



**MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI**

**DERECE II OLİGODENDROGLİOMLARIN
ANJİYOJENİK NİTELİKLERİNİN
NÜKS ZAMANI İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. MUSTAFA GÜDÜK
UZMANLIK TEZİ**

Danışman: Doç. Dr. TÜRKER KILIÇ

İSTANBUL, 2007

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
1. GİRİŞ-AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	8
2.1. Oligodendrogliomlar.....	8
2.1.1. Tarihçe-Tarif.....	8
2.1.2. Epidemiyoloji.....	8
2.1.3. Histopatoloji.....	9
2.1.4. Genetik.....	11
2.1.5. Klinik.....	11
2.1.6. Radyoloji.....	12
2.1.7. Tedavi.....	13
2.2. Floresan in-situ hibridizasyon (FISH).....	15
2.3. Anjiyojenez.....	18
2.3.1. Anjiyojenez basamakları.....	19
2.3.2. Anjiyojenez modelleri.....	21
2.3.2.1. Kornea anjiyojenez modeli.....	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. Hasta seçimi.....	23
3.2. FISH uygulaması.....	24
3.2.1. Hücre eldesi.....	24
3.2.2. Prob uygulaması ve hibridizasyon.....	24
3.2.3. Yıkama ve zıt boyama.....	25
3.2.4. Değerlendirme.....	25
3.3. Kornea anjiyojenez modeli uygulaması.....	26
4. BULGULAR.....	28
4.1. Anjiyojenik potansiyellerin karşılaştırılması.....	29
4.2. Kaplan-Meier analizleri.....	30

4.3. Örnek olgular.....	33
5. TARTIŞMA.....	36
5.1. Düşük Dereceli Oligodendrogliomlarda Anjiyojenez.....	36
5.2. Anjiyojenez Radyoloji İlişkisi.....	37
5.3. 1p/19q LOH Anjiyojenez İlişkisi.....	38
6. SONUÇLAR.....	39
7. KAYNAKLAR.....	40

ÖZET

Bu çalışmada düşük dereceli oligodendrogliomların anjiyojenik potansiyelleri fare kornea anjiyojenez modeli (KAM) ile çalışılmış ve radyolojik kontrast tutulumu, 1p/19q heterozigosite kaybı (LOH) ve tümör nüksü süresi ile karşılaştırılmıştır.

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji ABD ve Marmara Üniversitesi Nörolojik Bilimler Enstitüsünde Ocak 1986-Ekim 2006 tarihleri arasında yeni belirlenen supratentoryal tümör tanısı ile opere olan ve oligodendrogliom derece 2 (WHO sınıflaması) tanısı alan toplam 102 hasta arasından, cerrahi sonrası 24 saatlik manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ile teyit edilmiş total rezeke, doku örnekleri tümör bankasında saklanmış ve izlemi esnasında radyolojik nüksü tespit edilmiş olan hastalar örneklem grubunu oluşturmuştur. Yarıısı cerrahi öncesi MRG'de kontrast tutan, diğer yarıısı ise kontrast tutmayan ve hiçbir cerrahi sonrasında, nükse kadar ek tedavi almayan toplam 20 oligodendrogliom derece 2 olgusu seçildi. Yirmi olgunun tümör dokusu fare korneasına ekildi ve 4., 8., 12. ve 16. günlerde gözlenerek korneada gelişen anjiyojenez derecelenmesi yapıldı. Aynı zamanda tümörlerde floresan in-situ hibridizasyon tekniği ile 1p36, 19q13 LOH araştırıldı.

KAM ile gösterilen anjiyojenik potansiyeller, 60 ay sonrası nüks edenlerle, daha kısa zamanda nüks edenler arasında anlamlı olarak farklıydı. MRG'deki kontrast tutulumu anjiyojenik aktivite ile ilişkiliyken, 1p/19q LOH'nin ise anjiyojenik potansiyelde önemli bir belirleyici olmadığı görüldü. Olguların nüks süreleri, kontrast tutulumu ve kornea anjiyojenez dereceleri ile bağlantılı iken, 1p/19q LOH ile arada bir bağlantı tespit edilmedi.

Bu çalışma oligodendrogliomlarda anjiyojenezi araştıran ilk laboratuvar çalışmasıdır. Tüm olgular oligodendrogliom derece 2 olmasına rağmen, anjiyojenik potansiyellerinin değişkenlik gösterdiği ve anjiyojenik potansiyel ile nüks arasında anlamlı bağlantı olduğu saptanmıştır. Anjiyojenez inhibitörlerinin tedavide, radyolojik anjiyojenez işaretleyicilerinin ise klinik

belirteç olarak kullanılması, çalışmamızın kliniğe ilk uygulama alanları olacaktır.

ANAHTAR SÖZCÜKLER : Oligodendrogliom, gliom, anjiyojenez, glial, 1p/19q

ABSTRACT

In this study, the angiogenetic potential of oligodendroglioma WHO grade 2 tumors were studied by rat cornea angiogenesis model and compared the relationships between radiologic contrast enhancement, 1p/19q loss of heterozygosity (LOH), and time to radiologic tumor recurrence.

From a total of 102 cases that had been operated in Marmara University Department of Neurosurgery and Marmara University Institute of Neurologic Sciences between January 1986-October 2006 and had oligodendroglioma grade 2 diagnosis, 20 cases have been chosen; 10 of those were enhancing with contrast in preoperative MRI, while 10 were not. All of those 20 had total excision verified by postoperative 24 hour MRI, and none had an adjuvant treatment unless a recurrence was noted. The time to radiologic tumor recurrence of all were noted. The tumor samples of those 20 kept in tumor bank were embedded into rat corneas and observed on day 4, 8, 12 and 16 and visual grading was done. At the same time 1p/19q LOH study was performed on those tumors by fluorescent in-situ hybridization (FISH).

While the time to tumor recurrence of those cases were correlated with contrast enhancement and cornea angiogenesis grades either on day 4, 8, 12 or 16, but 1p/19q LOH; and the angiogenetic potentials of tumors verified by cornea angiogenesis model were significantly different between those having a time to tumor recurrence >60 months and those having ≤60 months, and according to contrast enhancement status in preoperative MRI; 1p/19q LOH was not a significant determinant of angiogenetic potential.

This is the first experimental study about the angiogenetic potential of oligodendroglioma grade 2. Though all tumors were oligodendroglioma grade 2, their angiogenetic potentials were much heterogeneous and angiogenetic potential seems to have an important role on time to tumor recurrence. Use of angiogenesis inhibitors in treatment, and radiologic angiogenesis markers

in grading and predicting time to tumor recurrence may be the first clinical applications of our study.

KEYWORDS : Oligodendroglioma, glial, glioma, angiogenesis, 1p/19q

SİMGELER VE KISALTMALAR

BT	: Bilgisayarlı tomografi
CI	: Güvenilirlik aralığı (İng: Confidence interval)
CNS	: Central nervous system
COX-2	: Siklooksijenaz – 2
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EGF	: Epidermal büyüme faktörü (İng: Epidermal growth factor)
EORTC	: Kanser Araştırmaları ve Tedavisi Çalışması için Avrupa Organizasyonu (İng: European Organisation for Research and Treatment of Cancer Study)
FISH	: Floresan in-situ hibridizasyon (İng: Fluorescent in-situ hybridization)
FITC	: Floresan izotiosiyanat
GBM	: Glioblastoma multiforme
Gr	: Grekçe
İng	: İngilizce
İSH	: İn - situ hibridizasyon
KAD	: Kornea anjiyojenez derecesi
LOH	: Heterozigosite kaybı (İng: Loss of heterozygosity)
M	: Molar
MRG	: Manyetik rezonans görüntüleme
MRI	: Magnetic rezonance imaging
MRS	: Manyetik rezonans spektroskopisi
NAA	: n-asetil asetik asit
PCV	: Prokarbazin, kloroetilsikloheksilnitrozüre (CCNU), vinkristin
PDGF	: Trombosit kökenli büyüme faktörü (İng: Platelet derived growth factor)

PDGF-R	: Trombosit kökenli büyüme faktörü reseptörü (İng: Platelet derived growth factor receptor)
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Dakikadaki devir (İng: Revolution per minute)
RPMI	: Roswell Park Memorial Enstitüsü medyumı (Roswell Park Memorial Institute medium)
SD	: Standart deviasyon
SSS	: Santral sinir sistemi
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü (İng: Vascular endothelial growth factor)
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü (İng: World Health Organization)

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Oligodendrogliomlar, diğer glial tümörlerden kemoterapiye verdikleri olumlu yanıt ve iyi prognozları ile ayrılırlar (1, 2, 3). Cairncross ve ark. (2) tarafından 1998 yılında kemosenitif tümörler olduklarının gösterilmesi, kemoterapinin tedavi yöntemi olarak kullanım ve geçerlilik taşımadığı nöroonkolojide büyük bir yenilik olmuştur. Zaman içinde, oligodendrogliomların bu özelliği nedeni ile pek çok genetik, histopatolojik kriter üzerinde çalışma yapılmış fakat 1p36, 19q13 LOH'nin anaplastik oligodendrogliomlarda kemosenitivite belirleyicisi olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bunun gösterilmesi sonrası bu konuda da çalışmalar ve tartışmalar devam etmektedir. Bazı gruplar tarafından 1p36/19q13 LOH'nin zaten iyi prognoz belirleyicisi olduğu savını desteklemektedir (4).

Tümör anjiyogenez ve bunun prognozdaki muhtemel rolünün ortaya konmasından sonra (5), beyin tümörlerinde anjiyogenez dair ilk çalışma 1974 yılında yapılmıştır (6) ve pekçok farklı tümör türünde ve serebral vasküler malformasyonlarda (7, 8, 9, 10, 11, 12) anjiyogenik belirteç ve anjiyogenik potansiyellere dair çalışma mevcuttur. Serebral astrositomlarda, 1976 yılında kornea ve vitre modellerinde, anjiyogenik potansiyeller araştırılmış ve korneada anjiyogenik indüksiyon altında tümör büyümesinin olduğu gösterilirken, aynı tümörler korneadan alınıp anjiyogenezin inhibe edici ortam olarak vitreye aktarıldığında büyümelerinin bir süre için yavaşladığı gözlenmiştir (13). Aynı yıl, koryoallantoik zar modelinde bazı deneysel karsinom ve melanom modelleri ile beraber insan meningiom ve GBM hücrelerinin anjiyogenik potansiyelleri araştırılmış, meningiom ve GBM'in en yüksek etkinlikte olduğu görüldükten sonra, bu tümörlerin in-vivo vasküleritesinin diğer tümörlere göre en yüksek olmasından hareketle tümör vasküleritesi ile anjiyogenik potansiyellerin ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (14).

Frame ve ark. (15) insan erişkin gliomlarında plazminojen aktivatörü ve tümör anjiyogenez faktörleri ile malignite arasında bağlantı olduğunu göstererek, anjiyogenezin malignite ve dolayısı ile prognozdaki muhtemel rolü

olduğunu ileri sürmüşlerdir. Aynı yıl McComb (16) malignant gliomların biyolojisine dair yazdığı bir derlemede anjiyogenez ve malignant gliomlardaki muhtemel rolüne dair literatürden bahsetmiştir.

Anjiyogenezin tümör oluşumu ve ilerlemesindeki rolü ortaya konulup, anjiyogenez inhibisyonunun bu tümörlerin tedavisinde kullanılabileceğini beyin tümörlerinde ilk olarak, deneysel astrositom modelinde, ibuprofen kullanarak Farrell ve ark. 1988 yılında göstermişlerdir (17). Muhtemel tedavi edici etkisinin ibuprofenin prostaglandin bağlantılı anjiyogenezini inhibisyonu ile olduğunu düşünmüşlerdir. Ariza ve ark. (7) GBM ile anaplastik astrositom, reaktif gliosis ve düşük dereceli astrositom anjiyojenik potansiyellerini karşılaştırmış ve GBM'de anlamlı anjiyojenik etkinlik tespit ederken, düşük dereceli astrositomlarda bunu düşük düzeylerde bulmuşlardır. Yalnız bu çalışmada anjiyojenik potansiyel belirleyicisi olarak renin seviyeleri değerlendirilmiştir.

Glial tümörlerde, özellikle GBM ve astrositik tümörlerde, 1990'dan itibaren, anjiyogenez ve antianjiyojenik ilaçların nöroonkolojide kullanımı konusunda yayınların sayısı belirgin artmaktadır. Tamargo ve ark. (18) 1990 yılında, 9L gliom hücre dizilerinde, biyolojik olarak indirgenebilen polianhidrid polimerine bağlı, yavaş salımlı olarak uygulanan antianjiyojenik etkinliği bilinen heparin ve kortizonun gerek tek tek gerekse kombine kullanımının, gliomların büyümesini yavaşlattığını göstermişlerdir. Aynı yıl içinde, Brem ve ark. (19) önemli bir anjiyojenik kofaktör olan bakır vücuttan atarak, antianjiyojenik etkinlik gösteren penisilaminin, farelerde beyin tümörlerinin büyümesini inhibe ettiklerini göstermişlerdir. Maxwell ve ark. (20), 1990 yılında astrositomlarda bazı anjiyojenik faktörlerin ve reseptörlerinin yüksekliğini tespit etmiş ve maligniteyle ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Zagzag ve ark. da (21) GBM ve astrositomlarda, normal beyin damar endotelinden farklı olarak bazik-fibroblast büyüme faktörünün mevcudiyetini ve etkinliğini göstererek, anjiyogenezin malignite de önemli olabileceğini göstermişlerdir.

Silbergeld ve ark. (22)1991 yılında insan astrositom hücrelerinin, normal endotel hücrelerinde, proliferasyonu ve anjiyogenezi tetikleyici özelliklerini in-vitro göstermişlerdir. Stefanik ve ark. ise (26) GBM içindeki astrositlerin ve vasküler yapılarının normal beyne göre aşırı miktarlarda asidik ve bazik fibroblast büyüme faktörü içerdiğini parafin dokularda immünohistokimya yöntemi ile göstermişlerdir. Plate ve ark. (23) 1992 yılında, PDGF-R betanın GBM oluşumu sırasında indüklendiğini, gelişimi sırasında ise arttığını fakat derece 2 astrositom ve anaplastik oligoastrositomlarda bunların görülmediğini göstermişlerdir. Shweiki ve ark. (24) ise vasküler endotelyal büyüme faktörünün (VEGF) hipoksi tarafından başlatılan anjiyogeneizde etkili olduğunu gösterirken, aynı sonucun insan gliomları içinde geçerli olduğunu atimik farelerde in-vivo olarak göstermişlerdir. Goldman ve ark. (25) 1993 yılında, epidermal büyüme faktörünün (EGF) VEGF yapımını artırarak GBM patofizyolojisinde rolü olduğunu ileri sürmüştür.

Antianjiyojenik etkinin tedavide kullanılması ile ilgili yapılan önemli çalışmalardan biri Taki ve ark. (27) tarafından antianjiyojenik etkili TNP-470'in gliom tedavisinde etkinliğinin in-vivo olarak gösterilmesi, bir diğeri de, Millauer ve ark. (28) tarafından ise VEGF reseptörü olan Flk-1 eksprese etmeyen atimik farelerde GBM büyümesinin in-vivo olarak inhibe olduğunun gösterilmesidir.

Ayrıca, Takamiya ve ark. (29) 1994 yılında önemli bir antianjiyojenik ajan olan AGM-1470'in GBM'lere karşı etkinliğini hem in-vivo hem de in-vitro olarak göstermişlerdir.

Kılıç ve ark. ise 2000 yılında, (30) fenilaminopirimidin grubundan oral yolla alınabilen bir kinaz inhibitörü antianjiyojenik ajanın GBM'lerdeki PDGF kontrolü altındaki büyümeyi inhibe edebildiğini göstermişlerdir.

Diğer bir önemli ve ilginç çalışma 1994 yılında van Meir ve ark.dan gelmiştir (31). Bu grup, astrositomlarda anjiyojenik etkinlik artışı yaratan vahşi türde p53 mutasyonu oluşturduktan sonra çevre hücrelerin antianjiyojenik etkenler salgılamaya başladığını, belkide vücudun da tümörle savaşımında

antianjiyojenik etkenleri kullanabileceğini göstermişlerdir. Aynı yıl içinde, Plate ve ark. (32) VEGF'in glioma anjiyojenezindeki rolü konusuna hem İSH, hem de immünohistokimyasal yöntemlerle daha kesin kanıtlar sunmuştur. Fakat Wesseling ve ark. (33) ilk defa GBM'lerde anjiyojenik belirteçleri bilgisayar yardımlı ve çoklu parametreleri olan bir değerlendirmeye tabii tutmuş aynı tümörlerin kendi içinde dahi anjiyojenik belirteçler açısından çok belirgin değişkenlik gösterdiğini bulduktan sonra antianjiyojenik tedavilerin geçerliliği konusunun tekrar tekrar sorgulanması gerektiğini ifade etmişlerdir.

Bu dönem ve sonrasındaki yayınlarda beyin tümörlerinde anjiyojenezin rolü ve antianjiyojenik ajanların hatta antianjiyojenik gen tedavilerinin nöroonkolojide olası kullanılabilirliğine dair birbirinin benzeri pekçok çalışma ve derleme yapılmış olmasına rağmen, radyolojinin özellikle MRG'nin bu tarz bir çalışmada kullanılmasına dair ilk yazı 1995 yılında Abramovitch ve ark.dan gelmiştir (34). Bu çalışmada farelere implante edilen C6 gliom sferoidlerinin anjiyojenez MR tekniği ile takip edilmiş, gross ve immünohistokimyasal sonuçlarla korrele olduğu gösterilmiştir, daha sonra Aronen ve ark. (35) eko-planar MR görüntülemelerin düşük ve yüksek dereceli gliomlarda beyin kan hacmi ve tümörün muhtemel anjiyojenik potansiyelini ölçebilirliğini ve bunun klinik uygulanabilirliğini araştırmışlar ve nöroonkolojide anjiyojenez çalışmalarına yeni bir boyut eklemişlerdir. Yine, 1995 yılında Fine (36), malignant gliomlarda antianjiyojenik tedaviyi, immünoterapi ve gen tedavisi ile beraber irdelleyen ilk derlemeyi yayınlamıştır.

Leon ve ark. ise 1996 yılında (37) astrositik tümörlerden ve oligoastrositomlardan oluşan 93 hastalık bir seride retrospektif olarak anjiyojenik potansiyelin doğrudan histomorfolojik görüntüsü olan mikrodamar yoğunluğu ile sağkalımı karşılaştırarak glial tümörlerde, anjiyojenez prognoz ilişkisine dair ilk araştırmayı yayınlamışlardır.

Pietsch ve ark. 1997 yılında (38) oligodendrogliomlarda, VEGF immünoaktivitesinin olmadığını, bunun bu tümörlerde anjiyojenik etkinliğin düşüklüğü veya başka bir etken tarafından düzenlendiği şeklinde

yorumlanması gerektiğini ileri sürmüşlerdir. Christov ve ark. (39) 1998 yılında 13'ü derece 2, 24'ü derece 3 oligodendrogliomlardan oluşan bir seride, VEGF ekspresyonunun düşük dereceli oligodendrogliomlarda da mevcut olmakla beraber, derece 2 ve 3 oligodendrogliomlar arasında da anlamlı ekspresyon farkı olduğunu immünohistokimyasal olarak göstermişlerdir. Aynı yıl Assimokopoulou ve ark. (8) düşük ve yüksek dereceli glial tümörlerde, meningiomlarda ve medulloblastomlarda mikrodamar yoğunluğu ile ilgili bir araştırma yapmışlar düşük dereceli oligodendrogliomlarda bu yoğunluğun en düşük olduğunu görmüşlerdir. Chan ve ark. da (40) 10 ependimom, 12 düşük dereceli oligodendrogliom, 3 anaplastik oligodendrogliom, 6 düşük dereceli astrositom, 5 anaplastik astrositom ve 20 GBM'den oluşan bir seride düşük dereceli oligodendrogliomlarda VEGF ekspresyonunu düşük yoğunlukda gösterebilmişlerdir.

Schiffer ve ark. (41) derece 2 ve 3 oligodendrogliomlardan oluşan 95 olguluk bir seride, anjiyogenezin doğrudan histomorfolojik göstergeleri olan endotel hücre hiperplazisi, mikrovasküler proliferasyon ve kapiller yoğunlukla sağkalım arasında anlamlı bir bağlantı bulamamışlardır; hatta yaş, cerrahi rezeksiyon miktarı, postoperatif Karnofsky skoru ve MIB-1 indeksi ile anlamlı bağlantı gösterdiğini görmüşlerdir. Benzeri bir çalışmada Vaquera ve ark. 36 olguluk düşük dereceli oligodendrogliom serisinde (42), düşük dereceli oligodendrogliomlarda VEGF ekspresyonu izlenmediğini, mikrodamar yoğunluğunun ise sağkalımla hiçbir ilişkisinin mevcut olmadığı, hatta yaş ve cerrahi rezeksiyon miktarının ana belirleyici olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Fakat yine Vaquera ve ark. 2001 yılında yaptıkları (43), 26 düşük dereceli oligodendrogliom olguluk bir çalışmada damar endotel yüzeyi endeksi ile uzun dönemli prognoz arasında anlamlı ilişki olduğunu ve anjiyogenezin düşük dereceli oligodendrogliomlarda da önemli bir belirleyici olduğunu öne sürmüşlerdir. Vaquera'nın 2002 yılında yapılan bir çalışmasında (44) ise 26 oligodendrogliom olgusunun, ameliyat öncesi BT incelemelerinde kontrast tutulumu ile patolojik spesimenlerde tümör anjiyogenez endeksi karşılaştırılmış ve anjiyogenez ile prognoz arasında anlamlı bağlantı olduğu

ve BT'de kontrast tutulumunun önemli bir anjiyogenez işaretleyicisi olduğu gösterilmiştir.

Birner ve ark. (45) ise 51 supratentoryal oligodendrogliomda, anjiyogenezde rol aldığı düşünülen bir etken olan HIF-1 alfa ve mikrodamar yoğunluğuna bakmış ve bunlarla tümör derecesi arasında bir bağlantı olmadığını, çoğunlukla bu etkenlerin ekspresyonunun düşük veya orta şiddette olduğunu fakat bu etkenlerin prognoz ve sağkalımda belirleyici olduğunu göstermişlerdir. Chaundry ve ark. (46) GBM, anaplastik ve düşük dereceli astrositom, anaplastik ve düşük dereceli oligodendrogliom ve pilositik astrositomları kapsayan bir tümör grubunda VEGF çalışmış ve oligodendrogliomlarda da anlamlı VEGF ekspresyonu olduğunu ve tümör derecesi ile bağlantılı olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Buccoliero ve ark. (47), tümör anjiyogenezinde olduğu kadar, metastaz ve progresinde de önemli olduğu gösterilmiş olan siklooksijenaz-2'nin (COX-2) GBM, düşük ve yüksek dereceli oligodendrogliomlardaki immünekspresyonu araştırılmış, düşük dereceli oligodendrogliomlarda, çok az ekspresyon olmakla beraber bu grup tümörlerin kendi içinde prognozunda COX-2 ekspresyonunun, yani anjiyogenik aktivitenin önemli bir kötü prognoz belirleyicisi olduğu bulunmuştur.

Radyoloji ve anjiyogenez korelasyonuna dair önemli bir çalışma, Maia ve ark.nın (48) çalışmasıdır. Bu çalışmada, düşük dereceli glial tümör olduğu ameliyat öncesi beyin MRG görüntüleri ile düşünülen hastalara ek olarak serebral kan hacmini gösterecek biçimde spin eko-eko planar proton ağırlıklı görüntüleme yapılmış ve serebral kan hacmi ile VEGF ekspresyonu ve WHO patolojik derecelerinin ilişkili olduğu görülmüştür. Ayrıca, Law ve ark. (49) perfüzyon MR ile tümör hacmi ve serebral kan hacmini ölçmüş, serebral kan hacmi ile patolojik derece ve sağkalım arasında anlamlı bağlantı bulmuşlardır.

Boudouresque ve ark. (50) 2005 yılında önemli bir mitojen ve anjiyogenik etken olan adrenomedullini GBM, anaplastik astrositom ve düşük dereceli astrositom ve oligodendrogliomlarda mRNA seviyelerinde çalışmış

ve GBM ve anaplastik astrositelerde çok yüksek adrenomedullin saptarken, düşük dereceli tümörlerde çok kısıtlı seviyelerde olduğunu göstermişlerdir. Lim ve ark. (51) ise yine anjiyojenik bir marker olan integrini çeşitli tümörlerde çalışmışlar ve vestibüler Schwannomlar, ependimomlarda güçlü integrin ekspresyonu olmasına rağmen, oligodendrogliom, pilositik astrositom ve medulloblastomlarda integrin ekspresyonunun çok değişken olduğunu görmüşlerdir. Aynı yıl, Salmaggi ve ark. (52) düşük dereceli astrositom, oligoastrositom ve oligodendrogliomdan oluşan 50 hastalık bir seride, total rezeksiyon, mikrodamar yoğunluğu ve anjiyojenez ilişkili bir kemokin olan CXCL-12 düzeylerini çalışmış, total rezeksiyonun tümör nüksüne kadar geçen süre ve sağkalıma anlamlı katkısı olduğunu, yine CXCL-12 düzeyleri ile ters orantılı olduklarını göstermişler ve buradan anjiyojenik etkinliğin prognozda önemli olabileceği sonucuna ulaşmışlardır.

Çalışmamızda, supratentoryal düşük dereceli oligodendrogliomların kornea anjiyojenez modelinde anjiyojenik potansiyelini araştırırken, bunun tümör nüks süresi, 1p/19q LOH ve preoperatif beyin MRG'de kontrast tutulumu ile ilişkisini araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Oligodendrogliomlar

2.1.1. Tarihçe-Tarif

Oligodendrogliomların ilk tanımlanması 1926 tarihinde Bailey ve Cushing tarafından glial tümörlerin sınıflanmasına dair çalışmalarında yapılmıştır (53). Bailey ve Bucy, 1929 yılında 13 olguluk oligodendrogliom serilerini yayınlamışlardır (54).

Günümüzde, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yapılan oligodendrogliom tanımı; "erişkinlerde görülen, iyi diferansiye, yaygın infiltrasyon gösteren, tipik olarak serebral hemisferlere yerleşik ve ağırlıklı olarak oligodendroglia morfolojisine benzeyen hücrelerden oluşan tümörler" biçimindedir (55). İkibin (56) ve 1993 (57) tarihli WHO beyin tümörleri sınıflamasında, oligodendrogliomlar nöroepitelyal kökenli beyin tümörleri grubundadır. Oligodendrogliomlar çoğunlukla serebral hemisferlerde, özellikle de frontal loblarda yerleşik tümörlerdir (58, 59, 60, 61). Çoğunlukla frontotemporal, perisylvian bölgede yerleşmişlerdir (58, 59, 60).

Ayrıca oligodendrogliomlar kesin olarak beyin dokusuna infiltre olmakla beraber, astrositik tümörlerden farklı olarak çevre beyin dokusundan keskin sınırlı olarak ayrılan yerler mevcuttur (58, 59, 60, 61).

2.1.2. Epidemiyoloji

Oligodendrogliomlar, tüm primer intrakranyal gliomların %4-7'sini oluşturmakla beraber (62, 63), son dönemde yapılan bazı çalışmalarda %20 gibi oranlar bildirilmiştir (64, 65). Hatta Daumas-Duport ve ark. 1997 tarihinde

oligodendrogliomların supratentoryal tümörlerin %33'ünü oluşturduğunu ileri sürmüşlerdir (66).

Oligodendrogliomlar, en sık dördüncü dekatta görülmekle beraber, bifazik yaş dağılımı vardır; 6-12 ve 26-46 yaşlarında en sık görülürler (66, 67). GBM ve astrositomların ardından en sık üçüncü gliom tipidir. Her iki cinstede eşit oranda görüldüğü kabul edilmekle beraber (3, 62), erkeklerde daha sık olduğunu bildirilen seriler de vardır (63, 68).

2.1.3. Histopatoloji

Santral sinir sisteminde (SSS) nöronlarla beraber mevcut olan ve myelin yapımı, trofik ve fagositik işlevlerin yanında nöronların birbirinden ayrımını da sağlayan nöroglia denilen ve astrositler, mikrogliya, ependimal hücreler ve oligodendrosit gibi hücre türlerinin bulunduğu yapı vardır (69). Her nöron hücrelerine karşılık yaklaşık 10 nöroglial hücre bulunmasına rağmen, bu hücreler daha küçük oldukları için sinir sisteminin total hacminin ancak yarısını kaplarlar (69).

Oligodendrositler, astrositlerden çok daha küçüktürler ve uzantıları diğer nöroglial hücrelerden çok daha az sayıda ve kısadır. Çekirdekleri astrositlerinkinden daha küçüktür ve daha yoğun boyanır. Oligodendrositlerin sayısı türler arasında farklılık gösterir ve daha gelişmiş türlerde daha fazla bulunur; insan sinir sistemi nöron başına düşen oligodendrosit sayısı açısından en fazla sayıya sahiptir (69).

Oligodendrositler, hem ak hem de boz maddede bulunur. Boz maddede daha çok perikaryonlar etrafına yerleşmişken, ak maddede myelinli nöron lifleri etrafında sıralanmış olarak bulunurlar. Fetal sinir dokusunun elektron mikroskopik çalışmaları, SSS myelin kılıfının oligodendrositler tarafından oluşturulduğunu göstermiştir (69).

Oligodendrositlerin sitoplazmaları, elektron yoğundur ve çok sayıda mitokondri, büyükçe bir Golgi kompleksi, kaba endoplazmik retikulum

sisternleri ve pek çok mikrotübül içerir ve bu özellikleri elektron mikroskopisinde kolayca tanınmalarını sağlar (69).

Oligodendrositlerden köken alan tümörler olan oligodendrogliomlar, makroskopik olarak yumuşak ve translusent yapılardır. Gross olarak görülebilen kalsifikasyonlar ayırıcı özellikleridir. Tümör hücrelerinin sitoplazmaları belirsiz sınırlıdır ve zayıf fibriller yapı gösteren bir matriks içinde yerleşmişlerdir. Çekirdekleri tipik olarak yuvarlak veya hafif lobüledir. Tümör hücreleri çok geniş bir histolojik yapıda dizilebilir, çoğunlukla yaygın veya psödolobüledirler. "Kümes teli görünümü" denilen ve hücrelerin dallanmış damar yapıları arasında lobüler yapılar oluşturacak biçimde bölünmesinden oluşan yapı tipiktir. Özellikle düşük dereceli oligodendrogliomlarda, stromada musin birikimine bağlı, intersellüler mikrokist oluşumu görülür. Tümör içinde özellikle kan damarları etrafında reaktif astrositler görülebilir. Hücre proliferasyon etkinliği genelde düşüktür. Yakın zamanlı bir çalışmada , düşük dereceli oligodendrogliomlarda MIB-1 değerinin 2'den az olduğu, 5'ten yüksek olanların ise kısa sağkalım süresi gösterdiği bulunmuştur. (70, 71)

Olgun oligodendrosit ve oligodendrositik hücreleri belirleyen protein ve antijenik belirteçlerin çoğu neoplastik oligodendrositlerde çoğu zaman mevcut değildir. Ayrıca, tümör sınıflamasında kullanılabilecek, oligodendrogliyal diferansiasyonu belirleyebilecek hiçbir özgün immünohistokimyasal belirteç yoktur (72, 73, 74, 75).

Oligodendrogliom hücreleri çoğunlukla vimentin eksprese etmezlerken (76), anaplastik oligodendrogliomlar çoğunlukla eksprese ederler (77). Bu genellikle teşhis ve derecelendirmede yararlı olmaktadır.

Anaplastik oligodendrogliomlar WHO tarafından derece 3 tümörler olarak gruplanmışlardır ve artmış sellülerite, yaygın çekirdek atipisi ve pleomorfizm, mitotik endekste artış ve nekrozla karakterizedir. Oligodendrogliom sellüleritesini gösterirken, aynı zamanda glioblastomların vaskülerite ve nekroz özelliklerini gösteren tümörler de anaplastik oligodendrogliom olarak sınıflanır (63, 78, 79).

2.1.4. Genetik

Oligodendrogliomlar, diğer glial tümörlerle ortak genetik değişiklikleri gösterebilmekle beraber, çoğu zaman onlardan farklı değişiklikler taşırlar. Her iki derecedeki oligodendrogliomlar, sıklıkla 1p (oligodendrogliomların %41'i) ve 19q (oligodendrogliomların %63'ü) LOH gösterirler (80, 81, 82, 83, 84, 85, 87). 19q LOH, astrositomların yanında, tüm oligodendrogliom derecelerinde görülmektedir. Kromozom 1p36 LOH oligodendrogliomlara özgüdür ve astrositomlarda çok nadir görülür (astrositomların %9'u) (80, 86).

1p LOH astrositik tümörlerde az olmakla beraber, p53 gen mutasyonları oligodendrogliomlarda nadirdir (86).

1p veya 1p/19q LOH olan oligodendrogliomların kemoterapiye yanıtı olmayanlara göre çok daha iyidir (2, 88, 89). 1p/19q delesyonu olan hastalar kemoterapi sonrası olmayanlara göre daha uzun nüksüz sağkalım göstermişlerdir. Bu moleküler biyolojinin günlük nöroonkoloji uygulamasındaki ilk örnekleri arasındadır.

Oligodendrogliomların çoğu trombosit kökenli büyüme etkeni (PDGF; İng: platelet derived growth factor) ve bunun reseptörünü (PDGF-R) eksprese etmektedir ki, bu büyüme etkeninin oligodendrogliomlarla otokrin bir ilişki içinde olduğunu düşündürmektedir (90).

2.1.5. Klinik

Nöbet, oligodendrogliomların kliniğinde en sık rastlanan yakınmadır (91, 92). Genelde, jeneralize tonik-klonik nöbetler olur (58). Nöbet, iyi huylu tümörlerin yıllarca tek göstergesi olabileceği için (93), nöbetle prezentasyonun, oligodendrogliomlarda iyi prognoz göstergesi olabileceği düşünülmektedir (94). Yine de, oligodendrogliomların yaklaşık yarısına yakını, fokal nörolojik defisit ve baş ağrısı ile başvurur. İntraventriküler yerleşimli

oligodendrogliomlarda kafa içi basınç artışına bağlı olarak başağrısı ile beraber görme semptomları ve papillödem görülebilir.

2.1.6. Radyoloji

Oligodendrogliomlar tipik olarak kapsülsüz, korteks ve leptomeninkslere uzanabilmekle beraber fokal, iyi sınırlı, genelde serebral hemisferik yerleşimli ak madde tümörleridir. Nadiren difüz ve sınırları belirsiz lezyonlarda görülebilmekle beraber anaplastik oligodendrogliomlarda bu oran daha fazladır. Kistik dejenerasyon ve kalsifikasyon, sıklıkla görülebilir. Anaplastik oligodendrogliomlarda kanama ve nekroz oldukça sıktır. En çok frontal loblarda, ardından temporal loblarda yerleşimli olmakla beraber, paryetal ve oksipital loblarda da görülebilirler. Nadiren (%1-10) intraventriküler yerleşimlidirler.

Oligodendrogliomların teşhisinde altın standard yöntem beyin MRG'dir. T1 ağırlıklı MRG'de, oligodendrogliomlar hem hipointens hem de izointens alanlar gösterirken, T2 ağırlıklı MRG'de, yaygın hiperintens alanlar görülür. Kontrast tutulumu tipik olarak zayıf ve heterojendir ve lezyonların yaklaşık %50'sinde görülür. Lezyon çevresinde minimal ödem görülebilir. Tümör yayılımını göstermekte MRG, bilgisayarlı tomografiye (BT) üstünken, kalsifikasyonların tespitinde BT daha üstündür.

Manyetik rezonans spektroskopisi (MRS) tetkikinde artmış kolin, azalmış n-asetil asetik asit (NAA) tipiktir. Anaplastik oligodendrogliomlarda artmış kolin/kreatin oranı, azalmış NAA görülürken, lipid/laktat oranında artış görülebilir.

BT incelemelerinde, oligodendrogliomlar tipik olarak %70-90 oranında kalsifikasyon içeren, heterojen dansite gösteren, sıklıkla kistik dejenerasyonun olduğu hemisferik kitleler olarak görülür. Bazı vakalarda kafatasının iç tabulasında erozyon görülebilir. Oligodendrogliomların üçte ikisi, BT'de kontrast verilmesi sonrası zayıf ve orta şiddette kontrast tutulumu gösterir.

Anjiyografi tetkiklerinde ise oligodendrogliomlar tipik olarak avasküler veya zayıf vasküler ve etrafındaki kortikal damarları geren lezyonlar olarak görülür. Anaplastik oligodendrogliomlarda anjiyojenez tespit edilebilir.

2.1.7. Tedavi

Şu zamana kadar, oligodendrogliomlarda, tedavi yöntemlerinin etkinliğini kıyaslayan ve ortaya koyan randomize, prospektif bir çalışma yoktur. Tüm primer beyin tümörlerinde olduğu gibi, oligodendrogliomlarda da tedavi kararı hastanın kliniği ve tümörün beklenen seyri temel alınarak yapılmaktadır (95). Bir dereceye kadar, oligodendrogliomların seyri, klinik ortaya çıkış, hastanın yaşı ve genel durumu ve tümörün radyolojik özellikleri (kitle etkisi, kontrast tutulumu) ile bağlantılıdır.

Oligodendrogliomların tedavisinde temel yöntemler cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir. Yalnız bazı gruplar tarafından genç, sadece nöbet yakınmaları olan, radyolojik görüntülemelerinde tipik düşük dereceli glial tümör ile uyumlu ve kitle etkisi ve kontrast tutulumu göstermeyen lezyonlarda takip de önerilmektedir. Takip öneren grupların başlıca savı bu lezyonların uzun sürelerle stabil kalmaları, cerrahi veya radyoterapi gibi tedavilerin ise klinik yakınmalara (örn: kognitif bozukluklar) neden olabileceğidir. Düşük dereceli oligodendrogliom ve oligoastrositomlardan oluşan 106 hastalık bir seride medyan sağkalım süresi 16,7 yıl olarak bulunmuştur (96). Yine aynı seride radyoterapi alan hastaların %15'i radyasyon nekrozu, %21'i kognitif bozukluk sorunu yaşamışlardır.

Günümüzde daha çok tercih edilen bu lezyonların bir şekilde tedavi edilmesidir. Tedavi yönündeki argümanlar, öncelikle doku tanısının elimizde olması ve bu lezyonlarda ileride progresyon ve hatta derece yükselmesi (malignitede artış) potansiyeli olan hücrelerin sayısının azaltılmasıdır (sitoreduksiyon) (97).

Elimizdeki öncelikli tedavi yöntemi cerrahidir. Cerrahide amaç total eksizyon olmakla beraber, tümörün elegant bölgelere yakınlığı, derin

yerleşimli olması gibi nedenlerle bu her zaman olası değildir fakat en azından doku tanısı olması için stereotaktik biyopsi düşünülmelidir.

Temel olarak her türlü tedavi planında histolojik tiplendirme ve derecelendirme gereklidir. Çoğu durumda kitle etkisi, kafa içi basınç artışı sendromu, nöbet gibi tümöre bağlı oluşan durumlarda cerrahiden yarar görecektir. Bazı çalışmalar, hem düşük hem de yüksek dereceli gliomların cerrahiden yarar gördüğü sonucuna ulaşmışlardır (95). Glial tümörlerde gross total eksizyonun daha uzun süreli hastalıksız sağkalım (İng: disease free survival) sağladığına dair bilgiler mevcuttur (98) fakat özellikle oligodendrogliomlarda bu konuya dair bilgiler net değildir ve prospektif data yoktur. Ayrıca bu çalışmaların çoğunda yaş, tümör derecesi, hastalığın prezentasyonu gibi eşlik eden etkenlerin hiçbirini elimine edilmemiştir (99, 100). Yine de cerrahinin yararının olmadığı sonucuna ulaşan çalışmalar yok değildir (101) fakat bu çalışmaların da tümü retrospektif ve kontrollü olmayan çalışmalardır.

Cerrahi sonrası radyoterapinin yüksek dereceli glial tümörlerde önemli yararı olduğu prospektif çalışmalarla gösterilmiş olmakla beraber, bu konu düşük dereceli gliomlarda kesin değildir. Bu tümörlerde, Kanseri Araştırmaları ve Tedavisi Çalışması için Avrupa Organizasyonunun (European Organization for Research and Treatment of Cancer Study; EORTC) yaptığı bir çalışmada, erken radyoterapinin progresyon süresini uzattığını fakat genel sağkalıma bir etkisi olmadığı görülmüştür (102). Cerrahi sonrası radyoterapinin oligodendrogliomlardaki etkinliğine dair çalışmaların sonuçları randomize, prospektif çalışmalar olmadığından dolayı birbirleri ile uyumsuzdur.

Genel nöroonkoloji için oldukça önemli olan bir konu oligodendrogliomların kemoterapiye duyarlı oluşlarıdır. Oldukça geniş ve homojen popülasyonlu 3 çalışma anaplastik oligodendrogliomu olan hastaların üçte ikisinin prokarbazin, kloroetilsikloheksilnitrozüre (CCNU) ve vinkristin (PCV) üçlü kemoterapisine iyi yanıt verdiğini göstermişlerdir (1, 88, 103). Bu çalışmalarda progrese kadar olan medyan sağkalım süresinde anlamlı farklılık saptanmıştır; parsiyel yanıt verenlerde 12-16 ay, tam yanıt verenlerde 25-46 ay ve stabil hastalığı olan hastaların %19-27'sinde 7-9 ay.

Düşük dereceli oligodendrogliomların kemoterapiye yanıtına dair kısıtlı data mevcuttur (104). Küçük gruplarla yapılan çalışmalar kognitif işlevlerde ve nöbet kontrolünde düzelme bildirmişlerdir.

Temozolomid, yakın zamanda kullanımına başlanmış oral yolla verilen alkilleyici bir ajandır.

Kromozom 1p kolunun kaybı kemosensitivite belirleyicisi olarak gözükmektedir (2). Kromozom 1p ve/veya 19q LOH hem kemosensitivite hem de kemoterapi sonrası daha uzun nüksüz sağkalım belirticidir ve sadece 1p LOH olan tümörlere göre kemoterapi yanıtları daha iyi gözükmektedir.

2.2. Floresan İn-Situ Hibridizasyon (FISH)

İn-situ hibridizasyon (ISH), nükleik asit dizilerinin (DNA ve RNA) morfolojik olarak korunmuş kromozomlar, hücreler veya doku kesitlerinde saptanarak gösterilmesini sağlayan ve temel olarak çift iplikli nükleik asit oluşumu kinetiğini kullanan bir moleküler biyolojik tekniktir. ISH'un diğer hibridizasyon yöntemlerinden (Southern veya Northern blotting) farkı nükleik asitlerin kendi hücresel ortamlarında tanınarak gösterilmesidir. Böylece hedef nükleik asit dizisinin hücredeki yeri belirlenmiş olur. ISH yöntemi ilk kez 1969 yılında birbirinden bağımsız çalışan John ve Pardue tarafından uygulanmıştır (105)

FISH, mikroskop ile baz dizileri arasında direk bağ kurulmasını sağlayan bir yöntemdir. Bu teknikte özgün DNA dizilerine kromozomda ve çekirdekte bulundukları bölgede in-situ hibridizasyon yapılmakta ve bu bölgelerin mikroskop yardımı ile görülmesi sağlanmaktadır. Bu yöntemde in-situ hibridizasyon işleminde kullanılacak olan prob DNA dizileri biyotin gibi bir işaretleyici ile işaretlenmekte ve genomun araştırılacak olan parçası ile klonlanmaktadır. Denatürasyon sonrasında prob, kromozomal DNA üzerindeki komplementer baz dizisine bağlanmakta ve bu bölgeler sonradan avidin-FITC gibi DNA probuna tutunmuş işaretleyiciye bağlanan floresan boyalar ile boyanmakta ve mikroskop altında uygun floresan filtreler yardımı

ile izlenebilmektedir. Bu yöntem öncesinde radyoaktif işaretleyicilerle işaretlenmiş DNA ve RNA problemleri 1969 yılından beri kullanılıyor idiysen de, radyoaktif materyalin floresan işaretleyicilerle yer değiştirilmesi ile bu alan gelişmiştir. Floresan işaretleyiciler, daha güvenilir, kullanımı kolay, daha yüksek çözünürlüklü ve eş zamanlı olarak aynı hücrede farklı DNA dizilerinin farklı floresan boya ile incelenmesini sağlayacak özelliktedirler (105, 106, 107, 108).

Tiroglobulin geni radyoaktif olmayan yöntemle, ilk defa 1985 yılında, kromozom bandında haritalanan gen dir. Bugün rutin uygulamada 10 kb'lık segmentleri lokalize etmek mümkündür (105). Bu sayede sitogenetikçiler DNA'nın çok küçük bir parçasını içeren kromozomal anomalileri dahi uygun problemlerin kullanımı ile ayırt etmektedirler.

FISH tekniği ile, genomun tümünü gözden geçirmek olanaklı hale gelmiş ve insan genomunda birbirinden uzak bölgelerde duplika olan DNA dizileri ortaya çıkarılmıştır. Duplikasyonun olduğu bölgeler kromozomal yeniden düzenlemelerin olduğu yerler olarak değer kazanmış ve hastalıklara yol açan bölgeler olabileceğinden biyolojik araştırmalarda ön sıralarda yer alarak, zaman, enerji ve yatırım tasarrufu sağlanmıştır.

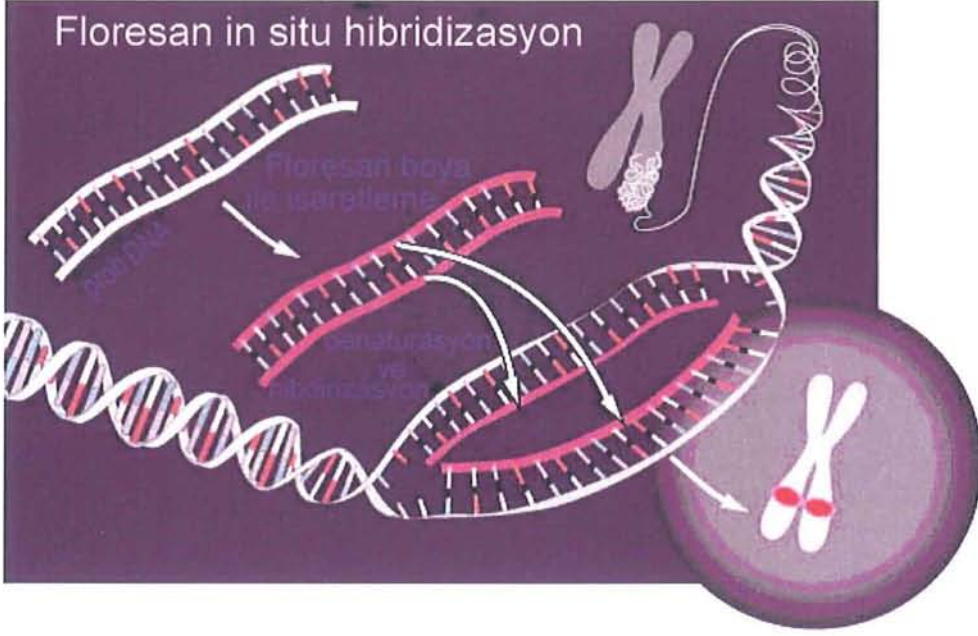
FISH tekniği ile gelen daha önemli bir yenilik, bölünmeyen hücre çekirdeklerinin de karyotip analizlerinin yapılmasıdır. FISH ve kromozomun özgün problemleri kullanılarak, sitogenetikçiler her çekirdekteki noktaların sayımı yöntemi ile kromozomları numaralandırabilirler. Nokta sayısındaki sapmalar, gen delesyon ve amplifikasyonuna işaret ederler. DNA, interfaz evresinde, metafazdakinden 10000 kat daha gevşektir ve metafaz FISH ile ortaya çıkarılamayan anormallikler, interfaz FISH ile ortaya çıkarılabilir. Nokta pozisyonunun oransal oynamaları, translokasyon ve inversiyon gibi kromozomlarda yapısal yeniden düzenlemelerin olduğunu düşündürür (105, 108) (Şekil 1).

İnterfaz FISH tekniğinin olanaklı kıldığı bir diğer önemli moleküler olay ise, hücre döngüsünün S fazında duplika olan özgün DNA dizilerinin yaklaşık zamanlamasını da göstermesidir (105). Replikasyon öncesinde prob her iki kromozomda tek nokta oluşturur; oysa replikasyon sonrası birbirine çok yakın

noktalar görülür. Bu yaklaşım kullanılarak, replikasyonun dikkatli bir biçimde yönetildiği ve birçok lokus için ana ve baba allellerinin aynı zamanda replike olduğu bulunmuştur. Buna karşın, birçok lokus allellerinin de eksprese olan allelin sessiz allelden daha önce replike olması gibi asenkronizasyon tespit edilmiştir (105).

İnterfaz kromatinindeki DNA dizilerinin yakınlığı ile DNA heliksi boyunca olan ayrılma arasındaki ilişki aydınlatılmıştır. İlgilenilen DNA dizilerini belirleyen floresan noktalar arası mesafe ölçülerek 50-100 kb çözünürlük ile DNA dizilerinin sırası tahmin edilebilir. Son halde sitogenetik çözünürlük çekirdek organizasyonunun tümünü yok ederek, FISH tekniğini DNA iplikçikleri üzerine taşımıştır (fiber FISH). İnterfazda ışık mikroskopunun çözünürlüğünde yoğun küçük bir nokta olarak görülen görüntü, fiber FISH tekniğinde uzun floresan çizgi haline gelmiştir. Fiber FISH, bir kromozom bölgesindeki genlerin sıralamasında varolan anormallikleri çözebilmek, tandem duplikasyonları analiz etmek ve kromozomlardaki küçük ölçekli yeniden ortaya koymak için kullanılır (105).

Klasik sitogenetik laboratuvarları FISH tekniğini tanı ve araştırma alanlarında kullanmaktadırlar. DNA dizilerinin çekirdek içerisinde bulundukları yerde saptanması, kromozomların fiziksel haritalarının yapılanmasında, kromozom yapı ve hatalarının analizinde, kromozomların ve genomun yapı, işlev ve evriminin araştırılmasında, gen ekspresyonunun belirlenmesinde, eşey tayininde, dokudaki virüs ve bakterilerin tanınmasında, transformasyon dizilerinin ve onkojenlerin yerlerinin belirlenmesinde önemlidir.



Şekil 1 : FISH prensipleri ve işleminin temsili resmi

2.3. Anjiyojenez

Anjiyojenez, (Gr; angeion: damar, genesis: oluşmak, üretmek) yeni damar oluşumu olarak tarif edilebilir. Literatürde, anjiyojenez sözcüğü yerine neovaskülerizasyon sözcüğü de kullanılmaktadır. Tümör anjiyojenezi ise solid bir tümör tarafından çevre dokunun bir şekilde uyarılması ile, normal çevre damarlardan tümörü besleyecek yeni damar oluşumudur.

Tümör damarlanması daha önce çevre dokularda mevcut olan damar sistemi ve bu damarların tümöre verdikleri anjiyojenik yanıt sonucu oluşan damarlardan oluşur. Neoplastik bir yapının anjiyojenez olmadan, birkaç milimetrelik bir çapı aşamayacağının gözlenmesi, ayrıca kan yolu ile metastaz oluşabilmesi için neoplastik hücrelerin kan damarlarına girmesi gerekliliği onkolojide anjiyojenez ile ilgili pek çok araştırmanın yapılmasına neden olmuştur (109, 110, 111, 112). Ayrıca, anjiyojenezin inhibisyonunun solid tümörlerin büyümesini ve metastazını durdurabileceği hipotezi pek çok antivasküler, antianjiyojenik ve anjiyostatik ajanın, nöroonkolojide araştırılmasına ve denenmesine neden olmuştur. Bu süreçte yeni damar

oluşumunun basamakları daha iyi anlaşılmış ve anjiyojenezi başlatan, yöneten ve inhibe eden pek çok doku, hücre ve molekül tespit edilmiştir (109, 110, 111,112). Diğer yandan transgenik/knock out fare modellerinin geliştirilmesi anjiyojenezin mekanizmasının daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır (111, 112).

Bu alandaki pek çok gelişmeye rağmen hala bazı sorular yanıt beklemektedir: Bu güne kadar tanımlanmış bunca anjiyojenik molekül (stimülatör, inhibitör, düzenleyici) nasıl oluyorda tek bir anjiyojenez bütününü devam ettirmektedir? Bu ajanlar sürekli olarak mı ortamda bulunmalıdırlar, yoksa anjiyojenez işlemi sırasında belli dönemlerde mi ortaya çıkarlar? Bir kanser hücresi nasıl anjiyojenik fenotip kazanmaktadır? Anjiyojenezde, hücresel ve ekstrasellüler etkenlerin rolleri ne orandadır? Anjiyojenezde biyokimyasal mikroçevrenin rolü, mekanik mikroçevre karşısında nedir? Anjiyojenezdeki genlerin ekspresyonları sonuçta oluşacak olan damarlanmayı ne kadar gösterebilir? Klinik şartlarda hangi farmasötikler anjiyojenezi inhibe veya stimule ederler? Bu ajanların optimal dozları nedir?

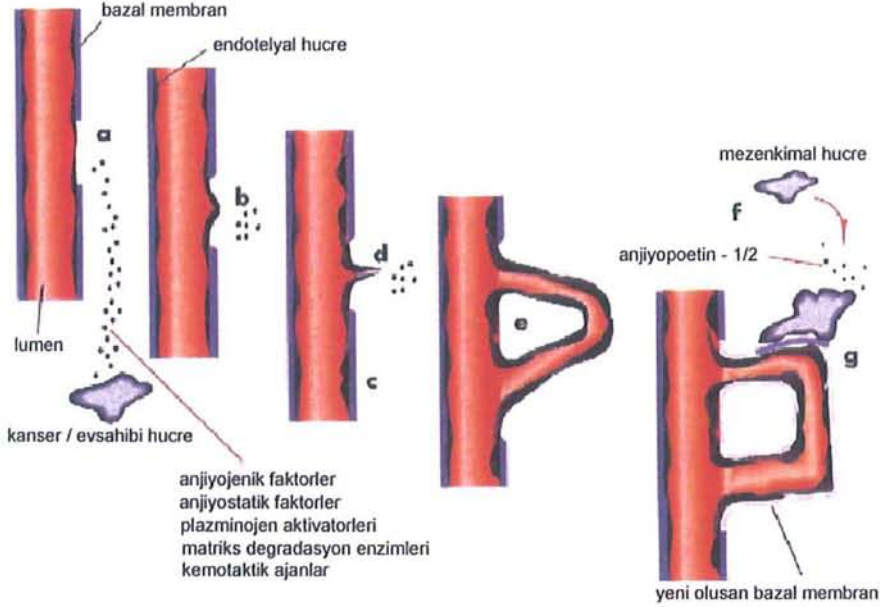
Tüm bu ve bunun gibi soruların yanıtlanabilmesi için anjiyojenezi kantitatif olarak araştırabileceğimiz, ucuz, kolay uygulanabilir anjiyojenez modellerine gereksinimimiz vardır. Her türlü ilerlemeye rağmen, halen bu özelliklerde kusursuz bir model mevcut değildir.

Varolan modeller öncelikle in-vitro ve in-vivo modeller olarak ikiye ayrılabilir. Öncelikle anjiyojenez basamaklarını özetledikten sonra, bu modellerden bahsedilecektir.

2.3.1. Anjiyojenez basamakları

Bir hücrenin anjiyojenik bir fenotip kazanmasını sağlayan moleküler mekanizma bilinmemekle beraber, yeni damar oluşumunu sağlayan olayların sırası gayet iyi ortaya konulmuştur (111, 112). Damar oluşumu ya endotelial tomurcuklanma (İng: sprouting), ya da içine geçme (İng: intussusception)

ardından gelmektedir. İlk biçimde olayların sırası şu şekildedir: (a) çoğunlukla postkapiller bir venül olan damarın dış zarının ve interstisyel matriksin erimesi; (b) endotel hücrelerinin stimulus yönüne göçü; (c) öndeki endotel hücrelerin ardı sıra gelen endotel hücrelerinin çoğalması; (d) endotel tomurcuğunda lümen oluşumu (kanalizasyon); (e) tomurcukların anastomozu/sonlanması ile dalların oluşumu; (f) damar etrafının perisitlerle kaplanması; (g) immatür damar etrafında dış zarın oluşumu (111, 112) (Şekil 2). Literatürde (c) basamağının her zaman olmadığı (113, 114) ve (f) ile (g) basamaklarının ise proliferasyonun bitip damarların matürasyon/diferansiasyonunun başlangıcı olduğuna dair pek çok bilgi vardır. Yeni damarlar ikinci yolu kullanarak da oluşabilir, burada interstisyel doku dizisi daha önce mevcut olan bir damarın içine girebilir. Ardından bu hücre dizisinin büyümesi ve stabilizasyonu damar lümeninin birkaç bölüme ayrılmasına ve lokal damar ağının remodelizasyonuna neden olur (115).



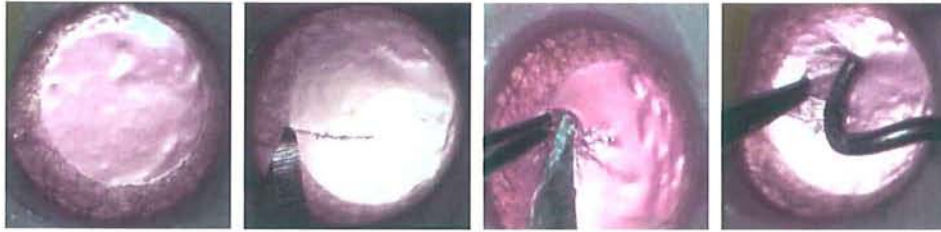
Şekil 2 : Anjiyogenez basamakları ve muhtemel faktörler (116)

2.3.2. Anjiyojenez modelleri

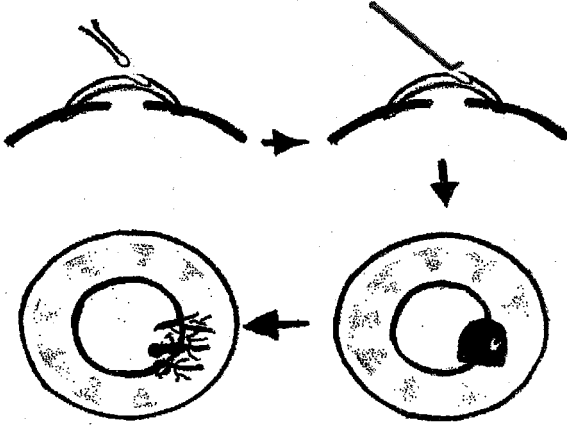
Anjiyojenez çalışmalarının yapılabilmesi için oluşturulan modeller, öncelikle in-vitro ve in-vivo modeller olarak ikiye ayrılabilir. Anjiyojenezin moleküler ve hücresel biyolojisine dair pek çok önemli bilgi, kültürü yapılmış endotel hücreleri kullanan in-vitro çalışmalardan elde edilmiştir (117, 118, 119).

2.3.2.1. Kornea anjiyojenez modeli

Kornea avasküler bir dokudur. Korneaya açılan cep içine konulan anjiyojenik olarak aktif tümör veya doku (örn: meningiom, AVM), korneanın vaskülarize olmasına sebep olmaktadır. Bu durum in-vivo anjiyojenez çalışmalarında önemli bir yöntem oluşturmaktadır (Şekil 3 ve 4).



Şekil 3 : Korneaya tümör ekimi için cep oluşturulması işlemi (120)



Şekil 4 : Kornea anjiyojenez modeli tekniği ve prensipleri (120)

Normal kornea dokusu avasküler olması ve oluşan yeni vasküler ağı laboratuvar ortamında kolaylıkla fotoğraflanması açısından kullanılabilen deneysel bir yöntemdir. Dokunun korneada mikrocebe ekilmesinden sonra iki boyutlu damar büyümesinin görüntülenmesi son 30 yılda anjiyojenez modeli olarak tümör çalışmalarında oldukça sık kullanılmıştır. Ayrıca Konya ve ark. (120) bu metodun serebral vasküler malformasyonlarda da kullanılabilirliğini göstermişlerdir. Bu metot ilk olarak tavşanlarda geliştirilse de sıçan ve fare modellerine kolaylıkla uyarlanmıştır. Daha önce oligodendrogliom ve diğer düşük dereceli glial tümörlerde bu modelde yapılmış olan bir çalışma yoktur. Çalışmamızda korneal model bu veriler üzerine kurulacak ve veriler literatür desteği ile toplanacaktır. Kornea Anjiyojenez modeli literatürde en güvenilir anjiyojenez modeli olarak görülmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta Seçimi

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji ABD ve Marmara Üniversitesi Nörolojik Bilimler Enstitüsünde Ocak 1986-Ekim 2006 tarihleri arasında supratentoryal tümör nedeni ile ameliyat edilip, Marmara Üniversitesi Nörolojik Bilimler Enstitüsü Patoloji Bölümünde oligodendrogliom derece 2 (WHO sınıflaması) tanısı alan 102 olgu tarandı. İçlerinde cerrahi öncesi beyin MRG veya beyin BT çalışmalarında kontrast tutan ve ameliyat sonrası ilk 24 saat içinde çekilen kontrol beyin MRG tetkikinde total tümör eksizyonu olmakla beraber, daha sonra radyolojik nüksü beyin MRG veya BT ile teyit edilen ve nükse kadar ek tedavi almamış olan 10 olgu seçildi. Hastaların ilk ameliyat tarihinden itibaren radyolojik tümör nüksüne kadar geçen süre çıkarıldı. Yine bu 102 olgunun içinden ameliyat sonrası 24 saatlik beyin MRG ile gösterilmiş total tümör eksizyonu olan, fakat cerrahi öncesi beyin MRG veya BT çalışmasında kontrast tutmayan ve takiplerinde ek tedavi almayıp, daha sonra radyolojik tümör nüksü saptanan 10 olgu seçildi. Yirmi olgunun tümünün tanısı yeni konulmuştu ve daha önce herhangi bir tedavi almamıştı.

Yirmi olgunun ameliyat öncesi ve ameliyat sonrası 24 saat içinde çekilmiş beyin MRG, kranyal BT tetkikleri mevcuttu ve total tümör rezeksiyonu teyit edilmişti. Yine olguların ameliyat sonrası ilk 1 yıl içinde 3 ayda bir, daha sonra ise 6 ayda bir çekilen kontrol beyin MRG tetkikleri de mevcuttu. Olguların tümü radyolojik görüntülemelerinde tümörlerin kontrast madde tutulumu gösterip göstermediği, ameliyat sonrası eksizyonun total olup olmaması yönünden değerlendirildi ve olguların tümü total eksizyon yapılanlar arasından seçildi. Olguların takip radyolojik tetkikleri, radyolojik tümör nüksü sürelerinin tespiti için kullanıldı.

Olguların hiçbirisi ameliyat sonrasında, takiplerinde nüks saptanana kadar radyoterapi, kemoterapi veya başka bir ek tedavi almamıştı.

Aynı zamanda, Marmara Üniversitesi Nörolojik Bilimler Enstitüsü tümör bankasında depolanmış olan bu 20 olguya ait tümör örneklerinde FISH tekniği kullanılarak 1p36 ve 19q13 LOH araştırıldı.

3.2. FISH Uygulaması

3.2.1. Hücre eldesi

Ameliyat sırasında alınan tümör örnekleri sıvı azotta bekletilmiş olup, bu çalışmada incelenen hücrelere temel teşkil etmiştir. Doku örnekleri, sıvı azottan çıkarılmasının ardından 37°C de eritilip, serumsuz besiyeri (RPMI-1640) ile yıkaması yapıldı. Yıkamanın ardından mekanik parçalama işlemi uygulanan dokular 15 ml.lik Falcon tüplere alındı ve üzerlerini örtecek kadar kollajenaz II çözeltisi ile 37°C'de bir gece bekletildi. Bir gün sonra serumsuz ortam ile yıkaması yapıp hücre süspansiyonun elde edilebilmesi için 1100 rpm de 10 dakika santrfüj edildi. Elde edilen pellet, 0,75 M KCl solüsyonundan 10 ml eklenerek 37°C'de 24 dakika tutuldu. Ardından tekrar 1100 rpm'de 10 dakika santrfüj edilen süspansiyon içindeki pellet üzerine taze hazırlanmış 10 ml Carnoy fiksatif (3:1 ; Methanol:Glasial asetik asit) eklendi. Aynı işlem üç kez tekrarlandı. Son yıkamadan sonra iki ayrı lam üzerine (Superfrost, Menzel-Gläser, Germany) birer damla hücre süspansiyonu yayıldı ve prob uygulamasına kadar -18°C'de bekletildi.

3.2.2. Prob uygulaması ve hibridizasyon

LSI problemleri (LSI 1p36/1q25, LSI 19p13/19p13 Dual Color Probe Set, Vysis, US), saklanma koşulu olan -20°C' den çıkarıldı ve HYBrite cihazı (HYBrite-Vysis, USA) nemli ortam sağlamak üzere ıslak kağıt havlu ile desteklendikten

sonra cihazın sıcaklığı 37°C' ye getirildi. Çalışma problemleri, 37°C'ye gelmesi için inkübatöre (Heraeus, Germany) konuldu ardından 10 µl prob, lam üzerindeki işaretli bölgeye mikropipet (Eppendorf) aracılığıyla yerleştirildi. Daha sonra uygun boyutta lamel (10mmx10 mm) (Isolab, Germany), prob üstüne kapatıldı, lam, parafilm (3M) ile kapatıldı ve HYBrite cihazına yerleştirildi, 73°C'de 5 dakika denatürasyon ve 37°C'de 16-17 saat hibridizasyon programı uygulandı.

3.2.3. Yıkama ve zıt boyama

Yıkama solüsyonu I [0,4xSSC (Vysis, US)/% 0,3 NP40 (Vysis, US); pH: 5,3 (NaOH ile ayarlandı)], dik şale içinde 73°C'ye ayarlanmış su banyosuna (Nüve) yerleştirildi, ısı termometre ile kontrol edildi. Lam üzerindeki parafilm uzaklaştırıldı ve lam yıkama solüsyonu içinde 5 dakika süreyle bırakıldı. Ardından, yıkama solüsyonu II [2xSSC/% 0,1 NP40; pH: 5,3 (NaOH ile ayarlandı)] içinde 30 saniye bekletilen lamlar, saf sudan geçirilerek kuruması için karanlık ortama bırakıldı.

Kuruyan lamlar üzerinde işaretli bölgeye, 10 µl DAPI-II çözeltisi mikropipet aracılığıyla damlatıldı. Üstüne lamel kapatılan lam, mikroskopta izleninceye kadar 4°C'de bekletildi.

3.2.4. Değerlendirme

Değerlendirme işlemi floresan mikroskopta (Olympus BX50), uygun filtre seti ile (DAPI; FITC; Texas Red), eş zamanlı olarak en az 50 hücrenin incelenmesine olanak tanıyacak şekilde iki kişinin incelemesiyle tamamlandı.

Sayılan hücrelerin %50'sinde veya daha fazlasında 1p36 ve/veya 19q13 LOH mevcut ise olgu 1p/19q LOH (+) kabul edildi.

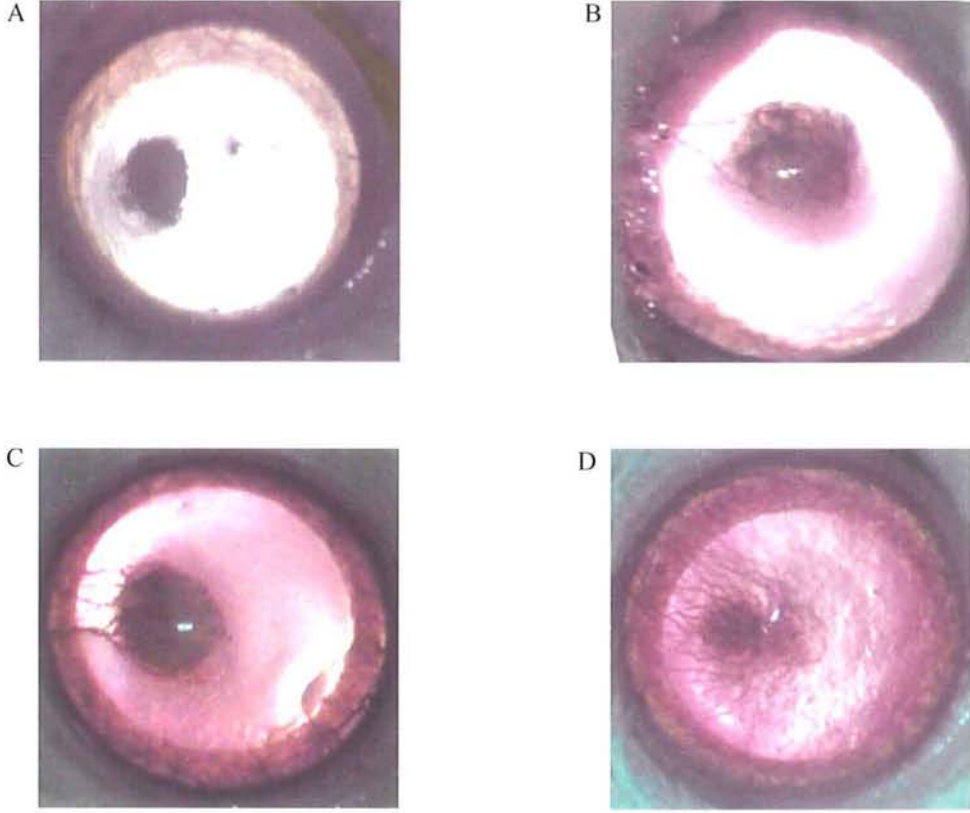
3.3. Kornea Anjiyojenez Modeli Uygulaması

Korneaya tümörlerin ekiminden 4 saat önce sıvı azot içindeki tümör dokuları (-187°C), oda sıcaklığına taşındı ve dimetilsülfoksit (DMSO) ile yıkandıktan sonra ekime uygun olacak boyutlarda (2-3 mm) mikroskop altında parçalandı.

Her bir fare intraperitoneal ketamin enjeksiyonu ile anestetize edildi ve tüm işlemler mikroskop altında steril koşullarda yapıldı. Kornealar ise % 0,5 propakain damlatılarak anestetize edildi ve her bir glob kuyumcu forsepsi ve paket lastiği kullanılarak hafifçe proptoze edildi. Cerrahi mikroskop altında, araknoid bıçağı kullanılarak yaklaşık 4 mm uzunluğunda ve limbusa dik açı yapacak biçimde radyal intrastromal lineer keratotomi yapıldı ve ardından mikrohook yardımı ile kornea dokusunda bir cep oluşturuldu. Oluşturulan cebe, korneanın her iki epitel katmanı arasına olacak biçimde belirli bir miktar tümör dokusu yerleştirildi; her bir kornea farklı bir tümör dokusunun ekimi için kullanıldı. İşlemin gerçekleştirildiği gün sıfırinci gün (gün 0) olarak alındı.

On altı gün boyunca hergün klinik gözleme devam edildi ve gözlerden herhangi birinde oküler enfeksiyon belirtisi (akıntı, kızarıklık) gözleendiğinde, söz konusu fare çalışmadan çıkarıldı yerine yenisi konuldu (aynı tümör örnekleri ile işlem tekrarlandı). Yirmi korneanın herbiri 4., 8., 12. ve 16. günlerde biyomikroskopa (Zeiss, Oberkochen, Germany) bağlı dijital video sistemi (Sony, Digital Video Camera 201) kullanılarak, fotoğraflandı ve anjiyojenez derecesi, çalışmaya kör bir araştırmacı tarafından derecelendirildi. Süregiden anjiyojenik etkinlik korneal cep çevresinde oluşan damarların sayısını esas alan bir sistem ile skorlandı. Derecelendirme şu biçimde idi (Şekil 5); derece 0; hiç anjiyojenez belirtisi yok (gözükten damarlanma yok), derece 1; düşük anjiyojenik etkinlik (gözükten damar sayısı

<3), derece 2; orta anjiyojenik etkinlik (gözükten 3-8 damar) ve derece 3; yüksek anjiyojenik etkinlik (gözükten damar sayısı >8 ve/veya arteriyoller arasındaki kornea dokusunda anastomoz yapan damarlanma var).



Şekil 5 : Kornea anjiyojenez modelinde anjiyojenez derecelenmesine örnekler. A) Anjiyojenez belirtisi görülmeyen *derece 0*; B) Gözüken damar sayısının <3 olduğu *derece 1*; C) Damar sayısının 3-8 olduğu *derece 2*; D) Gözüken damar sayısı 8'den fazla olan ve/veya mikroanastomozların gözüküğü *derece 3*.

4. BULGULAR

Tablo-1'de olguların kontrast tutulumu olup olmadığı, 1p36/19q13 LOH durumu, radyolojik tümör nüksüne kadar geçen süre ve 16 gün boyunca 4 günde bir yapılan kornea anjiyojenez derecelendirmesine ait sonuçlar özetlenmektedir.

Tablo 1 : Olguların, yaş, kontrast tutulumu, LOH, nükse kadar geçen süre ve 4., 8., 12. ve 16. günlerdeki kornea anjiyojenez dereceleri dökümü

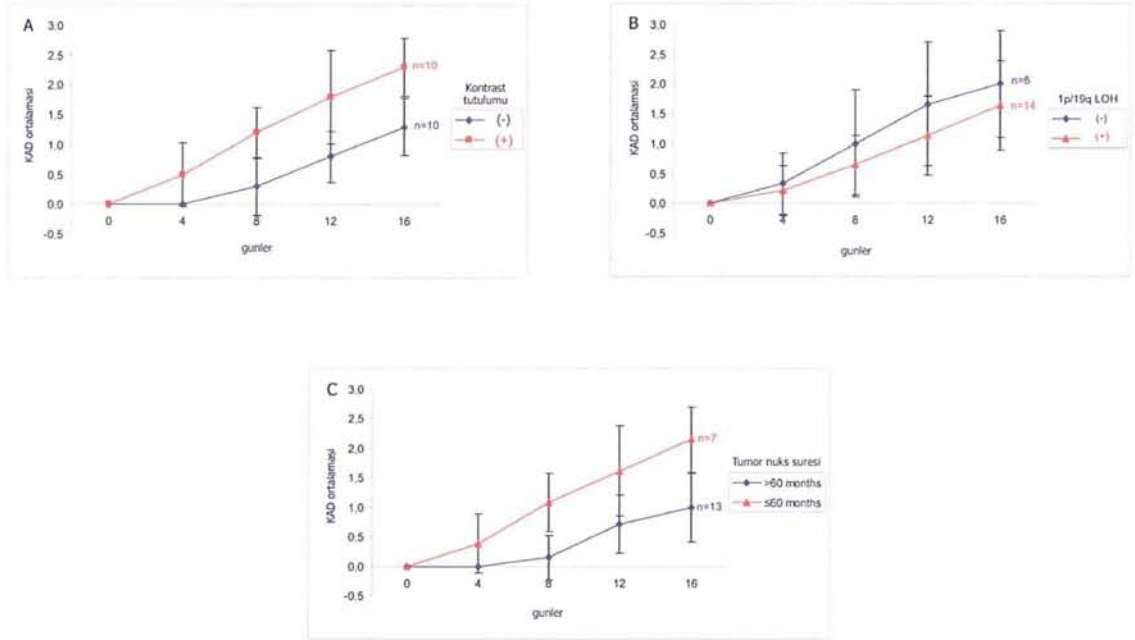
Hasta	Yaş	Kontrast tutulumu	1p/19q LOH	Nüks Zamanı (ay)	Kornea Anjiyojenez Derecesi (KAD)			
					Gün 4	Gün 8	Gün 12	Gün 16
BS	16	(-)	(+)	96	0	0	0	1
OSÜ	21	(-)	(+)	54	0	1	1	2
HY	23	(-)	(-)	60	0	1	1	2
ARS	27	(-)	(-)	90	0	0	1	1
FE	28	(-)	(-)	42	0	1	1	2
GA	34	(-)	(-)	60	0	0	1	1
YY	45	(-)	(+)	66	0	0	1	1
YG	46	(-)	(+)	102	0	0	0	1
KÖ	53	(-)	(+)	72	0	0	1	1
DAK	62	(-)	(+)	78	0	0	1	1
ÖME	15	(+)	(+)	78	0	1	1	2
CÇ	17	(+)	(+)	48	0	1	1	2
MG	24	(+)	(-)	9	1	2	3	3
TK	30	(+)	(-)	12	1	2	3	3
SS	31	(+)	(+)	36	1	1	2	2
AB	43	(+)	(+)	24	1	1	2	2
NT	47	(+)	(+)	60	0	1	1	2
EÖ	51	(+)	(+)	42	0	1	2	2
AK	55	(+)	(+)	60	0	1	1	2
ZY	56	(+)	(+)	24	1	1	2	3

4.1. Anjiyojenik Potansiyellerin Karşılaştırılması

Bu sonuçlara dayanarak öncelikle 20 olgu kontrast tutan ($n=10$) ve tutmayanlar ($n=10$) olarak ikiye ayrıldı ve 4., 8., 12. ve 16. günlerdeki KAD ortalamaları alındı (Şekil 6A), ardından Fisher testi kullanılarak aralarında anjiyojenik potansiyel açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığına bakıldı. İstatistik yöntemi açısından, derece 0 ve 1 KAD düşük dereceli, derece 2 ve 3 KAD ise yüksek dereceli olarak iki ayrı grup şeklinde birleştirildi. Yapılan Fisher testi sonuçlarına göre tüm tümörler WHO derece 2 oligodendrogliomlar olmalarına rağmen kontrast tutan ve tutmayanlar arasında 12. günden itibaren istatistiksel olarak anlamlı anjiyojenik farklılık vardı. Onikinci günde p değeri 0,011 ($p<0,05$) iken 16. günde p değeri 0,003 idi ($p<0,05$).

Diğer yandan bu 20 tümör 1p36/19q13 LOH olanlar (LOH +) ve olmayanlar (LOH -) biçiminde tekrar sınıflandı ve 4., 8., 12. ve 16. günlerdeki KAD ortalamaları alındıktan sonra aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığına bakıldı. Çalışılan tümörlerin 14'ü (%70) LOH (+) iken, 6'sı (%30) LOH (-) idi (Şekil 6B). Yapılan Fisher testi sonucunda 8., 12. ve 16. günlerdeki KAD ortalamalarının 1p36/19q13 LOH olan ve olmayan grup arasında hiçbir anlamlı farklılık göstermediği görüldü. Sekizinci günde p değeri 0,079 ($p>0,05$) iken, 12. ve 16 günde ise 1 ($p>0,05$) idi.

Yine bu 20 olgu, hastaların nüks sürelerine göre ikiye ayrıldı. Çalışmanın medyan nüks süresi 60 ay idi; bu nedenle nüks süresi 60 aydan fazla olan 7 hastanın tümörleri ile nüks süreleri ≤ 60 ay olan 13 hastanın tümörleri ayrı ayrı gruplanarak 4., 8., 12. ve 16. günlerdeki KAD ortalamaları alındı ve karşılaştırıldı (Şekil 6C). Yapılan Fisher testinde bu tümörlerin 8. günde KAD ortalamaları karşılaştırıldığında p değeri 0,521 iken, 12. günde sınırda bir değer olan 0,051 olarak hesaplandı, fakat 16. günde nüks süreleri >60 ay olan tümörlerle, ≤ 60 ay olan tümörlerin KAD ortalamaları arasındaki fark oldukça anlamlı idi ve p değeri 0,001 ($p<0,05$) idi.



Şekil 6 : A) Kontrast tutan (n=10) ve tutmayan (n=10) olguların kornea anjiyojeniz dereceleri ortalamaları $\pm$ 1SD kıyaslanması; B) 1p36/19q13 heterozigosite kaybı olan (n=14) ve olmayan (n=6) olguların, kornea anjiyojeniz dereceleri ortalamaları $\pm$ 1SD kıyaslanması; C) Tümör nüks süreleri >60 ay olan (n=7) ve $\leq$ 60 ay olan (n=13) olguların, kornea anjiyojeniz dereceleri ortalamaları $\pm$ 1 SD kıyaslamaları

4.2. Kaplan - Meier Analizleri

Kaplan-Meier analizlerinde, kontrast tutan (n=10) ve tutmayan (n=10) olguların, nüks süreleri arasındaki farkın p değeri 0,0068 idi (df=1, %95 CI) ve arada anlamlı fark vardı, ama aynı analiz 1p36/19q13 LOH olan (n=14) ve olmayanlar (n=6) arasında yapıldığında p=0,3511 (df=1,%95 CI) idi ve arada istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi (Şekil 7).

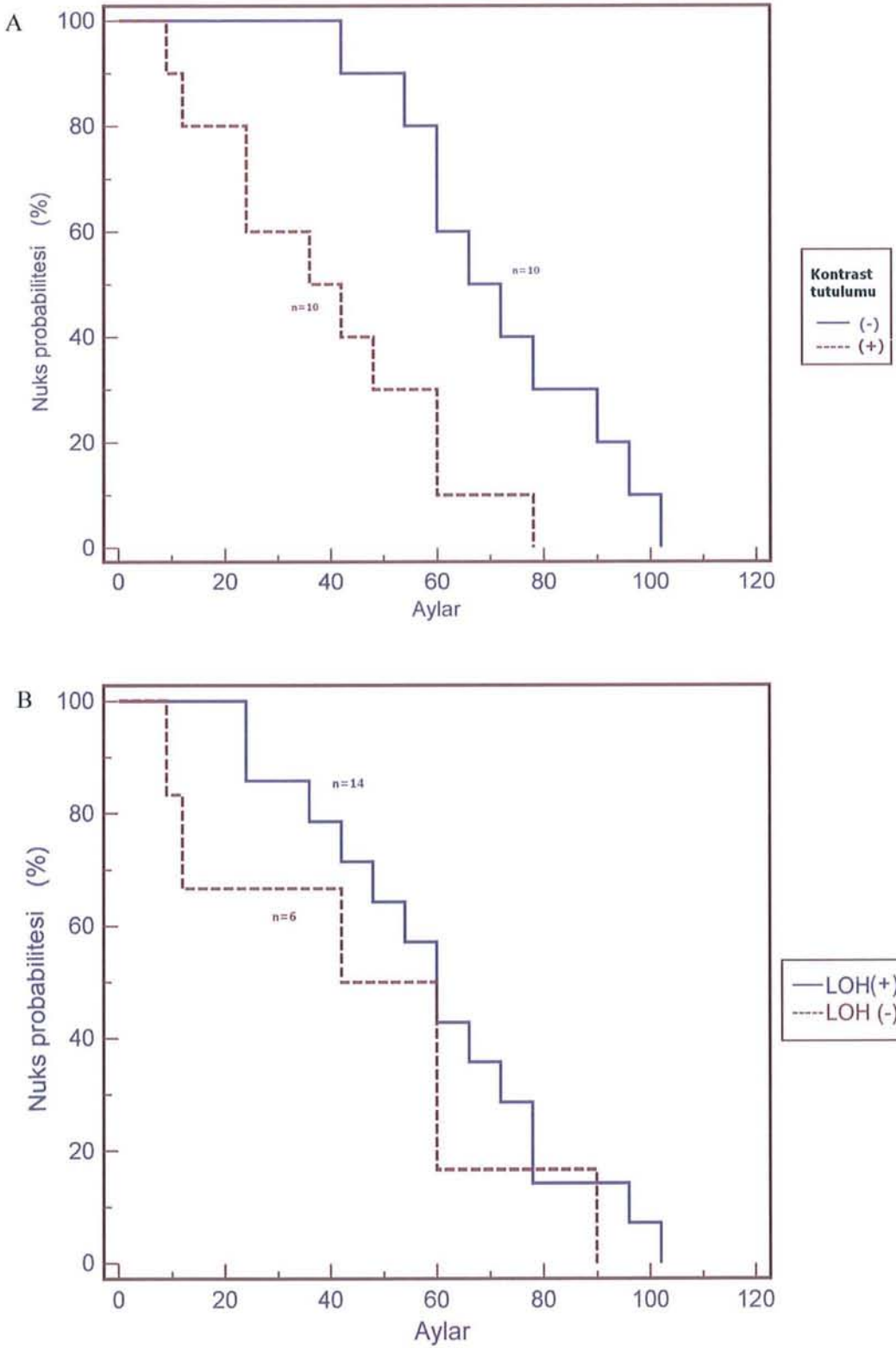
Ayrıca, tümörler 4., 8., 12. ve 16. günlerde ulaştıkları KAD göre gruplanarak Kaplan-Meier eğrileri çıkarıldı ve analizleri yapıldı (Şekil 8). İstatistiksel yöntem olarak 12 . ve 16. günde KAD 0 veya 1 olanlar düşük anjiyojenik grup olarak ayrılırken, KAD 2 veya 3 olanlar yüksek anjiyojenik etkinliği olanlar olarak ayrı gruplandı. Dördüncü günde KAD sadece 0 veya 1 olanlar olduğu için KAD 0 ve 1 ayrı gruplandı, 8. günlerde KAD 0 olanlar ayrı, KAD 1 veya 2 olanlar ayrı olarak gruplandı.

Onaltıncı günde KAD 0 veya 1 olan 8 tümör varken, 2 veya 3 olan 12 tümör vardı. KAD 0 veya 1 olan tümörlerin nüks süresi 75 ay iken, 2 veya 3 olanların medyan nüks süresi 42 ay idi. Kaplan-Meier eğrilerine (Şekil 10), log-rank testi yapıldığında her iki nüks süresi arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p=0,0012$, $df=1$, %95 CI).

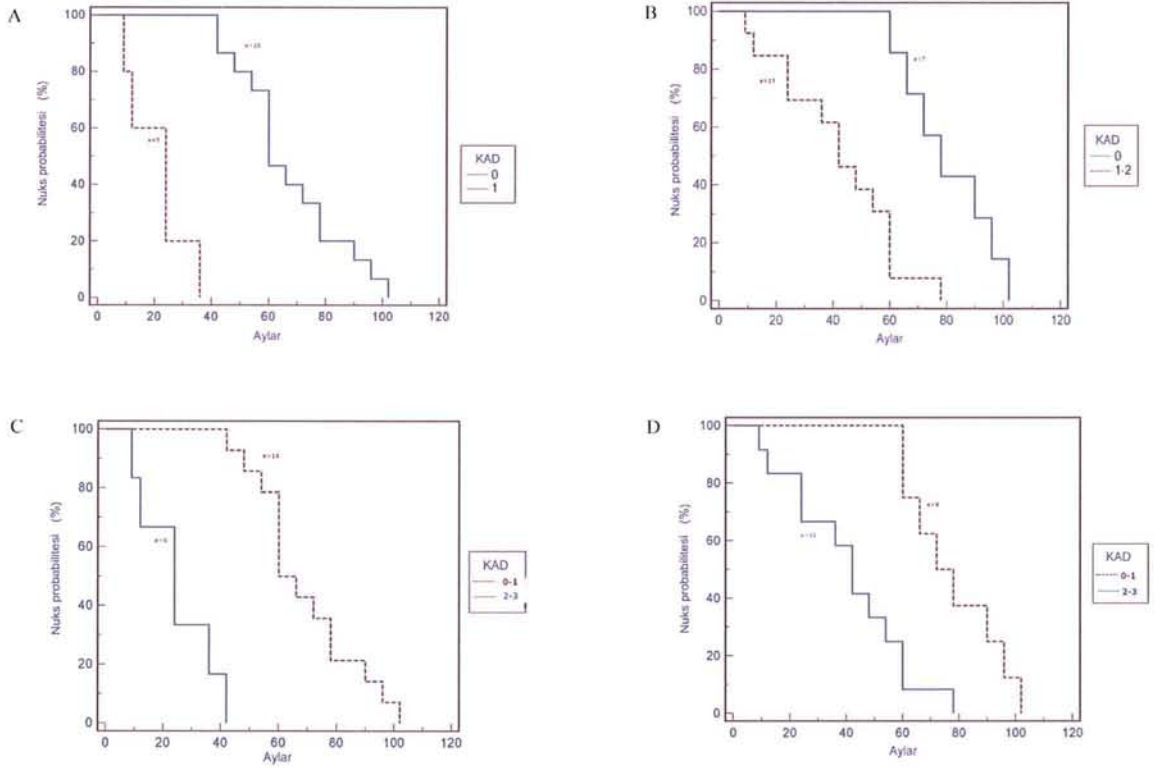
Aynı çalışma 12. gündeki KAD göre yapıldığında, KAD 0 veya 1 olanların sayısı 14 iken KAD 2 veya 3 olanların sayısı 6 idi, KAD 0 veya 1 olanların medyan nüks süresi 66 ay, KAD 2 veya 3 olanların medyan nüks süresi 24 ay idi. Kaplan-Meier eğrileri (Şekil 11) karşılaştırıldığında $p<0,0001$ ($df=1$, %95 CI) idi ve istatistiksel olarak anlamlıydı.

Sekizinci gündeki KAD göre gruplar değerlendirildiğinde, KAD 0 olan 7 tümör varken, 1 veya 2 olan 13 tümör vardı. KAD 0 olanların medyan nüks süresi 72 ay, KAD 1 veya 2 olanların ise 48 ay idi. Kaplan-Meier eğrileri (Şekil 8C) kıyaslandığında ise aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($P<0,0012$, $df=1$, %95 CI).

Benzer değerlendirme 4. gün KAD göre de yapıldı. Fakat 4. gündeki KAD tüm tümörler için 0 veya 1 olduğu için tümörler sadece KAD 0 olanlar ve 1 olanlar olarak gruplandı. KAD 0 olan 15 tümör varlığına karşın, 1 olan 5 adet tümör vardı. KAD 0 olanların medyan nüks süresi 60 ay iken, KAD 1 olanların medyan nüks süresi 24 ay idi. Kaplan-Meier eğrileri analiz edildiğinde nüks süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttu ($p<0,0001$, $df=1$, %95 CI).



Şekil 7 : Olguların A) Kontrast tutan (n=10) ve tutmayanlar (n=10) olarak ikiye ayrılması sonrası; B) 1p36/19q13 LOH olan (n=14) ve olmayan (n=6) olarak ikiye ayrılması sonrası yapılan Kaplan Meier grafiği.



Şekil 8 : Tümörlerin, A) Dördüncü gündeki kornea anjiyojeniz değerlerine; B) Sekizinci gündeki kornea anjiyojeniz derecelerine; C) Onikinci gündeki kornea anjiyojeniz derecelerine; D) Onaltıncı gündeki kornea anjiyojeniz derecelerine göre yapılan gruplamalar sonrası Kaplan-Meier grafikleri.

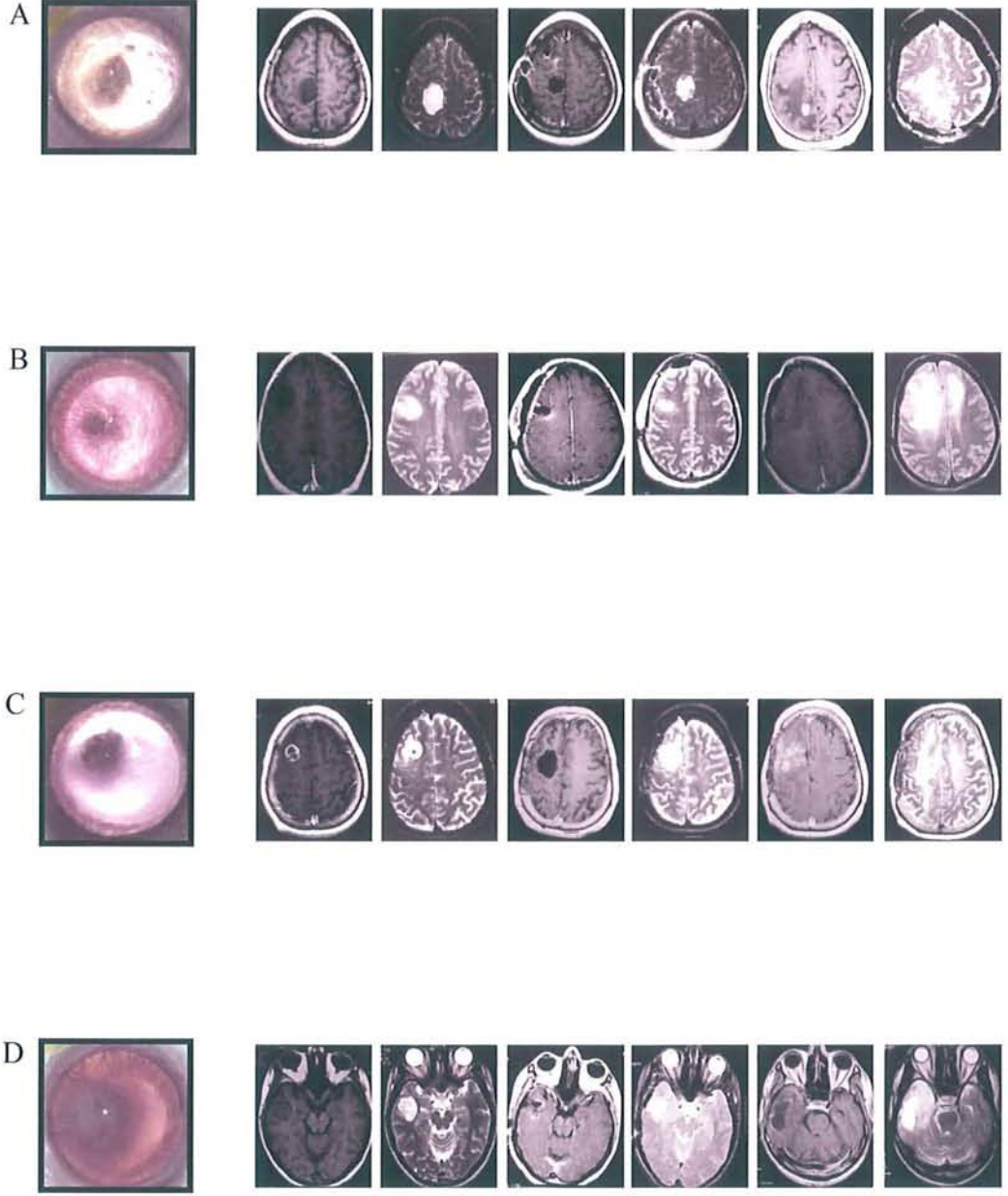
4.3. Örnek Olgular

Şekil 9'da 4 adet örnek olgu 16. gün KAD, ameliyat öncesi ve sonrası 24 saat içinde çekilen kontrol beyin MRG tetkikleri ve nüks zamanındaki filmleri ile gösterilmektedir. Olgulardan ilki (Şekil 9a) 1p/19q LOH göstermeyen, ameliyat öncesi MRG tetkiklerinde kontrast tutulumu göstermeyen bir hasta idi ve 90 ay sonra nüks gözlenerek reopere edilmişti. Bu hastanın gerek

1p/19q LOH durumu kötü bir prognoz beklememize neden olabilecekken, KAD 16. günde 1 idi ve düşük anjiyojenik nitelik göstermekte idi.

İkinci olgu (Şekil 9b) ise yine kontrast tutmayan, fakat 1p/19q LOH olan bir hastaydı. Hastanın 16. gün KAD 3 idi ve hastanın total rezeksiyona rağmen 54. ayda yaygın nüksü oldu.

Kontrast tutan tümörü olan hastaların her ikisinin de (Şekil 9c ve d) 1p/19q LOH mevcuttu. Yapılan kornea anjiyojenez çalışmasında ise 16. günde KAD 1 olan olgu ek tedavi almamasına rağmen, 78. ayda nüks etti. KAD 16. günde 3 olan ve korneada tümör büyümesinin de görüldüğü olgunun nüks süresi ise 24 aydı.



Şekil 9 :Örnek olgular A) Kontrast tutmayan, LOH (-), 90.ayda nüks; B) Kontrast tutmayan, LOH (+), 54. ayda nüks; C) Kontrast tutan, LOH (+), 78. ayda nüks; D) Kontrast tutan, LOH (+), 24.ayda nüks

5. TARTIŞMA

Mevcut literatürde derece 2 oligodendrogliomların anjiyojenik potansiyellerini deneysel bir modelde araştıran yayın mevcut değildir. Fakat oligodendrogliomların anjiyojenik potansiyelleri glial tümörler adı altında yapılan çalışmalarda GBM ve astrositomların yanında değerlendirilmiştir. Yine de bunların çoğu anjiyojenezin immünohistokimyasal endirekt belirleyicilerini kullanmıştır ya da in-vitro modellerde çalışılmıştır. Diğer yandan oligodendrogliomların prognozunda, anjiyojenik potansiyelin olası belirleyiciliğine dair yazılar mevcuttur.

5.1. Düşük Dereceli Oligodendrogliomlarda Anjiyojenez

Çalışmamızda dinamik bir anjiyojenez modeli olan fare kornea anjiyojenez modeli kullanılmasının, çalışmamıza getirdiği üstünlük fare korneasının küçük ve ince olması nedeni ile anjiyojenezin çok erken iki boyutlu evrelerini dahi gözleyebilmemiz olmuştur. Daha önce yapılan bir çalışmada (120) fare korneasına GBM ekimi sonrası yüksek anjiyojenik potansiyeli nedeni ile farelerin 5-6. günde sakrifikasyonunu gerektirmiştir. Fakat derece 2 oligodendrogliomların GBM'e kıyasla düşük anjiyojenik potansiyeli nedeni ile anjiyojenez süreci erken dönemlerden, 16. gün gibi geç dönemlere kadar izlenebilmiştir. Çalışmamızda düşük dereceli oligodendrogliomların anjiyojenik potansiyellerinin kendi aralarında da heterojen olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızın bir diğer sonucu ise, radyolojik tümör nüksüne kadar geçen süre ile korneadaki anjiyojenik aktivitenin birbiri ile anlamlı negatif ilişki olduğudur. Literatürde, VEGF, b-FGF gibi anjiyojenez belirteçleri ve radyolojik anjiyojenik belirteçler ile düşük dereceli oligodendrogliomların

prognozu ilişkisine dair çalışmalar mevcuttur (7, 8, 9, 10, 30). Fakat çalışmamız bunu dinamik bir modelde araştıran ilk çalışmadır. Çalışmamızda bu ilişki, olgularımızın medyan tümör nüks süresi olan 60 aydan geç nüks edenlerle, 60 ay ve daha erken nüks edenlerin KAD karşılaştırıldığı Fisher analizi ile, ayrıca 4., 8., 12. ve 16. günlerdeki KAD göre yapılan gruplandırmanın tümör nüks sürelerini karşılaştıran Kaplan-Meier analizi ile de gösterilmiştir.

Literatürde anaplatik astrositom ve GBM'de antianjiyojenik ajanların tedavide kullanılmasına ait pekçok deneysel çalışma mevcuttur (9, 17, 18, 19). Invazyon, dedifferansiasyon, infiltrasyon, kontakt inhibisyon kaybı gibi neoplazilere özgün özellikler oligodendrogliom derece 2 tümörlerde çok düşük düzeydedir (97). Çalışmamızın gösterdiği gibi düşük dereceli oligodendrogliomların seyrinde anjiyojenik aktivitenin önemli yeri vardır ve antianjiyojenik ajanlar oligodendrogliom tedavisinde de araştırılmalıdır.

5.2. Anjiyoenez Radyoloji İlişkisi

Beyin MRG'de kontrast tutulumunun olup olmaması, anjiyojenik potansiyel konusunda belirleyici olarak ortaya çıkmıştır (34). Yalnız unutulmamalıdır ki, MRG veya BT'de kontrast tutulumu, gerek perfüzyon MRG, gerek serebral kan hacmi ölçümü çalışmaları ile beraber anjiyojenik aktivite ve endotel hiperplazisinin radyolojik belirteçleri olarak literatürde vurgulanmaktadır (35). MRG veya BT'de kontrast tutulumu kan-beyin bariyerinin bozulduğunun primer belirtecidir. Çalışmamızın materyali olarak kontrast tutan ve tutmayan hastaların sayısı birbirine eşit tutulmuştur. Kesinleşmiş data olmamakla beraber anjiyojenik potansiyelin belirteci olarak vurgulanan kontrast tutulumu olan oligodendrogliomlarda, KAM'de de bunun görülmesi bu bilgiyi teyit etmektedir. Diğer yandan Kaplan-Meier analizlerinde, kontrast tutulumu ile tümör nüksüne kadar geçen süre arasında anlamlı ilişki görülmüştür. Oligodendrogliomların derecelenmesi sorununda

Daumas-Duport ve ark. (121) nekroz, mitotik etkinlik, atipi ve dediferansiasyon gibi kriterleri içermeyen, sadece beyin MRG/BT'de kontrast tutulumu olup olmaması ve/veya mikroskopide endotel hiperplazisinin olup olmamasına göre dereceleme sistemi önermiştir .

5.3. 1p/19q LOH Anjiyoenez ilişkisi

1p/19q LOH olan ve olmayan tümörlerin anjiyojenik potansiyellerinde anlamlı farklılık görülmemiştir. 1p/19q LOH, 1998 yılından beri anaplastik oligodendrogliomlarda kemoterapiye duyarlılık belirteci olarak vurgulanmaktadır (1, 2). Ayrıca, 1p/19q LOH'nin kemosenitiviteden çok iyi prognoz belirteci olduğu da ileri sürülmektedir (4). Düşük dereceli oligodendrogliomlarda bu kromozomal değişikliğin rolüne dair bilgiler sınırlıdır, keza kemosenitivitenin mekanizmasına dair bir bilgi yoktur.

Çalışmamızda, neoplazik patolojilerin önemli bir komponenti olan anjiyoenezde, 1p/19q LOH'nin belirleyici bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Ayrıca, Kaplan-Meier analizlerinde de 1p/19q LOH tümör nüksüne kadar geçen süre ile ilişkisiz bulunmuştur. Yine de, örneklem büyüklüğümüzün 20 ile sınırlı olduğu ve 1p/19q LOH'nin olgu seçim kriterlerimiz içinde olmadığı unutulmamalıdır.

Ayrıca, örnek olgularımızdan olgu 1 LOH (-) olmasına rağmen, en geç dönemde nüks eden olgular arasındadır.

6. SONUÇLAR

1. Düşük dereceli oligodendrogliomların anjiyojenik potansiyelleri kontrast tutulumu ile ilişkilidir.
2. Aynı zamanda, anjiyojenik aktivite tümör nüks süresi ile ilişkilidir. Bu ilişkinin gerek radyolojik gerekse patolojik anjiyojenik belirteçlerle, derece belirlemede, prognoz beklentisinde klinik yararı olacaktır.
3. 1p/19q LOH düşük dereceli oligodendrogliomlarda iyi prognoz belirteci olarak gözükmemektedir.
4. Antianjiyojenik ilaç veya yöntemlerin kullanımı tedavi açısından düşünülmeli gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Cairncross G, Macdonald D, Ludwin S, Lee D, Cascino T, Buckner J, Fulton D, Dropcho E, Stewart D, Schold C Jr ve ark: Chemotherapy for anaplastic oligodendroglioma. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. J Clin Oncol Oct;12(10):2013-21, 1994.
2. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, Silver JS, Stark PC, Macdonald DR, Ino Y, Ramsay DA, Louis DN: Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. J Natl Cancer Inst 90(19):1473-79, 1998.
3. Celli P, Nofrone I, Palma L, Cantore G, Fortuna A: Cerebral Oligodendroglioma: prognostic factors and life history. Neurosurgery 35(6):1018-34, 1994.
4. Jeon YK, Park K, Park CK, Paek SH, Jung HW, Park SH: Chromosome 1p and 19q status and p53 and p16 expression patterns as prognostic indicators of oligodendroglial tumors: a clinicopathological study using fluorescence in situ hybridization. Neuropathology. 2007 Feb;27(1):10-20.
5. Brem S, Cotran R, Folkman J: Tumor angiogenesis: a quantitative method for histologic grading. J Natl Cancer Inst. Feb;48(2):347-56, 1972.
6. Brem SS, Cotran RS, Folkman MJ: Angiogenesis in brain tumors: a quantitative histologic study. Surg Forum. ;25(0):462-4, 1974.

7. Ariza A, Fernandez LA, Inagami T, Kim JH, Manuelidis EE. Renin in glioblastoma multiforme and its role in neovascularization. *Am J Clin Pathol.* Oct;90(4):437-41, 1988.
8. Assimakopoulou M, Sotiropoulou-Bonikou G, Maraziotis T, Papadakis N, Varakis I: Microvessel density in brain tumors. *Anticancer Res.* 1997 Nov-Dec;17(6D):4747-53.
9. Kilic T, Pamir MN, Kullu S, Eren F, Ozek MM, Black PM: Expression of structural proteins and angiogenic factors in cerebrovascular anomalies. *Neurosurgery.* 2000 May;46(5):1179-91.
10. Deniz ML, Kilic T, Almaata I, Kurtkaya O, Sav A, Pamir MN: Expression of growth factors and structural proteins in chordomas: basic fibroblast growth factor, transforming growth factor alpha, and fibronectin are correlated with recurrence. *Neurosurgery.* 2002 Sep;51(3):753-60.
11. Kilic T, Sohrabifar M, Kurtkaya O, Yildirim O, Elmaci I, Gunel M, Pamir MN: Expression of structural proteins and angiogenic factors in normal arterial and unruptured and ruptured aneurysm walls. *Neurosurgery.* 2005 Nov;57(5):997-1007.
12. Seker A, Yildirim O, Kurtkaya O, Sav A, Gunel M, Pamir MN, Kilic T: Expression of integrins in cerebral arteriovenous and cavernous malformations. *Neurosurgery.* 2006 Jan;58(1):159-68.
13. Brem SS: The role of vascular proliferation in the growth of brain tumors. *Clin Neurosurg.* 1976;23:440-53.

14. Klagsbrun M, Knighton D, Folkman J. Tumor angiogenesis activity in cells grown in tissue culture. *Cancer Res.* Jan;36(1):110-4, 1976.
15. Frame MC, Freshney RI, Vaughan PF, Graham DI, Shaw R. Interrelationship between differentiation and malignancy-associated properties in glioma. *Br J Cancer.* Mar;49(3):269-80, 1984.
16. McComb RD, Bigner DD: The biology of malignant gliomas--a comprehensive survey. *Clin Neuropathol.* 1984 May-Jun;3(3):93-106.
17. Farrell CL, Megyesi J, Del Maestro RF. Effect of ibuprofen on tumor growth in the C6 spheroid implantation glioma model. *J Neurosurg.* Jun;68(6):925-30, 1988.
18. Tamargo RJ, Leong KW, Brem H: Growth inhibition of the 9L glioma using polymers to release heparin and cortisone acetate. *J Neurooncol.* Oct;9(2):131-8, 1990.
19. Brem SS, Zagzag D, Tsanaclis AM, Gately S, Elkouby MP, Brien SE: Inhibition of angiogenesis and tumor growth in the brain. Suppression of endothelial cell turnover by penicillamine and the depletion of copper, an angiogenic cofactor. *Am J Pathol.* 1990 Nov;137(5):1121-42.
20. Maxwell M, Naber SP, Wolfe HJ, Hedley-Whyte ET, Galanopoulos T, Neville-Golden J, Antoniades HN: Expression of angiogenic growth factor genes in primary human astrocytomas may contribute to their growth and progression. *Cancer Res.* Feb 15;51(4):1345-51, 1991.
21. Zagzag D, Miller DC, Sato Y, Rifkin DB, Burstein DE: Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in astrocytomas. *Cancer Res.* 1990 Nov 15;50(22):7393-8.

22. Silbergeld DL, Ali-Osman F, Winn HR. Induction of transformational changes in normal endothelial cells by cultured human astrocytoma cells. *J Neurosurg.* Oct;75(4):604-12, 1991.
23. Plate KH, Breier G, Farrell CL, Risau W: Platelet-derived growth factor receptor-beta is induced during tumor development and upregulated during tumor progression in endothelial cells in human gliomas. *Lab Invest.* 1992 Oct;67(4):529-34.
24. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E: Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 1992 Oct 29;359(6398):843-5.
25. Goldman CK, Kim J, Wong WL, King V, Brock T, Gillespie GY: Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Mol Biol Cell.* 1993 Jan;4(1):121-33.
26. Stefanik DF, Rizkalla LR, Soi A, Goldblatt SA, Rizkalla WM: Acidic and basic fibroblast growth factors are present in glioblastoma multiforme. *Cancer Res.* 1991 Oct 15;51(20):5760-5.
27. Taki T, Ohnishi T, Arita N, Hiraga S, Saitoh Y, Izumoto S, Mori K, Hayakawa T: Anti-proliferative effects of TNP-470 on human malignant glioma in vivo: potent inhibition of tumor angiogenesis. *J Neurooncol.* 1994;19(3):251-8.
28. Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A: Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature.* 1994 Feb 10;367(6463):576-9.

29. Takamiya Y, Brem H, Ojeifo J, Mineta T, Martuza RL: AGM-1470 inhibits the growth of human glioblastoma cells in vitro and in vivo. *Neurosurgery*. 1994 May;34(5):869-75; discussion 875
30. Kilic T, Alberta JA, Zdunek PR, Acar M, Iannarelli P, O'Reilly T, Buchdunger E, Black PM, Stiles CD: Intracranial inhibition of platelet-derived growth factor-mediated glioblastoma cell growth by an orally active kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class. *Cancer Res*. 2000 Sep 15;60(18):5143-50.
31. Van Meir EG, Polverini PJ, Chazin VR, Su Huang HJ, de Tribolet N, Cavenee WK: Release of an inhibitor of angiogenesis upon induction of wild type p53 expression in glioblastoma cells. *Nat Genet*. 1994 Oct;8(2):171-6
32. Plate KH, Breier G, Weich HA, Mennel HD, Risau W: Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible in vivo regulatory mechanisms. *Int J Cancer*. 1994 Nov 15;59(4):520-9
33. Wesseling P, van der Laak JA, de Leeuw H, Ruiter DJ, Burger PC: Quantitative immunohistological analysis of the microvasculature in untreated human glioblastoma multiforme. Computer-assisted image analysis of whole-tumor sections. *J Neurosurg*. 1994 Dec;81(6):902-9.
34. Abramovitch R, Meir G, Neeman M: Neovascularization induced growth of implanted C6 glioma multicellular spheroids: magnetic resonance microimaging. *Cancer Res*. 1995 May 1;55(9):1956-62.

35. Aronen HJ, Glass J, Pardo FS, Belliveau JW, Gruber ML, Buchbinder BR, Gazit IE, Linggood RM, Fischman AJ, Rosen BR et al: Echo-planar MR cerebral blood volume mapping of gliomas. Clinical utility. *Acta Radiol.* 1995 Sep;36(5):520-8.
36. Fine HA: Novel biologic therapies for malignant gliomas. Antiangiogenesis, immunotherapy, and gene therapy. *Neurol Clin.* 1995 Nov;13(4):827-46.
37. Leon SP, Folkerth RD, Black PM: Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors. *Cancer.* 1996 Jan 15;77(2):362-72.
38. Pietsch T, Valter MM, Wolf HK, von Deimling A, Huang HJ, Cavenee WK, Wiestler OD: Expression and distribution of vascular endothelial growth factor protein in human brain tumors. *Acta Neuropathol (Berl).* 1997 Feb;93(2):109-17.
39. Christov C, Adle-Biassette H, Le Guerinel C, Natchev S, Gherardi RK: Immunohistochemical detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the vasculature of oligodendrogliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1998 Feb;24(1):29-35.
40. Chan AS, Leung SY, Wong MP, Yuen ST, Cheung N, Fan YW, Chung LP: Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the anaplastic progression of astrocytoma, oligodendroglioma, and ependymoma. *Am J Surg Pathol.* 1998 Jul;22(7):816-26.
41. Schiffer D, Bosone I, Dutto A, Di Vito N, Chio A: The prognostic role of vessel productive changes and vessel density in oligodendroglioma. *J Neurooncol.* 1999 Sep;44(2):99-107.

42. Vaquero J, Zurita M, Coca S, Oya S, Morales C: Prognostic significance of clinical and angiogenesis-related factors in low-grade oligodendrogliomas. *Surg Neurol*. 2000 Sep;54(3):229-34.
43. Vaquero J, Zurita M, Morales C, Coca S: Prognostic significance of the endothelial surface in low-grade resected oligodendrogliomas. *Br J Neurosurg*. 2001 Jun;15(3):247-50
44. Vaquero J, Zurita M, Morales C, Coca S: Prognostic significance of tumor-enhancement and angiogenesis in oligodendroglioma. *Acta Neurol Scand*. 2002 Jul;106(1):19-23.
45. Birner P, Gatterbauer B, Oberhuber G, Schindl M, Rossler K, Prodingner A, Budka H, Hainfellner JA: Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in oligodendrogliomas: its impact on prognosis and on neoangiogenesis. *Cancer*. 2002 Apr 15;94(8):2317-8.
46. Chaudhry IH, O'Donovan DG, Brenchley PE, Reid H, Roberts IS: Vascular endothelial growth factor expression correlates with tumour grade and vascularity in gliomas. *Histopathology*. 2001 Oct;39(4):409-15.
47. Buccoliero AM, Caldarella A, Arganini L, Mennonna P, Gallina P, Taddei A, Taddei GL: Cyclooxygenase-2 in oligodendroglioma: possible prognostic significance. *Neuropathology*. 2004 Sep;24(3):201-7.
48. Maia AC Jr, Malheiros SM, da Rocha AJ, da Silva CJ, Gabbai AA, Ferraz FA, Stavale JN: MR cerebral blood volume maps correlated with vascular endothelial growth factor expression and tumor grade in nonenhancing gliomas. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2005 Apr;26(4):777-83

49. Law M, Oh S, Johnson G, Babb JS, Zagzag D, Golfinos J, Kelly PJ: Perfusion magnetic resonance imaging predicts patient outcome as an adjunct to histopathology: a second reference standard in the surgical and nonsurgical treatment of low-grade gliomas. *Neurosurgery*. 2006 Jun;58(6):1099-107
50. Boudouresque F, Berthois Y, Martin PM, Figarella-Branger D, Chinot O, Ouafik L: Role of adrenomedullin in glioblastomas growth. *Bull Cancer*. 2005 Apr;92(4):317-26
51. Lim M, Guccione S, Haddix T, Sims L, Cheshier S, Chu P, Vogel H, Harsh G: $\alpha(v)\beta(3)$ Integrin in central nervous system tumors. *Hum Pathol*. 2005 Jun;36(6):665-9
52. Salmaggi A, Gelati M, Pollo B, Marras C, Silvani A, Balestrini MR, Eoli M, Fariselli L, Broggi G, Boiardi A: CXCL12 expression is predictive of a shorter time to tumor progression in low-grade glioma: a single-institution study in 50 patients. *J Neurooncol*. 2005 Sep;74(3):287-93
53. Bailey P, Cushing H: A Classification of the Tumors of the Glioma Group on a Histogenetic Basis With a Correlated Study of Prognosis. Philadelphia: Lippincott, 1926
54. Bailey P, Bucy PC: Oligodendrogliomas of the brain. *J Pathol Bacteriol* 32:735–751, 1929
55. Berger MS, Prados MD: Textbook of Neurooncology, 1st edition, 167 Elsevier Saunders, 2005

56. Kleihues P, Cavenee WK: World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumors of the Nervous System. Lyon : International Agency for Research on Cancer (IARC) Press, 2000
57. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW: The new WHO classification of brain tumours. Brain Pathol. Jul;3(3):255-68. 1993
58. Chin HW, Hazel JJ, Kim TH et al: Oligodendrogliomas I. A clinical study of cerebral oligodendrogliomas. Cancer 45:1458-66, 1980
59. Earnest F III, Kernohan JW, Craig WM: Oligodendrogliomas. A review of two hundred cases. Arch Neurol Psychiatry 63:964-976,1950
60. Roberts M, German WJ: A long term study of patients with oligodendrogliomas. Follow up of 50 cases including Dr. Harvey Cushing's series. J Neurosurg 24:697-700, 1966.
61. Burger PC, Vogel F: Oligodendroglioma. Surgical Pathology of The Nervous System and its Coverings, 2nd edition. New York:John Wiley & Sons, 1982.
62. Rubinstein LJ: Oligodendrogliomas. Tumors of the Central Nervous System. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; 85-104, 1972.
63. Mork SJ, Lindegaard K-F, Halvorsen TB, Lehmann EH, Solgaard T, Hatlevoll R, Harvei S, Ganz J, Oligodendroglioma: incidence and biological behavior in a defined population. J Neurosurg 63:881-889, 1985.

64. Zülch KJ: Brain Tumors, Their Biology and Pathology. 3rd edition, Berlin: Springer-Verlag; 241, 1986.
65. Burger PC, Scheithauer BW, Vogel F: Oligodendroglioma. Surgical Pathology of the Nervous System and its Coverings, 3rd edition. New York: John Wiley & Sons; 306-327, 1991
66. Daumas-Duport C, Varlet P, Tucker ML, Beuvon F, Cervera P, Chodkiewicz JP: Oligodendrogliomas. Part I: Patterns of growth, histological diagnosis, clinical and imaging correlations: a study of 153 cases. J Neurooncol. Aug;34(1):37-59, 1997
67. Shaw EG, Scheithauer BW, O'Fallon JR: Supratentorial gliomas: a comparative study by grade and histologic type. J Neurooncol. 1997 Feb;31(3):273-8.
68. Russel DS, Rubinstein LJ: Oligodendroglioma. Pathology of Tumors of the Central Nervous System. London, Edward Arnold, 1977.
69. Janqueira LC, Carneiro J, Kelley RO: Basic Histology, p 172, 7th edition, Lange medical books, 1992.
70. Coons SW, Johnson PC, Pearl DK: The prognostic significance of Ki-67 labelling indices for oligodendrogliomas. Neurosurgery 41:878-884, 1997.
71. Reis-Filho JS, Faoro LN, Carrilho C ve ark, Evaluation of cell proliferation, epidermal growth factor receptor, and bcl-2 immunoexpression as prognostic factors for patients with World Health Organization grade 2 oligodendroglioma. Cancer 88:862-869, 2000.

72. Less MB, Brostoff SW; Proteins of myelin, Myelin: Plenum Press, New York, 1984.
73. Figols J, Iglesias-Rozas JR, Kazner E; Myelin basic protein in human gliomas: a study of twenty five cases. Clin Neuropathol 4: 116-120, 1985.
74. Nakagawa Y, Perentes E, Rubinstein LJ; Immunohistochemical characterization of oligodendrogliomas: an analysis of multiple markers. Acta Neuropathol 72:15-22, 1986.
75. Perentes E, Rubinstein LJ; Immunohistochemical recognition of human neuro-epithelial tumors by anti-Leu 7 (HNK-1) monoclonal antibody. Acta Neuropathol 69:227-233, 1986.
76. Jagadha V, Halliday WC, Becler LE, Glial fibrillary acidic protein in oligodendrogliomas: a reflection of transient GFAP expression by immature oligodendroglia. Can J Neurol Sci 13: 307-311, 1986.
77. Cruz-Sanchez FF, Rossi ML, Buller JR, Oligodendrogliomas: a clinical, histological, immunocytochemical and lectin-binding study. Histopathology 19: 361-367, 1991
78. Smith MT, Ludwig CL, Godfrey AD, Armbrustmacher VW. Grading of oligodendrogliomas. Cancer 52:2107-2114, 1983
79. Burger PC, Kleihues P: Cytologic composition of the untreated glioblastoma with implications for evaluation of needle biopsies. Cancer. 1989 May 15;63(10):2014-23.

80. Bello MJ, Vaquero J, de Campos JM et al: Molecular analysis of chromosome 1 p abnormalities in human gliomas reveals frequent loss of 1p in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer* 57 (2):172-175, 1994.
81. Bello MJ, Leone PE, Vaquero J et al : Allelic loss at 1p and 19q frequently occurs in association and may represent early oncogenic events in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer* 64 (3):207-210,1995.
82. Bello MJ, Leone PE, Nebreda P et al: Allelic status of chromosome 1 in the neoplasms of the nervous system. *Cancer Genet Cytogenet* 83(2) :160-164, 1995.
83. Von Deimling A, Louis DN, von Ammon K et al: Evidence for tumor suppressor gene on chromosome 19q associated with human astrocytomas, oligodendrogliomas, and mixed gliomas. *Cancer Res* 52(15):4277-4279,b 1992.
84. Yong WH, Chou D, Ueki K et al: Chromosome 19 q deletions in human gliomas overlap telomeric to D19S219 and may target a 425 kb region centromeric to D19S112. *J Neuropathol Exp Neurol* 54 (5): 622-626, 1995
85. Rosenberg JE, Lisle DK, Burwick JA et al: Refined deletion mapping of the chromosome 19q glioma tumor suppressor gene to the D19S412-STD interval. *Oncogene* 13(11):2483-2485,1996.
86. Maintz D, Fiedler K, Koopmann J, Rollbrocker B, Nechev S, Lenartz D, Stangl AP, Louis DN, Schramm J, Wiestler OD, von Deimling A: Molecular genetic evidence for subtypes of oligoastrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 56(10):1098-1104,1997.

87. Rosso SM, van Dekken H, Krishnadath KK et al: Dtection of chromosomal changes by interphase cytogenetics in biopsies of recurrent astrocytomas and oligodendrogliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 56(10):1125-1131,1997.
88. Van den Bent MJ, Kros JM, Heimans JJ, Pronk LC, van Groeningen CJ, Krouwer HG, Taphoorn MJ, Zonnenberg BA, Tijssen CC, Twijnstra A, Punt CJ, Boogerd W: Response rate and prognostic factors of recurrent oligodendroglioma treated with procarbazine, CCNU, and vincristine chemotherapy. Dutch Neuro-oncology Group. *Neurology* Oct;51(4):1140-5, 1998.
89. Van den Bent MJ, Looijenga LH, Langenberg K, Dinjens W, Graveland W, Uytendewilligen L, Sillevis Smitt PA, Jenkins RB, Kros JM: Chromosomal anomalies in oligodendroglial tumors are correlated with clinical features. *Cancer* Mar 1;97(5):1276-84, 2003.
90. Di Rocco F, Carroll RS, Zhang J, Black PM. Platelet derived growth factor and its receptor expression in human oligodendrogliomas. *Neurosurgery* 42(2):341-346, 1998.
91. Wilkinson IM, Anderson JR, Holmes AE: Oligodendroglioma: an analysis of 42 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1987 Mar;50(3):304-12.
92. Shaw EG, Scheithauer BW, O'Fallon JR, Tazelaar HD, Davis DH: Oligodendrogliomas: the Mayo Clinic experience. *J Neurosurg*. 1992 Mar;76(3):428-34.

93. Smith DF, Hutton JL, Sandemann D, Foy PM, Shaw MD, Williams IR, Chadwick DW: The prognosis of primary intracerebral tumours presenting with epilepsy: the outcome of medical and surgical management. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1991 Oct;54(10):915-20.
94. Winger MJ, Macdonald DR, Cairncross JG: Supratentorial anaplastic gliomas in adults. The prognostic importance of extent of resection and prior low-grade glioma. *J Neurosurg*. 1989 Oct;71(4):487-93.
95. Keles GE, Lamborn KR, Berger MS: Low-grade hemispheric gliomas in adults: a critical review of extent of resection as a factor influencing outcome. *J Neurosurg*. Nov;95(5):735-45, 2001.
96. Olson JD, Riedel E, De Angelis LM: Long term outcome of low-grade oligodendroglioma and mixed glioma. *Neurology* 54: 1442-1448, 2000.
97. Kaye AH, Laws ER: *Brain Tumors: An encyclopedic approach*, Second Edition, Churchill Livingstone, 2001
98. Lacroix M, Abi-Said D, Fournier DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E, Hess K, Michael C, Miller D, Sawaya R: A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 95:190-198, 2001
99. Berger MS, Deliganis AV, Dobbins J, Keles GE: The effect of extent of resection on recurrence in patients with low grade cerebral hemisphere gliomas. *Cancer* Sep 15;74(6):1784-91, 1994

100. Puduvalli VK, Hashmi M, McAllister LD, Levin VA, Hess KR, Prados M, Jaeckle KA, Yung WK, Buys SS, Bruner JM, Townsend JJ, Davis R, Sawaya R, Kyritsis AP: Anaplastic oligodendrogliomas: prognostic factors for tumor recurrence and survival. *Oncology* 65(3):259-66, 2003
101. Kros JM, Pieterman H, van Eden CG, Avezaat CJ: Oligodendroglioma: the Rotterdam-Dijkzigt experience. *Neurosurgery*. Jun;34(6):959-66, 1994
102. Karim AB, Afra D, Cornu P, Bleehan N, Schraub S, De Witte O, Darcel F, Stenning S, Pierart M, Van Glabbeke M: Randomized trial on the efficacy of radiotherapy for cerebral low-grade glioma in the adult: European Organization for Research and Treatment of Cancer Study 22845 with the Medical Research Council study BRO4: an interim analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* Feb 1;52(2):316-24, 2002.
103. Soffietti R, Ruda R, Bradac GB, Schiffer D. PCV chemotherapy for recurrent oligodendrogliomas and oligoastrocytomas. *Neurosurgery* Nov;43(5):1066-73, 1998.
104. Mason WP, Krol GS, DeAngelis LM: Low-grade oligodendroglioma responds to chemotherapy. *Neurology* Jan;46(1):203-7, 1996.
105. Trask BJ: Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nat Rev Genet* 3:769-78,2002.
106. Weise A, Harbarth P, Claussen U, Liehr T: Fluorescence in situ hybridization (FISH) on human chromosomes using photoprobe biotin labelled probes. *J Histochem Cytochem* 51:549-51, 2003

107. Raap AK. Advances in fluorescence in situ hybridization. *Mutat Res* 400:287-98, 1998
108. Petersen BL, Sorensen MC, Pedersen S, Rasmussen M. Fluorescence in situ hybridization on formalin fixed and paraffin embedded tissue: optimizing the method. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 12:259-65, 2004
109. Folkman J: Tumor angiogenesis. *Molecular Basis of Cancer*. 206-32, W. B. Saunders, Philadelphia, 1995
110. Folkman J: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med.* 1, 27-31, 1995
111. Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 277, 48-50, 1997
112. Risau W: Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671-74, 1997
113. Ausprunk DH, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res.* 14, 53-65, 1977
114. Sholley MM, Ferguson GP, Seibel HR, Montour JL, Wilson JD. Mechanisms of neovascularization: Vascular sprouting can occur without proliferation of endothelial cells. *Lab Invest.* 51, 624-34, 1984
115. Patan S, Munn LL, Jain RK. Intussusceptive microvascular growth in a human colon adenocarcinoma xenograft: A novel mechanism of tumor angiogenesis. *Microvasc Res.* 51, 260-72, 1996

116. Jain RK, Schlenger K, Hockel M, Yuan F: Quantitative angiogenesis assays: progress and problems. *Nat Med.* 1997 Nov;3(11):1203-8.
117. Montesano R: 1992 Mack Forster Award Lecture. Review. Regulation of angiogenesis in vitro. *Eur J Clin Invest.* 1992 Aug;22(8):504-15.
118. Montesano R, Vassalli JD, Baird A, Guillemin R, Orci L: Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Oct;83(19):7297-301.
119. Sankar S, Mahooti-Brooks N, Bensen L, McCarthy TL, Centrella M, Madri JA: Modulation of transforming growth factor beta receptor levels on microvascular endothelial cells during in vitro angiogenesis. *J Clin Invest.* 1996 Mar 15;97(6):1436-46.
120. Konya D, Yildirim O, Kurtkaya O, Kilic K, Black PM, Pamir MN, Kilic T: Testing the angiogenic potential of cerebrovascular malformations by use of a rat cornea model: usefulness and novel assessment of changes over time. *Neurosurgery.* 2005 Jun;56(6):1339-45
121. Daumas-Duport C, Tucker ML, Kolles H, Cervera P, Beuvon F, Varlet P, Udo N, Koziak M, Chodkiewicz JP. Oligodendrogliomas. Part II: A new grading system based on morphological and imaging criteria. *J Neurooncol.* Aug;34(1):61-78, 1997
122. Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W: Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature.* 1992 Oct 29;359(6398):845-8