

88275

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**ASTROSİTOMLARDA Nm23 PROTEİN
EKSPRESYONU**

UZMANLIK TEZİ

T 88275

Dr. Mustafa BAKIRTAŞ

SAMSUN-1999

T.C. YATIRIM MENKUL DEĞERLER A.Ş. KURULU
DOKÜMANTASYON MENKUL DEĞERLER

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ASTROSİTOMLARDA Nm23 PROTEİN
EKSPRESYONU**

UZMANLIK TEZİ

T 88275

Dr. Mustafa BAKIRTAŞ

**Danışman:
Doç. Dr. Y. Sancar Barış**

SAMSUN-1999

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
• GİRİŞ VE AMAÇ	1
• GENEL BİLGİLER	1
• MATERYAL VE METOD	7
• BULGULAR	8
• TARTIŞMA	18
• SONUÇLAR	22
• ÖZET	23
• KAYNAKLAR	24

GİRİŞ VE AMAÇ

Santral sinir sistemi primer tümörlerinin % 80'ini oluşturan astrositomların nadiren metastaz yaptıkları bilinmektedir^(1,2,3). Tümör hücrelerinin metastaz yapabilmeleri için bu hücrelerin aktif olarak hareket edebilme, adezyon moleküllerini eksprese edebilme ve ekstrasellüler matriksi yıkabilme gibi özelliklere sahip olmaları gerekmektedir⁽⁴⁾.

Bilindiği gibi metastatik süreç ikiye ayrılır:

1) Ekstrasellüler matriksin invazyonu

2) Tümör hücrelerinin vasküler yayılımı ve primer tümörle organik olarak devamlılığı bulunmayan uzak dokulara yerleşimi.

Astrositomların histolojik grade'i yükseldikçe daha çok vaskülarizasyon gösterdiği, çevre glial dokuya daha hızlı infiltre olduğu yani ekstrasellüler matriks invazyonu gösterdiği ve hastanın prognozunu kötüleştirdiği bilinmektedir. Nadir metastaz oluşturmalarının nedenlerinden biri astrositomların metastaz için gerekli olan vasküler invazyon gerçekleşmeden erken dönemde hastanın hayati merkezlerini invazyona uğratarak hastayı ölüme götürmesi, bir diğer neden de santral sinir sisteminin lenfatik sistem içermemesidir^(4,5).

Nm23 geni 1988 yılında ilk olarak sıçanların melanom hücre kültürlerinde tanımlanmıştır⁽⁶⁾. Nm23 gen ürünü proteinin pekçok tümörde metastatik potansiyeli azalttığı bu nedenle insanlarda antimetastaz geni olabileceği öne sürülmüştür^(7,8,9,10).

Her ne kadar metastaz yapmasa da astrositomların grade'i yükseldikçe metastatik süreçte ilk aşama olan ekstrasellüler matriksi invaze etme yeteneğinin arttığı ve hastayı hızla ölüme götürdüğü bilinmektedir.

Bu nedenle yaptığımız çalışmada nadiren metastaz yaptığı bilinen astrositomlarda metastazın az olmasında katkısı olabilecek pekçok parametreden biri olabileceği düşüncesiyle bu tümörlerde nm23 protein ekspresyonuna bakıldı.

GENEL BİLGİLER

NORMAL ANATOMİ VE HİSTOLOJİ

Santral sinir sisteminin sellüler kısmını oluşturan temel elemanlar nöronlar, glial hücreler, meninksler ve kan damarlarıdır⁽⁴⁾. Glial elemanlar arasında yer alan astrositler,

yıldızimsı tarzda gelişmiş çok sayıda uzantılara sahip santral sinir sisteminin temel stromal elemanları olup, kan beyin bariyeri oluşumunda ve reaktif olaylarda görev alırlar⁽¹¹⁾.

Astrositler temel olarak fibriler ve protoplazmik olarak ikiye ayrılırlar. Fibriler astrositler beyaz cevherde, protoplazmik olanlar ise gri cevherde yoğunlaşırlar. Ayrıca serebellumda periventriküler alanlarda ve spinal kordda bulunan diğer bir alt tip de pilositik astrositlerdir. Serebellar korteksin Purkinje nöronlarının gövdeleri arasında yer alan Bergman astrositlerinin uzantıları embryonel gelişim sırasında nöronlarla astrositler arasındaki iletişimi sağlarlar⁽¹²⁾.

Astrositler aynı zamanda zedelenmeye karşı hiperplazi ve hipertrofiye olarak yanıt verirler. Bu sürece gliosis denir⁽⁴⁾. Pilositik astrositler normalde belirgin olmamalarına karşın gliosis sırasında belirginleşir ve Rosenthal fibrillerini oluştururlar. Rosenthal fibrilleri belirgin, eozinofilik, uzamış, girintili çıkıntılı yapılardır ve juvenil pilositik astrositomların karakteristik özelliğidir⁽¹²⁾.

Astrositlerin uzantıları, gümüşleme boyaları ve immünohistokimyasal olarak Glial Fibriller Acidic Protein (GFAP) ile pozitif reaksiyon verir⁽⁴⁾.

ASTROSİTOMLAR

Astrositomların indifferansiye glial prekürsör hücrelerden köken aldıkları ve matürasyon arresti derecesine göre farklı biyolojik davranış gösteren morfolojik varyantların oluştuğu öne sürülmektedir⁽¹³⁾. Astrositomlar mikroskopik görünümüne ve biyolojik davranışlarına göre çeşitli gruplara ayrılırlar. Astrositomların sınıflaması günümüzde de tartışma konusu olmaya devam etmektedir. Halen geniş kabul gören WHO'nun 1993'teki sınıflamasına göre astroglial tümörler başlığı altında astrositomlar, hakim hücre morfolojisine göre fibriler, protoplazmik, pilositik, pleomorfik ksantoastrositom ve subependimal dev hücreli astrositom olarak incelenmektedir⁽¹⁴⁾.

Astrositomlarda henüz tam olarak kabul görmüş üniform bir grade ve stage'lendirme sistemi oluşmamıştır⁽¹⁾. Yine WHO kriterlerine göre astrositomlar üçlü grade'lendirme sistemi kullanılarak astrositomlar, anaplastik astrositomlar ve glioblastoma multiforme olarak sınıflandırılmaktadır⁽²⁾.

Ancak WHO'ya alternatif olarak sunulan Daumas-Duport ve arkadaşları tarafından tanımlanan sınıflamada astrositomlar, nükleer atipi (hiperkromazi, şekil ve

büyüklik farkı), mitotik figürler, vasküler endotelyal proliferasyon ve koagülasyon nekrozu varlığı veya yokluğu açısından değerlendirilerek dört grade'e ayrılmıştır. Eğer yukarıda tanımlanan kriterlerden hiçbiri yoksa tümör grade I, biri varsa grade II, ikisi varsa grade III ve üç tanesi varsa grade IV olarak tanımlanmaktadır⁽¹⁵⁾.

Astrositomlar santral sinir sisteminin primer tümörlerinin %80'ini oluşturur ve erişkinlerde en çok supratentoriyal, çocuklarda ise infratentoriyal yerleşim gösterir^(2,4,16).

Astrositomlar makroskopik olarak glial dokuda diffüz genişleme, sertleşme ve gri cevher-beyaz cevher ayırımında kaybolma ile kendini gösterir. Bazan miksoid dejenerasyona bağlı olarak mukoid bir görünüm alabilirler⁽²⁾.

Astrositomlar histolojik olarak değişik yoğunlukta astrositik uzantılardan oluşan bir zeminde neoplastik astrosit çekirdeklerinden oluşur. Bu zemin, onlara genellikle fibriler bir görünüm verir^(2,4).

Dörtlü grade'lendirme sistemine göre grade I astrositomlar sellülaritede artım; grade II astrositomlar ise nükleer pleomorfizm gösterir. Tümör hücrelerinin bir kısmı uzantılı belirgin sitoplazmalı iken bir kısmı fibriler bir ağ içinde belirsiz sitoplazmaları ile sadece gömülmüş bir çekirdek görüntüsü verirler. Ultrastruktürel olarak sitoplazmik uzantılar 7-11 nm'lik GFAP ve Vimentin'den oluşan intermediate filament'lerden meydana gelir⁽¹⁷⁾. Çekirdekler tipik olarak oval yumuşak konturludur, belirgin çekirdekçik içermezler; sıklıkla veziküler bazan da hiperkromatikler⁽²⁾.

Grade III (anaplastik) astrositomlarda histolojik olarak artmış nükleer anaplazi ve mitoz dikkati çeker. Çekirdeklerde genellikle açılanma, yoğun bir hiperkromazinin yanısıra belirgin şekil, büyüklük ve boyanma farklılıkları dikkati çeker. Grade IV (glioblastoma multiforme) astrositomlar oldukça sellüler, pleomorfik ve mitozdan zengindir. Diferansiye elemanlarla birlikte acayip şekilli çok çekirdekli tümör dev hücreleri yanısıra anaplastik hücreler biraradadır. Grade IV astrositomların pekçoğunda mitojen üretimine bağlı olarak glomeruloid yapılar halinde vasküler endotelyal proliferasyon görülür. Ayrıca WHO kriterlerine göre fokal tümör koagülasyon nekroz alanları çevresinde tümör hücrelerinin palizatlaşarak yer alması tipiktir^(1,2,4).

Nm23

Nm23 cDNA'sı ilk kez Steeg ve arkadaşları tarafından yapılan deneysel bir çalışmada sıçanlarda değişik derecelerde metastatik potansiyele sahip K-1735 melanom hücre kültürlerinde tanımlanmıştır. Yapılan bu çalışmada K-1735 melanom hücre serileri ve fare meme karsinom hücre serilerinden düşük metastatik potansiyele sahip olanlarda nm23 RNA düzeylerinin en yüksek düzeylerde olduğu gösterilmiştir⁽⁶⁾. Nm23'ün dokuların normal gelişim ve farklılaşma sürecinde rol oynadığını gösteren yayınlar vardır. Nm23, *Drosophila*'lardaki abnormal wing discs (awd) geni ile %77 özdeşir ve nm23'ün kodladığı amino asit awd geninin kodladığı amino asit ile %96 oranında uygunluk gösterir. Awd geninde oluşan bir mutasyon malign gelişimle benzer olan aberan diferansiyasyon, nekroz ve anormal doku morfolojisine yol açmaktadır⁽¹⁸⁾. İlginç bir bulgu da awd geninin beyin, over gibi erişkin dokuların hücre morfolojisi ve farklılaşmasını düzenlemesidir⁽¹⁹⁾.

Bundan başka gelişim sürecinde olan mürin dokularındaki nm23 ekspresyonu ile farklılaşma süreci arasında korelasyon saptanmıştır. Örneğin organogenesisin ilk safhalarında beyin, kalp ve tüm embryonik epitelyal dokularda artmış nm23 protein düzeyleri bulunmuştur. Nm23 protein ekspresyonunun erişkin yaşamı boyunca intestinal epitel hariç pekçok dokuda belli düzeylerde korunduğu öne sürülmüştür⁽²⁰⁾. Ayrıca insan nm23 geninin *Disctyostelium discoideum* adlı amipte bulunan Gip 17 geni ile homolog olduğu ileri sürülmüştür⁽²¹⁾. Gip 17 gen mRNA'sı büyüyen hücrelerde en yüksek düzeylere ulaşmakta ve gelişim süresince yüksek kalmaktadır. Gip17 geninin kodladığı proteinin nükleozid difosfat kinaz (NDPK) ile aynı aktiviteyi gösterdiği izlenmiştir. Nm23 proteinleri de in vitro olarak nükleozid difosfat kinaz aktivitesi gösterirler. NDPK'in Guanosin Difosfat'ın (GDP) fosforillenerek Guanosin Trifosfat'a dönüşümünü sağladığı ve böylece GTP-bağlayıcı protein kompleksleri oluşumuna yolaçarak sonuçta hücrelerin gelişimi, büyüme kontrolü ve onkojenik dönüşümünde rol oynadığı düşünülmektedir^(4,21).

Nm23 enzimatik ve DNA bağlama yetenekleri olan çok fonksiyonlu bir proteindir. Nm23 RNA düzeyleri yüksek derecede metastaz yeteneğine sahip rodent hücre serilerinde belirgin olarak düşmektedir⁽¹⁸⁾.

İnsanda 17q21 lokalizasyonunda nm23 genine benzeyen NME1 ve NME2 genleri bulunur⁽²²⁾. İki sıçan (nm23-1 ve nm23-2) iki de insan (nm23-H1 ve nm23-H2) nm23

geni tanımlanmıştır ve bunların her biri %90 identik olan 17 kDa'lık bir protein olan NDPK ekspres ederler⁽²³⁾.

Nm23'ün metastazı düzenleme mekanizması halen tartışma konusu olmaya devam etmektedir ve henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Bu hipotezlerden biri nm23'ün in vitro olarak nükleozid difosfat kinaz aktivitesi göstermesiyle ilgilidir. Nükleozid difosfat kinazın nükleozid trifosfat havuzunun sürekliliğini ve bu sayede heterotrimerik G proteinlerin aktivasyonunu ve mikrotübüllerin biraraya gelmesini sağladığı ileri sürülmüştür. Ancak bu fonksiyonlardan hangisinin nm23'e atfedildiği halen tartışma konusu olmaya devam etmektedir⁽²⁴⁾. Mikrotübüller tübülün moleküllerinden oluşan sağlam polimerlerdir. Mikrotübüllerin fonksiyonlarından biri sitoplazmada organellerin hareketidir⁽²⁵⁾. Bu noktada nm23 protein kaybının mikrotübül polimerizasyonunda bozulmaya ve sonuçta protein, nükleik asit, polisakkarit ve lipidlerin sentezinde eksikliklere yol açtığı ileri sürülmüştür⁽²⁶⁾.

Bir diğer hipotez nükleozid difosfat kinaz aktivitesinden bağımsız olarak nm23'ün serin otoposforilasyon aktivitesinin metastatik potansiyeli inhibe ettiğinin ileri sürülmesidir. MacDonald ve arkadaşlarının yaptığı deneysel bir çalışmada nm23 serin fosforilasyonu, nm23 ekspresyonu ile korelasyon göstermiş ve kontrol gruplarına göre mürin melanom hücre serilerinin metastatik potansiyelinde azalma tespit edilmiştir⁽²⁷⁾.

Bazı çalışmalarda nm23 ekspresyonunun sinyal transdüksiyonunda rol aldığı bunun sonucunda hücre proliferasyonunu arttırdığı ve mitoz sürecini sağladığı ileri sürülmüştür^(28,29). Russell ve arkadaşlarının çalışmasında normal prostat, prostatik intraepitelyal hiperplazi (PIN) ve prostat adenokarsinomlarında nm23 ekspresyonuna bakılmış. Yapılan çalışmada 28 radikal prostatektomi spesimeninde normal glandüler epitelde zayıf veya orta derecede nm23 boyanması olurken 19 PIN olgusunda, 39 lokalize prostat adenokarsinomunda ve 7 metastatik prostat adenokarsinomunda güçlü nm23 boyanması gerçekleşmiştir⁽³⁰⁾.

Başka bir görüşe göre nm23 gen bölgesinin purin bağlayan faktöre (PuF) benzer bir protein ekspresyonundan sorumlu olduğu ileri sürülmüştür. PuF'nin ise C-myc gen transkripsiyonunu başlattığı ve bu nedenle nm23'ün metastaz dışında hücre proliferasyonu ile de ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Fakat bu görüşler daha çok nm23-H2 için geçerlidir⁽³¹⁾.

Nm23 proteinleri daha çok sitoplazmada bulunmalarına karşın nükleus ve sitoplazma membranında da saptanmışlardır^(18,22).

Bertheau ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 78 malign tümör, 13 adenom ve 10 benign olgudan oluşan toplam 101 tiroid dokusunda nm23'le sitoplazmik, membranöz ve çekirdek boyanmasına bakılmıştır. Burada olguların büyük çoğunluğunda (benign ve malign) ve normal dokularda sitoplazmik boyanma saptanmış ancak histolojik tip ve klinik gidişle sitoplazmik boyanma arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Buna karşın çekirdek boyanması normal dokuların %93'ünde pozitif iken primer tiroid karsinomlarının ancak %29'unda pozitif bulunmuş. Sonuç olarak dokularda çekirdekte nm23 pozitifliğinin tiroid tümörlerinin değerlendirilmesinde ve prognozunda kullanılabilir bir belirleyici olduğu sonucuna varılmıştır⁽³²⁾.

Bevilacqua ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 27 primer infiltratif duktal meme karsinomunda nm23 RNA düzeylerine bakılmış. Burada nm23 ekspresyonu ile lenf nodu metastazı, tümör grade'i ve östrojen reseptör durumunun ilişkisi araştırılmış. Lenf nodu metastazı olmayan olguların %75'i yüksek %25'i düşük nm23 RNA düzeylerine sahip bulunmuş. Düşük nm23 ekspresyonu yapan grubun grade'i daha yüksek ve östrojen reseptörleri negatif iken yüksek nm23 ekspresyonu yapan grupta olguların hiçbiri yüksek grade'li ve östrojen reseptörü negatif bulunmamış. Ayrıca düşük nm23 düzeyleri olan olgulardan %18'inde 16 aylık takipler sonucu lenf nodu metastazı gelişirken yüksek nm23 düzeyleri olan grupta metastaz gelişmemiştir⁽³³⁾.

Buna karşın nm23 ekspresyonunun metastaz yapan nöroblastomlarda ve Ewing sarkomları gibi tümörlerde arttığı da rapor edilmiştir^(34,35). Keim ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada nöroblastomlarda yüksek nm23 düzeyleri ile büyük tümör kitlesi, metastaz, ilerlemiş stage ve N-myc onkogen ekspresyon artımı arasında anlamlı ilişki bulunmuştur⁽³⁶⁾.

Her ne kadar nm23'ün antimetastatik gen olduğu ileri sürülse de metastazı engellemesindeki mekanizmalar günümüzde kesin olarak açıklığa kavuşturulamamıştır.

MATERYAL VE METOD

19 Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden 1994-1999 yılları arası taranarak saptanan astrositom tanısı almış 55 adet beyin biyopsi materyali çalışmaya alındı.

Olguların H&E kesitleri yeniden gözden geçirilerek, Daumas-Duport ve arkadaşları tarafından tanımlanan prognostik önem taşıdığı kabul edilen dört morfolojik kriterin; anaplazi, mitoz, endotelial vasküler proliferasyon ve nekrozun varlığı ve yokluğuna göre değerlendirilmesi sonucu grade'lendirildi ^(15,37).

Olgulara ait dokular 24 saatlik tamponlu nötral formalinde tespit edildi ve rutin doku takip işleminden geçirilerek parafin blokları hazırlandı. Uygun bulunan doku örneklerinden seçilenlerin 5 µm'lik kesitlerine, nm23 (Nucleoside Diphosphate Kinase A, Clone 37.6) (Biogenex Laboratories San Ramon, CA 94583, USA) antikoru ile streptavidin biotin peroksidaz yöntemi (Biogenex Laboratories San Ramon, CA, USA) uygulanarak immünohistokimyasal çalışma yapıldı. Bu işlem için deparafinize ve rehidrate edilen kesitlerin endojen peroksidaz aktivitesi %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda 10 dakika inkübe edilerek giderildi. 20 dakika süre ile tavşan normal serumundan oluşan non-spesifik protein bloke edici ajan uygulandı. Sonra kesitler, primer antikor ile 30 dakika ve biotinli anti-immünglobülin ve streptavidin-peroksidase konjugat ile 20'er dakika inkübe edildi.

Renklendirici ajan olarak 3,3'-diaminobenzidin(DAB) içeren kit (Biogenex , San Ramon, USA) kullanıldı. Son olarak Mayer hematoksilin ile kesitler 60 saniye süreyle boyandı. Protein bloke edici ajan aşaması hariç diğer tüm aşamalarda kesitler pH 7.6 fosfat tamponu ile yıkandı. İşlemler oda ısısında gerçekleştirildi.

Diğer taraftan tümöral dokular haricinde akciğer embolisinden ölen bir hastanın otopsisinden elde edilen normal beyin dokusu kesitlerine de kontrol amaçlı olarak aynı immünohistokimyasal yöntemler uygulandı.

İmmünohistokimyasal işlem uygulanan tüm camlar Nikon Optiphot-2 (1 HPF= 0.125mm²) ışık mikroskobu kullanılarak 10x objektif ve 10x oküler büyütmede tarandı ve 40x objektif 10x oküler büyütmede tüm sahalar incelendi.

Olgular değerlendirilirken tümör hücrelerinin sitoplazmik (sitoplazma membranı ve sitoplazmik matriks) ve çekirdek (perikaryal ve nükleer matriks) boyanmaları,

tümörde vasküler yapıların endotellerinin boyanmaları değerlendirildi. Tümöral hücrelerde sitoplazmik ve çekirdek boyanması: hücrelerin %1-25'inde varsa (+), %26-50'sinde varsa (++) , %51-75'inde varsa (+++), %75-100'ünde varsa (++++), hiç boyanma yoksa (-) olarak skorlandı. Vasküler yapılardaki boyanma ise herhangi bir alanda boyanma varsa (+) hiç boyanma yoksa (-) olarak değerlendirildi. Olgular grade 'lerine göre gruplandırıldı ve nm23'le boyanma dereceleri ile histolojik grade arasındaki ilişki istatistiksel olarak X^2 (Ki-kare) testi uygulanarak değerlendirildi. Tümörle infiltre glial doku içeren olgularda infiltrasyon alanlarında tümöral hücrelerde nm23 için boyanma paternine (çekirdek ve sitoplazma) bakıldı. Ayrıca tümöre komşu normal glial alanlardaki nm23'le boyanma paterni kontrol beyin dokusunun boyanma paterni ile karşılaştırıldı.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 55 olgunun 32'si (%58.2) erkek, 23'ü (%31.8) kadındı. Astrositom tanısı alan bu olguların yaşları 4-84 arasında değişiyordu. Yaş ortalaması tüm olgular için 38.09 ± 2.63 idi. Olgulara ait cerrahi spesimenler eksizyonel biyopsi materyalleriydi.

Daumas-Duport'un grade'lendirme sistemine göre gruplandırıldığında olguların 10'u (%18.2) grade I, 17'si (%30.9) grade II, 12'si (%21.8) grade III ve 16'sı (%29.1) grade IV olarak değerlendirildi.

Gruplar baz alındığında yaş ortalamaları: Grade I grubunda 30.70 ± 8.80 , grade II grubunda 30.59 ± 3.58 , grade III grubunda 38.92 ± 4.45 ve grade IV grubunda 50.60 ± 3.93 idi (Tablo 1).

Gruplar	Grade I	Grade II	Grade III	Grade IV
Olgu Sayısı	10 (%18.2)	17 (%30.9)	12 (%21.8)	16 (%29.1)
Yaş ortalaması	30.70 ± 8.80	30.59 ± 3.58	38.92 ± 4.45	50.60 ± 3.93

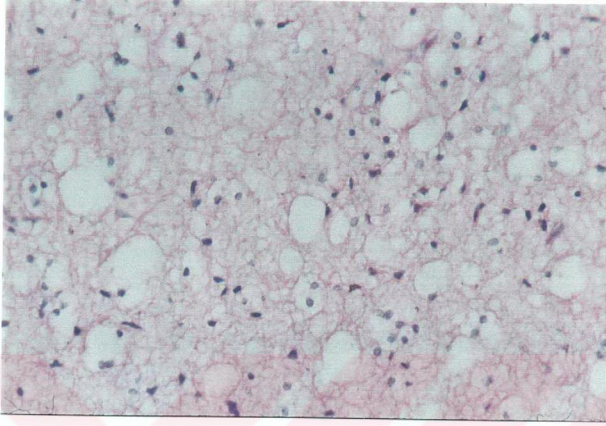
Tablo 1: Olguların Grade'lere Göre Yaş Ortalamaları ve Sayısal Dağılımı.

Olguların sitoplazmik boyanma paterni ile grade'leri arasındaki ilişkiye bakıldığında grade I olan 10 olgudan 4'ünde (%40) hiç boyanma olmazken 3'ünde (%30) (+); 3'ünde (%30) (++) boyanma saptandı. Grade I grubunda (+++) sitoplazmik boyanma mevcut değildi (Resim 1,2). Grade II olan 17 olgudan 3'ünde (%17.7) hiç boyanma olmazken 8'inde (%47) (+), 4'ünde (%23.5) (++) , 2'sinde (%11.8) (+++) boyanma saptandı (Resim 3,4). Grade III olan 12 olgudan 4'ünde (%33.3) (+), 6'sında (%50) (++) , 2'sinde (%16.7) (+++) boyanma saptandı (Resim 5,6). Grade IV olan 16 olgudan 2'sinde (%12.5) hiç boyanma olmazken 7'sinde (%43.75) (+), 7'sinde (%43.75) (++) boyanma saptandı (Resim 7,8). Olguların hiçbirinde (++++) boyanma saptanmadı. Elde edilen bu bulgular ışığında Ki-kare testi uygulanarak yapılan değerlendirmede histolojik grade ile sitoplazmik nm23 boyanma dereceleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı ($X^2=11.74$, $p>0.05$). Ancak grade gözönüne alınmadan yapılan değerlendirmede toplam 55 olgudan 9'unda (%16.4) nm23'le sitoplazmik boyanma olmazken 46'sında (%83.6) boyanma saptanmıştır. Ayrıca grade I grubunda olguların %40'ında boyanma olmaz %60'ında boyanma olurken grade IV grubunda olguların %12.5'da boyanma olmamış %87.5'inde boyanma gerçekleşmiştir. Grade I ve II ile grade III ve IV grupları yansıma (-) ve (+) boyanma paterni ile (++) ve (+++) boyanma paterni birleştirilerek istatistiksel çalışma tekrarlandığında da yine gruplar arası farkın anlamlı olmadığı görüldü ($p>0.05$). Olguların nm23'le sitoplazmik boyanma dereceleri ile histolojik grade'leri tablo 2'de gösterildi.

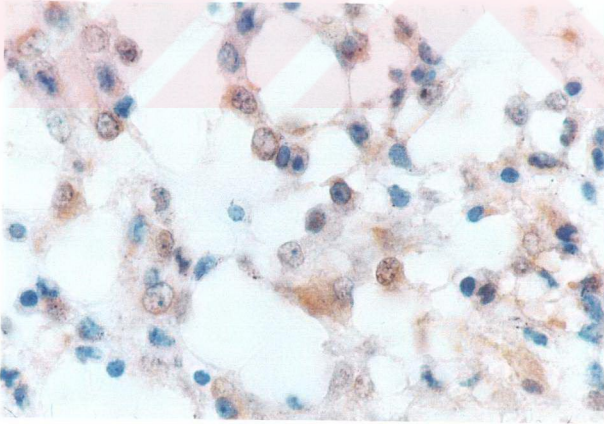
Nm23 ile Sitoplazmik Boyanma Dereceleri						
Gruplar	(-)	(+)	(++)	(+++)	(++++)	Toplam
Grade I	4	3	3	0	0	10
Grade II	3	8	4	2	0	17
Grade III	0	4	6	2	0	12
Grade IV	2	7	7	0	0	16
Toplam	9	22	20	4	0	55

Tablo 2. Olguların Nm23 ile Sitoplazmik Boyanma Derecelerine Göre Dağılımları.

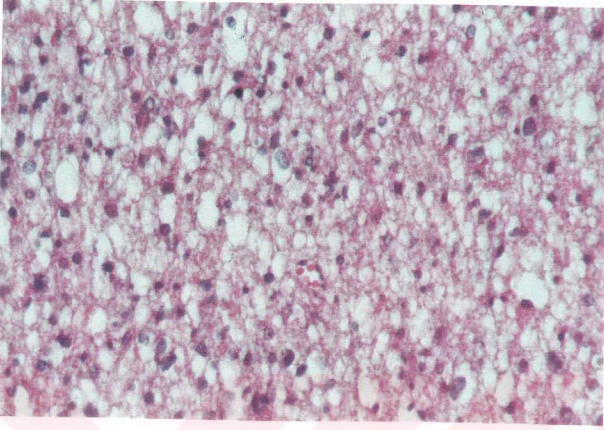
($X^2=11.74$, $p>0.05$)



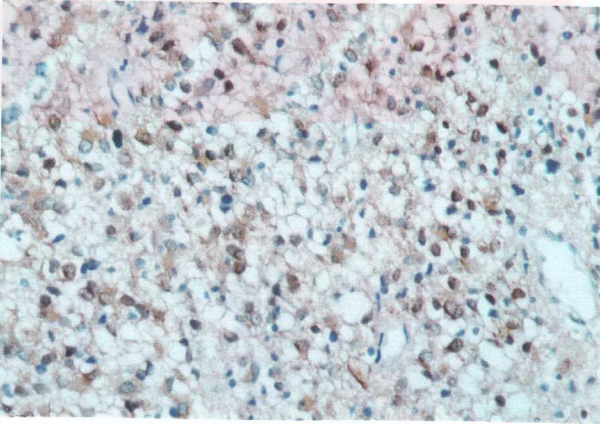
Resim-1: Grade I astrozitomda sellülaritede artım (H&E, x400).



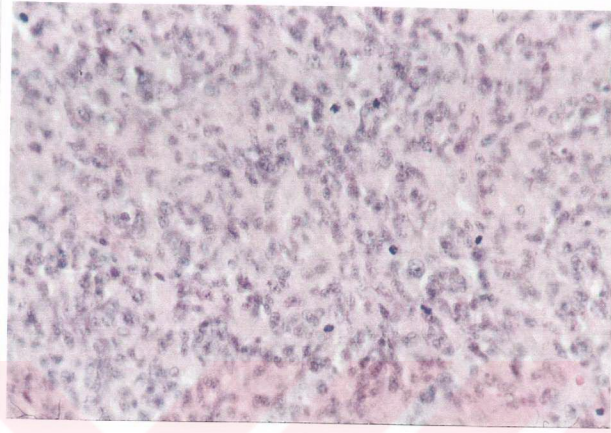
Resim-2: Grade I astrozitomda çekirdek için (++) sitoplazma için (++) nm23 immün reaksiyonu (B-SA, DAB, x1000).



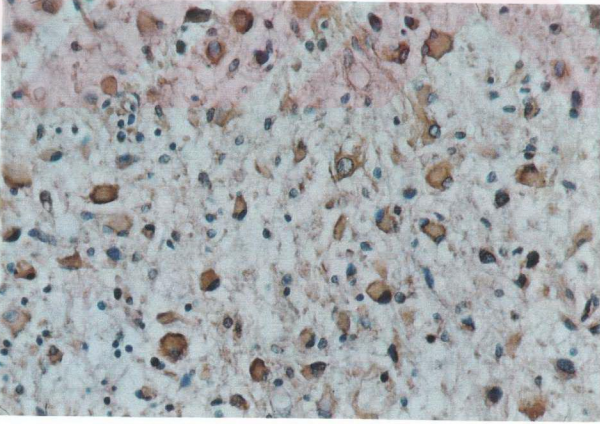
Resim-3: Grade II astrositomda nükleer pleomorfizm (H&E, x400).



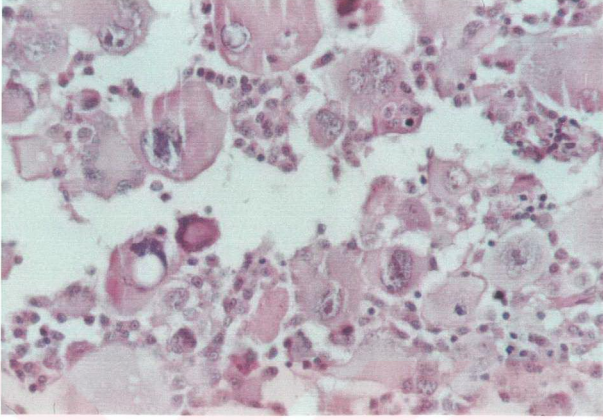
Resim-4: Grade II astrositomda ekirdek iin (++) sitoplazma iin (+++) nm23 immün reaksiyonu (B-SA, DAB, x400).



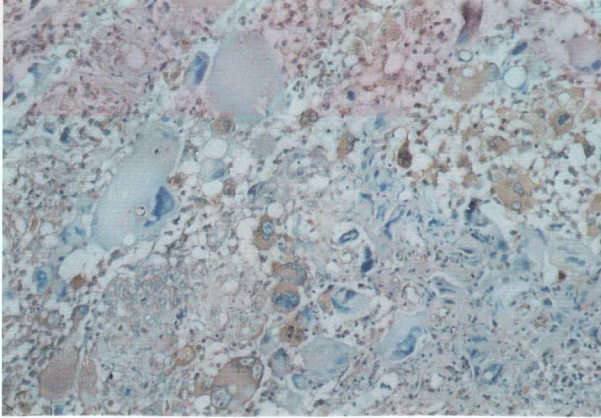
Resim-5: Grade III astrositomda atipik mitotik figürler (H&E, x400).



Resim-6: Grade III astrositomda sitoplazma için (+++) nm23 immün reaksiyonu (B-SA, DAB, x400).



Resim-7: Grade IV astrositomda acayip şekilli tümör dev hücreleri ve anaplastik hücreler (H&E, x400).



Resim-8: Grade IV astrositomda çekirdek için (+) sitoplazma için (++) nm23 immün reaksiyonu (B-SA, DAB, x200).

Olguların nm23 ile çekirdek boyanması açısından grade'le ilişkisine bakıldığında grade I olan 10 olgudan 5'inde (%50) hiç boyanma olmazken 3'ünde (%30) (+); 2'sinde (%20) (++) boyanma saptandı. Grade I grubunda (+++) sitoplazmik boyanma mevcut değildi. Grade II olan 17 olgudan 3'ünde (%17.7) hiç boyanma olmazken 4'ünde (%23.5) (+), 3'ünde (%17.7) (++) ve 7'sinde (%41.1) (+++) boyanma saptandı. Grade III olan 12 olgudan 4'ünde (%33.3) hiç boyanma olmazken 2'sinde (%16.7) (+), 5'inde (%41.7) (++) ve 1'inde (%8.3) (+++) boyanma saptandı. Grade IV olan 16 olgudan 1'inde (%6.25) hiç boyanma olmazken 2'sinde (%12.5) (+), 7'sinde (%43.75) (++) ve 6'sında (%37.5) (+++) boyanma saptandı. Olguların hiçbirinde (++++) boyanma saptanmadı. Elde edilen bu bulgular ışığında Ki-kare testi uygulanarak yapılan değerlendirmede histolojik grade ile çekirdek için nm23 boyanma dereceleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı ($X^2=15.9$, $p>0.05$). Ancak grade gözönüne alınmadan yapılan değerlendirmede toplam 55 olgudan 13'ünde (%23.6) nm23'le çekirdek boyanması olmazken 42'sinde (%76.4) boyanma saptanmıştır. Yine grade I grubunda olguların %50'sinde boyanma olmazken %50'sinde boyanma olurken grade IV grubunda olguların %6.25'de boyanma olmamış ancak %93.75'inde boyanma olmuştur (Resim 6). Grade I ve II ile grade III ve IV grupları yanısıra (-) ve (+) boyanma paterni ile (++) ve (+++) boyanma paterni birleştirilerek istatistiksel çalışma tekrarlandığında da yine gruplar arası farkın anlamlı olmadığı görüldü ($p>0.05$). Olguların çekirdek için nm23'le boyanma dereceleri ve histolojik grade'leri tablo 3'de gösterildi.

Nm23 ile Çekirdek Boyanma Dereceleri						
Gruplar	(-)	(+)	(++)	(+++)	(++++)	Toplam
Grade I	5	3	2	0	0	10
Grade II	3	4	3	7	0	17
Grade III	4	2	5	1	0	12
Grade IV	1	2	7	6	0	16
Toplam	13	11	17	14	0	55

Tablo 3. Olguların Çekirdek İçin Nm23 Boyanma Derecelerine Göre Dağılımları.
($X^2=15.9$, $p>0.05$)

Buna karşın çekirdek ve sitoplazmik boyanma grade gözönüne alınmadan birlikte değerlendirildiğinde 55 olgudan sadece 1 (%1.8) olguda hem çekirdek hem sitoplazmik boyanma saptanmamıştır. Diğer 54 (%98.2) olguda dereceleri değişen oranda ya çekirdek ya da sitoplazmik boyanma mevcuttur.

Tümörle infiltrate glial dokularda tümöral hücrelerde nm23 için boyanma paternine (çekirdek ve sitoplazma) bakıldığında olguların bir kısmının tümörle infiltrate glial doku içermediği (toplam 27 olgu) izlendi. Geriye kalan 28 olgunun tümörle infiltrate olan kısımlarındaki nm23 ile boyanma paterni tablo 4'te verildi.

Tümörle infiltrate dokularda nm23 ile boyanma			
Gruplar	(-)	(+)	Toplam
Grade I	1	6	7
Grade II	2	9	11
Grade III	1	2	3
Grade IV	2	5	7
Toplam	6	22	28

Tablo 4. Olguların Tümörle İnfiltrate Glial Dokularda Nm23 İle Boyanma Dağılımları.

Tablo 4'ün verileri incelendiğinde toplam 28 olgudan 22'sinde (%78.5) (+) boyanma varken kalan 6'sında (%21.5) boyanma olmamıştır. Ancak olgu sayıları yeterli olmadığından gruplar arasındaki fark açısından istatistiksel inceleme yapılamamıştır.

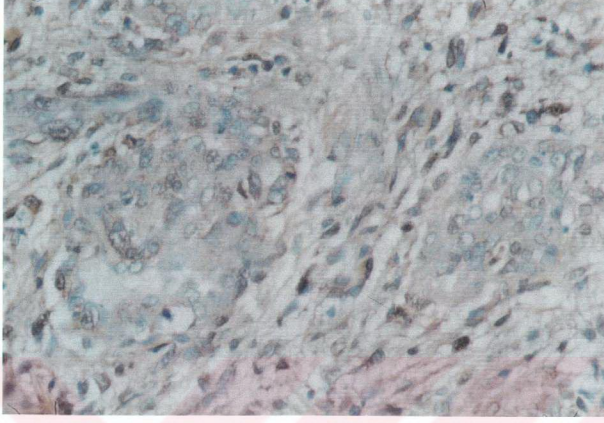
Vasküler endotelyal proliferasyon alanlarında nm23'le boyanma paternine bakıldığında, grade III olan 12 olgudan 8'inde (%66.7) boyanma olmazken 4'ünde (%33.3) (+) boyanma, grade IV olan 16 olgudan 7'sinde (%43.75) boyanma olmazken 9'unda (%56.25) (+) boyanma saptandı (Resim 9).

Bu veriler gözönüne alınarak yapılan Ki-kare testinde vasküler endotelyal boyanma ile histolojik grade arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı ($X^2=6.51$, $p>0.05$). Olgularda tümör ara dokusu içerisinde vasküler endotelilerin boyanma paterni tablo 5'te gösterildi.

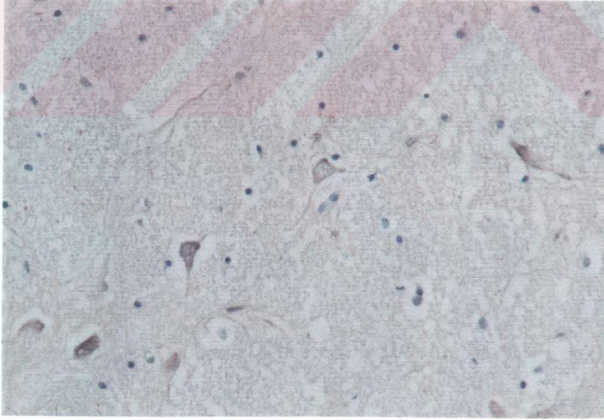
Nm23 ile vasküler endotellerde boyanma			
Gruplar	(-)	(+)	Toplam
Grade III	8	4	12
Grade IV	7	9	16
Toplam	15	13	28

Tablo 5. Tümör Ara Dokusundaki Vasküler Endotelyal Proliferasyon Odaklarında Nm23 Boyanma Dağılımları. ($X^2=6.51$, $p>0.05$)

Tümöre komşu normal glial alanlardaki nm23 ile boyanma paterni akciğer yağ embolisinden ölen bir hastanın beyin dokusunun boyanma paterni ile karşılaştırıldığında arada bir fark bulunamamıştır. Normal beyin dokusunda nöronların nm23'le boyandığı ancak astrositlerin boyanmadığı görülmüştür (Resim 10).



Resim-9: Vasküler endotelial proliferasyon alanlarında nm23 immün reaksiyonu (B-SA, DAB, x400).



Resim-10: Normal beyin dokusunda nöronlarda nm23 immün reaksiyonu (B-SA, DAB, x200).

TARTIŞMA

İnvasiv hücrelerin metastaz yapmaları için aktif olarak hareket edebilme, adezyon molekülleri eksprese edebilme, ekstrasellüler matriksi yıkabilme gibi özellikler kazanmış olmaları gerekmektedir⁽⁴⁾.

Primer beyin tümörlerinin santral sinir sistemi dışına nadiren metastaz yaptığına inanılmaktadır. Her ne kadar Bailey ve Cushing adlı araştırmacılar primer beyin tümörlerinin hiçbir zaman ekstraselül metastaz yapmadıklarını söyleseler de günümüzde bu tümörlerin metastaz yaptığına dair yayınlar bulunmaktadır^(1,2,3). Smith ve arkadaşlarının 1969'da yayınlanan çalışmasına göre 8000 primer beyin tümörünün %0.4'ü santral sinir sistemi dışına metastaz yapmıştır⁽³⁸⁾. Bizim çalışmamızdaki 55 olgudan hiçbiri santral sinir sistemi dışına metastaz yapmamıştır.

Nadiren metastaz yapsa da bu tümörler beyin içerisinde diffüz infiltratif ve ekspansif gelişim paterni göstermeye eğilimlidir. Astrositomların grade'i yükseldikçe artan bu yayılım paterni sonuçta hastaların prognozunu kötüleştiren bir gelişimdir^(1,2,14). Bu yüzden yaptığımız çalışmada antimetastaz geni olduğu ileri sürülen nm23'ün nadiren metastaz yaptığı bilinen astrositomaların bu davranışında rolü olup olmadığına ve tümör grade'i ile nm23 arasındaki ilişkiye bakılmıştır. Bu çalışmada ayrıca nm23'ün metastaz önleme mekanizması tam olarak bilinemediği için bu konuya katkısı olabileceği düşüncesiyle tümöral dokularda nm23 ekspresyonunun lokalizasyonu (çekirdek ve sitoplazma), tümöral dokudaki vasküler endotelial yapıların nm23 ile boyanma paterni ve tümörle infiltre dokularda nm23 ekspresyonu ile normal glial dokunun nm23 boyanma paternine bakıldı.

İlk kez 1988'de hücre kültür ortamlarında antimetastatik gen olarak tanımlanan nm23 geninin daha sonra bazı klinik çalışmalar ile de meme, tiroid, karaciğer ve malign melanomda antimetastatik fonksiyon gören bir gen olabileceği ileri sürülmüştür. Ancak yüksek metastaz potansiyeline sahip bazı tümörlerde ise nm23 ekspresyonunun arttığı rapor edilmiştir^(7,8,9,10,34,35). Henüz literatürden elde edebildiğimiz kadarıyla nm23'ün beyin tümörlerinde metastazın çok düşük oranda olmasını sağladığını gösteren yayın yoktur.

Bizim çalışmamızda 55 olgudan metastaz yapan olgu bulunmamakla birlikte çekirdek sitoplazma ayrımı yapılmaksızın olguların 54'ünde (%98.2) nm23 ekspresyonu

saptanmıştır. Bu durum astrositomların metastaz yapmamalarının gerekçeleri olarak şimdiye değin açıklanagelen "santral sinir sisteminde lenfatik sistemin olmayışı ve invazivite" gibi geleneksel faktörlerin yanısıra nm23 antimetastatik geninin de bu davranışta rolü olabileceğini ve literatürdeki nm23'ün antimetastatik potansiyelinin astrositik tümörler için de geçerli olabileceğini akla getirmektedir.

Nawashiro ve arkadaşlarının⁽³⁹⁾ yaptığı bir çalışmada astrositik tümörlerde yüksek nm23 düzeylerinin ektranöral metastatik potansiyelle korelasyon gösterdiği sonucuna varılmıştır. Nawashiro ve arkadaşlarının çalışmasında 19 farklı olgudan elde edilen 24 astrositom spesimeninden pelvise kemik metastazı yapan bir olguda nm23 (GST/nm23-H1 poliklonal antikoru) ile (+) sitoplazmik boyanma olurken grade IV olan 2 olguda şüpheli boyanma gerçekleşmiştir. Kalan 16 olguda nm23 için boyanma saptanmamıştır. Yani olguların %15.8'inde nm23 için sitoplazmik boyanma gerçekleşirken %84.2'sinde boyanma olmamıştır. Metastaz yapan olguda primer, rekürrens ve metastaz alanlarındaki boyanma paterninde bir farklılık olmamıştır. Bu olgu 11 yaşında, erkek, pons yerleşimli olup grade III astrositom tanısı almıştır. Şüpheli boyanan diğer 2 olgu ise grade IV astrositom tanısı almıştır.

Ancak bizim çalışmamızda 55 olgudan 46'sında (%83.6) sitoplazmik boyanma olurken 9'unda (%16.4) boyanma olmamıştır. Nawashiro ve arkadaşlarının çalışmasıyla çelişen bu durum, bizim kullandığımız antikorun (Nucleoside Diphosphate Kinase A, Clone 37.6, monoklonal) farklılığından kaynaklanmış olabilir.

Timmons ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada lethal giant larvae geninde mutasyonun yanısıra awd gen ekspresyonunun nöral tümörlerin oluşumu ve proliferasyonu için gerekli olduğu ileri sürülmüştür⁽⁴⁰⁾. Bizim çalışmamızda elde edilen verilerle bu konuda bir yorumda bulunmak güçtür. Ancak olgularımızın %98.2'sinde nm23 ekspresyonunun bulunması nm23'ün tümör oluşumu ve progresyonu için gerekli olabileceği olasılığını akla getirmekle birlikte bu noktanın açıklığa kavuşturulması için daha ileri ve ultrasitruktürel düzeyde çalışmalara gerek vardır.

Nm23'ün metastazı baskılayan etkileri :

- 1-Mikrotübül ilişkili nükleozid difosfat kinaz (NDPK) aktivitesi
- 2-Serin fosforilasyonu
- 3-Sinyal transdüksiyonu

4-C-myc için transkripsiyon aktivatörü olarak rol oynamasına bağlanmaktadır^(27,28,31,41).

Ancak tüm bu hipotezlerin haricinde nm23 proteini ve onun tümör progresyonundaki rolünün dokuya spesifik olarak değiştiğini ileri süren yayınlar da vardır^(41,42).

Deneysel çalışmalarda yüksek oranda metastatik K-1735 TK mürin melanom hücrelerine nm23 transfekte edildiği zaman bu hücrelerin tümör oluşturma ve tümör metastatik potansiyelinde azalmaya yol açtığı görülmüştür⁽⁴³⁾. Kanto ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada mürin melanom hücreleri ve insan meme karsinom hücrelerine nm23 cDNA'sı transfekte edildiği zaman bu hücrelerin hareket yeteneğinde inhibisyon oluştuğu dikkati çekmiştir⁽⁴⁴⁾. Bazı çalışmalarda nm23'ün hücrelerin hareket etmesini ve göç etmesini inhibe ettiği ileri sürülmüştür^(44,45). Bizim çalışmamızda tümörlü dokularda sitoplazmik nm23 ekspresyonununun %83.6 oranında pozitif olması ancak tümörle infiltrate beyin dokusunda tümör hücrelerinde %78.5 oranında nm23 ile boyanma saptanması bu görüşü desteklemektedir. Öte taraftan hem astrositomlarda invazivitenin göstergesi olan tümör grade'i ile nm23 boyanma paterni arasında hem de tümör ara dokusundaki vasküler endotel hücrelerinde nm23 boyanma dağılımları açısından anlamlı ilişki olmaması nm23'ün hareketi inhibe ettiği görüşüyle uyuşmamaktadır. Ayrıca grade I grubunda olguların % 60'ında sitoplazmik % 50'sinde çekirdek boyanması varken grade IV grubunda olguların %87.5'inde sitoplazmik %93.75'inde çekirdek boyanması olması da bu hipotezle uyuşmamaktadır. Ancak farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığı için biz buradaki sonuçlara bakarak nm23'ün astrositomlarda invazyonu inhibe ettiği görüşünün geçerli olduğunu söyleyebiliriz.

Nm23'ün değişik tümörlerde farklı boyanma paterni göstermesini açıklamak için çeşitli görüşler öne sürülmüştür. Aryee ve arkadaşlarının çalışmasında Ewing tümörlerinde dokuların değişik fiksasyon yöntemleri ve ısı uygulamalarına bağlı olarak boyanma paterni de değişmiştir. Bu durum in situ düzeyde oligomer oluşumu ve protein seviyesinde yapısal polimorfizme bağlanmıştır⁽³⁵⁾.

Alternatif bir düşünce de nm23'ün ekspresyon kaybından çok inaktive olduğudur. Metastatik kolorektal karsinomlarda ve nöroblastomlarda nm23 lokusunda DNA mutasyonları saptanmıştır^(34,46). Nm23'te genom düzeyinde allelik kayıp olması nadirdir ve

metastaz veya invaziv potansiyelle ilişkisi saptanamamıştır⁽⁴⁷⁾. Ancak buna karşın yapılan retrospektif bir çalışmada 104 kolorektal karsinomlu hastanın 5 yıllık takibi sonucunda nm23-H1 allelik delesyonu olan hastaların olmayanlara göre 3 kat daha fazla uzak metastaz yapmaya eğilimi görülmüştür⁽⁴⁸⁾. Bizim çalışmamızdaki sonuçlara baktığımızda olguların %98.2'sinde nm23 ekspresyonu olması ve nm23 ekspresyonu ile tümör grade'i arasında anlamlı ilişki bulunamamış olması astrositomlarda nm23 gen mutasyonu olabileceği düşüncesini akla getirmektedir. Ayrıca grade I grubunda olguların % 60'ında sitoplazmik % 50'sinde çekirdek boyanması varken grade IV grubunda olguların %87.5'inde sitoplazmik %93.75'inde çekirdek boyanması olması da nm23 gen mutasyonu (p53 modelinde olduğu gibi) olabileceğini akla getirmektedir. Fakat yapılan çalışma ile bu konuda ancak tahminde bulunulabilir. Kesin kanıtlar için daha ileri ve kapsamlı çalışmalara gerek vardır.

Literatürde nm23'ün metastazı önleyen bir gen olmasının yanısıra tümör oluşumu, gelişimi ve invaziviteyi sağlayan bir gen olabileceği de öne sürülmektedir. Yapılan çalışmalarla nm23'ün etki mekanizmaları hakkında kesin bir fikre ulaşılamamış olmakla birlikte birden çok etki mekanizmasının olduğunu söylemek mümkündür. Bu nedenle nm23'ün antimetastatik etkileri, tümör oluşumu ve gelişimi üzerindeki etkilerini açığa çıkarmak için daha ileri düzeyde ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Elde ettiğimiz bulgularla literatür bilgilerini birlikte değerlendirdiğimizde astrositomlarda histolojik grade ile nm23 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin bulunmadığını ancak histolojik grade ile nm23 ekspresyonunun arttığını söyleyebiliriz.

SONUÇLAR

1-Nm23 normal beyin dokusunda nöronlarda eksprese edilmekte astrositlerde eksprese edilmemektedir.

2-Astrositomlarda nm23 eksprese edilmektedir ve bu ekspresyon astrositomların nadiren metastaz yapma davranışına katkıda bulunan nedenlerden biri olabilir.

3-Astrositomlarda histolojik grade ile nm23 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin bulunamamıştır ancak grade artışı ile nm23'te ortaya çıkacak olan bir mutasyon p53 modelinde olduğu gibi bu proteinin hücre içi düzeyinde bir artışa neden olabilir.

ÖZET

Bu çalışma 19 Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden 1994-1999 yılları arası taranarak saptanan astrositom tanısı almış 55 adet beyin biyopsi materyali üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Astrositomlar yeniden gözden geçirilerek Daumas-Duport ve arkadaşları tarafından tanımlanan 4'lü grade'lendirme sistemine göre değerlendirildi ve grade'lerine göre gruplandırıldı.

Olgularda immünohistokimyasal olarak nm23 (sitoplazmik ve çekirdek) ekspresyonunun histolojik grade ile ilişkisi araştırıldı.

Nm23 ekspresyonunun normal beyin dokusunda nöronlarda pozitif astrositlerde negatif olduğu görüldü.

Nm23'ün astrositomların büyük bir kısmında eksprese edildiği gözlemlendi ve bunun astrositomların nadiren metastaz yapmalarının nedenlerinden biri olabileceği düşünüldü.

Nm23 ekspresyonu ile histolojik grade arasında anlamlı ilişki bulunamadı. Ancak olguların grade'i yükseldikçe hem çekirdek için hem sitoplazma için nm23 ekspresyonunun tümöral hücrelerde arttığı görüldü. Bu durumun nedeninin nm23 geninde bir mutasyon olabileceği düşünüldü.

Ayrıca tümörle infiltrate dokularda nm23 ekspresyonunun tümöral hücrelerde azaldığı ve bunun sonucunda nm23'ün hareketi inhibe edebileceği düşünüldü.

Kaynaklar

- 1-Rubinstein LJ. Tumors of the central nervous system. **Atlas of Tumor Pathology No.6** Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 19-21, 1970.
- 2- Rosenblum MK, Bilbao JM and Ang LC. Neuromuscular system. In: Rosai J. editor. **Ackerman's Surgical Pathology**. 8th ed. St. Louis: Mosby, 2268-2289, 1996.
- 3-Gamis AS, Egelhoff J, Roloson G, Young J, Woods GM, Newman R, Freeman AI. Diffuse bony metastases at presentation in a child with glioblastoma multiforme. A case report. **Cancer**. 66: 180-184, 1990.
- 4-Girolami UD, Frosch MP and Anthony DC. The central nervous system. In: Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, editors. **Robbins Pathologic Basis of Disease**, 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1296-1343, 1994.
- 5-Powers JM, Horoupian DS. Central nervous system. In: Damjanov I, Linder J, editors. **Anderson's Pathology**. 10th ed. St. Louis: Mosby, 2746-2747, 1996.
- 6-Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, et al. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. **Journal of National Cancer Institute**. 80: 200-204, 1988.
- 7-Florenes VA, Aamal S, Myklebost O, Maelandsmo GM, Bruland OS, Fodstad O. Levels of nm23 messenger RNA in metastatic malignant melanomas: inverse correlation to disease progression. **Cancer Research**. 52: 6088-6091, 1992.
- 8-Barnes R, Masood S, Barker E, Rosengard AM, Coggin DL, Crowell T, King CR, Porter-Jordan K, Wargotz ES, Liotta LA, et al. Low nm23 protein expression in infiltrating ductal breast carcinomas correlates with reduced patient survival. **American Journal of Pathology**. 139: 245-250, 1991.
- 9-Yamaguchi A, Urano T, Goi T, Takeuchi K, Niimoto S, Nakagawara G, Furukawa K and Shiku H. Expression of human nm23-H1 and nm23-H2 proteins in hepatocellular carcinoma. **Cancer**. 73: 2280-2284, 1994.
- 10-Arai T, Watanabe M, Onodera M, Yamashita T, Masunaga A, Itoyama S, Itoh K and Sugawara I. Reduced nm23-H1 messenger RNA expression in metastatic lymph nodes from patients with papillary carcinoma of the thyroid. **American Journal of Pathology**. 142(6): 1938-1944, 1993.
- 11-Weiss L, Greep RO. **Histology** 4th ed. New York: McGraw-Hill Book, 1977.

12-Fuller GN and Burger PC. Central nervous system. In: Sternberg SS, editor. **Histology for Pathologists**. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 258-263, 1997.

13-Cairncross JG. The biology of astrocytoma: Lessons learned from chronic myelogenous leukemia-hypothesis. **Journal of Neuro-Oncology**. 5: 99-104, 1987.

14- Fuller GN and Burger PC. Gliomas: Pathology. In: Wilkins RH, Rengachary SS, editors. **Neurosurgery**. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 735-741, 1996.

15-Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P. Grading of Astrocytomas. A simple and reproducible method. **Cancer**. 62: 2152-2165, 1988.

16-Littman P, Jarrett P, Bilaniuk LT, et al. Pediatric brain stem gliomas. **Cancer**. 45: 2787-2792, 1980.

17-Cosgrove M, Fitzgibbons PL, Sherrod A, Chandrasoma PT, Martin SE. Intermediate filament expression in astrocytic neoplasms. **American Journal of Surgical Pathology**. 13: 141-145, 1989.

18-Rosengard AM, Krutzsch HC, Shearn A, Biggs JR, Barker E, Margulies IMK, King CR, Liotta LA and Steeg PS. Reduced Nm23/Awd protein in tumour metastasis and aberrant Drosophila development. **Nature**. 342: 177-180, 1989.

19-Dearolf C, Hersperger E, Shearn A. Developmental consequences of awdb3, a cell autonomous lethal mutation of Drosophila induced by hybrid dysgenesis. **Developmental Biology**. 129: 159-168, 1988.

20-Lakso M, Steeg PS, Westphal H. Embryonic expression of Nm23 during mouse organogenesis. **Cell Growth Differentiation**. 3: 873-879, 1992.

21- Wallet V, Mutzel R, Troll H, Barzu O, Wurster B, Veron M, Lacombe ML. Dictyostelium nucleoside diphosphate kinase highly homologous to nm23 and awd proteins involved in mammalian tumor metastasis and Drosophila development. **Journal of the National Cancer Institute**. 82 : 1199-1202, 1990.

22-Backer JM, Mendola CE, Kovessi I, Fairhurst JL, O'hara B, Eddy Jr RL, Shows TB, Mathew S, Murty VVVS, Chaganti RSK. Chromosomal localization and nucleoside diphosphate kinase activity of human metastasis-suppressor genes NM23-1 and NM23-2. **Oncogene**. 8: 497-502, 1992.

23-MacDonald NJ, De La Rosa A, Steeg PS. The potential roles of nm23 in cancer metastasis and cellular differentiation. **European Journal of Cancer.** 31A: 1096-1100, 1995.

24-De La Rosa A, Williams RI, Steeg PS. Nm23/nucleoside diphosphate kinases: toward a structural and biochemical understanding of its biological functions. **Bioessays.** 17: 53-62, 1995.

25-Alberts B, Bray B, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. **Molecular Biology Of The Cell.** 3rd ed. New York: Garland, 803-814, 1994.

26-Kimura N, Shimada N, Nomura K and Watanabe K. Isolation and characterization of cDNA clone encoding rat nucleoside diphosphate kinase. **Journal of Biological Chemistry.** 26: 15744-15749, 1990.

27-MacDonald NJ, De La Rosa A, Benedict MA, Freije JMP, Krutsch H and Steeg PS. A serine phosphorylation of nm23, and not its nucleoside diphosphate kinase activity, correlates with suppression of tumor metastatic potential. **Journal of Biological Chemistry.** 268: 25780-25789, 1993.

28-Igawa M, Rukstalis DB, Tanabe T And Chodak GW. High levels of nm23 expression are related to cell proliferation in human prostate cancer. **Cancer Research.** 54: 1313-1318, 1994.

29-Caligo MA, Cipollini G, Fiore L, Calvo S, Basolo F, Collecchi P, Ciardiello F, Pepe S, Petrini M, Bevilacqua G. Nm23 gene expression correlates with cell growth rate and S-phase. **International Journal of Cancer.** 60: 837-842, 1995.

30-Myers RB, Srivastava S, Oelschlager DK, Brown D and Grizzle WE. Expression of nm23-H1 in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma. **Human Pathology.** 27: 1021-1024, 1996.

31-Stahl JA, Leone A, Rosengard AM, Porter L, King CR And Steeg PS. Identification of a second human nm23 gene, nm23-H2. **Cancer Research.** 51: 445-449, 1991.

32-Bertheau P, De La Rosa A, Steeg PS and Merino MJ. Nm23 protein in neoplastik and nonneoplastik thyroid tissues. **American Journal of Pathology.** 145 (1): 26-32, 1994.

33-Bevilacqua G, Sobel ME, Liotta LA And Steeg PS. Association of low nm23 RNA levels in human primary infiltrating ductal breast carcinomas with lymph node involvement and other histopathological indicators of high metastatic potential. **Cancer Research.** 49: 5185-5190, 1989.

34-Leone A, Seeger RC, Hong Cm, Hu YY, Arboleda Mj, Brodeur GM, Stram D, Slamon DJ and Steeg PS. Evidence for nm23 RNA overexpression, DNA amplification and mutation in aggressive childhood neuroblastomas. **Oncogene.** 8: 855-865, 1993.

35-Aryee DN, Strobel T, Kos K, Salzer-Kuntschik M, Zoubek A, Veron M, Ambros IM, Traincart F, Gadner H, Kovar H. High nm23-H1/NDPK-A expression in Ewing tumors: paradoxical immunohistochemical reactivity and prognostic significance. **International Journal of Cancer.** 64: 104-111, 1995.

36-Keim D, Hailat N, Melhem R, Zhu XX, Lascu I, Veron M, Strahler J. Proliferation-related expression of p19/nm23 nucleoside diphosphate kinase. **Journal of Clinical Investigation.** 89: 919-924, 1992.

37-Barış YS. **Astroditomların derecelenmesinde Daumas-Duport ve üçlü dereceleme sistemlerinin karşılaştırılması (Uzmanlık Tezi).** Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı. Samsun, 1993.

38-Smith DR, Hardman JM, Earle KM. Metastasizing neuroectodermal tumors of the central nervous system. **Journal of Neurosurgery.** 31: 50-58, 1969.

39-Nawashiro H, Ozeki Y, Takishima K, Shima K and Chigasaki H. Immunohistochemical analysis of the nm23 gene product (NDP kinase) expression in astrocytic neoplasms. **Acta Neurochirurgica.** 138: 445-450, 1996.

40-Timmons L, Hersperger E, Woodhouse E, Xu J, Liu LZ and Shearn A. The expression of the Drosophila awd gene during normal development and in neoplastic brain tumors caused by lgl mutations. **Developmental Biology.** 158: 364-379, 1993.

41-Parker C and Sherbet GV. Taxol, a promoter of microtubule polymerisation, downregulates MTS1 gene expression in the B16 murine melanoma. **Proceedings of the Annual Meeting of the American Association for Cancer Research.** 34: A367, 1993.

42-Hennesy C, Henry JA, May FE, Westley BR, Angus B, Lennard TW. Expression of the antimetastatic gene nm23 in human breast cancer: an association with good prognosis. **Journal of the National Cancer Institute.** 83:281-285,1991.

43-Leone A, Flatow U, King CR, Sandeen MA, Margulies IM, Liotta LA and Steeg PS. Reduced tumor incidence, metastatic potential and cytokine responsiveness of nm23-transfected melanoma cells. **Cell.** 65: 25-35, 1991.

44-Kantor JD, McCormick B, Steeg PS and Zetter BR. Inhibition of cell motility after nm23 transfection of human and murine tumor cells. **Cancer Research.** 53: 1971-1973, 1993.

45-Hsu S, Huang F, Ossowski L, Friedman E. Colon carcinoma cells with inactive nm23 show increased motility and response to motility factors. **Carcinogenesis.** 16: 2259-2262, 1995.

46-Wang L, Patel U, Ghosh L, Chen HC, Banerjee S. Mutation in the nm23 gene is associated with metastasis in colorectal cancer. **Cancer Research.** 15:717-720, 1993.

47-Brewster SF, Browne S and Brown KW. Somatic allelic loss at the DCC, APC, nm23-H1 and p53 tumor suppressor gene loci in human prostatic carcinoma. **Journal of Urology.** 151: 1073-1077, 1994.

48-Cohn KH, Orstein DL, Wang F, LaPaix FD, Phipps K, Edelsberg C, Zuna R, Mott LA, Dunn JL. The significance of allelic deletions and aneuploidy in colorectal carcinoma. Results of a 5-year follow-up study. **Cancer.** 79: 233-244, 1997.