, tümör gelişimini belirler. Henüz tam anlaşılmamış olmalarına karşın, çoğalma ve apoptoz arasındaki denge, aynı çoğalma kapasitesine sahip iki ayrı tümörün neden gerçek gelişim hızlarının farklı olduklarını açıklayabilir gibi görülmektedir. Muhtemelen oligodendrogliomlar ile astrositomlar arasındaki farklılığın nedeni çoğalma kapasitesinden ziyade, bu dengenin farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla, tanı açısından tümörün nasıl çoğaldığı değil, çoğalma özelliğinin olması gerçeği önem taşımaktadır. Hücre, ölüm hızlarından bağımsız olarak düşünüldüğünde, genelde çoğalma hızları yüksek olan tümörler

daha hızlı tümör gelişim hızlarına sahiptirler. Sonuçta apoptotik hız, benzer tümörlerde genellikle prognostik çoğalma sınırlarını etkilemekte gibi gözükmektedir. Genel olarak, histopatolojide çoğalma kapasitesini değerlendirmek için bölünme (mitotik) aktivitesinin değerlendirilmesi en uygun yöntem olarak kabul edilmektedir. Nöropatolojide ise çoğalmanın, özellikle astrositomların değerlendirilmesindeki dereceyi belirleyen en önemli bileşen olduğu belirtilmektedir. Prognoz ile bu denli yakın ilişkisi nedeni ile, çoğalma belirteçleri nöropatofizyolojik çalışmalar için özel bir ilgi alanı haline gelmiş ve bir seri proliferasyon belirteci tanımlanmıştır (17): Doğrudan bölünme aktivitesi (Direk mitotik aktivite), ³H-Thymidine, Bromodeoxyuridine, Ki-67 / MIB-1, çoğalan hücre çekirdeği antijeni/ siklin, DNA polimeraz, sitrometrik hücre siklusu analizi, Histon-3 in situ hibridizasyon, nükleolar organize edilen hücrelerin gümüş boyaması gibi. İyi bir çoğalma belirteci; doğru, tekrar edilebilir ve kolay kullanılabilir olmalıdır. Bu açıdan bakıldığında, bölünme aktivitesi ve Ki-67 / MIB-1 oldukça uygundur ve yaygın olarak kullanıma girmişlerdir.

D. Büyüme faktörleri

Astrositlerde habis gelişim, hücre büyüme kontrolünün bozulması ile sonuçlanan çok basamaklı bir süreç olarak bilinmektedir. İnsan astrositomları, kromozom 9, 10, 17 üzerindeki lokusların kaybı ya da yapısal değişikliklerini içeren çeşitli sitogenetik anormallikler gösterirler. Astrositik tümörlerin habis dönüşümü ve polipeptid büyüme faktörlerinin salınımı arasında sıkı bir ilişkinin olduğu gösterilmiştir (29, 30, 31).

Büyüme faktörleri, büyüme, gelişme ve bir organizmanın devamı gibi olaylar üzerinde önemli rolleri olan çok fonksiyonlu protein ailesinden oluşurlar. Habis fenotipin oluşumunda, hücre çoğalması, hücre yaşamının devam ettirilmesi, hücre göçü, hücre istilası, angiogenez ve immün sistemden kaçma yeteneği kazandırmak gibi kolaylıklar sağlarlar. Beyin tümör hücrelerinde, potansiyel otokrin döngülerin varlığını akla getiren, büyüme faktörlerinin aynı kökten gelen kendi reseptörü ile beraber

salındığının açık kanıtları vardır. Bu duruma göre, habis beyin tümör hücresi, aynı hücre üzerindeki uygun reseptöre bağlanıp, onu aktif hale getirerek kendi çoğalmasını uyaran büyüme faktörleri üretir. Habis tümör hücreleri tarafından üretilen başka bir büyüme faktörü alt grubu ise eş zamanlı uygun reseptör salınımı olmadan işlev görürler. Bu faktörlerin yeni damar oluşumunu artıran ya da immün cevabı etkileyen önemli parakrin fonksiyonları vardır. Üçüncü bir mekanizma ise, tümör hücrelerinin kendi üretmedikleri büyüme faktörleri için reseptör oluşturmalarıdır. Tümör hücresinin endotelial hücre ile bağlanmasının sonucu olarak, tümör içerisindeki aktif hale gelmiş endotelial hücreler, tümör çoğalmasını artıran ilave büyüme faktörleri oluşturabilir.

- Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EBFR veya EGFR), Dönüştürücü büyüme faktörü-alfa [(DBF- α)-Transforming büyüme faktörü- α (TGF- α): erbB reseptörleri, mesela erbB1 ve, erbB2 [HER2, Neu], erbB3, erbB4 gibi. Bu faktörler özel ligandlara bağlanarak sinyal iletimini düzenleyen hücre zarları arası reseptör proto-onkogenlerinin prototipleridir. Endotel büyüme faktörü (EBF) ve DBF- α , EBFR'ye aynı duyarlılık ile bağlanırlar. DBF- α , habis gliomlarda sıklıkla salınırlar ve tirozin kinaz aktivitesini uyarırlar. Normal şartlarda, EBFR ve ligandları normal hücre büyümesi ve bölünmesi için sinyal üretirler. Bu genlerin tümöral sürümleri farklı ve bazen sürekli aktif olan reseptörleri kodlarlar ve düzensiz çoğalmaya neden olurlar. GBM'lerde EBFR gen değişikliği, hızlı büyüme gösteren gliomların yaklaşık % 50'sinde görülmektedir (32, 33). En sık görülen doğal EBFR mutasyonu, hücre dışı ligand bağlama alanının (ekson 2-7) silinmesini içerir (33). GBM'nin öngörülen kaynağına, görülme yaşına ve ilgili genetik farklılaşmalara göre alt gruplara ayrılabilmesine dair öneriler vardır. EBFR içeren GBM'nin genelde daha yaşlı insanlarda bulunduğu, p53'ün vahşi tip salınımı ile ilişkili olduğu, p16 tümör

baskılayıcı fonksiyonunun kaybı ile birlikte görüldüğü ve belki de daha saldırgan klinik gidişatının olduğu gözlenmiştir (34). p53 mutasyonu ya da silinmesi ile ilişkili GBM'ler daha genç insanlarda görülür ve daha düşük dereceli tümörlerin ileri bir evreye geçmesinden (progresif ya da sekonder) oluştuğu düşünülmektedir.

- Fibroblast büyüme faktörleri (FBF): Bir çok hücre tipini indüklemeye, inhibisyon ve hücre farklılaşmasını sağlama gibi etkileri vardır. FBF-1 ve FBF-2 salınımı habis astrositomlarda normal beyin parankimine göre artmıştır (35, 36). Astrositomlardaki FBF salınımının, çoğalmayı ve istilayı artırdığına dair kanıtlar vardır. FBF-2 ve FBF-9 tedavisinin sırasıyla ürokinaz plazminojen aktivatör protein ve matriks metaloproteinazların salınımlarını uyardığı gösterilmiştir (37, 38). Bu yolla malin gliom hücreleri beyin doku istilası sırasında stromal yapıların proteolizini indüklerler. FBF-2 aynı zamanda vasküler endotelial büyüme faktörünün salınımını artırır. (25). FBF-2'ye karşı oluşturulan nötralizan antikorların glioblastom hücrelerinde hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir ve bu da FBF-2'nin malin beyin tümör hücrelerinin yaşaması için gerekli olduğunu ortaya koymaktadır. Bununla beraber, FBF'lerin anormal hücre büyümesini ancak diğer genetik değişiklikler zemininde arttırdığı unutulmamalıdır.
- İnsülin benzeri büyüme faktörleri: İnsülin benzeri büyüme faktörleri (İBBF), örneğin İBBF-1 ve İBBF-2 ve reseptörlerinin SSS gelişimi ve olgunlaşmasında görev aldığı gösterilmiştir (39). Fuller ve Bigner, normalde fetal hücrelerde salınan ancak erişkin hücrelerde görülmeyen İBBF bağlayıcı protein-2'nin GBM'lerde sürekli olarak fazla salınım gösterdiğini bildirmiştir (32).

- Nörotrofik faktörler ve reseptörleri: Nörotrofik faktörler ya da nörotrofinler, prototipik nörotrofik faktör, sinir büyüme faktörü (SBF), nörotrofik faktör-3 (NT-3), nörotrofik faktör-4/5 ve glial hücre serisi kökenli nörotrofik faktöründen (GKNF) oluşur. Bu peptid moleküller etkilerini tirozin kinaz reseptörleri üzerinden gösterirler (40).
- Platelet kökenli büyüme faktörü (PKBF): Bir polipeptid mitojen olan PKBF diğer normal ve değişime uğramış hücrelerden de salınır. (41). PKBF reseptörlerinin intrinsik kinaz aktiviteleri vardır. PKBF özellikle fibroblast, osteoblast, vasküler düz kas hücreleri ve glia gibi konektif doku hücreleri üzerindeki mitojenik etkileri ile karakterizedir (42). PKBF glia hücrelerinin gelişiminde önemli rol oynar; SSS nöronları üzerinde nörotrofik etkileri olduğu gösterilmiştir (43). Birçok çalışma, PKBF ve reseptörlerinin beraber salınımlarının normal beyin dokusunda görülmezken astrositik tümörlerde görüldüğünü, bununla glial tümörlerin gelişmesinde parakrin ya da otokrin tipte bir yol olduğunu göstermektedir (44). Astrositik kökenli tümörlerde ve özellikle yüksek dereceli olanlarda PKBF reseptör salınımlarının olduğu gösterilmiştir. İn situ hibridizasyonla oluşturulan birçok GBM'ler PKBF- α reseptörünü fazla miktarda ortama verirken, tümör içerisindeki kapiller endotelinde fazla oranlarda PKBF- β reseptörü içerdiği gösterilmiştir. Buna göre, PKBF- α reseptörü tümör hücre çoğalmasında ön planda iken, PKBF- β reseptörü tümör anjiyogenezinde önemli rol oynar (45).
- Transforme edici büyüme faktörü- β (TBF- β): TBF- β yapısal ve fonksiyonel olarak birbiriyle ilişkili 3 polipeptidden oluşur (TBF- β 1, TBF- β 2 ve TBF- β 3) ve her biri ayrı genler tarafından kodlanır. Hücre çoğalmasını, farklılaşma, embriyogenez ve immün fonksiyonlarını etkilerler. Son yıllarda yapılan ve

gliom hücre serilerini içeren çalışmalarda artmış TBF- β 1 salınımının programlı hücre ölümüne olan yatkınlığı artırdığı gösterilmiştir (46). TBF- β , aynı zamanda B ve T lenfositlerinin aktivasyonunu engelleyerek astrositomların büyümesine katkıda bulunurlar (47).

- Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEBF): Vasküler geçirgenlik faktörü olarak da bilinir. Endotel hücrelerine özelleşmiş bir mitojendir. Hipoksi ile salınımı artar. Neovasküler cevabı uyarak özellikle tümör devamlılığında ve ilerlemesinde rol alır. İn situ hibridizasyon ile yapılan çalışmalarda, GBM'deki tümör hücrelerinden nekrotik odağa daha yakın olanlarda VEBF yapımının daha fazla olduğu gösterilmiştir (48). VEBF salınımı, gliomun histolojik derecesi ile paralellik gösterir. VEBF-mRNA kopyalarının, GBM'de düşük dereceli astrositomlara göre 50 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (49). VEBF aynı zamanda anjiyogenez yoluyla tümör gelişimi ve büyümesine katkıda bulunur.

2. GLİOBLASTOM MULTİFORME

GBM en sık görülen primer beyin tümörüdür ve başlıca astrositik farklılaşma gösteren en malin neoplazmdır. Histopatolojik özellikleri arasında nükleer atipi, hücresel pleomorfizm, mitotik aktivite, vasküler tromboz, mikrovasküler proliferasyon ve nekroz yer alır. Tipik olarak erişkinlerde görülür ve özellikle serebral hemisferlerde yer alır. Çoğu GBM hızlı bir şekilde de novo olarak ortaya çıkar (primer glioblastom). Sekonder GBM'ler ise, yavaş olarak difüz astrositom (WHO Grade II) ya da anaplastik astrositomlardan (WHO Grade III) gelişirler (50). GBM, WHO Grade IV dereceli bir tümördür. Bu tümörün yetişkin kanser ölümlerinin % 2'sinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Tüm intrakraniyal tümörlerin % 12-15'ini ve astrositik tümörlerin % 60-75'ini oluştururlar (51). Her yaşta görülebilmeye karşın 45-75 yaşları arasında görülme oranları en yüksek seviyeye çıkar. Erkeklerde daha sık görülür. Görülme sıklığının etnik grup ve coğrafi koşullarda farklılık gösterdiği düşünülmektedir (52). Aynı zamanda son zamanlarda daha sık GBM tanısı konulduğuna yönelik yaygın bir görüş mevcuttur. Kuşkusuz bunun en önemli nedeni bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRG) gibi görüntüleme yöntemlerinin geliştirilmiş olmasıdır. Bunun yanında insanın beklenen ömrünün uzamasının ve değişen çevre faktörlerinin de etkili olduğu düşünülmektedir. GBM genelde serebral hemisferlerin subkortikal beyaz cevherinde görülür. Tümör istilası komşu kortekse ve korpus kallozum yoluyla diğer hemisfere yayılır. Beyin sapı glioblastomu nadir görülür ve genellikle çocukları etkiler (53). Serebellum ve omurilikte nadir görülürler.

Hastalığın klinik hikayesi, tümör daha düşük dereceli bir astrositomdan gelişmemişse (sekonder glioblastom) genelde 3 aydan daha kısadır. Artmış kafa içi basıncı bulguları ve semptomları görülür (1).

Çoğu GBM hastasında herhangi büyük bir risk faktörü tespit edilememektedir. Her ne kadar bu tümörler “Li-Fraumeni” veya “Nörofibromatoz” gibi genetik hastalıklar ile veya belirsiz ailesel birikim hastalıkları (non-spesifik familial agregasyonlar) ile ilişkilendirilmiş ise de, bu vakalar çok küçük bir hasta grubunu oluşturmaktadır (3). Alerji, astım, veya otoimmün hastalıklar bir şekilde koruyucu olabilmektedir (54). Nitratlar, sentetik kauçuk, petrokimyasallar, polivinil klorid ve formaldehit gibi birçok çevresel faktör GBM gelişimiyle zayıf bir şekilde ilişkilendirilmiştir. İyonizan radyasyon kanıtlanan tek risk faktörü olmasına rağmen, hastaların küçük bir bölümü buna maruz kalmıştır. Elektromanyetik dalgalar (mobil telefonlar veya yüksek akım hatları) ile şu ana kadar bir ilişki kurulamamıştır (55).

A. Moleküler Patogenez

GBM'lerde moleküler bozukluk iki büyük kategoriye ayrılabilir: Birincisi proto-onkojenlerin fazla salınımı ve ikincisi tümör baskılayıcı genlerin az salınımı. GBM'lerde fazla aktif onkojenler genellikle tirozin kinaz reseptörü (RTK)-ras-AKT mekanizmasına aittir. Bunlar arasında EBFR, PKBF, PKBFR ve ras sayılabilir. GBM'lerde kaybedilen çoğu tümör baskılayıcı geni, hücre siklusu regülasyonunda rol almaktadır. Bunlara örnek olarak, p16, p14, p53, Rb, siklin D, siklin E, siklin-bağımlı kinaz 4/6 (CBK); verilebilir. Bazı tümör baskılayıcı genleri normalde RTK-Akt yolunu inhibe ederler.

GBM'ler klinik ve moleküler faktörler göz önüne alındığında primer ve sekonder olmak üzere ikiye ayrılırlar (56, 57). Primer GBM'ler direk olarak daha önceden düşük dereceli astrositom olmadan oluşurlar ve artmış EBFR ve MDM2 aktivitesi ve azalmış fosfataz ve tensin homologu (phosphatase and tensin homolog-PTEN) ve P16 aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir. Buna karşılık sekonder olanlarda, önce düşük dereceli astrositom oluşur ve takiben GBM oluşur. Bunlar genellikle daha genç yaşlarda görülürler. Öncelikle p53 kaybı, PKBF artışı ve tümörün ilerlemesi

sırasında Rb ve CDK4/6 kaybı ile ilişkilendirilmiştir. Bunlara ek olarak hem primer hem sekonder GBM'lerde anjiyogenez artırıcı, hücre ölümünü önleyici ve bağışıklık sisteminden kaçmaya yönelik mekanizmalar gelişmiştir.

B.Patoloji

GBM'ler çoğunlukla ilkel astrositlere benzeyen hücrelerden oluşmuş yaygın intraaksiyel beyin tümörleridir. Tümör sınırı gözle görülür bir şekilde belirgin değildir ve erken ve geç dönemde kırmızı ve kahverengi kanama odakları görülebilir. Santral nekroz toplam tümör kitlesinin % 80'ini oluşturabilir (1).

Glioblastomlar komşu beyin dokulara hızlı yayılımı ile bilinirler. En sık görülen özelliği tümörün diğer hemisfere korpus kallosum yoluyla yayılarak, bilateral simetrik lezyon (kelebek gliomu) görünümü oluşturmaktır. Yine internal kapsül, forniks, anterior kommisür ve optik radyasyon içerisinde hızlı yayılım görülebilir. Glioblastom istilasının önemli bir özelliği de, tümör hücreleri tarafından tümör hücrenin göçünü artırıcı hücre dışı matriks salınımıdır (58).

Primer ve Sekonder Glioblastom

Glioblastomların büyük bir kısmı (> %90) kısa bir klinik süreç sonrası (< 3 ay), öncesinde daha az habis bir tümör varlığının klinik ya da histopatolojik kanıtı olmaksızın hızlı bir şekilde gelişirler (Primer ya da de novo Glioblastoma). Bu tip, genelde daha yaşlı hastalarda görülür (50). Glioblastom aynı zamanda diffüz astrositom (WHO grade II) ya da anaplastik astrositomun (WHO grade III) ilerlemesi sonucunda oluşabilir ve bu tip, sekonder glioblastom olarak adlandırılır. Tüm glioblastomların < %10'ını oluştururlar ve daha genç insanlarda görülürler (59). Bu tip tümörü olan hastaların yaşam süresi belirgin olarak daha uzundur. Primer ve sekonder glioblastomlar farklı genetik yollarla oluşurlar ve tedaviye cevapları da farklılık gösterir ancak her ikisinde de kromozom 10q'da yüksek oranda heterojenite kaybı (LOH) görülür.

Histopatoloji

Glioblastom, az diferansiye, pleomorfik, belirgin nükleer atipi ve canlı mitotik aktiviteye sahip astrositik tümör hücrelerinden oluşan anaplastik, hücrel bir gliomdur. Belirgin mikrovasküler çoğalma ve/veya nekroz önemli tanı kriterlerindendir. Glioblastomlar bölgesel farklılıklar gösterdikleri için doku örneklerinin az olması durumunda histopatolojik tanı güçleşebilir. Doku örneklerinde, tümör merkezinde büyük nekrotik alanlar, periferde ise canlı tümör hücreleri kümelenmiştir. Çevresel hücre çoğalması ve anormal damarlanma radyolojik olarak görülen kontrast-halkasından sorumludur. Glioblastom hücreleri SSS'deki sınır bölgelere ulaştığı zaman, ana odaktan uzağa göç etme kapasiteleri iyice belirgin hale gelir. Tümör hücreleri korteksin subpial bölgesinde, subependimal bölgede, nöronların etrafında (satelloz) ve damarların etrafında sıralanıp, depolanırlar. Bu oluşumlar “sekonder yapılar” olarak adlandırılır ve gliom hücrelerinin ev sahibi beyin yapıları ile ilişkisinden kaynaklanır. Yüksek oranda tanı koydurucudur.

C.Tanı

GBM'in belirti ve bulguları diğer yer kaplayıcı lezyonlarla genelde benzerdir ve artmış kafa içi basıncı bulguları (bulantı, kusma, başarı, çift görme veya görme netliğinde azalma, sersemlik hali) yaygındır. Bunlara papilödem, ekstraoküler palsi, pupil anormallikleri veya bilinç durumunda bozulma eşlik edebilir. Genellikle bulgu ve belirtiler sabahları daha belirgindir ve gün içinde hafiflerler. Epileptik nöbet, vakaların yaklaşık üçte birinde görülür (1). Tümörün yerine göre nörolojik bozukluklar olabilir. Bununla beraber bazı hastalarda nörolojik bozukluk ancak tanı konulduktan sonra ortaya çıkabilmektedir. GBM'lerde laboratuvar tetkikleri tanıya yardımcı olmaz. Tanı görüntüleme teknikleri ile konulur.

D.Görüntüleme Teknikleri

Çoğu nöro-onkolojik tümörlerde olduğu gibi GBM'lerde de BT ve MRG teknikleri, tanının yapıtaşlarını oluşturmaktadır. Kontrastsız BT'de GBM'ler genellikle hipodens görülürler. Kontrast verildiğinde kontrast tutan düzensiz halka şeklini alırlar, nekrotik olan bölge hipodens olarak gözlenir ve etrafı ise ödemli olduğundan yine hipodens olarak görülür (60). Kontrastlanma genellikle tümörün yüksek dereceliliği ile doğru orantılıdır, ancak bu durum kural değildir. Günümüzde MRG, GBM tanısında, cerrahinin ve radyoterapinin planlamasında büyük ölçüde BT'nin yerini almıştır. Gerek yumuşak doku anatomisini daha iyi göstermesi gerekse çok yönlü görüntü sağlaması MRG'ye bu konuda büyük üstünlük sağlamaktadır. Kontrastsız T1 kesitlerde hipointens, kontrastsız T2 ve FLAIR (Fluid Attenuation Inversion Recovery) kesitlerde ise hiperintens görüntü verir. Kontrastlanma ise BT'de olduğu gibidir. Bununla beraber unutulmamalıdır ki hiçbir görüntü tümörün gerçek sınırlarını tam anlamı ile göstermemektedir. Kontrastlanmanın dışında ve hatta tümörün etrafındaki ödemin dışında bile tümör hücrelerinin olabileceği unutulmamalıdır. Her ne kadar MRG ilk tanı için yeterli ise de gerek cerrahi gerekse radyoterapi sonrasında uygulanan takipler için yeterli olmayabilir. Cerrahinin kendisi doğası nedeni ile bir travma olduğundan, oluşturduğu inflamasyon, 48 saat sonrasında 4 haftaya kadar kontrastlanma göstermektedir. Benzer biçimde radyoterapi sonrasında radyoterapiye sekonder hasar ve nekroz kontrastlanma gösterebilir. Son olarak, kullanılan steroid altta yatan tümörü değiştirmeden kontrast tutulumunu azaltabilir. Bu açıdan değerlendirildiğinde biyolojik görüntüleme çalışmaları GBM tedavi ve takibinde giderek önem kazanmaktadır. 2-[¹⁸F] fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) and pozitron emisyon tomography (PET) (FDG-PET) biyolojik olarak aktif tümörü (nüks?) inaktif nekrozdan ayırtedebilir (61). Bununla beraber ulaşım zorluğu ve radyoizotop gerekliliği dezavantajdır. Buna karşın Proton Manyetik Rezonans Spektroskopisi

(MRS) normal ve anormal doku metabolitlerini ayırt edebilir. Yaygın olarak kolin, kreatin, N-asetil aspartat, laktat ve lipid metabolit pikleri kullanılır (62). Aktif tümör genellikle normal dokudan daha fazla kolin ve daha az N-asetil-aspartat aktivitesi gösterir. Nekrotik dokuda lipid haricindeki metabolitlerin hepsinin genel olarak aktivitesi düşmüştür. Benzer olarak MR perfüzyon çalışmaları, aktif ve ileri evreli bir tümördeki artmış kan hacmini ve nekrotik dokudaki azalmış kan hacmini gösterir. Diğer görüntüleme teknikleri GBM'lerde çok fazla önem taşımazlar, vakalara özel durumlarda kullanılabilirler.

E. Tedavi:

GBM hastalarının genellikle ilk tedavileri semptomatiktir. Çünkü henüz tanı patolojik olarak ortaya konmamıştır. Cerrahi hazırlık döneminde semptomlara yönelik tedavinin başında steroidler “deksametazon” gelir. Steroidler vazojenik ödemi azaltarak semptomları geriletir ve cerrahiyi daha güvenli hale getirir. Anti-epileptik tedavi supratentoriyal tümörlerde peri-operatuvar nöbetleri engellemek veya azaltmak için başlanmalıdır. Bununla beraber Amerikan Nöroloji Akademisinin yayınladığı bir kılavuzda, nöbet geçirmemiş beyin tümörü olan hastalarda profilaktik antiepileptik ilaç kullanımı önerilmemektedir (63). Asetaminofen gibi kodein içermeyen hafif analjezikler baş ağrısının kontrolünde kullanılabilir.

Cerrahi, GBM tedavisinde anahtar rol oynamaktadır. Endikasyonlarını; histopatolojik tanı sağlamak, aktif tümör hücrelerini mümkün olduğu kadar azaltmak, kitle etkisini azaltmak ve beyin omurilik sıvı (BOS) akımını yönlendirmek olarak sıralayabiliriz (64). Cerrahi prosedür seçenekleri: Stereotaksik biyopsi, açık biyopsi, kitle etkisini azaltma ve tamama yakın rezeksiyon olarak sıralanabilir. Bir çok çalışma göstermiştir ki tamama yakın rezeksiyon iyi prognoz ile ilişkilendirilmiştir (65, 66). Her ne kadar bu çalışmalar çoğunlukla retrospektif ise de birçok otorite nörolojik bozukluk beklenmeyen ulaşılabilir tümörlerin tamamına yakınının çıkarılması gerektiği

konusunda hemfikirdirler. Cerrahi tekniklerin son zamanlarda gelişmesi ile (örneğin, mikroskopik cerrahi, uyanık kraniyotomi, intraoperatuvar görüntüleme ve intraoperatuvar elektrofizyolojik beyin haritalandırılması), daha fazla tümör güvenli olarak çıkartılabilir duruma gelmiştir (64, 67). Bununla beraber yapılan cerrahi işlem; brakiterapi, anti-neoplastik ajan yerleştirilmesi gibi lokal tedavilere de olanak sağlamaktadır.

Konvansiyonel radyoterapi hasta tedaviyi reddetmediği sürece tüm GBM hastalarında tedavinin vazgeçilmez parçasıdır. Tipik olarak erken postoperatuvar dönemde verilir. Yaşam süresini iyi yönde etkiler. Genellikle 6-6,5 hafta boyunca haftanın beş günü 1,8-2 Gy (Gray) olarak aralıklı şekilde toplam 60 Gy dozunda verilir. Radyoterapinin diğer formları olan; stereotaksik radyoşirurji, brakiterapi ve partikül terapisi halen tartışmalıdır.

Kemoterapi de GBM tedavisinde rol oynamaktadır. Fakat zamanlama değişkendir. Bazı protokollerde tedavinin devamı olarak radyoterapiden sonra uygulanırken, bazılarında ise sadece nüks vakalarda uygulanmaktadır (68).

Genellikle ilk seri ilaçlar olarak temazolamid, Karmustin veya PCV (procarbazine, CCNU ve vincristine'nin bir kombinasyonu) kullanılmaktadır. Temazolamid bunlar arasından ilk seçilmesi gereken ilaçtır. İkinci seride karboplatin, VP-16, CPT-11 bulunmaktadır. Bunlar da GBM'lerde etkili olabilmekle beraber ilk seri kadar etkili değildirler. Diğer birçok kemoterapötik ilaçların, daha az olmak üzere etkili oldukları gösterilmiştir. Bununla beraber, lokal yavaş salınımlı kemoterapötik ilaçların tümör yatağına konulmasının yararlı olabileceği düşünülmektedir (69).

Bütün bunların yanında biyolojik bazlı deneysel tedavi seçenekleri üzerinde halen çalışılmaktadır. Bunlara örnek olarak gen tedavileri, immunoterapiler (1-70) ve sitotoksik viral terapiler sayılabilir.

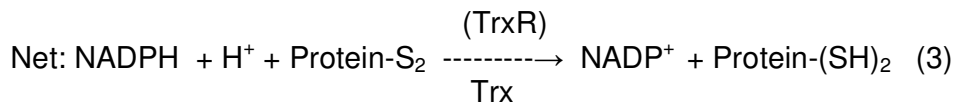
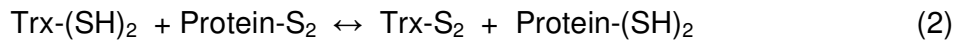
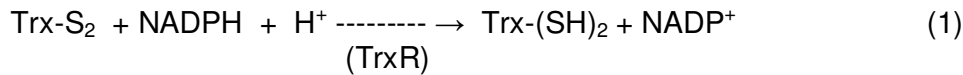
F.Prognoz

Tanı, cerrahi tedavi ve cerrahi tedavilere yardımcı tedavilerdeki elde edilen kayda değer gelişmelere rağmen GBM'li hastalarda ortalama yaşam süresi yaklaşık olarak 1 yıldır ve tekrarlayan vakalarda bu süre 4 aydır (6). Bazı faktörler iyi prognoza işaret edebilir: 45 yaşından genç olmak, iyi fonksiyonel durum ve tama yakın rezeksiyon gibi (71). Bu klinik faktörlere ek olarak bazı moleküler ve sitogenetik faktörler de prognozu etkileyebilir. Normal P53 değerleri ile beraber EBFR'nin artmış salınımı, uzamış ortalama yaşam ile ilişkilendirilmiştir (50). Uzamış ortalama yaşam, aynı zamanda 1p, 19q kromozom delesyonları ile de ilişkilidir.

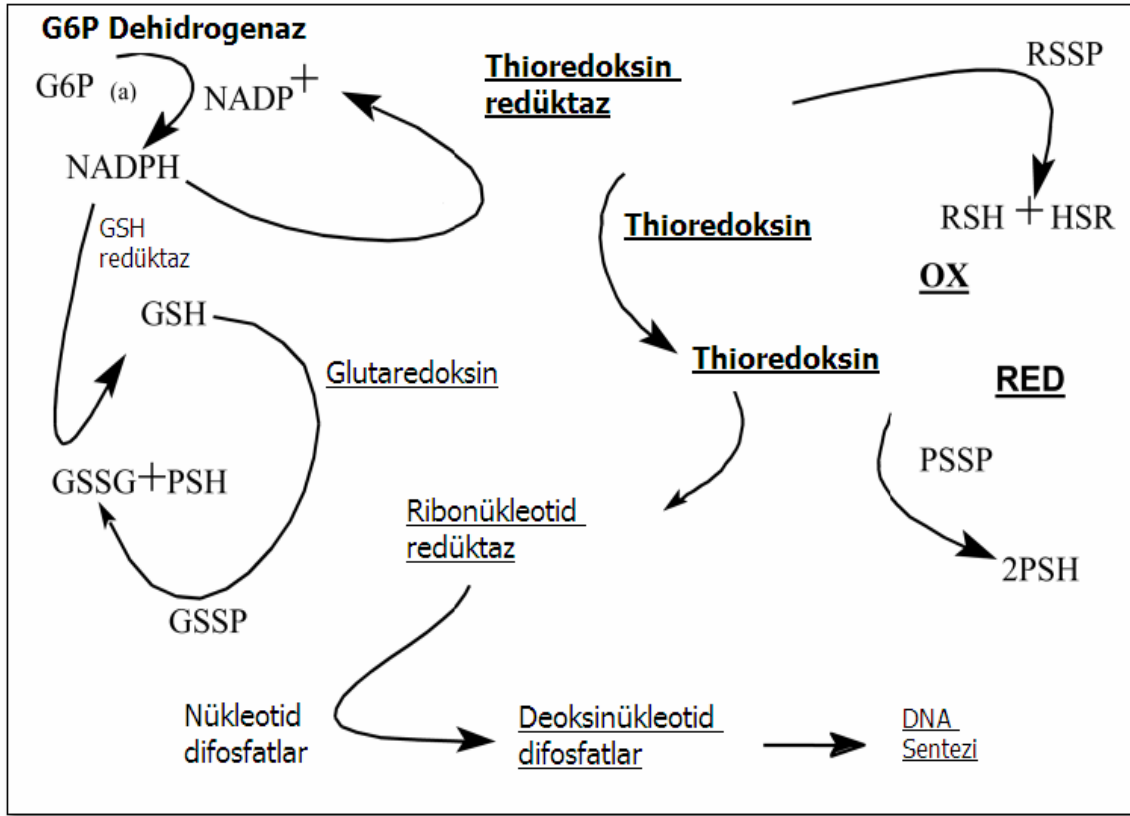
3. TİYOREDOKSİN REDÜKTAZ- TİYOREDOKSİN SİSTEMİ VE KANSER

Tiyoredoksin redüktazlar (TrxR), Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys katalitik bölümü ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat-oksidaz (NADPH) bağlanma bölümü olan flavoproteinlerdir. Ayrıca, katalitik bölüm ile etkileşime giren ve redoks aktivitesi için gerekli olan C-terminal selenosistein sırasından oluşurlar ve selenyum içerirler (72, 73). TrxR aktivitesi, oksidatif heksosmonofosfat (HMPS) siklusunun hız azaltıcı enzimi olan glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) ile üretilen NADPH tarafından düzenlenir (74). İki adet TrxR klonlanmıştır: başlıca sitoplazmada bulunan 54 kDa'luk bir enzim ve mitokondride bulunan 56 kDa'luk ikinci bir enzim (72).

Tiyoredoksinler (Trx) ise Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys katalitik bölümü içeren 10-12 kDa'luk bir protein ailesidir. Bu proteinlerin iki sistein grubu geri dönüşümlü oksidasyon / redüksiyona uğrar. Trx'in redükte olmuş dithiol formu [Trx-(SH)₂] disülfid grubu içeren oksidize protein substratlarını redükte eder, oksidize disülfid formu [Trx-(S-S)] ise TrxR tarafından düzenlenen NADPH-bağımlı bir yolla sıklusa geri katılır (72, 75). Trx'in iki temel formu klonlanmıştır: Trx-1 tipik olarak sitoplazmada, ayrıca normal endometriyal stromal hücrelerin, tümör hücreleri ve primer solid tümörlerin çekirdeğinde bulunan 104 aminoasitli bir proteindir. Trx-2 mitokondride bulunan 166 aminoasitli bir proteindir (72).



Şekil-1'de Trx / TrxR sisteminin hücre içerisindeki rolü özetlenmektedir.



Şekil-1. Trx / TrxR ve thioltransferazın sitoplazma ve mitokondri içerisindeki protein homeostazı ve DNA sentezindeki rolü: İlk reaksiyonda (a) elektron kaynağı olan glukoz-6-fosfatın (G6P) glukoz-6-fosfat dehidrogenaz tarafından oksidasyonu gösterilmektedir. Bu heksoz monofosfat şantının ilk basamağıdır. Tam bir siklus sonrası 12 NADPH ve 6 CO₂ oluşur. Bu büyük redüksiyon gücü oksidatif stres için kullanılır ve protein homeostazı için TrxR ve glutaredoksine elektron sağlar. NADPH'den gelen elektronlar TrxR'a geçer ve Trx'i indirgemek için kullanılır. TrxR ve Trx, çiftli reaksiyonlarda DNA sentezi için gerekli olan deoksiribonükleotidin kaynağını sağlayan ve anahtar bir enzim olan ribonükleotid redüktaza elektron sağlar (14).

Trx önemli redoks düzenleyicilerinden birisidir. Trx geni kromozom 9q32 üzerinde, protein ürünü ise mitokondri ve sitozolde yeralır (72). Trx proteininin yapımı, oksidatif stres, hipoksi, lipopolisakkaridler, viral enfeksiyonlar, X-ışını ve UV radyasyon ile

uyarılır. Trx, redoks dengesi üzerinden p53, AP-1 gibi transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasını etkiler. Ayrıca Trx'in kanser hücrelerinin sitotoksik ilaçlara olan direncini arttırdığı da gösterilmiştir (72).

TrxR/ Trx Sisteminin Biyolojik Aktiviteleri

1. Deoksiribonükleik asit (DNA) sentezindeki kofaktör rolü

TrxR/Trx sistemi, DNA sentezi ve hücre çoğalması için gerekli olan deoksiribonükleotidlerin yapımında kritik bir rol oynar. Trx, nükleotid difosfatların deoksiribonükleotidlere dönüşümünü katalizleyen bir enzim olan ribonükleotid redüktazın, ribozu indirgemesi için gerekli olan elektronları sağlar (76).

2. Hücrelerin hücre ölümüne karşı korunması

Trx-1'in lenfoid hücre kültürüne eklendiğinde ya da geni bu hücrelere transfer edildiğinde hücre ölümünü engellediği gösterilmiştir (10). Trx-2'nin hücre ölümüne karşı hangi mekanizma ile koruma sağladığı henüz bilinmemektedir. Ancak hücre redüksiyon gücündeki artışın, oksidatif stresin zarar verdiği proteinleri indirgediği, böylelikle hücre ölümünü uyardığı düşünülebilir.

3. Anjiogenezin uyarılması

İnsan meme kanseri MCF-7, kolon kanseri ve murin lenfoma hücreleri gibi çeşitli değişik hücre serilerinin insan Trx-1 ile enfekte edilmesi sonrası VEBF sekresyonunda önemli oranda artış görülmüştür (11). Buna karşın, redoks inaktif mutant Trx ile enfekte edilmesinin VEBF yapımını kısmi olarak engellediği görülmüştür.

4. Hücre çoğalmasının uyarılması

Trx-1'e maruz kalan lenfositler, fibroblastlar ve birçok lösemik ve solid tümör hücre serilerinin büyüme hızında artış görülmüştür (72, 10). Bu çoğaltıcı etkinin mekanizması tam olarak bilinmemektedir, ancak sitokin (IL-1, IL-2 ve TNF- α)

üretimindeki ve büyüme faktör (temel fibroblast büyüme faktörü) aktivitesindeki artışa bağlı olduğu düşünülmektedir (72).

5. Tioredoksinlerin anti-oksidan etkileri

Glutasyon peroksidaz ve hücre zarı peroksidazlarının, hücrenin oksijen radikalleri ve peroksitlerin zararlı etkilerine karşı korunmasında önemli rolü vardır (77). Bu enzimler, reaktif oksijen ürünlerini toplamak için tiyol gruplarını elektron kaynağı olarak kullanırlar. Trx, anti-oksidan etkilerini başlıca tioredoksin peroksidazlara elektron sağlayarak yapar. Oksidize olmuş peroksitleri indirgeyerek enzimin monomerik formunu geri kazandırır ve böylece oksiradikal toplama görevine devam etmesini sağlar (78). Trx, tioredoksin peroksidaz salınımını da artırır.

6. Transkripsiyon faktör aktivitesinin uyarılması

Trx, NF- κ B, AP-1 ve AP-2 gibi bir dizi transkripsiyon faktörünün ve glukokortikoid ve östrojen gibi nükleer reseptörlerinin DNA-bağlama aktivitesini artırır (75). Sitoplazmada ise Trx, paradoksikal olarak NF- κ B'yi engeller (79). Trx'nin bazı transkripsiyon faktörleri üzerindeki etkisi, DNA-tamir endonükleaz aktivitesi de olan 37 kDa'luk bir protein olan Ref-1'in redüksiyonu ile olur (72).

7. Tioredoksinin hücresel proteinlere bağlanması

Redükte olmuş Trx-1, bir çok hücresel proteine bağlanarak biyolojik aktivitelerini düzenlerler. Trx, apoptoz sinyal regüle edici kinaz-1 (ASK1)'e, protein kinaz C'nin çeşitli izoformlarına, p40 fagosit oksidaza, nükleer glukokortikoid reseptörüne ve lipokaline bağlanır. Oksidatif stres durumlarında ise, Trx'ini oksidize eden ve böylece ASK-1'den ayrılmasını artıran ve ASK1'in aktive olmasını sağlayan reaktif oksijen ürünleri üretilir.

KANSERDE TİYOREDOKSİNİN ROLÜ

Trx salınımının, muhtemelen protein yapı ve fonksiyonundaki değişikliklere bağlı olarak, akciğer, kolorektal, servikal, hepatik ve pankreas kanseri gibi birçok insan kanser türünde arttığı gösterilmiştir (10, 11, 12, 13). Trx salınım yokluğu bu kanser türlerinde, lenf nod negatifliği ve daha iyi klinik sonuç ile birliktelik göstermiş, bununla beraber tümörün derecesi, evre ve histolojisinden bağımsız olduğu gösterilmiştir. Araştırmacılara göre, bu sonuçlar Trx'nin bazı insan kanserlerindeki tahmin edilen büyüme arttırıcı rolünü desteklemektedir ve aşırı salınımı daha malin bir tümör fenotipinin göstergesi olabilir.

TrxR aktivitesi ve tümör büyümesi arasındaki ilişki çok net değildir. Katalitik aktivitesi fonksiyonel olarak artsa da, tümör hücrelerinin TrxR enzim salınımını arttırmaları gerekmeyebilir.

Kanser hücreleri, neredeyse her solid tümörde görülen hipoksik şartlara adapte olabilecek durumdadırlar (80). Hipoksi, kanser fenotipinin gelişmesinde rol alan bir transkripsiyon faktörü olan hipoksi-indükte edilebilir faktörün (HIF-1) aktivasyonuna neden olur. HIF özellikle, hipoksiye cevap elementlerine (HRE) bağlanarak, angiogenez (VEGF), metabolik adaptasyon (GLUT taşıyıcıları, hekzokinaz ve diğer glikolitik enzimler) ve hücre çoğalması ile yaşam süresini uzatıcı bir takım genlerin oluşmasını uyarır (80, 81). Trx'nin aşırı salınımının hem normoksik ve hem de hipoksik şartlarda HIF-1 α 'yı önemli oranda arttırdığı gösterilmiştir (11).

TEDAVIDE HEKZOSMONOFOSFAT / TrxR / Trx ÇİFTLİ REAKSİYONLARININ HEDEF OLARAK KULLANILMASI

TrxR / Trx'nin biyolojik aktiviteleri ve saldırgan tümör büyümesi ile olan bağlantısı, bu sistemin kanser terapisi için önemli bir hedef olduğunu düşündürür. Hem enzim hem de substratı değiştirilebilir. Glutaredoksin içermeyen hücrelerde, HMPS / TrxR / Trx çiftli reaksiyonlarının engellenmesi için HMPS sonucu oluşan NADPH'nin tükenmesi ya da Trx veya TrxR'in direkt teması, doğru bir yaklaşım olabilir.

Şuanda mevcut kemoterapötik ajanlardan sisplatin doğrudan Trx / TrxR sistemini etkileyebilmektedir (82).

Trx / TrxR sistem inhibitörleri ile ilgili deneysel çalışmalar: Çeşitli Trx / TrxR sistem inhibitörleri tanımlanmıştır. PX-12, Trx-1'in cys rezidüsünü thioalkilleyerek inhibe eder. PX-12'nin MCF-7 meme kanser hücrelerinin ve HT-29 kolon kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (83). PX-12, bu hücrelerde hipoksi indükleyici faktör-1 alfa (HIF-1 α) seviyesinde hipoksiye bağlı artışı engeller ve HIF aktivitesini, VEGF yapımını, indüklenebilen nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonunu azaltır.

Plöroatin, geri dönüşümsüz bir TrxR inhibitörüdür ve insan kanser hücre paneline karşı PX-12'ye benzer şekilde büyüme inhibitör etkileri vardır (83, 84).

Çeşitli anti-romatizmal ajanların Trx / TrxR sistemini etkiledikleri gösterilmiştir. Bir penisilamin derivesi olan KE-298 ve aktif metabolitleri, konsantrasyona bağlı olarak insan monositik ve T hücre dizisi tarafından salınan Trx'ini inhibe ederler (85).

Moteksafin Gadolinyum: Moteksafin gadolinyum (MG), Gd⁺³ içeren genişlemiş bir porfirindir. Askorbat, NADPH, glutatyon, Trx gibi çeşitli hücre içi metabolitlerden elektron kabul ederek katalitik aktivasyon gösterir (86). MG, TrxR aktivitesini direk inhibe eder, ancak ayrıca glutatyon / glutaredoksin reaksiyonlarını da, muhtemelen reaktif oksijen ürünü yapımıyla ya da hidrojen peroksit ile GSH'ın tüketilmesi sonucu

engelleyebilir. Bu etkilerin bir sonucu olarak, MG kanser hücresi içindeki metabolizmayı bozar, DNA tamirini engeller ve hücre ölümünü kolaylaştırır.

KLİNİK GEREÇ VE YÖNTEM

1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Seçimi

Çalışmaya İstanbul üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı Kliniğinde 2008 yılında cerrahi tedavi uygulanmış GBM tanısı almış hastalar dahil edilmiştir. Akut veya kronik enfeksiyon, immünolojik veya metabolik hastalık, başka bir neoplastik hastalık, kardiyopulmoner hastalık ve son zamanlarda büyük cerrahi geçirmiş olan hastalar bu çalışmanın dışında bırakılmıştır. Kontrol grubunu ise Adli Tıp Anabilim Dalı'na otopsi amacı ile getirilen vakalardan alınan beyin dokusu örnekleri ve değişik yaştaki sağlıklı insanlardan alınan 12 serum örneği oluşturmuştur. Kontrol beyin dokuları ölümü takiben ilk 4 saat içerisinde adli tıp laboratuvarına getirilen vakalardan alınmıştır. Ayrıca otopsi sırasında beyin veya başka organ neoplastik, inflamatuvar veya belirgin lezyonu tespit edilmiş olan vakalar ile zehirlenme vakaları çalışma dışı bırakılmıştır. Kontrol serum örnekleri ise, hiçbir sistemik hastalığı olmayan sağlıklı bireylerden elde edilmiştir. Hasta ve kontrol grubu bireylerinden veya yakınlarından gerekli izinler alındıktan sonra örnekler alınmıştır. Bu çalışmaya İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı alındıktan sonra başlanmıştır.

2. Demografik Bilgiler

Bu çalışmada hasta grubunu, histopatolojik olarak tanısı desteklenmiş 27 GBM hastası, kontrol grubunu ise 10'u trafik kazası ve 2'si yüksekten düşme sonucu ölümleri gerçekleşen toplam 12 otopsi vakası ve 12 sağlam insandan alınan serum örnekleri oluşturmuştur. Kontrol doku grubundaki hiçbir vakanın beyin dokusunda belirgin patoloji saptanmamıştır. Hasta grubundaki 10 vakanın lezyonu sağ hemisferde, 16 vakanın sol hemisferde ve 1 vakanın de ventrikül içinde bulunmuştur. Tümörlerin 7'si frontal, 7'si temporal, 4'ü parietal, 3'ü temporoparietal,

2'si frontopariyetal, biri oksipital, biri 3. ventrikül, biri parietooksipital, biri oksipitotemporal yerleşimli olarak tespit edilmiştir. Hastaların 13'ü erkek, 14'ü kadından oluşmuştur. Ortalama yaşları 48.5 ± 15.8 yıl olarak bulunmuştur. Yirmibeş hastanın kraniyal MRG tetkikinde tümör etrafında ödem saptanırken, 2 hastanında ödeme rastlanmamıştır. Hastalardan 4 tanesi daha önce ameliyat edilmiş ve bunlardan 2 tanesine radyoterapi uygulanmıştır. Postoperatuvar dönemde hiçbirinde herhangi bir komplikasyon gelişmemiş ve hepsi tedavilerinin devamı için Radyasyon Onkolojisi ve Medikal Onkoloji Anabilim dalları ile konsülte edilmiştir. Tablo 1'de çalışmaya dahil edilen hastaların demografik ve klinik özellikleri özetlenmektedir.

Tablo 1. Hastaların demografik ve klinik özellikleri.

HASTALARIN DEMOGRAFİK ÖZELLİKLERİ						
Hasta No	Yaş	Cinsiyet	Semptom ve bulgular	Nörolojik Muayene	Lezyonun Yerleşimi	Karnofsky skoru
1	36	E	Kas güçsüzlüğü	Sağ hemiparezi	Sol parietal	60
2	36	E	Konuşma bozukluğu	Disfazi	Sol frontal operkulum	80
3	56	K	Kas güçsüzlüğü	Sağ hemiparezi	Sol parietal	90
4	48	E	Konuşma bozukluğu	Disfazi	Sağ frontoparietal	90
5	73	K	Kas güçsüzlüğü	paraparezi	Sol oksipitotemporal	20
6	32	E	Baş ağrısı	Normal	Sol frontal	90
7	38	K	Bulantı, kusma, baş ağrısı	Sol hemiparezi	Sağ temporoparietal	60
8	52	K	Oryantasyon kaybı	Konfüzyon	Sol parietal	90
9	27	E	Kas güçsüzlüğü	Sağ hemiparezi, motor afazi	Sol temporal	30
10	62	E	Nöbet geçirme	Sağ hemiparezi, Sağ santral KS7 parezi, dizartri	Sol posterior parietal	70
11	53	E	Baş ağrısı	Normal	Sağ frontal	100
12	69	K	Oryantasyon kaybı, konuşma bozukluğu	Disfazi	Sol temporal	90
13	63	E	Baş ağrısı	Normal	Sol temporoparietal	100
14	52	K	Konfüzyon	Sol hemiparezi, Sol fasyal parezi	Sağ temporal	80
15	50	E	Kas güçsüzlüğü	Sol hemiparezi, Sol apraksi	Sağ temporal	70
16	36	K	Konfüzyon	GKS:13 (M ₆ V ₄ E ₃)	Sol temporal	100
17	23	K	Baş ağrısı, bulantı, kusma	Normal	3. ventrikül	90
18	26	K	Baş ağrısı, nöbet geçirme	Normal	Sol temporoparietal	100
19	47	E	Baş ağrısı	Normal	Sağ temporal	100
20	49	K	Kas güçsüzlüğü	Sağ hemiparezi	Sağ frontoparietal	60
21	55	E	Nöbet geçirme	Normal	Sol frontal	100
22	78	K	Şuur bulanıklığı	Sol hemiparezi	Sağ frontal	20
23	71	K	Baş ağrısı, bulantı	Normal	Sağ frontal	90
24	56	E	Disfazi	Sağ hemiparezi	Sol temporal	80
25	42	E	Baş dönmesi	Yürüyüş ataksisi	Sol oksipitoparietal	90
26	20	K	Baş ağrısı	Normal	Sağ frontal	100
27	62	K	Görme bozukluğu	Sol hemianopsi	Sağ oksipital	80

E: Erkek, GKS: Glasgow koma skalası, K: Kadın, KIBAS: Kafa içi basınç artışı, KS: Kraniyal

Sinir.

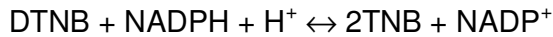
3. Örneklerin Toplanması ve Çalışılması

Yirmiyedi hastada GBM dokusu ve serumlarında, 12 kontrol beyin dokusu (otopsi) ve 12 (sağlıklı kişiler) normal serum örneğinde tiyoredoksin redüktaz enzimi çalışıldı. Her hastadan tümör dokusu operasyon sırasında çıkartılan dokunun % 20'sini geçmemek kaydı ile ve kontrol grubundan beyin dokusu ise otopsi sırasında alındı. Hasta grubunun hepsinden operasyon öncesi 2 cc serum örnekleri toplandı. Bilinen bir hastalığı olmayan ve değişik yaş grubundaki sağlıklı 12 kişiden 2 cc serum örneği alındı. Dokular mümkün olduğunca çabuk -70 derecede muhafazaya alındı ve çalışılıncaya kadar saklandı.

Tiyoredoksin redüktaz aktivitesi kolorimetrik yöntem ile tayin edildi. Bu yöntemde NADPH aracılığıyla 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoik) asit (DTNB), 5-tiyo-2-nitrobenzoik asid'e (TNB) indirgenir. Oluşan ürün, TNB, kuvvetli sarı bir renk oluşturur ve bu renk 412 nm'de ölçülür. Kit içerisinde, memeli tiyoredoksin redüktaz aktivitesinin spesifik inhibisyonu için inhibitör solüsyonu bulunmaktadır. Biyolojik örneklerdeki bazı enzimler de DTNB'yi indirgediğinden kit içerisinde yer alan spesifik inhibitör ölçüm sırasında kullanılarak, sadece tiyoredoksin redüktaz aktivitesi'nden kaynaklanan DTNB indirgenmesi tayin edilmiştir.

Prosedür

Memeli tiyoredoksin redüktaz aktivitesi DTNB'yi substrat olarak kullanan Tiyoredoksin Redüktaz Kit'i (Sigma) ile tayin edildi.



Her 1 mol NADPH oksidasyonuna karşılık 2 mol 5-tiyo-2-nitrobenzoik asid (TNB) oluşur. Oda ısısında (25°C) yapılan analizde oluşan TNB 412 nm'de

maksimum absorpsiyon (molar ekstinksiyon katsayısı $[\epsilon^M] = 14,150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) verir. Biyolojik örneklerde glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz gibi diğer enzimlerde DTNB'yi indirgediğinden, DTNB indirgenmesinde gözlenen oran daha yüksek olur. Bu enzimlerin total DTNB indirgenmesine katkısı spesifik inhibitör solüsyonu kullanılarak hesaplanabilir. Çalışma esnasında serum ve homojenize doku örneklerinde sadece tiyoredoksin redüktaz aktivitesine bağlı DTNB indirgenmesini tayin etmek amacıyla iki ölçüm yapılmıştır. İlkinde örnekteki total DTNB indirgenmesi, ikincisinde ise tiyoredoksin redüktaz inhibitör solüsyonu varlığında ölçüm yapılmıştır. Her iki ölçüm arasındaki fark tiyoredoksin redüktaz aktivitesine bağlı DTNB indirgenmesi olup, dolaylı olarak enzim aktivitesi hesaplanmıştır.

Doku homojenatları proteaz inhibitör kokteyli kullanılarak (katalog numarası P8340-Sigma) 1:100 oranında diluye edildikten sonra çalışılmıştır. Böylece doku örneklerindeki istenmeyen proteoliz önlenmesi amaçlanmıştır. Doku örnekleri buz içerisinde %0.9 NaCl ve homojenizatör ile homojenize edildikten sonra 10000 rpm'de +4C°de 15 dakika santrifüje tabii tutulmuştur. İşlemden sonra dipteki peletler atılarak süpernatantlar alınıp, enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

Hesaplama

$$\text{Ünit/mL} = \frac{\Delta A_{412}/\text{dk (tiyoredoksin redüktaz)} \times \text{dil}}{\text{enzvol}}$$

$$A_{412}/\text{dk (tiyoredoksin redüktaz)} = [\Delta A_{412}/\text{dk (örnek)} - \Delta A_{412}/\text{dk (örnek+inhibitör)}]$$

$$\text{dil} = \text{örnek dilüsyon faktörü}$$

$$\text{enzvol} = \text{enzim hacmi (ml)}$$

Ünite tanımı: 1 ünite memeli tiyoredoksin redüktaz aktivitesi, 1 dakikada, pH 7.0'de, 25°C'de (sadece DTNB içeren, eşleşmemiş yöntem kullanılarak, ortamda NADPH bulunmayan), 1 ml'de, A_{412} 'de artışa yol açan enzim aktivitesinin U/ml cinsinden ifadesidir.

4. İstatistiksel Analiz

Kontrol ve hasta grupları doku ve serum karşılaştırılmalarında “Non-parametrik Mann-Whitney U” testi kullanılmıştır. Korelasyon analizlerinde ise “Non-parametrik Pearson Korelasyon” testi kullanılmıştır. Sonuç değerleri, “ortalama $\pm$ standart deviyasyon” olarak verilmiştir. 0.05'den büyük değerler (p) anlamlı olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

Tiyoredoksin redüktaz düzeyleri

Örnekler tiyoredoksin redüktaz için analiz edilerek her iki grup karşılaştırılmıştır. GBM ve normal beyin dokusundaki tiyoredoksin redüktaz düzeyleri hasta ve kontrol grubuna göre belirgin farklılık göstermiştir. Kontrol grubunda bu molekülün ortalama konsantrasyonu 14.8 ± 3.4 U/gr olarak bulunmuştur. Buna karşın tüm hastaların GBM dokularında daha yüksek konsantrasyonlar saptanmıştır. Bu grubun ortalama değeri 74.5 ± 14.9 U/gr olarak bulunmuştur (Tablo 1 ve 2). Kontrol grubundaki tiyoredoksin redüktaz serum değerleri ortalaması 203.0 ± 11.3 U/mL iken, hasta grubunda bu değer 296.3 ± 43.6 U/mL olarak hesaplanmıştır (Tablo 3 ve 4).

Tiyoredoksin redüktaz doku ve serum değerleri, hastalarda kontrol gruplarına nazaran anlamlı yüksek bulunmuştur. Hasta-kontrol doku değerleri karşılaştırılması istatistiksel olarak çok anlamlı bulunmuştur ($p = 0.00001$). Aynı şekilde hasta-kontrol serum değerleri karşılaştırılması da istatistiksel olarak çok anlamlı bulunmuştur ($p = 0.00001$). Tablo 5, hasta ve kontrol grupları doku ve serum ortalama değerlerini içermektedir. Şekil 2 ve 3, istatistik sonuçlarının bir özetini vermektedir.

Tablo 1. Hasta (GBM) grubu tiyoredoksin redüktaz doku değerleri.

(U/Gr)					
Hasta 1	95,4	Hasta 10	63,1	Hasta 19	82,96
Hasta 2	61,36	Hasta 11	54,97	Hasta 20	58,43
Hasta 3	63,32	Hasta 12	82,25	Hasta 21	76,28
Hasta 4	67,04	Hasta 13	60,31	Hasta 22	68,36
Hasta 5	81,92	Hasta 14	60,31	Hasta 23	79,24
Hasta 6	81,92	Hasta 15	87,12	Hasta 24	87,3
Hasta 7	87,44	Hasta 16	86,48	Hasta 25	91,6
Hasta 8	71,4	Hasta 17	64,3	Hasta 26	91,6
Hasta 9	65,6	Hasta 18	69,21	Hasta 27	72,43

Tablo 2. Kontrol (otopsi) grubu tiyoredoksin redüktaz doku değerleri.

(U/Gr)			
Kontrol 1	10,24	Kontrol 7	16,43
Kontrol 2	15,62	Kontrol 8	12,21
Kontrol 3	21,24	Kontrol 9	14,72
Kontrol 4	9,52	Kontrol 10	16,58
Kontrol 5	14,3	Kontrol 11	19,53
Kontrol 6	13,66	Kontrol 12	14,71

Tablo 3. Hasta (GBM) grubu serum tiyoredoksin redüktaz değerleri.

(U/ML)					
Hasta 1	295,6	Hasta 10	306,4	Hasta 19	331,36
Hasta 2	263,2	Hasta 11	205,2	Hasta 20	272,2
Hasta 3	360,11	Hasta 12	287,7	Hasta 21	288,5
Hasta 4	345,5	Hasta 13	315,62	Hasta 22	263,51
Hasta 5	289,6	Hasta 14	296,44	Hasta 23	241,05
Hasta 6	344,4	Hasta 15	287,5	Hasta 24	232,71
Hasta 7	286,6	Hasta 16	236,06	Hasta 25	341,53
Hasta 8	341,6	Hasta 17	386,44	Hasta 26	295,34
Hasta 9	340,8	Hasta 18	244,68	Hasta 27	301,4

GBM: Glioblastom multiforme.

Tablo 4. Kontrol (sağlıklı bireyler) grubu serum tiyoredoksin redüktaz değerleri

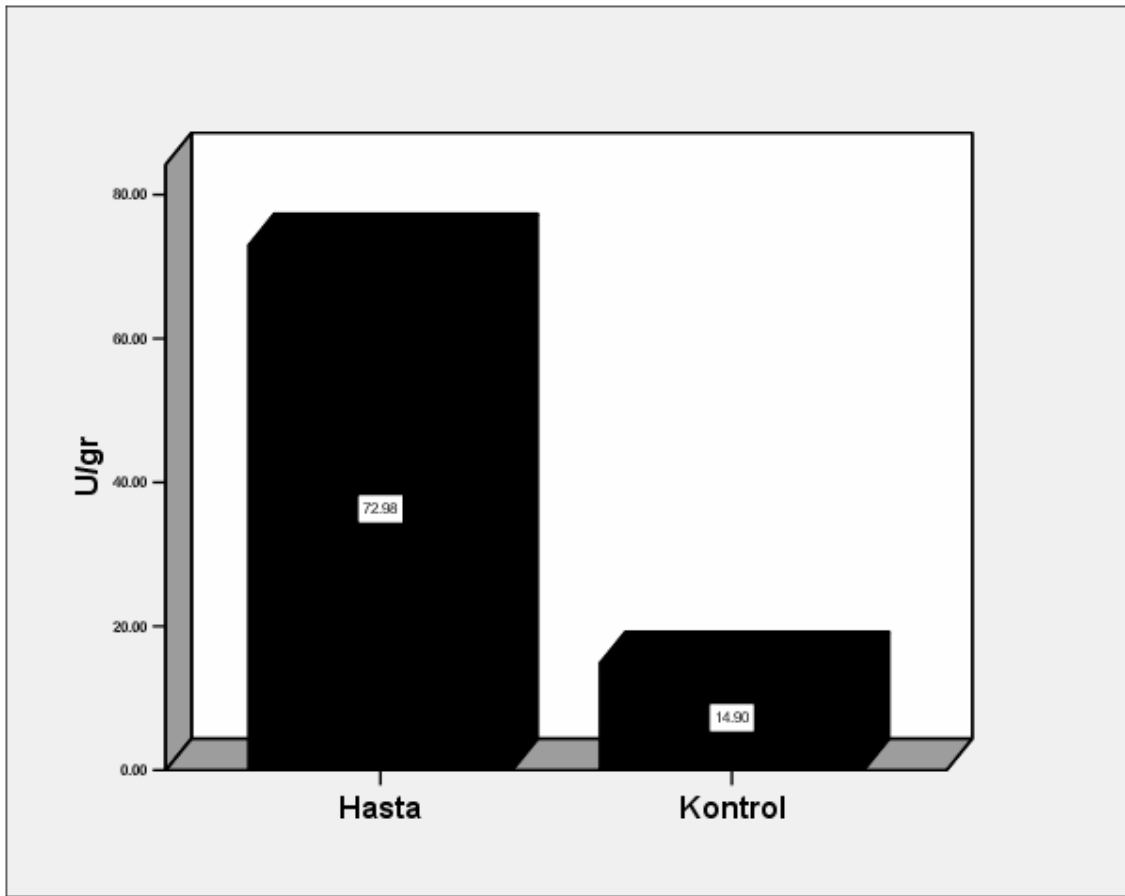
(U/ML)			
Kontrol 1	197,04	Kontrol 7	208,94
Kontrol 2	206,4	Kontrol 8	225,38
Kontrol 3	217,2	Kontrol 9	204,79
Kontrol 4	184,08	Kontrol 10	200,24
Kontrol 5	201,25	Kontrol 11	206,21
Kontrol 6	186,24	Kontrol 12	198,47

Tablo 5. Tioredoksin redüktaz doku ve serum düzeylerinin hasta ve kontrol grupları ortalama ($\pm$ standart deviyasyon) değerleri.

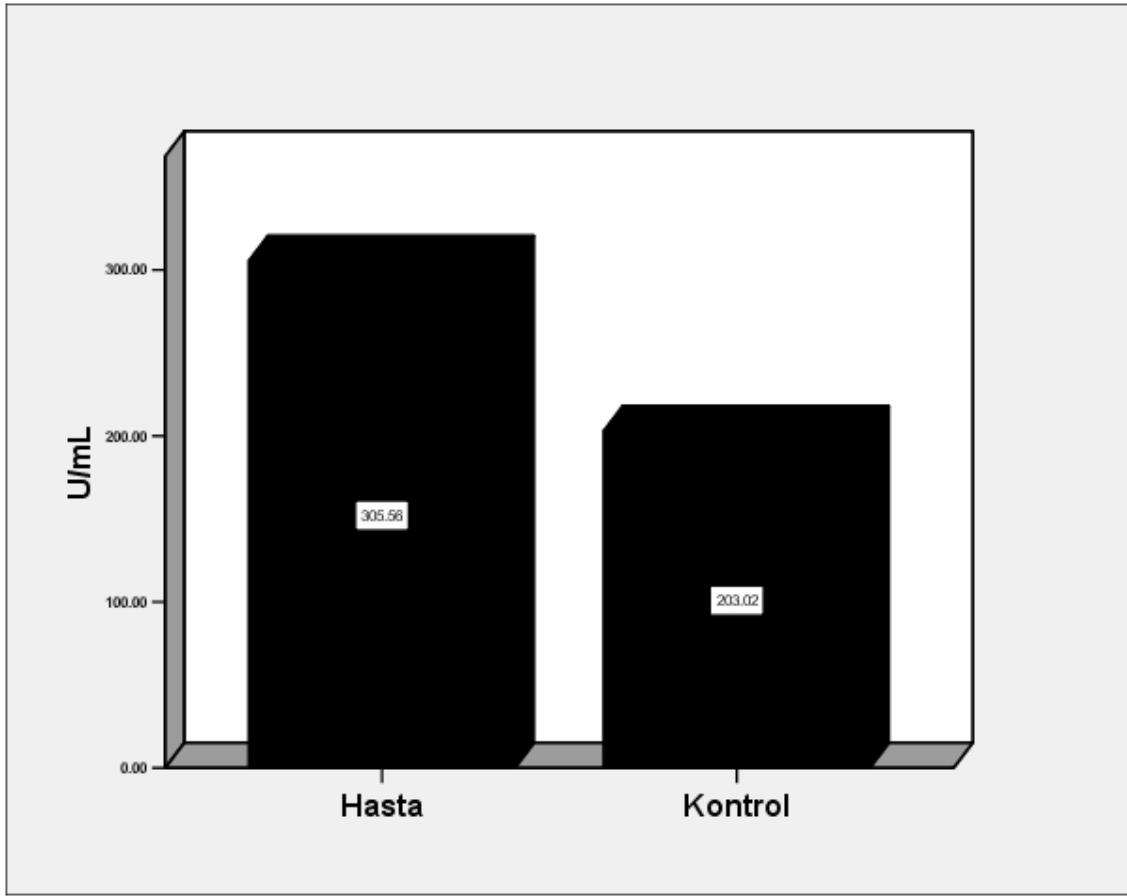
Parametreler (n)	Hasta doku (27) [†]	Hasta serum (27) [‡]	Kontrol doku (12) [†]	Kontrol serum (12) [‡]
Thioredoksin redüktaz	74.5 $\pm$ 14.9	296.3 $\pm$ 43.6	14.8 $\pm$ 3.4	203.0 $\pm$ 11.3
<i>p</i>	0.00001	0.00001	0.00001	0.00001

[†] Değerler 'U/gr' olarak verilmiştir.

[‡] Değerler 'U/mL' olarak verilmiştir.



Şekil 2. Hasta (GBM) ve kontrol (otopsi) grubundaki doku tiyoredoksin redüktaz değerleri.



Şekil 3. Hasta (GBM) ve kontrol (sağlıklı bireyler) grubundaki serum tiyoredoksin redüktaz değerleri.

Hasta grubunda, cinsiyet farkına göre karşılaştırma yapıldığında, erkek ve kadın doku değerleri arasındaki sonuç anlamsız bulunmuştur ($p = 0.90$). Hasta grubunda yapılan erkek ve kadın serum değerleri karşılaştırması da anlamsız bulunmuştur ($p = 0.55$). Cinsiyet farkına göre hasta grubu doku ve serum ortalama değerlerinin karşılaştırılması Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Glioblastom multiformeli hastalardaki tioredoksin redüktaz ortalama doku ve serum değerlerinin cinsiyete göre karşılaştırılması.

Parametreler (n)	Erkek hasta doku değerleri (13) †	Kadın hasta doku değerleri (14) †	Erkek hasta serum değerleri (13) ‡	Kadın hasta serum değerleri (14) ‡
Thioredoxin redüktaz (ortalama± SD)	74.9 ± 13.1 U/gr	74.0 ± 10.7 U/gr.	299.8 ± 44.6 U/mL.	293.0 ± 44.1 U/mL.
<i>p</i> değerleri	0.90	0.90	0.55	0.55

Korelasyonlar

Hasta serum ve doku tiyoredoksin redüktaz değerleri arasında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır. (Pearson korelasyon; $p = 0.47$). Bu sonuçlar, glioblastom multiformeli hastalardaki tiyoredoksin redüktaz yüksekliğinin sadece beyinde gerçekleştiğini ve sistemik etkiden kaynaklanmadığını düşündürmektedir.

Hasta doku değerleri ile Karnofsky skalası arasında anlamlı korelasyon saptanmamıştır (Pearson corelasyon; $p = 0.96$). Hasta serum değerleri ile Karnofsky skalası arasında anlamlı korelasyon saptanmamıştır (Pearson corelasyon; $p = 0.93$).

Hasta doku değerleri ile parankim ödemi arasında anlamlı korelasyon saptanmamıştır (Pearson corelasyon; $p = 0.78$).

TARTIŞMA

Glioblastom multiforme, kötü huylu gliomların yaklaşık % 60-70'ini oluşturur (1, 2). Yeni teşhis edilmiş kötü huylu gliomlarda standart tedavi, cerrahi rezeksiyon, radyoterapi ve kemoterapiden oluşmaktadır. Optimum tedaviye rağmen glioblastomlu hastalarda ortalama yaşam süresi sadece 12-15 aydır (6). Son yıllarda yapılan deneysel ve klinik çalışmalar kötü huylu gliomların moleküler patogenezinin daha iyi anlaşılmasını sağlayarak, tedavide yeni seçeneklerin ortaya çıkmasını ve moleküler hedefli terapilerin kullanılmasını olanaklı hale getirmiştir (56, 87). Moleküler hedefli terapilerin etkinliğini artırmak için geliştirilen mevcut deneysel stratejiler, birden çok kinazı hedefleyen tek bir ajanın kullanılması, EBFR ve mTOR (mammalian target of rapamycin) gibi birbirini tamamlayıcı hedefleri durduran ajanların kombinasyonu ve hedefli ajanların radyoterapi ve kemoterapi ile kombinasyonunu içerirler (56, 87, 88, 89).

Bu konuda ilgi özellikle, EBFR, PKBF ve VEGFR gibi reseptör tirozin kinazları hedefleyen inhibitörler ve çeşitli sinyal-ileti inhibitörleri üzerine yoğunlaşmıştır (90, 91, 92). Hücre içi apoptotik yolları hedef alan birçok sitotoksik ilacın kombine kullanıldığı terapiler ve kemoterapötiklerin tümör içinde kullanımı da klinik odak haline gelmiştir (16).

Kanser araştırmalarında apoptoz merkezi bir rol oynar. Daha önceki yapılan çalışmalarda, yüksek hücre döngüsüne sahip olan tümörlerin düşük apoptoz hızının TrxR enziminin fazla salınımı ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür. Ayrıca, TrxR ve Trx salınımlarının, çeşitli kanser hücre tiplerinde apoptotik direnç ile paralellik gösterdiğine dair literatürde kanıtlar sunulmuştur (93).

Trx / TrxR sistemi, birçok önemli fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyon ile ilişkilendirilmiştir ve kanser tedavisinde önemli bir hedef olmuştur. Hücrel

alışmalar, Trx / TrxR'ın DNA sentezinde kofaktör olarak çalıştığını, apoptozu durdurduğunu , hücre çoğalması ve anjiyogenezi uyardığını , transkripsiyon faktor aktivitesini arttırdığını göstermektedir (10, 11, 72, 75). TrxR'nin, malin lösemi ve melanoma hücre serileri yanında, normal kan monositleri tarafından da salındığı gösterilmiştir (9). Bizim alışmamızda da normal kontrol grubunda insan serumunda belli düzeyde tiyoredoksin redüktaz değerlerinin elde edilmesi yukarıda bahsedilen verileri destekler niteliktedir.

Monositlerden TrxR salınması, oksidatif yangıyı da içeren enflamatuvar cevap sırasında salınan reaktif oksijen türlerini engelleyerek, monositler için hücre koruyucu anti-oksidan bir rolü olduğunu gösterebilir. Trx ve TrxR'nin hücre salınımının artması, doğal öldürücü hücreler [Natural killer (NK)] ya da T hücrelerinin immün atağını engelleyebilir ve böylelikle hücrenin savunması artmış olabilir. Bu etki tümör hücrelerine uyarlanırsa, TrxR'ın tümör hücrelerinin immün sistemden kaçan varyantlar oluşturmalarını sağladığı söylenebilir (9).

TrxR ile indirgenmiş Trx, reaktif oksijen türlerinin yakalanması ve apoptoz sinyal-düzenleyici kinaz (ASK) enzim fonksiyonlarını durdurarak kazandığı anti-apoptotik aktivite ile tanınır (94). Trx sisteminin anti-apoptotik etkisi, küçük hücre dışı akciğer karsinomunda yapılan bir çalışmada, Trx / TrxR salınımı ile apoptoz arasında negatif bir korelasyonun olduğu ve böylelikle tümör hücre yaşam süresini artırdığı gösterilerek kanıtlanmıştır (95).

Trx / TrxR sisteminin tümör ilerlemesinde çeşitli rolleri vardır. Birincisi, Trx ribonükleotid redüktaz için proton vericisidir (96). İkincisi, Trx bir apoptoz mediyatörü olan hücreiçi hidrojen peroksiti indirgeyerek anti-apoptotik görev üstlenir (97). Ayrıca, Saitoh ve arkadaşlarının son çalışmalarında memeli Trx'ninin apoptoz sinyal-düzenleyici kinazın doğrudan inhibitörü olduğu bulunmuştur (98).

Trx salınımının artışı çeşitli tümör oluşumlarında gösterilmiştir ve son bulgular bu molekülün malignite, kısa yaşam süresi ve kötü prognoz ile ilişkili olduğunu savunmaktadır (10, 11, 12, 99). Bu zamana kadar, Trx'in onkojen bir molekül olduğuna dair kanıt bulunamamıştır. Trx mutajenik olmaktan çok, anti-oksidan koruma mekanizmasında ve muhtemelen oksidize proteinlerin tamiri veya kanserojen oksidanların uzaklaştırılmasıyla kanserin engellenmesinde rol alır (8).

Literatürde Trx / TrxR sistemine dair bir çok çalışma yeralırken, TrxR'in glioblastom multiforme dokusundaki değerlerini serum değerleriyle kıyaslayarak ortaya koyan bir çalışma henüz yayınlanmamıştır. Ancak, Trx'in oligodendrogliomlar ve astrositomlardaki ekspresyonunu inceleyen kısıtlı çalışmalar mevcuttur. Sally ve arkadaşlarının yaptığı 85 oligodendrogliom vakasını içeren çalışmada (100), tümör hücrelerinin Trx ve TrxR'ı da içeren antioksidanlara karşı olan immünreaktiviteyi ölçülmüş, %29'unda Trx, %76'sında TrxR'a karşı immünreaktivitenin olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada aynı zamanda, Trx salınımının oligodendrogliomların derecesiyle de ilişkili olduğu tespit edilmiş, Trx pozitif tümör örneklerinde apoptotik hızın daha fazla olduğu bulunmuştur.

Haapasolo ve ark. antioksidan enzimler ile ilgili yaptığı benzer bir çalışmada (101), 433 astrositom olgusunun % 46'sında Trx, % 66'sında TrxR immünreaktivitesi gözlenmiştir. Yaygın (difüz) astrositomlarda Trx ve TrxR boyanmasının pilositik astrositomlara göre daha yoğun olduğu görülmüştür. Bu çalışmada da, Trx pozitif tümörlerin yüksek proliferasyon aktivitesi ve kötü prognozla ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Bizim çalışmamızda ise glioblastom multiforme tümör dokularındaki TrxR değerleri ölçülerek normal parenkimle kıyaslanmış ve bu enzimin gbm vakalarının tümünde anlamlı oranda fazla salgılandığı tespit edilmiştir. Ancak gbm dokuları arasında TrxR düzeyleri arasında belirgin bir fark bulunamamıştır.

Bu çalışmaların yanında, Trx / TrxR sisteminin çeşitli inhibitörleri tanımlanmış ve GBM vakalarını da içine alan deneysel çalışmalarda kullanılmıştır. Örneğin, MG gelişme aşamasında olan bir ajandır ve selektif olarak kanser hücrelerine yerleşerek, hem Trx'i direk olarak inhibe eder, hem de reaktif oksijen türleri oluşturarak tiyoredoksin ve glutaredoksin sistemlerinin çalışmasını engeller (14).

Trx aktivitesinin direk inhibitörü olan MG adlı bu ajan, solid tümörden beyin metastazı olan 61 hastayı içeren Faz Ib/II çalışmasında tüm beyin radyoterapi ile beraber değerlendirilmiştir (102). Çalışmanın Faz II kısmında, % 72 oranında radyolojik cevap olduğu görülmüştür. Tedavi sonrası 11 aylık takipte tümör küçülmesi devam etmiştir. Kontrastsız MR görüntülemelerinde, MG'nin normal dokuda değil, özellikle beyin metastazlarında lokalize olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmaya ek olarak, tüm beyin radyoterapisi uygulanan 24 GBM'li hastada çok-dozlu Faz I çalışması yapılmıştır (15). MG'nin 4 mg/kg (22 dozda) dozunda radyoterapi ile eşzamanlı verildiğinde iyi tolere edildiği görülmüştür. MR incelemelerinde, MG'nin GBM tümörleri içerisine alınıp biriktiği gösterilmiştir. Bu hastaların ortalama yaşam süresi 17 ay olarak bulunmuştur (103).

Ahmaid ve arkadaşları, glioblastom sıçan modelinde etkili Trx inhibitörleri olan 4-merkaptopiridin platinum nitrat ve 2-merkaptopiridin platinum nitratın etkilerini incelemişlerdir (16). Hayvanların kandaki metabolik ve redoks parametrelerinde değişiklik gözlenmezken, tümör dokusundaki TrxR aktivitesi önemli oranda azalmış olarak bulunmuştur. Bu ajanların ani-tümör aktivitelerinin, değişik apoptotik belirteçlerle gösterildiği üzere, programlı hücre ölümüyle değil, TrxR inhibisyonu ve hücre döngüsünün durmasına yolaçan DNA etkileşimlerine bağlı olduğu kanıtlanmıştır.

Literatürde yer alan ve Trx'in glial tümörlerdeki salınımını gösteren ve ayrıca TrxR'ın beyin tümörlerinin gelişimindeki yerini TrxR inhibitörleri çalışılarak gösteren bu sayılı

Çalışmaların dışında, glioblastomlarda TrxR'ın normal doku değerleri ile kıyaslandığı bir çalışma yoktur. Bu açıdan bakıldığında yaptığımız araştırma literatüre katkı sağlayacak bir çalışma niteliğindedir. Bu tez çalışmasında, TrxR'ın glioblastomalı hastaların serumunda da normal insan serumuna göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ancak, hastaların serum ve doku değerleri arasında anlamlı bir korelasyonunun olmaması, olayın sadece beyinde gerçekleştiğini ve sistemik etkiden kaynaklanmadığını düşündürmektedir.

SONUÇ

Bu alışma ile GBM'li hastalarda, tiyoredoksin redüktaz düzeylerinin serum ve tümör dokusunda artmış olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar, tiyoredoksin redüktazın, daha önce yapılan tümör çalışmalarındaki benzer yol üzerinden GBM gelişiminde de bir rolünün olduğuna işaret etmektedir. Bununla beraber, Trx / TrxR sisteminin karsinogenezde tam olarak ne kadar rol oynadığını açıklamak için ve TrxR'a bağlı apoptozun engellenmesine yönelik tedavilerin geliştirilmesi için daha fazla ve büyük çaplı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

ÖZET

Amaç

Bu çalışmanın amacı, tümör büyümesinde rolü olduğu düşünülen tiyoredoksin redüktazın, glioblastom multiformeli (GBM) hastaların tümör dokularında ve serum örneklerindeki değerlerini incelemektir.

Materyal ve Metod

Tiyoredoksin redüktaz değerleri, 27 hastadan alınan GBM dokularında ve hasta serum örneklerinde ve ölümlerinin ilk dört saatinde gelmiş 12 otopsi vakasının normal beyin dokularında, ayrıca 12 sağlıklı insandan alınan serum örneklerinde ölçülmüştür. Tiyoredoksin redüktaz ölçümü, tiyoredoksin redüktaz aktivitesini tayin etmede kullanılan kalorimetrik yöntemeye dayalı bir kit olan tiyoredoksin redüktaz kiti (sigma) ile yapılmıştır. Sonuçlar karşılaştırılmış ve aralarında korelasyon olup olmadığına bakılmıştır.

Bulgular

Ortalama tiyoredoksin redüktaz düzeyi GBM'lerde (74.5 ± 14.9 U/gr) normal beyin dokularına (14.8 ± 3.4 U/gr) göre oldukça yüksek bulunmuştur. Bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı sonuç vermiştir ($p = 0.00001$). Bununla beraber, GBM'li hastalardaki serum ortalama tiyoredoksin redüktaz ortalama değeri (296.3 ± 43.6 U / ml) kontrollere (203.0 ± 11.3 U/ml) göre belirgin olarak artmış bulunmuştur. Bu farklılık da istatistiksel olarak anlamlıdır ($p = 0.00001$). Aynı zamanda, hasta serum ve doku tiyoredoksin redüktaz değerleri arasında anlamlı bir korelasyon olmadığı saptanmıştır ($p > 0.05$).

Sonuç

Bu sonuçlar, GBM'in malignite özelliği ve oluşum mekanizması içinde artmış tiyoredoksin redüktaz değerlerinin etkili olabileceğini düşündürmektedir. Aynı zamanda, tiyoredoksin redüktaz seviyesini düşürmeyi hedefleyen tedavilerin bu malin beyin tümörüne sahip hastaların kliniğine ve yaşam sürelerinin uzamasına yararlı etkilerinin olabileceğini düşünmekteyiz.

SUMMARY

Aim

The purpose of this study was to assess the levels of thioredoxin reductase, which is considered to take place in tumor progression, in blood and tumor samples of glioblastoma multiforme (GBM) patients.

Materials and Methods

Thioredoxin reductase levels were evaluated in blood and GBM tissues extracted from 27 patients, in normal brain tissues of 12 subjects who underwent autopsy within first 4 hours of death and in blood samples of 12 healthy subjects. The level of thioredoxin reductase was measured by Thioredoxin Reductase Kit (sigma); quantitative assay for thioredoxin reductase activity was analyzed using ImAnOx Colorimetric test system. The results were compared between tumor and control groups, any correlation between the groups was determined.

Results

The mean level of TrxR in GBM tissues (74.5 ± 14.9 U/gr wet tissue) was remarkably higher than in normal brain tissues (14.8 ± 3.4 U/gr wet tissue). The difference was statistically significant ($p = 0.00001$). The mean thioredoxin reductase levels in blood were significantly higher in GBM patients (296.3 ± 43.6 U / ml) than that of controls (203.0 ± 11.3 U/ml). This difference was also found to be significant statistically ($p = 0.00001$). We found no significant correlation between the tissue and serum levels of thioredoxin reductase in GBM patients.

Conclusions

These findings suggest that higher levels of thioredoxin reductase may be related to the aggressiveness and malignancy of glioblastoma multiforme. Treatments targeting to inhibit the effects of thioredoxin reductase may be beneficial for patient outcome with these highly destructive brain tumors.

KAYNAKLAR

1. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. The 2007 WHO classification of tumors of the central nervous system. Lyon, France: IARC Pres, 2007.
2. CBTRUS 2008 statistical report: primary brain tumors in the United States, 1998-2002. Central Brain Tumor Registry of the United States, 2000-2004.
3. Farrell CJ, Plotkin SR. Genetic causes of brain tumors: neurofibromatosis, tuberous sclerosis, von Hippel-Lindau, and other syndromes. *Neurol Clin* 25:925-46, 2007.
4. Linos E, Raine T, Alonso A, Michaud D. Atopy and risk of brain tumors: a metaanalysis. *J Natl Cancer Inst* 99:1544-50,2007.
5. Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL. Epidemiology of brain tumors. *Neurol Clin* 25:867-90, 2007.
6. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 359:492-507, 2008.
7. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70, 2000.
8. Arner ESJ, Holmgren A. The thioredoxin system in cancer. *Seminars in cancer biology* 16:420-426, 2006.
9. Söderberg A, Sahaf B, Rosen A. Thioredoxin Reductase, a redox –active selenoprotein, is secreted by normal and neoplastic cells: presence in human plasma. *Cancer research* 60:2281-2289, 2000.
10. Powis G, Kirkpatrick DL, Angulo M, Baker A. Thioredoxin redox control of cell growth and death and the effects of inhibitors. *Chem-Biol Interact* 111-112:23-34, 1998.
11. Welsh SJ, Bellamy WT, Briehl MM, Powis G. The redox protein thioredoxin-1 (trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1 α protein expression: Trx-1

- overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis. *Cancer Res* 62:5089-95, 2002.
12. Kakolyris S, Giatromanolaki A, Koukourakis M, Powis G, Souglakos J, Sivridis E, et al. Thioredoxin expression is associated with lymph node status and prognosis in early operable nonsmall cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 7:3087-91, 2001.
 13. Choi JH, Kim TN, Kim S, Baek S-H, Kim J-H, Lee S-R, et al. Overexpression of mitochondrial thioredoxin reductase and peroxiredoxin iii in hepatocellular carcinomas. *Anticancer Res* 22:3331-36, 2002.
 14. Biaglow JE, Miller RA. The thioredoxin reductase / thioredoxin system. *Cancer Biol and Therapy* 4:6-13, 2005.
 15. Ford JM, Alger JR, Endicott T, Earle J, Miles D, Phan S. Phase i dose escalation trial of the tumor selective radiation sensitizer motexafin gadolinium (gadolinium texaphyrin, Xcytrin) in primary glioblastome multiforme (gbm). *Proc Am Soc Clin Oncol* 54:Abstract 213, 2001.
 16. Ahmadi R, Urig S, Hartmann M, Helmke BM, Koncarevic S, Allenberg B, Kienhoefer C, Neher M, Steiner HH, Unterberg A, Herold-Mende C, Becker K. Antiglioma activity of 2,2':6'.2"-terpyridineplatinum (II) complexes in a rat model-Effects on cellular redox metabolism. *Free Radical Biology and Medicine* 40:763-778, 2006.
 17. Carlotti CG, Dirks PB, Rutka JT. Basic brain tumor biology: invasion, angiogenesis and proliferation. In: Batjer HH, Loftus CM, eds. *Textbook of neurological surgery*. Volume II, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins 1215-29, 2003.

18. Khoshyomm S, Penar PL, Rossi J et al. Inhibition of phospholipase C-gamma1 activation blocks glioma cell motility and invasion of fetal rat brain aggregates. *Neurosurgery* 44:568-577, 1999.
19. Hinek A, Jung S, Rutka JT. Cell surface aggregation of elastin receptor molecules caused by suramin amplified signals leadin to proliferation of human glioma cells. *Acta neuropathol.(Berl)* 97:399-407, 1999.
20. Giese A, Kluwe L, Laube B et al. Migration of human glioma cells on myelin. *Neurosurgery* 38:755-764,1996.
21. Giese A, Westphal M. Glioma invasion in the central nervous system. *Neurosurgery* 39:235-250,1996.
22. Cloughesy TF, Prados MD, Wen PY, et al. A phase II, randomized, non-comparative clinical trial of the effect of bevacizumab (BV) alone or in combination with irinotecan (CPT) on 6-month progression free survival (PFS6) in recurrent treatment-refractory glioblastoma (GBM). *J Clin Oncol* 26:Suppl:91s,2008
23. Fischer I, Gagner JP, Law M, Newcomb EW, Zagzag D. Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology. *Brain Pathol* 15:297-310,2005.
24. Wesseling P, Ruiter DJ, Burger PC. Angiogenesis in brain tumors; pathobiological and clinical aspects. *J Neurooncol* 32:253-265,1997
25. Tsai JC, Goldman CK, Gillespie GY. Vascular endothelial growth factor in human glioma cell lines: induced secretion by EGF, PDGF, BB and bFGG. *J Neurosurg* 82:864-873,1995.
26. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U et al. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie2 in blood vessel formation. *Nature* 376:70-74,1995.

27. Segal DH, Germano IM, Bederson JB. Effects of basic fibroblast factor on in vivo cerebral tumorigenesis in rats. *Neurosurgery* 40:1027-1033,1997.
28. Lamdzus K, Schmidt NO, Jin L, Laterra J, Zagzag D, Way D, Witte M, Weinand M, Goldberg ID, Westphal M, Rosen EM. Scatter factor promotes motility of human glioma and neurovascular endothelial cells. *Int J Cancer* 5:75;19-28,1998.
29. Mikkelsen T, Cairncross JG, Cavenee WK. Genetics of the malignant progression of astrocytoma. *J Cell Biochem* 46:3-8,1991.
30. Rasheed BK, Bigner SH. Genetic alterations in glioma and medulloblastoma. *Cancer Metastasis Rev* 10:289-299,1991.
31. Nagane M, Huang HJ, Cavenee WK. Advances in the molecular genetics of gliomas. *Curr Opin Oncol* 9:215-222,1997.
32. Fuller GN, Bigner SH. Amplified cellular oncogenes in neoplasms of the human central nervous system. *Mutat Res* 276:299-306,1992.
33. Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, et al. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:2965-2969,1992.
34. Rasheed BK, Wiltshire RN, Bigner SH, et al. Molecular pathogenesis of malignant gliomas. *Curr Opin Oncol* 11:162-167,1999.
35. Libermann TA, Friesel R, Jaye M, et al. An angiogenic growth factor is expressed in human glioma cells. *EMBO J* 6:1627-1632,1987.
36. Paulus W, Grothe C, Sensenbrenner M, et al. Localization of basic fibroblast growth factor, a mitogen and angiogenic factor, in human brain tumors. *Acta Neuropathol (Berl)* 79:418-423,1990.
37. Kitange G, Shibata S, Tokunaga Y, et al. Ets-1 transcription-factor mediated urokinase-type plasminogen activator expression and invasion in glioma cells

- stimulated by serum and basic fibroblast growth factors. *Lab Invest* 79:407-416,1999.
38. Miyagi N, Kato S, Terasaki M, et al. Fibroblast growth factor-2 and -9 regulate proliferation and production of matrix metalloproteinases in human gliomas. *Int J Oncol* 12:1085-1090,1998.
 39. Glick RP, Lichtor T, Unterman TG. Insulin-like growth factors in central nervous system tumors. *J Neurooncol* 35:315-325,1997.
 40. Barbacid M. The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol* 25:1386-1403,1994.
 41. Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 46:155-169,1986.
 42. Antoniades HN. PDGF: A multifunctional growth factor. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 5:595-613,1991.
 43. Smits A, Kato M, Westermarck B, et al. Neurotrophic activity of platelet-derived growth factor (PDGF): Rat neuronal cells possess functional PDGF beta-type receptors and respond to PDGF. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8159-8163,1991.
 44. Fleming TP, Saxena A, Clark WC, et al. Amplification and/or overexpression of platelet-derived growth factor receptors and epidermal growth factor receptor in human glial tumors. *Cancer Res* 52:4550-4553,1992.
 45. Hermanson M, Funa K, Hartman M, et al. Platelet derived growth factors and its receptors in human glioma tissue: Expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer Res* 52:3213-3219,1992.
 46. Ashley DM, Kong FM, Bigner DD, et al. Endogenous expression of transforming growth factor beta1 inhibits growth and tumorigenicity and

- enhances Fas-mediated apoptosis in a murine high-grade glioma model. *Cancer Res* 58:302-309,1998.
47. Fakhrai H, Dorigo O, Shawler DL, et al. Eradication of established intracranial rat gliomas by transforming growth factor beta antisense gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:2909-2914,1996.
 48. Shweiki D, Itin A, Soffer D, et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359:843-845,1992.
 49. Plate KH, Breier G, Weich HA, et al. Vascular endothelial growth factor is a potential tumor angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 359:845-848,1992.
 50. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schuler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lutoff UM, Kleihues P. Genetic pathways to glioblastoma: a population based study. *Cancer Res* 64:6892-6899,2004.
 51. Lantos PL, Louis DN, Rosenblum MK, Kleihues P. Tumours of the nervous system. Oxford University Press: London, 2002.
 52. Berger SB, Prados DP. Textbook of neuro-oncology 2005, pp 143-148.
 53. Dohrmann GJ, Farwell JR, Flannery JT. Glioblastoma multiforme in children. *J Neurosurg* 44:442-448,1976.
 54. Wrensch M, Minn Y, Chew T et al. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuronkol* 4:278-299,2002.
 55. Inskip PD, Trone RE, Hatch EE et al. Cellular telephone use and brain tumors. *N Engl J Med* 344:79-86,2001.
 56. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 21:2683-710,2007.

57. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 170:1445-53, 2007.
58. Knott JC, Mahesparan R, Garcia-Cabrera I, Bolge TB, Edvardsen K, Ness GO, Mork S, Lund-Johansen M, Bjerkvig R. Stimulation of extracellular matrix components in the normal brain by invading glioma cells. *Int J Cancer* 75:864-872, 1998.
59. Dropcho EJ, Soong SJ. The prognostic impact of prior low grade histology in patients with anaplastic gliomas: a case-control study. *Neurology* 47:684-690, 1996.
60. Cha S. Update on brain tumor imaging: from anatomy to physiology. *AJNR Am J Neuroradiol* 27:475-87, 2006.
61. Chen W. Clinical applications of PET in brain tumors. *J Nucl Med* 48:1468-81, 2007.
62. Young GS. Advanced MRI of adult brain tumors. *Neurol Clin* 25:947-73, 2007.
63. Glantz MJ, Cole BF, Forsyth PA, et al. Practice parameter: anticonvulsant prophylaxis in patients with newly diagnosed brain tumors: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 54:1886-93, 2000.
64. Asthagiri AR, Pouratian N, Sherman J, Ahmed G, Shaffrey ME. Advances in brain tumor surgery. *Neurol Clin* 25:975-1003, 2007.
65. Devaux BC, O'Fallon JR, Kelly PJ. Resection, biopsy and survival in malignant glial neoplasms. A retrospective study of Clinical parameters, therapy and outcome. *J. Neurosurg* 78:767-775, 1993.
66. Lacroix M, Abi-Said D, Fournier DR et al. A multivariate analysis of 416 patients with Glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection and survival. *J. Neurosurg* 95:190-198, 2001.

67. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicenter phase III trial. *Lancet Oncol* 7:392-401, 2006.
68. Butowski NA, Sneed PK, Chang SM. Diagnosis and treatment of recurrent high grade astrocytoma. *J Clin Oncol* 24:1273-80, 2006.
69. Brem H, Piantadosi S, Burger PC et al. Placebo controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery biodegradable polymers of chemotherapy for gliomas. *Lancet* 345:1008-1012, 1995.
70. Fecci PE, Sweeney AE, Grossi PM, Nair SK, Learn CA, Mitchell DA, Cui X, Cummings TJ, Bigner DD, Gilboa E, Sampson JH. Systemic anti-CD25 monoclonal antibody administration safely enhances immunity in murine glioma without eliminating regulatory T cells. *Clin Cancer Res* 12:4294-4305, 2006.
71. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 9:157-73, 2006.
72. Powis G, Montfort WR. Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:261-95, 2001.
73. Mustacich D, Powis G. Thioredoxin reductase. *Biochem J* 346:1-8, 2000.
74. Ayene IS, Stamato TD, Mauldin SK, Biaglow JE, Tuttle SW, Jenkins SF, et al. Mutation in the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene leads to inactivation of ku dna binding during oxidative stress. *J Biol Chem* 277:9929-35, 2002.

75. Nishinaka Y, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J. Redox control of cellular function by thioredoxin: A new therapeutic direction in host defence. *Arch Immunol Ther Exp* 49:285-92, 2001.
76. Jordan A, Reichard P. Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem* 67:71-98, 1998.
77. Biaglow JE, Mitchell JB, Held K. The importance of peroxide and superoxide in the x-ray response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 22:665-9, 1992.
78. Berggren MI, Husbeck B, Samulitis B, Baker AF, Gallegos A, Powis G. Thioredoxin peroxidase-1 (peroxiredoxin-1) is increased in thioredoxin-1 transfected cells and results in enhanced protection against apoptosis caused by hydrogen peroxide but not by other agents including dexamethasone, etoposide, and doxorubicin. *Arch Biochem Biophys* 392:103-9, 2001.
79. Hirota K, Murata M, Sachi Y, Nakamura H, Takeuchi J, Mori K, et al. Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus: A two step mechanism of redox regulation of transcription factor nf-kb. *J Biol Chem* 274:27891-7, 1999.
80. Semenza GL. Hypoxia, clonal selection, and the role of hif-1 in tumor progression. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 35:71-103, 2000.
81. Yasuda S, Aii S, Mori A, Isobe N, Yang W, Oe H, et al. Hexokinase ii and vegf expression in liver tumors: Correlation with hypoxia-inducible factor 1 alpha and its significance. *J Hepatol* 40:117-23, 2004.
82. Arner ES, Nakamura H, Sasada T, Yodoi J, Holmgren A, Spyrou G. Analysis of the inhibition of mammalian thioredoxin, thioredoxin reductase, and glutaredoxin by cis-diamminodichloroplatinum (ii) and its major metabolite, the glutathione-platinum complex. *Free Radic Biol Med* 31:1170-8, 2001.

83. Kirkpatrick DL, Kuperus M, Dowdeswell M, Potier N, Donald NJ, Kunkel M, et al. Mechanisms of inhibition of the thioredoxin growth factor system by antitumor 2-imidazolyl disulfides. *Biochem Pharmacol* 55:987-94, 1998.
84. Kunkel MW, Kirkpatrick DL, Johnson JI, Powis G. Cell line-directed screening assay for inhibitors of thioredoxin reductase signaling as potential anti-cancer drugs. *Anticancer Drug Des* 12:659-70, 1997.
85. Sugimoto N, Inoue T, Takeshita K, Nakamura H, Yodoi J. Effects of a new anti-rheumatic drug ke-298 and its active metabolite: Ke-758 on secretion of thioredoxin and on the level of intracellular glutathione in human monocytes and T cells. *Mol Immunol* 38:793-9, 2001.
86. Magda D, Lepp C, Gerasimchuk N, Lee T, Sesler JL, Lin A, et al. Redox cycling by motexafin gadolinium enhances cellular response to ionizing radiation by forming reactive oxygen species. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 51:1025-36, 2001.
87. Chi AS, Wen PY. Inhibiting kinases in malignant gliomas. *Expert Opin Ther Targets* 11:473-96, 2007.
88. Sathornsumetee S, Rich JN, Reardon DA. Diagnosis and treatment of high grade astrocytoma. *Neurol Clin* 25:1111-39, 2007.
89. Sathornsumetee S, Reardon DA, Desjardins A, Quinn JA, Vredenburgh JJ, Rich JN. Molecularly targeted therapy for malignant glioma. *Cancer* 110:13-24, 2007.
90. Rich JN, Reardon DA, Peery T, et al. Phase II trial of gefitinib in recurrent gliomas. *J Clin Oncol* 22:133-42, 2004.
91. Wen PY, Yung WK, Lamborn KR, et al. Phase I/II study of imatinib mesylate for recurrent malignant gliomas: North American Brain Tumor Consortium Study 99-08. *Clin Cancer Res* 12:4899-907, 2006.

92. Galanis E, Buckner JC, Maurer MJ, et al. Phase II trial of temsirolimus (CCI-779) in recurrent glioblastoma multiforme: a North Central Cancer Treatment Group Study. *J Clin Oncol* 23:5294-304, 2005.
93. Yokomizo A, Ono M, Nanri H, Makino Y, Ohga T, Wada M, Okamoto T, Yodoi J, Kuwano M, Kohno K. Cellular levels of thioredoxin associated with drug sensitivity to cisplatin, mitomycin C, doxorubicin, and etoposide. *Cancer Res* 55:4293-4296, 1995.
94. Ueda S, Masutani H, Nakamura H, Tanaka T, Ueno M, Yodoi J. Redox control of cell death. *Antioxid Redox Signal* 4:405-414, 2002.
95. Soini Y, Kahlos K, Napankangas U, Kaarteenaho-Wiik R, Sally M, Koistinen P, Pääkkö P, Holmgren A, Kinnula VL. Widespread expression of thioredoxin and thioredoxin reductase in non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 7:1750-1757, 2001.
96. Thelander L. Thioredoxin reductase. Characterization of a homogenous preparation from *Escherichia coli* B. *J Biol Chem* 242:852-859, 1967.
97. Zhang P, Liu P, Kang SW, Seo MS, Rhee SG, Obeid LM. Thioredoxin peroxidase in a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of bcl-2. *J Biol Chem* 272:30615-30618, 1997.
98. Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, Kawabata M, Miyazano K, Ichijo H. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J* 17:2596-2606, 1998.
99. Raffel J, Bhattacharyya AK, Gallegos A, Cui H, Einspahr JG, Alberts DS, et al. Increased expression of thioredoxin-1 in human colorectal cancer is associated with decreased patient survival. *J Lab Clin Med* 142:46-51, 2003.
100. Jarvela S, Bragge H, Paunu N, Jarvela T, Paljarvi L, Kalimo H, Helen P, Kinnula V, Soini Y, Haapasalo H. Antioxidant enzymes in oligodendroglial

- brain tumors: association with proliferation, apoptotic activity and survival. *J Neurooncology* 77:131-140, 2006.
101. Haapasalo H, Kyläniemi M, Paunu N, Kinnula VL, Soini Y. Expression of antioxidant enzymes in astrocytic brain tumors. *Brain Pathol* 13:155-164, 2003.
102. Carde P, Timmerman R, Mehta MP, Koprowski CD, Ford J, Tishler RB, et al. Multicenter phase Ib / II trial of radiation enhancer motexafin gadolinium in patients with brain metastases. *J Clin Oncol* 19:2074-2083, 2001.
103. Rodrigus P. Motexafin gadolinium: A possible new radiosensitizer. *Expert Opin Investig Drugs* 12:1205-1210, 2003.