

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI
ANABİLİM DALI BAŞKANI: PROF. DR. NEJAT ÇIPLAK**

**GLİAL TÜMÖRLÜ HASTALARDA MATRİKS
METALLOPROTEİNAZ 9 (MMP-9) GEN
POLİMORFİZMİ**

DR. MAHMUT ÖZDEN

BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL – 2012

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI
ANABİLİM DALI BAŞKANI: PROF. DR. NEJAT ÇIPLAK**

**GLİAL TÜMÖRLÜ HASTALARDA MATRİKS
METALLOPROTEİNAZ 9 (MMP-9) GEN
POLİMORFİZMİ**

DR. MAHMUT ÖZDEN

BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. MEHMET YAŞAR KAYNAR**

İSTANBUL - 2012

TEŞEKKÜR

Asistanlığım boyunca bana yol gösteren Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı'nın tüm değerli öğretim üyeleri ve uzmanlarına saygı ve şükranlarımı sunarım.

Nöroşirürji ihtisasım boyunca beraber çalışmaktan mutlu olduğum sevgili asistan arkadaşlarıma, hastane personel ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Tez hazırlık ve araştırma sürecinde ilgi ve desteklerini esirgemeyen başta tez danışmanı hocam Prof. Dr. Mehmet Yaşar Kaynar olmak üzere; Uzm. Dr. Mustafa Onur Ulu'ya, Uzm. Dr. Hakan Hanımoğlu'na, Uzm. Dr. Cumhuri Gökhan Ekmekçi ve Dr. Sema Sırma'ya teşekkür ederim.

Ayrıca hayatta sahip olduğum en büyük güç olan aileme sonsuz teşekkür ederim. Bu çalışmayı, bu günlere gelmemde en büyük destekçim olan, rahmetli babam Mehmet Özden'e ithaf ediyorum.

Dr. Mahmut Özden

İstanbul- 2012

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	v
TABLO ve GRAFİK LİSTESİ	vii
ŞEKİL ve RESİM LİSTESİ	viii
ÖZET (TÜRKÇE)	ix
ÖZET (İNGİLİZCE)	x
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	4
Astrositlerin histolojisi	4
Glial tümörlerin görülme sıklığı ve yaygınlık derecesi	5
Astrositomların derecelendirilmesi ve histopatoloji	6
Pilositik Astrositom	8
Difüz Astrositom	13
Anaplastik Astrositom	15
Glioblastoma Multiforme	16
Glial tümörlerde tanısal görüntüleme	19
Glial tümörlerde derece yükselmesi (malignite artışı)	27
Glial tümörlerin tedavisi	28
Prognoz	35
Glial tümör genetiği	36
Glial tümörlerde klinik yayılma özellikleri	40
Kanser ve hücre dışı matriks	44

Matriks metalloproteinazlar	45
Mutasyonlar ve polimorfizmler	56
GEREÇ VE YÖNTEM	64
Hasta ve Kontrol Gruplarının seçilmesi	64
Demografik Bilgiler	64
DNA izolasyonu ve PCR RFLP tekniği	68
İstatistik analizi	68
DNA'nın Elde Edilmesi	69
Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	70
Akrilamid Jel Elektroforezi	73
Akrilamid Jel Elektroforezi-Yükleme	73
Akrilamid Jelin GelRed ile Boyanması	74
Enzim Kesim yöntemi	74
BULGULAR	75
TARTIŞMA	86
SONUÇ	89
KAYNAKLAR	90

KISALTMALAR

WHO:	Dünya Sağlık Örgütü
MSS:	Merkezi sinir sistemi
MMP:	Matriks metalloproteinaz
HDM:	Hücre dışı matriks
DDA:	Düşük dereceli astrositom
YDA:	Yüksek dereceli astrositom
VEP:	Vasküler endotelyal proliferasyon
PA:	Pilositik astrositomlar
BT:	Bilgisayarlı tomografi
MRG:	Manyetik rezonans görüntüleme
PXA:	Pleomorfik ksantoastrositom
HE:	Hemotoksilen-eozin
AA:	Anaplastik astrositom
VEGF:	Vasküler endotelyal büyüme faktör
GBM:	Glioblastoma multiforme
KPS:	Karnofsky Performans Skalası
PET:	Pozitron emisyon tomografisi
SPECT:	Tekli foton emisyon bilgisayar tomografisi
MRS:	Manyetik rezonans spektroskopi
FLAIR:	Fluid Attenuation Inversion Recovery
RT:	Radyoterapi
KT:	Kemoterapi
TMZ:	Temozolomid
MGMT :	Metilguanin-DNA-metiltransferaz

CBTRUS: Amerika Birleşik Devletleri Beyin Tümörü Kayıt Merkezi

PI3K: Fosfatidilinozitol-3'-kinaz

EGFR Epidermal büyüme faktörü reseptörü

RB: Retinoblastom

CC: Korpus kallosum

ADAM: α disintegrin ve metalloproteinaz

uPAR: Ürokinaz tipi plazminojen aktivatör reseptörü

GAG: Glikozaminoglikanlar

BM: Bazal membran

uPA: Ürokinaz-tip plazminojen aktivatörü

MMPI: Matriks metalloproteinaz inhibitörleri

SNP: Tek nükleotid polimorfizmi

SSCP: Tek zincir konformasyon polimorfizmi

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RFLP: Kesim Parça Uzunluğu Polimorfizmleri

SEGA: Subependimal dev hücreli astrositom

EGB: Eozinofilik granüler cisimcik

TABLO ve GRAFİK LİSTESİ

Tablo 1: WHO Astrositik tümör sınıflaması.....	8
Tablo 2: Jelatinazların salınımını etkileyen faktörler.....	53
Tablo 3: Hastaların demografik ve klinik özellikleri.....	65
Tablo 4: PZR Karışımı (R279Q polimorfizmi).....	70
Tablo 5: PZR Karışımı (P574R polimorfizmi).....	71
Tablo 6: PZR Karışımı (R668Q polimorfizmi).....	72
Tablo 7: Hasta grubu Sonuçları.....	79
Tablo 8: Kontrol Grubu Sonuçları.....	83
Grafik 1: R279Q polimorfizmi hasta – kontrol grubu sonuçları.....	75
Grafik 2: P574R polimorfizmi hasta – kontrol grubu sonuçları.....	76
Grafik 3: R668Q polimorfizmi hasta – kontrol grubu sonuçları.....	77

ŞEKİL ve RESİM LİSTESİ

Resim 1: Piloitik astrositom MRG görüntüleri	22
Resim 2: Astrositom derece 2 MRG görüntüleri	23
Resim 3: Anaplastik astrositom MRG görüntüleri	25
Resim 4: Glioblastom multiforme MRG görüntüleri	26
Resim 5: MspI Enzimi ile kesim işlemi	71
Resim 6: NlaIV Enzimi ile kesim işlemi	72
Resim 7: StyI Enzimi ile kesim işlemi	73
Şekil 1: Astrositom genetik değişiklikleri	39
Şekil 2: MMP enzimlerinin moleküler yapısı	48
Şekil 3: MMP enzim aktivitesinin düzenlenmesi	49
Şekil 4: MMP'lar için hücre yüzeyi ile ilişkili aktivasyon kaskadı	50
Şekil 5: Matriks metalloproteinaz-9	52
Şekil 6: Polimerizasyon zincir reaksiyonu	61

ÖZET

Gliyal Tümörlü Hastalarda Matriks Metalloproteinaz-9 Gen Polimorfizmi

Giriş: Matriks metalloproteinazlar (MMP) hücre dışı matriksin yıkımında rol alan geniş bir proteolitik enzim grubudur. Farklı MMP'lerin farklı tümörlerde invazyon ve metastaz aşamalarında görev aldıklarına yönelik kanıtlar bulunmaktadır. Bunlar arasında özellikle MMP-9'un kanser gelişimi ve ilerlemesinde kritik rolünün olduğu gösterilmiştir. MMP-9 genindeki varyasyonlar gen ekspresyonunu ve dolayısıyla tümör oluşumunu etkileyebilir. Bu çalışmada gliyal tümörlü hastalarda MMP-9 gen polimorfizmini araştırmayı amaçladık.

Materyal ve Metod: MMP-9 geninin bilinen 3 polimorfizmi (R279Q A/G; P574R G/C ve R668Q G/A) gliyal tümörlü 100 hastanın (59 Erkek / 41 Kadın) ve yaş uyumlu, sağlıklı 100 kontrol deneğin (60 Erkek / 40 Kadın) kan örneklerinde çalışıldı. İstatistiksel analizde ki-kare ve student's t-testi ve lojistik regresyon için de 'backward stepwise elimination' metodu kullanıldı.

Bulgular: Her üç polimorfizm için de gliyal tümör histolojisi açısından anlamlı sonuç elde edilemedi (R279Q A/G: $p = 0.703$, P574R G/C: $p = 0.248$ ve R668Q G/A: $p = 0.759$). Hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında sonuçlar her üç polimorfizm için de anlamlı bulunmadı (R279Q A/G: $p = 0.279$, P574R G/C: 0.451 ve R668Q G/A: $p = 0.909$). Grupların polimorfizm sonuçları ve demografik özellikleri tek değişkenli analiz, lojistik regresyon ve doğrusal regresyon testleri ile analiz edildiğinde her üç metod için de yaş ve R279Q (A/G) polimorfizmi anlamlı sonuç vermiştir.

Sonuç: Bu bulgular gliyal tümör oluşumunda MMP-9 geninin P574R G/C ve R668Q G/A polimorfizmlerinin etkisinin olmadığını göstermiştir. Buna karşın R279Q A/G polimorfizmi gliyal tümör oluşumunda etkili olabilir. Bu çalışmanın sonuçlarını desteklemek için daha geniş hasta popülasyonlu çalışmalara ihtiyaç vardır.

ABSTRACT

Matrix Metalloproteinase-9 Gene Polymorphism in Glial Tumor Patients

Background: The matrix metalloproteinases (MMPs) are a large family of proteolytic enzymes, which are involved in the degradation of many different components of the extracellular matrix. There is increasing evidence to indicate that individual MMPs have important roles in tumour invasion and metastasis. Among these, MMP-9 has been shown to play critical roles in cancer development and aggression. Variations in MMP-9 gene may induce gene expression may in turn increase the risk of tumor formation. In this study we aimed to investigate polymorphisms of MMP-9 gene in glial tumor patients.

Materials and Methods: Three gene polymorphisms of MMP-9 gene (R279Q A/G; P574R G/C and R668Q G/A) were studied in peripheral blood samples of 100 patients with glial tumors (59 Male / 41 Female) and 100 age matched healthy controls (60 Male / 40 Female). Chi-square and student's t-test were used in statistical analysis and backward stepwise elimination was used for logistic regression.

Results: No statistically significant relation was found for all polymorphisms regarding the glial tumor histology (R279Q A/G: $p = 0.703$, P574R G/C: $p = 0.248$ and R668Q G/A: $p = 0.759$). When compared with control group the results were not significant for all polymorphisms (R279Q A/G: $p = 0.279$, P574R G/C: $p = 0.451$ and R668Q G/A: $p = 0.909$). When polymorphism results and demographic features of both groups were compared by univariate analysis, logistic regression and linear regression tests, R279Q (A/G) and age were found statistically significant for all methods.

Conclusion: These findings indicate that P574R G/C and R668Q G/A polymorphisms of MMP-9 gene polymorphisms do not play significant role in glial tumor formation. However R279Q A/G polymorphism may be important in glial tumor formation. Further studies with larger patient populations are required to confirm the results of the current study.

1.GİRİŞ

Merkezi sinir sisteminin (MSS) primer tümörleri 100.000’de 6–10 oranında görülür ve yeni tanı konulan tüm habis tümörlerin %2’sini oluşturur. Amerika Birleşik Devletleri’nde yıllık yaklaşık 30.000 ile 50.000 yeni olgu bildirilmektedir(3). Primer beyin tümörlerinin %60’ı glial tümörlerdir(8) . Glial tümörler genel olarak intraaksiyal yerleşimli, kapsülsüz ve diffüz büyüme gösteren tümörlerdir (7). Astrositik, oligodendrositik veya ependimal hücrelerden köken almaktadırlar. Tüm glial tümörler hücresel tiplerine göre 4 gruba ayrılmaktadır;

- 1- Astrositik tümörler
- 2- Oligodendriogial tümörler
- 3- Ependimal tümörler
- 4- Miks glial tümörler

Sıfır -15 yaş grubundaki primer tümörlerin %40-45’i, erişkin yaş grubunda ise %50-60’ı astrosit kökenli tümörlerdir (1). Bunların da büyük kısmını Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Sinir Sistemi Tümörleri sınıflamasına göre III. ve IV. evre kabul edilen yüksek dereceli glial tümörler teşkil etmektedir. Glial tümörlerin prognozu derecelerine göre değişiklik göstermektedir ve derece IV bir glioblastom olgusunun ortalama sağkalım süresi 8-12 aydır (14). WHO evreleme sistemine göre düşük derece kabul edilen gliomlarda ise en agresif tedavi yöntemleri sonrası dahi ortalama sağkalım süresi 6-10 yıl arasında değişmektedir (14). Bu olgular sıklıkla tümörün lokal olarak tekrarlaması ve zamanla prognozun daha kötü olduğu ve mortalitenin yükseldiği bir üst dereceye geçişi sonrası kaybedilir.

Bazı kalıtsal sendromlar, radyasyon ve bazı immün baskılayıcı ajanların beyin tümörlerinin gelişiminde etkili olduğu düşünülmektedir. Bu nedenler, beyin tümörlü hastaların çok az bir kısmında etkilidir (9). Astrositomlar ile ilişkili bazı kalıtsal hastalıklar tüm beyin tümörlerin % 1-2’sini oluşturmaktadır (10). Bunlar Li-Fraumeni, Nörofibromatozis tip 1, Kalıtsal nonpoliposis kolorektal kanser (Turcot sendrom B), Cowden hastalığı (çoklu hamartom sendromu, Lhermitte-Duclos), Melanom-astroitom sendromudur (10). Terapotik dozlarda verilen iyonize radyasyonun, beyin tümörü gelişiminde bilinen risk faktörleri arasında yer almasına karşın, tanı amaçlı X-ray ışınlarının glial tümörler ile ilişkili olup olmadığına dair çelişkili sonuçlar

bildirilmektedir (11,12). Organ transplantasyonu sonrasında kullanılan immün sistemi baskılayıcı ajanların kullanımına bağılı olarak başka kanserler de olmak üzere glial tümör riski de artmaktadır (13).

Glial tümörlerin komşu normal beyin dokusuna invazyonlarının ve total cerrahi rezeksiyon sonrası lokal olarak tekrarlamalarının moleküler ve genetik mekanizmaları birçok bilimsel araştırmaya konu olmuştur ve olmaktadır (15-17). Bu tümörlerin beyin içi invazyon mekanizmalarının tespiti, nüksün önlenmesi ve lokal tümör kontrolünün sağlanması yönünde yeni tedavi metodlarının geliştirilmesi için çok önemlidir. Astrositik tümörlerin invazyonunda ilk olarak hücre dışı matriks (HDM)'in proteolizisi gerçekleşir. Daha sonra matriks içine tümör hücrelerinin migrasyonu olur (4). Yapılan çalışmalarda glial tümörlerin invazyonunda özellikle matriks metalloproteinazların (MMP) kritik bir öneme sahip olduğu tespit edilmiştir (18-21).

Zincir bağımlı geniş bir endopeptidaz ailesi olan MMP'ler, kollajen, fibronektin ve proteoglikanlar gibi hücre dışı matriks (HDM) proteinlerinin neredeyse tümünü yıkmaya potansiyeline sahiptirler (22). MMP'ler, HDM'in fizyolojik olarak yıkılması gereken durumlarda (doku tamiri ve angiogenez) rol oynadıkları gibi temelinde HDM'nin aşırı yıkımının görüldüğü patolojik durumlarda da (romatoid artrit, osteoartrit, tümör invazyonu, metastaz..vb) önemli görevler alırlar (22 – 24).

MMP ailesi içerisinde MMP-2 (Gelatinaz-A) ve MMP-9 (Gelatinaz-B) bazal membranların yıkımında rol alırlar ve ek olarak bu endopeptidazlar fibriller kollajenlerin kollajenazlar tarafından ilk yıkımından sonraki son parçalama aşamasından sorumludurlar (22). Bu önemli görevlerinin yanında, yapılan çalışmalarda MMP-2 ve MMP-9 doku ekspresyonu ile glioma progresyonu arasında ilişki olduğunun tespiti, bu iki MMP'nin glial tümör invazyon mekanizmasında kilit rolü olduğunu düşündürmektedir (25, 26). Bunlardan özellikle MMP-9'un çeşitli invazif tümörlerde sıklıkla eksprese olduğu ve glial tümör yayılımı ve nüksünde önemli rol oynadığı belirtilmiştir (21, 27). Bu proteazı inhibe edecek veya baskılayacak ve dolayısı ile beyin tümörü invazyonunu engelleyecek çeşitli moleküller kemoterapotik ajan olarak önerilmiştir (28, 29).

MMP'lerin işlevi, oluşumundan itibaren çeşitli basamaklarda etkilense de bu safhaların belki de en önemlisi genetik transkripsiyon safhasıdır. Zira MMP genlerinin çoğu sadece aktif bir fizyolojik veya patolojik doku yenilenmesi gerektiğinde eksprese olmaktadır (30-33). Yapılan araştırmalarda tek nükleotid polimorfizmleri gibi doğal

sekans varyasyonlarının farklı bireylerde farklı MMP ekspresyonlarına neden olduğu hakkında sağlam veriler bulunmaktadır (2). Kodlama bölgesinde olabilecek tek nokta mutasyonları protein aktivitesini etkileyebilir ve kanser oluşumu ve metastaz ile ilişkili olabilir (23). Daha önce MMP-9 genindeki polimorfizmler çeşitli tümörlerde araştırılmasına karşın glial tümörlerdeki veriler sınırlıdır (5, 6).

MMP'lerden substrat özellikleri bakımından sınıflandırıldığında jelatinazlar grubunda yer alan ve bazal membran kollajenlerini, jelatini, elastini parçalayan MMP-9 (Jelatinaz B)'un R279Q, P574R ve R668Q noktaları fonksiyoneldir. R279Q (ekson 6, A/G) substrat bağlanmasını sağlayan jelatinaz spesifik fibronektin tip 2 bölgesinde (34, 35), P574R (ekson 10, G/C) ile R668Q (ekson 12, G/A) ise hem substrat hem de inhibitör bağlanmasını etkilediği düşünülen hemopeksin domain bölgesinde konumlanmaktadır (36,37). Bu yüzden, bu polimorfizmler potansiyel olarak MMP-9'un protein yapısını değiştirir ve bazı fonksiyonel etkiler yaparak kişinin kansere yatkınlığını artırabilir (38).

Amaç:

Bu çalışmanın amacı glial tümörlü hastalarda tümör gelişiminde fonksiyonel polimorfizmlerin olası rollerini araştırmaktır. Hipotezimize göre MMP-9 genindeki varyasyonlar gen ekspresyonunu değiştirebilir ve tümör oluşum riskini arttırabilir. Bu bağlamda MMP-9 genindeki üç polimorfizm (R279Q A/G; P574R G/C ve R668Q G/A) glial tümörlü hastalarda araştırılacak ve sonuçlar diğer epidemiyolojik verilerle ve kontrol grubu ile karşılaştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ASTROSİTLERİN HİSTOLOJİSİ

Astrositler, nöroektodermal kökenli hücrelerdir. Yuvarlak ya da oval nükleuslu, nükleol içermeyen, 8–10 mikron boyutlarında, çok sayıdaki uzantıları nedeniyle yıldız şeklinde izlenen hücrelerdir (38). Bu yıldız şeklindeki uzantılar, metalik impregnasyon veya immünohistokimya ile görülür (41). Bu hücrelerin, yapılarını güçlendiren glial fibriler asit proteininden yapılmış ara filamanları bulunur. Astrositler, nöronları kapillerlere ve pia matere bağlar. Uzantıları az olan astrositlere “fibröz astrositler” denir ve bunlar beyaz cevher içinde yer alır. Çok sayıda kısa uzantılara sahip olan protoplazmik astrositler ise gri cevher içinde yer almaktadır (39,41,43).

Astrositler, yapısal işlevlerine ek olarak nöronların iyonik ve kimyasal ortamını kontrol eder (40). Astrositlerin uzantıları, bir yandan kan damarlarının duvarına yapışırken, diğer yandan nöronlarla bağlantıları nedeniyle kan damarı ile nöron arasında madde alışverişi sağlanır. Protoplazmik ve fibriler astrositlerin uzantıları, damarların çevresinde sonlanarak “astrovasküler ağ” (perivasküler membran) adı verilen destek bir yapı oluşturur. Ayrıca damarlar çevresinde pia materin uzantısı bulunur. Pia materin uzantısı ve astrovasküler ağın damarlar çevresinde oluşturduğu destek yapı “pia-glial zar” olarak tanımlanır. Damar adventisyası ile pia-glial zar arasında yer alan bu bölüm “Virchow-Robin aralığı” adını alır. Burası subaraknoid boşluğun devamıdır (39).

Travmada ve beyin dokusu yıkıma uğradığında, astrositler hiperplazi ve hipertrofi göstererek uzantıları çoğalır. Sitoplazma eozinofilik bir görünüm alır, nükleus ekzantirik yerleşir ve gemistosite benzer. Fibriler uzantılar, giderek travmaya uğramış alanı doldurur ve “glial skar” dokusu oluşur. Bu görünüm “gliosis” olarak tanımlanır (39,41-43).

Rosenthal fibriller, ince, oval ve uzamış, yoğun eozinofilik cisimler görünümünü almış astrosit uzantılarıdır. Genellikle travmada, glioziste, kraniofarengiom komşuluğundaki reaktif beyin dokusunda izlenir. Alexander hastalığında, lökodistrofilerde periventriküler, perivasküler ve subpial lokalizasyonda bol miktarda bulunur. Ayrıca pilositik astrositomlarda da saptanır (39,41,42).

2.2. GLİAL TÜMÖRLERİN GÖRÜLME SIKLIĞI VE YAYGINLIK DERECESESİ

Merkezi sinir sistemi tümörleri, yeni tanı konulan tüm malignitelerin % 2'sini oluştururken çocukluk çağı malignitelerinin % 20'sini oluşturur (1, 45). Amerika Birleşik Devletleri'nde yıllık yaklaşık 30.000 ila 35.000 yeni olgu bildirilmektedir (53). Yüksek morbidite ve mortalite ile beraber olan bu tümörlerin yaklaşık % 60 kadarını glial tümörler oluşturmaktadır. Merkezi sinir sistemi tümörleri içinde, ilk 15 yaşındaki primer tümörlerin % 40 - 45'i (bunlarında %35'i de düşük derecelidir), erişkin yaş grubunda ise % 50 - 60'ı astrosit kökenli tümörlerdir (44). Hemen tüm yaş gruplarında, erkeklerde kadınlara göre hafif bir fazlalık saptanmaktadır. İnsidans çalışmaları, yıllar içinde merkezi sinir sistemi tümörlerinin sıklığında hafif bir artış olduğunu göstermektedir (44, 45).

Serebellar astrositom bütün pediatrik beyin tümörlerinin %12'si ile %28'ini oluşturmaktadır. Çocuklardaki bütün tümörlerin yaklaşık yarısı infratentoryal alanda meydana gelir ve astrositom bunların yaklaşık üçte birini oluşturur. Modern görüntüleme çağında yayınlanan en yeni seriler ortalama yaşı 7 olduğunu bildirmektedir (54).

Düşük dereceli astrositomlar (DDA)'lar, erişkinlerdeki beyin tümörlerinin yaklaşık % 15'ini oluşturur (48). Dünyanın farklı bölgelerinde yürütülen çalışmalar, gliomaların yıllık ortalama görülme oranının yaklaşık 100.000'de 5.4 olduğunu göstermiştir (49). Bu veriler temel alınarak erişkinlerdeki DDA'ların yıllık sıklık oranının yaklaşık 100.000'de 0.8 olduğu söylenebilir (50). Başka bir deyişle beyin tümörü tanısı almış her 8 olgunun birinin patolojisi DDA'dır (51)

Primer beyin tümörleri insidans oranları ülkeler arasında da farklılık göstermektedir. Genetik ve çevresel etkenlerin önemli rol oynadığını gösteren kanıtlar mevcuttur. Tüm Asya Kıtası'nda primer beyin tümörü sıklığı azdır. Yine aynı ülkede yaşayan beyaz ırkdaki sıklığı, siyah ırka göre belirgin olarak daha fazladır (44). Genetik ve ailevi yatkınlık, beyin tümörlerinde en sık fakomatozlarla birliktelik gösterir. Nörofibromatozis tip 1'li hastalarda optik gliom ve meningiom, tüberoz sklerozlu hastalarda ependimom ve astrositom, von-Hippel-Lindau hastalığı olanlarda hemanjioblastom, feokromositoma ve retinal tümör gelişmesinin daha sık olduğu bilinmektedir. Kanserli aile sendromu olarak bilinen Li-Fraumeni sendromunda da beyin tümörleri sık görülmektedir. Ayrıca organ transplantasyonu olup immüniteyi

baskılayıcı tedavi alan kişilerde MSS tümörleri için artmış risk vardır. Benzer şekilde endojen immünsüpresyonun olduğu Wiskott-Aldrich sendromu ve Ataksi-telenjiyektazi, lenfomalar ve sporadik olarak MSS tümörleri ile ilişkilidir (45,46).

Çevresel faktörler ile MSS tümörleri sıklığı arasında ilişki olduğunu belirten yayınlar vardır. Çevresel faktörler içinde en iyi ortaya koyulan faktör radyasyondur. In utero dönemde, çocukluk çağında ya da erişkin çağda radyasyon tedavisi veya tanısal amaç ile maruz kalma, artmış MSS tümörleri sıklığı ile birliktedir. Daha önceki tümörü nedeniyle kranial radyoterapi almış çocuklarda, 2–24 yıl sonra ikincil MSS tümörü geliştiği bildirilmiştir. Bazı organik bileşimler (çoğunlukla nitrozaminler, nitrozüreler, hidrazinler, polisiklik hidrokarbonlar) deney hayvanlarında MSS kanserojenleridir ve in utero veya doğumdan sonra bu tür maddelerle maruz kalanlarda MSS tümörleri sık görülmektedir (45,47).

2.3. ASTROSİTOMLARIN DERECELENDİRİLMESİ VE HİSTOPATOLOJİ

Broders'in 1950 (66) yılında epitelyal tümörler için geliştirdiği derecelendirme sisteminin kullanılmasının ardından, 1949'da Kernohan, astrositomların derecelendirilmesi ile ilgili çalışmasını yayınlamıştır (56). Kernohan, astrositoma, glioblastoma multiforme ve polar spongioblastoma şeklindeki önceki sınıflandırmayı reddederek, bu tümörleri fibriler, gemisitositik ve protoplazmik astrositoma ile birlikte 1-4 arası tek bir astrositom kategorisi içinde gruplandırmıştır (67). Bu derecelendirmede tümör, artan anaplazi ve azalan farklılaşmayı içerecek şekilde düşük dereceli (I-II) ve yüksek dereceli (III-IV) astrositomlar olmak üzere, iki gruba ayrılmıştır. Ancak II. ve III. dereceler arasındaki ayırimda belirsizlikler vardır. Bu nedenler ile Ringertz 1950'de 3 dereceli bir sistem ortaya koymuştur (57). Ringertz (63) astrositik tümörleri astrositom, orta düzey tümörler ve glioblastoma multiform olarak ayıran üçlü bir dereceleme sistemini ortaya atarken, Burger ve Vogel (24), Nelson (69) gibi araştırmacılar yine bu tümörler için 3 aşamalı başka bir dereceleme sistemi önermişlerdir.

Derecelendirmenin sağlıklı olabilmesi için kesin patolojik kriterler ortaya konmalı ve buna göre karşılaştırmalı değerlendirmeler yapılmalıdır. Bu amaçla 1980'lerde Dumas ve Duport şimdi St. Anne/Mayo diye anılan, hücre morfolojik özelliklerine (pleomorfizm, mitoz, vasküler endotelial proliferasyon (VEP) ve nekroz)

dayanan 4 basamaklı derecelendirme sistemini ileri sürmüştür (58). Bu sisteme göre, özelliklerden hiçbirini görülmediğinde derece I, bir özellik varsa derece II, iki özellik varsa derece III, üç veya dört özellik bulunuyorsa derece IV olarak değerlendirilmektedir.

WHO 1993 yılında astrositik tümörleri histolojik veriler (pleomorfizm, mitoz, VEP, nekroz) kadar yaşam süresi verilerine de dayanarak benigninden maligne doğru derece I-IV olarak sınıflamıştır. Bu sistem pilositik astrositomu içeren grade I tümörler dışında büyük bir ölçüde St. Anne/Mayo sistemine benzer.

WHO'ya göre astrositik tümörlerde histopatolojik değişiklikler;

- a) Derece I astrositik tümör: Pilositik astrositom ve subependimal dev hücreli astrositom
- b) Derece II astrositik tümör: (Düşük dereceli) Astrositom (pleomorfizm ve yok/veya nadiren mitoz)
- c) Derece III astrositik tümör: Anaplastik astrositom (pleomorfizm ve belirgin mitoz)
- d) Derece IV astrositik tümör: Glioblastom multiforme (pleomorfizm + mitoz + VEP ve /veya nekroz)

Nükleer atipi: Nükleus, hiperkromazi ve/veya şekil ve ölçü bakımından net bir değişiklik gösteriyorsa nükleer atipinin mevcut olduğu düşünülür. Ancak, gözlenen nükleer ölçü ve şekil, minimal bir değişiklik gösteriyorsa bu durumda nükleer atipinin olmadığı görüşüne varılır.

Mitoz: Tespit edildiğinde normal ya da anormal konfigürasyonlu olup olmadığına bakılmaksızın mitoz mevcut olarak kabul edilir.

Endotelyal çoğalma: Vasküler lümen tek bir endotelyal hücre katından daha fazla bir endotel ile döşenmiş ise, endotelyal çoğalmanın olduğuna karar verilir. Endotelyal çoğalma, yeni oluşan kapillerden dolayı basit vaskülarite artışından ayırt edilmelidir. Hem astrositom hem de tümörün olmadığı durumlarda görülen bu tür neovaskülarite, beraberinde endotelyal çıkıntıyı da gösterebilir ancak bu durumda hücreler tek bir katman halinde lümenaya yerleşirler. Ayrıca, endotelyal çoğalma, renal glomeri andıran kıvrımlı kapillerden de ayrılmalıdır. Bu tür damarlar, tipik olarak pilositik astrositomda görülür ancak tek tabakalı endotelyum ile kaplanmışlardır.

Nekroz: Sadece belirgin olarak görüldüğünde nekrozun varlığına karar verilir. Açık nekrozla ilgili olmayan neoplastik çekirdeğin basit psödopolisadı, makrofajların varlığı

ve tek bir tümör hücre nekrozunun bulunması nekroz olarak kabul edilmemelidir. Nekrozlar, hücrelerin işleyen yapay ve mekanik distorsiyonundan ve koagülasyondan ayırt edilmelidir.

Bugün için en sık kullanılan sistem 2000 ve 2007 yıllarında yeniden gözden geçirilerek düzenlemeler yapılan WHO sınıflandırmasıdır (Tablo1). WHO sınıflaması bazı terminolojik değişiklikler ile yeniden yayınlanmıştır. En önemli değişiklik, daha önce WHO tarafından DDA olarak tanımlanan astrositomların, diffüz astrositom olarak isimlendirilmesinin önerilmesidir. Bu şekilde DDA tanımında, farklı antiteler olan pilositik astrositom, pleomorfik ksantroastrositom ve subependimal dev hücreli astrositom gibi iyi sınırlı astrositomların ayrı tutulması amaçlanmaktadır (28). Bu sınıflama, astrositik tümörleri büyüme paternlerine göre iki ana gruba ayırır. Birinci grup, histolojik derece bakılmaksızın komşu beyin dokusuna makroskopik görünenin ötesinde difüz infiltrasyon kapasitesi gösteren, difüz infiltran astrositik tümörlerdir. Belirgin oranda da anaplastik progresyon gösterirler. İkinci grup, daha iyi sınırlı, malign potansiyeli azalmış, komşu beyin dokusuna genellikle sınırlı infiltrasyon gösteren, spesifik subtipleri içeren astrositik tümörleridir (59-61).

Tablo1: WHO Astrositik tümör sınıflaması

Difüz infiltran astrositik tümörler	Derece
Difüz astrositom	II
Anaplastik astrositom	III
Glioblastoma multiforme	IV
Gliomatozis serebri	
Daha iyi sınırlı, astrositomların özel varyantları	
Pilositik astrositom	I
Pleomorfik ksantroastrositom	II
Subependimal dev hücreli astrositom (SEGA)	I

2.3.1. Pilositik Astrositom (WHO Derece I)

Pilositik astrositomlar (PA), çocukluk çağında ve genç erişkinlerde sık, daha ileri yaşlarda ise oldukça nadir görülen, iyi sınırlı, yavaş büyüyen primer merkezi sinir sistemi tümörleridir (76). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2007 yılı MSS Tümörleri

Sınıflaması'na göre PA Derece I tümördür (77). Bu sınıflamada Derece I, proliferasyon potansiyeli düşük olan, tek başına cerrahi rezeksiyon ile tedavisi mümkün tümörler için kullanılmıştır.

PA'lar tüm nöroaksiste yerleşim gösterebilirler. Çocukluk çağında daha sıklıkla infratentorial bölgede, bu bölgede de en sık serebellumda yerleşim gösterdikleri bilinmektedir. Yine çocukluk çağında supratentorial bölgede en sık hipotalamus ve optik yolda yerleşirler (78). Bunun dışında talamus, bazal ganglia, serebral hemisferler ve beyin sapında da yerleşim gösterebilirler (77).

Beyin sapı gliomları çocukluk çağı gliomlarının yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır. Beyin sapında ventral ponstan çok genellikle orta beyin ve medulla yerleşimlidirler (79). Medulla spinalis yerleşimli PA'lar seyrek ve genellikle daha ileri yaşlarda görülür(80). Ancak medulla spinalis tümörlerinde bu anatomik bölgede cerrahi girişimin yaratacağı olası riskler nedeniyle doku tanısı almamış tümör sayısı da oldukça fazladır. Bu tümörlerin bir bölümü radyolojik olarak PA'yı desteklese de bu sonuçlar PA'nın yerleşim bölgelerine göre verilen oranlara yansımamaktadır.

Hasta geçmişi karakteristiktir ve semptomların süresi dışında diğer posterior fossa tümörlerinden ayırt edilemez. Çoğunlukla obstruktif hidrocefali nedeni meydana gelen artmış kafa içi basıncın non-spesifik semptomları bulunur. Semptomlar genellikle sinsidir ve hikayesi detaylı incelendiğinde yıllardır aralıklı olarak var olan şikayetler şeklindedir. Bu tümörlerin yavaş büyümesi, serebellum ve beyin sapının yavaş yavaş genişlemesine yol açar. Uyarıcı semptomlar çoğunlukla masif tümörlerin ve hidrocefalinin gelişmesini bekler. Meydana gelen erken semptomlar genellikle non-spesifikdir ve sıklıkla viral hastalığa, migrene, gastrointestinal hastalığa ya da psikiyatrik problemlere bağlanır. Kesin tanı konulmadan önceki semptomların süresi Ilgren ve Stiller (91) tarafından bildirildiği gibi 18.7 aydan daha yeni literatür bilgilerindeki gibi 5.8 aya düşmüştür (92). Posterior fossa kitlesi nedeni uzun bir baş ağrısı ya da kusma geçmişi astrositom teşhisini ileri sürerken, sadece birkaç günlük veya haftalık bir geçmiş ependimom veya medulloblastom gibi daha hızlı progrese olan tümörü daha olasılıklı kılar. Günümüzde bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRG) kullanımının sıklığı, travma gibi ilişkisiz endikasyonlar için gerçekleştirilen görüntülemeler de rastlantısal lezyonlar olarak bulunan asemptomatik serebellar astrositomların insidansında bir artış olmasına neden olmuştur.

Baş ağrısı, posterior fossa tümörleri bulunan çocuklarda en yaygın semptomdur. Bazı serilerde neredeyse % 100' ünde meydana gelmektedir (91). Non-spesifik baş ağrısı çocuklarda yaygındır ancak bir posterior fossa tümörünün baş ağrısı karakteristiktir. Genellikle suboksipitalden önce frontal bölgede baş ağrısı görülür. Baş ağrısı suboksipital bölgeye lokalize olmuş hale geldiğinde, boyun ağrısı da bereberinde bulunur. Bu tablo kronik tonsiler herniasyonu akla getirir. Sadece sabahları meydana gelen ve faaliyetle azalan baş ağrıları anlamlıdır. Uykuyla ilişkilenen hipoventilasyon ve baş pozisyonu nedeniyle artan intrakraniyal basıncın kombinasyonu uyarırken meydana gelen baş ağrısını tetikler. Ağrı çocuğu uykudan bile uyandırabilir. Öksürme, aksırma ya da dışkılama sırasında baş ağrısı tetiklenebilir ve bazı çocuklar rahatsız oldukları için kontsipte olabilirler.

Kusma yaygın bir semptom olmasının yanı sıra genellikle sabahları görülün bulantı ile ilişkilendirilmeyen projektıl tarzıdır. Diğer semptomlar olmaksızın persistan kusma genellikle kapsamlı gastrointestinal değerlendirmeyle araştırılır ya da psikojenik faktörlere bağlanır. Bu nedenle bir çocuktaki persistan kusmanın değerlendirilmesinde kranial görüntülenmesine de yer verilmelidir.

Üçüncü karakteristik semptom ataksidir ve serebellar astrositomu bulunan daha büyük bir çocuk genellikle “her zaman sakar bir çocuk” olarak tanımlanır. Muayenede nistagmus, dismetri ya da geniş tabanlı yürüyüş ortaya çıkarabilir. Viral serebellit ya da akut çocukluk çağı serebellar ataksi olduğu tahmin edilen her çocuk, katastrofik herniasyonu önlemek için lomber ponksiyon yapılmadan önce mutlaka kranial görüntülenmelidir.

Diğer belirti ve semptomlar arasında makrosefali, kişilik değişikliği, tortikolis ve baş dönmesi yer alabilir. Hidrosefaliye eşlik eden altıncı sinir etkilenmesine bağlı diplopi görülebilir. Diğer kranial sinir parazileri beyin sapı tutulumunu gösterir. Vermisteki tümörler daha genç yaşta, serebellar hemisferdeki lateral yerleşimli tümörlerin ise daha ileri yaş hastalarda meydana gelmesi olasıdır (90).

PA mikroskopik olarak genellikle gri beyaz renkte, sınırları seçilebilen tümörlerdir. Tümör içinde veya çevresinde kist oluşumu sıktır. Uzun süreli lezyonlarda kalsifikasyon görülebilir (77).

PA'lar histopatolojik olarak bipolar hücrelerin oluşturduğu, Rosenthal fibrillerden zengin kompakt alanlar ve multipolar hücrelerin oluşturduğu mikrokistler ile eozinofilik granüler cisimlerden zengin gevşek alanlar içeren bifazik görünüme sahiptir. Difüz astrositomlar için anaplastik özellikler sayılabilecek glomerüler vasküler proliferasyon ve nekroz PA'lar için dereceyi yükseltmeyecek olası bulgulardır (81). Ancak yüksek dereceli difüz astrositomların bir özelliği olan endotelial proliferasyon PA' larda gözlenmez (82). Regresyon bulguları olarak hyalinize damar yapıları, hemosiderin birikimi, kalsifikasyon, perivasküler lenfositler görülebilmektedir (83). Hiperkromatik ve pleomorfik nükleuslu hücreler de PA'da izlenebilir. Seyrek mitoz görülebilir (77). Kompakt alanlardaki uzun, saçsı uzantıları olan bipolar hücreler benign görünümdedir. Bu alanlarda sıklıkla rastlanan Rosenthal fibriller aslında astrositlerin intrasitoplazmik yerleşimli inklüzyonlardır. İlk olarak 1898 yılında Werner Rosenthal tarafından "ampul ya da dalgalı bir sosis şeklinde, bir ucu geniş diğer ucu dar, parlak oluşumlar" olarak tanımlanmıştır. PA ve gangliogliom gibi neoplastik dokularda görülebileceği gibi, kist ya da vasküler malformasyonları çevreleyen reaktif gliotik dokuda, Alexander Hastalığı gibi genetik bozukluklarda da görülebilmektedir(84). Mikrokistik alanlardaki hücreler ise protoplazmik astrositler olarak isimlendirilen, oval-yuvarlak şekilli nükleuslu, sitolojik olarak benign, kısa örümcek ağı benzeri uzantıları olan hücrelerdir. Bu alanlarda eozinofilik granüler cisimler ve hiyalen damlacıkları sıklıkla gözlenir (85, 86). Bunlar PAS pozitif intrasellüler birikimlerdir. PA dışında ganglion hücreli tümörler ve pleomorfik ksantoastrositomlarda (PXA) da görülebilirler (89). Tümör içerisinde oligodendrosit benzeri hücreler gözlenebilir (77). Bifazik patern en sık serebellar tümörlerde gözlenir. Kimi zaman ise özellikle leptomeningial tutulum olduğunda belirgin dezoplastik reaksiyonun neden olduğu lobüler bir görünüm, bazen de tümöral hücrelerde çit benzeri dizilim ya da organoid yapılar görülebilir (77). Bu durumlarda tümörün sınıflandırılması konusunda güçlükler yaşanabilir.

Pilositik astrositomlarda tanımlanan histopatolojik tipleri şunlardır:

- 1) Difüz pilositik astrosito
- 2) Anaplastik pilositik astrositom
- 3) Pilomiksoid astrositom

Difüz gliomlara göre PA'lar oldukça iyi sınırlıdır, ancak çevre parankime birkaç milimetreden santimetrelere kadar ilerlemiş olabilecekleri bilinmektedir. Bu durumlarda arada sıkışmış nöronal hücreler izlenebilir. Ancak bu nöronlar sitolojik olarak tamamen benign görünümündedir(77,87). PA'larda tümör subaraknoid alana ya da perivasküler boşluklara uzanabilmekte, leptomeningial yayılım gözlenebilmektedir (88). Pilomiksoid astrositom özellikle yenidoğan ve erken çocukluk çaığında görülmektedir. Çoğunlukla hipotalamik/kiazmatik bölgede meydana gelir. Çoğu pilositik astrositomun aksine, pilomiksoid astrositomlarda, Rosenthal fiberler ve EGB'ler ya göze çarpmaz veya hiç bulunmaz. Lokal nüks ve beyin-omurilik sıvısı yayılımı PA'lara göre daha sıktır. WHO tarafından Derece II olarak değerlendirilmiştir (77).

Pleomorfik ksantoastrositom (PXA; WHO derecesi II) tipik olarak nöbet hikayesi bulunan çocuklarda ve genç erişkinlerde yüzeysel serebral yerleşimde meydana gelen astrositomun iyi sınırlı varyantıdır. Sıklıkla temporal lob yerleşimlidir. Histolojik olarak, PXA' da dikkat çekici pleomorfizm bulunması GBM' i taklit ederek seviyededir. Ancak mitotik aktivitenin azlığı, vasküler proliferasyonun ve nekrozun bulunmaması doğru tanı için ipuçları sağlar ve aynı zamanda diğer iyi sınırlı tümörlerde de (pilositik astrositom ve gangliogliom gibi) görülen EGB'lerin karakteristik varlığı PXA'nın daha da güçlü bir ayırt edici özelliğidir. PXA'lar yaklaşık olarak %15'i nükseder ve anaplastik olarak yüksek dereceli bir diffüz astrositoma ilerler.

Subependimal dev hücreli astrositom (WHO derecesi I), morfolojik ve immünohistokimyasal olarak gemistosit veya ganglion hücrelere, veya her ikisine de benzeyen geniş hücrelerden oluşan intraventriküler bir tümördür. Bu tümör, her ne kadar bu durum genel olarak ilk değerlendirmede bilinmese de, neredeyse sürekli olarak tüberoz sklerozle ilişkilendirilir. Cerrahi rezeksiyon küratiftir.

2.3.2. Difüz Astrositom (WHO Derece II)

Difüz astrositom terimi, erişkinlerin düşük dereceli (WHO derece II) difüz astrositomlarını belirtir. WHO sınıflandırılmalarında daha önceleri “astrositom” terimi kullanılırdı. Difüz astrositomlar, hücrel diferansiyasyon, yavaş büyüme ve çevre beyin parankiminin diffüz infiltrasyonu ile karakterizedir. Anaplastik astrositom ve glioblastoma multiformeye kadar ilerlemeye yatkınlıkları vardır (44, 62, 64).

Difüz astrositomlar, tüm astrositik beyin tümörlerinin %10–15’ini oluşturur. Genellikle daha genç yaşları etkiler ve hastaların yaşları ortalama 35’dir. Erkek/kadın oranı: 1.18/1 dir (44, 64).

Difüz astrositomlar, MSS’nin herhangi bir bölgesinde yerleşim gösterebilir. Ancak, hem çocuklarda hem de erişkinlerde en sık serebrumda supratentorial olarak yerleşir. DDA’lar ağırlıklı olarak beyin konveksitesi içinde görülürler. Sıklıkla frontal loblarda meydana gelir ve bunu azalan insidans sırasıyla temporal ve parietal lob lezyonları izler (72). Bu tümörler bazal ganglia ve talamusda nadir de olsa görülebilmektedir. Ancak bu tür bir lokalizasyonda prognoz, hemisfer içindeki benzer bir lezyonun prognozundan daha kötüdür (73). Beyin sapı ve spinal kord diğer en sık etkilenen alanlardır. Serebellum yerleşimi nadirdir.

Hastalarının %50 ile %80’inde, çoğunda nörolojik muayenede defisit yokken, ilk semptom olarak nöbetler görülür. (93). Hastalar çoğunlukla tümörün boyutu ve yerleşiminden kaynaklı semptomlar gösterir. Bunlar artan intrakraniyal basınç (baş ağrısı, bulantı, kusma, letarji, papilla ödemi), fokal nörolojik kayıplar (motor ve duyu defisitleri, görme bozuklukları, agnozi, afazi) ve duyu durum bozukluğu (değişen kişilik, dezinhibisyon, apati) belirti ve semptomlarını kapsar.

Birçok çalışmada, hastaların %81’inden fazlasında DDA’nin tanı almasına nöbetler neden olmaktadır (94). Nöbetler görülen hastaların yaklaşık %50’si anti-epileptik tedaviye rağmen rezeksiyon sonrasında kontrol dışı nöbetler geçirmektedir. Bir hastanın nöbet durumunun dikkatli bir şekilde ele alınması DDA’lı hastalar için olağanüstü önem taşımaktadır. Çünkü nöbetler yaşam kalitesini büyük ölçüde etkilemektedir. Anti-epileptik ajanların ötesinde, cerrahi rezeksiyon DDA’lı hastaların üzerindeki nöbet yükünü azaltmanın etkili bir yoludur. Postoperatif olarak, nöbetlerin bulunmamasıyla ilişkilendirilen faktörler makroskopik toplam tümör rezeksiyonu, bir yıldan daha az preoperatif nöbet geçmişi ve basit olmayan parsiyel nöbet tipidir. Ancak

bazı hastalarda anti-epileptik ilaçların sürekli kullanımı gerekli olabilmekte ve bu hastalarda persistan nöbet faaliyeti için ek bir operasyon gerekebilmektedir.

Difüz astrositomlar infiltratif yapıları nedeniyle, genellikle makroskopik olarak belirsiz sınırları olan, sarı-beyaz, homojen kitle şeklindedir. Tutulan anatomik yapılarda genişleme ve şekil bozukluğu vardır, fakat destrüksiyon yoktur. Makroskopik morfolojileri, tümör tipine göre değişkenlik göstermektedir. Protoplazmik tipte, tümör süperfisyel gri cevherde kortikal genişleme alanı olarak gözlenirken, tümör sınırları net olarak izlenemez. Kist formasyonu sıklıkla bulunan yumuşak ve homojen bir tümördür. Fibriler tümörler ise daha sert lastik kıvamındadır. Kalsifikasyon fokal ya da diffüz kum taşı şeklinde izlenebilir (41,61-64).

Difüz astrositomlarda tanımlanan histopatolojik tipler şunlardır:

- 1) Fibriler astrositom
- 2) Gemistositik astrositom
- 3) Protoplazmik astrositom

Derece II astrositik tümör içinde, her üç hücre tipi de belli oranlar içinde bulunurken, önde gelen hücre tipine göre o tümör sınıflandırılır. Bunların içinde en sık görülen, fibriler astrositomlardır. Gemistositik astrositom grade II astrositik tümörlerin %20'sini oluşturur, sıklık açısından ikinci sıradadır, daha malign formlara dönüşme konusunda yüksek bir riske sahiptir. Bu nedenle bunların prognozu, diğer düşük dereceli astrositomalara göre daha kötüdür (50,70). Protoplazmik astrositom ise oldukça nadir olup derece II astrositik tümörlerin %1 ini oluşturur (43,62,64).

Difüz astrositomlar, gevşek olarak yapılanmış, sıklıkla mikrokistik tümör matriksinde, iyi diferansiye fibriler ya da gemistositik neoplastik astrositlerden oluşur. Selülerite orta derecede artmıştır ve seyrek nükleer atipi, tipik özelliktir. Mitotik aktivite genel olarak yoktur. Tek bir mitoz anaplastik astrositom tanısına izin vermez. Nekroz ya da mikrovasküler proliferasyon olması difüz astrositom tanısı ile uyuşmaz. Neoplastik astrositlerin fenotipi, boyut, alan, hücre uzantılarındaki değişiklikler ve sitoplazmik glial filamentlerin miktarına bağlı olarak değişik olabilir (41,42,64).

Neoplastik astrositlerin, hemotoksilen-eozin (HE) ile boyalı kesitlerde histolojik olarak tanımlanması, esas olarak nükleer özelliklere dayanır. Nükleus tipik olarak veziküledir. Oval, uzamış, incelmış olarak izlenir. Enine kesitlerde yuvarlak görülür. Orta yoğunlukta kromatin kitlesi ve sıklıkla belirgin nükleolusları vardır. Sitoplazma

zor seçilir. Müsinöz materyal içeren mikrokistler karakteristik yapılardır. Selüler lezyonlarda neoplastik hücre uzantıları gevşek fibriler matriks oluşturur. Fibriler astrositomlar, değişen miktarda gliofibriler matriks içerir. Gemistositik astrositomlar, parlak eozinofilik sitoplazma ve kaba, rastgele dağılmış fibriler uzantılara sahiptir. Nükleus genellikle eksantiriktir, küçük nükleolusu vardır. Protoplazmik astrositomlarda zayıf fibriler matriks mevcut olup hücreler yıldızlımsı şekillidir ve mikrokistler örümcek ağı görünümü verir. Tümörler arasında ve aynı lezyon içinde histolojik değişiklikler olabilir. Ancak belirgin bir ayırım her zaman mümkün değildir (41, 55, 61-64).

Tüm difüz astrositomların anaplastik astrositomaya progresyon riski mevcuttur. Özellikle gemistositik astrositik tümörlerde bu oran %80'e kadar çıkmaktadır (64).

2.3.3. Anaplastik Astrositom (WHO derece III)

Anaplastik astrositom (AA) için kullanılan diğer terimler, malign astrositom veya astrositom derece III' dür (15). Anaplastik astrositom, fokal ya da dağınık anaplazi ile birlikte diffüz infiltran astrositom ve belirgin proliferatif aktivite içeren heterojen bir tümör grubudur. AA de novo gelişebildiği gibi sıklıkla düşük dereceli astrositomlardan da gelişir. Difüz astrositomların tüm tiplerinde, anaplastik değişim eğilimi bulunur (43,59-62,64). Görülme yaşı, ortalama 41 olup, düşük dereceli astrositomlardan daha yüksek ancak glioblastom multiforme olan hastalardan anlamlı olarak daha düşüktür. Anaplastik astrositomun erkek/kadın oranı 1.8/1'dir. Sıklıkla serebral hemisifer yerleşimlidir (46, 64).

Semptomlar derece II astrositoma benzer. Klinik olarak en sık rastlanan bulgu klasik intrakranial basınç artışı semptomlarıdır (baş ağrısı, kusma, bilinç bozuklukları, 3. ve 6. sinir tutulumları). Yerleşim bölgesine bağlı olarak nörolojik bulgular meydana gelmektedir. Epileptik nöbetlerin ortaya çıkması, frontal ve temporal yerleşimli tümörlerde siktir. Nadiren inmeye benzer şekilde ani başlangıçlı olarak ortaya çıkabilmektedir. Olguların büyük çoğunluğunda ilk klinik yakınma ile hekime başvuru arası süre 1 ay ile 1 yıl arasında değişmektedir (43, 46, 64).

Anaplastik ve diffüz astrositomu makroskopik olarak ayırmak sıklıkla mümkün değildir. Anaplastik astrositom difüz astrositoma göre daha selüler olduğu için kesit yüzeyinde daha kolay fark edilen tümör kitlesi oluşturur. Belirgin doku yıkımı

olmaksızın infiltrasyon yapma eğilimi vardır. Makroskopik kistler nadirdir, fakat sık olarak granüler, opak ve daha yumuşak kıvamlı alanları vardır (44, 55, 61-64).

Anaplastik astrositom histopatolojik olarak, artmış selülerite, belirgin atipi ve göze çarpan mitotik aktivite içerir. Önemli tanısal kriteri, bölgesel ya da difüz hiperselüleritedir. Nükleer şekil ve boyut farkında artış, kaba dağınık kromatin, nükleol belirginliği, anormal mitozlar tanıda önemlidir. Kapillerler tek sıralı endotel hücreleriyle döşelidir. Mikrovasküler proliferasyon ve nekroz yoktur. Seyrek olarak vasküler endotelyal büyüme faktör (VEGF) salınımı ve yeni başlamış mikrovasküler proliferasyon bölgesel olarak gözlenebilir. Mikrovasküler proliferasyon ve nekrotik odakların bulunması glioblastoma multiformeye ilerlemeyi yansıtır, anaplastik astrositom tanısıyla bağdaşmaz (44,61-64).

2.3.4. Glioblastoma Multiforme (WHO derece IV)

Az diferansiye astrositlerden oluşan en malign ve en sık görülen beyin tümörüdür. Yaklaşık olarak tüm intrakraniyal tümörlerin %12-15'ini ve astrositik tümörlerin %50-60'ını oluşturur. Herhangi bir yaşta görülebilirse de sıklıkla 45 ve 70 yaşları arasında saptanır. Erkeklerde daha sık görülür (44,62,64).

GBM'ler iki ayrı yolla oluşur; Primer GBM (de novo) 50 yaş üzeri hastalarda, öncü bir lezyon olmaksızın kısa bir klinik öyküyü takiben saptanır. Sekonder GBM ise düşük dereceli gliomaların zaman içinde değişime uğraması ile oluşan P53 mutasyonlarından kaynaklanır ve daha çok genç yaş grubunu etkiler (74,75). GBM yetişkin kanser ölümlerinin % 2'sinden sorumludur. BT ve MRG gibi görüntüleme imkanlarının yaygınlaşması, ve değişen çevre koşulları nedeniyle son yıllarda GBM görülme sıklığında artış olduğu görüşü mevcuttur.

GBM sıklıkla serebral hemisferlerin derin beyaz cevherine yerleşir. Kombine fronto-temporal lokalizasyon tipiktir. Tümör sıklıkla komşu korteks, bazal ganglionlar ve korpus kallosum boyunca karşı taraf hemisfere infiltrasyon gösterir. Genellikle dağınık ve derin yerleşimleri nedeniyle birden fazla fonksiyonel beyin bölgesini tutar. Bu nedenle tümörü cerrahi olarak çıkarmak zorlaşır. Glioblastomların yaklaşık %10'u derin yerleşimli değildir, beyaz-gri cevher sınırına yerleşerek metastazlara benzeyen lezyon oluşturur (41,63,65).

Semptomlar ve belirtiler GBM'li hastalarda non-spesifiktir. Yaygın olarak, hastalarda baş ağrısına, bulantı ve kusmaya, bulanık veya çift görme ve sersemliğe

neden olabilen kafa içi basınç artışı görülmektedir. Bu belirti ve semptomlar ekstraoküler paralizi, objektif papil ödemi, pupil anomalileri veya azalan şuur düzeyiyle ilişkilendirilebilir. Tipik olarak sabahları daha belirgindir ve gün boyunca artış gösterirler. Aralıksız ilerleyen başağrıları bu tümörlerin semptomatolojisinin kendine has özelliğidir. GBM'li hastaların yaklaşık üçte biri nöbet geçirir. Nörolojik defisit yaygındır ve tümör infiltrasyonunun yerleşimine ve kapsamına göre değişiklik gösterirler. Bu defisitler fokal ya da global olabilirler (bilinç ve kişilikte değişiklik). GBM hastalarında yaygın olmasına rağmen, bu lezyonlardan kaynaklanan nörolojik defisitler genellikle hafiftir ve beyin tümörü teşhisinden sonrasına kadar fark edilememiş olabilir.

Glioblastomlar makroskopik olarak kötü sınırlıdır. Kesit yüzeyi çeşitli renktedir. Eski ve yeni kanama alanları, merkezindeki nekroz total tümör kitlesinin %80 kadarını oluşturabilir. Makroskopik kistler bulunduğu zaman, likefaksiyon gösteren nekrotik tümör dokusunu yansıtan sıvı içerir. Lezyon genellikle unilateraldir. Ancak beyin sapı ve korpus kallosum tutulumunda bilateral-simetrik olarak kelebek görünümü saptanır (44,62,63).

Glioblastoma multiforme (GBM) terimi bu tümörün çeşitliliğini ifade eder. Tümörde, hücre morfolojisinde ileri derecede değişiklik izlenir. Bazı lezyonlarda çok sayıda multinükleuslu dev hücreler ile nükleer pleomorfizm ve hiperselülarite izlenirken, bazıları hiperselüler fakat oldukça monotondur. Hücreler belirgin nükleer atipi içerir. Az diferansiye alanlarda iğsi veya yuvarlak pleomorfik hücreler hakim olabilir, daha diferansiye neoplastik astrositler fokal olarak fark edilebilir. Tümörde diferansiyasyon alanları arasındaki geçiş tanınabilir (41,62-64).

Glioblastomda tanı, tipik olarak ana hücre tipinin belirlenmesinden çok doku paternine bağlıdır. Oldukça anaplastik glial hücrelerin, mitotik aktivitenin, mikrovasküler proliferasyonun, mikrovasküler proliferasyon ve/veya nekrozun varlığı gereklidir (41,65,72).

Glioblastomun tanımlanan histolojik tipleri:

- 1) Dev hücreli glioblastom
- 2) Gliosarkomdur.

Dev hücreli glioblastom, gliomların %5 kadarını oluşturur. Yaş dağılımı daha geniş bir yelpazeyi kapsar, çocukları da içine alır. Kısa bir klinik hikayeyi takiben de novo gelişir. Çok sayıda dev hücreler, küçük iğsi sinsityal hücreler ve artmış retikülin çatı ile birlikte olan bir glioblastomdur. Hem psödopalizatik hem de geniş iskemik nekroz alanları, atipik mitozlar içerir. Çoğu dev hücreli glioblastom kötü prognoza sahiptir. Ancak bazı yayınlarda klinik gidişin klasik glioblastomdan daha iyi olduğu bildirilmiştir (44,62,64).

Gliosarkomalar, GBM (WHO derecesi IV) vakalarının %2'si ile %8'ini oluşturmaktadır (95, 98). Gliosarkom ve GBM'de klinik bulgular ve prognoz benzerdir (97). Meis ve arkadaşları yaş, cinsiyet, tedavi öncesi Karnofsky Performans Durumu skoru (KPS), ortalama yaşam oranı, tümör yerleşimi ve boyutuna ilişkin olarak gliosarkomla GBM arasında hiçbir anlamlı fark olmadığını bildirmiştir (97). Ortalama yaş 53 olmakla birlikte, çoğu gliosarkom vakası 40 ile 60 yaşları arasında meydana gelmektedir (97, 77). Ancak gliosarkom aynı zamanda çocuklarda da meydana gelebilir. Nadir görülen durumlarda, infantil gliosarkom bile bildirilmiştir (58). Gliosarkom erkeklerde kadınlarda görüldüğünden daha sık meydana gelir. Erkek-kadın oranı 1.8:1 dir (97, 77). Jack ve arkadaşları AA ve GBM'nin aksine, gliosarkomun dural invazyona karşı belirgin bir eğilimi olduğunu ve vakaların yaklaşık yarısında karma bir dural ve pial vasküler beslenmesi olduğunu bulmuşlardır (102). Gliosarkom semptomları GBM'e benzerlik gösterir (96,97,98,100). Semptomlar geniş ölçüde primer tümörün yerleşimi ve artan intrakranial basınç varlığıyla belirlenir (103). Bulantı, nöbetler ve kişilik değişikliği de meydana gelebilmesine rağmen, gliosarkomun en yaygın semptomları baş ağrısı ve hemiparezidir. Gliosarkomun en yaygın belirtileri fokal nörolojik defisit, görüş alanı kusurları, papilla ödemi ve disfazidir (77, 98, 101).

2.4. GLİAL TÜMÖRLERDE TANISAL GÖRÜNTÜLEME

Gliyal tümörlerde laboratuvar tetkikleri tanıya yardımcı olmaz. Tanı görüntüleme teknikleri ile konulur. MSS tümörü bulunduğu düşünülen olgularda, bilgisayarlı tomografi (BT) ve magnetik rezonans görüntüleme (MRG) tekniklerinin klinik olarak kullanılması, nöroradyolojik değerlendirme aşaması için bir devrim yaratmıştır. Böylece tümörün tespiti, preoperatif yayılımı ve büyüklüğü, tümör rezeksiyonunun sınırları, postoperatif komplikasyonlar, tümör rekürrensini takibi, tümörün radyoterapi ve kemoterapiye cevabı yeterli şekilde değerlendirilmektedir.

2.4.1. Düşük dereceli gliyal tümörlerin görüntülenmesi

DDA'ların karakteristik BT bulguları arasında etraf dokulardan ayırt edilemeyen izohipodens bir kitle ve etrafında belirgin ödem ve kitle etkisi olmaması sayılabilir. Kontrast madde tutulumunun olmaması kan beyin bariyerinin genellikle bozulmadığına işaret etmektedir. DDA'larda kalsifikasyon oranı %10-20 arasındadır ve kalsifikasyonların görüntülenmesinde BT'nin belirgin üstünlüğü vardır (71). Fonksiyonel alanlara göre tümör lokalizasyonu, tümörün çıkarılabilirliği ve dolayısı ile olgunun prognozunu etkileyen önemli faktörlerdendir (106-108). BT neoplazmik oluşumların yapısını tam olarak belirlemeyebilir (50,109). BT taraması normal çıksa bile sadece MRG ile düşük derece astrositomların tespit edilmesi hiç de ender bir durum değildir (134). Ayrıca çoğu kişi, MRG' nin bu lezyonları teşhis etmek için günümüzde kullanılan en hassas inceleme olduğuna inanmaktadır (Resim 1 ve 2) (110). Klasik olarak ödem olduğu düşünülen T2 sekans MR görüntülemedeki yüksek yoğunluklu bölgenin, değişken tümör bileşenine sahip olduğu gösterilmiştir (104,108,110).

BT taramasında lezyonun kontrast enjeksiyonu ile belirginleşmesi düşük dereceli astrositomlu olguların kötü prognozu arasında bir ilişki olup olmadığı tartışmaya konu olmuştur. İlk yayınlanan makalelerden birinde, kontrast artışının bu tümöre sahip olgularda prognostik bir değer taşımadığı rapor edilmesine karşın (111) daha sonra sunulan daha büyük bir seride, BT taramasında intravenöz kontrast madde verildikten sonra tümörü belirginleşen olguların lezyonu belirginleşmeyen olgulara göre daha kötü bir prognoza sahip oldukları ileri sürülmüştür (112). Bu bulgu, retrospektif bir

çalışmayla güçlü bir biçimde desteklenmiştir. Bu çalışmaya göre; BT taramasında kontrast artışı görülen vakalarda tümör nüksü riski, bu tür bir artışın görülmediği vakalara kıyasla yaklaşık 7 kat daha fazladır (50, 113). Bu verilere göre, DDA'lı olduğu bilinen olguları tümörün malign dönüşüm yönünden değerlendirmede BT taramasında kontrast artışı büyük bir önem arz eder (114).

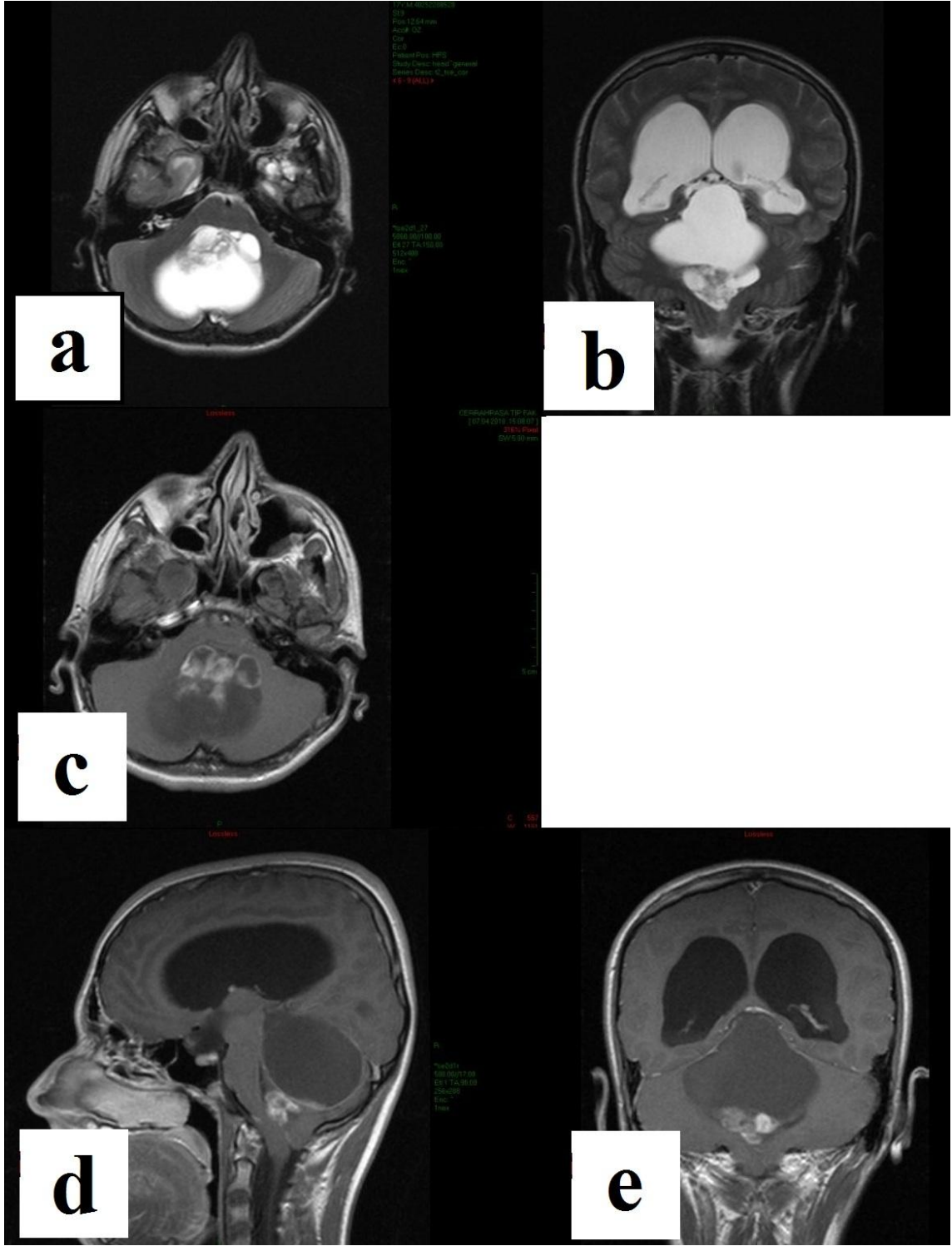
MR görüntüleme intrakranial tümörlerde, kitlenin tespiti ve büyüklüğü konusunda mevcut en duyarlı görüntüleme yöntemidir. Kelly ve arkadaşları, kitlenin T2 sekanslarında gösterdiği anormal bulguların, aynı lezyonun BT'sindeki bulgulardan daha değerli olduğunu ortaya koymuştur (104). Aynı zamanda kontrast tutulumu yönünden MRG, BT'deki kontrast tutulumuna göre daha detaylı bilgi vermektedir (115). DDA'lar genellikle beynin, en fazla ak maddeye sahip bölgelerinde görülmekte ve frontal loblarda biraz daha sıklıkla bulunmaktadır. MRG'de astrositomlar genellikle iyi sınırlı, homojen kitle lezyonları olarak görülmektedir. Lezyonlar T1 sekanslarda hipointens, T2 sekanslarda hiperintens görülmektedir. Sinyal artışı bölgesi, hemoraji ya da nekroz bulgusu olmaksızın genellikle homojen ve sınırları belirlidir (118). Genellikle yüzeysel lezyonlar olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Fibriller astrositomlar genellikle ak madde tutulumu ile seyrederken, protoplasmik astrositomlar korteksi daha fazla tutmaktadır (116).

Postoperatif rezidü tümörün ortaya konması için yapılan kontrastlı MRG tetkiklerinde, rezeksiyon sahasında da kontrast tutulumunun olması değerlendirmeyi zorlaştırmaktadır (71). Günümüzde önerilen postoperatif ilk 24-48 saat arasında yapılacak MRG tetkikinin, rezidüel tümör'ün ortaya konulması açısından yeterli olabileceğidir (71). Winger ve arkadaşları, kortikosteroidlerin tümörlerin kontrast tutulum paternini azaltarak değiştirebileceğini göstermişlerdir (117). Steroidler tümörün kontrast tutulumunu ve peritümoral ödemi azalttığından gliomalarda tedavi sürecinin MRG ile değerlendirilmesinde olguların steroid alıp almadıkları göz önünde tutulmalıdır (71). MRG taramasında çoğu vakada tümörün kendisini, onu çevreleyen ödem bölgesinden ayırmak zordur. Kesin olmasa da gadolinyum gibi kontrast maddesi kullanımıyla, MRG'de küçük lezyonlar tespit edebilmek mümkündür (50). DDA'lara özgü bir MRG paterni (iyi sınırlı, homojen, T1 sekansda hipointens, T2'de hiperintens gri madde kalınlaşması) olmasına rağmen, bu tür bir patern düşük dereceli tümörler için her zaman tanısal değildir. Bir grup, BT ve MRG taramalarında düşük grade astrositom tanısını çağrıştıracak türde lezyonları olan 20 erişkin olgu üzerinde stereotaktik biyopsi

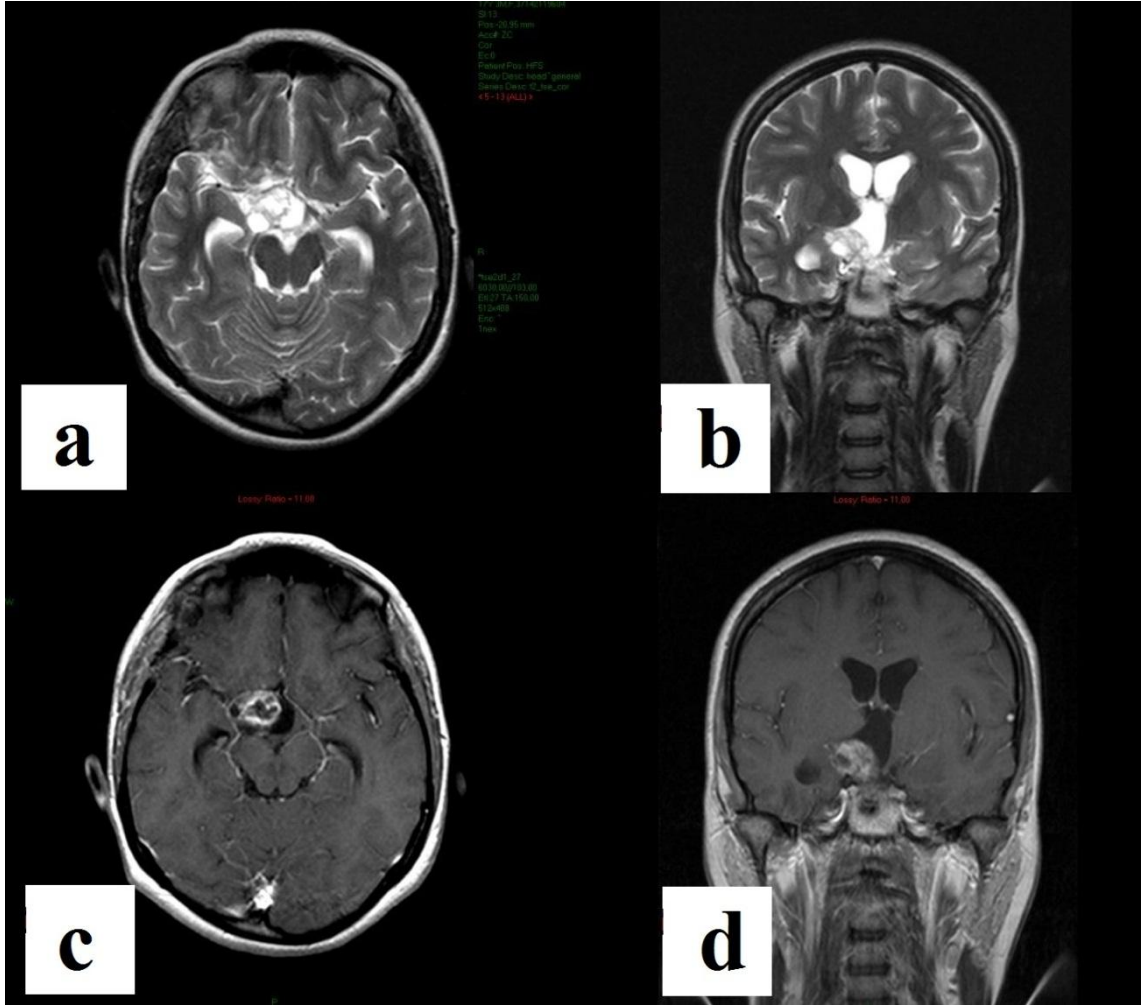
uygulanmış. Ancak histolojik analizler, bu olguların sadece % 50'sinin düşük dereceli astrositoma sahip olduğunu, % 45'inin de anaplastik astrositom olduğunu ortaya çıkarmıştır (119) . Diğer çalışmalarla birlikte bu çalışmadan çıkarılacak sonuç, modern yüksek çözünürlüklü MRG taramanın tek başına DDA teşhisini güvenli bir biçimde yapamayacağı ve bu nedenle histolojik bir doğrulamanın da gerekli olduğudur (50). Bunun dışında DDA'lu olgular ilk kez değerlendirilirken ya da tümörün yüksek dereceye dönüşüp dönüşmediği belirlenirken; pozitron emisyon tomografisi (PET), tekli foton emisyon bilgisayar tomografisi (SPECT) ve manyetik rezonans spektroskopisi (MRS) gibi daha yeni ve ileri tarama teknikleri de kullanılabilir (50). DDA, hipometabolik bir lezyon olduğu için PET taramasında “soğuk nokta” olarak görülürken bu tümörler daha malign bir yapıya dönüştüğünde, hipermetabolik hale dönüşecekleri için PET taramasında “sıcak nokta” olarak gözlenirler (50). PET nükseden tümör ile radyasyon nekrozunu ayırt etmede kullanılabilir (120).

MRG radyasyon nekrozu ile rezidü veya nüks tümör ayırımının yapılmasında yeterli olmamaktadır. Burada, F-2-fluoro-2-D-deoxyglukoz metabolitini kullanan PET tekniği yararlı olabilir. Fonksiyonel bir görüntüleme yöntemi olan PET scanning'de serebral glukoz metabolik aktivitesi gözlenmektedir. Glukoz aktivitesi burada nekroz olduğunda düşmekte, rekürren tümörde ise artış göstermektedir. DDA'lar da ise etraftaki gri maddenin metabolik aktivitesine yakın düşük bir aktivite göstermektedir (20). MRS ile yapılan bir çalışma sonucunda, kolin düzeyinde zamanla gözlenen artışın DDA'larda malign dejenerasyonla uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır (122).

MRS ise intrakranial belli bir bölgenin enerji metabolizmasının haritasını çıkarabilmektedir (71). MR spektroskopisi her ne kadar glial tümörlerin histolojik derecesinin ortaya konmasında tam olarak yeterli olmasa da, kolin tutulumundaki bir artışla, NAA değerlerinin azda olsa azalması veya aynı kalması, radyasyon nekrozundan ziyade tümör rekürensine lehine bulgu olarak, iki patolojiyi ayırmaktadır (105).



Resim 1: Piloitik astrositom (WHO I) MRG görüntüleri. a.Aksiyel ve b. Koronal T2 ağırlıklı kesitler ve Kontrastlı c.Aksiyel; d.Sagittal ve e.Koronal kesitler



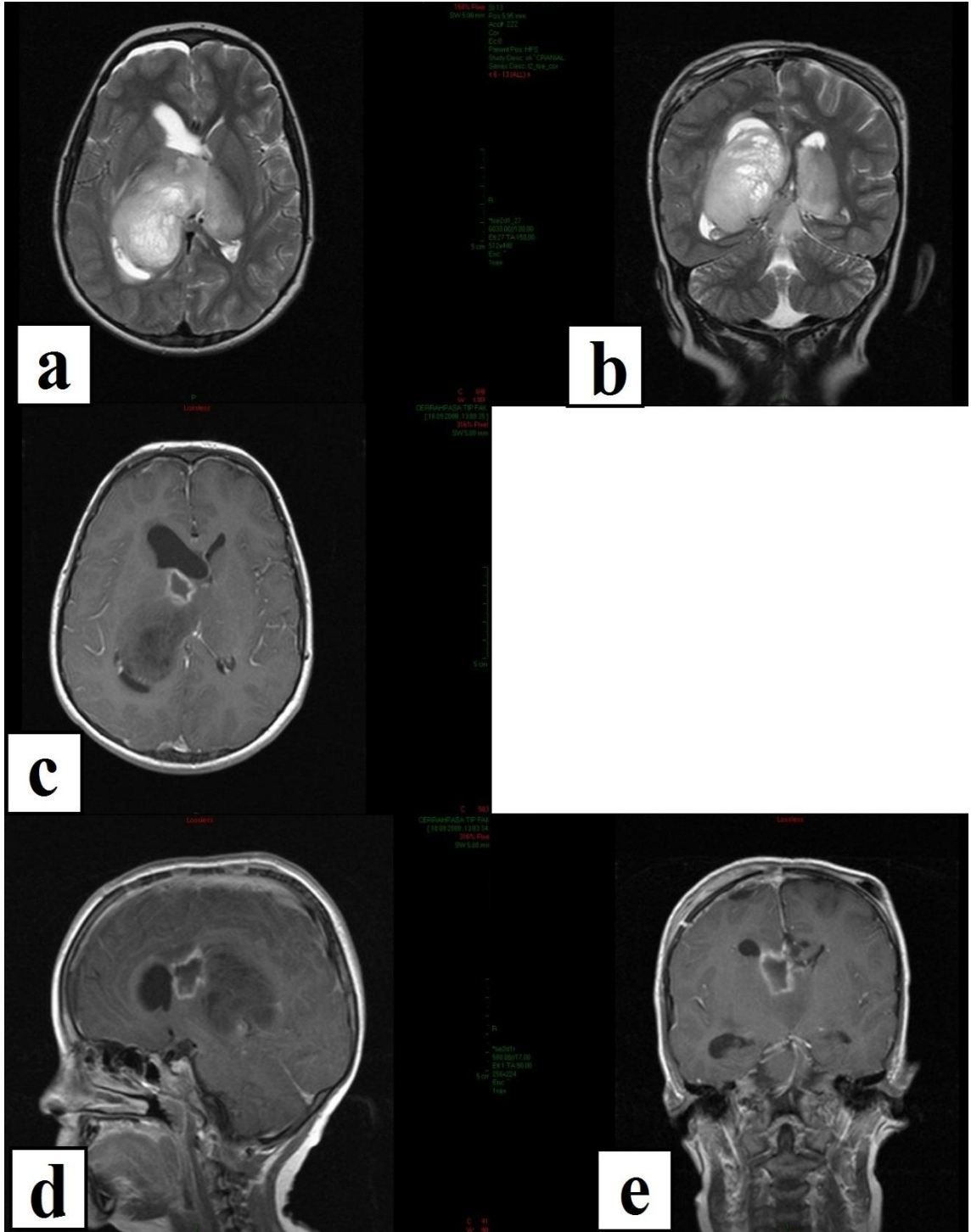
Resim 2: Astrositom (WHO II) MRG görüntüleri a.Aksiyel ve b. Koronal T2 ağırlıklı kesitler; Kontrastlı c.Aksiyel ve d. Koronal kesitler

2.4.2. Yüksek Dereceli Glial Tümörlerin görüntülemesi

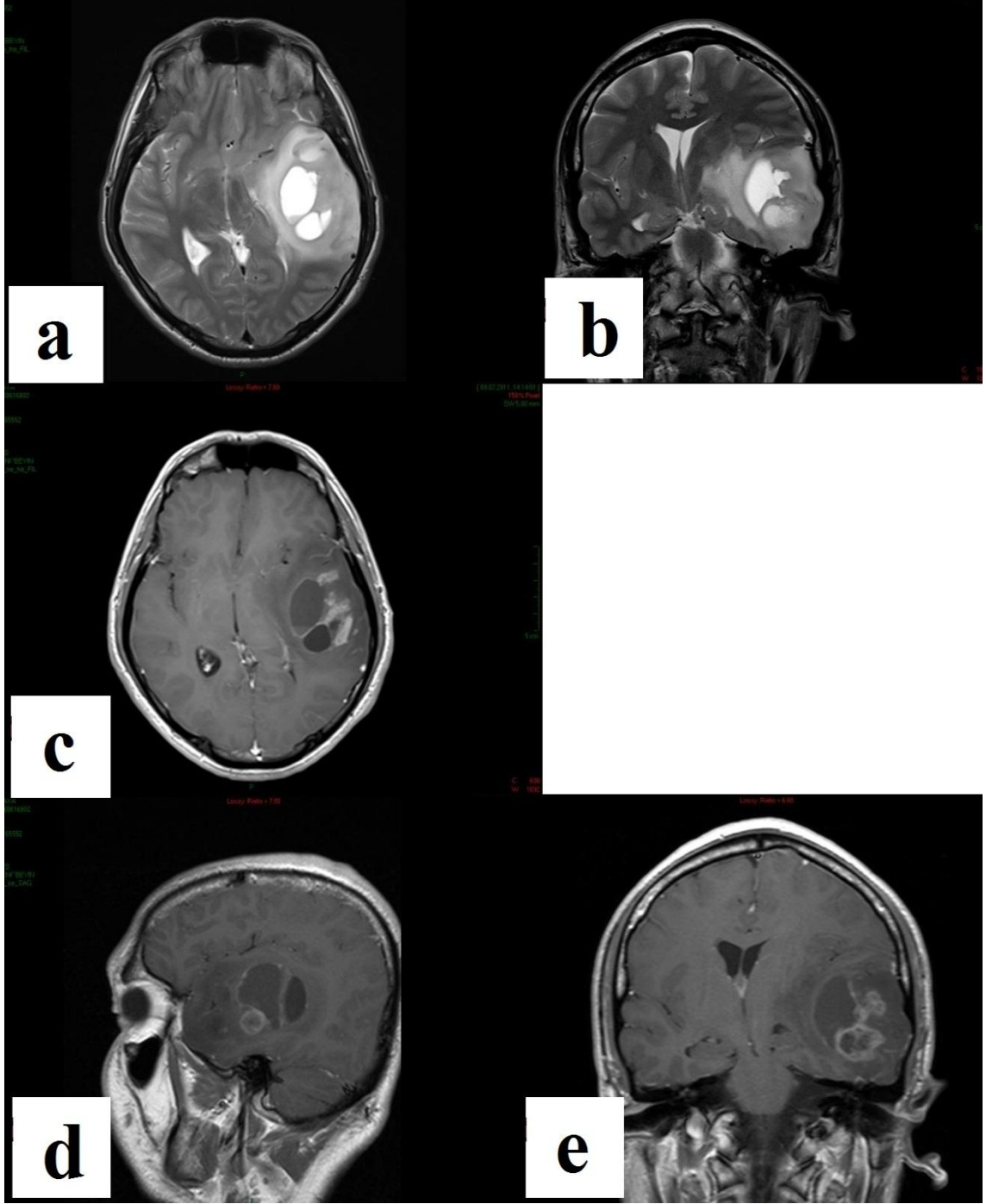
Çoğu nöroonkolojik tümörlerde olduğu gibi AA ve GBM’lerde de BT ve MRG teknikleri, tanının yapıtaşlarını oluşturmaktadır. Kontrastsız BT’de GBM’ler genellikle hipodens görülürler. Kontrast verildiğinde kontrast tutan düzensiz halka şeklini alırlar. Nekrotik olan bölge hipodens olarak gözlenir ve etrafı ise ödemli olduğundan yine hipodens olarak görülür (130). Kontrastlanma genellikle tümörün yüksek dereceliliği ile doğru orantılıdır. Günümüzde MRG, GBM tanısında, cerrahinin ve radyoterapinin planlamasında büyük ölçüde BT’nin yerini almıştır. Gerek yumuşak doku anatomisini

daha iyi göstermesi gerekse çok yönlü görüntü sağlaması MRG'ye bu konuda büyük üstünlük sağlamaktadır (Resim 3 ve 4). Kontrastsız T1 kesitlerde hipointens, kontrastsız T2 ve FLAIR (Fluid Attenuation Inversion Recovery) kesitlerde ise hiperintens görüntü verir. Kontrastlanma ise BT'de olduğu gibidir. Aynı zamanda hiçbir görüntüleme tümörün gerçek sınırlarını tam anlamı ile göstermemektedir. Kontrastlanmanın dışında ve hatta tümörün etrafındaki ödemin dışında bile tümör hücrelerinin olabileceği unutulmamalıdır. Her ne kadar MRG ilk tanı için yeterli ise de gerek cerrahi gerekse radyoterapi sonrasında uygulanan takipler için yeterli olmayabilir. Cerrahinin kendisi doğası gereği bir travma olduğundan, oluşturduğu inflamasyon, 48 saat sonrasında 4 haftaya kadar kontrastlanma göstermektedir. Benzer biçimde radyoterapi sonrasında radyoterapiye sekonder hasar ve nekroz kontrastlanma gösterebilir. Son olarak, kullanılan steroid altta yatan tümörü değiştirmeden kontrast tutulumunu azaltabilir. Bu açıdan değerlendirildiğinde biyolojik görüntüleme çalışmaları GBM tedavi ve takibinde giderek önem kazanmaktadır. 2-[18F] fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) ve pozitron emisyon tomografisi (PET) (FDG-PET) biyolojik olarak nüks tümörü radyasyon nekrozundan ayırtedebilir (131).

Manyetik Rezonans Spektroskopi normal ve anormal doku metabolitlerini ayırt edebilir. Yaygın olarak kolin, kreatin, N-asetil aspartat, laktat ve lipid metabolit pikleri kullanılır (132). Aktif tümör genellikle normal dokudan daha fazla kolin ve daha az N-asetil-aspartat aktivitesi gösterir. Nekrotik dokuda lipid haricindeki metabolitlerin hepsinin genel olarak aktivitesi düşmüştür. Benzer olarak MR perfüzyon çalışmaları, aktif ve ileri evreli bir tümördeki artmış kan hacmini ve nekrotik dokudaki azalmış kan hacmini gösterir. Diğer görüntüleme teknikleri GBM'lerde çok fazla önem taşımazlar, vakalara özel durumlarda kullanılabilirler.



Resim 3: Anaplastik astrositom MRG görüntüleri a.Aksiyel ve b. Koronal T2 ağırlıklı kesitler ve Kontrastlı c.Aksiyel; d.Sagital ve e.Koronal kesitler



Resim 4: Glioblastom multiforme MRG görüntüleri. a.Aksiyel ve b. Koronal T2 ağırlıklı kesitler ve Kontrastlı c.Aksiyel; d.Sagital ve e.Koronal kesitler

2.5. GLİAL TÜMÖRLERDE DERECE YÜKSELMESİ (MALİGNİTE ARTIŞI)

DDA'nın daha malign bir forma dönüşmesi, bir çok çalışmanın konusu olmuştur (50). Bu konuyu araştıran ilk çalışmalardan birinde, Müller ve ark. operasyon sonrasında patolojik tanısı astrositom olan 72 olguyu incelemişler. Nüks eden bu tümörlerin % 14'ü patolojik açıdan değişmemiş; % 55'i anaplastik astrositoma; % 30'u da glioblastoma multiformeye dönüşmüştür. İlk patolojik tanı ile 2. operasyon arasındaki ortalama süre 31 ay olarak bulunmuştur. Tüm astrositomaların yaklaşık 2/3'ünde (DDA ve AA dahil) daha malign bir forma dönüşümün beklenebileceği sonucuna varılmıştır (126). Bir başka tartışma konusu da daha önce düşük derece astrositom teşhisi konulmuş bir olguda uygulanan 2. biyopsi ya da 2. rezeksiyon ile elde edilen anaplastik tanının, ilk alınan örnekteki yetersizlik nedeni ile olup olmadığıdır (50,128). Başka deyişle vakaların yaklaşık yarısında, DDA'dan daha malign forma dönüşüm gerçekleşirken geri kalan yarısında 2. cerrahi sırasında zaten daha önceden mevcut olan tümörün malign kısmından örnekleme yapılmış olabileceğidir (50,128). Histopatolojik farklılaşma veya anaplastiye dönüşüm derecesine bağlı olmaksızın bütün intrakranal gliomalar histopatolojik olarak maligndir (155). Düşük derece astrositom olarak bilinen tümörler anaplastik gliomalardan biyolojik davranış olarak farklıdır, çünkü daha yavaş büyürler ve olguların daha uzun süre yaşamalarına izin verirler. Düşük derece astrositomalarda tümör ile doku arasındaki sınır ayrımının mümkün olmamasına rağmen bu özellikleri nedeni ile bunların malign astrositomlardan daha iyi bir prognozları vardır. Bununla birlikte gemistositik form diğer DDA'dan farklı olarak kötü prognozludurlar ve hızlı anaplastik değişime girerler. Bu olgularda beklenen yaşam süresi beklenilenden çok kısa olabilir (127).

Glioblastoma multiformeli 129 vakalık bir otopsi serisi analiz edilmiş ve bunların yaklaşık % 28'inin daha önceki astrositomdan çıkmış olabileceği sonucuna varılmıştır (129). Bu çalışmaya göre DDA hikayesi olan olgularda yaşam süresi, tümör anaplastik astrositoma dönüştükten sonra bile çok daha uzundur. Halbuki bu süre, anaplastik astrositomun de novo olarak ortaya çıktığı olgularda daha kısadır (117). DDA'lı hastaların kaybedilmesinin asıl nedeni genellikle tümörün malign transformasyon göstermesidir. İkinci biyopsi örneğinde veya otopsi serilerinde anaplastik bölge görülme oranı seriden seriye %13 ile %85 oranında değişmektedir. Rekürrensler malign transformasyon nedeniyle olabileceği gibi, yukarıda da belirtildiği

gibi, ilk histopatolojik değerlendirmede gözden kaçan anaplastik bölgeler nedeniyle de olabilir (123,124). Laws ve arkadaşları (125), kendi serilerindeki olgularının yarısının derecelerinin takiplerde aynı bulmuş, buna karşın diğer yarısının derece yükselttiğini tespit etmişlerdir.

2.6.GLİAL TÜMÖRLERİN TEDAVİSİ

2.6.1. Destek Tedavi

Destek tedavileri antikonvülzanlar ve kortikosteroidlerdir. Fenitoin ve fenobarbital en sık kullanılan profilaktik ajanlardır. Kortikosteroidler peritümöral ödemi azaltmakta ve intrakranial basıncı düşürerek kitle etkisini azaltmaktadır.Minimal mineralokortikoid etkisi nedeniyle deksametazon en çok tercih edilen kortikosteroiddir. Başlangıç dozu 16 mg/gün ve idamesi aynı dozun dörde bölünerek 6 saat aralıklarla olmakla birlikte nörolojik semptomları kontrol etmek için doz ayarlaması yapılabilir. Kortikosteroidlerin uzun dönem kullanılması hipertansiyon, diabetes mellitus, nonketotik hiperosmolarite, miyopati, kilo alma , insomnia, ve osteoporoza neden olabilir. Radyoterapi alacak hastalarda beyin ödemi riskini azaltmak için mutlaka radyoterapi öncesi kortikosteroid tedavisi başlanmalıdır.

2.6.2. Cerrahi Tedavi

Cerrahi yaklaşım vital beyin yapısını koruyarak, postoperatif nörolojik defisit riskini minimize ederek maksimal tümör dokusunu çıkarmaktır. Cerrahinin amacı;

- 1-Doğru histolojik tanının elde edilmesi
- 2-Tümör ve peritümöral ödem nedeniyle oluşan kitle etkisinin giderilmesi
- 3-Bozulan BOS akımının yolunun giderilmesi
- 4-Gros total kitle eksizyonu ile potansiyel kür elde edilmesi (173)

Cerrahi, glial tümörlerin tedavisinde anahtar rol oynamaktadır. Geniş rezeksiyon kitle etkisi, ödem ve steroid bağımlılığını azaltarak hayat kalitesi ve Karnofsky performans skoru üzerinde olumlu etki yapmaktadır.

Cerrahi prosedür seçenekleri; Stereotaksik biyopsi, açık biyopsi, kitle etkisini azaltma ve tamama yakın rezeksiyon olarak sıralanabilir. Bir çok çalışma göstermiştir ki

tamama yakın rezeksiyon iyi prognoz ile ilişkilendirilmiştir (108,175). Her ne kadar bu çalışmalar çoğunlukla retrospektif ise de birçok otorite nörolojik bozukluk beklenmeyen ulaşılabilir tümörlerin tamamına yakınının çıkarılması gerektiği konusunda hemfikirdirler. Cerrahi tekniklerin son zamanlarda gelişmesi ile (örneğin, mikroskopik cerrahi, uyanık kraniyotomi, intraoperatif görüntüleme ve intraoperatif elektrofizyolojik beyin haritalandırılması) daha fazla tümör güvenli olarak çıkartılabilir duruma gelmiştir (173, 175). Bu sebeple beyin cerrahisi tarafından beynin kritik bölgelerindeki riski minimize ederek maksimal rezeksiyona gayret edilir. Bununla beraber yapılan cerrahi işlem; brakiterapi, anti-neoplastik ajan yerleştirilmesi gibi lokal tedavilere de olanak sağlamaktadır.

Son yirmi sene içerisinde, literatürde DDA rezeksiyon artışının ortalama yaşam ömrünü uzattığı yönünde kanıtlar artış göstermektedir. Genel ortalama yaşam ömrünü uzatmakla birlikte, daha agresif yapıda DDA rezeksiyon uygulamaları, hastalığın doğal seyrini değiştirebilecek cerrahi girişimlerin olasılığını arttıran, histolojik ilerleme riskini etkileyebilmektedir (177). Bu etkileşimler, sadece genel hemisferik DDA popülasyonunda belirgin olmakla kalmaz (176,180), ayrıca insüler DDA gibi belirli alt-gruplara bağlı DDA'de de belirgindir (178,179).

Modern literatürde, hacimsel ölçümlere dayalı en geniş kapsamlı analizler, hemisferik DDA yaşam süresinin 10 senelik zaman dilimine eşit olduğunu belirtmektedir (180). Basit tümör çıkartma ameliyatlarına kıyasla, daha agresif rezeksiyonun yaşam süresinde ciddi manada katkı sağladığı öngörülmektedir. Total rezeksiyon geçiren hastalarda, 10 senelik yaşam ömrü %100'e yaklaşmaktadır, Ancak rezeksiyon kapsamı %40'a ulaştığında yaşam ömrü rezidü tümör miktarının artmasıyla orantılı azalmaktadır. %100 Rezeksiyona karşı %50 rezeksiyon değerinde, mortalite risk değeri de yüksek manada gerilemektedir. Tümör kalıntılarının ve hatta 10 cm³ seviyesinde hacimsel değerlere ulaşan miktarların, genel yaşam süresini negatif etkilediği düşünülmektedir. Diğer çalışmalarda, daha geniş rezeksiyonun daha yüksek sonuç verdiği belirtilmiş olmasına rağmen, hiçbirisinde, gelişmiş haritalandırma yönteminin kullanımını gerektiren aşama olan, son birkaç santimetre küpte rezeksiyon uygulamasının katkılarına değinilmemiştir. Genel olarak, bu veriler güçlü bir şekilde maksimal DDA rezeksiyon yapılması gerekliliğini desteklemektedir.

GBM'lerde başlangıç tedavisinde cerrahi girişim önemlidir. Cerrahi, tanıyı doğrulamak ve kitle etkisine bağlı semptomları azaltmak için uygulanır. Cerrahi

rezeksiyonun genişliği hastanın yaşam süresinde iyi tanımlanmış etkiye sahiptir. Lacroix ve arkadaşlarının cerrahi rezeksiyonun prognostik etkisini araştırmak için 416 GBM tanılı hastayı retrospektif olarak incelemişler. Tümör miktarının %98 ve üzeri çıkartılanlar ile daha az çıkartılanlar istatistiksel olarak analiz etmişler. 1. Grupta ortalama yaşam süresi 13 ay, 2. grupta ise ortalama yaşam süresi 8.8 ay bulunmuş (108). Agresif cerrahinin yaşam süresine etkisinin ortaya konulması üzerine , hastalara anlamlı defisit yaratmayacak şekilde cerrahi rezeksiyonun miktarının genişletilmesi önerilmektedir (175).

2.6.3. Radyoterapi

Beyin normal parankimal hücre popülasyonu statik veya yavaş bölünen hücrelerden oluştuğu için beyindeki radyasyonun etkileri gecikmiş reaksiyonlar şeklinde görülmektedir. Beyine radyasyon üç ana yolla uygulanmaktadır.

-Fraksiyone eksternal radyoterapi

-Küçük alan stereotaktik radyoterapi

-Beyne radyoaktif kaynakların interstisyel implantasyonu (Brakiterapi)

Radyoterapi glial tümörlerin tedavisinde önemli rol oynamaktadır. Radyoterapi malign gliomaların tedavisinde en efektif cerrahi dışı yöntem olurken, optimal radyasyon dozu, volüm, ve fraksiyasyon planı astrositomaların tedavisinde halen tartışılmaktadır. Genelde cerrahiye adjuvan postoperatif radyoterapi şeklinde uygulanır. Postoperatif radyoterapinin amacı tümörün lokal kontrolünü artırarak, lokal nüksün azaltılmasıdır. İntrakranyal malign tümörler makroskopik olarak total çıkarılırsalar bile gerçekte radikal eksizyonun mümkün olmadığı iyi bilinmektedir. Postoperatif radyoterapi mikroskopik rezidü tümörün temizlenmesi için için gereklidir.

2.6.3.1. Düşük dereceli astrositomlarda radyoterapi:

Pilositik astrositomaların çoğu cerrahi ile tam rezeke edilebilmektedirler. Bu durumda adjuvan bir tedaviye gerek kalmamaktadır. Diferansiye astrositomaların çoğu cerrahi rezeksiyonla tedavi edilir. Bu tümörlerin inkomplet rezeksiyonunda ise postoperatif radyoterapi tartışmalıdır. DDA'ların çoğunda subtotal rezeksiyon sonrası postop 5000-5400 cGy radyoterapi önerilmektedir. Cerrahi uygulanması mümkün olmayan olgularda primer radyoterapi dozu 5600-6000 cGy olmalıdır. Diferansiye

astrositomlar nüksettiginde reoperasyon düşünölmelidir, mümkün olmuyorsa ikinci seri radyoterapi veya kemoterapi uygulanmalıdır.

2.6.3.2. Yüksek dereceli astrositomlarda radyoterapi:

Anaplastik Astrositoma ve GBM tedavisi birbirine benzemektedir. Bugünkü tedavi cerrahi rezeksiyondan sonra postoperatif radyoterapi ve seçilmiş olgularda kemoterapi ilavesidir. Postoperatif radyoterapi volümü peritümöral ödemin 2-3 cm. periferinden geçmelidir. Radyoterapi dozu 1.8-2 Gy günlük fraksiyonlarla total 60-64 Gy olmalıdır. Genel durumu bozuk ve sınırlı sağkalım beklenen olgularda 10 fraksiyonda total 30 Gy uygulanabilir. Hiperfraksiyone ve akselere fraksiyone uygulamalarla sağkalımda uzama gözlenmemiştir.

2.6.4. İnterstisiyel brakiterapi

Bu yöntem, yüksek doz radyasyonun tümörü kuşatan beyni devre dışı bırakarak hedefe gönderilmesini amaç edinmiştir. Birkaç günlük seanslar boyunca saatte 40-100 rad'lık sürekli düşük dozlarla uygulanan radyasyon; tümör dokusunun tekrar oksijen kazanmasına imkan vermekte ve tedavi esnasında daha çok hücrenin aktif kısma girmesini sağlamaktadır. 500-7500 rad (cGy) aralığındaki normal toplam doz; tümör kenarına ya da onun 5-15 mm ötesindeki noktaya gönderilir. Bu teknik; yeni teşhis konulan hastalarda 4500 rad'lık bölgesel dış radyasyon sonrası fokal artış vermek amacıyla ileride kullanılabilir ya da bu teknik nüks esnasında kurtarma tedavisi olarak kullanılabilir (136). Iyot 125 (125 I) implant edilmiş malign astrositomalı 95 hasta üzerindeki bir çalışmada, nüks tanısının konulmasından itibaren 3. derece tümörlerde 81 hafta, 4. derece tümörlerde ise 54 hafta ortalama yaşam süresi elde edilmiştir (137). Ancak brakiterapi verilecek olguların uygun seçilmesi gerekir, tüm olguların sadece % 20-30'u implantasyona uygun bulunmuştur (136). Brakiterapi adayları, yoğun bakım ünitesinde kendi bakımına yardım edebilecek derecede oldukça iyi bir performans durumuna sahip olmalıdır. Tek odaklı olması gereken bu tümörlerin, en büyük çapı 5 cm'den az olmalı ve nisbeten birkaç kateterle implantasyon yapılmasına imkan vermelidir. Bu tümörlerin hiçbirisi önemli nöral ya da vasküler yapıların yakınında olmamalı ya da vital alanlarda yer almamalıdır (138). Eldeki ilk veriler, 3. derece hastalar arasında iyi bir tepki olduğunu göstermiş, ancak GBM hastalarının yaşam süresinde net bir düzelme göstermemiştir (139). GBM'li hastaların çoğunda, tedavi

bölgesinin kenarında bazen de çok uzağında beliren nüksler nedeniyle brakiterapi başarısız kalmıştır (136). Bir bakıma brakiterapinin büyük avantajı, aynı zamanda onun en büyük kısıtlılığıdır; yani sadece tedavi bölgesiyle kısıtlanmış bir tedavi etkisidir. Böyle bir durumda tedavi edilen yerin hemen dışına yayılan pek çok tümör hücresi hesaba katılmamaktadır. İnterstisiyel radyasyonun etkinliğini daha çok artırmak amacıyla bu uygulamayı kemoterapi ya da interstisiyel hipertermi ile kombine ederek alternatif tedavi yöntemleri araştırılmaktadır.

2.6.5. Gamma bıçağı (radyocerrahi)

AA'larda prognoz, cerrahi tedavi, RT ve KT'deki gelişmelere rağmen hala kötüdür. Lokal nüksü önlemek veya geciktirmek ve yaşam sürelerini artırmak için değişik stratejiler denenmiştir. Primer AA'ların tedavisi cerrahi rezeksiyonu takiben RT'dir. Ancak nüks görülen olgularda ek RT radyonekroz riski nedeni ile önerilmez. San Francisco California Üniversitesi Tıp Merkezi'nde (UCSF) nüks eden AA'lı olgular değişik RT seçenekleri ile tedavi edilmişlerdir. Bu seçenekler: geçici radyoaktif implant kullanımı, geçici radyoaktif implanta ilave hipertermi, kalıcı radyoaktif implantlar, lineer hızlandırılmış radyocerrahi (LINAC) ve gamma bıçağıdır (140).

Larson ve arkadaşları (141) radyocerrahi sonrası iyi sonuçların elde edilmesine katkıda bulunan prognostik kriterlerin hastanın yaşının genç olması, yüksek karnofsky performans skoru (KPS) hastalar, tümör hacminin küçük olması ve tek odaklı tümörler olduğunu belirtmişlerdir. Bu kriterleri taşıyan 3. derece tümörlerin 2 yıllık yaşam oranı %61 iken 4. derece tümörlerde bu oran %34 olarak hesaplanmıştır. Bu kriterleri taşımayan 3. derece tümörlerin 2 yıllık yaşam oranı %36, 4. derece tümörlerde %12 olarak tespit edilmiştir. Hall (142) radyocerrahi sonrası yaklaşık yaşam süresini 3. Derece tümörlerde 11.8 ay, 4.derece tümörlerde ise 7.5 ay olarak bulmuşlar. Shrieve (143) ise GBM'de radyocerrahi sonrası ortalama yaşam süresini 10.2 ay olarak bulmuştur.

2.6.6. Kemoterapi

Cerrahi rezeksiyon sonrası RT ve KT uygulanan 4. derece tümörlü hastaların ortalama yaşam süresi, cerrahi sonrası yalnız radyasyon tedavisi gören hastalardaki 9.25 ayla karşılaştırıldığında sadece 10 aydır (162). Ancak, ölçülebilir uzun süreli yaşam süresi oranının sadece BCNU grubunda olduğu görülür. BCNU kullanmayan grupta ise hemen hemen hiç uzun süre hayatta kalan hasta yoktur (136). BCNU, serebral sirkülasyonda 1. ya da 2. geçiş sırasında hücre membranından çabucak geçen lipofilik, non-polar, düşük moleküler ağırlıklı bir maddedir. BCNU'nun klinik etkinliği, ilacın verilmesi ya da tümöre girişine ilişkin bir sorunun ötesinde tümörün ilaca karşı olan kalıtsal ilaç direnci ve tümöre komşu nöral dokunun ilacın etkilerine karşı duyarlılığı nedeniyle daha da kısıtlanır. Bu ilaca karşı yanıtı artırmak için, sistemik yükseltilmiş doz kullanımı ve otolog kemik iliği kurtarımı ya da intrakarotid infüzyon gibi teşebbüsler, çoğu kez başarısızlıkla sonuçlanmıştır ve önemli derecede toksisiteye neden olmuştur (144).

BCNU'nun radyasyon sırasında tümörü küçülen ya da aynı kalan genç hastaların destekleyici tedavisinde seçilecek ilk ilaç olarak değerlendirilmesine şimdilik devam edilmektedir. BCNU'nun normal başlangıç dozu, 1-3 günde intravenöz olarak verilen 80-100 mg/m² dir. Tedavi genellikle 4-5. haftada gözlenen düşük lökosit sayımı ve trombositopeninin giderilmesinin ardından her 8-10 haftada bir tekrarlanır. Eğer hastada kötüleşme görülürse sadece 1 seans sonrası bile BCNU durdurulmalı ve diğer bir kimyasal ajanın verilmesi düşünülmelidir. Chang (145) randomize çalışmasında cerrahi rezeksiyon ve RT'e BCNU'nun eklenmesinin, 40-60 yaş grubu hastalar arasında artan yaşam süresi ile birlikte olduğunu belirtmiştir. Yaşlı hastalarda BCNU tedavisine alternatif bir tedavinin düşünülmesine gereksinim vardır. Çünkü, yaşlı popülasyonda BCNU kullanımının faydalı olduğunu gösteren az bulgu vardır. Nüks tümörlü 50 yaş üzerindeki hastalara tekrar ameliyat ve interstisyel brakiterapi önerilmelidir. Ancak bunun için bu hastalarda lezyonun uygun büyüklük ve konumda olması gerekir (136). Çoğu yaşlı hastada diğer alternatifler düşünülüp hastalar tarafından kabul edilmediğinde fiziki ve sosyal sınırlamalar, prokarbazin ya da Lamustine (CCNU) gibi oral ajanların kullanımını tercih edilebilir bir seçenek haline getirmektedir. YDA'lı olguların kemoterapötik ajanlara olan cevabındaki direnç ve ilaçlara bağlı gelişen komplikasyonlar tedaviyi sınırlandıran en önemli faktörlerdir. Bu yüzden birçok

merkezde farklı kemoterapötik ajanlar ile YDA'lı olguların yaşam süreleri uzatılmaya çalışılmaktadır (136).

2.6.6.1. Temozolomid

Temozolomid (TMZ), özellikle malign glioma karşı 1980'lerin sonundan beri etkili bir tedavi olarak geliştirilmeye çalışılmaktadır. Temozolomid, imidazotetrazin sınıfına mensup oral olarak uygulanan alkilleyici bir ajandır. Süratle ve tam olarak absorbe olur. Vücut pH'ında spontan olarak aktif metabolit 5-(3-metiltriazen-1-yl)-imidazole-4-karboksamid'e hidrolize olur. Ayrıca % 20 ile 40 arasında bir konsantrasyonla kan beyin bariyerinden geçer (146,147). Rekürren hastalığın tedavisinde tek ajan olarak 5 gün boyunca 150-200 mg/m²/gün kullanılması kararlaştırılmıştır (146, 148). Yeni teşhis edilen GBM'de ise radyoterapi ile birlikte (hafta sonları dahil) en fazla 45 gün 75 mg/m² olarak uygulanır (149,150). DNA onarıcı protein MGMT'ye (O6-metilguanin-DNA-metiltransferaz) normal dokularda her zaman rastlanılır. Bu enzim, genom bütünlüğünün idamesinde çok önemli bir yere sahiptir (151,152). MGMT geni, kromozom 10q26'da lokalizedir ve guanin'in O6 pozisyonundaki alkil gruplarını kaldıran DNA onarıcı proteini şifreler. DNA restorasyonu, hücre içinde yeniden sentezlenmesi gereken MGMT'yi tüketir. Tümörde aşırı MGMT ekspresyonu, alkilleyici ajanla yapılan tedaviye gösterilen dirençle ilişkilendirilmiştir (152,153). Guanin'in O6 pozisyonunun TMZ ile indüklenen metilasyonu, sitotoksik yanıtı tetikleyen biyolojik açıdan önemli etkilerden birine neden olur. Bu durum, düzelmediği takdirde hücre ölümüne kadar gidebilir (154).

MGMT geninin promoter metilasyonla inaktivasyonu, DNA onarıcı etkinliği azaltır. Bu olgu, alkile edici ajanlar kullanılarak tedavi edilen GBM'li hastalarda daha uzun toplam yaşam süresiyle ilişkilendirilmiştir (155,156).

İlk Faz I çalışma sonuçları; TMZ'nin % 100 oral biyoyararlılığa, iyi bir tolere edilebilirliğe ve uygun bir güvenlik profiline sahip olduğunu göstermiştir (157). TMZ'nin 49 güne kadar sürekli uygulanması, Faz I çalışma ile değerlendirilmiştir (149,150). Bu çalışmada myelosupresyon ve özellikle trombositopeni, doz sınırlayıcı bulunmuştur. Radyoterapi sırasında TMZ'nin her gün sürekli olarak uygulanması, bir Faz II ve bir randomize Faz III çalışma ile araştırılmıştır (150,158). Genel olarak ilaca tolerans mükemmel bulunmuş, ancak TMZ+radyoterapi alan hastaların % 9'unda hafif yorgunluk rapor edilmiştir. Bu oran, sadece radyoterapi gören hastalarda % 6'dır

(158,160). Sürekli düşük doz TMZ tedavisi gören hastaların sadece küçük bir bölümünde antiemetik profilaksiye ihtiyaç duyulmuştur. Bununla birlikte hastalarda ciddi lenfopeni nedeniyle fırsatçı enfeksiyonlar gözlenmiş ve muhtemelen eşzamanlı kortikosteroid tedavisi bu durumu daha da kötüleştirmiştir. Stupp ve arkadaşlarının raporları (160,161) ve son zamanlarda yayınlanmış randomize Avrupa-Kanada ortak araştırması, GBM'in tedavi algoritmasını esaslı bir biçimde değiştirmiştir. Bu çalışmalar, GBM'li hastaların tedavisinde bariz bir biçimde TMZ'in önemine işaret etmektedir. Buna göre TMZ alan hastaların ortalama yaşam süreleri ile 2 yıllık sağ kalım oranları, TMZ almayan hastalardaki süre ve oranlardan daha iyidir (Ortalama yaşam beklentisi 12 aya karşı 14,6 ay; 2 yıllık sağ kalım oranı % 10'a karşı % 27). Netice itibariyle radyoterapi ile birlikte uygulanan TMZ'in, yeni teşhis konulan GBM'li hastalar için yeni bir tedavi standardı olmuştur.

2.7. PROGNOZ

PA'nın bugün için de en iyi prognozlu çocukluk çağı beyin tümörü olduğu söylenebilir. Pilositik astrositomlarda kitle total çıkarılırsa, 5 yıllık yaşam %100'e kadar ulaşır (133). Amerika Birleşik Devletleri Beyin Tümörü Kayıt Merkezi (CBTRUS) raporuna göre PA'lar için 5 yıllık sağkalım hızı %92 olarak bildirilmiştir (76). PA Tüm grup için %80 oranında 20 yıllık bir yaşam oranı beklenebilir (165). Malign serebellar astrositomlar, yüksek dereceli astrositom gibi davranır ve bunu kötü prognozludur. Ortalama yaşam süresi 14 aydır ve % 50'si yayılır.

DDA hastaları için ortalama genel yaşam süresi yaklaşık 6.5 ile 8 yıl arasındadır (167,168). DDA teşhisi konulan hastalar için yayımlanmış yaşam tahminleri 3 ile 20 yıldan fazla bir süreye kadar değişiklik göstermektedir (166-170). Genel olarak, sırasıyla yaklaşık %70 ve %50'sinde 5 ile 10 yıllık yaşam oranları bildirilmiştir. (171). Smith ve arkadaşları (172) yaş, Karnofsky Performans Skoru, tümör yerleşimi ve alt tümör tipi belirlendikten sonra, rezeksiyonun kapsamı genel yaşam oranının önemli bir öngörücüsü olduğunu ve ilerlemesiz yaşam oranını tahmin etmeye yönelik bir eğilim sergilediğini göstermiştir. Rezeksiyon analizinin bu volumetrik kapsamı, %90'a eşit veya %90'dan fazla rezeksiyon geçirmiş hastalar %92 oranında 8 yıllık genel yaşam oranı ve %43 oranında ilerlemesiz yaşam oranına sahipken, %90'dan az oranda rezeksiyon geçirmiş hastalar %60 oranında 8 yıllık genel yaşam oranı ve %21 oranında ilerlemesiz yaşam oranına sahip olduklarını ortaya çıkarmıştır.

DDA' larda tümör histopatolojisi gemistositik olanların prognozu, fibriler ve protoplazmik astrositomlara oranla daha kötüdür. Gemistositik astrositomların % 80' inde erken nüks ve derece yükselmesi görülmektedir (64). Ayrıca başvuru şikayeti epileptik nöbet olanların prognozunun daha iyi olduğu belirtilmektedir. Bu da kortikal yerleşim gösterdiklerinden ve total rezeksiyon imkanının daha uygun olmasından kaynaklanmaktadır.

Yüksek dereceli astrositomlarda prognoz oldukça kötüdür. Hasta yaşı, tümör derecesi, lokalizasyonu, boyutu, semptomların süresi, Karnofsky Performans Skoru, cerrahi rezeksiyon boyutu, postoperatif rezidüe tümör boyutu ile postoperatif uygulanan radyoterapi ve kemoterapi prognozu etkileyen faktörlerdir. Optimal tedaviyle bile, ortalama yaşama süresi glioblastomlu hastalar için yalnızca 2 yıldan daha az ve anaplastik gliomlu hastalar için 2 ile 5 yıldır. (163,164). Primer GBM'li hastaların prognozu sekonder GBM' lilere oranla daha kötüdür.

2.8. GLİAL TÜMÖR GENETİĞİ

2.8.1. Düşük Dereceli Glial Tümörlerde Genetik

DDA'un nedeni bilinmemektedir ve fakomatozlardan dışında, bu tümörlerin gelişmesine yol açan tanımlanmış hiçbir genetik yatkınlık bulunmamaktadır. Düşük dereceli astrositomları bulunan hastalarda sürekli olarak gözlemlenen tek genetik alterasyon p53 geninin mutasyonudur (181). p53 geni, 17p'de yani 17 nolu kromozomun kısa bacağında bulunmaktadır ve bu bölge bütün derecelerdeki astrositomlarda sıklıkla silinmektedir. p53'ün geriye kalan kopyası çoğunlukla hafif bir mutasyon yoluyla inaktive edilir. Bu gen apoptozun ve hücre döngüsü ilerlemesinin düzenlenmesinde gerekli olduğu için normal p53 fonksiyonunun kaybı astrositlerin hızlandırılmış büyümesini ve malign diferensiasyonu artırır (182, 183). Astrositomlar anlamlı p53 mutasyonu sergileyen tek beyin tümörleridir. 2. derece ve 3. derece astrositomların %50'si ile %60'ı p53 mutasyonları gösterirler. Bu da tümör baskılayıcı genin malign gliomların gelişimiyle ilişkilendirilen gen alterasyonları arasında erken bir lezyon olduğunu ileri sürmektedir (184). Yetişkin düşük dereceli astrositomlarda gözlenen diğer yaygın alterasyonlar 7 nolu kromozom kazancı ve yapısal anomalilerdir. Hastalarda 10, 13, 15, 20 ve 22 nolu kromozom kayıpları ve 4, 11, 12, 13, 16, 18 ve 21 nolu kromozomları kapsayan yapısal düzenlemeler de bildirilmiştir (185).

2.8.2. Yüksek Dereceli Glial Tümörlerde Genetik

En yaygın malign beyin tümörü olan GBM, aynı zamanda üzerinde en çok çalışılan beyin tümörüdür ve sonuç olarak genetik temeli, diğer beyin malignitelerinden daha iyi açıklanmaktadır. GBM'lerin klinik belirtilerine dayanarak belirlenen başlıca iki sınıfı vardır: primer (ya da yeniden [de novo]) ve sekonder (ilerleyici). Primer GBM'ler ilk olarak IV. derece tümör olarak meydana gelirken, sekonder GBM'ler ilk olarak II. derece ya da III. derece astrositom olarak meydana gelir.

GBM'lerin %5 ile %10'u II. ya da III. derece tümörlerden meydana gelir. (188,189). Sekonder GBM'ler grup olarak, farklı bir mutasyon spektrumuna sahiptir. Sekonder GBM'lerin primer GBM'lere göre daha yüksek p53 mutasyon frekansı (%28'e karşılık %65), daha düşük PTEN mutasyon frekansı (%25'e karşılık %4) ve daha düşük EGFR amplifikasyonu (%36'ya karşılık %8) vardır. (190). Aynı zamanda p53 mutasyonu tiplerinin primer ve sekonder GBM'ler arasında farklılık gösterdiği anlaşılmaktadır (188). Son onkogenomik çalışmalar GBM genomunun mutasyonlar için en iyi karakterize edilenlerden biri olmasına yol açmıştır. (187, 191).

20,611 adet genin taranmasında, tümörlerin % 11'inde izositrat dehidrojenaz 1 (IDH1)'in mutasyona uğradığı anlaşılmıştır (187). Bu mutasyonlar neredeyse bütün sekonder GBM'lerde (daha düşük derecelerden ilerleyenlerde) bulunmuştur ve primer GBM'lerde sık görülmemiştir (187). Bu durum IDH1'in ve ilişkili mutasyonların sekonder GBM sınıfını tanımlamaya yardımcı olabileceğini göstermektedir. Aynı zamanda bu mutasyonun büyük ölçüde daha düşük dereceli astrositomlarla ilişkilendirildiği ve nükseden yüksek dereceli tümörlerde sürdürüldüğü anlaşılmaktadır. Dolayısıyla, GBM'ye yol açan yollardan bazılarının farklılaştığı ve sekonder GBM'nin daha düşük bir EGFR ve daha yüksek p53 mutasyon oranına sahip olmasına ek olarak IDH1 mutasyonlarıyla karakterize edilebileceği anlaşılmaktadır. (186, 188).

Grup olarak, sıralanan 22 GBM genomunda, mutasyon frekansları açısından istatistik olarak anlamlı olan 41 gen vardır. En azından 41 farklı genin, bir şekilde glioblastomun ilerlemesine katkıda bulunan GBM'lerde mutasyona uğrayabileceğine dair güçlü bir kanıttır (187). Bu genlerin pek çoğu, p53 gibi iyi bilinen onkogenler ve tümör baskılayıcılarıdır ancak diğer genlerin kansere ilişkin işlevleri halen bilinmemektedir.

Kanserde en yaygın şekilde mutasyona uğrayan yollardan biri, p53 kontrol noktası, p53 mutasyonu aracılığıyla, inaktivasyonu ya da baskın negatif bir etkisi bulunan MDM2 veya MDM4 amplifikasyonu bozulabilir. Kısaca GBM'lerin yarısının değiştirilmiş p53 yolu geni vardır. (187).

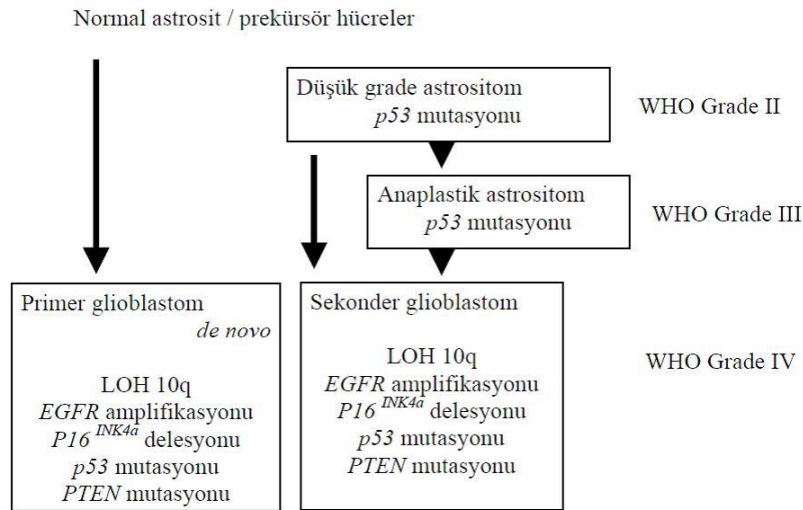
Pek çok diğer kanserin yanı sıra GBM'nin gelişimindeki önemli bir başka gen grubu, fosfatidilinozitol-3'-kinaz (PI3K'ler) (192). GBM'lerin yarısında, PI3K aktive eden mutasyon, negatif düzenleyici PTEN'in kaybı/mutasyonu ya da PI3K kinazın mutasyona uğratılmış bir insülin aracılı aktivatör olan insülin substrat reseptörü 1 (IRS1) meydana gelir. Aynı zamanda reseptör tirozin kinazlarındaki mutasyonların, özellikle EGFR amplifikasyonlarının, bu yoldaki sinyal iletimine katkısı olması da mümkündür. Birlikte bu genler kapsamlı bir şekilde, reseptör tirozin kinazdan mitojen-aktivasyonlu kinaz ve diğer dönüştürücüler aracılığıyla sonraki sinyal kademelerinden oluşan bir büyüme faktörü sinyal iletim yolu oluştururlar.

EGFR tümörlerin(194) yaklaşık %40'ında genomik olarak amplifiye edilmektedir (193) ve GBM'lerde aktivasyon noktası mutasyonuna sahiptir (187, 191). Kısaca, GBM'lerin yaklaşık yarısında tümörün gelişimi sırasında meydana gelen bir genomik değişikle aktive edilen bir EGFR geni bulunmaktadır. Genomik amplifikasyondan sonra EGFR geni bir kez daha yeniden düzenlemeden geçebilir (194,196). EGFR amplifikasyonu GBM'lerin üçte ikisinde bulunur. EGFR'de en sık gözlenen genomik kayıp, amino asitlerin 6 ile 273 kodlama sırasına karşılık gelen gendeki iç eksonların kaybıdır (197). Bu Tip 3 EGFR yeniden düzenlemesi ya da EGFRvIII olarak adlandırılır (198). Kaybolan alanın giderilmesi temel olarak mutant proteinin tirozin kinaz faaliyetini aktive eder (199, 200). GBM hücrelerindeki mutant proteinin yeniden düzenlenmesi hücrelerin uyarılmış bir hücre dışı matrikse akın etme yeteneğini artırır. (201).

Ancak tek ajanlı bir rejimandaki EGFR inhibitörleri bulunan GBM hastalarını tedavi etmek için gösterilen çabalar bu zamana kadar klinik deneylerde yaşam oranında çoğaltılabilir artışlar gerçekleştirilmemiştir. (202,203). Bu başarısızlığın nedenleri arasında inhibitörlerin yeterli düzeyde tümör içi konsantrasyonlarının gerçekleştirilememesi ya da kanser hücresinin paralel yollarla büyüme sinyalleri iletilme ve dolayısıyla EGFR inhibitörlerinin etkilerini aşabilmesi sayılabilir.

GBM’de ve pek çok diğer kanserde aktive olan reseptör tirozin kinaz sinyal iletim yoluna ek olarak tanımlanmış birtakım başka yollar da vardır. Örneğin, retinoblastom (RB) yolu GBM’lerin üçte ikisinden fazlasında sadece üç gendeki: RB1, CDK4 ve CDKN2A (CDK4 inhibitörü p16-INK4)’teki mutasyonlarla aktive edilir. RB1 ve fonksiyonunun modülatörlerinin başlıca görevi hücrenin hücre döngüsüne girişini düzenlemektir. RB1 kontrol noktası olmadan, hücre proliferasyonu bu kontrol olmaksızın kanserde ilerleyebilir.

MMR gen mutasyonunun kalıtsal olabilmesine rağmen, aynı zamanda tümör oluşumunu başlatmak ya da kemoterapiye direnci artırmak üzere düzensiz bir şekilde meydana gelir. (204-207). Astrositik tümörlerde gözlenen tüm bu genetik değişiklikler ve tümör evrelendirilmesi ile ilişkiler Şekil 1’de görülmektedir (188).



Şekil 1: Astrositom genetik değişiklikleri

2.9.GLİAL TÜMÖRLERDE KLİNİK YAYILMA ÖZELLİKLERİ

2.9.1. Komşu Yayılma

Otopsi serilerinde, GBM vakalarının % 45'inde bir lobun ötesine geçtiği saptanırken, % 25'inin tüm hemisferi kapladığı ve % 25 ile % 30'unun da karşı hemisfere geçtiği bulunmuştur (208,209). Supratentorial gliomların neredeyse %60'ı anteroposterior yönde yayılır ve yaklaşık olarak %20'si dikey yöndeki fiber traktları boyunca derindeki supratentorial yapıları ve infratentorial alanları invaze ederler(209). Frontal lob gliomları korpus kallosum (CC)'dan geçerek frontal lobu invaze ederken, temporal lob gliomları orta beyni ve ponsu invaze etmeye meyillidir. Bu eğilimler yüksek dereceli olanlarının yanı sıra düşük dereceli gliomlarda da gözlenmektedir. CC'nin altındaki bölgelerde meydana gelen gliomlar geniş ölçüde sınırlanmaktadır ve talamus ve kortikospinal yollar boyunca bulunan pedinküller gibi bazal yapıları invaze etmeye meyillidir (210). Talamus, hipotalamus ve anterior komissürden, özellikle bazal ganglionlar bölgesinde bilateral uzantı meydana gelir (94,211). Aslında, Scherer bütün talamik ve hipotalamik gliomların bilateral olarak yayıldığını söylemiştir (208). Pons yerleşimli tümörler sıklıkla orta beyin ve talamik bölgeleri invaze ederken zaman zaman üst servikal korda doğrudan kaudal yayılma yapabilir. Tedavi edilmeyen lezyonlarda, nektrotik dokuların 3 cm aralığında neoplastik hücreler gözlemlenmişken, nüks durumlarında tümör hücreleri primer tümörün çok daha ötesine yayılmıştır ve vakaların %80'inde karşı hemisferde bulunmuştur.

2.9.2. Uzakta Nüks etme

Yüksek dereceli gliomlara yönelik bütün tedavi stratejileri en sonunda başarısızlığa uğrar. Tedaviye rağmen nüks eden tümörler için Kramer 1959 yılında tam beyin radyoterapisi savunduğundan bu yana geniş kapsamlı olarak çalışılmaktadır (212). Tümör aynı bölgede ya da onun yakınında (lokal nüks) nüksedebilir. Ya da rastgele orijinal tümör bölgesinden 2cm daha uzak bir mesafe olarak tanımlanan ona uzak bir bölgede nüksedebilir (uzakta nüks). Otopsi çalışmaları radyoterapinin bir dereceye kadar lokal hastalığı (vakaların %50'sinde primer bölgede hiçbir nük olmaz) kontrol edebildiğini ancak uzakta nüks insidansının radyoterapi uygulanlarda %3'ten radyoterapi uygulanmayanlarda %19 ile %22'ye çıktığını göstermiştir. (213,214).

Klinik olarak yüksek dereceli gliom hastalarının %5 ile %7'si ilk kez görüldükleri orijinal bölgeden uzakta ek lezyonları olabilmektedir (215,216).

Brakiterapinin yaşam oranını artırmada konvansiyonel tedaviden daha etkili olduğu düşünülürken bu aynı zamanda malign gliomlu hastalarda uzak nüks insidansının artmasına neden olmaktadır (167,169). Orijinal tümörden 2 ile 5 cm uzakdaki nüksler hastaların %36 ile %50'si arasında gelişmiş ve orijinal tümörün 5 cm'den fazla uzağındaki nüksler hastaların %20'si ile %45'i arasında gelişmiştir. Başka bir çalışmada, brakiterapiden sonraki nüks yaygınlığı incelenmiş; hastaların 23'ünden yaklaşık %39'u multisentrik ve subependimal yayılma görülmüş (218). Ancak diğer çalışmalar bu kadar yüksek bir uzak yayılma insidansı bildirmemektedirler. Brakiterapi sonrası 50 nükseden tümör vakasının bir analizinde nükslerden yalnızca %16'sının 2cm'lik sınırın ötesine yayıldığı bulunmuştur.

Hastalık lokal olarak daha etkili bir şekilde kontrol edilip yaşam oranı daha uzun oldukça, uzak bir bölgede nüks olasılığı daha büyük olmaktadır. Massey ve Wallner uzak yayılım insidansının ikinci nükste ilkinde göre daha yüksek olduğunu bulmuşlar ve ilk nüks için cerrahi gerçekleştirildikten sonra, vakaların %25'i kadarında ikinci bir uzak nüks (orijinal tümörden >4 cm) geliştiğini gözlemlemişlerdir (219). Choucair ve arkadaşları (216) ve Sneed ile arkadaşları (220), aksine uzak nüksün insidansında anlamlı herhangi bir artış bulmamışlardır. Ancak geç takip vakaların %40'ında belirgin bir biçimde ayrı lezyonlar veya subependimal ya da sistemik yayılma göstermiştir; bu da dolayısıyla malign gliomla artan yaşam oranının uzak nükslerin sayısında da bir artış anlamına geldiğini yeniden doğrulamaktadır. Düşük dereceli gliomlar aynı zamanda uzun yıllar sonra da uzak bölgelerde nüksedebilmektedir. (221). 20 düşük dereceli nüks vakasında, yaklaşık dörtte biri radyoterapi alanının dışında gelişmiştir. (217).

2.9.3. İnvazyonun Moleküler Temeli

Yapılan çalışmalar malign gliomların oldukça yüksek infiltratif özellikte olduğunu kanıtlamıştır. Bu invazif tümörlerin cerrahisinde tek taraflı gliomları bulunan hastalarda iyi cerrahi rezeksiyon sınırlarına ulaşmak için hemisferektomiler gerçekleştirmiştir. Ancak, böylesine büyük girişimlerden sonra bile, GBM'ler kontralateral hemisferden meydana gelmiştir. Bu bulgular gliom hücreleri hakkında

önemli bir gerçeği ön plana çıkarmaktadır. Bu hücreler oldukça invaziftir ve hastalığın hiçbir radyografik kanıtının olmadığı beyin bölgelerine kolayca yayılırlar. GBM'lerin invazif özellikleri ağırlıklı olarak tümör hücrelerinin mikro çevreleriyle etkileşimiyle oluşur. Makrofajlar, endotelial hücreler, glial hücreler ve hücre dışı matriks (HDM) gibi tümör dışı hücrelerden oluşan mikro çevre tümör hücresi proliferasyonuna ve invazyonuna izin veren belirli özellikler taşır.

Moleküler düzeyde, gliomlar parankim içerisinde daha uzak bölgelere gliom hücre yayılımına yardım etme işlevi gören çok sayıda protein üretir. GBM'ler, işlevleri HDM ile etkileşim kurmak olan hücre adhezyon moleküllerini, HDM'nin işlevini bozan ekstraselüler proteazları ve hücrelerin beyin bir bölgesinden diğerine göç etmesini sağlayan promigratör/sitoskeletal proteinleri kullanır. Bu proinvazyon molekülleri arasında başı çeken hücre adhezyon reseptörü CD44'tür. CD44, HDM bileşenleri osteopontin (OP) ve hyalüronik asit (HA) için bir transmembran glikoproteindir (225). CD44'ün OP ve HA bağlanması, aktin sitoskeletonunu yeniden düzenleyerek hücre protrüzyonları oluşturarak hücrelerin daha hareketli hale gelmesine neden olur. Gliom hücrelerindeki diğer transmembran proteinleri, özellikle integrin ailesindekiler, sitoskeletal yeniden düzenlemeleri tetikler ve HDM bileşenlerinin bağlanması üzerindeki hücre hareketliliğini artırır. CD44, OP, HA ve integrin ailesi üyeleri, GBM'nin gen ifadesi çalışmalarında önemli ölçüde upregüle edilirler.

İnvazif GBM hücrelerinin, normal olarak hücre göçüne karşı kısıtlayıcı etkisi olan HDM'yi geçmesi gerekir. Anlamlı bir tümör hücresi göçü gerçekleştirmek için GBM'ler, HDM proteazlarını kullanan aktif bir HDM'i yeniden modelleme olayını gerçekleştirirler. Dört protein ailesi özellikle gliomla tetiklenen HDM yeniden modelleme işleminde önem taşırlar: çinko bağımlı matriks metalloproteinaz (MMP) ailesi, katepsinler olarak adlandırılan bir sistein proteazları ailesi, α disintegrin ve metalloproteinaz (ADAM) ailesi ve ürokinaz tipi plazminojen aktivatör reseptörü (uPAR). Bu proteinlerin hepsi de, HDM'nin seyrekleşmesini sağlayan ve böylece HDM yoluyla gliom hücrelerinin invazyonunu artıran HDM'nin protein bileşenlerinin degrade edilmesinde önemli roller oynarlar. Gliomlar için en sık görülen yayılma mekanizması HDM yoluyla gerçekleşen invazyondur. Gliom gen ifadesi çalışmaları GBM'lerdeki bu yolların hiperaktivitesini teyit etmektedir ve bu genlerin seviyeleri gliom derecesiyle olumlu bağıntı göstermektedir (225).

2.9.4. Anti-İnvazyon Tedavisi

Cerrahi, radyoterapi ve sitotoksik kemoterapi gibi konvansiyonel antineoplastik yaklaşımlar düzenleyici modeldeki tümör dokularını çıkarma modaliteleri olarak rol oynarken, biyolojik stratejiler yeniden düzenlemeyi ve uzun vadeli tümör kontrolünü indüklemeyi amaçlar. Anti-invazyon tedavisi malign gliomlardaki bu stratejilerden birini temsil eder ve sürecin moleküler temeline dayanır.

Gliomların tedavisi için anti-invazif veya anjio-inhibitör stratejiler olarak şu anda pek çok hedef araştırma sürecindedir. Her ne kadar bu durum hasta seçimindeki yargıdan kaynaklanabiliyor olmasına rağmen 131I ile etiketlenen tenaskine özel antikörlerin faz II çalışmaları yaşam süresinde hafif artışlar göstermiştir (222). Çalışmanın diğer kısıtlaması ilacın yalnızca difüzyonla verilerek uzak invazif gliom hücrelerini etkilenilmemiş bırakılmasıdır. Ek olarak, anti-anjiyogenez ajanlarının kullanılmasıyla proliferasyonu azaltarak tenascin-C'nin inhibisyonu tümör hücrelerinin, bir invazyon fenotipine dönüştürerek daha invazif hale gelmesine neden olabilir.

EMD121974 (cilengitide) $\alpha v\beta 3$ ve $\alpha v\beta 5$ integrininin HDM ile etkileşimini bloke etmek üzere görevlendirilmiştir. Böylece anjiogenez ve invazyondaki önemli bir süreci güçlü bir şekilde inhibe etmektedir. İn vivo çalışmalar anlamlı tümör regresyonu (223) göstermiştir ve ardından gelen EMD121974 ile yapılan tedavinin radyasyon tedavisiyle birleştirildiği klinik faz I çalışmaları ümit verici tümör yanıtının yanı sıra tedaviye klinik tolerans göstermiştir. (224)

2.10. KANSER VE HÜCRE DIŞI MATRİKS

Dokular sadece hücrelerden meydana gelmez. Hücreler ve hücre dışı matriksden meydana gelir. Hücre dışı matriks (HDM) hücreler arasındaki bağlantıyı ya da hücrelere desteği sağlamanın yanısıra hücrelerin davranışları, gelişimi, migrasyonu, proliferasyonu, adhezyonunda rol oynar. HDM, polisakkaritlerden ve proteinlerden oluşan karmaşık bir ağ yapısındadır. Makromoleküllerden oluşur. Makromoleküllerin türlerine ve miktarlarına göre bulunduğu dokuya göre özellik alırlar. Kemik ve diş dokusu gibi dokularda HDM oldukça sert yapıda olup kornea da transparan özelliktedir. Tendonlarda ise halat gibi yüksek gerilim gücüne sahip yapıdadır. Bu güne kadar HDM' in sadece destek dokusu görevi olan stabil yapıda olduğu düşünülürdü. Son çalışmalar göstermiştir ki HDM, bulunduğu dokunun fonksiyonlarını belirleyen oldukça dinamik bir yapıdır. Bu kompleks organizasyon bir çok hastalığın patogeneğinde rolü olmasına rağmen henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

Hücre dışı matriks içerisinde makromoleküllerin gömülü olduğu hidrate jelden oluşur. Bu makromoleküller dokudaki hücrelerden sekrete edilen glikozaminoglikanlara (GAG) kovalent bağlı çekirdek proteininden oluşan proteoglikanlar ve fibroz proteinlerdir. Sıklıkla konnektif dokuda bu hücreler fibroblastlardır. Fibroblastlar spesifik dokularda özel isim alabilirler. Mesela kemik dokuda osteoblast, kıkırdak dokuda kondroblast adını alırlar. Fibroz proteinler; strüktürel (kollajen, elastin), adhesiv (fibronektin, laminin) proteinler olmak üzere iki gruptur. Her iki grup farklı şekil ve büyüklüktedir. Polisakkarit jel kompresif güçlere karşı dayanmayı, kollajen lifler ise gerilme gücünü sağlar. Polisakkarit jelin sıvı fazı metabolitlerin, hormonların, besinlerin kan ve doku arasında hızlı difüzyonunu sağlar. Elastik lifler ise esnekliği sağlar. Adhesiv proteinler hücrelerin matriks içindeki kendilerine ait bölümlere yapışmasını sağlar. Örneğin fibronektin konnektif dokunun diğer hücreleri ve fibroblastların yapışmasını sağlar. Laminin ise bazal lamina epitelinin yapışmasını sağlar (251).

Hücre dışı matriks makromoleküllerinin düzenlenmesi kritik ve önemli biyolojik süreçlerle olur. Bunlardan her biri lokal hücrelerden sekrete edilen ekstrasellüler proteolitik enzimlerle parçalanır. Bu enzimler; matriks metalloproteazlar, serin proteazlardır. Metalloproteazların aktiviteleri için Zn ve Ca bağlanmasına ihtiyaç vardır. Bunlar fibronektin, kollajen, laminin gibi matrix proteinlerini parçalarlar. Kollajenaz gibi spesifik isimler alabilirler. Bu enzimler hücre dışı matriksteki ve hücre yüzeyindeki

proteinleri parçalarlar. Tümör hücresinin etrafını boşaltarak, bazal laminanın bütünlüğünü bozarak tümör invazyonunda rol oynarlar (251). İnvazyon için bazal membranın ve çevredeki interstisyel stromanın parçalanması gereklidir. İnvazyonu önleyen en önemli bariyer kollajendir. İnterstisyum ve stromada daha çok tip I ve tip III kollajen bulunurken, bazal membranda tip IV ve V kollajen bulunmaktadır.

Tümör invazyonu ve metastazın mekanizması ile ilgili yapılan yeni çalışmalarda, bazal membran (BM) ve HDM bozulmasının asıl basamak olduğu gösterilmiştir. MMP'ların burada çok önemli rol oynadığı ortaya konmuştur (231,250). Kanserde HDM, tümör dokusunun büyümesi ve tümör hücresinin yayılımını önlemek için primer bir bariyer olarak görev yapar. Malign tümörler bu bariyeri aşmak için metalloproteinazları kullanırlar (234).

Matriks metalloproteinazlar, HDM yıkımını hem direkt olarak hem de tümör invazyonuna karışan diğer biyolojik sistemlerle etkileşerek, hücre adezyon molekülleri, sitoskeletal proteinler ve büyüme faktörleri aracılığıyla gerçekleştirirler (226).

2.11. MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR

Matriks metalloproteinazlar (MMP); Hücre dışı matriks ile bazal membran komponentlerini parçalama yeteneğine sahip olan ve aktif bölgesinde çinko içeren homolog bir enzim ailesidir (232,234,249). Bu enzimler doku yeniden yapılanması, morfogenezis, yara iyileşmesi ve normal gelişimsel süreç gibi fizyolojik durumlarda rol oynadıkları gibi tümör hücresi invazyonu, anjiogenezis ve metastaz gibi patolojik süreçlerde de yer alırlar (234,249).

HDM ve bazal membranın parçalanması nonneoplastik dokunun yeniden oluşum sürecinde olduğu gibi kanser invazyonunda da önemli rol oynar. MMP'lar santral sinir sistemi, baş-boyun, mide, pankreas, kolon, böbrek, deri ve prostatın malign tümörlerinin invazyonunda belirgin bir rol oynar (234).

2.11.1. Sınıflandırma

Matriks metalloproteinaz ailesinin önceden tanımlanmış üyesine birçok yeni metalloproteinazın eklenmesi ile bugün 20'den fazla enzim bildirilmiştir (226,227,230,232,237). Matriks metalloproteinazlar, lökositler, keratinositler, fibroblastlar, makrofajlar, kondrositler, düz kas hücreleri gibi epitelyal ve mezenkimal kökenli hücreler tarafından sentezlenirler. Pek çok MMP embriyogenez aşamasında yaygın olarak eksprese edilir. Yetişkinlerde ise plasentada, endometriyumda, meme bezlerinin involüsyonu esnasında ve inflamasyonda hızla eksprese edilirler. Doku gelişimi ve farklılaşmasında, yeniden şekillenmede, ovulasyon, hücre göçü, angiogenez ile tam mekanizmaları bilinmese de birçok hastalığın patolojisinde MMP'ler önemli rol oynamaktadır. Kanser dışında, artrit, inflamasyon, multipl skleroz, kronik yaralar, kronik akciğer hasarı, bronşiyal astım, pulmoner tansiyon MMP'lerin rol aldığı başlıca hastalıklardır.

Yaygın kullanılan sınıflandırma substrat özelliklerine göre olandır:

- a) İntersitisyal kolejenazlar (MMP-1, MMP-8, ve MMP-13), fibriller yapıdaki kollajenleri parçalarlar.
- b) Tip IV kollejenazlar (Jelatinazlar) (MMP-2, MMP-9), bazal membran kollajenleri, jelatin, elastini parçalarlar.
- c) Stromelizinler (MMP-3, MMP-10, MMP-11), proteoglikanlar, fibronektin, laminin, jelatin, ve tip IV kolajenin globuler proteinlerini parçalar.
- d) Membran tip MMP (MT-MMP) 'lar (MT-1, MMP-15, MMP-16, MMP-17) bunlar karboksi terminallerinde transmembran domain içerirler ve hücre yüzeyinde membranına kovalent bağlıdırlar (252-254).

Matriks metalloproteinazlar genellikle pro/latent formda salınır. Enzim düzeylerinin kontrolü ekspresyon düzeyinin kontrolü ile sağlanır. Proteolitik aktivite için ekstrasellüler olarak aktivasyon gereklidir (236).

2.11.2. Matriks Metalloproteinazların Yapısı

Matriks metalloproteinazların primer yapısı incelendiğinde bu proteinlerin birkaç farklı bölge içerdiği görülmüştür (234).

1-Pre-domain bölgesi: İlk bölge; molekülü sekresyon için hedefleyen, ancak daha sonra uzaklaştırılan ve latent enzimde bulunmayan sinyal peptid dizesidir. 80-90 aminoasit içeren aminoterminal propeptiddir.

2-Pro-domain bölgesi: Yüksek derecede korunmuş PRCGVDPV dizesi içerir. Enzim aktive olduğunda çıkarılır. “Pro-domain” yapısında bulunan sistein rezidülerinin enzimin latent formunun korunmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Bu bölgenin çıkarılması, inaktif proenzimin aktif forma dönüşmesini sağlar.

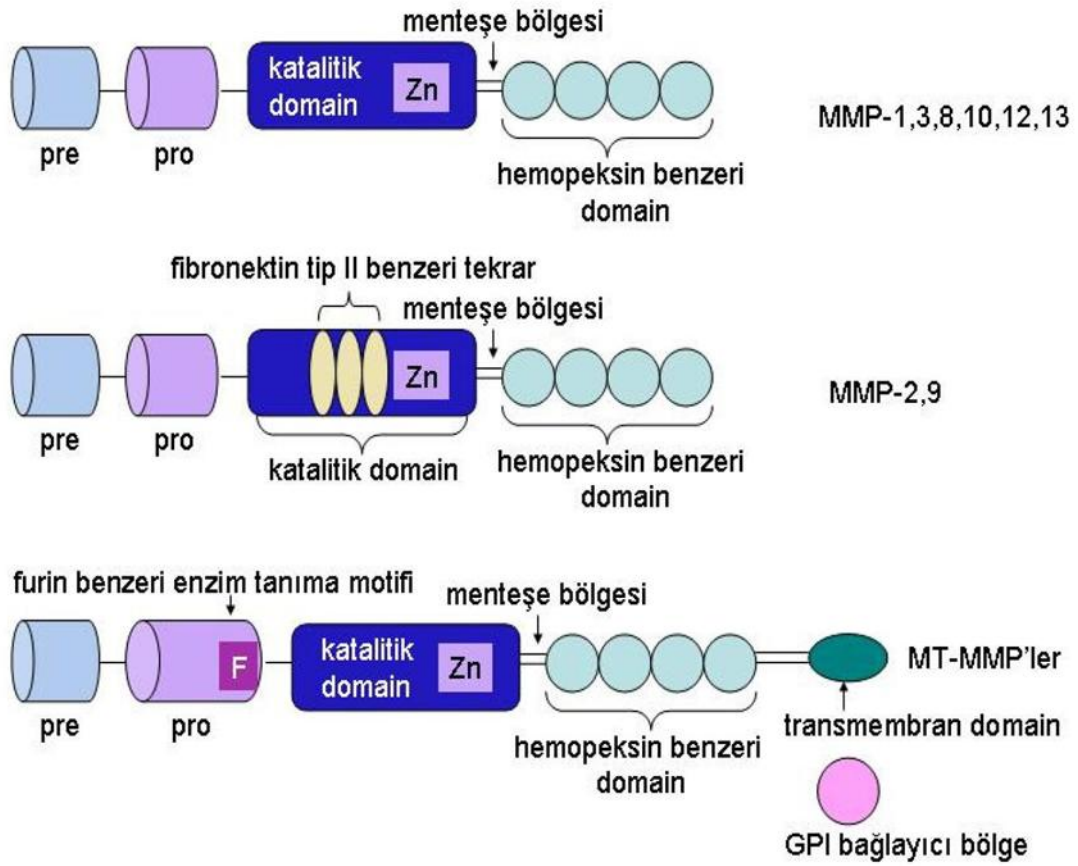
3-Katalitik bölge: Histidin rezidüleri içeren, bakteriyel metalloproteinazlardan termolizine analog olan ve fonksiyonel stabilitenin korunması için gerekli olan çinko iyonunu içeren bölgedir. Yaklaşık 170 aminoasit içerir.

4-Prolinden zengin bölge (menteşe bölgesi): Katalitik bölge ve son bölge arasında yer alır.

5-Hemopeksin benzeri bölge: Son kısımda hem bağlayan moleküllere dizin benzerliği nedeniyle, hemopeksin olarak adlandırılan bölge yer alır. Bu bölge N ve C terminal kısımlarını bağlayan disülfid bağı içerir ve katalitik bölgeye 5-10 aminoasitlik prolinden zengin bir bölge ile bağlanır. Matrilizin (MMP7) dışında tüm metalloproteinazlarda bulunur. Bu bölgenin fonksiyonu bilinmemekle birlikte substrat spesifitesini sağlama ya da plazminojen aktivatör ürokinaz sistemine analog olma özelliği ile, hücre yüzey reseptör alanını tanıma fonksiyonu gösterdiği ileri sürülmüştür. Substrata bağlanma ve TIMP ile etkileşime girmede fonksiyonel rolü vardır (234).

Bu genel yapının dışında; Jelatinaz A ve B, katalitik bölgelerinde fibronektinin kollajen bağlayan bölgesi ile ilişkili olan, sisteinden zengin jelatin bağlayan bir ekstra domain içerirler. Membran tipi metalloproteinazlar (MT-MMP) bir transmembran domain, stromelisin 3 ise furin benzeri bir kısım içerirler (Şekil 2) (234,237). Jelatinaz B ve MT- MMP nin tümü, tip V kollajenin α zincirine benzer bir kısım içerirler.

Şekil 2: MMP enzimlerinin moleküler yapısı (237)



2.11.3. Matriks Metalloproteinaz Aktivitesinin Düzenlenmesi

Latent zimojenler; MT-MMP'ler aracılığıyla, diğer proteazların etkisiyle veya önceden aktive olmuş MMP'lerin diğerlerini aktive etmesiyle aktiflenebilirler. Matriks metalloproteinazların proteolitik aktiviteleri üç basamakta düzenlenir. Bunlar transkripsiyon, pro-enzimin aktivasyonu ve enzim aktivitesinin inhibisyonudur (Şekil 3) (237).

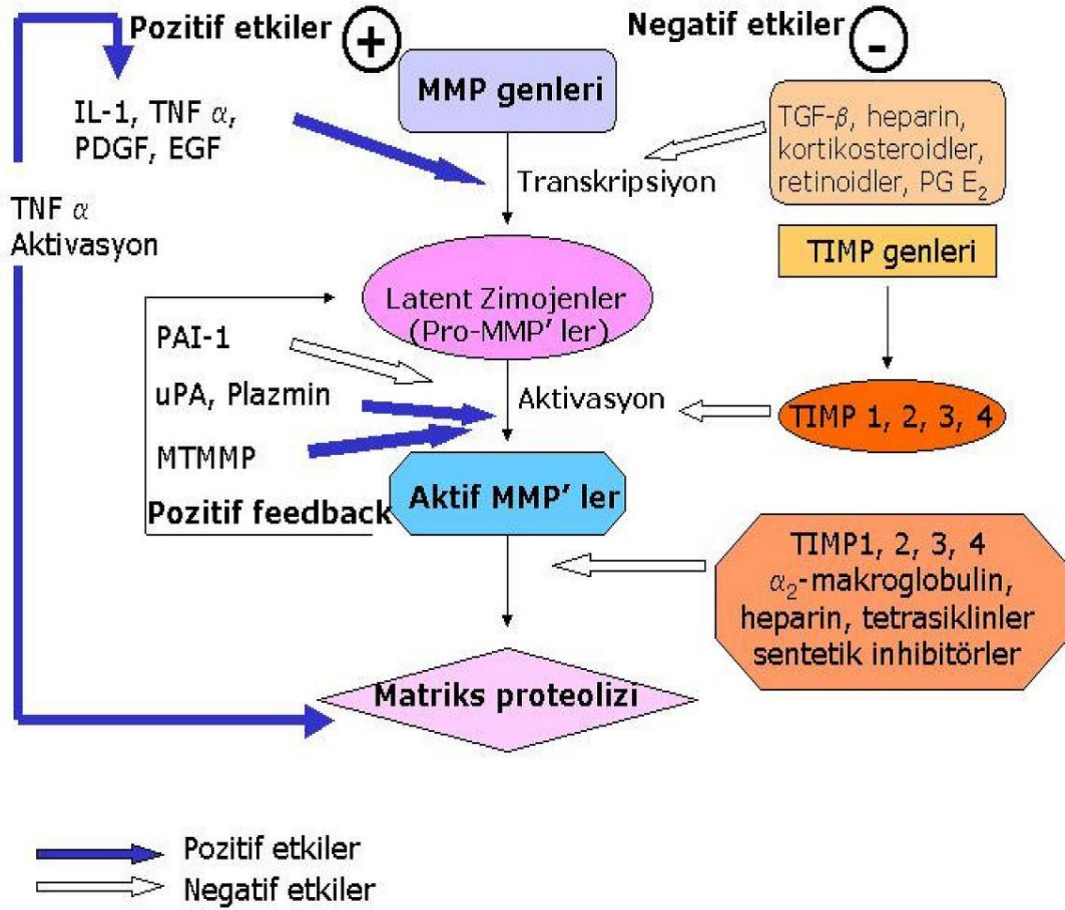
2.11.3.1. Transkripsiyonel Düzenleme

Matriks metalloproteinaz gen ekspresyonu tümör nekrozis faktör α (TNF- α), interlökin-1 (IL-1) gibi inflamatuvar sitokinlerle, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi birçok büyüme faktörü ve hormonlar ile stimüle edilir (Şekil 3). Transforme edici büyüme faktörü-b (TGF-b), heparin, kortikosteroidler, retinoidler, prostaglandin E2 (PGE2) ve diğer eikozanoidler ise MMP gen transkripsiyonunu inhibe ederler (235,237,238).

2.11.3.2. Proenzimin Aktivasyonu Aşamasında Düzenleme

Matriks metalloproteinazlar sentezlendikten sonra inaktif proenzim (zimojen) olarak salıverilirler. Pro-domain yapısında bulunan sistein rezidülerinin enzimin latent formunun korunmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Bu bölgenin çıkarılması, inaktif proenzimin aktif forma dönüşmesini sağlar.

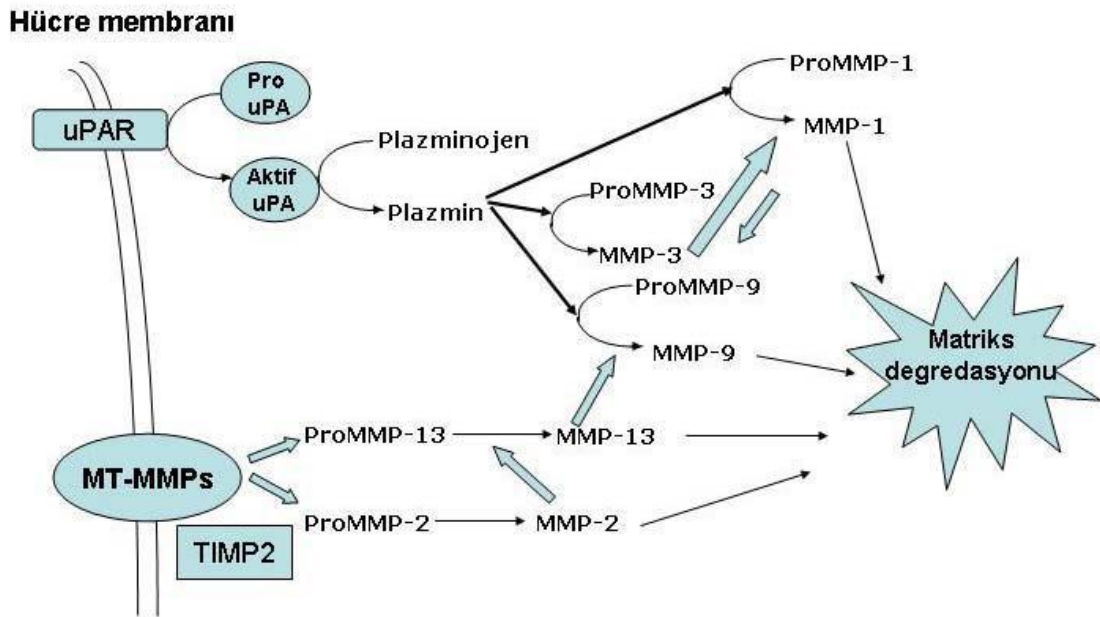
Şekil 3: MMP enzim aktivitesinin düzenlenmesi (237)



Matriks metalloproteinazların temel fizyolojik aktivatörü plazmindir. Çeşitli hücrelerde (endotel hücresi, monosit-makrofaj, düz kas hücresi) eksprese edilen ürokinaz-tip plazminojen aktivatörü (uPA)'nın aktif formunun plazminojeni plazmine dönüştürdüğü ve oluşan plazminin pro-MMP'leri aktive ettiği kabul edilmektedir (Şekil 4) (237). Ürokinaz-tip plazminojen aktivatörü aracılığı ile oluşan aktivasyon kaskadı ile pıhtılaşma kaskadı arasında benzerlikler vardır. uPA aracılı aktivasyon kaskadında bir MMP'nin aktivasyonu, diğer bir MMP'nin aktivasyonuna yol açar, aktiflenen enzim bir diğer MMP'yi aktive edecek şekilde bir döngü oluşturur (Şekil 4) (237). Bu şekilde plazmin pro- formdaki MMP-1, MMP-3 ve MMP-9'u aktif formuna dönüştürür. Daha sonra MMP-3 pro-MMP-1'i MMP-1'e dönüştürür. MMP-1 de pro-MMP-9'u aktif formuna dönüştürebilir. MT-MMP'ler de diğer MMP'lerin özellikle MMP-2'nin aktivatörüdürler. Oluşturdukları proteolitik aktivasyon plazminojen/plazmin aktivatör sistemine benzer şekilde hücre yüzeyinde gerçekleşir (237).

Matriks metalloproteinaz-2 ve MMP-9 aktive olmuş doku makrofajları tarafından üretilen (özellikle aterosklerotik plak içindeki köpük hücre makrofajları) serbest radikal etkisiyle HDM içinde kendiliğinden aktive olabilir (237).

Şekil 4: MMP'lar için hücre yüzeyi ile ilişkili aktivasyon kaskadı (237)



2.11.3.3. Matriks Metalloproteinaz Enzim Aktivitesinin İnhibisyonu

Metalloproteinazların proteolitik aktiviteleri spesifik doku inhibitörleri (TIMP) ile inhibe edilmektedir . MMP lerin çinko içeren katalitik bölgelerine bağlanırlar. MMP lerin TIMP' lar tarafından inhibisyonu, 1:1 sitokiyometride ve nonkovalent şekilde gerçekleştirilir. 4 farklı doku inhibitörü vardır. TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4 (15). TIMP'ler de MMP'ler gibi vasküler düz kas hücreleri, endotel hücreleri, kan hücreleri, bağ dokusu hücreleri ve makrofajlar tarafından sentez edilirler (12). TIMP lar değişik MMP türlerine göre de özgüllük gösterirler. Örneğin; Jelatinaz A (MMP-2) tercihen TIMP- 2 ile Jelatinaz B (MMP-9) ise TIMP-1 ile inhibe edilirler (237).

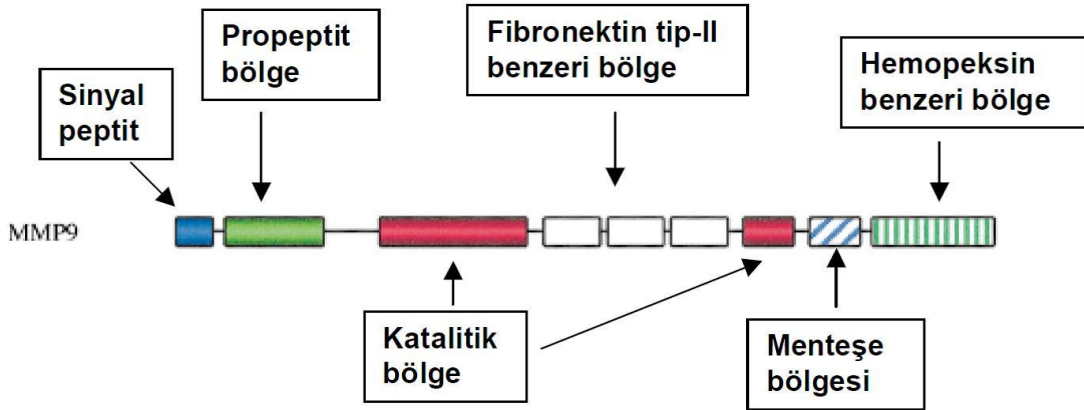
Doku inhibitörleri malign tümörün büyümesini, invazyonunu ve metastazını inhibe etmektedir(255). Metalloproteinazlar aynı zamanda alfa-1 proteinaz inhibitör ve alfa-2 makroglobulin gibi nonspesifik inhibitörler tarafından da inhibe edilir.(24). Ayrıca tetrasiklin analogları, non-selektif MMP inhibitörleri olarak kabul edilebilir. MMP molekülünün Zn içeren aktif bölgesine bağlanarak enzimde yapısal değişikliğe yol açarlar ve enzimin aktivitesini kaybetmesine neden olurlar (237). Son yıllarda peptid ve non-peptid yapıda sentetik MMP inhibitörleri de üretilmiştir (248). Bu inhibitörler en çok kanser tedavisinde olmak üzere kardiyovasküler hastalıklar, artrit, psöriyazis, peridontal hastalık ve makula dejenerasyonu gibi farklı hastalıkların tedavisinde denenmektedir.

2.11.4. Jelatinazlar (MMP-2 ve MMP-9)

Jelatinazlar, diğer MMP' lerden farklı olarak katalizör bölge ile aktif bölgesi arasında jelatin bağlayıcı bölge içeren enzim grubudur. Jelatinazlar, Tip IV, V, VII, X, XI ve XIV kollajen, jelatin, elastin, proteoglikan kor proteinleri, myelin temel proteini, fibronektin, fibrillin-1, TNF- α , Interlökin-1 β öncüllerini yıkma özelliğine sahiptirler. Bu grupta tip A ve tip B olmak üzere iki alt grup mevcuttur. Tip A jelatinaz, 72 kDa olup MMP-2 dir ve keratinositler, fibroblastlar, endotel hücreler, kondrositler, osteoblastlar, monositler gibi pek çok değişik hücre ve transforme olmuş değişik hücreler tarafından üretilir. MMP-2 aynı zamanda tip 1 kollajeni, MMP-9 ise asidik ortamda tip 1 kollajenin N-terminalini yıkarak HDM nin remodeling olayında önemli rol üstlenir (260,261).

MMP-9 (Jelatinaz B), ilk olarak 1974 yılında Sapota ve Dancemicz tarafından polimorfonükleer lökositlerden salgılanan bir jelatinolitik enzim olarak tanımlanmıştır (Şekil 5). Daha sonra yapılan çalışmalarda 92 kDa.luk bir molekül olarak salgılandığı, önce 87 kDa olan bir inaktif maddeye ve sonra aktif form olan 82 kDa veya 83 kDa' lık bir moleküle dönüştürüldüğü gösterilmiştir. 45-67 kDa arasında değişen aktif formları da izlenebilmektedir. MMP-9, aktivasyonunu takiben, denatüre kollajen ve jelatin, tip IV ve V kollajen ve elastini de içeren pek çok HDM elemanını yıkabilir. MMP-9, diğer bir jelatinaz olan MMP-2 ile substrat düzeyinde bir madde hariç oldukça benzerlik gösterir. MMP-9, kazeine karşı oldukça spesifikken MMP-2 de bu duyarlılık bulunmaz (260).

Şekil 5: Matriks metalloproteinaz-9 (259)



MMP-9, MMP ailesinin en büyük üyesidir. Sinyal peptidi, propeptit bölgesi, çinko atomu bağlayıcı bölüm, COOH-terminal hemopeksin benzeri bölüm olmak üzere

7 bölümden oluşur. Ayrıca katalitik bölüm ve hemopeksin benzeri bölüm arasında prolinden zengin bağlayıcı bölge yer alır. C-terminal hemopeksin benzeri bölüm substrat spesifitesini belirlemede anahtar rolü oynar. Fibronektin benzeri bölüm kollajen ve jelatinlere bağlanmayı kolaylaştırır (Şekil 5) (258). Jelatinazların salınımını etkileyen faktörler Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2: Jelatinazların salınımını etkileyen faktörler

Aktive Edici Faktörler			İnhibe Edici Faktörler
Hücre Yüzeyinde Etkili Faktörler	Kimyasal Ajanlar	Diğerleri	
Kalsiyum iyonofor A23187 Hücre füzyonu Konkanavalin A Kristaller Ürat Hidroksi apatit Kalsiyum pirofosfat İntegrin reseptör antikor Polihidroksietilmethakrilat Fagositoz	cAMP Kolşisin Lipopolisakkarit Mitomisin C Pentoksifilin Forbol diesterleri Prostaglandin E Trifluoperazin Fiziksel ajan : UV ışını	Viral transformasyon Onkogenler Otokrin ajanlar Fibroblastların yaşlanması İnterlökin Epidermal büyüme faktörü Platelet büyüme faktörü Tümör nekroz faktör	Retinoik asit Glukokortikoidler Adenovirüs-5EIA geni Östrojen Progesteron

2.11.5. Kanser Progresyonunda Proteinazların Rolü

Malign hücreler, invazyon ve metastaz yapma özelliğine sahiptirler. Glial tümörlü hastaların da ölümün major nedeni tümör invazyonudur. Yaklaşık 25 yıldan daha uzun bir zamandır kanser yayılmasında proteazların rolü bilinmektedir. Sistein ve aspartat proteazları, proteinleri asit pH’da parçalarken, intrasellüler proteolitik aktiviteden de sorumludurlar. Kanser invazyonunda hücre dışı matriksin ve bazal membranın parçalanması önemli rol oynar. Bu parçalanma çeşitli ekstrasellüler proteolitik enzimler sayesinde olur. Bu enzimler matriksi parçalayan proteazlar olarak bilinirler.

Bu grupta serin proteaz ailesi (tPA sistemi) ile birlikte matriks metalloproteinaz ailesi yer alır. Serin proteazları ve metalloproteinazlar nötral pH’da aktivite gösterirler (229). Tümör ile infiltre olmuş stromal hücrelerde matriksi degrade eden proteaz sisteminin komponentleri saptanmıştır. Bu da kanser invazyon sürecinde stromal

hücrelerin aktif rol oynadığını gösterir. Bu enzimlerin aktivitesi, proenzim aktivatörleri (uPA, MT-MMP), spesifik inhibitörler (PAI, TIMP) ve hücre yüzey reseptörleri (uPAR) ile düzenlenir. Matriks parçalanması, hücre dışı matriks komponentlerinin üretimi, proteinaz üretimi ve proteinaz inhibitörlerinin üretimi arasındaki dengeye bağlıdır (234).

Tümör dokusunda, proteinaz düzeyleri normal kolorektal dokudakinden daha fazladır. HDM'deki proteolitik hasarın nedeni olarak yüksek proteinaz seviyeleri gösterilmiştir. Bu durum tümörlerin invazyon ve metastaz potansiyelini de etkiler (232,240). Proteinazların oluşturduğu HDM hasarı primer olarak, spesifik proteinaz inhibitörlerince normal ve patolojik dokunun her ikisinde de düzenlenir. Ne var ki kanserde bu proteinazlar normal olarak düzenlenemezler (240). Aktif proteinazlar ve inhibitörleri arasındaki denge, metastatik kaskadın her bir evresinde ortaya çıkacak HDM yıkımı/ remodeling olup olmadığını belirlemede önemlidir (240).

Matriks metalloproteinazların artrit, yara iyileşmesinde, aortik anevrizmalar, konjestif kalp yetmezliği gibi birçok patolojik durumda rol oynadığı ileri sürülmektedir (240,241). Kronik obstrüktif akciğer hasarı (KOAH), akut akciğer hasarı, bronşiyal astım, pulmoner hipertansiyon gibi selim akciğer hastalıkları ile akciğer kanserinin MMP-9 ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (244).

Jelatinazlar kollajenleri, jelatinleri, fibronektini ve elastini parçalayabilirler. Bu enzimler katalitik bölgeye ilişmiş 3 kez tekrar eden fibronektin benzeri bölgeler içerirler. Jelatinaz B (MMP-9) kolorektal kanserler başta olmak üzere akciğer, mesane, mide ve derinin yassı hücreli karsinomlarında makrofajlarında saptanmıştır. MMP-2 ve MMP-9 bazal membranın majör komponenti olan kollajen IV'ün yapısını bozarlar (232). MMP-2 ve MMP-9 malign dokularda en fazla belirlenen, tümör saldırganlığı ve metastatik potansiyelle ilişkili olduğu saptanan MMP'lardır (242,243).

Diğer bir MMP, interstisyel kollajenaz (MMP-1) meme, beyin, mide, baş boyun kanserlerinde saptanmıştır. Kolorektal kanserlerde insitu hibridizasyon (İSH) tekniği ile eozinofil ve fibroblastlarda artmış MMP-1 düzeyi gösterilmiştir. Kolorektal kanser hücrelerinde MMP-1'in Duke's evrelendirmesinden bağımsız olarak kötü prognozla birlikte olduğu gösterilmiştir (227). Bazal hücre karsinomlarında stromal hücrelerde MMP-1 düzeyinin artışı, immünohistokimyasal (İHK) yöntemlerle gösterilmiştir. Mide

kanserinde tümör stromasının makrofaj ve fibroblast benzeri hücrelerinde lokalize olmuştur (234).

Stromelizin-1 (MMP-3) ve stromelizin-2 (MMP-10) bazal hücreli kanserde, baş boyun yassı hücreli karsinomlarında, prostat, mide, kolon ve pankreas karsinomlarında saptanmıştır. Yine, stromelizin-3 (MMP-11) baş boyun, mide, kolorektum, karaciğer, akciğer, böbrek, deri ve pankreas kanserlerinde stromada artmış olarak bulunurken neoplastik epitelde lokalizasyonu saptanmamıştır. İnvazif meme kanserinde in situ meme kanserinden daha fazla olması ve kolorektal kanserde gözlenirken benign kolon adenomunda gözlenmemesi, MMP-11'in giderek artan miktarlarının tümörün invazif olma potansiyeli ile doğru orantılı olduğunu düşündürmektedir. Buna karşılık tüm MMP'ları tümör gelişiminin destekçisi değildir. Gerçekte MMP-12 ekspresyonunda artış, tümör büyümesinin inhibisyonunda rol oynar. Pro MMP-9'un aktivasyonunda MMP-13'ün rolü vardır. MMP-13'ün tümörlerde normal dokulara göre arttığı bildirilmiştir (227).

Matrilizin (PUMP-1, MMP-7) düzeyleri mide, meme, prostat, ve kolorektal kanserde artış göstermektedir. Kolorektal kanserlerde de tümörün geç evrelerinde matrilizin düzeyleri yükselir. Atipik malign tümörlerden olan ve metastaz yapmayan bazal hücreli karsinomlarda ise matrilizin düzeylerinde artış izlenmemiştir. Bu da matrilizin düzeylerinin tümör progresyonunda önemli bir rolü olduğunu kanıtlar.

Membran tipi MMP'ler (MT-MMP) jelatinaz aktivasyonunda rol alırlar. Jelatinaz aktivasyonu, tümör hücrelerinin göçü için önemlidir. MT-MMP'ların mRNA ve proteini mide kanserinde neoplastik bölgede kolon, meme, baş boyun kanserinde ise stromada saptanmıştır (234).

Son derece potent olan bu endopeptidazların regülasyonunda çeşitli sitokinler, büyüme hormonları, perisellüler ortam, hücre matriks ilişkisi ve hücre dışı matriks rol oynar. Bu enzimlerin ekstrasellüler aktivasyonlarının kontrolünde endojen inhibitörlerle olan inaktivasyon da oldukça önemlidir. (228,230,232,245,246).

Metalloproteinazların spesifik doku inhibitörleri (TIMP) in vivo koşullarda bu enzimlerin aktivitesinin regülasyonunda önemli rol oynarlar, tümör invazyon ve metastazını reversibl olarak inhibe ederler. Dokudaki ve ekstrasellüler sıvıdaki TIMP konsantrasyonları genellikle MMP konsantrasyonlarından fazladır. Böylece doğal

inhibitörler fokal perisellüler bölgede enzimin proteolitik etkisini sınırlar (247). TIMP'lerin transkripsiyonu MMP'lere benzer şekilde sitokinler (TNF α , IL-1, IL-6) ve büyüme faktörlerince (TGF β) düzenlenir. MMP'lar ve TIMP'ler arasındaki oran çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde değişmekte olup aradaki dengedeki değişiklikler farklı tabloların patogeneğinde önemli roller oynayabilmektedir (234).

2.11.6. Matriks Metalloproteinaz İnhibitörleri (MMPI)

MMP aktivitesinin ekstrasellüler alanlarda inhibisyonu, invazyonu durdurulması amacıyla çalışmalar halen sürmektedir. Geleneksel sitotoksik ilaçlara ek olarak MMPI ile ilgili çalışmalar mevcuttur. MMPI tümörün büyümesini tümör çevresinde fibrotik bir kapsül oluşturarak, tümörün indüklediği anjiogenezi inhibe ederek ve aynı zamanda tümör hücrelerinin apoptozun indükleyerek invazyonu engeller (256). Erken evre tümörlerde MMPI ile daha olumlu sonuç elde edileceği düşünülmektedir. İri tümörlerde maksimum tolere edilebilecek ilaç dozu kutanöz raş ve artralji gibi yan etkileri nedeniyle kısıtlıdır.(257)

2.12. MUTASYONLAR VE POLİMORFİZMLER

2.12.1.Mutasyon

Mutasyon DNA'nın sekansındaki veya DNA düzenlenmesinde meydana gelen herhangi bir değişiklik olarak tanımlanır. Bir gen lokusunda meydana gelen mutasyon ciddi fizyolojik sorunlara yol açabilmekte ve hastalık için belirleyici olarak kabul edilmektedir. Mutasyonlar, üç kategoride sınıflandırılır:

- 1.Genom mutasyonları, hücredeki kromozom sayısını etkileyen kromozomlardır. Mayoz ve mitozdaki hatalardan kaynaklanır.
- 2.Kromozom mutasyonları, kromozomların yapısını değiştiren duplikasyon, delesyon, insersiyon ve translokasyon gibi kromozomun bir parçasını içine alan anormalliklerdir.

3.Gen mutasyonları, belirli genleri etkileyen mutasyonlar olup tek bir nükleotid değişikliğinden yüzlerce baz çiftini etkileyen değişikliklere kadar uzanan DNA sekans değişiklikleridir.

2.12.2. Mutasyon Çeşitleri:

2.12.2.1. Nükleotid değişimi mutasyonları

a-Missens mutasyonlar; Bir DNA sekansındaki tek bir nükleotid değişimi (nokta mutasyon) üçlü baz kodunu değiştirir ve gen ürününde bir amino asitin yerine başka bir amino asitin geçmesine sebep olur. Meydana gelen proteinde fonksiyon farklılığı ortaya çıkar.

b-Nonsens mutasyonlar; Terminasyon kodonunda meydana gelen bir mutasyon translasyonun erken sonlanmasına yol açar.

c-RNA kesim mutasyonlar; RNA kesim bölgeleri, şapka bölgeleri ve poliadenilasyon bölgelerinin tahrip olmasıyla veya kriptik bölgelerin oluşmasıyla meydana gelir.

d-Transisyon ve transversion; DNA sekansındaki pürin bazları yerine başka bir pürin bazını veya pirimidin başka bir pirimidin değişimini içeren nükleotid değişikliklerine transisyon denilir. DNA sekansındaki pürin ile pirimidinin yer değiştirmelerinden kaynaklanan mutasyona ise transversiyon denilir.

2.12.2.2. Delesyon ve insersiyonlar

Delesyon ve insersiyonlar DNA sekansı üzerinde bazların sekansa girip veya çıkmasından ortaya çıkarlar. Bu mutasyonlara bağlı olarak tamamen yeni bir proteinin oluşabilir veya çerçeve kayması mutasyonunda meydana gelebilir.

2.12.2.3. Duplikasyonlar

DNA kendini eşlerken belirli bir sekans dizisini ardı ardına iki kere eşlemesinden oluşur. Yani, bir sekans dizisi DNA üzerinde tekrarlanır.

2.12.2.4. Translokasyonlar

Homolog olmayan kromozomlar arasındaki nükleotid dizi parçalarının değişiminden kaynaklanan mutasyonlardır.

2.12.3. POLİMORFİZM

Polimorfizm bir genin DNA sekansındaki doğal çeşitliliğidir. Yani, iki veya daha fazla alternatif genotipin popülasyonu en az %1’de görülmesidir. Polimorfizmler organizma üzerinde herhangi bir anormal etkisi yoktur. Mutasyonlardan farklı olarak polimorfizmlerin varlığında hastalık ortaya çıkmaz, ancak hastalıkla ilişkili allelerin hastalarda sağlıklı bireylere nazaran daha sık görüldüğü bilinmektedir. Polimorfizmlerin anlaşılmasında hastalıkla ilişkili olduğu bildirilen allellerin sağlıklı kimselerde de bulunabildiği ve hastalıklı bazı bireylerde ise bu allellerin bulunmadığının bilinmesi önemlidir. ABO kan grupları, Rh kan grupları ve MHC polimorfizme örnek olarak verilebilir.

Her yeni zigotun ebeveyn genomlarında bulunmayan 100 civarında baz çifti değişikliği içermesi beklenir. Bu varyasyonların çoğu coding sekansta değil ekstrasenik sekansta veya noncoding sekans bölgelerinde bulunur. Genetik çeşitlilik kromozom boyamalarında, protein varyasyonlarında, DNA sekansı değişikliklerinde veya hastalık olarak gösterebilir. Her ne kadar bütün polimorfizmler DNA sekansındaki farklılıkların sonucu olsa da bazı polimorfik lokuslar, allellerin kendi DNA sekansında ki farklılıklardan ziyade alleller tarafından proteinlerdeki varyasyonlar incelenerek ortaya çıkarılabilir.

2.12.4. TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMİ (SNP) ve ANALİZ YÖNTEMLERİ

Tek nükleotid polimorfizmi DNA üzerinde herhangi bir şekilde meydana gelmiş tek bir nükleotid değişimidir. Bu bir delesyon veya insersiyon sonucu meydana gelebilir. Tek nükleotid polimorfizmleri toplumda DNA zincirinin belli bir bölgesindeki nükleotid çiftinin sıklıkla değiştiği bölgeler olarak tanımlanabilir. Örneğin DNA üzerinde belirli bir noktada bulunan T-A baz çifti popülasyondaki diğer bazı bireylerde G-C baz çifti olarak bulunuyorsa bu bölgede bir SNP vardır diyebiliriz. SNP farklı iki allelin bulunduğunu buna bağlı olarak da üç farklı genotip oluşacağını göstermektedir. Bunlar homolog kromozomların her ikisinde de T-A baz çiftinin bulunduğu homozigot T-A genotipi, homolog kromozomların birisinde T-A diğerinde G-C olan heterozigot genotip ve homolog kromozomların her ikisinde de G-C nükleotidleri bulunan homozigot G-C genotipidir. SNP’ler bir genin kodlanmayan bölgesinde de bulunabilir. Rasgele seçilen iki insanın DNA’sı protein kodlayan kısımda 1000-3000 bp civarında

bir farklılık gösterirken kodlanmayan bölgelerde yaklaşık olarak 500-1000 bp da bir farklılık göstermektedir. DNA dizisindeki bir farklılığın SNP olarak kabul edilebilmesi için popülasyonda %1 den daha sık görülüyor olması gerekmektedir. Daha nadir olarak görülen değişiklikler mutasyon olarak kabul edilmektedir. SNP'ler insanlar arasındaki genetik farklılıkların en genel türleridir ve hem insanlar hemde kromozomlar arasında eşit dağılımlar göstermektedir.

2.12.4.1. Tek zincir konformasyon polimorfizmi (SSCP)

Tek zincir konformasyon polimorfizmi analizi (SSCP) bilinmeyen mutasyonların tesbit edilmesinde ve bilinen mutasyonların taranmasında kullanılır. Genetik analiz yöntemleri içinde en kolay uygulanabilen bir metot olduğun içinde her genetik laboratuvarında gerçekleştirilebilir.

SSCP metodunda polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılan ürün 95°C'de denature edildikten sonra soğutma veya sodyum hidroksit gibi yöntemler kullanılarak ürünün çift zincirli heliks yapısında dönmesi engellenir. Böyle bir durumda her bir zincir kendisi üzerinde sarmal oluşturarak yapısal dengesini korumaya yönelir. Oluşan bu yeni tek zincirli sarmal yapı oligonükleotitdeki baz dizilimine ve baz sayısına göre değişik konformasyonlar oluşur. Buna bağlı olarak yapılan elektroforezde ürünler aldıkları son konformasyona bağlı olarak farklı uzaklıklarda yürüyeceklerdir. Böylelikle zincirler arasında meydana gelen bu uzunluk farkı zincirlerin bir birinden farklı baz dizilişine sahip olduğunun kanıtıdır.

SSCP yöntemi güvenilirliği 110 ila 280 bp uzunluğundaki PZR ürünleri için geçerlidir. Burada bir diğer husus SSCP yönteminde kullanılan jel özelliği ve ortam şartlarıdır. Gerek jel ve gerekse ortam optimizasyonu alınacak sonuçlara direkt etki edeceğinde SSCP metodunun optimizasyonu olmazsa olmaz şartıdır. Örneğin jel konsantrasyonu ve jel yapımında kullanılan madde içerikleri oldukça önemli parametrelerdir.

2.12.4.2. Kesim Parça Uzunluğu Polimorfizmleri “Restriction Fragment Length Polymorphisms” (RFLP) Test Tekniğı

DNA seviyesinde tek bir nükleotit değişikliğı çoğu kere normal üründen sapmalar meydana getirir. Bunun yanı sıra üründe hiç bir değişiklik yapmayan tek nükleotid polimorfizmlerde mevcuttur. Polimorfizmin teşhisinde kullanılan yöntemlerden biri de RFLP test yöntemidir.

1980 yılında D. Botstein, R.L. White, M.H. Skolnick ve R.W. Davis yeni bir metot geliştirdiler. Bu metoda göre restriksiyon enzimleri DNA'yı belirli noktalardan kesecek ve bu kesimlere bağlı olarak farklı uzunlukta oligonükleotid parçaları elde edilecek. Ardından yapılan elektroforez işleminden sonra, oluşan bu parçaların uzunluklarına bağlı olarak örnekler arasında baz diziliş i açısından bir fark olup olmadığı gösterilecektir. Örneğ in PZR ile çoğaltılmış 1000 bç'lik bir amplikon restriksiyon enzimlerince muamele edilir. Eğer restriksiyon enzimi tanıma bölgesinde herhangi bir polimorfizm mevcut ise enzim o bölgeyi tanımayacağı için kesmeyecek ve parça yekun bir halde kalacaktır. Fakat polimorfizm olmaması durumunda enzim kesme iş lemini yaparak tanıma bölgesine bağlı olarak 1000 bç'lik oligonükleotidi parçalara ayıracaktır.

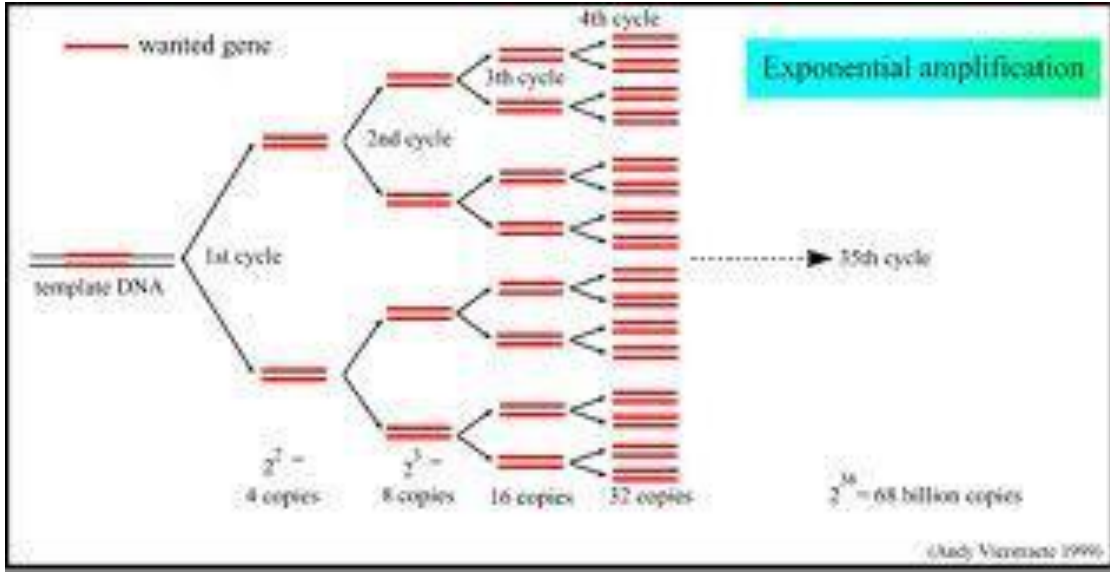
Burada yapılacak analiz yönteminde sadece restriksiyon enzimi tanıma bölgesinde meydana gelebilecek bir polimorfizm belirleneceğı için çok geniş bir tarama yapılması söz konusu değildir. Ayrıca SSCP yönteminde de olduğu gibi yalnızca mutasyonun varlığını göstermekle birlikte mutasyonun ne olduğunu açıklamaya yeterli değildir.

2.12.5. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR)

Tüm dünyada canlıları oluşturan genetik yapının çözülmesi, ortaya çıkarılan bu yapıdaki genlerin yerlerinin saptanması, işlevlerinin anlaşılması, ilişkilerinin belirlenmesi amacıyla yürütölen çalışmalar büyük bir hızla devam etmektedir. Bu amaç doğrultusunda, belirlenen hedefe ulaşmayı kolaylaştıracak, hızlandıracak yöntemlerin geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir. Basit gibi görünmekle birlikte, geliştirilen bu yöntemlerin en önemlilerinden birisi Polimeraz Zincir Reaksiyonudur.

1985 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan Cetus şirketine bağlı olarak çalışan Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilen metod nükleik asitlerin canlı organizma içinde bulunmadan, uygun koşullar altında çoğaltılmasına dayanır. Hem araştırmada hem de klinik laboratuvar tanısındaki uygulama alanlarıyla büyük öneme sahip olan PZR'ın geliştirilmesindeki çalışmaları nedeniyle, K.Mullis, 1993 yılı Nobel Kimya Ödülünü almaya hak kazanmıştır.

Şekil 6: Polimeraz zincir reaksiyonu



Polimeraz Zincir Reaksiyonu bir çeşit in vitro (canlı organizma dışındaki yapay ortam) klonlamadır. PZR ile bir hedef DNA parçasından milyonlarca çoğaltmak mümkündür. Reaksiyon başlatılmadan önce istenen sayıda döngünün tekrarlanması sağlanabilir. PCR'ın en önemli özelliği çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamasıdır. Bir PCR döngüsü için gerekli olan beş ana madde vardır: DNA örneği, genelde genomik DNA; çoğaltılacak bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen bir çift sentetik primer; deoksi-nükleotit-trifosfatlar (dNTP); yüksek ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi; uygun pH ve iyon koşullarını (Mg^{+2}) sağlayan tampon karışımı, genelde $MgCl_2$ 'dir.

Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenilen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı olan, bir çift sentetik oligonükleotid primeri kullanılarak, bu iki primerin 5' uçları ile sınırlandırılmış olan bölgenin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır. Oligonükleotid primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelерinde

denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle birleşirler. Bir PCR döngüsü sırasıyla, DNA çift zincirinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılması (denaturation), sentetik oligonükleotid primerlerin hedef DNA bölgesine bağlanması (annealing) ve primerlerin yeni DNA zincirini oluşturacak şekilde uzaması (extension) aşamalarından meydana gelir. Ardı ardına tekrarlanan denatürasyon, primerlerin bağlanması ve uzama evreleriyle DNA fragmentleri üssel olarak artar. Böylece, 20 döngülük bir PCR sonucunda tek bir hedef diziden yaklaşık bir milyon kopya oluşturulur. Bu üssel artışın nedeni, bir döngü sonucu sentezlenen ürünün, ardışık döngüde diğer primer için kalıp görevi yapmasıdır. Böylece her PCR döngüsü DNA molekülü üzerinde istenilen bölgenin iki katına çıkması ile sonuçlanır. PCR boyunca biriken ürünlerin boyu iki primerin boyu ve hedef DNA bölgeleri arasındaki mesafelerin toplamı kadardır.

Bir PCR döngüsü için gerekli olan beş ana bileşen vardır:

- 1.Çoğaltılmak istenen DNA fragmentini (tek bir gen, genin bir bölümü ya da DNA'daki kodlamayan bir dizi) içeren kalıp DNA
- 2.Çoğaltılacak bölgenin başlangıç ve bitiş bölgesini belirleyecek olan iki adet oligonükleotid primeri
- 3.Taq Polimeraz ya da başka bir ısıya dayanıklı polimeraz enzimi
- 4.DNA polimerazın kalıp DNA'dan sentezleyeceği yeni zincir için kullanacağı Deoksiribonükleotid-trifosfatlar (dNTP)
- 5.Kullanılan DNA polimeraz için uygun bir kimyasal çevre sağlayacak olan tampon karışımı

PCR yöntemi kolay uygulanabilir olması ve hızlı sonuç vermesi gibi avantajları nedeniyle, birçok farklı alanda kullanılabilmektedir. Bu alanlar şöyle özetlenebilir:

- 1) Kalıtsal hastalıklarda taşıyıcının ve hastanın tanısı,
- 2) Prenatal(doğum öncesi) tanıda,
- 3) Klinik örneklerde patojen(hastalık yapabilecek) organizmaların saptanması,

- 4) Adli tıpta,
- 5) Onkogenesisin(kanser yapan hücrelerin oluşum evresi) araştırılmasında,
- 6) Klonlamada; gen tanımlaması araştırmalarında,
- 7) DNA dizi analizinde; büyük miktarda DNA örneklerinin oluşturulmasında,
- 8) Bilinmeyen dizilerin tayininde,
- 9) Geçmiş DNA'nın incelenmesi ve evrimin aydınlatılmasında,
- 10) "Restriction Fragment Length Polymorphism" (RFLP) analizinde,
- 11) In vitro fertilization (canlı hücre dışında gerçekleşen sperm yumurta birleşmesi) yapılan tek hücrede, implantasyon (döl tutma) öncesi genetik testlerin yapılmasında ve implantasyonun gerçekleştirilmesi ile bebeğin normal doğumunun sağlanması sırasında,
- 12) DNA-Protein interaksiyonunun (etkileşiminin) araştırılmasında ("footprinting") kullanılabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Hasta ve Kontrol Gruplarının seçilmesi

Bu çalışmaya 2007-2011 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Nöroşirürji Kliniğinde opere edilen ve intrakranial kitle rezeksiyonu sonrasında glial tümör tanısı alan 100 hasta dahil edilmiştir. Hastaların demografik özellikleri (yaş, cinsiyet, tümör lokalizasyonu, WHO sınıflamasına göre tümör patolojileri...vb.) arşiv verilerinden çıkartılmış ve son kontrol muayenesinde kan örneği vermek için gönüllü olan hastalardan periferik venöz kan örneği alınmıştır. Kontrol grubu olarak yaş ve cinsiyet uyumlu 100 sağlıklı hastadan periferik venöz kan örneği alınmıştır. Hasta ve kontrol grubu gönüllülerinden ayrıntılı onam alınmıştır. Bu çalışmaya İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı alındıktan sonra başlanmıştır.

3.2. Demografik Bilgiler

Bu çalışmada histopatolojik olarak desteklenmiş ve pür astrositik hücrelerden kaynaklı glial tümör tanısı konmuş 100 hasta ile daha önceden bilinen intrakranial hastalık hikayesi olmayan 100 kontrol grubu dahil edilmiştir. Hastaların 59'u erkek, 41'i kadından oluşmuştur. Kontrol grubunun da 60'ı erkek, 40'ı kadından oluşmuştur. Yüz hastadan 70'i histopatolojik olarak yüksek dereceli glial tümör (WHO sınıflaması 3. Ve 4. Derece), 30'u ise düşük dereceli glial tümör (WHO sınıflaması 2. Derece) ve pilositik astrositom (WHO sınıflaması 1. Derece) lardan oluşmaktadır. Hasta grubundaki 40 vakanın lezyonu sağ hemisferde, 36 vakanın sol hemisferde, 16 vakanın posterior fossada, 6 vakanın ventrikül içinde, 2 vakanın de beyin sapında bulunmuştur. Tümörlerin 23'ü temporal, 17'si frontal, 14'ü parietal, 4'ü oksipital, 4'ü insüler, 4'ü frontoparietal, 4'ü parietookspital, 3'ü talamik, 2'si frontotemporal, 1'i de temporoparietal yerleşimli olarak tespit edilmiştir. Hastaların 8 tanesi daha önceden ameliyat edilmiş ve nüks etmesi üzerine tekrar ameliyat edilmiştir. Tablo 3'de çalışmaya dahil edilen hastaların demografik ve klinik özellikleri özetlenmektedir.

Tablo 3: Hastaların demografik ve klinik özellikleri

Hasta #	Cinsiyet	Yaş	Şikayet	Lokalizasyon	Patoloji
1	K	52	Baş ağrısı	Sağ paryetal	GBM
2	E	39	Nöbet	Sağ temporal	Astrositom grade 2
3	E	69	Nöbet	Sağ temporal	GBM
4	E	58	Nöbet	Sağ frontotemporal	Astrositom grade 2
5	E	68	Baş ağrısı	Sağ temporal	GBM
6	E	37	Nöbet	Sol paryetal	Astrositom grade 2
7	E	6	Baş ağrısı/kusma	Posterior fossa	Pilositik astrositom
8	K	56	Baş ağrısı	Posterior fossa	Anaplastik astrositom
9	E	65	Görme kaybı	Sol frontal	Anaplastik astrositom
10	K	4	Dengesizlik	Posterior fossa	Pilositik astrositom
11	E	65	Baş ağrısı	Sağ temporal	GBM
12	E	58	Baş ağrısı	Sağ paryetokspital	GBM
13	K	20	Kusma/ataksi	Posterior fossa	Pilositik astrositom
14	E	63	Uyuklama	Sağ temporal	GBM
15	E	60	Nöbet	Sağ frontal	GBM
16	E	5	Sol nistagmus	Intraventriculer	Anaplastik astrositom
17	K	54	Şuur etkilenmesi	Sağ temporal	GBM
18	K	9	Sol hemiparezi	Sağ talamik	Pilositik astrositom
19	K	41	Baş ağrısı	Sol frontotemporal	GBM
20	E	24	Nöbet	Sol paryetal	Astrositom grade 2
21	K	6	Baş ağrısı/kusma	Posterior fossa	Pilositik astrositom
22	E	52	nöbet	Sağ frontal	GBM
23	E	17	Baş ağrısı,ataksi	Posterior fossa	Pilositik astrositom
24	E	72	Sol hemiparezi	Sağ frontoparietal	GBM
25	E	28	Baş ağrısı	Sağ temporal	Astrositom grade 2
26	E	17	Baş ağrısı	Ventrikül içi	Astrositom grade 2
27	E	43	Baş ağrısı	Sol frontal	GBM
28	K	3	Kusma	Posterior fossa	Pilositik astrositom
29	E	44	Sağ hemiparezi	Sol paryetal	Astrositom grade 2
30	E	80	Nöbet	Sağ temporal	GBM
31	E	58	Nöbet	Sağ frontoparietal	GBM
32	E	39	Baş ağrısı/ataksi	Posterior fossa	Pilositik astrositom
33	E	39	Nöbet	Sol insüler	Astrositom grade 2
34	E	45	Nöbet	Sol paryetal	GBM
35	E	52	Baş ağrısı	Sol paryetal	Anaplastik astrositom
36	E	32	Sol görme kaybı	Sol frontal	GBM
37	K	31	Baş ağrısı	Sol paryetal	Astrositom grade 2
38	K	19	Baş ağrısı,diplop	Ventrikül içi	GBM

Tablo 3: Hastaların demografik ve klinik özellikleri (Devam)

Hasta #	Cinsiyet	Yaş	Şikayet	Lokalizasyon	Patoloji
39	E	64	Sağ hemiparezi	Sol temporal	GBM
40	K	37	Nöbet	Sol temporal	GBM
41	E	16	Sol hemiparezi	Sağ frontoparietal	GBM
42	K	5	Baş ağrısı / kusma	Posterior fossa	Astrositom grade 2
43	E	14	Baş ağrısı, bulantı	Sağ talamik	Astrositom grade 2
44	K	19	Dengesizlik, kusma	Posterior fossa	Pilositik astrositom
45	E	61	Nöbet	Sağ frontal	GBM
46	K	39	Nöbet	Sağ paryetal	Anaplastik astrositom
47	K	51	Baş ağrısı	Sağ frontal	GBM
48	E	47	Nöbet	Sol temporal	GBM
49	K	18	Baş ağrısı, ataksi	Posterior fossa	Astrositom grade 2
50	K	73	Baş ağrısı	Sağ temporal	GBM
51	K	45	Baş ağrısı	Sol oksipital	GBM
52	K	17	Baş ağrısı, kusma	Posterior fossa	Pilositik astrositom
53	E	72	Unutkanlık	Sağ frontal	GBM
54	K	34	Nöbet	Sağ insüler	Astrositom grade 2
55	E	31	Nöbet	Sol paryetooksipital	Astrositom grade 2
56	K	60	Baş ağrısı, ataksi	Sağ temporal	GBM
57	E	48	Nüks	Sol paryetal	GBM
58	K	43	Baş ağrısı	Talamik	GBM
59	K	33	Kollarda güçsüzlük	Bulbus	Anaplastik astrositom
60	E	51	Baş ağrısı, ataksi	Sağ temporal	GBM
61	K	66	Sol hemiparezi	Sağ frontoparyetal	GBM
62	K	50	Nöbet	Sağ frontol	astrositom grade 2
63	K	73	Yürüyüş bozukluğu	Sağ temporal	GBM
64	E	31	Baş ağrısı	Sol insüler	GBM
65	K	61	Baş ağrısı	Sol paryetotemp.	GBM
66	E	65	Nöbet	Sol temporal	GBM
67	E	86	Şuur etkilenmesi	Sol paryetooksipital	GBM
68	K	37	Nöbet	Frontal (orta hat)	GBM
69	E	55	Baş ağrısı, uyuklama	Sol temporal	GBM
70	K	42	Çift görme	Ventrikül içi	GBM
71	E	31	Baş ağrısı, kusma	Sağ frontal	Anaplastik astrositom
72	E	34	Nüks	Sol frontal	GBM
73	K	12	Baş ağrısı, kusma	Posterior fossa	Pilositik astrositom
74	E	51	Baş ağrısı	Sağ oksipital	GBM

Tablo 3: Hastaların demografik ve klinik özellikleri (Devam)

Hasta #	Cinsiyet	Yaş	Şikayet	Lokalizasyon	Patoloji
75	E	50	Nüks	Sağ temporal	GBM
76	E	36	Baş ağrısı, demans	Sol temporal	GBM
77	K	32	Sağ kol hipoestezi	Mezensefalon	GBM
78	E	51	Baş ağrısı	Sol frontal	GBM
79	E	12	Görme bozukluğu	Ventrikül içi	SEGA
80	E	49	Sol hemiparezi	Sağ parietal	GBM
81	K	73	Sağ hemiparezi	Sol parietal	GBM
82	E	65	Baş ağrısı	Sağ parietal	GBM
83	E	53	Nöbet	Sol temporal	GBM
84	E	63	Baş ağrısı, dizartri	Sol frontal	GBM
85	E	41	Nüks	Sol oksipital	GBM
86	K	73	Disfazi	Sol frontal	GBM
87	E	38	Baş ağrısı	Sol frontal	Astrositom grade 2
88	E	52	Nöbet	Sağ frontal	GBM
89	K	21	Nüks	Ventrikül içi	SEGA
90	E	43	Baş ağrısı	Sol oksipital	GBM
91	K	14	Baş ağrısı, bulantı	Posterior fossa	Pilositik astrositom
92	K	63	Nöbet	Sol temporal	GBM
93	K	55	Sol hemiparezi	Sağ parietal	GBM
94	E	40	Nöbet	Sol insüler	GBM
95	E	8	Baş ağrısı/Ataksi	Posterior fossa	Anaplastik astrositom
96	K	56	Baş ağrısı	Sağ temporal	GBM
97	E	5	Baş ağrısı, kusma	Posterior fossa	Anaplastik astrositom
98	K	48	Nüks	Sağ paryetooksipit.	GBM
99	E	40	Nüks	Sağ parietal	GBM
100	K	65	Disfazi	Sol temporal	GBM

3.3. DNA izolasyonu ve PCR RFLP tekniği

Alınan 5 ml'lik periferik kan örnekleri EDTA'lı (etylenediaminetetraaceticacid) tüp içenisine konularak ve soğuk zincirde saklandı. Qiagen tissue blood isolation kit ile protokolüne uygun olarak DNA izolasyonu yapılarak izole edilen DNA'lar -20 °C'de saklandı. Elde edilen DNA'lardan MMP-9 genine ait R279Q; P574R; R668Q polimorfizmleri hasta ve kontrol gruplarında PCR-RFLP yöntemleri ile incelendi. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) için araştırılması ön görülen DNA bölgesi dizayn edilen primerler ile gerçekleştirildi. Primerlerin ve PCR'ın çalışma koşullarının optimizasyonundan sonra tüm hasta ve kontrol DNA ları ilgili polimorfizm bölgeleri için PCR yapılarak çoğaltıldı ve R279Q polimorfizmi için MspI; P574R polimorfizmi için NlaIV; R668Q polimorfizmi için StyI enzimleri ile Restriction fragment length polymorphisms (RFLP) analizi yapılarak enzim kesim ürünleri etidium bromürlü %3 agoroz jelde analiz edildi.

3.4. İstatistik analizi

Polimorfizmlerin hastalığın ortaya çıkmasında veya bazı özelliklerle ilişkili olup olmadıklarını sorgulamak için hasta-kontrol gruplarına ait sonuçlar ve yaş, cinsiyet, glial tümör derecesi gibi parametrelerin farkları, kategorik verilerin karşılaştırılması için ki kare testi, sayısal verilerin karşılaştırılması için student t test ile test edilmiştir. Logistik regresyon (Backward Stepwise (Likelihood Ratio)) analiz metodu ile istatistiksel analiz yapılmıştır. SPSS for windows (v14.0 Chicago) programı kullanılmıştır. P değerinin < 0.05 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.5. DNA'nın Elde Edilmesi

3.5.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

10 ml kan 50 ml'lik falkona konularak üzerine 1:3 oranında eritrosit lizis tamponu eklendi. +4 °C'de 10 dakika bekletilip, 1500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen örneğin üst fazı alındı ve altta kalan pelet kısmı vortekslendi. Üzerine 1:3 oranında eritrosit lizis tamponu eklenerek 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Tekrar elde edilen örneğin üst fazı alındı ve altta kalan pelet kısmı vortekslendi. Üzerine 9.4 ml lökosit lizis solüsyonu, 500 µl SDS (%10'luk) ve 50 µl proteinaz K eklenerek 56 °C'de gece boyu bekletildi. İnkübasyon sonrası üzerine 3.7 ml amonyum asetat (9.5 M) eklendi ve iyice karıştırıldı. Örnekler 4500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek üst fazı başka tüpe aktarıldı. Ardından üzerine etanol eklenerek DNA'nın toplanması sağlandı. Pipet yardımı ile DNA avlanarak 1.5 ml'lik tüpe konuldu ve üzerine %70'lik etanol ilave edildi. 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz pipet yardımı ile alındı ve tüpler 56°C'de ısıtıcı bloklara konularak kalan alkolün uçması sağlandı. DNA'lar TE (Tris-EDTA) tamponu ilave edildi ve +4°C'de saklandı. QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen kat no: 51304) kandan DNA izolasyon kiti de üreticinin önerileri doğrultusunda DNA izolasyonu için kullanılmıştır.

3.5.2. DNA Konsantrasyonu Ve Saflığının Ölçümü

Spektrofotometrenin küvetleri temizlendikten sonra küvetlerden birine 100 µl distile su konuldu ve bu küvet kontrol olarak kullanıldı ve spektrofotometrenin 260 ve 280 nm'lerde sıfırlanması için kullanıldı. İkinci küvette ölçülecek DNA 1:100 suyla seyreltilerek ölçüm yapıldı. Spektrofotometre dalga boyu ayarı 260 nm ye getirildi. Önce kontrol örneğini içeren küvet ile sıfır'a ayarlandı. DNA'yı içeren küvet aynı şekilde yerleştirildi ve ışığı soğurma (OD) değeri okundu. Aynı işlemler 280 nm dalga boyu için yapıldı. OD 260/280 hesaplanarak temizlik derecesi saptandı. Değerler ideal oran olan 1.8 civarında bulundu. DNA yoğunluğunun hesaplanması için ise aşağıdaki formül kullanıldı

Konsantrasyon= Seyreltme katsayısı (1/100) X 50(sabit) X OD260 = ng/µl RNA

3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Hasta ve kontrol örneklerine ait genomik DNA'lar MMP9 genine ait 3 polimorfizm bölgesi PZR ile çoğaltıldı. Her reaksiyon için forward ve reverse olmak üzere bir çift primer kullanıldı. Primer dizayn ederken, PZR ile çoğaltılacak bölgenin ve enzim kesim ürünleri allellerin birbirlerinden ayırt edilecek şekilde ürün vermesi sağlanacak şekilde dizayn edildi.

Kullanılan Primerler

1.MMP9 Geni R279Q (NM_004994.2:c.836A>G NP_004985.2:p.Gln279Arg NT_011362.9:g.9693133A>G) Polimorfizm Primerleri

F: GGC CCA ATT TTC TCA TCT GAG

R: GAG CTT GTC CCG GTC GTA

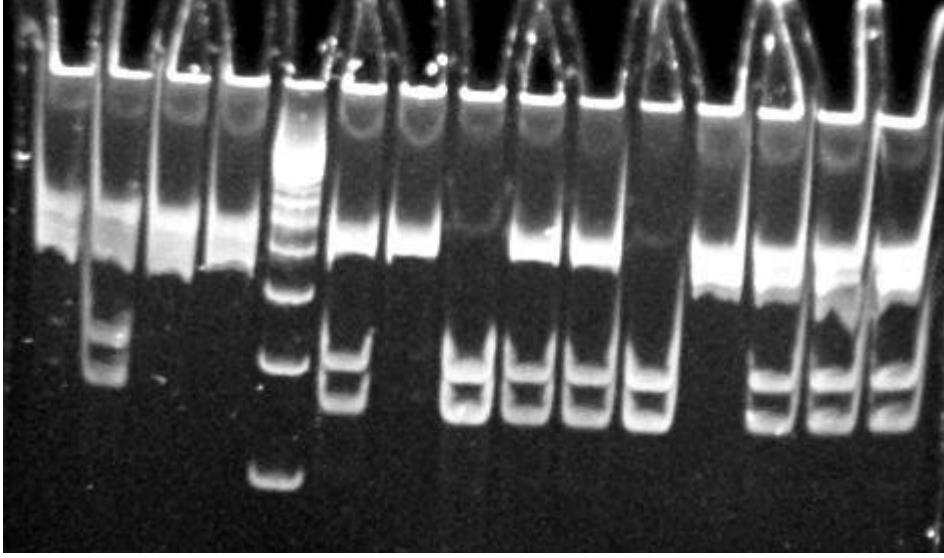
Tablo 4: PZR Karışımı (annealing 55 C)

	Miktar
Döngü sayısı	35 siklus
PZR Karışımı	25 µl
10X Buffer	2.5 µl
MgCl ₂ (25mM)	1 mM-2mM (0.8 µl)
dNTP (2mM)	2µl – 2.5 µl
Primer (10 pmol)	1 µl
Taq polimeraz	0.2 µl

MspI Enzimi ile kesim işlemi sonucu: A olunca 280+12 bp

G olunca 151+129+12 bp

Resim 5: MspI Enzimi ile kesim işlemi



2.MMP9 Geni P574R (NM_004994.2:c.1721G>C NP_004985.2:p.Arg574Pro NT_011362.9:g.9695314G>C) Polimorfizm Primerleri

F: CTT ATC GCC GAC AAG TGG

R: GCA CAA GAC GTT TCG TGG

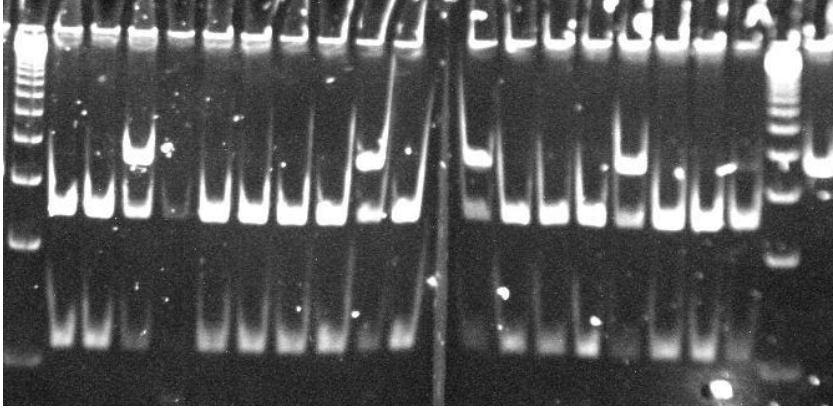
Tablo 5: PZR Karışımı (annealing 55 C)

	Miktar
Döngü sayısı	35 siklüs
PZR Karışımı	25 µl
10X Buffer	2.5 µl
MgCl ₂ (25mM)	0.8 µl
dNTP (2mM)	2µl – 2.5 µl
Primer (10 pmol)	1 µl
Taq polimeraz	0.2 µl

NlaIV Enzimi ile kesim işlemi sonucu: C olunca 124+56 bp

G olunca 180 bp

Resim 6: NlaIV Enzimi ile kesim işlemi



3.MMP9 Geni R668Q (NM_004994.2:c.2003G>A NP_004985.2:p.Arg668Gln NT_011362.9:g.9696019G>A) **Polimorfizm Primerleri**

F: AGG TGG ACC GGA TGT TCC

R: ACC TGG AGA AGG CCT CTG

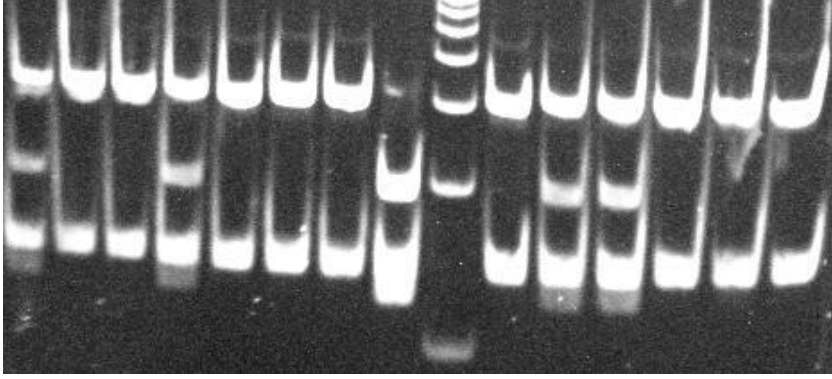
Tablo 6: PZR Karışımı (annealing 55 C)

	Miktar
Döngü sayısı	35 siklüs
PZR Karışımı	25 µl
10X Buffer	2.5 µl
MgCl ₂ (25mM)	1 mM-2mM (0.8 µl)
dNTP (2mM)	2µl – 2.5 µl
Primer (10 pmol)	1 µl
Taq polimeraz	0.2 µl

StyI Enzimi ile kesim işlemi sonucu: G olunca 147+67 bp

A olunca 56 +91 + 67 bp

Resim 7: StyI Enzimi ile kesim işlemi



3.7. Akrilamid Jel Elektroforezi

Jel dökmede kullanılan camlar ‘spacer’lar ve taraklar deterjanla iyice yıkandı ve durulandı. Kullanılan gereçler % 70’lik alkol ile temizlendi. Camların aralarına spacer’lar yerleştirildi. Camlar birbirinden ayrılmasın diye kısıkaçlar ile sabitlendi. % 40’lik akrilamid bisakrilamid solüsyonu kullanıldı (Ambresco). Solüsyondan 4 ml alınarak üzerine 2 ml % 10luk TBE solüsyonu %10’luk APS den 200 µl ve 14 µl TEMED ilave edildi. Karışım hızlı bir şekilde, hazırlanan cam düzeneğin içerisine iki cam arasına döküldü. Taraklar jelde hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirildi. Jelin polimerleşmesi için bir saat oda sıcaklığında beklendi.

3.8. Akrilamid Jel Elektroforezi-Yükleme

Cam düzenek dikey jel elektroforez aletine yerleştirildi ve üzerine TBE solüsyonu konuldu. Taraklar dikkatlice çekilerek çıkartıldı. Enzim kesim ürünleri 6X yükleme boyası (6X brom fenol mavisi ve gliserol içeren ‘loading buffer’ solüsyonundan 3’er µl alınarak) ile birlikte 15 µl yüklendi. Dikey jel elektroforez aletin elektrodları yerleştirildi. 200 voltda, 30 dakika yürütüldü. Yürütmeden sonra jeller GelRed (Biotium) ile boyama işlemine tabi tutuldu.

3.9. Akrilamid Jelin GelRed ile Boyanması

Yürütme işleminden sonra cam düzenek dikey elektroforez aletinden çıkartıldı. Camlar birbirinden ayrıldı ve tek cam yüzeyinde tutulan akrilamid jel boyama kabına yerleştirildi. Örnekler, GelRed (Biotium 10.000X) solüsyonunda 10 dakika çalkalandı. İşlem sonunda jel U.V. ışığı altında CCD kamera ile görüntülendi.

3.10. Enzim Kesim yöntemi

PZR ürünleri restriksiyon enzim kesimi yöntemi ile polimorfizmler incelenmiştir. R279Q polimorfizmi için Msp I, P574R polimorfizmi için Nla IV, R668Q polimorfizmi için Sty I Restriksiyon enzimleri kullanılmış ve her üç bölge için 37 °C’de 16 saat enzim kesimi gerçekleştirilmiştir.

Enzim Kesim Koşulları:

10X Buffer: 2 µl

RE : 1 µl

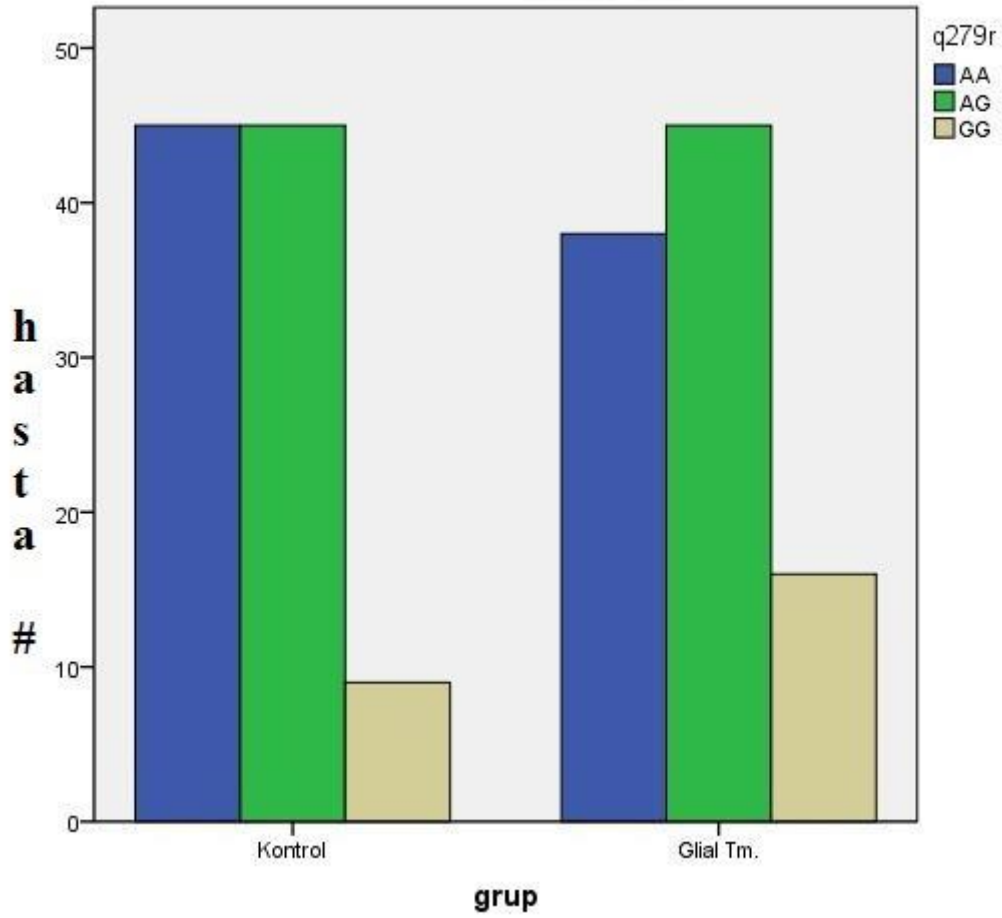
PCR ürünü: 10 µl

H₂O: 7 µl

4.BULGULAR

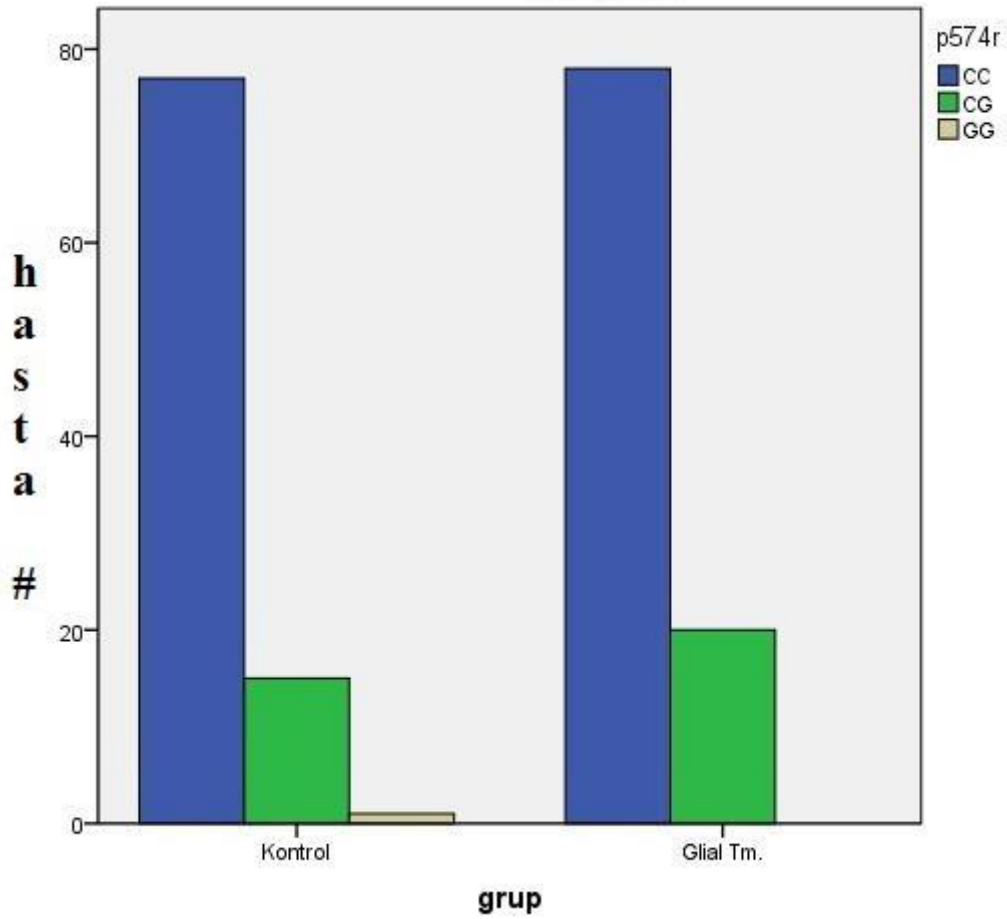
R279Q polimorfizmi için değerdendirilen 100 hastadan 1 tanesinde izole DNA' da amplifikasyon elde edilemedi. 38 tanesinde A/A (%38,4), 45 tanesinde A/G (%45,4) ve 16 tanesinde ise G/G (%16,2) olarak bulundu. Buna karşın aynı polimorfizm için kontrol grubunda değerdendirilen 100 örneğın 1 tanesinde izole DNA' da amplifikasyon elde edilemedi. 45 tanesinde A/A (%45,45), 45 tanesinde A/G (%45,45) ve 9 tanesinde ise G/G (%9,1) olarak bulundu.

Grafik 1: R279Q polimorfizmi hasta – kontrol grubu sonuçları



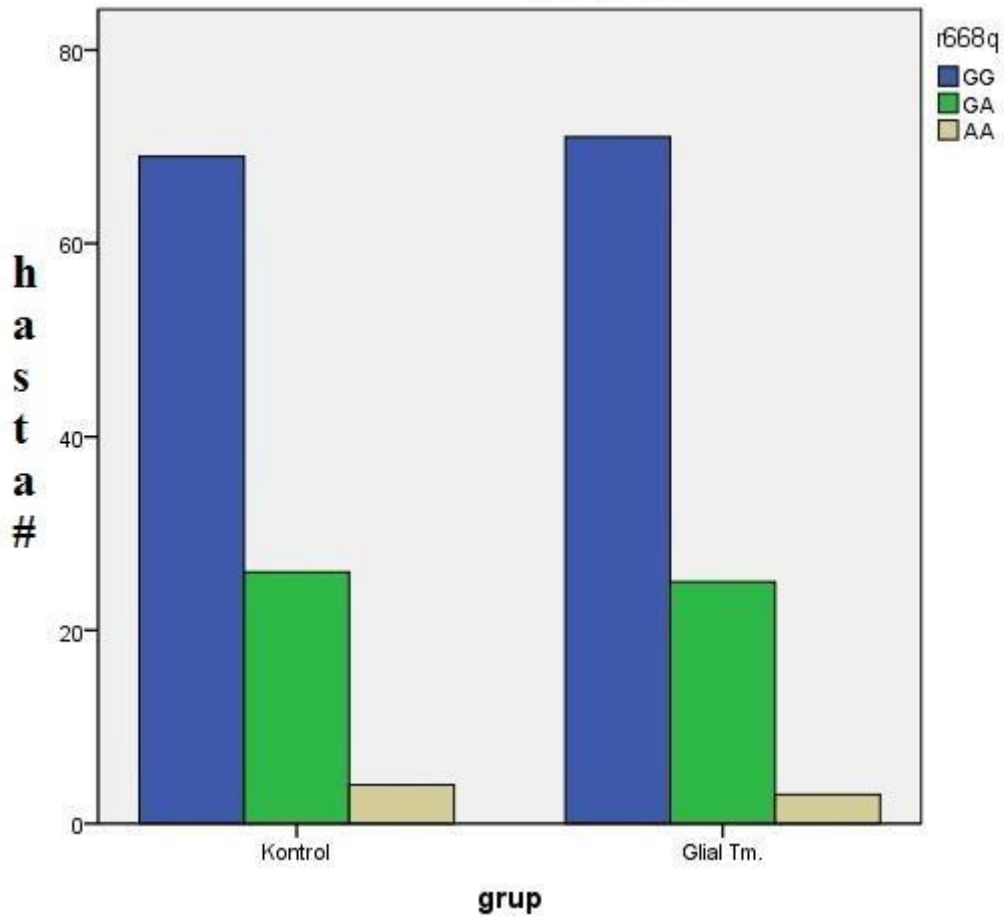
P574R polimorfizmi için değeriendirilen 100 hastadan 2 tanesinde izole DNA' da amplifikasyon elde edilemedi. 78 tanesinde C/C (%79,6), 20 tanesinde C/G (%20,4). Buna karşın aynı polimorfizm için kontrol grubunda değeriendirilen 100 örneğın 7 tanesinde izole DNA' da amplifikasyon elde edilemedi. 77 tanesinde C/C (%82,8), 15 tanesinde C/G (%16,1) ve 1 tanesinde ise G/G (%1,1) olarak bulundu.

Grafik 2: P574R polimorfizmi hasta – kontrol grubu sonuçları



R668Q polimorfizmi için değerlendirilen 100 hastadan 1 tanesinde izole DNA' da amplifikasyon elde edilemedi. 71 tanesinde G/G (%71,7), 25 tanesinde G/A (%25,3) ve 3 tanesinde ise A/A (%3,0) olarak bulundu. Buna karşın aynı polimorfizm için kontrol grubunda değerlendirilen 100 örneğin 1 tanesinde izole DNA' da amplifikasyon elde edilemedi. 69 tanesinde G/G (%69,6), 26 tanesinde G/A (%26,3) ve 4 tanesinde ise G/G (%4,1) olarak bulundu.

Grafik 3: R668Q polimorfizmi hasta – kontrol grubu sonuçları



Aynı polimorfizmler astrositom derecesi ile ilişkilendirildiğinde;

- R279Q'de A/G polimorfizmi düşük dereceli astrositomlarda % 40,0 oranında görülürken yüksek dereceli astrositomlarda ise % 47,8 oranında görülmüştür.
- P574R'de C/G polimorfizmi düşük dereceli astrositomlarda % 13,3 oranında görülürken yüksek dereceli astrositomlarda ise % 23,5 oranında görülmüştür.
- R668Q'de G/A polimorfizmi düşük dereceli astrositomlarda % 30 oranında görülürken yüksek dereceli astrositomlarda ise % 23,2 oranında görülmüştür.

Bu sonuçlar doğrultusunda 1. ve 2. polimorfizm yüksek dereceli astrositomlarda 3. polimorfizm de düşük dereceli astrositomlarda yüzdesel olarak daha fazla çıkmış olmalarına karşın istatistiksel değerlendirilme yapıldığında her üçü için de P değerinin > 0.05 bulunmuş (sırasıyla $p = 0.703$, $p = 0.248$, $p = 0.759$). Anlamsız olarak kabul edilmiştir.

R279Q A/G polimorfizmi, P574 C/G polimorfizmi, R668Q G/A polimorfizmi hasta – kontrol grubu birebir karşılaştırıldığında sırasıyla $p = 0.279$, $p = 0.451$, $p = 0.909$ bulunmuş. Her üçü için sonuç anlamsız değerlendirilmiştir.

Hasta ve kontrol grubu polimorfizm sonuçları yaş, cinsiyet parametreleri ile birlikte univariate analizi, logistik regresyon analizi ve lineer regresyon analizi yöntemleri ile ileri istatistiksel değerlendirilme yapılmıştır. Her üçünde de R279Q (A/G) polimorfizmi ve yaşı P değeri < 0.05 bulunmuş. Logistik regresyon analiz sonuçları sırasıyla $p = 0.039$ ve $p = 0.04$, ODDS oranı 1.026 ve 1.607 dir. İstatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Glial tümör gelişiminde katkıda bulunabileceği düşünülmüştür. Hasta ve kontrol grubunda her 3 polimorfizm sonuçları Tablo 7 ve Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 7 . Hasta grubu Sonuçları

Hasta #	R279Q Polimorfizmi	P574R Polimorfizmi	R668Q Polimorfizmi
1	A-A	C-C	G-G
2	A-G	C-C	G-G
3	A-A	C-C	G-G
4	A-A	C-C	G-G
5	A-G	C-C	G-G
6	A-A	C-C	G-G
7	A-A	C-C	G-G
8	A-G	C-C	G-G
9	A-G	C-C	G-A
10	A-G	C-C	G-G
11	A-G	C-C	G-G
12	G-G	C-C	G-A
13	A-A	G-C	G-G
14	A-A	C-C	G-G
15	A-G	G-C	G-G
16	A-G	C-C	G-G
17	A-A	C-C	G-G
18	A-A	C-C	G-G
19	A-G	C-C	G-G
20	A-A	C-C	G-G
21	A-G	C-C	G-G
22	A-A	C-C	G-G
23	A-G	G-C	G-A
24	A-A	G-C	G-G
25	G-G	C-C	G-G
26	A-A	C-C	G-G
27	A-A	G-C	G-G
28	A-G	C-C	G-G

Tablo 7 (Devam). Hasta grubu Sonuçları

Hasta #	R279Q Polimorfizmi	P574R Polimorfizmi	R668Q Polimorfizmi
29	A-A	C-C	G-G
30	A-A	G-C	G-G
31	A-G	C-C	G-A
32	G-G	C-C	G-A
33	G-G	C-C	G-A
34	A-A	C-C	G-A
35	A-A	C-C	G-G
36	A-G	C-C	G-G
37	A-A	C-C	G-G
38	A-G	G-C	G-G
39	A-G	C-C	G-G
40	A-A	C-C	G-A
41	A-G	C-C	G-G
42	A-A	C-C	G-A
43	A-G	G-C	G-G
44	A-G	C-C	G-A
45	A-A	G-C	G-G
46	G-G	C-C	G-A
47	G-G	C-C	G-G
48	A-A	C-C	G-G
49	G-G	C-C	G-G
50	A-A	C-C	G-A
51	A-G	C-C	G-A
52	A-G	C-C	G-G
53	A-A	C-C	G-G

Tablo 7 (Devam). Hasta grubu Sonuçları

Hasta #	R279Q Polimorfizmi	P574R Polimorfizmi	R668Q Polimorfizmi
54	G-G	C-C	G-G
55	A-G	C-C	G-A
56	A-G	C-C	G-G
57			
58	A-A	G-C	G-G
59	A-G	G-C	G-G
60	A-A	C-C	G-G
61	G-G	C-C	G-G
62	A-A	C-C	G-A
63	A-G	C-C	G-A
64	G-G	C-C	G-G
65	A-G	C-C	G-A
66	A-A	G-C	A-A
67	G-G	C-C	G-G
68	A-G	C-C	G-A
69	A-G	G-C	G-A
70	A-A	G-C	G-G
71	G-G	C-C	G-A
72	A-G	C-C	G-G
73	A-G	C-C	G-G
74	A-G	G-C	G-G
75	G-G	C-C	A-A
76	A-A	C-C	G-G
77	A-A	C-C	G-G
78	A-G	C-C	G-A
79	A-G	G-C	G-A

Tablo 7 (Devam). Hasta grubu Sonuçları

Hasta #	R279Q Polimorfizmi	P574R Polimorfizmi	R668Q Polimorfizmi
80	A-G	G-C	G-G
81	A-G	C-C	G-G
82	A-A	C-C	G-G
83	A-A	G-C	G-G
84	A-A	C-C	G-G
85	A-G	G-C	G-G
86	A-G	C-C	G-G
87	G-G	C-C	A-A
88	A-A	C-C	G-G
89	A-A	C-C	G-G
90	G-G	C-C	G-G
91	A-G	C-C	G-A
92	A-A	C-C	G-G
93	A-G	C-C	G-G
94	G-G	C-C	G-G
95	A-G	C-C	G-G
96	A-G	G-C	G-A
97	A-G	C-C	G-G
98	A-G	C-C	G-A
99	A-G	C-C	G-G
100	A-G		G-G

Tablo 8: Kontrol Grubu Sonuçları

Kontrol #	Cinsiyet	Yaş	R279Q Polimorfizmi	P574R Polimorfizmi	R668Q Polimorfizmi
1	E	21	A-A	G-C	G-G
2	E	31	G-G		A-A
3	E	50	A-A	C-C	G-G
4	E	39	G-G		G-G
5	E	57	A-G	C-C	G-A
6	E	36	A-A	G-C	G-G
7	E	25	A-A		G-G
8	E	37	A-A	G-C	G-G
9	E	38	A-A	C-C	G-G
10	E	51	G-G	C-C	G-A
11	E	51	A-A		G-G
12	E	41	A-A	C-C	G-G
13	E	24	A-A	C-C	G-G
14	E	34	A-A	G-C	G-G
15	E	24	A-A	C-C	G-G
16	E	32	A-G	C-C	G-G
17	E	23	A-G	C-C	G-G
18	E	67	A-A	C-C	G-G
19	E	36	A-G		G-A
20	E	42	A-A	C-C	G-G
21	E	23	A-A	C-C	G-G
22	E	21	A-A	C-C	G-G
23	E	21	G-G	C-C	A-A
24	E	22		C-C	G-A
25	E	29	A-G	C-C	G-A
26	E	42	G-G	C-C	A-A
27	E	45	A-G	C-C	G-G
28	E	34	A-A	C-C	G-G
29	E	58	A-G	C-C	G-G
30	E	56	A-G	G-C	G-G
31	E	41	A-G	C-C	G-A
32	E	61	A-A	C-C	G-G
33	E	56	A-G	G-C	G-G
34	E	41	G-G	C-C	G-G
35	E	24	A-G	C-C	G-A
36	E	34	A-A	C-C	G-G
37	E	18	G-G		G-G
38	E	41	A-A	C-C	G-G
39	E	19	A-G	C-C	G-A
40	E	34	A-G	C-C	G-G

Tablo 8 (Devam) : Kontrol Grubu Sonuçları

Kontrol #	Cinsiyet	Yaş	R279Q Polimorfizmi	P574R Polimorfizmi	R668Q Polimorfizmi
41	E	42	A-A	G-C	G-G
42	E	19	A-G		G-G
43	E	49	A-G	C-C	G-G
44	E	42	A-G	C-C	G-A
45	E	32	A-G	C-C	G-A
46	E	22	A-G	C-C	G-A
47	E	47	A-G	C-C	G-A
48	E	56	A-A	G-C	G-G
49	E	32	A-A	C-C	G-G
50	E	33	A-G	C-C	G-A
51	E	59	A-A	C-C	G-G
52	E	20	A-G	G-C	G-A
53	E	37	A-A	C-C	G-G
54	E	25	A-A	G-G	G-G
55	E	39	A-A	G-C	G-G
56	E	43	A-A	G-C	G-G
57	E	48	A-A	C-C	G-G
58	E	24	A-A	C-C	G-G
59	E	48	A-A	C-C	G-G
60	E	43	A-G	C-C	G-A
61	K	41	A-G	C-C	G-G
62	K	27	A-A	C-C	G-G
63	K	23	A-G	C-C	G-G
64	K	53	A-A	C-C	G-G
65	K	59	A-G	C-C	G-G
66	K	39	A-G	C-C	G-G
67	K	33	A-G	C-C	G-A
68	K	41	A-G	C-C	G-A
69	K	34	A-G	C-C	G-G
70	K	23	A-G	G-C	G-A
71	K	67	A-A	C-C	G-G
72	K	64	A-A	C-C	G-G
73	K	31	A-A	C-C	G-G
74	K	23	G-G	C-C	A-A
75	K	68	A-A	C-C	G-G
76	K	24	A-G	C-C	G-G
77	K	27	A-G	C-C	G-A
78	K	5	A-G	C-C	G-A
79	K	29	A-G	C-C	G-A
80	K	17	A-A	G-C	G-G

Tablo 8 (Devam) : Kontrol Grubu Sonuçları

Kontrol #	Cinsiyet	Yaş	R279Q Polimorfizmi	P574R Polimorfizmi	R668Q Polimorfizmi
81	K	52	A-G	C-C	G-A
82	K	69	G-G	C-C	G-A
83	K	29	A-G	C-C	G-G
84	K	19	A-A	C-C	G-G
85	K	22	A-G	G-C	G-G
86	K	23	A-G	C-C	G-A
87	K	24	A-G	C-C	G-G
88	K	31	A-G	C-C	G-A
89	K	45	A-A	C-C	G-G
90	K	24	A-G	C-C	G-G
91	K	27	A-A	C-C	G-G
92	K	29	A-G	C-C	G-G
93	K	24	A-A	C-C	G-G
94	K	40	A-G	C-C	
95	K	56	A-A	C-C	G-G
96	K	57	A-A	G-C	G-G
97	K	41	A-A	C-C	G-G
98	K	61	A-A	C-C	G-G
99	K	57	A-G	C-C	G-G
100	K	40	A-G	C-C	G-A

5. TARTIŞMA

Glial tümörler genel olarak intraaksiyal yerleşimli, kapsülsüz ve diffüz büyüme gösteren tümörlerdir (7). Glial tümörler içinde, ilk 15 yaşındaki %40-45'i, erişkin yaş grubunda ise %50-60'ı astrosit kökenli tümörlerdir (44). Astrositomlar da düşük dereceli ve yüksek dereceli diye iki ana sınıfa ayrılmaktadır. Glial tümörlerin prognozu evrelerine göre değişiklik göstermektedir ve evre IV bir glioblastom olgusunun ortalama sağkalım süresi 8-12 aydır (14). WHO evreleme sistemine göre düşük evre kabul edilen gliomlarda ise en agresif tedavi yöntemleri sonrası dahi ortalama sağkalım süresi 6-10 yıl arasında değişmektedir (14). Pilositik astrositomlar ise en iyi prognoza sahip olan astrositomdur. Kitle total çıkarılırsa, 5 yıllık yaşam %100'e kadar ulaşır (133) ve %80 oranında 20 yıllık bir yaşam oranı beklenebilir (165).

Düşük dereceli astrositomları bulunan hastalarda sürekli olarak gözlemlenen tek genetik alterasyon p53 geninin mutasyonudur (181). Buna karşın yüksek dereceli astrositomlarda p53 mutasyon (190), PTEN mutasyon (190), EGFR amplifikasyonu (194), izositrat dehidrojenaz 1'in mutasyonu (187), MMR gen mutasyonu (204), RB1, CDK4 ve CDKN2A mutasyonları gibi birden fazla mutasyonlar söz konusudur. Mutasyonlar dışında tümör gelişimine neden olan başka bir genetik oluşum ise tek nükleotid polimorfizmidir (SNP) (276). SNP, DNA üzerinde çoğunlukla tek bir nükleotid değişimi şeklinde olmaktadır. Kodlayan bölge dışındaki polimorfizmler delesyon veya insersiyon sonucunda meydana gelebilir.

Literatürde yapılan çalışmalarda, genetik polimorfizmlerin meydana getirdiği işlevsel değişikliklerin değerlendirilmesinin önemini vurgulamıştır (265). Genlerin protein yapıları, ekspresyonları ve/veya işlevleri üzerindeki amino asit ikamelerinin etkilerini belirleme amaçlı çeşitli yöntemler önerilmiştir (265). Bunlardan biri RFLP

teknikiğidir. Bu yöntem proteinler için nükleik asit değışim ve tümör gelişimi üzerine etkisinin saptanmasını sağlayan SNP'leri belirlenmesi amaçlı geliştirilmiştir.

Hayvan deneylerinde yapılan genetik çalışmalar göstermiştir ki, yüksek seviyelerde MMP-9 yapısal ekspresyonunun tümör oluşumuna (263) ve tümör progresyonuna (264) hassasiyet yaratmaktadır. Bu çalışmalar ışığında MMP-9 geninin işlevini değıştirebilecek genetik polimorfizmlerin kansere gelişimi ve özellikle invazyon potansiyelini arttırdığı düşünülmektedir. Gliomlar için en sık görülen yayılma mekanizması HDM yoluyla gerçekleşen invazyondur. Glial tümör genetik çalışmaları GBM'lerdeki bu yolların hiperaktivitesini teyit etmektedir ve bu genlerin seviyeleri glial tümör derecesiyle bağıntı göstermektedir (225). Bizim yapmış olduğumuz polimorfizm çalışmasında da R279Q polimorfizm ile P574R polimorfizminin yüksek dereceli tümörlerde düşük dereceli tümörlere göre oransal olarak daha fazla bulunmuştur.

Geçmişte, MMP'lerin kanserin yayılımında ve metastazında, hücre dışı matriksi ve temel membran bariyerleri azaltıcı etkilerine dayalı olarak, önemli role sahip olduğu düşünülmekteydi (31,262). Ancak, çalışmalar MMP'lerin kanser gelişiminde çoklu evrelerde rol oynadıklarını belirtmektedir (263). Son zamanlarda, daha fazla sayıda moleküler epidemiyolojik çalışma, MMP genetik polimorfizm ile glial (26), akciğer (267, 268), kolorektal (269), özofajeal (270) ve servikal (271) kanser dahil olmak üzere, kansere hassasiyet ve prognozu arasında ilişki saptamıştır.

MMP-9'un P574R ve R668Q varyantları enzimin hemopeksin benzeri alanında lokalizedir. Kollajenazlarda bu alanın çıkarılması, enzimin üçlü heliks yapısındaki kollajeni kesmesini engellerken, jelatin kazein veya sentetik maddelere karşı olan hidrolitik aktivitesine etki etmemektedir (37). Ayrıca, hemopeksin benzeri alanlar ve

yüzey pozitif yüklü kalıntılar; negatif yüklü olan COOH terminal uzantılara bağlanmada rol alarak inhibitör metalloproteinaz etkisi gösterebilir (273). Matriks metalloproteinaz uzantısının ve hemopeksin benzeri alanın etkileşiminin doğurduğu spesifik doku inhibitörü, özellikle projelatinaz aktivasyonunda yer alan MMP- Doku inhibitörü oluşumunda önemlidir (274 – 275). R279Q polimorfizmi ile yapılan ilgili deneysel veriler ışığında; amino asit değişimi, MMP-9 geninin katalitik alanında bulunmaktadır. Özellikle substrat bağlanımında önemli rol oynayan fibronektin tip 2'nin içine yerleşiktir (35, 272). Bu bulgunun olası etkisi; pozitif yüklü amino asit olan argininden yüksüz glutamine dönüşümün bu enzimin aktivitesini değiştirmesidir.

Bu çalışma ile MMP-9 geni üzerinde yer alan ve amino asit değişimine yol açan 3 polimorfizm incelenerek hastalığın gelişimindeki etkisi sorgulanmıştır. Hasta ve hasta grubuna benzer kontrol grubu oluşturularak hastalığın etyolojisindeki rolü istatistiksel olarak sorgulanmıştır. Elde ettiğimiz verilere dayanarak glial tümör (astrositik hücreli) gelişiminde R279Q polimorfizm ve ileri yaşın bereber değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. P574R ve R668Q polimorfizmleri ile hasta ve kontrol grubuna ait parametreler birlikte değerlendirildiğinde yapılan istatistiksel sonuçlar anlamlı bulunmamıştır. Tüm bu çalışmanın daha geniş hasta ve kontrol grubunda çalışılması ve istatistiksel sorgulanması anlamlı bulunan ve bulunmayan polimorfizmler için önemli olduğunu düşünmekteyiz.

6. SONUÇ

Bu bulgular glial tümör oluşumunda MMP-9 geninin P574R G/C ve R668Q G/A polimorfizmlerinin etkisinin olmadığını göstermiştir. Buna karşın R279Q A/G polimorfizmi glial tümör oluşumunda etkili olabilir. Bu çalışmanın sonuçlarını desteklemek için daha geniş hasta popülasyonlu çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Bolteus AJ, Berens ME, Pilkington GJ. Migration and Invasion in Brain Neoplasms. *Current Science* 2001; 1: 225–232.
2. Ye S. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biol.* 2000; Dec;19(7):623-9.
3. Hess KR, Broglio DR, Bondy ML. Adult glioma incidence trends in the United States 1977–2000. *Cancer* 101; 2293–2299.
4. Monaghan M, Mulligan KA, Gillespie H, Trimble A, Winter P, Johnston PG, McCormick D. Epidermal Growth Factor Up-regulates CD44-dependent Astrocytoma Invasion In vitro. *J Pathol* 2000; 192: 519–525.
5. Hu Z, Huo X, Lu D, Qian J, Zhou J, Chen Y, Xu L, Ma H, Zhu J, Wei Q, Shen H. Functional polymorphisms of matrix metalloproteinase-9 are associated with risk of occurrence and metastasis of lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2005; Aug 1: 5433-9
6. Wu J, Zhang L, Luo H, Zhu Z, Zhang C, Hou Y. Association of matrix metalloproteinases-9 gene polymorphisms with genetic susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma. *DNA Cell Biol.* 2008; Oct;27(10):553-7
7. Prof. Dr. İskender. Sayek., *Beyin Tümörleri ve Tedavisi, Temel Cerrahi.* 3.baskı. Güneş Kitapevi. p. 2300-54
8. Chosdol K., et al. Molecular pathways of glial tumorigenesis. *Current Science* 2002; 82(6): p.648-54.
9. McKinney, P.A. Brain tumours: incidence, survival, and aetiology. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75: 12-17
10. Collins, V.P. Brain tumors: classification and genes. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2004; 75: 2-11
11. <http://www.braintumor.org>

12. Hardell, L., et al. Case-control study on radiology work, medical x-ray investigations, and use of cellular telephones as risk factors for brain tumors. *MedGenMe* 2000; 2(2):E2.
13. Schiff, D., et al. Gliomas arising in organ transplant recipients: an unrecognized complication of transplantation?. *Neurology* 2001; 57(8): 1486-8.
14. Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro-Oncology* 2002; 4: 278–299.
15. Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA. Tumor cell interactions with extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* 1993; 9: 541–573
16. Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. (1993) Principles of molecular cell biology of cancer: cancer metastasis, in *Cancer: principles and practice of oncology*. 1993; 4: 134–149.
17. Engers R, Gabbert HE. Mechanisms of cancer metastasis: cell biological aspects and clinical implications. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126: 682–692
18. Zhao JX, Yang LP, Wang YF, Qin LP, Liu DQ, Bai CX, et al. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in rat brain after implantation of 9L rat glioma cells. *Eur J Neurol* 2007; 14: 510-516.
19. Rao JS. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 489-501.
20. Nagase H, Woessner JF (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274; 21491–21494
21. Fiore E, Fusco C, Romero P, Stamenkovic I. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9/gelatinase B) proteolytically cleaves ICAM-1 and participates in tumor cell resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Oncogene* 2002; 21: 5213-5223.
22. Vihinen P, Kähäri VM. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer* 2002; 10: 157-66

23. Shapiro SD. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10: 602– 8
24. Westermarck J, Kähäri VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumour invasion. *FASEB J* 1999; 13: 781–92.
25. Yamamoto M, Mohanam S, Sawaya R, Fuller GN, Seiki M, Sato H, Gokaslan ZL, Liotta LA, Nicolson GL, Rao JS. Differential expression of membrane-type matrix metalloprotease and its correlation with gelatinase A activation in human malignant brain tumors in vivo and in vitro. *Cancer Res* 1996; 56: 384–392.
26. P.A. Forsyth, H. Wong, T.D. Laing, N.B. Rewcastle, D.G. Morris, H. Muzik, K.J. Leco, R.N. Johnston, P.M. Brasher, G. Sutherland, D.R. Edwards. Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas, *Br. J. Cancer* 1999; 79: 1828–1835.
27. J.S. Rao. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat. Rev. Cancer* 2003; 3: 489–501.
28. Kim SY, Lee EJ, Woo MS, Jung JS, Hyun JW, Min SW, Kim DH, Kim HS. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 gene expression by an isoflavone metabolite, irisolidone in U87MG human astrogloma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 8;366(2):493-9.
29. C.S. Gondi, S.S. Lakka, D.H. Dinh, W.C. Olivero, M. Gujrati, J.S. Rao. Downregulation of uPA, uPAR and MMP-9 using small, interfering, hairpin RNA (siRNA) inhibits glioma cell invasion, angiogenesis and tumor growth. *Neuron Glia Biol.* 2004; 1: 165– 176.
30. Johnsen M, Lund LR, Romer J, Almholt K, Dano K. Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10(5): 667–671
31. Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol* 1999; 189(3): 300–308

32. Johansson N, Vaalamo M, Grenman S, Hietanen S, Klemi P, Saarialho-Kere U, Kahari VM. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by tumor cells in invasive vulvar squamous cell carcinomas. *Am J Pathol* 1999; 154(2): 469–480
33. Skobe M, Fusenig NE. Tumorigenic conversion of immortal human keratinocytes through stromal cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 95(3): 1050–1055
34. Allan JA, Docherty AJ, Barker PJ, Huskisson NS, Reynolds JJ, Murphy G. Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochem J* 1995; 309: 299-306.
35. O’Farrell TJ, Pourmotabbed T. Identification of structural elements important for matrix metalloproteinase type V collagenolytic activity as revealed by chimeric enzymes. Role of fibronectin-like domain and active site of gelatinase B. *J Biol Chem* 2000; 275: 27964-72.
36. Li J, Brick P, O’Hare MC, et al. Structure of full-length porcine synovial collagenase reveals a C-terminal domain containing a calcium-linked, four-bladed h-propeller. *Structure* 1995; 3: 541-9.
37. Murphy G, Knauper V. Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the “hemopexin” domain?. *Matrix Biol* 1997; 15: 511-8.
38. Zhibin Hu, Xiang Huo, Daru Lu, et al. Functional Polymorphisms of Matrix Metalloproteinase-9 Are Associated with Risk of Occurrence and Metastasis of Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5433-5439.
39. Canda Ş. Temel Patoloji IV: Nöropatoloji. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları 1992; 142: 1- 66.
40. Junqueira LC, Corneiro J, Kelley RO. Basis Histology. Çeviri Editörü: Aytekin Y. Temel Histoloji. Barış Kitabevi 1993; 7: 152–180.
41. Frosch MP, Anthony DC, Girolami UD. The Central Nervous System. In: Pathologic Basis of Disease. Eds: Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Philadelphia: Elsevier, 2004; 7: 1347–1420.

42. Russel DS, Rubinstein LJ. Tumors of Central Neuroepithelial Origin. In: Pathology of Tumors of the Nervous System. 5 th ed. Frome and London: Tanner Ltd, 1989; 83–289.
43. Graeber MB, Blakemore W.F, Kreutzberg GW. Cellular Pathology of the Central Nervous System. In: Greenfield's Neuropathology Volume 1. Eds: Graham DI, Lantos PL. 7 th ed. London. 2002; 123–174.
44. Lantos PL, Louis DN, Rosenblum MK, Kleihues P. Tumors of the Nervous System. In: Greenfield's Neuropathology. Eds: Graham DI, Lantos PL. Volume 2. 7 th ed. London. 2002; 765–810.
45. Demirkaya M, Sevinir B. Çocukluk Çağı Beyin Tümörleri. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Güncel Pediatri Dergisi 2005; Aralık 3(4). www.guncelpediatri.com.
46. Gross S, Konop R, Cripe TP, Pallares D, Coppes MJ. Astrocytoma. eMedicine World Medical Library 2002. www.emedicine.com.
47. Demir A, Yazıcı J. Nöro-Onkoloji. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi 2000. www.itfnoroloji.org.
48. B. Guthrie, Laws at al: Mergers in health care: can they be done? The lessons from Roanoke and Rockford. Interview by Michael J Health Care 1990; 10(1): 47-52.
49. Radhakrishnan VV, Saraswathy A, Rout D. Diffuse form of primary leptomeningeal gliomatosis Indian J Pathol Microbiol. 1994 Dec; 37: 51-3.
50. Morantz RA, Ward-Smith P, Tian C, Schmelzle KH, Mayo MS, Chin TD. low grade astrositomas, 2003 chapter 25 Brain Tumors
51. Cairncross JG, Laperriere NJ. Low-grade glioma. To treat or not to treat? Arch Neurol. 1989; 46(11): 1238-9.
52. Felsberg J., Reifenberger G. Neuropathology and Molecular Genetics of Diffusely Infiltrating Cerebral Gliomas. Med. Laser Appl. 2002; 17: 133-146.
53. Hess KR, Broglio DR, Bondy ML (2004). Adult glioma incidence trends in the United States, 1977–2000. Cancer 101: 2293–2299.

54. Pencalet P, Maixner W, Sainte-Rose C, et al. Benign cerebellar astrocytomas in children. *J Neurosurg* 1999; 90: 265.
55. Parisi JE, Scheithauer BW. Glial Tumors. In: *Principles and Practice Neuropathology*. Eds: Nelson JS, Parisi JE, Schochet SS. St Louis: Mosby, 1993; 123-183.
56. Kernohan JW, Mabon RF, Svien HJ, Adson AW: A Simplified classification of gliomas. *Proc Staff Meet Mayo Clinic* 1949; 24: 71.
57. Ringertz J: Grading of gliomas. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1950; 27: 51.
58. Daumas-Duport C, Scheithauer BW, O'Fallon J, Kelly P. Grading of astrocytomas. A Simple and Reproducible method.
59. Fuller GN, Goodman JC. Tumors. In: *Practical Review of Neuropathology*. Philadelphia: Lippincott Williams, 2001; 144-190.
60. Wharton S, Bridges L, Ellison D, Hilton D, Ironside J, Levy D. Minimum Dataset for the Histopathological Reporting Of Tumours Of The Central Nervous System. *Brit Neuropathol Soc* 2003.
61. McKeever PE, Boyer PJ. The Brain, Spinal Cord and Meninges. In: *Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology*. Edts: Carter D, Greenson JK, Oberman HA, Reuter V, Stoler MH. Volume 1. 4 th ed. Philadelphia: Lippincott Williams, 2004; 399-503.
62. Beatris M, Lopes S, Horten BC. Central Nervous System Tumors. In: *Modern Surgical Pathology*. Eds: Weidner N, Cote R J, Suster S, Weiss LM. Philadelphia: WB Saunders 2003; 2059- 2120.
63. Rosenblum MK, Bilbabo JM, Ang LC. Neuromuscular system. In: *Ackerman's Surgical Pathology*. Eds: Rosai J. Volume 2. 9 th ed. St. Louis: Mosby 2004; 2461–2683.
64. Zorludemir S. Difüz Astrositom. *Nöropatoloji Kurs Kitabı*. Ekim 2005; 131-153.
65. Demir MK, Hakan T, Akıncı O, Berkman Z. Primary Cerebellar Glioblastoma Multiforme. *Diagn Interv Radiol*. 2005;11(2): 83-86.

66. Broders AC. Cancer that is not always placed in the cancer category. *Tex Rep Biol Med.* 1950; 8(4): 468-70.
67. Daumas-Duport C, Scheithauer B., Fallon J et al. Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer* 1988; 62: 2152-2165
68. Burger PC, Vogel FS. *Surgical Pathology of the Nervous System and its Coverings* ed. 2. New York: John Wiley & Sons, 1982; 226-266.
69. Nelson JS, Tsukada Y, Schoenfeld D et al. Necrosis as a prognosis criteria in malignant supratentorial astrocytoma gliomas. *Cancer* 1983; 52: 550-554.
70. Krouwer HG, Vollmerhausen J, White J, Prados MD. Desmoplastic medulloblastoma metastatic to the pancreas: case report. *Neurosurgery* 1991; 29(4): 612-6.
71. van Veelen ML, Avezaat CJ, Kros JM, van Putten W, Vecht C. Supratentorial low grade astrocytoma: prognostic factors, dedifferentiation, and the issue of early versus late surgery. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 64(5): 581-7.
72. Krueger H, Conrady P, Zulch J. Special stresses at microscopy work places *Soz Praventivmed.* 1986; 31(4-5): 250-1.
73. Franzini A, Leocata F, Cajola L, Servello D, Allegranza A, Broggi G. Low-grade glial tumors in basal ganglia and thalamus: natural history and biological reappraisal. *Neurosurgery.* 1994; 35(5): 817-21.
74. Behin A., Hoang-Xuan K., Carpentier A.F., Delattre J.Y. Primary Brain Tumours in Adults. *Lancet* 2003; 361: 323-331.
75. Merlo A. Genes and Pathways driving Glioblastomas in Humans and Murine Disease Models. *Neurosurgery Reviews* 2003; 26: 145-158.
76. Central Brain Tumor Registry of United States. Primary Brain Tumors in the United States Statistical Report 2007.
77. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler O, Cavenee WK. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. 2007; Lyon: IARC,

78. Afra D, Muller W, Slowik F, Firsching R. Supratentorial lobar pilocytic astrocytomas: report of 45 operated cases, including 9 recurrences. *Acta Neurochir (Wien)* 1986; 81 (3-4): 90-3.
79. Fisher PG, Breiter SN, Carson BS, Wharam MD ve ark. A clinicopathologic reappraisal of brain stem tumor classification. Identification of pilocystic astrocytoma and fibrillary astrocytoma as distinct entities. *Cancer* 2000; 89 (7): 1569-76.
80. Minehan KJ, Shaw EG, Scheithauer BW, Davis DL ve ark. Spinal cord astrocytoma pathological and treatment considerations. *J Neurosurg* 1995; 83 (4): 590-5.
81. Tomlinson FH, Scheithauer BW, Hayostek CJ, Parisi JE ve ark. The significance of atypia and histologic malignancy in pilocytic astrocytoma of the cerebellum: a clinicopathologic and flow cytometric study. *J Child Neurol* 1994; 9 (3): 301-10.
82. Brat DJ, Burger PC. Cerebral pilocytic astrocytoma: distinction from infiltrating fibrillary astrocytomas. *Pathology Case Reviews*, 1998; 3: 290-295.
83. Malik A, Deb P, Sharma MC, Sarkar C. Neuropathological spectrum of pilocytic astrocytoma: an Indian series of 120 cases. *Pathol Oncol Res* 2006; 12 (3): 164-71.
84. Wippold FJ, 2nd, A P, J L. Neuropathology for the Neuroradiologist: Rosenthal Fibers. *Am J Neuroradiol* 2006; 27: 958-61.
85. Kim SH, Kim TS. Squash smear findings of eosinophilic granular bodies in pilocytic astrocytoma. *Acta Cytol* 2005; 49 (1): 112-4.
86. Murayama S, Bouldin TW, Suzuki K. Immunocytochemical and ultrastructural studies of eosinophilic granular bodies in astrocytic tumors. *Acta Neuropathol* 1992; 83: 408-414.
87. Hayostek CJ, Shaw EG, Scheithauer B, O'Fallon JR ve ark. Astrocytomas of the cerebellum. A comparative clinicopathologic study of pilocytic and diffuse astrocytomas. *Cancer* 1993; 72 (3): 856-69.
88. Braun-Fischer A, Romeike BF, Eymann R, Glas B ve ark. Pilocytic astrocytoma with subarachnoid dissemination. *Radiologe* 1997; 37 (11): 899-904.

89. Hirose T, Giannini C, Scheithauer BW. Ultrastructural features of pleomorphic xanthoastrocytoma: a comparative study with glioblastoma multiforme. *UltrastructPathol* 2001; 25 (6): 469-78.
90. Gol A, McKissock W: The cerebellar astrocytomas. A report on 98 verified cases. *J Neurosurg* 1959; 16: 287.
91. Ilgren E, Stiller C: Cerebellar astrocytomas. *J Neurooncol* 1987; 4:293.
49. Geissinger J: Astrocytomas of the cerebellum in children. *Arch Neurol* 1971; 24:125.
92. Desai K, Nadkarni T, Muzumdar D, et al. Prognostic factors for cerebellar astrocytomas in children:a study of 102 cases. *Pediatr Neurosurg* 2001; 35:311.
93. Chintala SK, Sawaya R, Aggarwal BB, et al. Induction of matrix metalloproteinase-9 requires a polymerized actin cytoskeleton in human malignant glioma cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 13545-13551.
94. Westphal M, Rosen EM: Scatter factor promotes motility of human glioma and neuromicrovascular endothelial cells. *Int J Cancer* 1998; 75: 19-28.
95. Feigin IH, Gross SW. Sarcoma arising in glioblastoma of the brain. *Am J Pathol* 1955; 31: 633-653.
96. Galanis E, Buckner JC, Dinapoli RP, et al. Clinical outcome of gliosarcoma compared with glioblastoma multiforme: North Central Cancer Treatment Group results. *J Neurosurg* 1998; 89: 425-430.
97. Meis JM, Martz KL, Nelson JS. Mixed glioblastoma multiforme and sarcoma. A clinicopathologic study of 26 radiation therapy oncology group cases. *Cancer* 1991; 67: 2342-2349.
98. Morantz RA, Feigin I, Ransohoff 3rd J. Clinical and pathological study of 24 cases of gliosarcoma. *J Neurosurg* 1976; 45: 398-408.
99. Okami N, Kawamata T, Kubo O, et al. Infantile gliosarcoma: a case and a review of the literature. *Childs Nerv Syst* 2002; 18: 351-355.

100. Jaros E, Perry RH, Adam L, et al. Prognostic implications of p53 protein, epidermal growth factor receptor, and Ki-67 labelling in brain tumours. *Br J Cancer* 1992; 66: 373-385.
101. Vecchio F, Giordano R, De Zanche L, et al. Intracranial sarcoma with reactive glioma: a clinicopathological case report. *Eur Neurol* 1988; 28: 301-305.
102. Jack Jr CR, Bhansali DT, Chason JL, et al. Angiographic features of gliosarcoma. *AJNR Am J Neuroradiol* 1987; 8: 117-122.
103. Alatakis S, Stuckey S, Siu K, et al. Gliosarcoma with osteosarcomatous differentiation: review of radiological and pathological features. *J Clin Neurosci* 2004; 11: 650-656.
104. Kelly PJ, Daumas-Duport C, Kispert DB. et al. Imaging based stereotactic serial biopsies in untreated intracranial glial neoplasms. *J Neurosurg* 1987. 66: 865-874.
105. Scott GB, Gibberd FB. Epilepsy and other factors in the prognosis of gliomas. *Acta Neurol Scand* 1980; 61: 227-39
106. Coffey RJ, Lunsford LD, Taylor FH: Survival after stereotactic biopsy of malignant gliomas. *Neurosurgery* 1988; 22: 465-473.
107. Gehan EA, Walker MD: Prognostic factors for patients with brain tumors. *Natl Cancer Inst Monogr* 1977; 46: 189-195.
108. Lacroix M., Abi-Said D., Fourney D.R, et al: A multi variate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, an survival. *J.Neurosurgery* 2001; 95: 190-198.
109. Hylton PD, Reichman OH. Clinical manifestation of glioma before computed tomographic appearance: the dilemma of a negative scan. *Neurosurgery* 1987; 21:27-32.
110. Burger PC, Heinz ER, Shibata T. et al. Tomographic anatomy and CT correlations in the untreated glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 1988; 68: 698-704.
111. Silverman C, Marks JE. Prognostic significance of contrast enhancement in low-grade astrocytomas of the adult cerebrum. *Radiology*. 1981;139(1): 211-3.

112. Piepmeier JM, Wagner FC Jr. Delayed post-traumatic extracerebral hematomas. *J Trauma*. 1982; 22(6): 455-60.
112. McCormack BM, Miller DC, Budzilovich GN, Voorhees GJ, Ransohoff J. Treatment and survival of low-grade astrocytoma in adults 1977-1988. *Neurosurgery*. 1992; 31(4): 636-42
114. Afra D, Osztie E. Histologically confirmed changes on CT of reoperated low-grade astrocytomas. *Neuroradiology* 1997; 39(11): 804-10.
115. Karim AB, Maat B, Hatlevoll R, Menten J, Rutten EH, Thomas DG, Mascarenhas F, Horiot JC, Parvinen LM, van Reijn M, Jager JJ, Fabrini MG, van Alphen AM, Hamers HP, Gaspar L, Noordman E, Pierart M, van Glabbeke M. A randomized trial on doseresponse in radiation therapy of low-grade cerebral glioma: European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Study 22844. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1996 1;36(3): 549-56.
116. Leibel SA, Sheline GE, Wara WM, Boldrey EB, Nielsen SL. The role of radiation therapy in the treatment of astrocytomas. *Cancer* 1975; 35(6): 1551-7.
117. Winger MJ, Macdonald DR, Cairncross JG. Supratentorial anaplastic gliomas in adults. The prognostic importance of extent of resection and prior low-grade glioma. *J Neurosurg* 1989; 71(4): 487-93.
118. Drayer BP, Johnson GA, Thompson MB, Three-dimensional MRI microscopy of the normal rat brain. *Magn Reson Med*. 1987; 4(4): 351-65.
119. Kondziolka D, Lunsford LD, Martinez AJ. Unreliability of contemporary neuro diagnostic imaging in evaluating suspected adult supratentorial (low-grade) astrocytoma. *J Neurosurg*. 1993; 79(4): 533-6.
120. Ishikawa M, Kikuchi H, Miyatake S et al. Glucose consumption in recurrent gliomas. *Neurosurgery* 1993; 33: 28-33.
121. A Report of the Medical Research Council Brain Tumour Working Party. Prognostic factors for high-grade malignant glioma: development of a prognostic index. *J Neurooncol*. 1990; 9(1): 47-55.

122. Tedeschi G, Lundbom N, Raman R, Bonavita S, Duyn JH, Alger JR, Di Chiro G. Increased choline signal coinciding with malignant degeneration of cerebral gliomas: a serial proton magnetic resonance spectroscopy imaging study. *J Neurosurg.* 1997; 87(4): 516-24.
123. Scanlon PW, Taylor WF. Radiotherapy of intracranial astrocytomas. Analysis of 417 cases from 1960 through 1969. *Neurosurgery* 1979; 5: 301-307.
124. Garcia DM, Fulling KH, Marks JE. The value of radiation therapy in addition to surgery for astrocytoma of the adult cerebrum. *Cancer* 1985; 55: 919-927.
125. Laws, Borgelt BB, Gelber RD, Larson M, Kramer S. Equivalence of radiation schedules for the palliative treatment of brain metastases in patients with favorable prognosis. *Cancer* 1981; 48(8): 1749-53.
126. Muller W, Afra D, Schroder R. Supratentorial recurrences of gliomas. Morphological studies in relation to time intervals with astrocytomas. *Acta Neurochir (Wien).* 1977; 37 (1- 2): 75-91.
127. Takao Hoshino, M.D., Luis A. Rodriguez et al. Prognostic implications of the proliferative potential of low-grade astrocytomas. *J neurosurg* 1988; 69: 839-842.
128. Davide schiffer, paola cavalla, adriano chio et al. Proliferative activity and prognosis of low-grade astrocytomas. 1997; 34: 31-35.
129. Russell DS, Rubinstein LJ. Ganglioglioma: a case with long history and malignant evolution. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1989; 21: 185-93.
130. Cha S. Update on brain tumor imaging: from anatomy to physiology. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006; 27: 475-87.
131. Chen W. Clinical applications of PET in brain tumors. *J Nucl Med* 2007; 48: 1468-81.
132. Young GS. Advanced MRI of adult brain tumors. *Neurol Clin* 2007; 25: 947-73.
133. Erdoğan Ş, Astrositik Tümörler II, Sınırlı Astrositomlar. *Nöropatoloji Kurs Kitabı.* Ekim 2005: 154-163.

134. Salcman M. The unconscious patient. In: Salcman M (ed.) *Neurologic Emergencies, Recognition and Management*. New York: Raven Pres 1990; 2: 17-38.
135. Kokunai T, Tamaki N, Matsumoto S. ACNU-resistant mutants of 9L rat glioma cell line. Isolation and preliminary characterization of these subclones. *J Neurosurg* 1985; 63: 583–588.
136. Salcman M. Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. In: Kaye AH, Laws ER (eds). *Brain Tumors*. Churchill Livingstone Toronto 2001; 26: 493-523 .
137. Liebel SA, Gutin PH, Wara WM et al. Survival and quality of life after interstitial implantation of removable high activity iodine-125 sources for the treatment of patients with recurrent malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 17: 1129-39.
138. Bernstein M, Laperrier NA, Leung P et al. Interstitial brachytherapy for malignant brain tumors, preliminary results. *Neurosurgery* 1990; 26: 371-80.
139. Gutin PH, Prados MD, Phillips TL et al. External irradiation followed by an interstitial high-activity iodine-125 implant boost in the initial treatment of malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991; 21: 601-6.
140. Larson DA, Prados M, Lamborn KR et al. Phase II study of central dose gamma knife radiosurgery and marimastat in patients with recurrent malignant glioma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 54: 1397-403
141. Larson DA, Gutin PH, McDermott M et al. Gamma knife for glioma: selection factors and survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996; 1; 36 (5): 1045-53.
142. Hall WA, Djalillian HR, Sperduto PW et al. Stereotactic radiosurgery for recurrent gliomas. *J Clin Oncol* 1995; 13: 1642-8.
143. Shieve DC, Alexander E, Wen PY et al. Comparision of stereotactic radiosurgery and brachythrepy in the treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *Neurosurgery* 1997; 41: 776-83.
144. Mahaley MS, Whaley RA, Blue M et al. Neurotoxicity following intracarotid BCNU chemotherapy for malignant gliomas. *JNeurooncol* 1986; 3: 297-314.

145. Chang CH, Horton J, Schoenfeld D et al. Comparison of postoperative radiotherapy and combined postoperative radiotherapy chemotherapy in the multidisciplinary management of malignant gliomas. A joint radiation therapy oncology group and eastern cooperative oncology group study. *Cancer* 1983; 52: 997-1007.
146. Brada M, Judson I, Beale P, et al. Phase I dose-escalation and pharmacokinetic study of temozolomide (SCH 52365) for refractory or relapsing malignancies. *Br J Cancer* 1999; 81: 1022–1030.
147. Ostermann S, Csajka C, Buclin T, et al. Plasma and cerebrospinal fluid population pharmacokinetics of temozolomide in malignant glioma patients. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3728–3736.
148. Spiro TP, Liu L, Majka S, et al. Temozolomide: the effect of once-and twice-a-day dosing on tumor tissue levels of the DNA repair protein O6-alkylguanine- DNA-alkyltransferase. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2309–2317.
149. Brock CS, Newlands ES, Wedge SR, et al. Phase I trial of temozolomide using an extended continuous oral schedule. *Cancer Res* 1998; 58: 4363–4367.
150. Stupp R, Dietrich PY, Ostermann Kraljevic S, et al. Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1375–1382.
151. Gerson SL. Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2388–2399.
152. Gerson SL. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 296–307.
153. Belanich M, Pastor M, Randall T, et al. Retrospective study of the correlation between the DNA repair protein alkyltransferase and survival of brain tumor patients treated with carmustine. *Cancer Res* 1996; 56: 783–788.
154. Kaina B, Christmann M. DNA repair in resistance to alkylating anticancer drugs. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2002; 40: 354–367.
155. Hegi ME, Diserens AC, Godard S, et al. Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in

glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1871–1874.

156. 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.

157. Nagasubramanian R, Dolan ME. Temozolomide: realizing the promise and potential. *Curr Opin Oncol* 2003; 15: 412–418.

158. Stupp R, Gander M, Leyvraz S, et al. Current and future developments in the use of temozolomide for the treatment of brain tumors. *Lancet Oncol* 2001; 2: 552–560.

158. Stupp R, Hegi ME, van den Bent M, et al. Changing paradigms an update on the multidisciplinary management of malignant glioma. *The Oncologist* 2006; 11: 165–180.

160. Stupp R, Dietrich PY, Ostermann Kraljevic S, et al. Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1375–1382.

161. Stupp R, Mason WP, van den Bent M, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352: 987–996.

162. Salzman M. Survival glioblastoma: Historical perspective. *Neurosurgery* 1980; 7: 435-9.

163. DeAngelis LM: Brain tumors. *N Engl J Med* 2001; 344:114-123.

164. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 2008; 359: 492-507.

165. Gjerris F, Agerlin N, Borgesen S, et al. Epidemiology and prognosis in children treated for intracranial tumours in Denmark 1960-1984. *Childs Nerv Syst* 1998; 14:302.

166. Cho K-K, Mikkelsen T, Lee YJ, et al. The role of protein kinase Ca in U87 glioma invasion. *Int J Dev Neurosci* 1999; 17: 447-461.

167. Loeffler JS, Alexander III E, Hochberg FH, et al. Clinical patterns of failure following stereotactic interstitial irradiation for malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990; 19: 1455-1462.

168. Wen PY, Alexander III E, Black PM, et al. Long term results of stereotactic brachytherapy used in the initial treatment of patients with glioblastomas. *Cancer* 1994; 73: 3029-3036.
169. Shrieve DC, Alexander III E, Wen PY, et al. Comparison of stereotactic radiosurgery and brachytherapy in the treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *Neurosurgery* 1995; 36: 275-284.
170. Laperriere NJ, Leung PM, McKenzie S, et al. Randomized study of brachytherapy in the initial management of patients with malignant astrocytoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 41: 1005-1011
171. Iwadata Y, Namba H, Sueyoshi K. Intra-arterial ACNU and cisplatin chemotherapy for the treatment of glioblastoma multiforme. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 1995; 35: 598-603.
172. Riva P, Arista A, Franceschi G, et al. Local treatment of malignant gliomas by direct infusion of specific monoclonal antibodies labeled with ¹³¹I: comparison of the results obtained in recurrent and newly diagnosed tumors. *Cancer Res* 1995; 55: 5952-5956.
173. Asthagiri AR, Pouratian N, Sherman J, Ahmed G, Shaffrey ME. Advances in brain tumor surgery. *Neurol Clin* 2007; 25: 975-1003.
174. Devaux BC, O'Fallon JR, Kelly PJ. Resection, biopsy and survival in malignant glial neoplasms. A retrospective study of Clinical parameters, therapy and outcome. *J. Neurosurg* 1993; 78: 767-775.
175. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicenter phase III trial. *Lancet Oncol* 2006; 7: 392-401.
176. Chaichana KL, McGirt MJ, Latta J, Olivi A, Quiñones-Hinojosa A. Recurrence and malignant degeneration after resection of adult hemispheric low-grade gliomas. Clinical article. *J Neurosurg* 2010;112: 10–17.

177. Sanai N, Berger MS. Glioma extent of resection and its impact on patient outcome. *Neurosurgery* 2008; 62: 753–764.
178. Sanai N, Polley MY, Berger MS. Insular glioma resection: assessment of patient morbidity, survival, and tumor progression. Clinical article. *J Neurosurg* 2010; 112: 1–9
179. Simon M, Neuloh G, von Lehe M, Meyer B, Schramm J: Insular gliomas: the case for surgical management. Clinical article. *J Neurosurg* 2009; 110: 685–695.
180. Smith JS, Chang EF, Lamborn KR, Chang SM, Prados MD, Cha S, et al.: Role of extent of resection in the long-term outcome of low-grade hemispheric gliomas. *J Clin Oncol* 2880; 26: 1338–1345.
181. James CD, Carlbom E, Nordenskjold M, et al. Mitotic recombination of chromosome 17 in astrocytomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 2858-2862.
182. Bogler O, Huang HJ, Cavenee WK. Loss of wild-type p53 bestows a growth advantage on primary cortical astrocytes and facilitates their in vitro transformation. *Cancer Res* 1995; 55: 2746-2751.
183. Yahanda AM, Bruner JM, Donehower LA, et al. Astrocytes derived from p53-deficient mice provide a multistep in vitro model for development of malignant gliomas. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 4249-4259.
184. Watanabe K, Sato K, Biernat W, et al. Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 523-530.
185. Rey JA, Bello MJ. Cytogenetics. In: Berger MS, Wilsons CW, ed. *The Gliomas*, Philadelphia: Saunders; 1999: 25-37.
186. Kleihues P, Burger PC, Plate KH, et al. *Pathology & Genetics: Tumours of the Nervous System*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2000.
187. Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008; 321: 1807.
188. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 2004; 64: 6892.

189. Dropcho EJ, Soong SJ. The prognostic impact of prior low grade histology in patients with anaplastic gliomas: a case-control study. *Neurology* 1996; 47: 684.
190. Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; 64: 479.
191. Cancer Genome Atlas Research Network Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 2008; 455: 1061.
192. Gallia GL, Rand V, Siu IM, et al. PIK3CA gene mutations in pediatric and adult glioblastoma multiforme. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 709.
193. Wong AJ, Bigner SH, Bigner DD, et al. Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 6899.
194. Collins VP: Gene amplification in human gliomas. *Glia* 1995; 15:289.
195. Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, et al. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:2965.
196. Bigner SH, Humphrey PA, Wong AJ, et al. Characterization of the epidermal growth factor receptor in human glioma cell lines and xenografts. *Cancer Res* 1990; 50: 8017.
197. Frederick L, Wang XY, Eley G, et al. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res* 2000; 60: 1383.
198. Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, et al. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 4309.
199. Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Emlet DR, et al. Constitutive activation of phosphatidylinositol 3-kinase by a naturally occurring mutant epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 1998; 273: 200.

200. Huang HS, Nagane M, Klingbeil CK, et al. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J Biol Chem* 1997; 272: 2927.
201. Lal A, Glazer CA, Martinson HM, et al. Mutant epidermal growth factor receptor up-regulates molecular effectors of tumor invasion. *Cancer Res* 2002; 62: 3335.
202. Voelzke WR, Petty WJ, Lesser GJ. Targeting the epidermal growth factor receptor in high-grade astrocytomas. *Curr Treat Options Oncol* 2008; 9: 23.
203. Omuro AM, Faivre S, Raymond E. Lessons learned in the development of targeted therapy for malignant gliomas. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 1909.
204. Leung SY, Chan TL, Chung LP, et al. Microsatellite instability and mutation of DNA mismatch repair genes in gliomas. *Am J Pathol* 1998; 153: 1181.
205. Cahill DP, Levine KK, Betensky RA, et al. Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2038.
206. Alvino E, Fernandez E, Pallini R: Microsatellite instability in primary brain tumors. *Neurol Res* 2000; 22: 571.
207. Rellecke P, Kuchelmeister K, Schachenmayr W, et al. Mismatch repair protein hMSH2 in primary drug resistance in in vitro human malignant gliomas. *J Neurosurg* 2004; 101: 653.
208. Scherer HJ. The forms of growth in gliomas and their practical significance. *Brain* 1940; 63: 1-34.
209. Salazar OM, Rubin P. The spread of glioblastoma multiforme as a determining factor in the radiation treated volume. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1976; 1: 627-637.
210. Maxwell HP. The incidence of interhemispheric extension of glioblastoma multiforme through the corpus callosum. *J Neurosurg* 1946; 3: 54-57.

211. Matsukado Y, MacCarty CS, Kernohan JW. The growth of glioblastoma multiforme (astrocytomas, grades 3 and 4) in neurosurgical practice. *J Neurosurg* 1961; 18: 636-644.
212. Kramer S. Tumor extent as determining factor in radiotherapy of glioblastomas. *Acta Radiol* 1959; 8: 111-117.
213. Hochberg FH, Pruitt A. Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma. *Neurology* 1980; 30: 907-911.
214. Wallner KE, Galicich JH, Krol G, et al. Patterns of failure following treatment for glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 16: 1405-1409.
215. Bashir R, Hochberg F, Oot R. Regrowth patterns of glioblastoma multiforme related to planning of interstitial brachytherapy radiation fields. *Neurosurgery* 1988; 23: 27-30.
216. Choucair AK, Levin VA, Gutin PH, et al. Development of multiple lesions during radiation therapy and chemotherapy in patients with gliomas. *J Neurosurg* 1986; 65: 654-658.
217. Salazar OM, Rubin P, McDonald JV, et al. Patterns of failure in intracranial astrocytomas after irradiation: analysis of dose and field factors. *AJR Am J Roentgenol* 1976; 126: 279-292.
218. Chun M, McKeough F, Wu A, et al. Interstitial iridium-192 implantation for malignant brain tumours. Part II. Clinical experience. *Br J Radiol* 1989; 62: 158-162.
219. Massey V, Wallner KE. Patterns of second recurrence of malignant astrocytomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990; 18: 395-398.
220. Sneed PK, Gutin PH, Larson DA, et al. Patterns of recurrence of glioblastoma multiforme after external irradiation followed by implant boost. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 29: 719-727.
221. Civitello LA, Packer RJ, Rorke LB, et al. Leptomeningeal dissemination of low-grade gliomas in childhood. *Neurology* 1988; 38: 562-566.

222. Castellani P, Dorcaratto A, Siri A, et al. Tenascin distribution in human brain tumors. *Acta Neurochir (Wien)* 1995; 136: 44-50.
223. MacDonald TJ, Taga T, Shimada H, et al. Preferential susceptibility of brain tumours to the antiangiogenic effects of an $\alpha(v)$ integrin antagonist. *Neurosurgery* 2001; 48: 151-157.
224. Nabors LB, Mikkelsen T, Rosenfeld SS, et al. Phase I and correlative biology study of cilengitide in patients with recurrent malignant glioma. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1637-1638.
225. Chi A, Norden AD, Wen PY. Inhibition of angiogenesis and invasion in malignant gliomas. *Expert Rev Anticancer Ther* 2007; 7: 1537-1560.
226. Curran S, Dundas S. R, Buxton J, Leeman M. F, Ramsay R, and Murray G. I. Matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancers. *Clinical Cancer Research* 2004; 10: 8229-8234.
227. Zucker S. and Vacirca J. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 2004; 23: 101–117.
228. Hi B, Li P, Zhao S, Liu Z, Yu Y.-M, Han M, Wen J-K. Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in colorectal carcinoma invasion and metastasis. *China World J Gastroenterol* 2005; 11(20): 3046-3050.
229. Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F. Melatonin: a peroxyl radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci* 1994; 15: 271-276.
230. Sanchez-Barcelo EJ, Cos S, Fernandez R, Mediavilla MD. Melatonin and mammary cancer: a short review. 2003; 10: 153-159.
231. Anisimov VN, Popovich IG, Shtylik AV, Zabezhinski MA, Ben-Huh H, Gurevich P, Berman V, Tendler Y, Zusman I. Melatonin and colon carcinogenesis. III. Effect of melatonin on proliferative activity and apoptosis in colon mucosa and colon tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2000; 52: 71– 6.

232. Waas ET, Wobbes T, Lomme RML, DeGroot J, Ruers T, Hendriks T. Matrix metalloproteinase 2 and 9 activity in patients with colorectal cancer liver metastasis British Journal of Surgery 2003; 90: 1556–1564.
233. Oz E. and Yılhan M. N. Effects of melatonin in reducing the toxic effects of doxorubicin Molecular and Cellular Biochemistry 2006; 286: 11–15.
234. Apakkan Aksun S, Özmen D, Bayındır O. Metalloproteinazlar, inhibitörleri ve ilişkili fizyolojik ve patolojik durumlar. T Klin Tıp Bilimleri 2001; 21: 332-342.
235. Kukacka J, Průša R, Kotaska K, Pelouch V. Matrix metalloproteinases and their function in myocardium. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2005; 149(2): 225-36.
236. E. A. Baker and D. J. Leaper measuring gelatinase activity in colorectal cancer. EJSO 2002; 28: 24-24.
237. Reel B. Matriks metalloproteinaz enzimleri ve ateroskleroz. Türkiye Klinikleri. J Med Sci 2006; 26: 527-537.
238. Nagase H, Suzuki K, Itoh Y, Kan C-C, Gehring MR, Huang W, Brew K. Involvement of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPS) during matrix metalloproteinase activation. Intracellular Protein Catabolism 1996; 23-31.
239. Brew K, Dinakarbandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. Biochim Biophys Acta 2000; 1477: 267–83.
240. Baker E.A, Leaper D.J. The plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in colorectal cancer: relationship to tumour pathology European Journal of Cancer 2003; 39: 981–988.
241. Tchetverikov I, Lohmander L S, Verzijl N, Huizinga T W J, TeKoppele J M, Hanemaaijer R and DeGroot J. MMP protein and activity levels in synovial fluid from patients with joint injury, inflammatory arthritis, and osteoarthritis. Ann Rheum Dis 2005; 64: 694-698.

242. Laack E, Kohler A, Kugler C, Dierlamm T, Knuffmann C, Vohwinkel G. Pretreatment serum levels of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2002; 13(10):1550-7.
243. Yang SF, Hsieh YS, Lin CL, Hsu NY, Chiou HL, Chou FP. Increased plasma levels of urokinase plasminogen activator and matrix metalloproteinase-9 in nonsmall cell lung cancer patients. *Clin Chim Acta* 2005; 354(1-2): 91-9.
244. Susskind H, Hymowitz MH, Lau YH, Atkins HL, Hurewitz AN, Valentine ES. Increased plasma levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in lung and breast cancer are altered during chest radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 56(4): 1161-9.
245. Reiter RJ, Tan DX. Melatonin: A novel protective agent against oxidative injury of the ischemic-reperfused heart. *Cardiovascular Research* 2003; 58: 10-9.
246. Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 2001; 426: 1-10.
247. Aydoğan S, Yerer MB, Yapislar H. In vitro effects of melatonin on the filtrability of erythrocytes in SNP-induced oxidative stress. *Clin Hemorheol Microcirc* 2004; 30: 317-22.
248. Tutton M. G, George M. L, Eccles S. A, Burton S, Swift R. I, Abulafi A. M. Use of plasma MMP2 and MMP 9 levels as a surrogate for tumour exspression in colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer*2003; 107: 541-550.
249. M. F Leeman, S. Curran and G. I Murray. New insights into the roles of matrix metalloproteinases in colorectal cancer development and progression *J Pathol* 2003; 201: 528–534
250. McCawley L. J. and Matrisian L M. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Molecular Medicine Today* 2000; vol:6
251. Alberts B, Johnson A, Lewis J et al. Intracellular compartments and protein sorting. *Molecular Biology of the Cell*. 4th Ed. GSGarland Science 2002; 1800-1850

252. M. Egeblad, Z. Werb. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* 2002; 2: 161–174.
253. Pravdenkova S, Al-Mefty O, Sawyer J, Husain M. Progesterone and estrogen receptors: opposing prognostic indicators in meningiomas. *J. Neurosurg.* 2006; 105 (2): 163-173
254. Sanchez-Lopez R, Alexander CM, Behrendtsen O et al. Role of zinc-binding- and hemopexin domain-encoded sequences in the substrate specificity of collagenase and stromelysin- 2 as revealed by chimeric proteins. *J. Biol Chem* 1993; 268: 7238–7247
255. Kahari V-M, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors intumourgrowth and invasion. *Ann Med* 1999;31: 34–45.
256. Nelson AR, Fingleton B, Rotherberg ML, et al. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1135–49
257. Brown PD. Ongoing trials with matrix metalloproteinase inhibitors. *Exp Opin Invest Drugs* 2000; 9: 2167–77.
258. Lijnen H.R. Extracellular proteolysis in the development and progression of atherosclerosis. *Biochem. Soc. Trans* 2002; 30(2): 163-7.
259. Birkedal-Hansen H., Moore W.G.I., Bodden M.K., Windsor L.J., Birkedal-Hansen B., DeCarlo A. and Engler J.A. Matrix Metalloproteinases: A Review: Critical Reviews in Oral Biology and Medicine 1993; 4(2): 197-250.
260. Woessner J.F. Jr.: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.*1991; 5(8): 2145-54.
261. Opdenakker G., Van den Sten P.E., Dubois B., Nelissen I., Coillie E.V., Masure S., Proost P., and Damme J.V.: Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J. Leukoc. Biol* 2001; 69: 851.859.
262. Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion andmetas tasis. *Semin Cancer Biol* 2000; 10: 415 -33.
263. Egeblad M,Werb Z. New functions for thematrixmetalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 161-74.

264. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 2000; 103: 481-90
265. Rebbeck TR, Spitz M, Wu X. Assessing the function of genetic variants in candidate gene association studies. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 589-97.
266. Sunyaev S, Ramensky V, Koch I, Lathe W III, Kondrashov AS, Bork P. Prediction of deleterious human alleles. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 591-7.
267. Fang S, Jin X, Wang R, et al. Polymorphisms in the MMP1 and MMP3 promoter and non-small cell lung carcinoma in North China. *Carcinogenesis* 2005; 26: 481-6.
268. Su L, Zhou W, Park S, et al. Matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 567-70.
269. Zinzindohoue F, Lecomte T, Ferraz JM, et al. Prognostic significance of MMP-1 and MMP-3 functional promoter polymorphisms in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 594-9.
270. Yu C, Zhou Y, Miao X, Xiong P, Tan W, Lin D. Functional haplotypes in the promoter of matrix metalloproteinase-2 predict risk of the occurrence and metastasis of esophageal cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 7622-8
271. Ju W, Kang S, Kim JW, et al. Promoter polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 and risk of cervical cancer in Korean women. *Cancer Lett* 2005; 217: 191-6
272. Allan JA, Docherty AJ, Barker PJ, Huskisson NS, Reynolds JJ, Murphy G. Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochem J* 1995; 309: 299-306.
273. Gohlke U, Gomis-Ruth FX, Crabbe T, Murphy G, Docherty AJ, Bode W. The C-terminal (haemopexin-like) domain structure of human gelatinase A (MMP2): structural implications for its function. *FEBS Lett* 1996; 378: 126-30.
274. Cao J, Sato H, Takino T, Seiki M. The C-terminal region of membrane type matrix metalloproteinase is a functional transmembrane domain required for progelatinase A activation. *J Biol Chem* 1995; 270: 801-5.

275. Butler GS, ButlerMJ, Atkinson SJ, et al. TheTIMP2 membrane type 1 metalloproteinase “receptor” regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. J Biol Chem 1998; 273: 871-80.

276. Türk Onkoloji Dergisi, 2004; Cilt 19(4): 135