



**T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GLİOBLASTOMLARDA METİL GUANİN METİL
TRANSFERAZ PROMOTER BÖLGESİNDE
METİLASYONUN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYON
YÖNTEMİYLE GÖSTERİLMESİ, KLİNİK ve
HİSTOPATOLOJİK PROGNOSTİK FAKTÖRLERLE
İLİŞKİSİ**

**Dr. Fatma BAYRAM
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Suzan ZORLUDEMİR**

ADANA-2012



**T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GLİOBLASTOMLARDA METİL GUANİN METİL
TRANSFERAZ PROMOTER BÖLGESİNDE
METİLASYONUN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYON
YÖNTEMİYLE GÖSTERİLMESİ, KLİNİK ve
HİSTOPATOLOJİK PROGNOSTİK FAKTÖRLERLE
İLİŞKİSİ**

Dr. Fatma BAYRAM

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Suzan ZORLUDEMİR

**Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu tarafından
TF2009LTP56 no'lu proje olarak desteklenmiştir.**

ADANA-2012

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında ve uzmanlık eğitimim süresince tecrübe, bilgi ve desteğini esirgemeyen tez hocam sayın Prof. Dr. Suzan ZORLUDEMİR'e teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. İlhan Tuncer, Prof. Dr. Figen Doran, Prof. Dr. Handan Zeren, Prof. Dr. Canan Ersöz, Prof. Dr. Gülfiliz Gönluşen, Prof. Dr. Melek Ergin, Prof. Dr. Derya Gümürdülü, Prof. Dr. Aysun Uğuz, Doç. Dr. Şeyda Erdoğan, Yard. Doç. Dr. Arbil Açıklalın ve Uzm. Dr. Emine Kılıç Bağır'a teşekkürlerimi sunarım.

Bulguların istatistiksel değerlendirilmesindeki yardımları için Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Gülşah ŞEYDAOĞLU'na, PCR aşamasında özverili çalışmaları için teknisyen Biyolog Demet ARAS'a, Patoloji laboratuvarında tezimin her aşamasında yardım eden başta Sinan ÖZBULAT, Elif ŞAN, Perihan TÜRKOĞLU'na ve diğer patoloji teknik elemanlarına, rapor-bölüm sekreterlerimize ve tüm bölüm çalışanlarına, asistanlık sürecini paylaştığım, birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum, bölümümüzden mezun olmuş ve halen asistan olarak görev yapan arkadaşlarıma, verdiği destek için eşim Dr. Yasin BAYRAM'a, bu günlere gelmemi sağlayan aileme ve neşe kaynağım oğluma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLO LİSTESİ.....	III
ŞEKİL LİSTESİ.....	IV
KISALTMA LİSTESİ.....	V
ÖZET ve ANAHTAR SÖZCÜKLER.....	VI
ABSTRACT and KEY WORDS	VII
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Beyin Tümörleri.....	2
2.2. Glioblastom.....	5
2.2.1. Etyoloji.....	5
2.2.2. Glioblastomda Klinik Özellikler	6
2.2.3. Glioblastomda Radyolojik Özellikler	6
2.2.4. Glioblastomda Makroskopik Özellikler	8
2.2.5. Glioblastomda Mikroskopik Özellikler.....	9
2.2.6. Glioblastomun İmmünohistokimyasal Özellikler	12
2.2.7. Glioblastomun Ultrayapısal Özellikleri	13
2.2.8. Glioblastomun Moleküler ve Sitogenetik Özellikleri	13
2.2.8.1. p53.....	17
2.2.8.2. EGFR	18
2.2.8.3. Ras ve PI3K/AKT	19
2.2.8.4. Kromozom 10 Kaybı	19
2.2.8.5. 1p ve 19q Kromozom Kodelasyonu	20
2.2.8.6. Kitinaz 3-like 1	20
2.2.8.7. IDH1/2 Mutasyonu.....	20
2.2.8.8. MGMT	21
2.2.9. Metastaz ve Yayılım	27
2.2.10. Ayırıcı Tanı	28
2.2.11. Glioblastom Tedavisi	29
2.2.11.1. Glioblastom Tedavisinde Cerrahi.....	30
2.2.11.2. Glioblastom Tedavisinde Radyoterapi.....	30
2.2.11.3. Glioblastom Tedavisinde Kemoterapi.....	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. PCR Yöntemi	33
3.2. İmmünohistokimya (İHK).....	40
3.3. Değerlendirme.....	40
4. BULGULAR.....	41
5. TARTISMA	55
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	63
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	74

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo No</u>	<u>SayfaNo</u>
Tablo 1. WHO 2007- Histolojik olarak primer beyin tümörlerinden nöroepitelyal doku tümörleri	3
Tablo 2. Glioblastomda genetik değişiklikler	16
Tablo 3. Glioblastom için varsayılan biomarkerlar ve biyolojik rolleri	17
Tablo 4. Olguların yaş, cinsiyet ve lokalizasyona göre dağılımı	41
Tablo 5. Olguların histomorfolojik ve tedavi durumlarına göre dağılımı	42
Tablo 6. İmmünohistokimyasal markerların glioblastomda dağılımı.....	43
Tablo 7. MGMT'nin klinik ve histopatolojik parametrelerle ilişkisi	44
Tablo 8. MGMT'nin immünohistokimyasal parametrelerle ilişkisi.....	45
Tablo 9. MGMT ile survey ilişkisi	45
Tablo 10. Cox regresyon analiz sonuçları	54
Tablo 11. Glioblastomlarda yayımlanan serilerde MGMT metilasyon durumu.....	58

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Sağ temporal lobda glioblastoma multiforme’li bir olgunun manyetik rezonans görüntülemesi.....	7
Şekil 2. Glioblastomun kesitte görünümü.....	9
Şekil 3. Glioblastomda palizatik nekrozun mikroskopik görünümü.....	10
Şekil 4. Küçük hücreli glioblastomda küçük, yuvarlak hücreler ile normal ve atipik mitoz	11
Şekil 5. Primer ve sekonder glioblastom gelişmesinde meydana gelen genetik değişiklikler	14
Şekil 6. Alkilasyon ajanlarının sitotoksik etkisi	23
Şekil 7. Unmethile MGMT’ye sahip gliom hücresinde TMZ’e olan kemorezistans mekanizma.....	24
Şekil 8. Metile MGMT’ye sahip gliom hücresinde TMZ duyarlılığı	24
Şekil 9. Temozolomid Molekülü ve Etki Mekanizması.....	25
Şekil 10. Glioblastomda palizatlanmış nekroz alanları HE X 100.....	46
Şekil 11. Glioblastomda vasküler endotelial proliferasyon HEX 200.....	46
Şekil 12. Glioblastom’da nükleer (3+) boyanma p53 x200	47
Şekil 13. Glioblastom’da membranöz boyanma EGFR X 400	47
Şekil 14. Glioblastom olgusunda yüksek Ki 67 oranı x400.....	48
Şekil 15. Glioblastom’da atipik mitoz H&E X 400	48
Şekil 16. PCR % 2,5’lik agaroz jel’deki görüntü: Agaroz–MGMT	49
Şekil 17. PCR poliakrilamide jel’deki görüntü: (29:1 oranında PAGE) MGMT.....	49
Şekil 18. Glioblastom için kanser spesifik yaşam eğrisi.....	50
Şekil 19. MGMT için kanser spesifik yaşam eğrisi	51
Şekil 20. p53 için kanser spesifik yaşam eğrisi	51
Şekil 21. Ki-67 için kanser spesifik yaşam eğrisi.....	52
Şekil 22. EGFR için kanser spesifik yaşam eğrisi	52
Şekil 23. Nekroz için kanser spesifik yaşam eğrisi	53
Şekil 24. VEP için kanser spesifik yaşam eğrisi	53

KISALTMALAR

ark	: Arkadaşları
bp	: Baz çifti
CDKN2A	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2
CHI3L1	: Kitinaz 3-like 1
EGFR	: Epidermal growth factor receptor
EMA	: Epitelyal membran antijeni
FDG	: 18F-florodeoksiglukoz
HDM2	: İnsan double minute 2
H&E	: Hematoksilen Eozin boyası
IDH-1	: İzositrat dehidrogenaz 1
IGFRBP	: İnsulin büyüme faktörü bağlanma proteini
GFAP	: Glial Fibriler Asidik Protein
GREs	: Glikokortikoid yanıt elementi
GRP78	: Endoplazmik retikulum stres sinyalinde yer alan glikoz
GTP	: Guanozin trifosfat
Kb	: Kilobaz
KT	: Kemoterapi
LOH	: Heterozigosite kaybı
MAPK	: Mitojen aktive edici protein kinaz
MDM2	: Mürin Double Minute
MGMT	: Metilguanin metiltransferaz
MRS	: Manyetik rezonans spektroskopisi
MSP	: Metilasyon spesifik PCR
NADP⁺	: Nikotinamid Adenin di Nükleotid fosfat
NFκB	: Nükleer faktör κB
PAS	: Periodik Acid Schiff
PAGE	: Polyakrilamide jel
PCNA	: Proliferating Cell Nükleer Antigen
PCR	: Polymerase chain reaction
PDGFRA	: Platelet kökenli büyüme faktörü reseptörü A protein
PET	: Pozitron emisyon tomografi
PI3K	: Fosfatidilinositol 3 kinaz
Prb	: Retinoblastom yatkınlık lokusu protein 1
PTEN	: Fosfat ve tensin homolog
P53	: Tümör baskılayıcı protein 53
RASSF1A	: Ras association domain family protein 1
RT	: Radyoterapi
SPECT	: Single photon emisyon tomography
SSS	: Santral sinir sistemi
TMZ	: Temazolamid
TP53	: Tümör baskılayıcı gen 53
VEGF(R)	: Vascular endothelial growth factor (receptor)
WHO	: World Health Organization
99mTcHMPAO	: Tc 99m heksametilpropilen amin-oksım
201 TI	: Talyum 201

ÖZET

Glioblastomlarda Metil Guanin Metil Transferaz Promoter Bölgesinde Metilasyonun Polimeraz Zincir Reaksiyon Yöntemiyle Gösterilmesi, Klinik ve Histopatolojik Prognostik Faktörlerle İlişkisi

Amaç: Bu çalışmada, glioblastomlarda Metil Guanin Metil Transferaz (MGMT) geninin promoter bölgesindeki mutasyonu araştırmak, tümör oluşumunda oynadığı rolü ortaya koymak ve bu bulguların histopatolojik prognostik faktörlerle ilişkisini belirlemek amaçlanmıştır. Ayrıca uygulanacak tedavide özellikle temozolomid gibi alkilleyici ajan seçiminde beklenen yararı ortaya koymak hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntemler: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2008-2011 yılları arasında tanı alan glioblastom olguları retrospektif olarak gözden geçirildi, 55 olgu çalışma için seçildi. Hastaların yaş, cinsiyet ve sağ kalım süreleri araştırıldı. Tümörün lokalizasyonu, alt tipi, histomorfolojik özellikleri: nekroz, vasküler endotelial proliferasyonu ve immüno histokimyasal olarak p53, *Epidermal growth factor receptor* (EGFR), Ki-67 boyanma sonuçları değerlendirildi. *Polymerase chain reaction* (PCR) yöntemi ile MGMT promoter bölgesinde metilasyon varlığı araştırıldı. Sonuçlar istatistiksel olarak Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda değerlendirildi.

Bulgular: Yaş, cinsiyet, lokalizasyon, histomorfolojik özellikler ve immüno histokimyasal parametreler: Ki-67, EGFR ile sağkalım süresi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p > 0,05$). p53 boyanma derecesi ile survey arasında pozitif bir korelasyon belirlendi ($p=0,003$). Olguların 32 (% 58,2)'sinde metile MGMT, 23 (% 41,8)'inde unmetile MGMT DNA'sı saptandı. Unmetile olguların metilize olanlara göre daha uzun süre yaşadığı gözlemlendi ($p=0,02$).

Sonuç: Bu çalışmada alkilleyici kemoterapötik ajan verilecek glioblastom hastalarında beklenen prediktif ve prognostik faktörü ortaya koymak için PCR ile MGMT promoter bölgesinin metilasyon durumuna bakılmasının faydalı ve yardımcı bir yöntem olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Glioblastom, PCR, MGMT

ABSTRACT

Demonstration of Methyl Guanine Methyl Transferase Promoter Methylation in Glioblastomas by Polymerase Chain Reaction Method, Correlation of Clinical and Histopathological Prognostic Factors

Aim: The aim of this study is to evaluate the mutation on promoter region of Methyl Guanine Methyl Transferase (MGMT) gene, the role of tumor pathogenesis and to detect correlation of clinical and histopathological prognostic factors. As a result of this, temozolamide therapy may be intended for management of those patients.

Material and Methods: The glioblastoma cases which were diagnosed in Cukurova University Faculty of Medicine Department of Pathology between 2008-2011 were reviewed retrospectively, 55 cases were selected for the study. All cases were evaluated for age, gender and survival time. Also tumor localization, subtype, histomorphologic features: necrosis, vascular endothelial proliferation and immunohistochemical staining for p53, Epidermal growth factor receptor (EGFR), Ki-67 staining results were evaluated. The presence of methylation in the MGMT promoter region was investigated by Polymerase Chain Reaction (PCR) method. The results were statistically analysed in Cukurova University, Faculty of Medicine, Department of Biostatistics.

Results: There was no statistically significant difference between age, gender, location, histomorphologic features, immunohistochemical parameters: Ki-67, EGFR and survival time ($p > 0.05$). Immunohistochemical p53 staining was statistically significant with survey ($p = 0.003$). Thirty two of fifty five cases (58.2 %) had methylated MGMT DNA and 23 cases of them (41.8 %) had unmethylated MGMT DNA. The patients without methylated MGMT DNA had longer survival compared to methylated group ($p = 0.02$).

Conclusion: It was concluded that in order to demonstrate the expected predictive and prognostic factors in patients who would take alkylating chemotherapeutic agent for glioblastoma, evaluating the presence of methylation of MGMT promoter region with PCR might be a useful method.

Key Words: Glioblastoma, MGMT, PCR

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Glioblastom, astrositomun en ileri formudur. Erişkinlerde beyin tümörlerinin yaklaşık % 60'ını oluşturur. Erken tanısıyla ilgili zorluklar, hızlı progresyon ve sık rekürrens nedeniyle yaşamı aşırı derecede tehdit eden malign bir tümördür.^{1,2} Hastalarda sağkalım süresi ortalama bir yıldır.^{3,4}

Standart tedavi 1970'lerin sonunda cerrahiye takiben radyoterapi olmuştur.⁴⁻⁸ Uzun yıllar kemoterapinin yeri tartışmalı kalmıştır.⁹ Günümüzde ise, mümkün olan en geniş cerrahi rezeksiyon sonrasında adjuvant radyoterapi ve uygun olan hastalarda kemoterapi uygulaması tercih edilmektedir.¹⁰ Yapılan çalışmalar tedaviye temozolomid eklenmesinin, medyan sağ kalımı 12.1 aydan 14.6 aya çıkardığını göstermiştir.⁶

DNA tamir enzimi olan O⁶-metilguanin metiltransferaz (MGMT), guaninin O⁶ pozisyonundan bir alkil grubunu uzaklaştırarak DNA onarımında etkili bir rol oynar.¹⁷ Temozolomid ise aynı bölgeye metil grubu ekleyerek anormal DNA onarımına zemin hazırlar.^{11,12} MGMT geninin metilasyon yolu ile inaktivasyonu, Temazolamid'in bu sitotoksik etkisini ve tümörde antikanser etkinliğini artırır.

MGMT geni, promoter bölgesinde bulunan CpG adalarının metilasyonu sonucu sessizleşir.^{20,21} MGMT ekspresyonunun epigenetik susturulması, gliomlar dışında baş boyun, kolorektal, melanom ve akciğer tümörlerinde sıklıkla gerçekleşmektedir.^{13,18,19} Oldukça pahalı olan alkilleyici ajanlarla tedavi planlanan bu hastalarda, tümörde metilasyon durumu incelenerek, öncelikle ilacın duyarlı grubun belirlenmesi uygun olacaktır. Günümüzde promoter bölgenin metilasyonunun belirlenmesinde en yaygın kullanılan yöntem PCR'dır.

Bu çalışmamızda 55 glioblastom olgumuzda PCR yöntemi ile MGMT promoter bölgesinin metilasyon durumunu belirlemeyi, bunun; alkilleyici ajan verilecek hastalarda beklenen yararını ve prognostik önemini araştırmayı hedefledik. Metilasyon durumu ile olgularımızın klinik, histomorfolojik, immünohistokimyasal özelliklerini ve sağ kalım sürelerini karşılaştırdık. Ayrıca bu yöntemin laboratuvarımızda rutin olarak çalışmaya açılmasına öncülük etmeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Beyin Tümörleri

Beyin tümörleri tüm kanserlerin % 1,5'inden ve kansere bağlı ölümlerin % 2'sinden sorumludur.²⁴ Yirmili yaşlardan 70 yaşına kadar giderek artan bir sıklıkta izlenir. Tüm yaş gruplarında erkeklerde kadınlardan daha fazla görülmektedir.²⁵

Bu tümörler primer veya sekonder olarak sınıflandırılır. Primer olanlar glial dokudan, nöronlardan, meninkslerden, damarlardan veya endokrin hücrelerden kaynaklanır. Gliomlar destekleyici glial dokudan köken alan nöroepitelyal tümörlerdir. Astrositik, oligodendrogliyal, oligoastrositik ve ependimomlar olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadır.²⁵

Santral sinir sistemi (SSS) tümörleri oldukça fazladır. Günümüzde sınıflandırma patolojiye göre yapılmaktadır.^{26,27} Dünya Sağlık Örgütü (*World Health Organization*, WHO) tarafından en son sınıflama 2007'de güncellenmiştir. Bu sınıflandırmaya göre sinir sisteminin başlıca tümörleri;

- nöroepitelyal,
- metastatik,
- germ hücreli tümörler,
- kraniyal ve paraspinal sinirlerin tümörleri,
- meninksin tümörleri,
- sellar bölgenin tümörleri,
- lenfomalar ve hematopoietik neoplazmlardan oluşur.^{28,29}

Astrositomlar bu sisteme göre nöroepitelyal doku tümörleri içerisinde yer alır (Tablo 1). Histopatolojik görünümüne göre 4 grade'de incelenir.²⁹ Prognoz grade artışı ile giderek kötüleşir. Grade I'de yer alanlar, iyi farklılaşmış gliomlardır. Bu terim subependimal dev hücreli ve pilositik astrositom için kullanılır. Diffüz astrositomlar Grade II'dir. Anaplastik astrositomlar (AA) grade III düzeyindeki tümörlerdir. Malign astrositom veya yüksek dereceli astrositom olarak da bilinirler. Glioblastom grade IV'tür ve en malign glial tümördür.^{28,30}

Tablo 1. WHO 2007- SSS'nin Nöroepitelyal Doku Tümörleri.^{28,30}

NÖROEPİTELYAL DOKU TÜMÖRLERİ	GRADE
1. Astrositik tümörler	
a. Pilositik astrositoma	I
Pilomiksoid astrositoma	II
b. Subependimal dev hücreli astrositom	I
c. Pleomorfik ksantroastrositoma	II
d. Diffüz astrositoma	II
1. Fibriler astrositom	
2. Gemiositik astrositom	
3. Protoplazmik astrositom	
d. Anaplastik astrositom	III
e. Glioblastom	IV
1. Dev hücreli glioblastom	IV
2. Gliosarkom	IV
f. Gliomatozis serebri.....	III
2. Oligodendrogliyal tümörler	
a. Oligodendrogliom	II
b. Anaplastik oligodendrogliom.....	III
3. Oligoastrositik tümörler	
a. Oligoastrositom	II
b. Anaplastik oligoastrositom	III
4. Ependimal tümörler	
a. Subependimom	I
b. Miksopapiller ependimom	I
c. Ependimom	II
1. Sellüler	
2. Papiller	
3. Clear cell	
4. Tanisitik	
d. Anaplastik ependimom.....	III
5. Koroid plexus tümörleri	
a. Koroid plexus papillomu	0
b. Atipik koroid plexus papillomu	II
c. Koroid plexus karsinomu	III

6. Diğer nöroepitelyal tümörler

- a. Astroblastom III
- b. Üçüncü ventrikülün kordoid gliomu II
- c. Angiosentrik gliom I

7. Nöronal ve mixt nöroglial tümörler

- a. Serebellumun displastik gangliositomu 0
- b. Desmoplastik infantil astrositom / gangliogliom I
- c. Disembriyoplastik nöroepitelyal tümör 0
- d. Gangliositoma 0
- e. Ganglioglioma I
- f. Anaplastik gangliogliom III
- g. Santral nörositom II
- h. Ekstraventriküler nörositom II
- i. Serebellar liponörositom II
- j. Papiller glionöral tümör I
- k. Dördüncü ventrikülün roset formasyonlu glionöral tümörü I
- l. Paragangliom I

8. Pineal bölgenin tümörleri

- a. Pineositom I
- b. Pineoblastom IV
- c. Orta derecede diferansiyasyon gösteren pineal parenkimal tümör.....II / III
- d. Pineal bölgenin papiller tümörü II / III

9. Embriyonal tümörler

- a. Medulloblastom IV
 - 1. Desmoplastik/nodüler medulloblastom
 - 2. Ekstensiv nodülariteyle birlikte medulloblastom
 - 3. Anaplastik medulloblastom
 - 4. Büyük hücreli medulloblastom
- b. SSS primitif nöroektodermel tümör (PNET)..... IV
 - 1. SSS Nöroblastomu
 - 2. SSS Ganglionöroblastomu
 - 3. Medullaepitelyom
 - 4. Ependimoblastom
- c. Atipik teratoid/rabdoid tümör IV

2.2. Glioblastom

Glioblastom erişkinlerde en sık görülen (ortalama her yüzbinde 5 olgu) ve en malign beyin tümördür.³¹ İntrakranial tümörlerin % 12-15'ini ve astrositik grubun ise % 50-60'ını oluşturur.^{30,32} Her yaşta görülebilir, ancak olgular en sık 45-75 yaş arasındadır. Çocukluk çağında nadir görülür. Erkek/kadın oranı 1,5/ 1 civarındadır.³³

Glioblastomlar % 90'ı primer, % 10'u ise sekonder olan iki gruptan oluşur. İleri yaşta kendine özgü ortaya çıkan lezyonlar "primer" olarak tanımlanmıştır. Bunlar glial öncü hücrelerden direkt gelişen ve ilk histopatolojik incelemede glioblastom tanısı konulan tümörlerdir. Hızlı geliştikleri için ilk 3 ay içinde klinik belirti verirler. Primer olanlar (60 yaş), sekondere göre (30-40 yaş) ileri yaşlarda daha fazla görülmektedir.³⁴ Sekonder glioblastomlar düşük dereceli gliomlardan (grade II ve III) progresyon göstererek gelişirler. Bu tümörler kadınlarda daha yüksek insidansa sahiptir.⁷ Düşük dereceli astrositomların glioblastoma dönüşmesi için ortalama 4-5 yıl süre geçmesi gerekir.³⁵ Her iki grupta morfolojik olarak ayırt edilemez. Hasta yaşı dikkate alınmadığında ikisi de kötü prognoza sahiptir.²⁵

2.2.1. Etyoloji

Beyin tümörlerinin oluşumuna neden olan etken veya etkenler tam olarak belirlenememiştir. Çeşitli teoriler ileri sürülmüşse de bu konuda kesin bir sonuca ulaşılamamıştır. Travma, hormonal faktörler, çevre ve genetik faktörler üzerinde durulmaktadır.³⁶ Kansorejen madde içeren, özellikle petro-kimya sanayi artıkları ile temas edenler ile manyetik alan içerisinde çalışanlarda bu tümörün görülme sıklığı artmıştır.³⁶ Radyasyon en önemli risk faktörü olarak gösterilmiştir.^{26,37} Son yıllarda cep telefonu kullanımının beyin tümörlerinde artışa yol açtığı bildirilmiştir.³⁸ Diğer risk faktörleri arasında sigara, alerji ve viral enfeksiyon üzerinde durulmuştur.^{39,40}

Ailesel bir takım hastalıkların (Nörofibromatozis, Tuberoz skleroz, Turkot sendromu, Li-Fraumeni sendromu) glioblastom ile birliktelik gösterdiği belirtilmiştir. Genetik yatkınlık, Ollier's hastalığı, ailesel kolon adenokarsinomu (DNA mismatch tamir enzim eksikliği) ve Maffucci sendromunda bu tümöre eşlik eden bir faktördür.^{39,41}

2.2.2. Glioblastom'da Klinik Özellikler

Glioblastomlar, başlıca serebral hemisferlerde yerleşim gösteren infiltran tümörlerdir.^{30,42} En sık tuttuğu lokalizasyon frontal, en az tuttuğu lokalizasyon ise oksipital lob'dur.⁴³ Serebral hemisferlerde, 5. ve 6. dekatlarda bir pik insidans gösterir. Beyin sapındaki tümörler çocuklarda meydana gelmektedir. Serebellum her yaşta nadir yerleşim yeridir. Çok nadir olarak optik siniri de tutabilir.⁷

Glioblastom makroskopik incelemede çevre normal dokudan iyi sınırla ayrılmaktadır. Mikroskopik olarak incelendiğinde ise kitleden uzakta normal doku içine infiltrasyon gösterebilir.²⁶ Yüksek derecede invaziv özelliklere sahip olduğu için tümörün çevresindeki normal beyin dokusunda ödeme ve ekspansiyona neden olurlar.³¹

En yaygın belirtileri baş ağrısı, bulantı kusma, epileptik nöbetler, nöromotor fonksiyon kaybı, 3. ve 6. sinir tutulumları ve mental değişikliklerdir. Tutulan tümör lokalizasyonuna bağlı fokal bulgular da oluşabilir.⁴⁴ İrritatif etkiye bağlı olarak epileptik bulguların ortaya çıkması frontal ve temporal yerleşimli tümörlerde sıktır. Baş ağrısı, meninkslerde kan damarlarıyla ilişkili olan, ağrıya duyarlı sinir uçlarının irritasyonu ve lokal gerilimi sonucu gelişebileceği gibi, intrakranial basıncın artışı ile de ortaya çıkabilir. Sıklıkla bölgeseldir ve genellikle tümörün yerleşimi hakkında bilgi verir. Bulantı-kusma orta hat ve posterior fossa tümörleri ile ilişkilidir. Mental değişiklikler frontal ve temporal lob tümörlü hastalarda en sık görülen bulgulardan biridir.^{45,46}

Nörolojik bozukluklar, beyinin tutulduğu alana bağımlı olarak ortaya çıkar. Pariyatel lob tümörlerinde afazi, agnozi, kortikal apreksi, hemipleji veya parezi; temporal yerleşimlilerde yakın hafıza kaybı, auralı nöbetler ve hallusinasyonlar izlenebilir. Frontal lob lokalizasyonunda anosmi, kişilik değişiklikleri, olfaktor hallusinasyonlar; oksipital lob tümörlerinde görme alanı bozuklukları ve aleksi görülebilir.^{45,46} Glioblastomda çok nadiren intrakranial kanama olabilir.³⁷

2.2.3. Glioblastom'da Radyolojik Özellikler

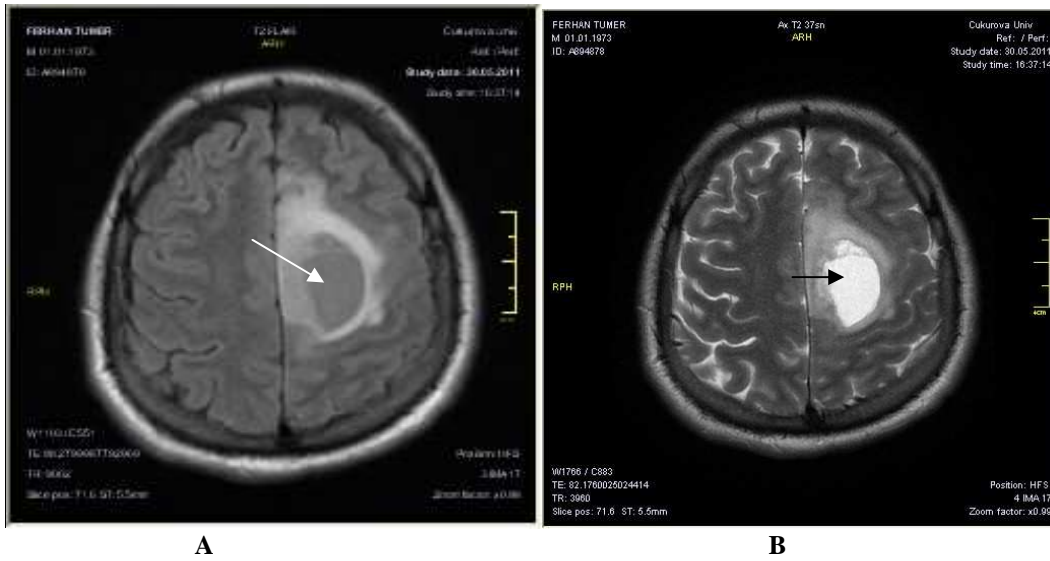
Son 20 yıldır, Magnetik Rezonans (MR) ve Bilgisayarlı Tomografi (BT), intrakranial ve spinal lezyonların tanısında standart kullanıma girmiş tekniklerdir.

Glioblastom genellikle BT'de 'hipodens' lezyondur, ancak 'izodens' de olabilir. Kontrast madde enjeksiyonunu sonrası BT'de kontrast tutan bölgeler, tümör dokusunu yansıtır. Bu tutulum, neovaskülarite varlığı ile ilişkilidir. Kanlanmanın zayıf olduğu

veya nekroz bölgeleri, kitle içinde yer alan düşük dansiteli alanlardır. Tümör çevresindeki aynı görünüm ise ödemi gösterir. BT, tanı ve cerrahi rezeksiyon sonrası tedavilere temel oluşturacak rezidüel tümörün boyutunu belirlemek için de kullanılmaktadır.⁴⁸

MR ise; normal anatomik yapıyı ve beyin parankimindeki değişiklikleri daha detaylı gösterir.^{47,49} MR'de glioblastom heterojen kitle şeklinde görünür. Bu heterojen görünüm nekroz ve/veya kist oluşumuna bağlıdır. T1A görüntüsünde genellikle santral yerleşimli hipointens alan mevcuttur. Bu hipointens alanı çevreleyen kalın, düzensiz duvar ve solid nodüller parankime göre izointens veya hafif hipointens sinyal paternine sahiptir. T2A incelemede heterojen yapıda hiperintens görünüm vardır. Çevresel ödem alanı T2A görüntülemeye belirgindir. İntravenöz gadolinyum sonrası yapılan incelemelerde opaklaşma her zaman saptanır. Bu boyanma genellikle tümörün kalın düzensiz duvarında halkasal olmaktadır (Şekil 1).⁴⁵

Bu radyolojik bulgular glioblastom için oldukça karakteristiktir. Grade II ve III astrositomdan ayırt etmeye de yardımcı olurlar.⁷



Şekil 1. Sağ temporal lobda glioblastomlu bir olgumuzun manyetik rezonans görüntülemesi. (A) Aksial T1A görüntülemeye hipointens lezyon (beyaz ok) olarak görülüyor. (B) T2A görüntülemeye bu lezyon hiperintens görünümde (siyah ok) ve etrafında yaygın ödem bölgesi mevcut.

Pozitron emisyon tomografi (PET); malign büyüme nedeniyle, metabolizması hızlı alanların farklılaşması sonucunda ortaya çıkan, doku değişkenliğini saptamaya yardımcı olan bir tanı yöntemidir. 'Single photon emisyon tomography' (SPECT) ve

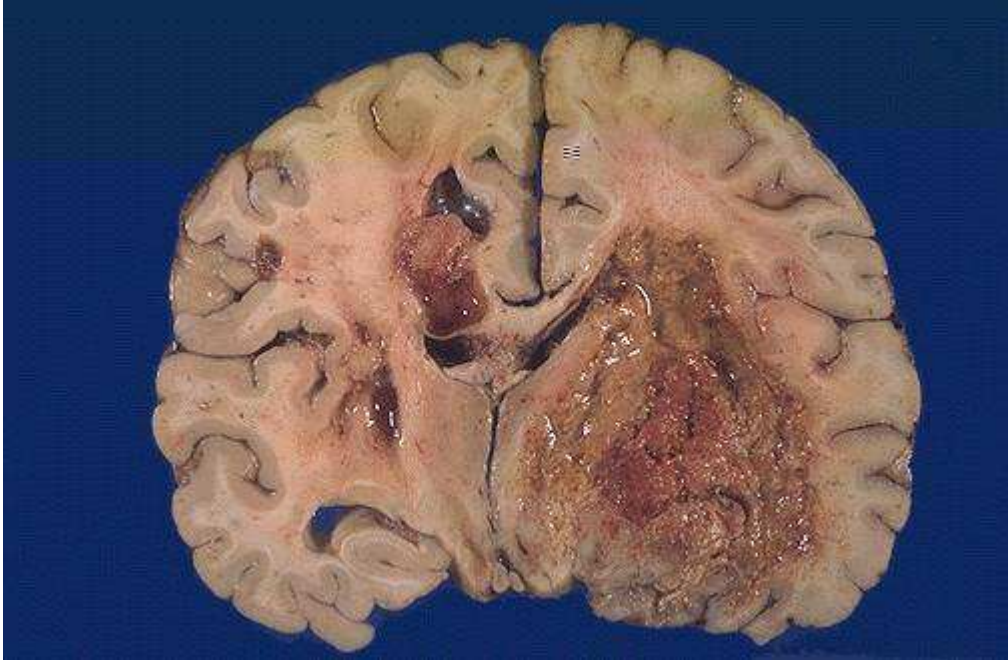
PET, tümör metabolizmasını anlamak ve radyasyon nekrozundan, neoplaziyi ayırt etmek için kullanılmaktadır. Malign hücrelerin daha fazla glukoz kullandığının bulunması üzerine, '18F-florodeoksiglukoz' (FDG) ile, PET çalışmaları genişletilmiştir. 'FDG-PE'in tanı ve tümör yönetiminde kullanılması birçok fayda sağlamıştır. Malignensinin derecesi, biyopsi alanının lokalizasyonu, tedavi sonrası metabolizma ölçümleriyle tümör nüksünün tespiti ve tümör nüksünü radyasyon nekrozundan ayırt etmek olanaklı hale gelmiştir. 'Talyum 201' (201 TI) tutulumunun, tümörü çevre beyin dokusundan ayırt ettiğinin bulunması ile, stereotaksik biyopsi alanının lokalize edilmesinde kullanılmıştır. Tümör nüksünün teşhisinde oldukça duyarlı bir tekniktir. Radyasyona bağlı gelişen değişikliklerden, tümör nüksünü ayırt etmekte ise duyarlılığı yetersizdir. 'TI 201' ve 'Tc 99m heksametilpropilen amin-oksım' (99mTcHMPAO)'in birlikte kullanımı ve bu maddelerin ardışık tutulumları sonucunda; radyasyon nekrozu ve nüks gliom ayırt edilebilmiştir. 'TcHMPAO' kan beyin bariyerini geçebilir. Nekrotik dokuda kan akımı azaldığı için, radyasyon nekrozunu tespit etmede yardımcıdır. Manyetik rezonans spektroskopisi (MRS); gliom metabolizması çalışmalarında yeni bir görüntüleme tekniğidir. MRS ile fosfor 31 ve hidrojen ölçümleri yapılarak, enerji metabolizmasının haritası çıkarılabilir, hücre zarının lipid metabolizması ve diğer hücre unsurları tanımlanabilir.⁵⁰

Opere olamayan hastalarda görüntüleme tekniklerinin yardımıyla stereotaktik biyopsi yapılır.⁷ Kesin tanı biyopsi veya eksize edilen lezyonun histopatolojik incelenmesi ile konur.⁴⁷

2.2.4. Glioblastom'da Makroskopik Özellikler

Glioblastomlar düzensiz ve kötü sınırlıdır.⁷ Hemoraji, kist formasyonları ve nekroz alanları içerir.^{51,52} Küçük, tromboze venler yaygındır.⁷ Kesit yüzeyi çeşitli renktedir. Taze dokularda nekroz ve kanama alanlarının olduğu yerler sarı, kırmızı ve kahverengi olarak gözlenir.⁷ Makroskopik kistler, diffüz astrositomdaki retansiyon kistlerinden farklı olarak likefiye nekrotik tümör dokusunu yansıtan sıvı içerir. Kitle genellikle tek taraflıdır. Beyin sapı ve korpus kallozumda bilateral ve simetrik olabilir. İlerlemiş lezyonlarda, korpus kallosumun gövdesinden her iki hemisfere de yayılan neoplasm kolları bir kelebeğinkine benzemektedir. Buna kelebek gliomu adı verilir

(Şekil 2).⁷ Glioblastomların çoğu serebral hemisferlerde yerleşir. Bu intra parankimal kitlelerin merkezi beyaz cevherdedir. Süperfişiyal yerleşimli kitleler leptomeninks ve dura ile ilişkilidir. Bu lokalizasyonda neoplazmlar sıklıkla kollajenden zengindir, cerrah ve nöroradyolog tarafından metastatik karsinom ya da menenjiom gibi ekstra aksiyel lezyon olarak yorumlanabilir. Bazı dev hücreli glioblastomların sınırı belirgindir ve bu durum metastatik karsinomla karıştırılabilir.⁷

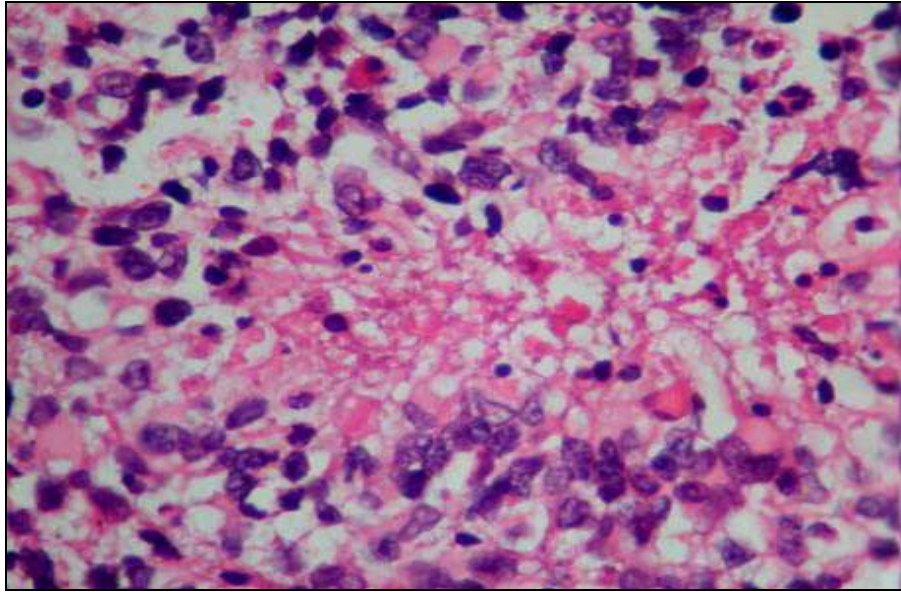


Şekil 2. Glioblastomun kesitte görünümü. Burada neoplazinin karşı hemisfere de geçtiğine dikkat edin. Buna kelebek gliomu adı verilir.³⁷

2.2.5. Glioblastom'da Mikroskobik Özellikler

Glioblastomlar histolojik ve sitolojik varyasyonlar gösterir. Yaygın patern, pleomorfik, hiperkromatik nükleus ve geniş sitoplazmalı hücrelerin düzensiz karışımından oluşur. Dağınık pleomorfik hücreler sıklıkla görülür. Hücrelerin birçoğu küçük ve bipolarıdır. Nükleolus belirgin değildir ve atipik mitozlar görülebilir.⁷ Mikrovasküler proliferasyon ve nekroz glioblastomlarda tanı için karakteristik iki önemli özelliktir. Tümörün iskemik alanlarında üretilen vasküler endotelial büyüme faktörü gibi vazojenik faktörler proliferasyona sebep olmaktadır. Endotelial hücreler ile birlikte düz kas hücreleri, perisitler ve adventisyal elementler de bu proliferasyonda rol

alırlar.⁷ Nekroz glioblastomun ayırıcı bir özelliğidir. Koagülatif tipteki bu odaklar sadece neoplastik dokuyu değil, vasküler sistemi de sarabilir. Küçük büyütmede neoplastik hücrelerin belirgin ve klasik periferik dizilimi nekroz bölgelerini ana hatlarıyla belirler (Şekil 3). Palizatlanan hücreler arasında apoptotik yapılar bulunabilir.⁷ Gemistositik astrositlerce ve dev hücre varyantlarıncı zengin olanlarda perivasküler lenfositler ve plazma hücreleri görülebilir.³⁷

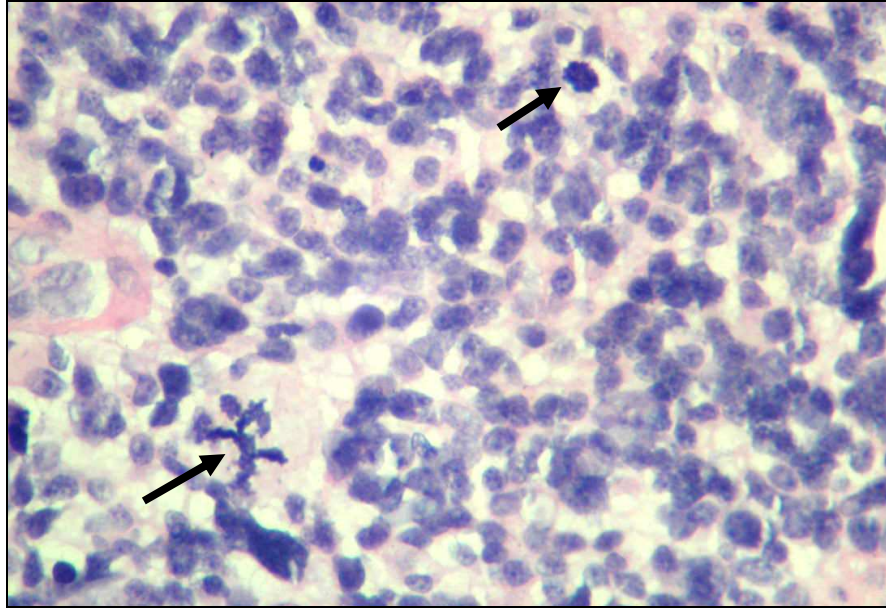


Şekil 3. Glioblastomda palizatik nekrozun mikroskopik görünümü. Yoğun selülarite, çarpıcı pleomorfizm ve glioblastomannın tipik karakteristik özelliği olan koagülatif nekroz alanını sıralayan ‘palizatik’ tümör hücreleri. H&E X 100

Glioblastomların sitolojik kompozisyonu geniş bir yelpazeye sahiptir. Tek düze küçük hücre neoplasmlarından dev hücreler içeren komponente kadar uzanabilir. Düşük grade’li astrositik neoplazmlar progresyon gösterebilirler. Aynı örnekte glioblastom ile birlikte iyi diferansiye ve anaplastik astrositom doku paternleri bir arada olabilir. Bu varyasyon sekonder glioblastomun ayırıcı özelliğidir. Kortekste, satellitosis, perivasküler birikim ve tümör hücrelerinin subpial toplanması gibi sekonder yapılar izlenebilir.⁷

Küçük hücreler glioblastom da yaygın olarak görülmesine rağmen onların baskın ve özel alt grubu Küçük Hücreli Glioblastom olarak bilinir. Bu alt tip küçük,

yuvarlak, hafif uzamış, orta derecede hiperkromatik nükleuslu, yüksek nükleer/sitoplazma oranı olan, minimum atipiye sahip monomorfik hücre popülasyonu içerir (Şekil4).^{28,30} Glial fibriler asidik protein (GFAP) immünreaktifliği sitoplazma miktarı ile orantılı olarak azdır.⁷ Mikrovasküler proliferasyon, nekroz belirgindir. Bu tümör fenotipi *Epidermal growth factor receptor* (EGFR) amplifikasyonu, p16^{INK4a} homozigot delesyonu, *Phosphatase and tensin homolog* (PTEN) mutasyonları ve *Loss of heterozygosity* (LOH) 10q gösterir. EGFR ve bunun varyantı olan EGFR VIII ekspresyonu yaygındır.^{28,30}



Şekil 4. Küçük hücreli glioblastomda küçük, yuvarlak, uniform hücreler ile normal ve atipik mitoz

Küçük, uniform hücreler oligodendrogliomaya benzerlik gösterebilir.⁷ Küçük hücreli glioblastomun nükleusu oligodendrogliomun uniform nükleer yuvarlaklığından yoksundur. Perivasküler psödoretler genellikle incedir ve ependimomdakilere benzemektedir. Çevre dokulara infiltrasyon gösterir.⁷ Küçük Hücreli dışı glioblastomlarla karşılaştırıldığında surveyde önemli farklılık yoktur.³⁰

Glioblastom oligodendroglioma benzeyen alanlar içerebilir. Bu alanlar çeşitli büyüklükte ve sıklıkta olabilir. Klasik glioblastomlardan daha iyi prognoza sahiptirler.

WHO 2007 sınıflamasında bu tümörler için 'oligodendrogliom komponentli glioblastom' tanımının kullanılması önerilmiştir.³⁰

Dev hücreli glioblastom, primer olarak çok loblu ve multinükleer büyük hücrelerden meydana gelir. Küçük hücrelerinde de bulunabildiği kollajenden zengin bir stroma ile karakterizedir.⁷ Kısa bir klinik hikaye ve %30 oranında PTEN mutasyonu vardır. Genç hastalarda, sekonder glioblastom ile birlikte bulunur. Tümör baskılayıcı protein (TP53) mutasyonu. % 70'den fazla bir oranda vardır. EGFR amplifikasyonu daha az görülür.²⁶ Proliferasyon indeksi düşük olan bu tümör uzun dönem sağ kalımla korelasyon göstermektedir.²⁵

Glioblastomlar epiteloid görümlü hücreler tarafından oluşturulabilir. Miksoid zemin bu lezyonlarda yaygın görülür ve tümöre mezenkimal görünüm verir. Psödoglandlarda medulloepiteliom benzeri patern ve tam skuamöz farklılaşma bulunabilir.⁷

2.2.6. Glioblastomun İmmünohistokimyasal Özellikleri

Neoplastik hücrelerin içinde glial filamentlerin varlığı GFAP immünohistokimya (İHK) boyası ile kanıtlanabilir. Spindle hücrelerin sitoplazmalarında ve gemistositlerin periferinde bu filamentöz protein reaktivitesi dikkati çeker. Küçük hücre komponentinde boyanma yetersizdir. GFAP'ın negatif olması glioblastom tanısını dışlamaz. Dokunun aşırı işlenmesi immüno reaktivite kaybına neden olabilir.⁷

p53 proteini, p16 ve p21 gibi tümör inhibitör proteinlerle harmonize çalışmaktadır. TP53 geninde meydana gelen mutasyon bu ahengi bozarak gliomlarda daha malign formlara dönüşüme yol açmaktadır. Tüm astrositik tümörlerde gözlenen bu mutasyon AA'da (% 64), glioblastomdan (% 26) daha fazla bulunmuştur. p53 proteininin aşırı ekspresyonu sekonder glioblastomlarda >% 90 iken, primer tipte <% 35 saptanmıştır.³⁴

EGFR amplifikasyonun primer glioblastomun gelişmesinde ilk moleküler aberasyon olduğu düşünülmektedir.^{14,28,54} Aşırı ekspresyon, denovo grubun % 40-

50'sinde, sekonder tipin % 0-9.5'inde 35 yaşın altındaki hastalarda meydana geldiği belirlenmiştir.^{14,34,53,54}

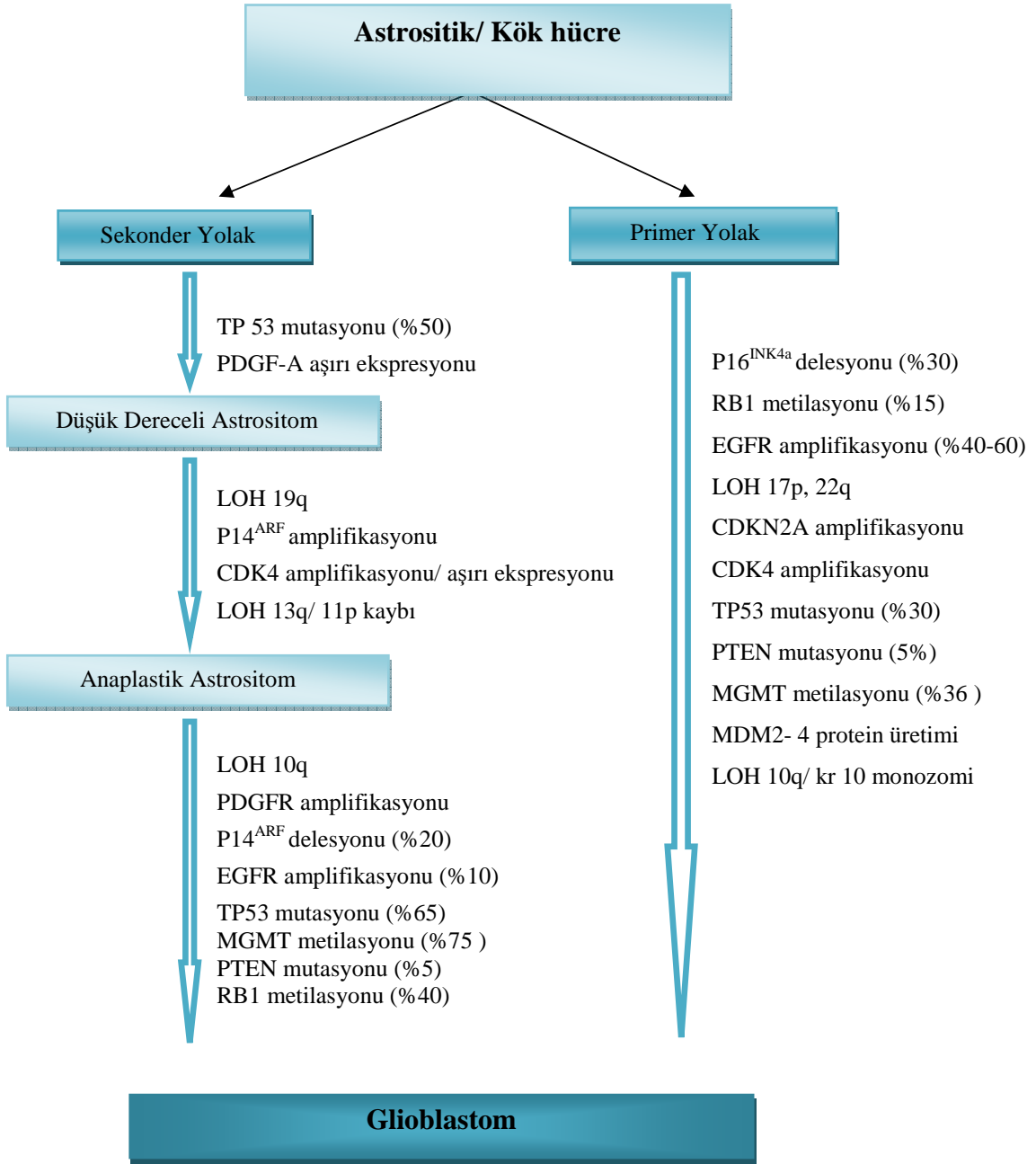
Glioblastom'un Ki-67 ile boyanma indeksi oldukça değişiklik göstermektedir. CDKN2 (p16) delesyonu olan tümörlerde yüksek seviyeler bildirilmiştir. Bu indeksin prognozda kullanımı azdır.⁷

2.2.7. Glioblastom'un Ultrayapısal zellikleri

Elektron mikroskopisi glioblastomun tanısında çok nadir kullanılır. Seçilmiş örneklere lezyonun nonepitelyal yapısı gösterilebilir. Tümör hücrelerinde düzensiz bağlantı noktaları sıktır. Tonofilament içeren iyi desmozom bağlantıları yoktur.⁷

2.2.8. Glioblastom'un Moleküler ve Sitogenetik zellikleri

Glioblastom'un genetik yapısı heterojendir. Farklı hastalara ait örneklere ve aynı tümör dokusunda genetik yapı değişmektedir. Bu yüzden hastalık 'multiform' olarak isimlendirilmiştir.^{41,44} Son moleküler parametreler, glioblastomları 'primer' ve 'sekonder' tipler olarak alt sınıflara ayırmıştır. Her iki tip tümörde sitogenetik farklılıklar da vardır.³² Düşük dereceli astrositomlardan glioblastoma kadar olan genetik değişiklikler Şekil 5'te özetlenmiştir. Dev hücreli glioblastom ise ara özelliklere sahiptir. Diğer alt tipler ve genetik anormalliklerin prognostik önemi henüz açıklama beklemektedir.⁷



Şekil 5. Primer ve sekonder glioblastom gelişmesinde meydana gelen genetik değişiklikler^{25,28,32,55}

Sekonder glioblastom için p53 mutasyonu, primer için EGFR amplifikasyonu karakteristik genetik değişikliklerdir.³² Sekonder grupta platelet kökenli büyüme faktörü reseptörü A (PDGFRA), PDGFRA ligandı ve TP53 genlerinde çeşitli genetik değişiklikler saptanmıştır. p16^{INK4A}, retinoblastom yatkınlık lokusu protein 1 (pRB1) genlerinde mutasyon, siklin bağımlı kinaz (CDK) 4/6 ve insan double minute 2

(HDM2)'de amplifikasyon, kromozom 10 delesyonları da gösterilmiştir.^{25,32} 19q kromozomundaki heterozigosite kaybı bu grupta daha yaygın görülmektedir.⁷

Primer glioblastom birçok anormalliğin sık görüldüğü alt tiptir. EGFR amplifikasyonu ve aşırı salınımı, PTEN'de delesyonlar, siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2 (CDKN2A) (p16)'da homozigot delesyonlar ve kromozom 10q23'te heterozigosite kaybı (LOH) en sık saptanan genetik değişikliklerdir. LOH olguların %60-80'inde meydana gelmektedir ve bu bölgede tümör baskılayıcı olan PTEN geni bulunmaktadır.²⁸ Tp53 gen mutasyonu primer grupta daha azdır ve geç yaşta ortaya çıkar. *Mürine Double Minutes* (MDM2) proteini p53'e karşı gelişen bir proteindir. MDM2'nin aşırı ekspresyonu, MDM2 geninin amplifikasyonu ve p53 mutasyonu bulunmayan primer glioblastomlarda saptanmıştır.³⁴

Kromozom 10 kaybı, PTEN gen delesyonu, primer ve sekonder glioblastomda saptanan ortak genetik değişikliklerdir. Ancak bu sınıflandırmanın kesin sınırları yoktur. Her iki tipte de p53 mutasyonu ve CDK4 amplifikasyonu gibi genetik değişikliklere rastlanabilir.^{25,32}

Tirozin kinazların aktivasyonu Ras onkogeni aracılığı ile mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) yolağını tetikler. Bu aktivasyon, glia hücresinde yaşam ve büyümeyi kontrol eden genlerin ekspresyonuna neden olur. Glioblastomda tirozin kinaz reseptörlerinde mutasyon oluşması sinyal yollarının kontrolsüz aktivasyonuna neden olmaktadır. Son yıllarda, oksidatif strese karşı korumada yer alan izositrat dehidrogenaz 1 (IDH1) geninde mutasyonlar da dikkat çekmiştir.⁴⁴

Sitogenetik yapı bakımından glioblastomlarda sayısal ve yapısal kromozomal anomaliler sık görülmektedir. t(15;19) ve t(10;19) translokasyonları ve 9p, 10p, 10q, 13q, 17p ve 19q bölgelerinde ki kayıplar sık saptanan anomalilerdir. Kromozomal kayıpların, kazanımlardan daha fazla olduğu tablo 2 de görülmektedir.^{34,55}

Tablo 2. Glioblastomda Genetik Değişiklikler⁵⁵

Gen	Kromozom	Mekanizma	Sıklık (%)
Multible	1p, 6q, 7q, 9p, 10p, 10q, 13q, 14q, 15q, 17p, 18q, 19q, 22q, Y	Kayıp	2- 75
Multible	1q, 3q, 4p, 4q, 7p, 7q, 12q, 13q, 19	Kayıp	80
CASP8	2q33	promotor metilasyonu amplifikasyon	-
KLF6	10p15	mutasyonla inaktivasyon	12
MGMT	10q26	Metilasyon	~75
NF1	17q11	mutasyonla inaktivasyon	-
NF2	22q11	Delesyon	-
p16-p14	9p21	homozigot delesyonu	~50
p16^{INK4a}	9p21	delesyon ve metilasyon	40-60
p14 A R F	9p21	delesyon ve metilasyon	-
p53	17p13	mutasyonla inaktivasyon	30-60
PTEN	10q23	mutasyonla inaktivasyon	5-40
RB 1	13q14	mutasyonla inaktivasyon	30
RUNX3	1p36	Metilasyon	-
TES	7q31	Metilasyon	-
TMS1/ASC	16p11	Metilasyon	20
CDK4	12q14	Amplifikasyon	-
CDK6	7q21	Amplifikasyon	-
COL4A2	13q34	Amplifikasyon	-
CSEIL	20q13	Amplifikasyon	~57
EGFR	7q21	Amplifikasyon	40-60
EGFRvIII	7p21	Amplifikasyon	20-30
ESR	-	Amplifikasyon	~36
FGR	1p35	Amplifikasyon	~36
GLI	12q13	Amplifikasyon	-
MDM2	12q15	Amplifikasyon	<10
MYC	8q24	Amplifikasyon	-
MYCN	2p24	Amplifikasyon	-
NRAS	1p13	Amplifikasyon	-
PDGFRA	4q12	Amplifikasyon	~65
PGY1	7q21	Amplifikasyon	~36
PIK3CA	3q26	Mutasyonla aktivasyon	-
SLA/LP	4p15	Amplifikasyon	-
SDTIM2	4p15	Amplifikasyon	-
TNFSF13B	13q33	Amplifikasyon	8

Glioblastomların yönetiminde kullanılacak biomarkerlar için araştırmalar devam etmektedir. İlk çalışmalar, başlıca immünohistokimya ile tanımlanan protein seviyelerine ve tümör dokusundaki moleküler genetik anormalliklere dayalıdır. Günümüzde ise tümör markerlarına, plazma, serum ve BOS'ta bakılmaktadır.¹⁵ En önemli biomarkerlar Tablo 3'te örneklenmiştir.

Tablo 3. Glioblastom için Varsayılan Biomarkerlar ve Biyolojik Rollerini¹⁵

Biomarker	Biyolojik Fonksiyonu	Glioblastom'da Önemi
<i>Tümör Doku Markerları</i>		
p53	Hücre siklusu kontrol noktası ve DNA tamiri	Mutasyon sekonder glioblastomda primere oranla daha yaygındır
EGFR	Proliferasyon, invazyon	Yaşlı ve primer glioblastomda amplifikasyonu ya da over ekspresyonu daha yaygındır
1p/19q	Biyolojik rolü bilinmiyor, oligodendroglial morfolojiye bağımlı kodelesyon ve olumlu sonuç	Kodelasyon seyrek ve önemi kesin değil
MGMT	DNA tamiri	Promoter metilasyonu sonucu alkilleyici ajanlara karşı artan sensitivite
IDH1	Biyolojik rolü bilinmiyor, muhtemelen proanjiojenik yollara bağımlı	Sekonder Glioblastoma bağı mutasyonlar ve pozitif G-CIMP
CD133	Fonksiyon bilinmiyor, marker glioma-başlatıcı hücrelerle ilişkili	CD133+ hücrelerin miktarı ya da daha kötü sonuçla ilişkili ekspresyon
<i>Serum Markerları</i>		
Metile MGMT promoter	DNA tamiri	Doku testi için vekil marker
VEGF(R)	Anjiogenez	Anjiogenik aktivite indikatörü
Kollajen IV	Kan damarlarının bazal membranı	Vasküler normalizasyonun indikatörü
miRNA	Gen ekspresyonunun regülasyonu	Bilinmiyor

2.2.8.1. p53

Tümör baskılayıcı gen olan Tp53, genom koruyucudur. Kodladığı protein p53; hipoksi, ultraviyole, radyasyon ve ilaç gibi nedenlerle hücrenin strese maruz kaldığı durumlarda p21, p14^{ARF}, MDM2 ve bax aktivasyonu yapar. Bu durum G1, G2 kontrol noktalarında siklusun durdurulmasına ve apoptoza neden olmaktadır. Astrositom onkogeneğinde Tp53 geninde mutasyon veya gen lokusunu içine alan allel kaybı olması kodlanan proteinin fonksiyon kaybına neden olur. Sonuçta yabancı (wild) p53 yokluğu ile hücre çoğalması kontrol edilemez ve hücrede apoptoz olayı gerçekleşemez.^{34,56}

Gliomu da içine alan kanserler içinde, Tp53 gen mutasyonu en yaygın moleküler genetik değişiklikler arasındadır.¹⁷ Kromozom 17p13 lokusunda oturan bu genin mutasyonu glial tümörler içinde en sık diffüz astrositomlarda saptanmıştır. Bu durum astrositom onkogenezinde ilk adımlarda gerçekleşen bir mutasyon olduğunu göstermektedir.⁵⁷ Mutasyonun oranı, sekonder glioblastomda % 65 iken primer de % 10'dur.³⁴ Glioblastomda bu mutasyonun prognostik değeri net değildir.⁵⁸ RT veya alkilleyici ajan KT'sine alınan cevabın tahmininde önemi henüz belirsizdir.¹⁵

2.2.8.2. EGFR

Kromozom 7q11.2'de oturan EGFR sinyal yolu de novo glioblastom gelişmesinde temel genetik değişikliklerden biridir. Genin amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonu glioblastomların % 35'inde bulunmuştur.³⁴ Bu ekspresyon tümörde artmış proliferasyon, invajinasyon ve dirençli apoptozla sonuçlanır.¹⁵ EGFR'ler tirozin kinaz reseptör ailesine bağlıdır.³⁴ Mitojen ile Aktive Protein Kinaz (MAPK) gibi hücrenin çoğalması ve yaşamından sorumlu sinyal yollarının aktivasyonuna neden olmaktadır. MAPK'ın aşırı ekspresyonu, RT'ye karşı dirençle ve kötü prognozla uyumlu bulunmuştur.^{15,34} AA'nın glioblastoma dönüşümünde MAPK aktivasyonu da sorumlu tutulmaktadır.³⁴

vIII varyantı (EGFRvIII), EGFR amplifikasyonu olan glioblastomaların % 20-40'ında belirlenmiştir.^{14,15,75} Gliomlara özgü bu varyant ekson 2-7'nin delesyonuyla karakterizedir.¹⁴

Hem yaban tip EGFR hem de vIII mutantın glioblastomda net prognostik rolü belirlenememiştir.^{14,15,75} Bazı çalışmalarda overekspresyonu kötü prognozla ilişkili bulunmuştur.¹⁵ vIII'ün glioblastomdan çok AA vakalarında prognostik olabileceği bildirilmiştir.¹⁴ Glioblastomlarda EGFRvIII negatifliğinin hastalarda prognostik olduğunu, pozitifliğinin ise prognostik önemi olmadığı belirtilmiştir.⁵⁹ Tedaviye yönelik EGFR varyantIII reseptörüne karşı aşılama stratejisi ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.¹⁵

2.2.8.3. Ras ve PI3K/Akt

Ras association domain family protein 1 (RASSF1A) insan DNA tamir proteini ile etkileşime girer. Bu proteinin aşırı ekspresyonu sonucunda mitotik siklinler stabilize olur ve hücre prometafaz safhasında durur. RASSF1A Ras'ın apoptozdaki rolüne aracılık eder.⁶⁰

İnvazyon, yer değiştirme, hücre sağ kalımı ve proliferasyonu gibi durumları *RASSF1A*, PI3K/Akt üzerinden yönetir. Aktive PI3K/Akt yolağı, tümör grade'nin artması, apoptozun azalmasında etkili bir yoldur.⁶¹ Ras'ın MAPK üzerinden aktivasyonu, radyasyon direncine, vaskülarizasyonun artmasına ve proliferasyona yol açar. p-MAPK, glioblastom hastalarında daha kısa sağ kalım süresi ve zayıf radyasyon cevabına neden olur.^{14,62}

Tümör süpresör gen olan *RASSF1A* 3p21.3 üzerinde yerleşir. Çeşitli kanserlerin tümöregenezisi sırasında, en çok promoter bölgenin metilasyonu yoluyla inaktifleşir. *RASSF1A*'nın metilasyonu gliomlar dahil farklı primer tümörlerde yüksek oranda bulunmuştur. Astrositomların % 32-% 70'inde metilasyon sonucu *RASSF1A* gen ekspresyon kaybı olur. Bu gen inaktivasyonu astrositom başlangıcı ve progresyonunda rol alır. Metilasyon oranı ile tümör grade'i artmaktadır.⁶⁰ Ras inaktivasyonu yüksek grade'li gliomlarda yaygındır.⁶¹ Metilasyonu normal dokularda nadiren görülür. Erken tümör tespiti ve hastalığın izlenmesinde promoter metilasyonunun tanısal araç olarak kullanımı önerilmiştir.⁶⁰

2.2.8.4. Kromozom 10 Kaybı

Glioblastomda kromozom 10 heterozigotluğunun kaybı sık görülen moleküler alterasyonlardandır. Primer ve sekonder glioblastomlarda yaklaşık % 60-80'inde meydana gelir. LOH; tüm kromozomun veya kolun kaybı olabildiği gibi delesyonlu bölge olarak da ortaya çıkabilir. 10p14-15, 10q23-24 ve 10q25-PTEN yaygın görülen delesyonlu bölgelerdir. 10q'daki delesyonlar daha çok sekonder glioblastomda görülürken, 10p ya da tüm kromozomun kaybı, sadece primer grupta görülür. LOH

10q'nun kısa dönem sağ kalımda oranı yüksek (% 73) bulunmuştur. Uzun dönem sağ kalımda oranı ise % 50 olarak bildirilmiştir.¹⁴

2.2.8.5. 1p ve 19q Kromozom Kodelesyonu

1p/19q kodelesyonu, bir hibrit kromozomun kaybına öncülük eder. Heterozigotluğun kaybına neden olan dengesiz bir translokasyon sonucu oluşur.¹⁵ Dengelenmemiş bir tüm-kol translokasyonu ile gerçekleşen bu delesyon RT ve KT'ye cevapta prediktif, güçlü bir prognostik faktördür. Bu kromozomların kodelesyonu oligodendroglial tümör oluşumunda erken genetik bir olaydır.¹⁶ Düşük dereceli astrositomların, anaplastik astrositom veya glioblastomlara dönüşümünde rol oynar. Kromozom 19q'da ki bu kayıp; sekonder glioblastomda % 54 gözlenirken, primerde % 6 düzeyinde saptanmıştır.^{34,63}

1p/19q delesyonu, p53 mutasyonu ve EGFR amplifikasyonu ile ters düşerken, MGMT promotor metilasyonu ve IDH1/2 mutasyonu ile birliktelik gösterir. Bu kodelesyonun yüksek grade'li gliomlarda iyi prognozla ilgili bir pronöral gen-ekspresyon profili olduğu gösterilmiştir.^{64,65}

2.2.8.6. Kitinaz 3-like 1 (CHI3L1)

Kitinaz benzeri protein, glioblastomda diğer SSS tümörleriyle karşılaştırıldığında aşırı eksprese edilen bir gen ürünüdür. CHI3L1'in yüksek serum seviyesi gliomun grade'i, potansiyeli ve tümör yükü ile paralellik gösterir. Yaşlı hastalarda görülen aşırı ekspresyonu radyasyon direncine neden olmaktadır. CHI3L1 tümör yükünün gösterilmesi için önerilmiş bir markerdir.¹⁶

2.2.8.7. İzositrat dehidrogenaz (IDH)1/2 Mutasyonu

İzositrat dehidrogenaz, Krebs devrine katılan bir enzimdir. Nikotinamid Adenin dinükleotid (NAD⁺) NADH'a dönüşürken, α -ketogluterat ve CO₂ üreterek izositratın oksidatif dekarboksilasyonunu katalizler. NAD redükte glutatyonun rejenerasyonunda önemli rol oynar. IDH1 dolaylı olarak oksidatif süreçte antioksidan görev almaktadır.

IDH1'in arjinin bulunan 132. aminoasit pozisyonunda (R132) bir mutasyon saptanmıştır. En yaygın (% 90) amino asit değişimi, arjininin histidine dönüşümüdür (R132H).¹⁴ Glioblastomların % 6-12'sinde bu mutasyon belirlenmiştir.¹⁴ Sekonder glioblastomda % 50-88 oranında görülen bu mutasyon primer grupta % 3-7 oranında saptanmıştır.⁶⁶

Tüm gliomlarda, IDH mutasyonu olan tümörler, wild tip içerenlere oranla daha az agresiftirler.^{15,54} IDH1 mutasyonu, bilinen klinik ve moleküler prognostik faktörlerden sonra sağ kalım ile güçlü bir ilişki içindedir.¹⁴ Mutasyona sahip grubun sağ kalım süresi daha uzundur.^{15,16,54,55,67} IDH statüsünü belirlemek, RT ya da KT'ye verilen yanıtları tahmin etmeye yardımcı değildir.¹⁵ Günümüzde hedefli tedavilerin dizaynı için IDH1 R132 mutantları araştırma konusudur.¹⁷

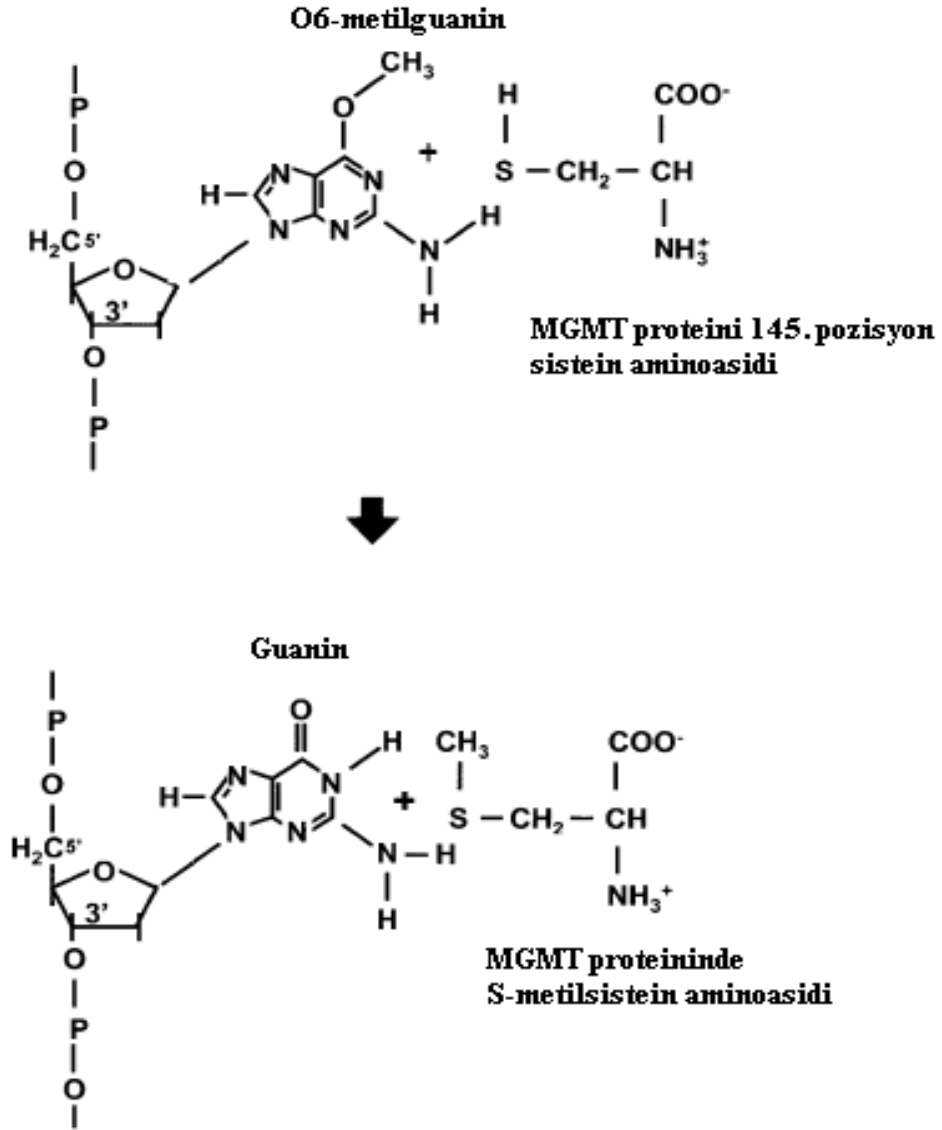
2.2.8.8. MGMT

Metil Guanin Metil Transferaz, 207 amino asitten oluşan (24 kDa), enzim benzeri küçük bir proteindir. Yarıömrü 24 saatten fazladır ve nispeten stabil bir proteindir.⁶⁹ Ribozomlarda sentezlendikten sonra sitoplazmadan çekirdeğe gelir. MGMT, hücrel genomu alkilleyici ajanların mutajenik etkilerinden koruyan en önemli DNA tamir proteindir.⁷⁰ MGMT'nin varlığında, alkilleyici ajanların toksisitesi azalır, guaninin O⁶ pozisyonundaki eklentilerin oluşumu tersine döner ve öldürücü çapraz bağların oluşumu inhibe olur. Bu protein aktivitesi nitrozoüre ve temozolomid gibi alkilleyici ilaçlara karşı direncin altında yatan majör bir mekanizmadır.⁷¹ Promoter metilasyonunun sağ kalımla güçlü bir şekilde ilişkili olduğu gösterilmiştir.^{12,13,15,16,54}

Kemoterapotik ajanlar tarafından indüklenen DNA alkilasyon bölgelerinden biri olan guaninin O⁶ pozisyonundan alkil grupları, MGMT tarafından uzaklaştırılır.¹² Bu alkil grupları baskılanarak, dolayısıyla alkilleyici ajanların etkileri sınırlandırılmaktadır. MGMT, birbirine komşu DNA dizileri arasındaki çapraz bağ formasyonunun önüne geçmek için dizayn edilmiştir.⁶⁵ Promotor bölgenin metilasyonu ile MGMT geni epigenetik olarak susturulur. Bu inaktivasyon MGMT ekspresyon kaybı ve azalmış DNA tamir aktivesi ile sonuçlanır.¹² Ekspresyon düzeyi, promotor bölgesindeki sitozin fosfat guanozin (CpG) adalarının hipermetilasyonu ile ters orantılıdır.⁷² Glioblastomlardaki ilk çalışmalarda MGMT promotor metilasyonunun kemoterapiye

cevapta bir prediktif faktör olabileceği düşünülmüştür. Son çalışmalarda geline nokta ise metilasyonun, RT ve KT'ye cevapta iyi bir prediktif marker olduğunu göstermiştir.^{12,15,16,54,31}

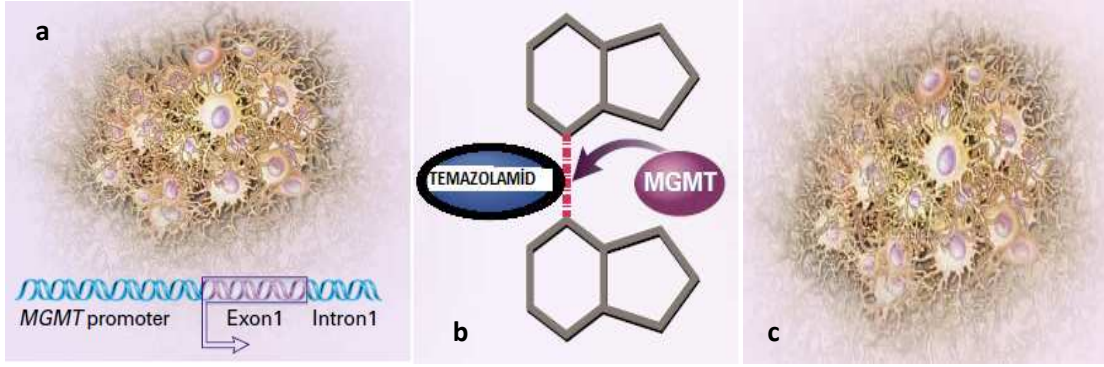
Alkilleyiciler tarafından oluşturulan DNA eklentileri ve özellikle guaninin O⁶ pozisyonunun alkilasyonu, mutasyonlarının oluşmasına ve kanserin indüklenmesine neden olur. MGMT molekülü, sitotoksik alkilleyici bileşiklere maruz kalan hücrelerde alkil eklentilerini kendi üzerindeki sistein amino asidine transfer eder.⁶⁹ Bu mekanizma şekil 6'da gösterilmiştir. Oluşan alkilasyonun mutajenik etkisini ortadan kaldırır. MGMT, alkilleyici ajanların sebep olduğu DNA hasarını tamir ederek bu moleküllere karşı gelişen direnç mekanizmalarından birini oluşturmaktadır.⁷¹ Bu tamir mekanizması sağlıklı hücreleri alkilleyici ajanlarının sitotoksik etkilerinden korumaktadır. Kanser hücrelerinde ise tedavi etkilerine karşı direnç gelişmesine neden olur. Bu çelişkili durum MGMT enzimini daha da önemli kılmaktadır. Enzim düzeyi yüksek olan tümör hücrelerinin alkilasyon ajanlarından TMZ'ye dirençli olduğu saptanmıştır.⁷³ MGMT düzeyi düşük olan hücrelerde ise TMZ duyarlılığı yüksek belirtilmiştir.^{73,74}



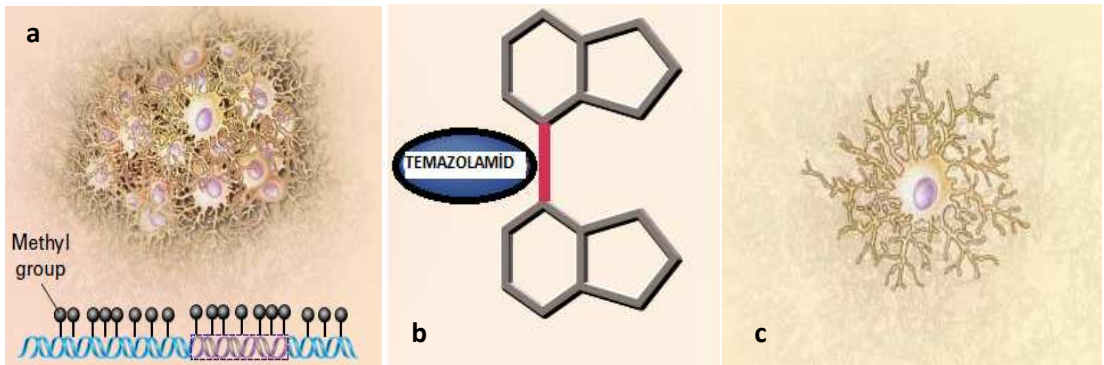
Şekil 6. Alkilasyon ajanlarının sitotoksik etkisi ⁶⁹

TMZ, DNA iskeleti boyunca bir çok bölgeye alkil gruplarını sokarak, DNA replikasyonunu bozar. Guaninin O⁶ pozisyonunu alkilleyerek sitotoksik bir etkiye yol açar. DNA'ya zarar vererek hücre ölümünü başlatır. Alkil gruplarını ya da alkillenmiş nükleotidleri uzaklaştıran DNA tamir proteinlerinden biri de Alkil Guanin Transferaz (AGT)'dir. O⁶-Metilguanin-DNA-metiltransferaz geni tarafından kodlanır. Guaninin O⁶ ve timinin O⁴ pozisyonunda, etkin bir biçimde DNA bazlarını tamir eder. TMZ'ye bağlı hücre ölümünün önüne geçerek, alkil eklentilerini uzaklaştırır (Şekil 7). AGT tarafından onarılamayan mutagenik lezyonlar, yanlış-eşleşme onarım (MMR) enzimleri tarafından

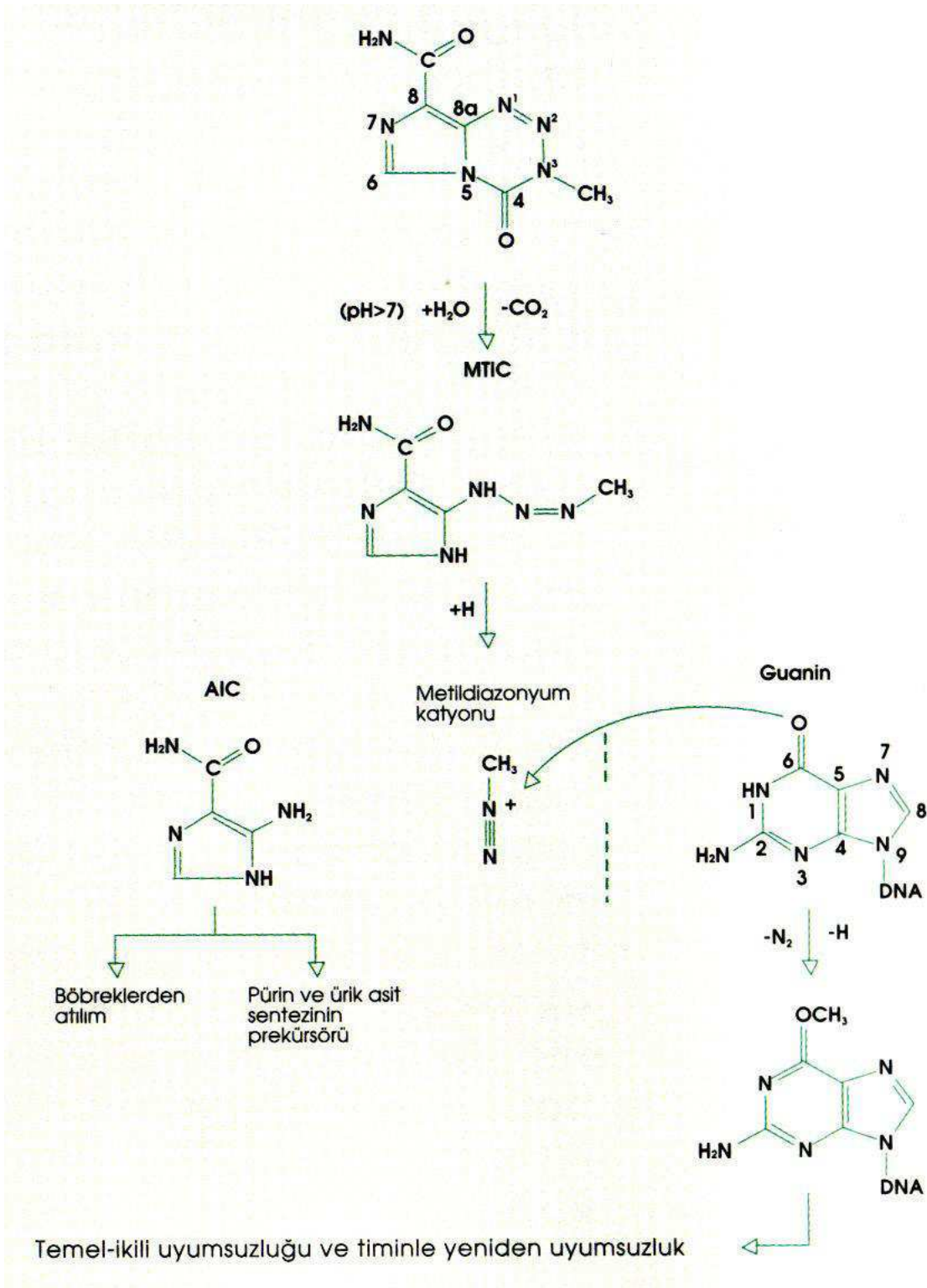
tanınırlar ve bu enzimler, yeni oluşan DNA ipliğindeki timin bazını eksize ederek, O⁶-metilguanin:timin baz çiftleri arasındaki yanlış eşleşmeyi onarırlar. Bununla birlikte O⁶-metilguanin lezyonu dokunulmadan bırakılırsa, timin her defasında yeniden yanlış eşleşir. MMR proteinlerinin girişimleri başarısız olur, ve aralıksız enzimatik sikluslar, sonunda DNA ipliğinde kopmalara ve kalıcı kırılmalara yol açar. Hücre, bunun sonucunda, apoptoza uğramadan önce G2/M evre geçişinde durdurulur. Bu nedenle diğer alkilleyici ajanlar gibi temozolomid de, geniş bir hücre topluluğu aktif olarak bölünme durumundaysa, daha büyük bir anti-tümör etkisi gösterebilir (Şekil 8-9).⁷⁶



Şekil 7. Unmetile MGMT'ye sahip gliom hücreinde TMZ'e olan kemorezistans mekanizma. a. Normal MGMT etkinliğine sahip gliom hücresi. b. TMZ tarafından eklenen alkil grubu MGMT tarafından DNA üzerindeki guanine taşınır. c. Kemorezistans tümörde DNA çapraz bağları kesilmiş canlı tümör hücresi.⁶⁵



Şekil 8. Metile MGMT'ye sahip gliom hücreinde TMZ duyarlılığı. a. Metil gruplarıyla inaktif MGMT'ye sahip gliom hücresi. b. TMZ ile çapraz bağlı DNA iplikçığı MGMT tarafından tamir edilemez. c. Çapraz bağlı kalan DNA ve hücre ölümü.⁶⁵



Şekil 9. Temozolomid Molekülü ve Etki Mekanizması

MGMT Ekspresyonu ve Düzenlenmesi

MGMT yapısal olarak tüm hücrelerde eksprese edilmektedir, ancak, tümör dokularında ekspresyonu daha yüksektir. MGMT aktivitesinin kolon, pankreas ve akciğer tümör dokularında yüksek, beyindeki neoplazmlarda ise düşük olduğu saptanmıştır. Nüks glioblastomlarda ise MGMT aktivitesinin arttığı bildirilmektedir.⁶⁹ Beyin tümörlerinde tedavi etkinliğinin tahmin edilmesinde MGMT ekspresyonunun etkin bir belirteç olduğu ısrarla vurgulanmaktadır.^{12,77} MGMT geni 10q26'da lokalizedir, ortalama 145 kilobaz (kb) büyüklüğünde, 5 ekzon ve 1 intron içermektedir. Bununla birlikte, MGMT geninde bir kaç varyant allel tanımlanmıştır. MGMT promotor bölgesi CpG açısından zengindir, TATA ve CAAT kutularından yoksundur, 10 tane Sp1 adı verilen transkripsiyon faktör bağlanma bölgesi ve 2 adet glikokortikoid yanıt elementine (GRES) sahiptir. GRE varlığı, glikokortikoidler tarafından kontrol edilebilen bir MGMT transkripsiyon kontrolüne işaret etmektedir.^{78,79} MGMT gen transkripsiyonu çeşitli düzenleyici mekanizmalarla kontrol edilir. MGMT metilasyonunun en önemli gen susturma mekanizması olduğu bilinmektedir.⁸⁰ Ekspresyonundaki azalmanın MGMT pomotorundaki hipermetile CpG adacıklarıyla ilişkili olduğu saptanmıştır.^{19,72,81} Sitozin-guanin dinükleotidlerindeki özellikle sitozin nükleotidinin metilasyonu ile gerçekleşir.⁸²

MGMT Tamir Mekanizması

MGMT tüm bazlarda ki alkil eklentilerini kaldırmasına rağmen, en aktif olarak guanin bazındaki alkil eklentilerini kaldırmaktadır. Mutajenik ve sitotoksik etki açısından guanin eklentileri diğerlerine göre daha etkilidir. MGMT'nin bu fonksiyonu aslında bir oto-inaktivasyon reaksiyonudur. Ayrıca serbest bazlar da MGMT için birer substrattır ve bunlarda MGMT'yi inaktive edebilmektedir.⁶⁹ MGMT proteinindeki arjinin amino asidinin (128. pozisyon) konformasyonel değişiklik için belirleyici olduğu belirtilmektedir. Arjininde meydana gelen bir mutasyonun MGMT'nin O⁶-meG tamir kapasitesini büyük ölçüde azalttığı saptanmıştır.⁸³

MGMT İlişkili Tedavi Alternatifleri

MGMT geni metile hücrelere sahip hastaların, alkilasyon ajanlarına karşı daha duyarlı olduğu gösterilmiştir.⁶⁹ MGMT metilasyonunun, tümöregenez sürecinin başlangıcında ve sıklıkla kolon, baş ve boyun, beyin ve akciğer, melanom kanserlerinde meydana geldiği rapor edilmiştir.¹⁹ Alkilasyon ajanlarının terapötik etkinliğinin artırılması için MGMT aktivasyonunun veya ekspresyonunun inhibe edilmesi önemli bir anti kanser tedavi yaklaşımıdır. Bu tedavi yaklaşımı çerçevesinde, MGMT inaktivasyonu için farklı alkilasyon ajanlarının birlikte kullanılması, Ribonükleik asit interferans (RNAi), viral proteinlerin uygulanması sayılabilir. MGMT inhibitörlerinin geliştirilmesi üzerinde çalışılan diğer araştırma konusudur.⁸⁴ Alkilasyon ajanları kombine kullanıldığında, MGMT aktivitesinin azaldığı ancak toksisitenin arttığı ve bu durumun tümör cevabına herhangi bir katkı sağlamadığı belirtilmektedir. Alternatif stratejiler içerisinde en uygulanabilir ve üzerinde en yoğun çalışılan MGMT inhibitörlerinin geliştirilmesidir.⁸⁰

Metilasyonun Tespiti

MGMT'nin metilasyon durumunu belirleyen teknikler: metilasyon spesifik PCR (MSP), semikantitatif MSP , prosekans RNA (*Real time reverse transkripsiyon PCR*) ve protein ekspresyonunu gösteren (İHK ve Western Blot) yöntemleridir. MSP tekniğiyle belirlenmiş MGMT durumu ve İHK ile saptanmış MGMT protein ekspresyonu arasındaki korelasyon zayıftır. Prosekans ile belirlenen spesifik CpG yerlerinin metilasyonu ve MGMT ekspresyon seviyesi arasında önemli bir uyumsuzluk vardır. DNA'yı baz alan metodlar özellikle kantitatif olanlar daha güvenilir bulunmuştur.¹⁶

2.2.9. Metastaz ve Yayılım

İnfiltratif yayılma bütün diffüz astrositik tümörlerin ortak bir özelliği olsa da, glioblastomlar komşu beyin yapılarına hızlı invazyonlarıyla meşhurdur. Tümörün korpus kallozum boyunca kontralateral hemisferlere bilateral yayılması yaygın bir özelliktir. İnternal kapsül, forniks, anterior komissur ve optik radyasyona da yayılım görülebilir. Subaraknoid boşluğu nadiren tutarak serebrospinal sıvı yoluyla metastaz yapabilir. Perivasküler boşluklar içinde ve boyunca ilerlemesi infiltrasyonunun başka bir modudur. Damar lümenlerinin invazyonu ise nadir görülür. Ventriküloperitoneal

şant yoluyla peritoneal metastaz gözlenmiştir. Duraya, venöz sinüse ve kemiğe penetrasyon yapabilmektedir.^{7,30}

2.2.10. Ayırıcı Tanı

Glioblastomlar da bir çok neoplastik lezyon ile reaktif olayları sorgulamak gereklidir. Gelişen bir enfarktüs hem klinik hem de radyolojik olarak taklit edebilir. Makrofajların akımı sayesinde, vasküler lezyonlar oldukça sellüler gözükebilir. Mikrovasküler hipertrofi ve hatta hiperplazi eşlik edebilir. Enfarktüs büyük damarlara yayılabilir. Nekroz makrofajca zengindir ve likefaksiyonedir.⁷

Demyelinize hastalığın kontrast tutan alanlarında sellülarite ve reaktif astrositler aldatıcı olabilir. Makrofajlar diffüz olarak lezyonu infiltre ederler. Lenfositlerle birlikte damarlar çevresinde toplanırlar. Astrositler eşit olarak dağılmıştır ve uzun yıldız şeklinde izlenebilir. Bazı glioblastomlar da polimorfonükleer lökositler çok fazladır. Absenin bir parçası gibi görünür. Neoplastik dokuyu belirlemek için derin kesitleri görmek gerekebilir.⁷

Glioblastom ve diğer anaplastik glial neoplazmlar arasında moleküler biyolojik ve tedaviye yönelik farklar vardır.⁷ Piloitik astrositom, pleomorfik ksantoastrositom ve desmoplastik infantil gangliom glioblastom taklidi yapan tümörlerdir. Bu üç tümörde tedavide RT'ye gerek kalmadan sağ kalım artmıştır. MR'da, her üçü, keskin sınırlarıyla tanımlanabilir.²⁸ Grade III astrositomun ayırımında nekroz ve vasküler endotelial proliferasyon varlığı glioblastom lehinedir.⁷

Glioblastom da küçük bir hücre varyantı malign endimomayı andıran özellikler taşıyabilir. Tümör yapısına ve nörogörüntülemeye dikkat etmek tanıda yardımcıdır. Yüksek grade'li endimomalar solidtir, iyi sınırlanmıştır ve parankime yayılmaz.⁷

Metastatik karsinomlar da ayırıcı tanıda yer alır. Glioblastom infiltratif özelliktedir ve nekroz paterni kendine özgüdür. Mikrovasküler proliferasyon yaygın görülürken, metastazlarda bunlar sınırlıdır. Metastatik karsinom hücreleri genellikle daha büyük ve daha epitelyaldir.⁷

Primer ve sekonder malign lenfomalar glioblastomu andıran infiltratif kitleler olarak görülebilir. Primer SSS lenfoması, nadir görülmesi, homojen paterni ve radyolojik özelliklerinden dolayı şüphenilmelidir. Lenfoma da retikülin boyası ile neoplastik hücrelerin perivasküler ve intramural birikim eğiliminde olması tanıya yardımcıdır. Büyük veziküler nükleus, çentikli membranlar ve belirgin çekirdekçik gibi sitolojik özellikler dikkat çekicidir. CD45 ve spesifik lenfoid alt küme markerları ile immünboyanma, glial hücrelerden ayırt etmeyi sağlar.⁷

Radyonekroz ayırıcı tanı gerektiren diğeri bir durumdur. Baş ya da boyundaki neoplazmların radyoterapisini takiben ortaya çıkabilir. Total dozun 50 Gy'yi geçmesi etkindir. En az 1 yılı bulan süreçten sonra gelişir. Radyonekroz subkortikal beyaz maddedeki mikrokalsifikasyonlarla birlikte, psödopalizatlanmanın eşlik etmediği koagülatif nekrozu kapsar. Dejeneratif ve distrofik değişiklikler, fibrinoid nekroz, telanjektazi ve damarlardaki hiyalin kalınlaşmayla karakterizedir. Gerçek vazoproliferatif değişiklikler nadiren görülür.⁷

2.2.11. Prognoz

Glioblastom, tedavisi zor kanserlerden biridir, yüksek morbidite ve mortaliteye sahiptir. Küratif tedavisi yoktur.⁸⁵ Hastaların yaşam süresi, en gelişmiş tedavi uygulamalarına rağmen ortalama 14.6 aydır.^{15,39,57} Hastaların % 10'luk bir kısmının 2 yıllık yaşam süresine ulaşabildiği bilinmektedir.⁸⁵

Bu güne kadar yapılan moleküler çalışmalar uzun süre hayatta kalan kişilerdeki tümörler hakkında tek bir şey tanımlamayı başaramamıştır. Genç yaşta olmak, ameliyat öncesi semptomların uzun süresi, preoperatif yüksek Karnofski performans skoru, kadın cinsiyet ve total eksizyon oranı uzun surveyi sağlayan faktörlerdir. Rezeksiyonun derecesi hayatta kalmayı en çok etkileyen faktörlerden biridir. Dev hücre varyantı bir dereceye kadar iyi prognoz olarak sunulsa da bu konuda çalışmalar devam etmektedir.^{7,58,65} Primer tipin sekondere karşı prognostik olarak önemi olup olmadığı net değildir.⁷

Glioblastomun serobrospinal yolların ve perikranial yapıların içine doğrudan ilerlemesi yaygın değildir. Lezyon bazen subependimal bölgelere ilerler. Tümörün akciğer, plevra, lenf nodları, karaciğer veya kemik gibi sistemik bölgelere yayılması oldukça nadirdir. Bu yayılım cerrahi girişimi ya da şant takılmasını takiben olabilir.⁷

2.2.12. Glioblastom Tedavisi

Uzun yıllar olgularda standart tedavi olarak cerrahi + RT kullanılmaktaydı.^{13,40} Günümüzde belirlenen optimal tedavi modalitesi, mümkün olan en geniş cerrahi rezeksiyon sonrasında adjuvan radyoterapi ve uygun olan hastalarda kemoterapi uygulaması tercih edilmektedir.⁸⁵⁻⁸⁷

2.2.12.1. Glioblastom Tedavisinde Cerrahi

Cerrahi tedavide de amaç, nörolojik harabiyete neden olmadan tümörün maksimum çıkartılmasıdır.⁸⁷ Tümörün boyutu ve lokalizasyonuna göre kısmi veya total rezeksiyon şeklinde yapılır.⁴⁵ Cerrahinin genişliği sağ kalımı arttıran ve adjuvan tedavi sonuçlarını etkileyen önemli bir prognostik faktördür.⁸⁸

Glioblastomun infiltratif yapısı nedeni ile tamamının çıkartılması neredeyse imkansızdır.⁸⁹ Geniş bir cerrahi sonrasında bile alınamayan mikroskobik bir tümör rezidüsü nükse neden olmaktadır. Cerrahi sonrası nüksü ve kalan tümör parçasının etkinliğini ortadan kaldırmak için radyoterapi ve kemoterapi uygulanmaktadır. Tümörün cerrahiye elverişli olmayan bir bölge lokalizasyonunda ise operasyon; histopatolojik tanı için biopsi almak veya şant, eksternal dekompresyon gibi palyatif tedavi amacıyla yapılmaktadır.^{90,91}

Alternatif olan stereotaksik biopsi; derin lokalizasyonlu kitlelerde, lezyonun konuşma merkezi gibi kritik alanlarda lokalize olduğu durumlarda, birden çok lezyonun varlığında yapılabilir. Lezyonun asemptomatik, hastanın yaşlı veya genel durumunun kraniyotomiye elverişsiz olduğu durumlarda ,doku tanısı amacıyla da kullanılmaktadır. Stereotaktik biyopsi; morbidite ve mortalitesi oldukça düşük, tanısal doğruluğu oldukça yüksek bir yöntemdir.⁹²

2.2.12.2. Glioblastom Tedavisinde Radyoterapi

Cerrahi uygulamaya adjuvan radyoterapinin eklenmesi, ana tedavi yaklaşımıdır. Ancak sadece biyopsi yapılan olgularda radyoterapi, tek tedavi yöntemidir. Postoperatif radyoterapi, tümör ilerlemesini ve rekürrensini geciktirmektedir. Böylece hastaların ortalama sağkalım süreleri artmakta ve yaşam kalitelerinde düzelleme görülmektedir. Bununla birlikte 5 yıllık yaşam süresinde çok belirgin bir başarı sağlanamamıştır.^{93,94}

Fraksiyon, radyoterapide tüm tedavi boyunca her bir seans için verilen addır. Fraksiyon başına düşen dozlar , primer/definitif tedavi için 1,8 Gy, palyatif tedavi için 3 Gy'dir. Tedavi süreleri (gün/hafta) ve toplam tedavi dozları matematiksel olarak belirlenir.⁹⁵ Glioblastomda konvansiyonel RT kullanılmaktadır. Konvansiyonel RT, hafta sonları hariç haftada beş gün, toplam altı fraksiyon olarak uygulanan RT şemasıdır. Toplam 60 Gray (Gy)'lik dozun tümör yatağına 6 haftada düzenli periyodlarla verilmesi hedeflenir.⁹⁶

2.2.12.3. Glioblastom Tedavisinde Kemoterapi

Günümüzde primer glioblastom olgularında, cerrahi sonrası sırasıyla veya aynı anda radyoterapi ve kemoterapi uygulaması standart tedavi modelidir.^{12,68} Yüksek dereceli beyin tümörlerinde kemoradyoterapinin yalnızca radyoterapi uygulamasına göre sağ kalım oranını % 10 arttırdığı saptanmıştır.⁴⁵ Kemoterapötik maddenin seçimi, dozu, uygulama süresi ve hastanın genetik yapısı kemoterapi sürecini doğrudan etkileyen unsurlardır.⁵¹ Bu tümörlerin kemoterapötik ajanlarla tedavisinde karşılaşılan sorunların başında kan beyin bariyeri gelmektedir.⁹⁷

Glioblastom tedavisinde alkaloidlerden vinkristin, antimetabolitlerden hidroksiüre, 6- tioguanin, 5-florourasil ve alkilasyon ajanları kullanılmaktadır.^{70,71} Alkilasyon ajanlarının son yıllarda özellikle tercih edildikleri görülmektedir.^{39,41} Bu ajanlar; Azotlu Hardallar, Etileniminler, Nitrozoüreler, Alkilsülfonatlar, Trizan ve Hidrazin türevleri (Dakarbazin, Prokarbazin, Temozolomid) olmak üzere 5 gruba ayrılır. Triazin bileşikleri olarak adlandırılanlar glioblastomda sıkça kullanılan kemoterapötiklerdir.⁸⁹

Kemoterapötikler DNA üzerinde gösterdikleri fonksiyon açısından, kloroetilasyon ajanları ve metilasyon ajanları olarak iki gruba ayrılır. Etilasyon ajanları DNA bazları üzerine etil grubu, metilasyon ajanları da metil grubu ekleyerek etkilerini gösterirler. Her iki grubun, ağırlıklı olarak guaninin 6. pozisyonuna etil veya metil eklentileri oluşturarak hücreyi apoptoza yönlendirdikleri saptanmıştır.⁶⁹ Alkilasyon ajanlarının oluşturdukları baz eklentilerinin stabiliteyi birbirlerinden farklıdır. O⁶-metilguanin (O⁶MeG) oldukça stabil bir eklentidir ve daha az oranda (\leq % 8) meydana gelen eklenti tipi olmasına rağmen mutajenitesi ve toksisitesi en güçlü olandır.⁶⁹

Metilasyon ajanlarının kullanımı sonucu hücre DNA'sında oluşan O⁶-MeG

eklentisi, MGMT tarafından tamir edilerek metilasyon kaldırılır. Bu eklenti tamir edilmezse, O⁶-MeG hücrenin ilk replikasyonu sonunda karşısına tamamlayıcı baz olarak timini alır. Oluşan yanlış baz çifti yanlış eşleşme tamir mekanizması (MMR) tarafından tamir edilmeye çalışılır. MMR sisteminin tamir edemediği yanlış eşleşmiş bazlar replikasyon sonunda hücrede çift zincir DNA kırıklarının oluşmasına ve son olarak apoptoz yolağının tetiklenmesine yol açar.⁶⁹

Yapılan birçok çalışma MGMT enziminin, alkilasyon ajanlarına karşı gelişen dirençte en önemli faktör olduğunu belirtmektedir.^{12,70,99-101} Bunun yanı sıra yanlış eşleşme ve baz çıkarım yoluyla tamir sistemleri de alkilasyon ajanlarına karşı gelişen dirençte rol almaktadır.^{12,71}

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında 2008-2011 yılları arasında glioblastom tanısı alan olgular tarandı. Elli beş olgu çalışma kapsamına alındı. Olgulara ait hematoksilen eozin (HE) boyalı preparatlar ışık mikroskopunda incelendi. Raporlama sırasında çalışılan p53, Ki-67 ve EGFR immünohistokimyasal boyalar tekrar değerlendirildi. Her olgu için nekroz ve kanama içermeyen en uygun parafin bloklar seçildi. Hastaların yaşam süreleri ve son durumları ile ilgili bilgiler hasta takip dosyalarından ve telefon aracılığı ile kendilerinden ve yakınlarından öğrenildi.

3.1. PCR Yöntemi

I- Basamak

Parafin doku'yu 1,5ml. Ependorf tüpüne şu şekilde alındı: Önce kesit yapılan mikrotom aleti iyice hipolu gazlı bezle silindi sonra temiz bir gazlı bezle tekrar silindi ve kurulandı. Parafin dokudan 5µm'lik kesitler halinde 5-10 adet (yaprak) ince kesit yapıldı (≈25-50mg). Bu yapraklar bir kürdan yardımı ile 1,5µl. lik Dnase-Rnase free ependorf tüpüne kesitler steril bir şekilde alındı. ve DNA elde etmek için ZYMO RESEARCH EZ DNA Genomic DNA Tissue Mini Prep-Cat no: D3050 Kit kullanılarak aşağıdaki işlemler yapıldı.

A.Dokudan Parafin Uzaklaştırılması:

1- Örneklerin bulunduğu tüplerin içine 750 µl Ksilen koyuldu ve hızla vorteksle 1saat oda ısısında ve arada sırada tüpleri alt üst ederek beklendi.10.000 g'de 1 dak. santrifüj edilip ksilen uzaklaştırıldı.

2- Tüplere tekrar 750 µl Ksilen koyuldu ve hızla vorteksle 1 saat oda ısısında ve arada sırada tüpleri alt üst ederek beklendi. 10.000 g'de 1 dak. santrifüj edilip ksilen uzaklaştırıldı.

3- Tüplere 1 ml % 100 Etanol koyuldu ve hızla vorteksle 5 dak. oda ısısında bekletildi. 10.000 g'de 1 dak. santrifüj edilip % 100 etanol uzaklaştırıldı.

4- Tüplere tekrar 1 ml % 100 Etanol koyuldu ve hızla vorteksle 5 dak. oda ısısında beklendi.10.000 g'de 1 dak. santrifüj edilip % 100 etanol uzaklaştırıldı.

5- Tüplere 1 ml % 95 Etanol koyuldu ve hızla vorteksle 5 dak. oda ısısında beklendi.10.000 g'de 1 dak. santrifüj edilip % 95 etanol uzaklaştırıldı.

6- Tüplere tekrar 1 ml % 95 Etanol koyuldu ve hızla vorteksle 5 dak. oda ısısında beklendi. 10.000 g'de 1 dak. santrifüj edilip % 95 etanol uzaklaştırıldı.

7- Tüplere 1 ml % 75 Etanol koyuldu ve hızla vorteksle 5 dak. oda ısısında beklendi. 10.000 g'de 1 dak. santrifüj edilip % 75 etanol uzaklaştırıldı.

8- Tüplere tekrar 1 ml % 75 Etanol koyuldu ve hızla vorteksle 5 dak. oda ısısında beklendi. 10.000g'de 1 dak. santrifüj edilip % 75 etanol uzaklaştırıldı.

9- Tüplere 1 ml ddH₂O koy ve hızla vorteksle 5 dak.oda ısısında beklendi. 10.000 g'de 1 dak. santrifüj edilip ddH₂O uzaklaştırıldı.

10- Doku kurutuldu. DNA çalışılmayacaksa -80 °C'de saklandı. Eğer DNA elde edilecekse aşağıdaki işlemler yapıldı.

B. DNA İzolasyonu:

Karışım:

ddH₂O = 95 µl

2X Digestion Buffer = 95 µl (37 °C'ye getirilir)

Proteinase K = 10 µl

Karışım tüpe konur ve 55 °C'de 1-3 saat bekletilir veya 1 gece bekletilir (doku parçalanmamışsa).

1- Ertesi gün sabah örnekleri (tüpleri) alındı.Tüpler 1 dak. oda ısısında bekletildi ve Genomik Lisis Buffer'ı kutusu alt üst edildi. Sonra her bir örneğin içerisine 700 µl Genomik Lisis Buffer koyulup ve vorteksle tekrar spin down (3 sn. santrifüj) yapıldı. 1dak. 1.000 xg santrifüj edildi.

2- Bu örnekler spin kolona konuldu ve 1dak. 10.000 xg santrifüj yapıldı.

3- Spin kolonlardaki alt tüp atılıp yenileri konuldu.

4- DNA Pre-Wash Buffer kutusunu alt üst edildi. Sonra Spin kolonlardaki her birinin içerisine 200 µl DNA Pre-Wash Buffer konuldu ve spin kolonun kapakları kapatıldı. Kolon alt üst edildi ve 1dak. 10.000 xg santrifüj yapıldı.

5- Spin kolonların altındaki tüpler atıldı. Yerine yenileri yerleştirildi.

6- g-DNA Wash Buffer kutusu alt üst edildi. Sonra Spin kolonlardaki her birinin içerisine 400 µl g-DNA Wash Buffer konulur ve spin kolonun kapakları kapatıldı. Kolon alt üst edildi ve 1dak. 10.000 xg santrifüj yapıldı.

7- Kolonlar 1,5 ml ependorf tüplerinin üzerine numaralar yazıldı ve bu kolonlar bu tüplerin içine konuldu. DNA Elution Buffer kutusunu alt üst edildi. Sonra Spin kolonların ağzı açıldı ve üzerine en az 50 µl (en fazla 200 µl) DNA Elution Buffer konuldu.

8- Örnekler 2-5 dak. oda ısısında bekletildi. 13.200 xg'de 30 sn. santrifüj edildi.

DNA elde edildikten sonra nanophotometer (IMPLEN, Product: Nanophotometer, Version:7122VI.6.1, Seri Numarası: 1562) ile DNA miktarı ölçüldü.

II- Basamak

Elde edilen DNA (ZYMO RESEARCH EZ DNA Methylation -Gold Kit cat no: 5005) metillendirilir. Bunun için aşağıdaki işlemler yapıldı:

1- CT Conversion Reagent solusyonu çalışmaya başlamadan önce ısısını 37 °C'ye getirildi ve sonra vortekslendi.

2-20 µl DNA örneği (Basamak I'deki elde edilen DNA örnekleri)

130 µl *CT Conversion Reagent* (Koyu renkli ve toz halde) 200 µl'lik ependorf tüpüne konuldu, karıştırıldı. Sonra kısa santrifüj ile tüpün etrafındaki damlaları almak için santrifüj yapıldı.

3- Termal Cyclera tüpler yerleştirildi:

98 °C 10 dak.

1 cycler

53 °C 3 dak.

1 cycler

53 °C 6 dak.

37 °C 30 dak.

8 cycler

+4 °C saklanır.

4- Üzerine 600 µl *M-Binding Buffer* Zymo-Spin IC kolona konuldu.

5- 3.'cü aşamada hazırlanan örnek *M-Binding Buffer* konmuş olan kolonun içine (20+130 µl) 150 µl bu solüsyon koyuldu ve tüpün ağzı kapatıldı ve tüp pek çok kez alt üst edilerek karıştırıldı.

6- En az 10.000 xg. veya daha yüksek hızda 30 sn santrifüj edildi.

7- Zymo-Spin IC kolonun üzerine 100 µl *M-Wash Buffer* koyuldu ve 10.000 xg. veya daha yüksek hızda 30 sn santrifüj edildi.

8- Zymo-Spin IC kolonun üzerine 200 µl *M-Desulphonation Buffer* koyuldu. Oda ısısında (20-30 °C'de) 15-20 dak. bekletildi. Sonra 10.000 xg. veya daha yüksek hızda 30 sn santrifüj edildi.

9- Zymo-Spin IC kolonun üzerine 200 µl *M-Wash Buffer* koyuldu ve 10.000 xg. veya daha yüksek hızda 30 sn santrifüj edildi.

10- Tekrar Zymo-Spin IC kolonun üzerine 200µl *M-Wash Buffer* koyuldu. 10.000 xg. veya daha yüksek hızda 30sn santrifüj edildi.

11- Zymo-Spin IC kolonun altına 1,5ml Ependorf yerleştirip kolonun üzerine de 10 µl *M-Elution Buffer* koyuldu ve 13.000 xg. veya daha yüksek hızda 30 sn santrifüj edildi.

DNA elde edildikten sonra nanophotometer (IMPLEN, Product: Nanophotometer, Version: 7122 VI.6.1, Seri Numarası: 1562) ile Metillenmiş DNA miktarı ölçüldü.

III- Basamak

MGMT PCR

PCR Amplifikasyonu:

MGMT sekansı mutasyon gen dizilimi

I-Unmetile MGMT Primer dizileri: 93 bp

U-MGMT-forward (upstream):5'-TTT-GTG-TTT-TGA-TGT-TTG-TAG-GTT-TTT-GT -3'

U-MGMT-reverse (Downstream):5'-AAC-TCC-ACA-CTC-TTC-CAA-AAA-CAA-AAC-A-3'

PCR Amplifikasyonu için her tüpe: PCR core kit (Promega M7660) ve yukardaki şekilde düzenlenen primerler kullanılarak,steril 0.2 ml.'lik mikrosantrifüj tüpünün içine her bir örnek için aşağıda belirtilen miktarlar kullanılarak PCR karışımı hazırlandı:

ekstrasyon örneği	= 5 µl.(100-200 ng/µl)
10XPCR(10 mmol/L Tris HCl,pH 8.3, 50 mmol/L KCl)	= 2.5 µl. (Final konsantrasyon 1X)
10 mmol/L dNTP	= 0.5 µl. (Final konsantrasyon 0.2 mmol/L)
50kU/LTaq DNA Polimerase	= 0,2 µl.
U-MGMT-forward (upstream) (2.0µmol/L)	= 0,5 µl. (Final konsantrasyon 5 µM)
U-MGMT-reverse (Downstream)(2.0µmol/L)	= 0,5 µl. (Final konsantrasyon 5µM)
Distile su	= 15,8 µl.
Toplam	= 25 µl

b-Bio-rad my-Cycler system tipi termal Cyclerda:

ilk denatürasyon için

Saat dak sn

1 step 95 °C	0	5	0 (Ön denaturasyon)
2 step 95 °C	0	0	45 (Denature)
3 step 58 °C	0	0	45 (Anneal)
4 step 72 °C	0	1	0 (Axtend)
5 step	go to 2		

cycle 40'da

6 step 72 °C	0	7	0 (Son Extention)
7 step +4 °C	24	0	0
8 step	END		

olacak şekilde programlandı.

c- PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi: PCR amplikasyonundan sonra 1 µl loading buffer +10 µl. PCR ürünü 0.5 mgr/L etidyum bromid ile boyanmış % 2,5'lik agaroz jelinde uygulanan elektroforez işlemi 100V da 60-80 dak. yürütüldü. Ayrıca PAGE'de de yürütüldü. Örneklerde Unmetile MGMT DNA'larına ait 93bp'lık ragmanlarının varlığı araştırıldı.

II- Metile MGMT Primer dizileri : 81 bp

M-MGMT-forward (upstream):5' -TTT-CGA-CGT-TCG-TAG-GTT-TTC-GC-3'

M-MGMT-reverse(Reverse):5' -GCA-CTC-TTC-CGA-AAA-CGA-AAC-G -3'

PCR Amplikasyonu için her tüpe: PCR core kit (Promega M7660)ve yukardaki şekilde düzenlenen primerler kullanılarak,steril 0.2ml.'lik mikrosentrifüj tüpünün içine her bir örnek için aşağıda belirtilen miktarlar kullanılarak PCR karışımı hazırlandı.

ekstrasyon örneği	= 5 µl. (100-200 ng/µl)
10XPCR(10mmol/L Tris HCl,pH 8.3, 50mmol/L KCl)	= 2.5 µl. (Final konsantrasyon 1X)
10 mmol/L dNTP	= 0.5 µl. (Final konsantrasyon 0.2 mmol/L)
50 kU/LTaq DNA Polimerase	= 0,2 µl.

U-MGMT-forward (upstream) (2.0µmol/L)	= 0,5 µl. (Final konsantrasyon 5 µM)
U-MGMT-reverse (Downstream)(2.0µmol/L)	= 0,5 µl. (Final konsantrasyon 5 µM)
Distile su	= 15,8µl.
Toplam	= 25 µl

b-Bio-rad my-Cycler system tipi termal Cyclerda:

ilk denatürasyon için

	<u>Saat</u>	<u>dak</u>	<u>sn.</u>	
1 step 95 °C	0	5	0	(Ön denaturasyon)
2 step 95 °C	0	0	45	(Denature)
3 step 58 °C	0	0	45	(Anneal)
4 step 72 °C	0	1	0	(Axtend)
5 step go to 2				
cycle 40'da				
6 step 72 °C	0	7	0	(Son Extention)
7 step +4 °C	24	0	0	
8 step END				

olacak şekilde programlandı.

c-PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi: PCR Amplikasyonundan sonra 1 µl loading buffer +10 µl. PCR ürünü 0.5 mgr/L etidyum bromid ile boyanmış % 2,5'lik agaroz jelinde uygulanan elektroforez işlemi 100 V'da 60-80 dak. yürütüldü. Ayrıca Poli akrilamid jelde (PAGE) de yürütüldü. Örneklerde Metile MGMT DNA'larına ait 81 bp'lik fragmanlarının varlığı araştırıldı.

3.2. İmmünohistokimya (İHK)

İmmünohistokimyasal çalışma için uygun parafin blok seçildi. Parafin bloklardan Rotary mikrotom cihazı ile 5 mikron kalınlığında özel polilizinli lamlara kesitler alındı. Kesitlere Strept Avidin-Biotin kompleks immünperoksidaz yöntemi ile, p53 (Neomarker Clone: D 0.7 dilüsyonu: 1/100), Ki-67 (Biocare Clone: MIB.1 dilüsyonu: 1/100) ve EGFR (NCL-EGFR 384 1: 80 Clone: EGFR.25) antikorları uygulandı. Pozitif kontrol olarak p53 için kolorektal karsinom, Ki-67 için tonsil, EGFR için plasenta dokuları kullanıldı. İmmünohistokimyasal boyanma ışık mikroskopunda değerlendirildi.

3.3. Değerlendirme

PCR ürünü jelin UV ışığı altında, 93 bp'de metillenmemiş DNA, 81 bp'de metillenmiş DNA bantının görülmesi pozitif kabul edildi. Band görülmeyen ürünler negatif kabul edildi.

p53 ve Ki-67 antikorları için nükleer boyanma pozitif kabul edildi. Her ikisi için tüm kesitte pozitif boyanan tümör hücrelerinin toplam tümör hücrelerine oranı hesaplandı. p53 pozitifliği, boyanan hücrelerin yüzdesine göre derecelendirildi. Boyanan hücre $< \% 10$ ise negatif (-), $\% 10$ ile $< \% 25$ arasında ise 1(+), $\% 26$ ile $\% 50$ arasında 2(+), $\% 50 <$ üzerinde ise 3(+) olarak değerlendirildi.¹³⁵ Olgular Ki-67 boyanma oranları $\% 1-10$, $\geq \% 11-20 \geq$ ve $\% 20 <$ olmak üzere üç grupta incelendi.

EGFR antikorları için membranöz boyanma pozitif kabul edildi. Boyanan hücre yoksa negatif değerlendirildi.

İstatistiksel analiz; PCR sonuçları, immünohistokimyasal boyanma, tümör tipi, ve lokalizasyonu, yaş, cinsiyet, histomorfolojik olarak nekroz ve vasküler endotelial proliferasyon, yaşam süreleri ile karşılaştırılarak yapıldı. Verilerin istatistiksel analizinde SPSSPC 15 paket programı kullanıldı. MGMT PCR değerleri, immünohistokimya ve diğer parametreler ile ilgili verilerin karşılaştırılması için Ki-Kare testi kullanılmış ve p değeri hesaplanmıştır. Anlamlılık için $p < 0,05$ olarak kabul edildi. Sağkalım analizi "Kaplan Meier, log rank ve cox regresyon analizi" ile değerlendirildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada; 2008-2011 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda tanı alan hastalar arasından tarama yapılarak çalışma grubumuza uygun 55 glioblastom olgusu seçildi. Olgulara ait biyopsi örnekleri histomorfolojik olarak tekrar değerlendirildi. Ellibeş olgunun klinik, histomorfolojik, immünohistokimyasal ve PCR bulguları karşılaştırıldı.

Glioblastom olgularının yaş ortalaması kadınlarda 49,29 (22-70), erkeklerde 54,37 (18-83) iken cinsiyet ayırımı yapmaksızın yaş ortalaması ise 53,07 (18-83) idi. Erkek kadın oranı 2,9:1 bulundu. Çalışmaya alınan olguların 34'ü (% 61,8), 50 yaş ve üzeri idi.

Hastaların 41'i (% 74,5) erkek, 14'ü (% 25,5) kadın idi. Tümörlerin 15'i (% 27,2) parietal, 14'ü (% 25,4) frontal, 10'u (% 18,1) temporoparietal, 6'sı (% 10,9) temporal, 7'si (% 12,7) oksipital lokalizasyonda idi (Tablo 4).

Tablo 4. Olguların yaş, cinsiyet ve lokalizasyona göre dağılımı

		Olgu sayısı n (%)
Yaş	<50	21 (38,2)
	≥50	34 (61,8)
Cinsiyet	Kadın	14 (25,5)
	Erkek	41 (74,5)
	E:K	2,9/1
Lokalizasyon	Parietal	15 (27,3)
	Temporal	6 (10,9)
	Oksipital	8 (14,5)
	Temporoparietal	10 (18,2)
	Frontal	14 (25,5)
	Diğer	2 (3,6)

Olgulardan 49'u (% 89,1) primer, 6'sı (% 10,9) sekonder glioblastomdu. Histomorfolojik olarak olguların 28'i (% 50,9) palizatik nekroz, 13'ü (% 23,6) coğrafik ve 14'ü (% 25,5) her iki nekrozu içermekte idi. (Şekil 10) Tümörlerin 40'ında (% 72,7) vasküler endotelyal proliferasyon izlenirken, 15'ünde (% 27,3) görülmedi (Şekil 11) RT alan olgumuz 44 (% 80,0) iken, KT alanlar 45 (% 81,8) olgu ile sınırlıydı (Tablo 5). Ancak hastanemiz dışında takip edilen hastaların kaç kür KT ve kaç seans RT aldıklarına dair sağlıklı verilere ulaşamadı.

Tablo 5. Olguların histomorfolojik ve tedavi durumlarına göre dağılımı

		Olgu sayısı n (%)
Tip	Primer	49 (89,1)
	Sekonder	6 (10,9)
VEP	Var	15 (27,3)
	Yok	40 (72,7)
Nekroz	Palizatik	28 (50,9)
	Coğrafik	13 (23,6)
	Her ikisi	14 (25,5)
RT	+	44 (80,0)
	-	11 (20,0)
KT	+	45 (81,8)
	-	10 (18,2)

İmmünohistokimyasal yöntem ile p53, Ki-67 ve EGFR boyanma paternleri incelendi. p53 boyanması en fazla sayıya sahip grup 25 (% 45,5) olgu ile, 1(+)'di. Primer grubun çoğunluğunu (% 51,0) 1(+) ve hiç boyanmanın olmadığı olgulardan oluşurken, sekonder grubun tamamında p53 boyanması izlendi (Şekil 12). EGFR pozitifliği 28 (% 50,9) glioblastomda izlenirken, 27 (% 49,1) olguda izlenmedi. Sekonder grupta % 66,6 (4/6) oranında EGFR negatif iken, primer grupta % 55,1 (27/49) oranında pozitif izlendi (Şekil 13). Ki-67 ile proliferasyon indekslerine bakıldığında en fazla 28 (% 50,9) olgu, % 11-20 arasında boyanmanın izlendiği grupta görüldü (Şekil 14-15). İmmünohistokimyasal markerların primer ve sekonder grupta dağılımı tablo 6'da özetlenmiştir.

Tablo 6. İmmünohistokimyasal markerların glioblastomda dağılımı

		Primer N	Sekonder n	Toplam n (%)
P53	0	3	0	3 (5,5)
	1(+)	22	3	25 (45,5)
	2(++)	9	2	11 (20,0)
	3(+++)	15	1	16 (29,0)
EGFR	Negatif	22	4	26 (47,3)
	Pozitif	27	2	29 (52,7)
Ki-67	≤ % 10	6	2	8 (14,5)
	% 11-20	25	3	28 (50,9)
	≥ % 20	18	1	19 (34,5)
Toplam n (%)		49 (89,1)	6 (10,9)	55 (100)

PCR yöntemiyle tüm glioblastom olgularında MGMT promoter bölgesinin metilasyonu araştırıldı. Olguların 32'sinde (% 58,1) metile MGMT, 23'ünde (% 42,9) unmetile MGMT DNA'sı saptandı (Şekil 16-17). Onbir (% 20,0) olguda sadece unmetile DNA bantı izlenirken, 12 (% 21,8) olguda hem metile hem de unmetile DNA bantı gözlemlendi. Bu olgular unmetile grupta değerlendirildi.^{65,105,106} PCR sonuçlarının yaş, cinsiyet, lokalizasyon, ve histopatolojik parametrelerle ilişkisi tablo 7'de özetlenmiştir.

Tablo 7. MGMT'nin klinik ve histopatolojik parametrelerle ilişkisi

		M-MGMT N	U-MGMT n	Toplam n (%)	P Değeri
Yaş	≥50	18	16	34 (61,8)	0,33
	<50	14	7	21 (38,2)	
Cinsiyet	Erkek	21	20	41 (74,5)	0,07
	Kadın	11	3	14 (25,5)	
Lokalizyon	Parietal	8	7	15(27,3)	0,87
	Temporal	3	3	6 (10,9)	
	Oksipital	6	2	8 (14,5)	
	Temporoparietal	5	5	10 (18,2)	
	Frontal	9	5	14 (25,5)	
	Diğer	1	1	2 (3,6)	
Tip	Primer	29	20	49 (89,1)	0,68
	Sekonder	3	3	6 (10,9)	
Nekroz	Palizatik	18	10	28 (50,9)	0,40
	Nonpalizatik	7	6	13 (23,6)	
	Herikisi	8	6	14 (25,5)	
VEP	Var	21	19	40 (72,7)	0,08
	Yok	11	4	15 (27,3)	
Toplam		32 (58,2)	23 (41,8)	55 (100)	

Elli yaş altında 21 hastanın 14 (% 66,6)'sında nispeten metile grubun oranı fazla izlenirken istatistiksel olarak korelasyon görülemedi ($p=0,33$). Erkekler için metilasyon durumuna bakıldığında eşit bir dağılım görülürken (21 metile/20 unmetile = % 51,2 / % 48,7), kadınlarda ise metile grup 14 (% 78,5) olgu ile baskın izlendi. Ancak istatistiksel bir fark ($p=0,07$) bulunamadı. Metilasyon durumu ile lokalizasyon ($p=0,87$), nekroz ($p=0,40$) ve VEP ($p=0,08$) arasında da anlamlı bir fark bulunamadı. Primer glioblastomda 29 (% 59,1) olguda, sekonder grupta 3 (% 50,0) olguda metilasyon saptandı.

Tümörlerin immüno histokimyasal boyanma özellikleri ile metilasyon durumları karşılaştırıldı. Yapılan Ki-Kare analizi ile p53 için $p=0,10$, Ki-67 için $p=0,86$ ve EGFR ile $p=0,07$ değerleri bulundu. Ancak anlamlı bir fark saptanamadı (Tablo 8).

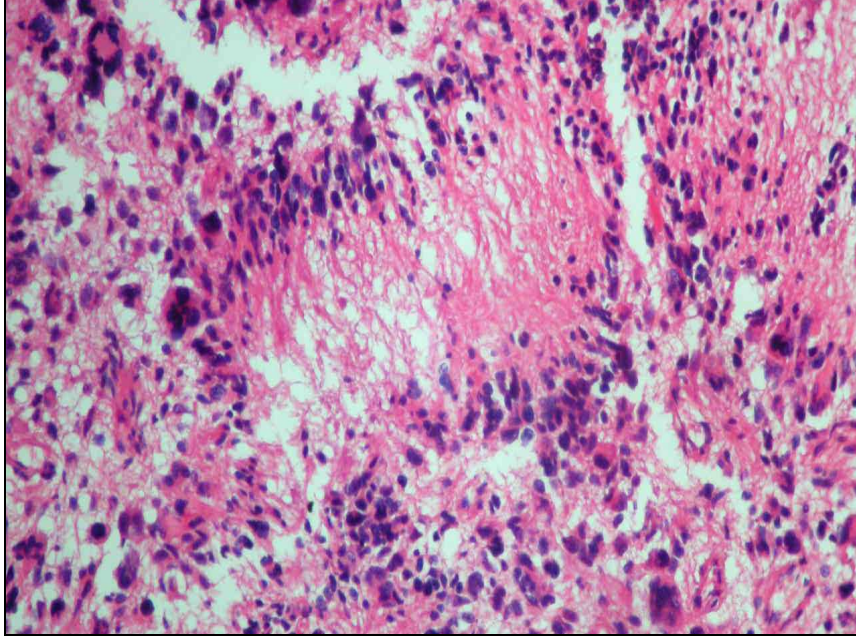
PCR sonuçlarının surveye göre dağılımı Tablo 9'de gösterilmiştir.

Tablo 8. MGMT'nin immünohistokimyasal parametrelerle ilişkisi

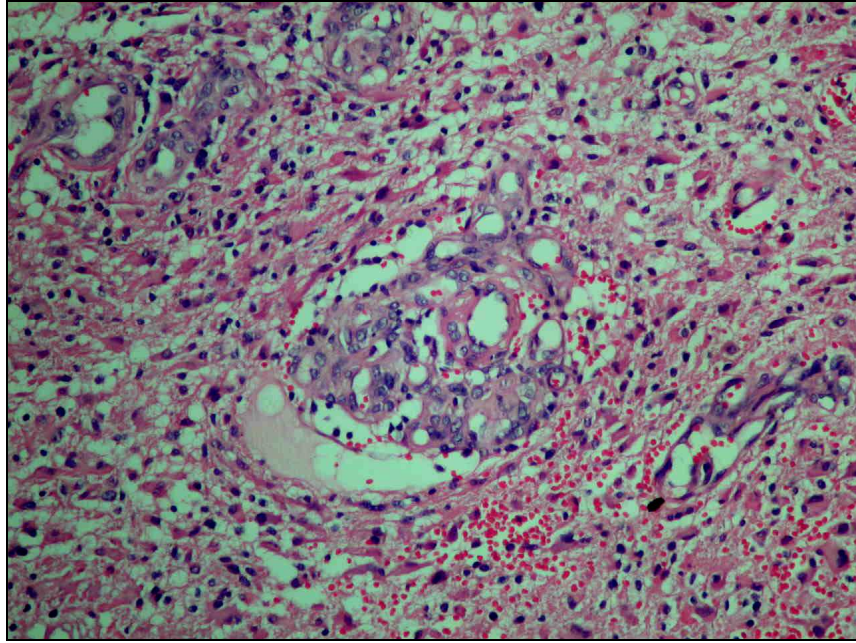
		M-MGMT N	U-MGMT N	Toplam n (%)	P değeri
P53	0	2	1	3 (5,5)	0,10
	1(+)	16	9	25 (45,5)	
	2(++)	4	7	11 (20,0)	
	3(+++)	10	6	16 (30,0)	
Ki67	%10 \geq	7	1	8 (14,5)	0,86
	%11-%20	13	15	28 (50,9)	
	%21 \leq	12	7	19 (34,5)	
EGFR	Negatif	14	14	28 (50,9)	0,07
	Pozitif	18	9	27 (49,1)	
Toplam n(%)		32	23	55 (100)	

Tablo 9. MGMT ile survey ilişkisi

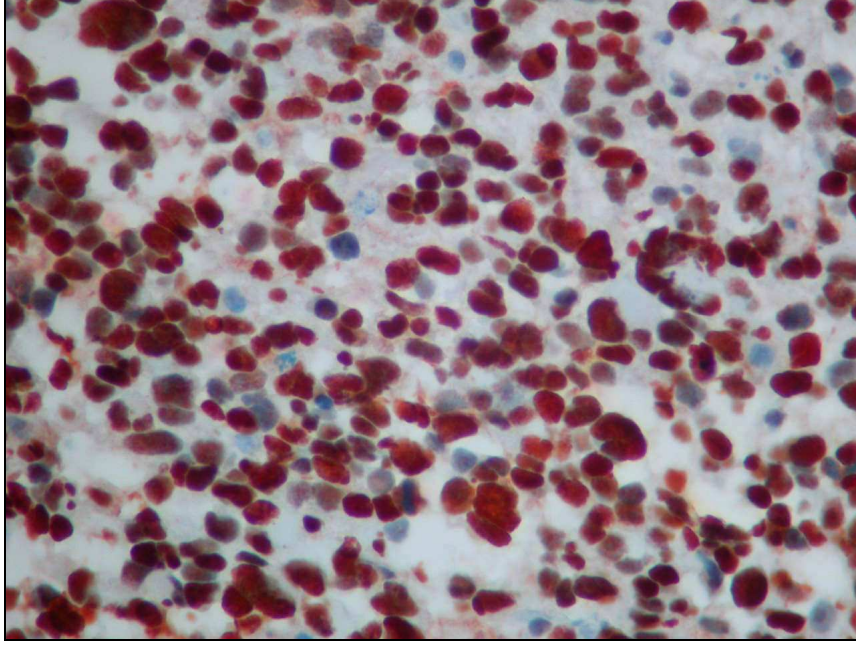
		M-MGMT n (%)	U-MGMT n (%)	Toplam n (%)	P değeri
Survey	yaşayan	7 (21,9)	15 (65,2)	22 (60,0)	0,02
	eksitus	25 (78,1)	8 (34,8)	33 (40,0)	
Toplam n (%)		32 (58,2)	23 (41,8)	55 (100)	



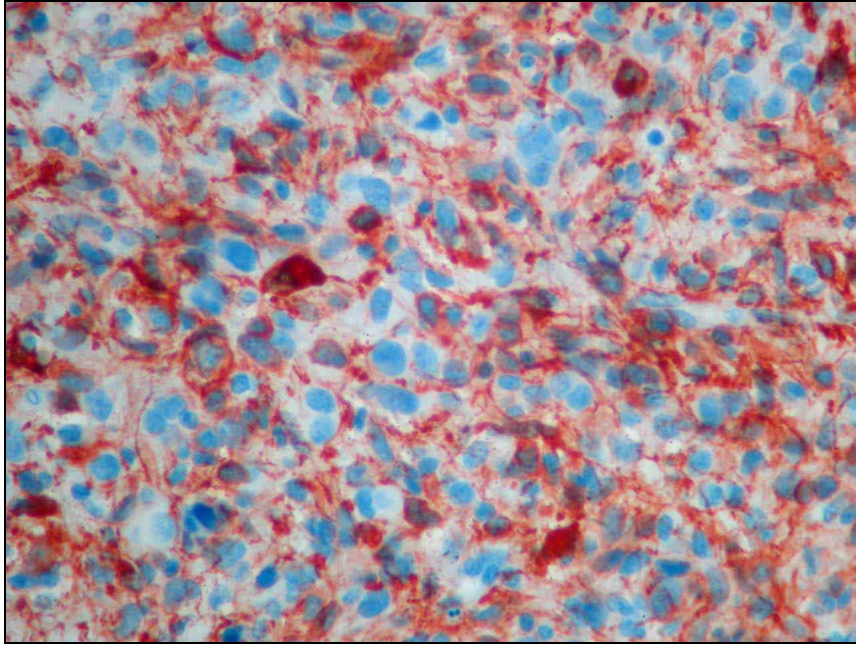
Şekil 10: Glioblastomda palizatlanan nekroz alanları HE X 100



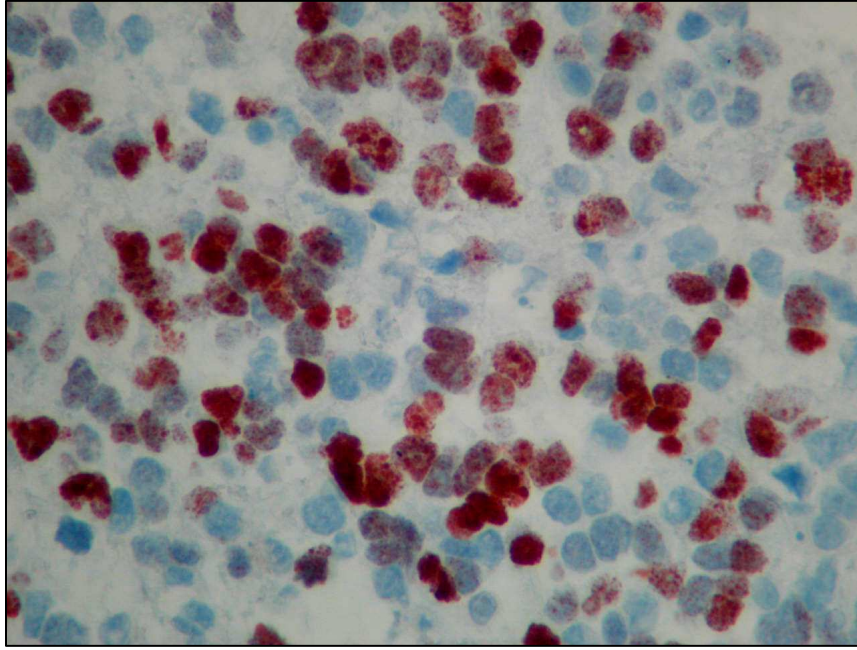
Şekil111: Glioblastomda vasküler endotelial proliferasyon H&E X 200



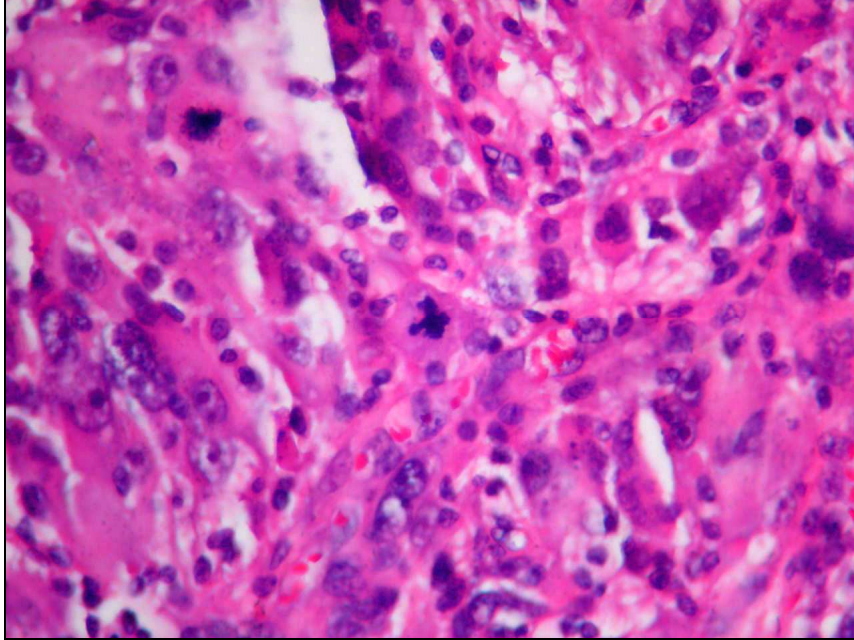
Şekil 12. Glioblastom olgusunda nükleer 3(+) p53 boyanma x 400



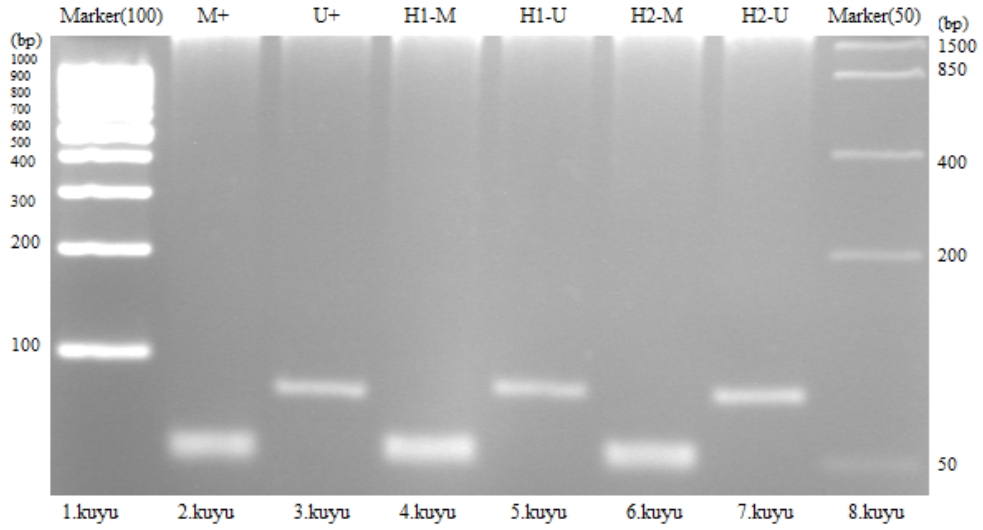
Şekil 13. Glioblastom'da membranöz boyanma EGFR x 400



Şekil 14. Glioblastom olgusunda yüksek Ki-67 oranı x 400

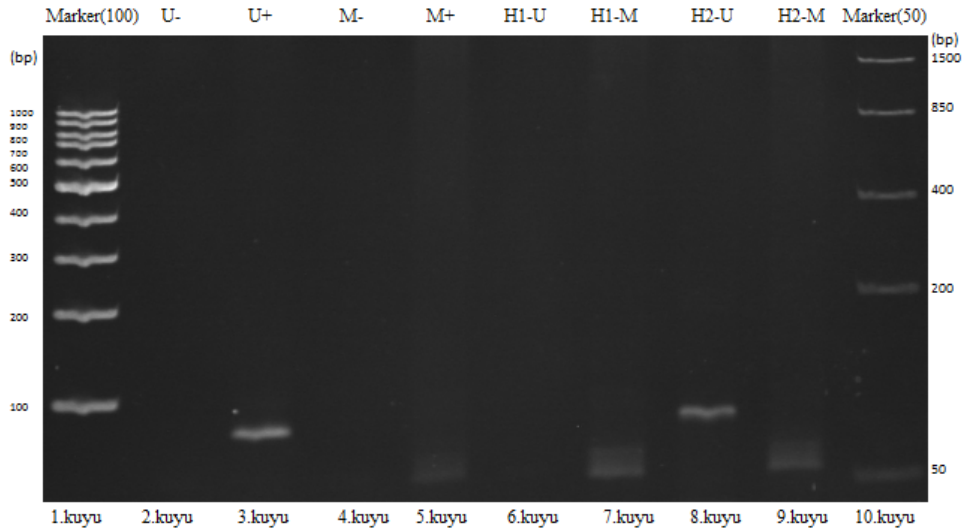


Şekil 15. Glioblastom da atipik mitoz H&E X 400



Şekil 16. %2.5'lik agaroz jel'deki görüntü:Agaroz –MGMT

1. **Kuyu:**Marker (100bp DNA Ladder)
2. **Kuyu:**Metile pozitif kontrol (81bp)
3. **Kuyu:** Unmetile Pozitif kontrol (93bp)
- 4-5. **Kuyu:**Hasta örneği (pozitif) (metilenmiş)
- 6-7. **Kuyu:**Hasta örneği (pozitif) (metilenmiş)
8. **Kuyu:**Marker (50bp DNA Lader)

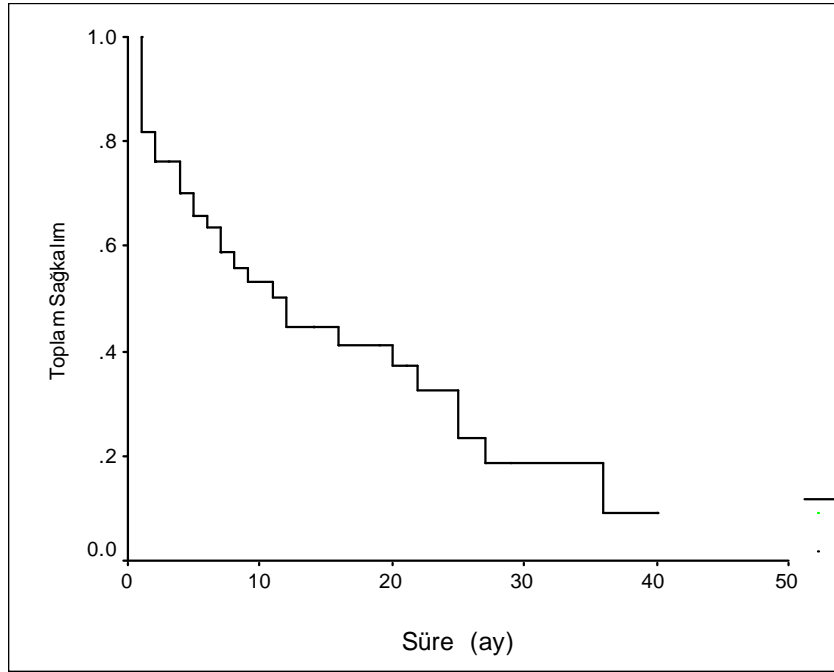


Şekil 17. PAGE (29:1 oranında polyakrilamide jel) görüntüsü MGMT

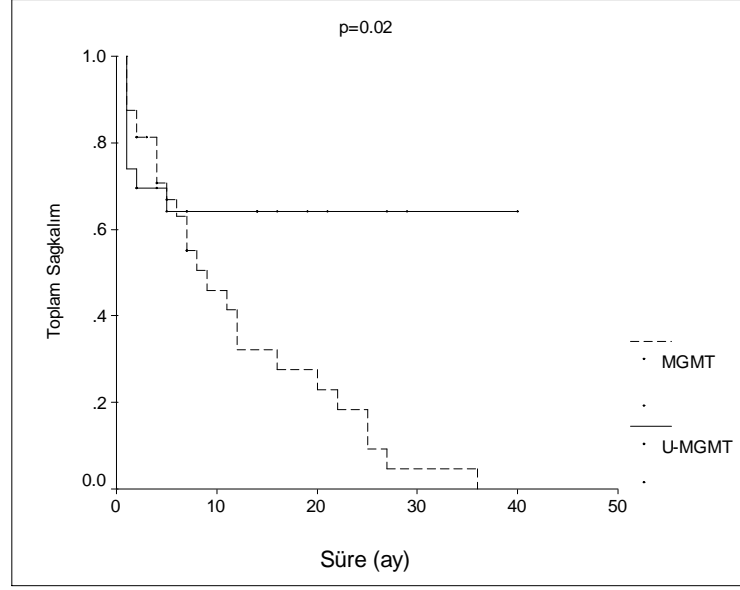
1. **Kuyu:**Marker (100 bp DNA Ladder)
2. **Kuyu:**UnMetile negatif kontrol
3. **Kuyu:**UnMetile pozitif kontrol (93 bp)
4. **Kuyu:**Metile negatif kontrol
5. **Kuyu:**Metile Pozitif kontrol (81 bp)
- 6-7. **Kuyu:** Hasta örneği 1 (pozitif) (metillenmiş)
- 8-9. **Kuyu:** Hasta örneği 2 (pozitif) (metillenmiş)
10. **Kuyu:** Marker (50 bp DNA Lader)

Sağkalım Sonuçları:

Olgularımızın takip süresi 1-40 ay arasında değişmekte idi (Tablo 18). 12 ayın sonunda sağ kalım olasılığı % 81,82 iken, 20. ayda % 32,53'e, 36.ayda % 10'un altına düşmektedir (Tablo 19). Kaplan Meier analizinde metile ve unmetile grup survey ile karşılaştırıldı. İki grup arasında ki istatikselsel fark anlamlı bulundu ($p= 0,02$). Unmetile MGMT grubunda beklenen sağ kalım süresi daha fazla idi (Şekil 14). Metilasyon olan grupta ortalama beklenen yaşam süresi 12 (8-16) ay iken, unmetile grupta 26 (19-34) ay saptanmıştır.

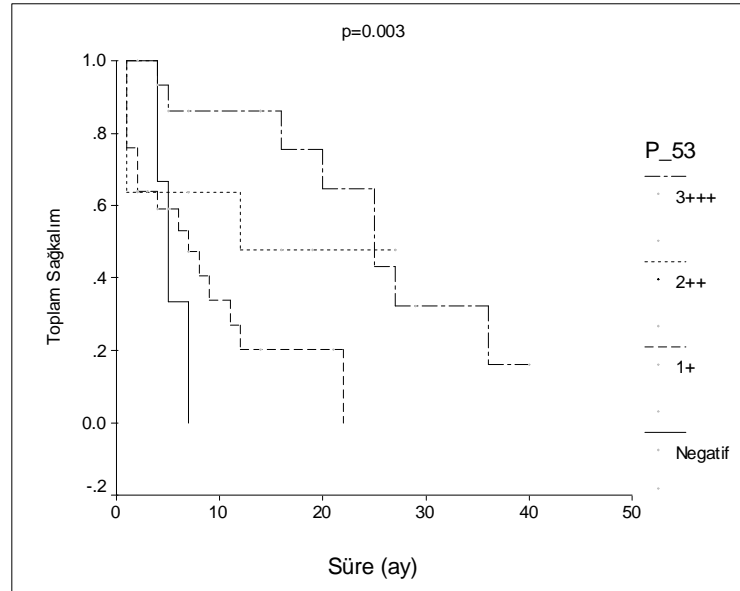


Şekil 18. Glioblastom için kanser spesifik yaşam eğrisi



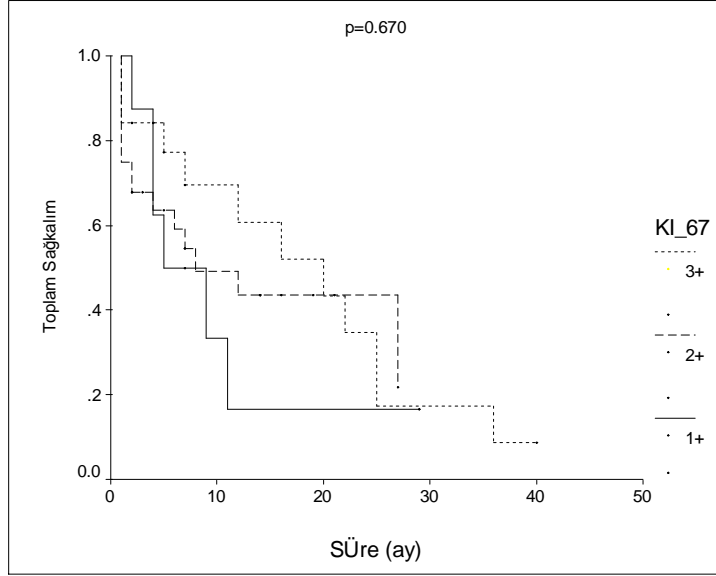
Şekil 19. MGMT için kanser spesifik yaşam eğrisi

İHK'sal olarak p53 boyanma p53 1(+) grupta beklenen ortalama yaşam süresi 9 (5-12) ay iken, 2 (+) grupta 15 (8-23) ay, 3(+) grupta ise 25 (19-32) ay bulundu. Şiddeti ile survey karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,003$) bir fark saptandı. Boyanma şiddeti arttıkça beklenen yaşam süresi de uzundu (Şekil 20).

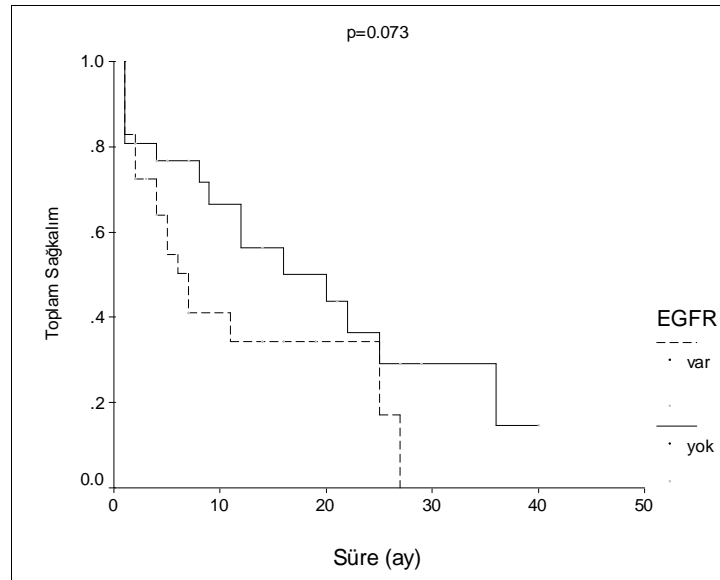


Şekil 20. p53 için kanser spesifik yaşam eğrisi

İmmünohistokimyasal olarak çalışılan Ki-67 ($p=0,67$) ve EGFR ($p=0,07$) ile survey karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 21-22).

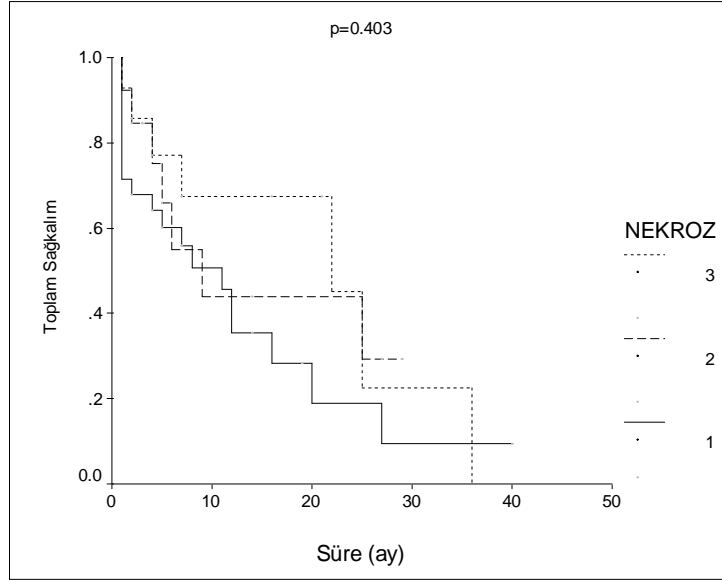


Şekil 21 . Ki-67 için kanser spesifik yaşam eğrisi

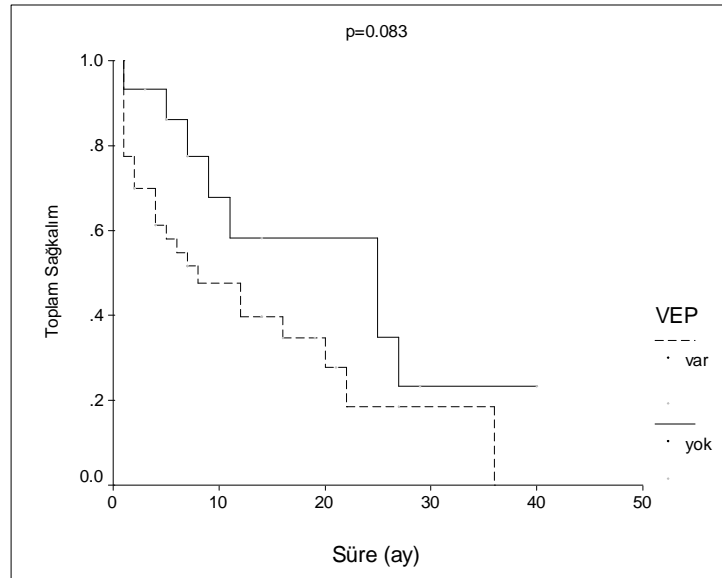


Şekil 22. EGFR için kanser spesifik yaşam eğrisi

Histomorfolojik olarak VEP ve nekroz özellikleri sağkalıma etkisi incelendi. Yapılan Kaplan Meier analizinde VEP ($p= 0,08$) ve nekroz ($p= 0,40$) ile anlamlı bir korelasyon bulunamadı (Şekil 23-24).



Şekil 23 . Nekroz için kanser spesifik yaşam eğrisi



Şekil 24. VEP için kanser spesifik yaşam eğrisi

Tablo 10. Cox Regresyon Analiz Sonuçları

	B	Sig.	OR	%95GA	
				Min	Max
MMGMT	1,005	0,040	2,73	1,04	7,14
P53	-1,808	0,003	0,16	0,05	0,53

Yaşam olasılığını etkileyebilecek faktörler Cox regresyon analizi ile değerlendirilmiştir (Tablo 10). MGMT metilasyonu ölüm riskini 2,7 kat (% 95 GA: 1,04-7,14, p=0,04), p53 pozitifliğinde artış ölüm riskini negatif yönde 0,1 kat (% 95 GA: 0,05-0,53) arttırmaktadır.

5. TARTIŞMA

Glioblastom, primer SSS tümörleri içinde en öldürücü olan ve en az kontrol edilebilen tümördür.¹⁰² Medyan sağkalım süresi 12-14 aydır. Hastaların sadece % 2-5'i >3 yıl yaşarlar.^{58,60} Standart model olan cerrahi, RT ve KT tedavi yaklaşımlarına rağmen başarısızlığın en önemli nedeni, tümörün lokal kontrolünün sağlanamamasıdır. Görüntüleme, cerrahi ve radyoterapi tekniklerinde kaydedilen ilerlemelere rağmen hastalarının prognozu kötüdür. Bu nedenle daha etkili kemoterapötik ajanlar için olan arayış çok büyük ilgi çekmektedir.¹⁰² Özellikle moleküler hedefli tedavi arayışları gündemdedir.¹⁴ Oral alkilleyici olan Temozolomid, malign ve nüks gliomların tedavisinde antitümör aktivitesi gösterilmiş tek ajandır.¹⁰³ DNA onarım enzimi MGMT'yi tüketir ve bu yolla tedaviyi daha etkili kılar. Kemoterapi alan hastalarda, tümör dokusunda MGMT'nin düşük düzeyde olmasının daha uzun sağkalımla ilişkili olduğu bir çok çalışmada gösterilmiştir.^{65,104}

Glioblastom her yaşta görülebilir. İnsidans piki 45-70 yaş arasındadır. Erkek/ kadın oranı 1,5/1 civarındadır.²⁸ Çeşitli kaynaklarda da yaş 18-70 arasında ve erkek dominantlığı bildirilmiştir.^{13,28,63,65,105,106} Çalışmamızda cinsiyet ayrımı olmaksızın yaş ortalaması 53,07 (18-83)'dür. Serimizin % 74,5'ini erkek popülasyonu oluşturmuştur. Bu veriler literatürle benzerlik göstermektedir.^{63,65,105,106}

Glioblastomlar genellikle serebral hemisferlere lokalize tümörlerdir.^{28,43} En sık sırasıyla temporal ve frontal lobda yerleşirler. Bizim serimizde % 27,3 oranla parietal lob en sık tutulan bölgedir. Eroğlu ve arkadaşlarının serisinde % 31,0'luk oranla parietal lob sık bildirilen lokalizasyondur.¹⁰⁷

Primer ve sekonder olarak iki gruba ayrılan glioblastomların en yaygın (% 90,0) varyantı primerdir.^{14,28,34} Bu grup kendiliğinden, kısa bir klinik öyküyü takiben gelişir. Hızlı progresyon ve kısıtlı sağ kalım süresi tipiktir. Çalışma grubumuzda olguların % 89,1'i primer glioblastom olup, literatürle paralellik göstermektedir.¹⁴

Ki 67'nin glioblastomlarda prognostik değeri son zamanlarda tartişma konusudur. Ki 67 boyanma indeksi ile ilgili yapılan birkaç çalışmada boyanma artışı ile tümör grade'i ve kötü prognoz arasında paralellik gözlenirken, Bouvier Labit ve ark. kendi serilerinde prognoz arasında korelasyon bulamamıştır.¹⁰⁸⁻¹¹⁰ Bu farklılık yüksek grade'li tümördeki bölgesel heterojeniteye bağlı olarak açıklanmıştır.^{108,109} Bizim serimizde de Ki 67 proliferasyon indeksi ve survey arası ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir (p= 0,67).

EGFR overekspresyonu ile ilgili gen amplifikasyonu kanserlerin birçoğunda bulunur.¹¹¹ Glioblastom da yapılan çalışmalarda EGFR amplifikasyonu ve buna bağımlı aşırı salınımı ile hastaların sağ kalım sürelerinin azalması arasında belirgin korelasyon saptanmıştır.^{7,112} EGFR salınımı ile survey arasında tam ters ilişki gösteren çalışmalar da vardır.^{113,114} Bu verilere rağmen hem Parsons ve ekibi hem de Bouvier ve ark. EGFR'deki genetik değişikliklerin tedavide prognostik önemi olmadığını ileri sürmüşlerdir.⁶⁷ Benzer şekilde biz serimizde EGFR ile prognoz arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamadık (p=0,07).¹⁰⁹

Astroitik beyin tümörlerindeki ilk genetik değişiklik TP53 mutasyonudur.^{7,28} Sekonder glioblastomda daha yüksek oranda (% 65) görülür.³⁴ TP53 mutasyonunun ve protein ekspresyonunun prognostik rolü glioblastomlarda net değildir.^{58,115} Yapılan bir çok çalışmada TP53 mutasyonu veya p53 ekspresyonuyla ilgili survey arasında önemli bir ilişki bulunamamıştır.^{58,109,114,116} Uzun dönem sağkalanların ayrı bir grup olarak değerlendirildiği iki çalışmada, p53 ekspresyon oranını sağkalım süreleri arasında farklılık göstermemiştir.^{40,58} Parsons ve ark., glioblastom olgularında yaptıkları genom analizinde en sık (% 40) değişen TP53 geninin, hiçbir prognostik değerinin olmadığını ileri sürmüşlerdir.⁶⁷ Yapılan bir çalışmada RT ve TMZ ile adjuvan KT alan glioblastom hastalarında TP53 mutasyonunun prognostik öneminin olmadığını desteklemektedir.¹¹⁵

Ohgaki ve arkadaşları, yaş ayarlı çok değişkenli analizlerinde TP53 mutasyonu olan ve olmayan hastalar arasında sağkalımda bir fark olmadığını göstermiştir. Ancak populasyon bağlı çalışmasında TP53 mutasyon varlığının, tek değişkenli analizinde daha uzun sağ kalımın prediktifi olduğunu bildirmiştir.¹¹³ Bizim serimizde p53 ekspresyon derecesi ile survey arasında Kaplan Meier analizinde anlamlı (p=0,003) bir

korelasyon bulunmuştur. İmmünohistokimyasal olarak p53 ile boyanma yüzdesi arttıkça sağ kalım süresi artmaktadır.

DNA üzerinde O⁶MeG, az oranda (% ≤8) meydana gelen metilasyon tipi olmasına rağmen mutajenitesi ve toksisitesi en güçlü olandır.^{70,71} MGMT'nin metilasyon durumuna, metilasyon spesifik PCR (MSP), semikantitatif MSP, prosekans RNA (*Real time reverse transkripsiyon PCR*) ile bakılabilir. İHK, normal çalışan gen ürünü MGMT protein ekspresyonunu gösteren bir yöntemdir.¹⁶ Günümüzde en sık MSP kullanılmaktadır.¹¹⁷ PCR ile belirlenmiş metilize MGMT gen durumu ve İHK ile saptanmış MGMT protein ekspresyonu arasında ki korelasyon zayıftır. Prosekans ile belirlenen spesifik CpG yerlerinin metilasyonu ve MGMT ekspresyon seviyesi arasında da önemli bir uyumsuzluk vardır. DNA'yı baz alan metodlar özellikle kantitatif olanlar daha güvenilir bulunmuştur.¹⁶ Felsberg ve ark. immünohistokimyasal olarak MGMT ekspresyonu saptadıkları olgularda PCR ile MGMT metilasyonu ve sağkalım arasında anlamlı bir korelasyon yakalayamamıştır.¹¹⁵ Kang ve ark. 12 gliosarkom olgusunda PCR ve İHK'sal yöntemi karşılaştırmışlardır. MGMT promoter bölgesinde PCR analizi ile metilasyon saptamalarına rağmen bu olgularda protein ekspresyonu da izlemişlerdir.¹¹⁸ Bu uyumsuzluğu, ekspresyonda, MGMT pozitif tümör dokusuyla kontamine aktive mikroglial hücreler, reaktif astrositler, lenfositik infiltrasyon ve vasküler hücreler gibi nonneoplastik elemanların neden olabileceğine bağlamışlardır.^{115,118} Kang ve ark. MGMT promoter metilasyonunun tek allelde gerçekleşmesi sonucu diğer unmetile allelin ekspresyona neden olabileceğini vurgulamışlardır.¹¹⁸ Nakamura ve ark. ise bu genin formaldehit ve metal iyonları varlığında etkilenebileceğini öne sürmüşlerdir.⁶³ Son yayınlanan çalışmalar da İHK'nın, PCR ile paralellik göstermediği ve metilasyon durumunu sağlıklı yansıtmadığı bildirilmiştir. Ayrıca İHK sonuçlarının survey ile anlamlı ilişkisi saptanamamıştır.^{6,115,118} Bu nedenlerle biz çalışmamızda İHK'yı kullanmayı uygun bulmadık.

Sekonder grupta MGMT promoter metilasyonu serilerde, yaklaşık % 75 oranında bulunmuştur.^{55,63} Buna karşın metilasyonu, primer glioblastomda % 36-68 oranında bildiren yayınlar da vardır.^{63,120} Biz serimizde primer olgularımızın % 59,2'de, sekonder grubumuzun %50,0'de metilasyon saptadık. Oranlar birbirine yakın olsa da, çalışmamızda sekonder glioblastom sayımız oldukça kısıtlıdır (% 10,9).

Glioblastomda TMZ direncinin belirlenmesinde MGMT metilasyonunun prognostik bir faktör olabileceğine ilişkin çok sayıda çalışma bulunmaktadır.^{72,119,121-124} Glioblastom hastalarında bu promoter bölgenin metilasyon oranı yaklaşık % 30-77 oranında değişmektedir (Tablo 11).^{40,65,123,125} Bu çalışmada da değerlendirilen 55 olgunun 32'sinde (% 58,2) MGMT metilasyonu saptanmıştır.

MGMT, yaşamın ve tedavinin nasıl olacağına öngörülmesi üzerine bugüne kadar belirlenen en önemli belirteçtir.^{12,65} Literatürü incelediğimizde birçok çalışmada metilasyon varlığı prognozda pozitif yönde bir belirteç olarak bulunmuştur. Esteller ve ark., MGMT metilasyonunun beyin tümörlerinde klinik seyir açısından önemli rol oynadığını belirtmiştir.⁶⁵ Paz ve ark.'nın 92 serilik çalışmalarında metilasyonun klinik cevapla doğrudan ilişkili olduğu ve hastalarının TMZ ile tedavisinde, klinik cevabın öngörülmesinde MGMT metilasyonunun önemli olduğu vurgulanmıştır.¹²¹ Bir çok çalışmada, glioblastomda bu bölge metilasyonunun, hastalık seyrinin klinik takibinde ve TMZ dozunun belirlenmesinde en önemli belirteç olduğu bildirilmiştir.^{6,12,72,119,123,124}

Tablo 11. Yayınlanan serilerde glioblastomda MGMT metilasyon durumu

	M-MGMT	U-MGMT	Metilasyon yüzdesi (%)
Esteller ve ark. ⁶⁵	12	17	41,3
Nakamura ve ark. ⁶³	25	25	50,0
Kamiryo ve ark. ¹⁰⁶	33	41	44,5
Paz ve ark. ¹¹⁹	28	64	30,4
Hegi ve ark. ¹²	206	101	67,1
Krex ve ark. ⁴⁰	28	8	77,7
Cankovic ve ark. ¹⁰⁵	35	45	43,7
Felsberg ve ark. ¹¹⁵	26	40	39,3
Sonoda ve ark. ⁵⁸	11	7	61,1
Dunn ve ark. ¹²³	58	51	53,2
Karayan Tapon ve ark. ⁷²	54	26	67,5
Kreth ve ark. ⁹⁸	24	29	45,2

Tüm bu yayınlarla birlikte, MGMT promoter metilasyonunun alkilleyici ajanlarla kemoterapiye verilen cevabın pozitif bir prediktif belirteci olduğu diğerleri tarafından onaylanmamıştır.^{60,126} MGMT promoter metilasyonunun kemoterapiyle tedavi edilmeyen glioblastom hastaları için prediktif olup olamayacağına dair az sayıda veri mevcuttur.¹²⁶ Piperi ve ark. 17 glioblastom hastasında 4 genin promoter bölgesinde metilasyon durumunu araştırmışlar ve MGMT için % 58.8 oranında metilasyonu saptamışlardır. MGMT metilasyonu survey ve nekroz genişliği ile pozitif korelasyon göstermiştir. MGMT metilasyonu olan hastalarda, metilasyonu olmayan ve 16 aydan fazla yaşayan hastalara göre medyan sağkalım süresi daha az (12 ay) bulunmuştur.⁶⁰ Bizim serimiz de paralel sonuçlar içermektedir. Çalışmamızda, MGMT metilasyonu olmayan hastaların ortalama sağkalım süresi daha uzundur. Metilasyon olan grupta ortalama beklenen yaşam süresi 12 (8-16) ay iken, unmetile grupta 26 (19-34) ay saptanmıştır. Bu fark yapılan Kaplan Meier istatistiksel analizinde anlamlı bulunmuştur (p=0,02). Prognostik ve prediktif faktör olarak öngörülen MGMT determinasyonunun değeri hala net değildir. Bazı raporlara göre, MGMT promoter metilasyonu radyoterapi ve alkilleyici ajanlarla tedavi edilen glioblastomda daha iyi bir sağkalımla ilişkilendirilmiştir.^{12,54,55,68,121,127} Bazı çalışmalar kendi başına MGMT promoter metilasyonunun tedaviye bakılmaksızın bağımsız bir prognostik faktör olduğunu bildirmiştir.^{12,126}

Kamiryö ve ark. yaptıkları PCR çalışmasına Anaplastik Astrositomları (AA)'ları da dahil etmişlerdir. Hem glioblastom hastalarında (% 44,6), hem AA'lı olgularda (% 45,2) benzer metilasyon oranı saptamışlardır. Ancak AA olgularında MGMT metilasyonunu uzun dönem sağkalım ve progresyonsuz survey arasında ilişkili bulmuşlardır. Aynı ilişkiyi glioblastomda saptamamışlardır. Glioblastomda sadece 55 yaş üzeri ve erkek cinsiyet bağımsız kötü prognoz göstergesi olarak bulunmuştur.¹⁰⁶ Bizim serimizde yaş ve cinsiyet ile survey arasında anlamlı ilişki görülmedi.

MGMT promoter bölgesinin metilasyon durumunu PCR analizi ile göstermek için parafinize ve taze dondurulmuş dokudan çalışılmaktadır. Krex ve ark.'nın çalışmasında glioblastomlu uzun dönem (3 yıldan fazla) sağ kalan olgularında, MGMT promoter metilasyonu % 77'e ulaşmıştır.⁴⁰ Krex çalışmasında metilasyon oranını yüksek bulmuştur. Bu durumu kriyoprezerve doku örneklerinden MSP çalışılmasının parafin kesitlere göre daha yüksek bir sensitiviteye sahip olmasıyla açıklamışlardır.^{40,60}

Taze doku ve parafin dokulardan MSP ile metilasyon saptama hassasiyeti farklı olabilmektedir. Bizim çalışmamızda parafin bloklardan DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Metilasyon saptamadığımız hasta grubunda bu nedenle kaybımızın olabileceğini düşündük.

Normal beyin dokusu, mikroglia, endotel hücreleri ve lenfositler unmetile MGMT'ye sahiptirler.^{65,106,115} Tüm bunların ekarte edildiği, pür canlı tümör hücresi içeren örnekte PCR çalışılması sağlıklı metilasyonu göstermek için gereklidir. Ancak glioblastomlar invazyon ve infiltrasyon gösteren, bol nekroz içeren tümörler olduğu için bu şartları sağlamak oldukça zordur. Çalışmamız da tüm olgular için parafin bloklar seçilirken bu şartlara ve kontaminasyona azami ölçüde dikkat edilmiştir. Buna rağmen unmetile ve metile MGMT bantlarına sahip 13 olgumuz vardır. Bu olgularda, unmetile bant varlığının, gerçek metilasyon durumunu gölgeleyebileceği olasılıklar arasındadır.

Parkinson ve ark. 10 glioblastom hastasında ameliyat öncesi ve sonrası 22 örnek olarak metilasyon durumunu araştırmışlardır. 10 hastanın 7'sinde tedavi öncesi ve sonrası elde edilen spesmenlerde MGMT promoterinin metilasyon durumu değişmiştir. Dört hastada, MGMT promoteri ilk ameliyatta unmetile iken, tedavi sonrası örneklemede bir miktar metilasyon göstermiştir (% 32, 44, 12 ve 4). Diğer bir hastada, metilasyon ilk örneklemede % 40 iken ikinci örnekte % 68'e yükselmiştir. Kalan iki hasta başlangıçta bir derece metilasyon ortaya koymuş (% 72 ve % 12), sonraki örnekleme herhangi bir MGMT promoter metilasyonu göstermemiştir. Değişken metilasyon durumu elde edilmesi intratümöral değişkenlik sebebiyle olabileceği için, büyük glioblastomaların farklı bölgelerinden 3-4 spesmen örneklenmiştir. Promoter sekanslama ile tüm örneklerde metilasyonda minimal değişim gözlenmiştir.⁶ Parkinson ve ark. tedavi öncesi ve sonrası değerlendirilen örneklerde MGMT'nin farklı olabileceğini ortaya koymuşlardır. Tedavi sonrasında nüks ve rezidü tümörde olabileceği gibi, aynı tümörün içinde MGMT promoter metilasyonunda değişim görülebilmektedir. Bizim çalışmamızda ise tek parafin blok seçilerek MGMT durumuna bakılmıştır. İntra tümöral heterojenite nedeniyle PCR çalışılırken birden fazla tümör alanı içeren farklı örneklerin çalışılması daha doğru veriler sağlayacaktır. Maddi olanaklarımızın kısıtlılığı nedeniyle her olguya seçilen bir örnek ile çalışma yapılmıştır. Çok sayıda örnekte çalışılması ile metilasyon durumu değişebileceği olasılıklar arasındadır.

MGMT promoter metilasyonunun glioblastomlar boyunca çoğunlukla heterojenite göstermektedir. İlk biyopside prediktif bir marker olarak MGMT promoter metilasyonunun değeri gösterilse de, tekrarlayan tümörlerde durum değişebilmektedir. Metilasyon durumunun RT ve KT tedavisinden sonra tekrarlayan veya rezidü tümör eksizyon yapılan olgularda araştırılmasının da anlamlı olacağı düşünülmüştür. Parkinson ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada tedavi sonrası metilasyon durumunda farklılıklar bulunmuştur. Adjuvan tedavi öncesi ve sonrası aynı tümörden alınan farklı spesmenler arasında MGMT promoterının metilasyon derecesinde artma ya da azalma olabileceğini göstermiştir. Bu değişiklikler için tümör içinde bölgesel varyasyon, tedaviyle metilasyon üzerine direkt etki, tedaviyle unmetile hücre popülasyonlarının seleksiyonu ve tümörün daha ileri dediferansiyasyonu dahil birkaç olası açıklama vardır. Rezidü ve rekürren tümörlerde metilasyon analizine dayanarak daha ileri tedavi kararları verilecekse ilk tedavi sonrası bu analizin tekrarlanması önerilmektedir.⁶

MGMT, alkilasyon ajanlarıyla tedavide en önemli direnç geni olduğu için metilasyon yapısı değerlendirilerek tedavinin şekillendirilmesi daha uygun olacaktır.^{128,129} Alkilasyon ajanlarına karşı gelişen hücresel dirençten yüksek MGMT aktivitesinin sorumlu olabileceğine ilişkin bu çalışmalar ortaya çıktıkça MGMT aktivitesini azaltabilecek yeni moleküllerin oluşturulmasına yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. MGMT ekspresyonunun kişiler arasında ortalama 7,6 kat değişkenlik gösterdiği ve aynı kişiden farklı zamanlarda alınan örneklerde bile 1,4-3,5 kat farklı MGMT ekspresyonu saptandığı belirtilmiştir.⁶⁹

MGMT promoter bölgesinin metilasyonu aynı zamanda kanserde mutasyonların oluşumunda artışla sonuçlanabilir. DNA hasarı sonucunda aktifleşen TP53 yolağı, MGMT ekspresyonunun düzenlenmesinde rol alan mekanizmalardan biridir.¹⁵⁹ Ancak, p53 ve MGMT ekspresyonu ilişkisini araştıran çalışmaların sonuçları arasında farklılıklar vardır.^{130,131,132}

Rolhion ve ark.'nın 39 glioblastom hastasına ait dokuda MGMT ve p53 gen ekspresyonları üzerine yaptıkları çalışmada, RT-PCR ile MGMT durumunu ve İHK ile de yaban tip ve mutant p53 ekspresyonu araştırmışlardır. TP53 geninde mutasyon olan örneklerde MGMT ekspresyonunun azaldığını saptadılar. Bu nedenle düşük MGMT ekspresyonunun p53 geninde mutasyonların oluşmasını tetikleyebileceğini

belirtmişlerdir.¹³³ Benzer şekilde Esteller ve ark., her hangi bir olası mekanizma önermeden, MGMT'nin metilasyon yoluyla inaktivasyonunun p53 geninde G:C_A:T transisyon mutasyonlarının artmasıyla ilişkili olabileceğini bildirmektedir.⁶⁵

Hermission ve ark. gliom hücre dizilerinde yaptıkları çalışmada, MGMT ekspresyonunun ve p53 yapısının hücrelerin TMZ'ye olan duyarlılıklarının tahmininde yardımcı olabileceğini bildirmektedir. Bu çalışma, MGMT'nin p53 ile doğrudan ilişkili olduğunu ve TMZ yanıtının öngörülmesinde her ikisinin de önemli olduğunu göstermiştir.¹¹⁹

Literatürde p53 ve MGMT arasında bağlantıyı gösteren yayınlara karşın tam aksi görüşler de vardır. Altmışyedi ve 219 serilik olguyu içeren iki çalışmada MGMT hipermetilasyonu ile p53 aşırı ekspresyonu arasında ilişki bulunamamıştır.^{115,134} Bizim çalışmamızda p53 ile MGMT arasında bir korelasyon saptanamamıştır (p=0,44). Bu konu ile ilgili daha geniş serili çalışmalarda her iki mutasyon arasında bağlantı netlik kazanacaktır.

Sonuç olarak çalışmamızda, unmetile grubun surveyinin daha fazla bulunmasının, parafin dokudan ve tek örnekte çalışılmasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Olguların randomize seçilmesi, cerrahi, KT ve RT'nin standardize edildiği homojenize bir gruptan oluşmaması, sonucu etkileyebilecek diğer bir faktör olarak yorumladık. Klinik olarak cerrahi ve diğer tedavi protokollerinin standardize edildiği daha fazla hasta grubunda tümör heterojenitesini göz önünde bulundurarak, mümkün olduğu kadar çok sayıda parafin bloktan çalışma yapılmasını uygun bulduk.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Bu çalışmaya; 2008-2011 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda glioblastom tanısı alan 55 olgu seçildi.

2. Hastaların 41'i (% 74,5) erkek, 14'ü (% 25,5) kadındır.

3. Glioblastom olgularının cinsiyet ayırımı yapmaksızın yaş ortalaması 53.07 (18-83) iken, kadınlarda 49.29 (22-70), erkeklerde 54.37 (18-83)'dir.

4. Olguların takip süresi 1 – 40 ay arasında değişmektedir.

5. Tümörlerin 15'i (% 27,2) parietal, 14'ü (% 25,4) frontal, 10'u (% 18,1) temporoparietal, 6'sı (% 10,9) temporal, 7'si (% 12,7) oksipital lokalizasyondadır

6. Olguların ikisine biyopsi uygulanmış, diğer 53 olguya gros total ve subtotal eksizyon yapılmıştır.

7. Histomorfolojik olarak olguların 28'i (% 50,9) palizatik nekroz, 13'ü (% 23,6) palizatlaşmayan ve 14'ü (% 25,4) her iki nekrozu içermektedir.

8. Tümörlerin 42'sinde (% 76,3) vasküler endotelial proliferasyon izlenirken, 13'ünde (% 23,6) görülmemiştir.

9. İHK yöntem ile uygulanan Ki-67 ile proliferasyon indeksi 8 olguda %10 ve altında, 28 olguda % 11-20 arası, 19 olguda % 21 ve üzerinde bulunmuştur.

10. Tüm olgulara uygulanan EGFR, 27 olguda (% 49,1) pozitif, 28 olguda (% 50,9) olguda negatif saptanmıştır.

11. Yapılan istatistiksel analizde; Ki-67 (p= 0,67), EGFR (p= 0,073), VEP (p= 0,08) ve nekroz (p= 0,40) sağkalımla ilişkili görülmemiştir.

12. Olgulara İHK yöntem ile uygulanan p53, 25 olguda (% 45,5) bir pozitif (+) , 11 olguda (% 20,0) iki pozitif (++), 16 olguda (% 30,0) üç pozitif (+++) boyanma gösterirken, üç olguda (% 5,5) negatif sonuç vermiştir.

13. İHK yöntem ile gösterilen p53 ekspresyonu arttıkça sağkalım olasılığı da artmaktadır. İstatistiksel olarak farkı ($p= 0,003$) anlamlı bulunmuştur. Glioblastom'da p53 ekspresyonu prognozu etkileyen bağımsız faktörlerden biri olarak ortaya çıkmıştır.

14. PCR yöntemi ile optimum şartlarda olguların 32'inde (% 58,2) metile, 23'ünde (% 41,8) unmetile MGMT DNA'sı saptanmıştır.

15. MGMT promoter bölgesinde metilasyon varlığını PCR çalışılması ile göstermek için pür tümör dokusundan çalışılmalıdır. Normal glial doku, mikroglia, endotel hücreleri, lenfositler unmetile MGMT'ye sahip oldukları için tümördeki metilasyonu gölgeleyebilmektedirler.

16. Glioblastomlarda intra tümöral heterojenite nedeniyle tümörün farklı bölgelerinden alınan örneklerde MGMT metilasyon durumu varyasyon gösterebilir. Bu nedenle birden fazla tümör alanı içeren örneklerde PCR çalışılması daha doğru veriler ortaya koyacaktır.

17. Tedavi öncesi ve sonrası metilasyon da varyasyonlar görülebilmektedir. Glioblastomda tedavi sonrası rekürren ve rezidü tümörlerde alkilleyici ajanlarla devam edebilmek için metilasyon analizinin tekrarlanması önerilmiştir.

18. Unmetilize grubun sağ kalım süresi (ortalama 26 ay), metilize olan gruba göre (ortalama 12 ay) daha uzundur. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p=0,02$) MGMT promoter bölgesinde metilasyon varlığı ile survey arasında negatif bir ilişki saptanmıştır.

19. Klinik olarak cerrahi ve diğer tedavi protokollerinin standardize edildiği belirli bir hasta grubunda tümör heterojenitesini göz önünde bulundurarak, mümkün olduğu kadar çok sayıda parafin bloktan çalışma yapılmasının uygun olacağı düşünülmüştür.

20. Başlangıç aşaması olan bu çalışmamızda glioblastom ve diğer tümörlerde PCR ile MGMT metilasyon durumunun araştırılması anabilim dalımızda teknik olarak oturtulmuş ve tümörlü olgularda rutin çalışma yapılmasına olanak sağlanmıştır.

KAYNAKLAR

1. **Hsieh JC, Lesniak MS.** Surgical management of high-grade gliomas. *Expert Rev. Neurother* **2005**;5:33–9.
2. **Maher EA, Fuarnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, DePinho RA.** Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes. Dev* **2001**; 15:1311–33.
3. **Cavenee WK, et al.** Diffusely infiltrating astrocytomas. In: Kleihues P, Cavenee WK, editors. *Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System*. 2nd ed. IARC Press; Lyon: **2000**; 10–21.
4. **Burger PC, Green SB.** Patient age, histologic features, and length of survival in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer* **1987**;59:1617–25.
5. **Stupp R, Dietrich P-Y, Ostermann Kraljevic S.** Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide. *J Clin Oncol* **2002** ; 20:1375-82.
6. **Parkinson JF, Wheler HR, Clarkson A, et al.** Variation of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation in serial samples in glioblastoma. *J. Neurooncol* **2008**; 87:71-8.
7. **Burger PC, Scheithauer BW, Vogel FS.** Surgical Pathology of the Nervous System and Its Coverings. 4nd Ed. Philadelphia: Churchill Livigstone **2002**; 180-196.
8. **Walker MD, Alexander EJ, WE H, MacCarty CS, Mahaley MSJ, Mealey JJ.** Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg* **1978**; 49:333–343.
9. **Stewart LA.** Chemotherapy in adult high-grade glioma: asystematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet* **2002**; 359:1011–1018.
10. **Gross MW, Weber WA, Feldmann HJ, Bartenstein P, Schwaiger M, Molls M.** The value of F-18-fluorodeoxyglucose PET for the 3-D radiation treatment planning of malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **1998**;5: 989-995.
11. **Stupp R, Mason WP, Van Den Bent MJ.** Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* **2005**; 352: 987-996.
12. **Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, et al.** MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* **2005**; 352: 997–1003.
13. **Hasse JC, Sucker A, Edler L, Kurzen H, Moll I, Stresemann C, Spieth K, Mauch C, Rass K, Dummer R, Schadendorf D.** MGMT gene promoter methylation correlates with tolerance of temozolomide treatment in melanoma but not with clinical outcome. *Br J Cancer* **2010**; 7; 103(6): 820–826.
14. **Rivera L.A., Pelloski E.C.** Diagnostic and Prognostic Molecular Markers in Common Adult Gliomas. *Expert Rev Mol Diagn* **2010**; 10(5),637-649.
15. **Weller M, Wick W, Hegi ME, Stupp R, Tabatabai G.** Should biomarkers be used to design personalized medicine for the treatment of glioblastoma? *Future Oncol* **2010**; 6(9):1407-14.

- 16. Ducray FÇ, Idbaih A, Wang XW, Cheneau C, Labussiere M, Sanson M.** Predictive and prognostic factors for gliomas. *Expert Rev. Anticancer Ther* **2011**; 11(5), 781–789.
- 17. Taioli E, Ragin C, Wang X, Chen J, Langevin SM, Brown AR, Gollin SM, Garte S, Sobol RB.** Recurrence in oral and pharyngeal cancer is associated with quantitative *MGMT* promoter methylation. *BMC Cancer* **2009**; 9: 354.
- 18. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG.** A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* **2001**; 61:3225–3229.
- 19. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG.** Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine- DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* **1999**; 59:793–797.
- 20. Esteller M.** CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* **2002**; 21:5427–40.
- 21. Jones PA, Baylin SB.** The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* **2002**; 3:415–28.
- 22. Esteller M.** Relevance of DNA methylation in the management of cancer. *Lancet Oncol* **2003**; 4:351–8.
- 23. Esteller M, Herman JG.** Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. *Oncogene* **2004**; 23:1–8.
- 24. Lee CH, Jung KW, Yoo H, Park S, Lee SH.** Epidemiology of primary brain and central nervous system tumors in Korea. *Journal of Korean Neurosurgical Society* **2010**; 48(2):145-52.
- 25. Sarkar C, Jain A, Suri V.** Current concepts in the pathology and genetics of gliomas. *Indian Journal of Cancer* **2009**; 46(2):108-119.
- 26. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P.** The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica* **2007**; 114(2):97-109.
- 27. Tatter SB.** The new WHO Classification of Tumors affecting the Central Nervous System. Erişim, [<http://neurosurgery.mgh.harvard.edu/newwhobt.htm>]. Erişim tarihi; **2010**; 20.08.2010.
- 28. Kleihues P, Cavenee WK.** Pathology and Genetics of Tumors of the Nervous System. IARC Press. Lyon, France. **2000**; 40-45.
- 29. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW.** The new WHO classification of brain tumours. *Brain pathology*, Zurich, Switzerland **1993**; 3(3):255-68.
- 30. Kleihues P, Lous DN, Wiestler OD, Burger PC, Scheithauer BW.** WHO classification of tumours of the central nervous system (4th Ed.). Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K. *International Agency for Research on Cancer (IARC) Lyon* **2007**;10-11.
- 31. Rosell R, De Las Penas R, Balana C, Santarpia M, Salazar F, De Aguirre I, Reguart N, Villa J, Wei J, Ramirez JL, Molina MA, Y Cajal SR, Jablons D, Taron M.** Translational research in glioblastoma multiforme: molecular criteria for patient selection. *Future Oncology* **2008**; 4(2):219-228.
- 32. Sathornsumetee S, Rich JN.** Designer Therapies for Glioblastoma Multiforme. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2008**; 1142:108-132.
- 33. Iacob G., Dinca EB.** Current data and strategy in glioblastoma multiforme. *Journal of medicine and life* **2009**; 2(4):386-93.

- 34. Durmaz R, Vural M.** Primer ve Sekonder Glioblastoma Multiforme Genetiği. *Türk Nöroşirürji Dergisi* **2007**; 17(2):80-90.
- 36. Davis FG and McCarty BJ.** Epidemiology of brain tumors. *Curr opin in neurology* **2000**;13;635-40.
- 37. Prasad G, Haas-Kogan DA.** Radiation-induced gliomas. *Expert review of Neurotherapeutics* **2009**; 9(10):1511-7.
- 38. Khurana VG, Teo C, Kundi M, Hardell L, Carlberg M.** Cell phones and brain tumors: a review including the long-term epidemiological data. *Surgical neurology* **2009**; 72(3):205-14.
- 39. Blumenthal DT, Schulman SF.** Survival outcomes in glioblastoma multiforme, including the impact of adjuvant chemotherapy. *Expert review of neurotherapeutics* **2005**; 5(5):683-90.
- 40. Krex D, Klunk B, Hartmann C, Von Deimling A, Piettsch T, Simon M, Sabel M, Steinbach JP, Heese O, Reifenberger G, Weller M, Schackert G.** Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain: a journal of neurology* **2007**; 130:2596-606.
- 41. Adamson C, Kanu OO, Mehta AI, Di C, Lin N, Mattox AA, Bigner DD.** Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert opinion on investigational drugs* **2009**; 18(8):1061-1083.
- 42. Deangelis LM.** Brain tumors. *The New England Journal of Medicine* **2001**; 344(2):114-23.
- 43. Oktar N.** Temel Nöroşirürji. Temel Nöroşirürji Derneği. Ankara. **2010**; 1037-48.
- 44. Krakstad C, Chekenya M.** Survival signaling and apoptosis resistance in glioblastoma: oppurtunities for targeted therapeutics. *Molecular cancer*, **2010**; 9:135.
- 45. Weingart J, Brem H.** Brain Tumors and Cancers of the Central Nervous System. Neiderhuber JE. Current Therapy. Fhirst ED., Decker: Mosby- Year Book Inc **1993**: 538-546.
- 46. Maity A, Pruitt AA, Judy KD, Phillips PC.** Cancer of the central nervous system. In: Abeloff MD, Armitage JO, Niederhuber JE, Kastan MB, McKenna WG, eds: Clinical Oncology. 3rd ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Churchill Livingstone **2004**; 1347-1431.
- 47. Karlsson UL, Leibel SA, Wallner K, Davis LW, Brady LW,** Brain in: Principles and Practise of Radiation Oncology. (eds) : Perez CA, Brady LW ,J.B Lippincot Company Philadelphia **1992**; ch23: 513-563.
- 48. J Janicek, Liangge Hsu.** Case report from RadPath Collection Brigham RAD Teaching File.Author(s): Milos Department of Radiology, Brigham and Women's Hospital Harvard Medical School. March 7, **1996**.
- 49. Kleihues P, Cavanee WK.** World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics-tumours of the nervous system. Lyon: IARC Press **2000**.
- 50. Yoo KS, Lee MC, Kang SS, Kim JH, Jung S, Kim YJ, Lee JH, Ahn KY, Lee JS, and Cheon JY.** p53 mutation and epidermal growth factor receptor overexpression in glioblastoma. *J Korean Med Sci.* **2001**; 16(4): 481-488.
- 51. Oh D, Prayson RA.** Evaluation of epithelial and keratin markers in glioblastoma multiforme. An immunohistochemical study. *Arch Pathol Lab Med* **1999**; 123:917-920.
- 52. The Internet Pathology Laborotary WebPath version 10 CD-ROM;** Central Nervous System Pathology Section.

- 53. Martinez R, Rohde V, Schackert G.** Different molecular patterns in glioblastoma multiforme subtypes upon recurrence *J Neurooncol* **2010** February; 96(3): 321–329.
- 54. Labussiera M, Wang XW, Idbaih A, Ducray FÇ Sanson M.** Prognostic Markers in Gliomas. *Future Oncol* **2010**; 6(5), 733-39.
- 55. Kanu OO, Hughes B, Di C, Ningjing Lin N, Jinrong Fu J, Bigner DD, Yan H, Adamson C.** Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. *Clin Med Oncol* **2009**; Apr 8;3:39-52.
- 56. Prives C, Hall PA:** The p53 pathway. *J Pathol* **1999**;187:112-126.
- 57. Pardo FS, Hsu DW, Zeheb R, Efird JT, Okunieff PG, Malkin DM.** Mutant, wild type, or overall p53 expression: freedom from clinical progression in tumours of astrocytic lineage. *Br J Cancer* **2004**; 9:1678-1686.
- 58. Sonoda Y, Kumabe T, Watanabe M, Nakazato Y, Inoue T, Kanamori M, Tominaga T.** Long-term survivors of glioblastoma: clinical features and molecular analysis. *Acta Neurochir (Wien)* **2009**; 151(11):1349-58.
- 59. Pelloski CE, Ballman KV, Furth AF, Zhang L, Lin E, Sulman EP, Baht K, McDonald JM, Colman H, Woo SY, Heimberg AB, Suki D, Prados MD, Chang SM, Barker FB, Buckner JC, James CD, Aldape K.** Epidermal growth factor receptor variant III status defines clinically distinct subtypes of glioblastoma. *J Clin Oncol* **2007**; 25(16), 2288–2294.
- 60. Piperi C, Themistocleous S. M, Papavassiliou AG, Farmaki E, Levidou G, et al.** High incidence of MGMT and RARbeta promoter methylation in primary glioblastomas: association with histopathological characteristics, inflammatory mediators and clinical outcome. *Mol Med* **2010**; 16(1-2):1-9.
- 61. Chakravarti A, Zhai G, Suzuki Y, Sarkesh S, Black PM, Muzikansky A, Loeffler JS.** The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas. *J Clin Oncol* **2004**; 22(10), 1926–1933.
- 62. Mawrin C, Diete S, Treuheit T, Kropf S, Vorweck CK, Boltze C, Kirches E, Firching R, Dietzmann K.** Prognostic relevance of MAPK expression in glioblastoma multiforme. *Int J Oncol* **2003**; 23(3), 641–648.
- 63. Nakamura M, Watanabe T, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H.** Promoter Methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C-> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis* **2001**; 22(10):1715-9.
- 64. Terada K, Tamiya T, Daido S, Kambara H, Tanaka H, Ono Y, Matsumoto K, Ito S, Ouchida M, Ohmoto T, Shimizu K.** Prognostic value of loss of heterozygosity around three candidate tumor suppressor genes on chromosome 10q in astrocytomas. *J Neurooncol* **2002**; 58(2):107-14.
- 65. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E.** In activation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* **2000**; 343:1350-4.
- 66. Ichimura K, Pearson DM, Kocalkowski S, Bäcklund LM, Chan R, Jones DT, Collins VP.** IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro Oncol* **2009**;11(4):341-7.
- 67. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA Jr, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE,**

- Kinzler KW.** An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **2008**; 321:1807-1812.
- 68. Lassman AB, Holland EC.** Incorporating molecular tools into clinical trials and treatment for gliomas? *Curr Opin Neurology* **2007**; Dec;20(6):708-11.
- 69. Kaina B, Margison GP, Christmann M.** Targeting O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase with specific inhibitors as a strategy in cancer therapy. *Cellular and Molecular Life Science* **2010**; 67(21):3663-81.
- 70. Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP.** MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA repair* **2007**; 6(8):1079-1099.
- 71. Marchesi, F, Turriziani M, Tortorelli G, Avvisati G, Torino F, DeVeckis L.** Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society*, **2007**; 56(4):275-87.
- 72. Karayan-Tapon L, Quilien V, Guilhot J, Wager M, Fromont G, Saikali S, Etcheverry A, Hamlat A, Loussouarn D, Campion L, Campone M, Vallette FM, Gatas-Rabbia-Re C.** Prognostic value of O⁶-methylguanine- DNA methyltransferase status in glioblastoma patients, assessed by five different methods. *Journal of neuro-oncology* **2010**; 97(3):311-22.115.
- 73. Agarwala SS, Kirkwood JM.** Temozolomide, a novel alkylating agent with activity in the central nervous system, may improve the treatment of advanced metastatic melanoma. *The Oncologist* **2000**; 5:144-151.
- 74. Khan O, Middleton MR.** The therapeutic potential of O⁶-alkylguanine DNA alkyltransferase inhibitors. *Expert opinion on investigational drugs* **2007**;16(10):1573-84.
- 75. Robertsan T, Koszyca B, Gonzales M.** Overview and recent advances in neuropathology. Part 1: Central nervous system tumours. *Pathology* **2011**; 43(2), 88–92.
- 76. Clarke JW, Chang EL, Levin VA, Mayr NA, Hong E, Cavaliere R, Lo SS.** Optimizing radiotherapy schedules for elderly glioblastoma multiforme patients. *Expert review of anticancer therapy* **2008**; 8(5):733-41.
- 77. Pressur M.** MGMT analysis at DNA, RNA and protein levels in glioblastoma tissue. *Histology and histopathology* **2009**; 24(4):511-8.
- 78. Biswas T, Ramana CV, Srinivasan G, Boldogh I, Hazra TK., Chen Z, Tano K, Thomson EB, Mitra S.** Activation of human O⁶-methylguanine- DNA methyltransferase gene by glucocorticoid hormone. *Oncogene* **1999**; 18(2):525-32.
- 79. Horiguchi M, Kim J, Matsunaga N, Kaji H, Egawa T, Makino K, Koyanagi S, Ohdo S.** Glucocorticoid-dependent expression of O⁶(6)-methylguanine-DNA methyltransferase gene modulates dacarbazine-induced hepatotoxicity in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2010**; 333(3):782-7.
- 80. Verbeek B, Soutgate TD, Gilham DE, Margison GF.** O⁶-methylguanine- DNA methyltransferase inactivation and chemotherapy. *British Medical Bulletin* **2008**; 85:17-33.
- 81. Danam RP, Qian XC, Howell SR, Brent TP.** Methylation of selected CpGs in the human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase promoter region as a marker of gene silencing. *Molecular carcinogenesis* **1999**; 24(2):85-9.

- 82. Shah N, Lin B, Sibenaller Z, Ryken T, Lee H, Yoon JG, Rostad S, Foltz G.** Comprehensive Analysis of MGMT Promoter Methylation: Correlation with MGMT Expression and Clinical Response in GBM. *Plos one* **2011**; 6(11):16146-16157.
- 83. Kanugula S, Goodtzova K, Edara S, Pegg AE.** Alteration of arginine-128 to alanine abolishes the ability of human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase to repair methylated DNA but has no effect on its reaction with O6-benzylguanine. *Biochemistry* **1995**; 21:7113-9.
- 84. Dolan ME, Pegg AE.** O6-benzylguanine and its role in chemotherapy. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* **1997**; 3(6):837- 47.
- 85. Gross MW, Weber WA, Feldmann HJ, Bartenstein P, Schwaiger M, Molls M.** The value of F-18-fluorodeoxyglucose PET for the 3-D radiation treatment planning of malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **1998**; 5: 989-995.
- 86. Baer JC, Freeman AA, Newlands ES.** Depletion of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase correlates with potentiation of temozolomide and CCNU toxicity in human tumor cells. *Br J Cancer* **1993**; 67: 1299-302.
- 87. Levin VA, Leibel SA, Gutin PH.** Neoplasms of the central nervous system. In: DeVita VT Jr, Hellmar S, Rosenberg SA, eds: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 6th ed. Philadelphia, Pa: *Lippincott Williams & Wilkins* **2001**; 2100-60.
- 88. Omay SB, Vogelaum MA.** Current concepts and newer developments in the treatment of malignant gliomas. *Indian Journal of Cancer* **2009**; 46(2):88-95.
- 89. Kim L, Glantz M.** Chemotherapeutic options for primary brain tumors. *Current treatment options in oncology* **2006**; 7(6):467-78
- 90. Hirose Y, Berger MS, Pieper RO.** Abrogation of the Chk1-mediated G2 checkpoint pathway potentiates temozolomide-induced toxicity in a p53-independent manner in human glioblastoma cells. *Cancer Res* **2001**; 61: 5843-9.
- 91. Oh D, Prayson RA.** Evaluation of epithelial and keratin markers in glioblastoma multiforme. An immunohistochemical study. *Arch Pathol Lab Med.* **1999**;123:917–920.
- 92. Weingart J, Brem H.** *Brain Tumors and Cancers of the Central Nervous System.* Neiderhuber JE. Current Therapy. Fhrst ED., Decker: Mosby- Year Book Inc, **1993**; 538-546
- 93. Leibel SA, Scott CB, Loeffler JS.** Contemporary Approaches to the treatment of Malignant Gliomas With Radiation Therapy. *Seminars in Oncology* **1994**; 21 (2):198-21.
- 94. Byrne TN.** Imaging of gliomas. *Seminars in Oncology*, **1994**; 21(2): 162-171.
- 95. Kristiansen K, Hagen S, Kolleud T.** Combined modality therapy of operated astrocytomas grad 3 and 4 Confirmation of the value of postoperative multicenter trial of the Scandinavian Glioblastoma Study Group. *Cancer* 47: **1981**; 649-652.
- 96. Smith KA, Ashby LS, Gonzalez LF, Brachman DG, Thomas T, Coons SW, Battaglia M, Scheck A.** Prospective trial of gross-total resection with Gliadel wafers followed by early postoperative Gamma Knife radiosurgery and conformal fractionated radiotherapy as the initial treatment for patients with radiographically suspected, newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Journal of Neurosurgery, Supplement* **2008**; 109:106-17.
- 97. Stupp R, Hegi ME, Gilbert MR, Chakravarti A.** Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2007**;10;25(26):4127-36.

- 98. Kreth S, Thon N, Eigenbrod S, Lutz S, Ledderose C, Egensperger R, Tonn JC, Kretschmar HA, Hinske LC, Kreth FW.** O⁶-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) mRNA Expression Predicts Outcome in Malignant Glioma Independent of MGMT Promoter Methylation. *Plos One* **2011**; 18;6(2):e17156.
- 99. Bredel M.** Anticancer drug resistance in primary human brain tumors. *Brain research reviews* **2001**; 35(2):161-204.
- 100. Mitra S.** MGMT: a personal perspective. *DNA Repair* **2007**; 6(8):1064-70.
- 101. Watson AJ, Margison GP, Middleton MR.** A phase I trial of lomeguatrib and irinotecan in metastatic colorectal cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **2010**; 66(5):829-35.
- 102. Tubbs JL, Latypov V, Kanugula S, Butt A, Melikishvili M, Kraehenbuehl R and at al.** Flipping of alkylated DNA damage bridges base and nucleotide excision repair. *Nature*, **2009**; 459(7248):808-13
- 103. Cleomans M, Kelly J, Watson AJ, Howell A, Mcelhunny RS, Mcurry TB, Margison GP.** O⁶-(4-bromophenyl) guanine reverses temozolomide resistance in human breast tumour MCF-7 cells and xenografts. *British Journal of Cancer*, **2005**; 93(10):1152-6.
- 104. Caporaso P, Turriziani M, Venditti A, Marchesi F, Buccisano F and at al.** Novel role of triazines in haematological malignancies: pilot study of Temozolomide, Lomeguatrib and IL-2 in the chemoimmunotherapy of acute leukaemia. *DNA Repair* **2007**; 6(8):1179-86.
- 105. Cankovic M, Mikkelsen T, Rosenblum ML and Zarbo RJ.** A simplified laboratory validated assay for MGMT promoter hypermethylation analysis of glioma specimens from formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Laboratory Investigation* **2007**; 87, 392–397.
- 106. Kamiryö T, Tada K, Shiraishi S, Shinöjima N, Kochi M, Ushio Y.** Correlation between promoter hypermethylation of the O⁶-methylguanine-deoxyribonucleic acid methyltransferase gene and prognosis in patients with high-grade astrocytic tumors treated with surgery, radiotherapy, and 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea-based chemotherapy. *Neurosurgery* **2004**; 54(2):349-57.
- 107. Eroğlu C, Soyuer S, Yıldız OG, Özkan M.** Glioblastoma Multiforme’li Olgularda Postoperatif Radyoterapi ile Eş Zamanlı Temozolomide Adjuvan Temozolomid İlavlesinin Tedavi Sonuçlarına Katkısı. *UHOD* **2008**;2(18): 65-73.
- 108. Torp S H.** Diagnostic and prognostic role of Ki67 immunostaining in human astrocytomas using four different antibodies. *Clin Neuropathol* **2002**; 21(6): 252-57.
- 109. Bouvier-Labit C, Chinot O, Ochi C, Gambarelli D, Dufour H, Figarella-Branger D.** Prognostic significance of Ki67, p53 and epidermal growth factor receptor immunostaining in humanglioblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* **1998**; 24:381–88.
- 110. Kayaselçuk F, Zorludemir S, Gümürdülü D, Zeren H, Erman T.** PCNA and Ki-67 in central nervous system tumors: correlation with the histological type and grade. *Journal of Neuro-Oncology* **2002**; 57: 115-121.
- 111. Harris RC, Chung E, Coffey RJ.** EGFR receptor ligand. *Exp Cell Res* **2003**; 284:2-13
- 112. Etienne MC, Formento JL, Lebrun-Frenay C, Giovanni J, Chatel M at al.** Epidermal growth factor receptor and labeling index are independent prognostic factors in glial tumor outcome. *Clin Cancer Res.* **1998**;4(10):2383-90.
- 113. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikava T, Di Patre PL, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Yasuhiro, Yaşargil MG, Lütolf**

- UM, Kleihues P. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* **2004**; 1:6892-9.
- 114. Smith JS, Tachibana I, Passe SM, Huntley BK, Borell TJ, Iturria N, O'Fallon JR, Schaefer PL, Scheithauer BW, James CD, Buckner JC, Jenkins RB.** PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J. Natl Cancer Inst* **2001** Aug 15;93(16):1246-56.
- 115. Felsberg J, Rapp M, Loeser S, Fimmers R, Stummer W, Goepfert M, Steiger HJ, Friedensdorf B, Reifenberger G, Sabel MC.** Prognostic significance of molecular markers and extent of resection in primary glioblastoma patients. *Clin Cancer Res* **2009**; 21:6683-93.
- 116. Houillier C, Benouaich-Amiel A, Laigle-Donadey F.** Prognostic impact of molecular markers in a series of 220 primary glioblastomas. *Cancer* **2006**; 15;106(10): 2218-23.
- 117. Malley DS, Hamoudi RA, Kocialkowski S, Pearson DM, Collins VP, Ichimura K.** A distinct region of the MGMT CpG island critical for transcriptional regulation is preferentially methylated in glioblastoma cells and xenografts A distinct region of the MGMT CpG island critical for transcriptional regulation is preferentially methylated in glioblastoma cells and xenografts. *Acta Neuropathology.* **2011**; 121(5):651-61.
- 118. Kang SH, Park KJ, Kim CY, Yu M, Park CK, Park SH, Chung YG.** O6-methylguanine DNA methyltransferase status determined by promoter methylation and immunohistochemistry in gliosarcoma and their clinical implications. *J Neurooncol* **2011**; Feb;101(3):477-86.
- 119. Paz MF, Yaya-Tur R, Rojas-Marcos I, Reynes G, Pollan M and at al.** CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **2004**; 10(15):4933-8.
- 120. Hermisson M, Klumpp A, Wick W, Wischhusen J, Nagel G, Roos W, Kaina B, Weller M.** O6-Methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells. *Journal of Neurochemistry* **2006**; 96(3):766-76.
- 121. Roos WP, Batista LF, Naumann SC, Wick W, Weller M, Menck CF, Kaina B.** Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. *Oncogene* **2007**; 26(2):186-97.
- 122. Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, Mehta MP, Gilbert MR.** Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol* **2008**; 1;26(25):4189-99.
- 123. Dunn J, Baborie A, Alam F, Joyce K, Moxham M, Sibson R, Crooks D, Husband D, Shenoy A, Brodbelt A, Wong H, Liloglou T, Haylock B, Walker C.** Extent of MGMT promoter methylation correlates with outcome in glioblastomas given temozolomide and radiotherapy. *British journal of cancer* **2009**; 101(1):124-31.
- 124. Van Nifterik KA, Van Den Berg J, Van Der Meide WF, Ameziane N, Wedekind LE, Steenbergen RD, Leestra S, Lafleur MV, Slotman BJ, Stalpers LJ, Sminia P.** Absence of the MGMT protein as well as methylation of the MGMT promoter predict the sensitivity for temozolomide. *British journal of cancer* **2010**; 103(1):29-35.
- 125. Gorlia T, Van Den Bent MJ, Hegi ME, Mirimanoff RO, Weller M, Cairncross JG, Eisenhauer E, Belanger K, Brandes AA, Allgeier A, Lacombe D, Stupp R.** Nomograms for predicting survival of

patients with newly diagnosed glioblastoma: prognostic factor analysis of EORTC and NCIC trial 26981-22981/CE.3 *The Lancet Oncology* **2008**; 9(1): 29-8.

126. Watanabe T, Katayama Y, Komine C, Yoshino A, Ogino A, Ohta T, Fukushima T. O6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation and TP53 mutation in malignant astrocytomas and their relationships with clinical course. *Int J Cancer* **2005**; 10;113(4):581-7.

127. Middleton MR, Thatcher N, Mcmurry TB, Mcelhinney RS, Donnelly DJ, Margison GP. Effect of O6-(4-bromothienyl)guanine on different temozolomide schedules in a human melanoma xenograft model. *International journal of cancer* **2002**;100(5):615-7.

128. Watson AJ, Sabaharwal A, Thorncroft M, Mcgown G, Kerr R, Bojanic S, Soonawalla Z, King A, Miller A, Waller S, Leung H, Margison GP, Middleton MR. Tumor O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase inactivation by oral lomeguatrib. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2010**; 16(2):743-9.

129. Srivenugopal KS, Shou J, Mullapudi SR, Lang FF JR, Rao JS, Aliosman F. Enforced expression of wild-type p53 curtails the transcription of the O(6)- methylguanine-DNA methyltransferase gene in human tumor cells and enhances their sensitivity to alkylating agents. *Clinical cancer research : an official journal of the American Associationfor Cancer Research* **2001**7(5):1398-409.

130. Grombacher T, Eichhorn U, Kaina B. p53 is involved in regulation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) by DNA damagingagents. *Oncogene* **1998**; 17(7):845-51.

131. Rolhion C, Penault-Llorca F, Kemeny JL, Kwiatkowski F, Lemaire JJ, Chollet P, Finat-Duclos F, Verrelle P. O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase gene (MGMT) expression in human glioblastomas in relation to patient characteristics and p53 accumulation. *International journal of cancer* **1999**; 84(4):416-20.

132. Osanai T, Takagi Y, Toriya Y, Nakagawa T, Aruga T, Iida S, Uetake H, Sugihara K. Inverse correlation between the expression of O6-methylguanine-DNA methyl transferase (MGMT) and p53 in breast cancer. *Japanese journal of clinical oncology* **2005**; 35(3):121-5.

133. Crinière E, Kaloshi G, Laigle-Donadey F, Lejeune J, Auger N, Benouaich-Amiel A, Everhard S, Mokhtari K, Polivka M, Delattre JY, Hoang-Xuan K, Thillet J, Sanson M. MGMT prognostic impact on glioblastoma is dependent on therapeutic modalities *J Neurooncol* **2007**; Jun;83(2):173-9.

134. Mut M, Turba UC, Botella AC, Baskurt E, Lopes MB, Shaffrey ME. Neuroimaging characteristics in subgroup of GBMs with p53 overexpression. *J Neuroimaging* **2007**;17(2):168-74.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Fatma BAYRAM
Doğum Tarihi : 05.12.1976
Medeni Durumu : Evli
Adres : Toros Mahallesi 78153 Sokak Mesut Apartmanı
B Blok No:16
Çukurova/ ADANA

E- posta : drfatmabayram@gmail.com
Mezun Olduğu Tıp Fakültesi : Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Görev Yerleri : Gündoğdu Sağlık Ocağı Bucak/BURDUR
Burdur 1 Nolu Sağlık Ocağı BURDUR
Elmalı 1 Nolu Sağlık Ocağı Elmalı/ ANTALYA
Elmalı Devlet Hastanesi Elmalı/ANTALYA

Yabancı Dil : İngilizce

Ek 1: Olguların PCR Sonuçlarına Göre Listesi

No	Biopsi No	PCR No	MGMT Sonuç	
			UMGMT	M MGMT
1	B12378-11	PCR205-11	+	+
2	B3808-11	PCR210-11	+	-
3	B1427-11	PCR211-11	+	-
4	B7989-11	PCR212-11	+	+
5	B27370-10	PCR213-11	+	+
6	B7804-11	PCR214-11	+	+
7	B6839-11	PCR215-11	-	+
8	B27893-10	PCR216-11	+	-
9	B21987-10	PCR217-11	+	-
10	B18635-10	PCR218-11	+	+
11	B4322-11	PCR219-11	+	+
12	B14382-10	PCR220-11	+	-
13	B20670-10	PCR221-11	+	+
14	B19669-10	PCR223-11	+	-
15	B15012-10	PCR224-11	+	-
16	B19599-10	PCR225-11	+	-
17	B6594-11	PCR226-11	-	+
18	B1881-11	PCR227-11	+	-
19	B705-11	PCR228-11	-	+
20	B8975-11	PCR229-11	+	-
21	B12876-11	PCR230-11	+	-
22	B5378-10	PCR231-11	+	-
23	B13006-10	PCR232-11	+	+
24	B4241-10	PCR233-11	+	+
25	B2706-10	PCR234-11	-	+
26	B2114-10	PCR235-11	-	+
27	B8531-09	PCR236-11	+	-
28	B24820-09	PCR237-11	+	+
29	B15150-09	PCR238-11	-	+
30	B21833-09	PCR239-11	+	-
31	B4555-09	PCR240-11	-	+
32	B21000-09	PCR241-11	+	-
33	B24628-09	PCR242-11	+	-
34	B25577-091	PCR243-11	-	+
35	B19119-09	PCR244-11	-	+
36	B20874-09	PCR245-11	+	-
37	B7228-09	PCR246-11	-	+
38	B14460-09	PCR247-11	-	+
39	B15640-09	PCR248-11	+	-
40	B12008-09	PCR249-11	-	+
41	B12076-10	PCR251-11	+	-
42	B10411-10	PCR252-11	-	+
43	B19586-09	PCR254-11	+	+
44	B11908-11	PCR255-11	+	+
45	B3781-09	PCR256-11	-	+
46	B21047-08	PCR257-11	+	-
47	B19594-08	PCR258-11	-	+
48	B14129-11	PCR259-11	+	-
49	B26390-08	PCR260-11	-	+
50	B6658-08	PCR265-11	+	-
51	B20748-08	PCR266-11	-	+
52	B6313-08	PCR267-11	+	+
53	B6064-08	PCR268-11	-	+
54	B7305-08	PCR269-11	-	+
55	B4589-08	PCR270-11	+	-

