



**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

GLİOBLASTOMA MULTİFORME'DE RHO-KİNAZ GEN EKSPRESYONU VE PROGNOZLA İLİŞKİSİ

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Ahmet ÇİĞİLOĞLU
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Celalettin CAMCI**

Nisan-2011

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

GLİOBLASTOMA MULTİFORME'DE RHO-KİNAZ GEN EKSPRESYONU VE PROGNOZLA İLİŞKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ahmet ÇİĞİLOĞLU
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Celalettin CAMCI

Bu tez, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından TF.10.30 proje numarası ile desteklenmiştir.

TEZ ONAY SAYFASI

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

GLİOBLASTOMA MULTİFORME'DE RHO-KİNAZ GEN EKSPRESYONU VE PROGNOZLA İLİŞKİSİ

Dr. Ahmet ÇİĞİLOĞLU

11/04/2011

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

Prof. Dr. Abdurrahman KADAYIFÇI
Tıp Fakültesi Dekanı

Bu tez çalışmasının "Tıpta Uzmanlık" derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Cemil SAVAŞ
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile "Tıpta Uzmanlık" tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

Prof. Dr. Celalettin CAMCI

TEZ JÜRİSİ

1. Prof. Dr. Cemil SAVAŞ
2. Prof. Dr. Celalettin CAMCI
3. Prof. Dr. Mehmet AKSOY
4. Doç. Dr. Mustafa PEHLİVAN
5. Doç. Dr. A. Mesut ONAT

I. ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleşmesi için araştırmanın başlangıcından sonuna kadar her aşamasında danışmanlık yapan, deneyimleriyle bana yön veren ve desteklerini esirgemeyen değerli tez hocam Prof. Dr. Celalettin Camcı'ya, genetik analizleri titizlikle yapan Yrd. Doç. Dr. Serdar Öztuzcu'ya, Biyolog Esmâ Özyazgan Özkara'ya, Prof. Dr. A. Tuncay Demiryürek'e ve uzmanlık eğitimimde emeği geçen tüm İç Hastalıkları Anabilim Dalı'ndaki hocalarıma, tüm mesai arkadaşlarıma, emeklerini asla ödeyemeyeceğim anneme ve babama, göstermiş olduğu sabır ve vermiş olduğu destekten dolayı eşim Ayşe Kutsal'a teşekkür ederim.

Dr. Ahmet ÇİĞİLOĞLU
Gaziantep-2011

II. İÇİNDEKİLER

I. ÖNSÖZ	I
II. İÇİNDEKİLER	II
III. ÖZET	IV
IV. ABSTRACT	V
V. KISALTMALAR	VI
VI. TABLO LİSTESİ	VIII
VII. ŞEKİL LİSTESİ	IX
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Glioblastoma Multiforme	3
2.1.1. İnsidans, Yaş ve Cins Dağılımı	6
2.1.2. Genetik	6
2.1.3. Yerleşim	7
2.1.4. Histopatoloji	8
2.1.5. Semptom ve Bulgular	8
2.1.6. Tanı	9
2.1.7. Prognostik Faktörler	9
2.1.8. Tedavi	10
2.1.8.1. Genel Tedavi Yaklaşımları	10
2.1.8.2. Cerrahi Tedavi	10
2.1.8.3. Radyoterapi	11
2.1.8.4. Kemoterapi	11
2.2. Rho-kinaz	13
2.2.1. Rho/Rho-Kinaz Yolağı	13
2.2.2. Rho-kinaz inhibitörleri	18
2.2.3. Rho-kinaz ve Kanser	20
2.2.4. Glioblastoma Multiforme ve Rho-kinaz	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Hasta grubu	23
3.2. Klinik Tanı Ve Veri Toplanması İçin Yapılan İşlemler	23

3.3. RNA İzolasyonu	23
3.4. Real Time PCR ile gen ekspresyonlarının tayini	24
3.5. İstatistiksel Analiz	24
4. BULGULAR	25
5. TARTIŞMA	35
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	39
7. KAYNAKLAR	41

III. ÖZET

GLİOBLASTOMA MULTİFORME'DE RHO-KİNAZ GEN EKSPRESYONU VE PROGNOZLA İLİŞKİSİ

Dr. Ahmet ÇİĞİLOĞLU

Uzmanlık Tezi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Celalettin CAMCI
Nisan 2011, 51 sayfa

Glioblastoma Multiforme (GBM), beynin en sık görülen ve en agresif primer malign tümördür. Yetişkin kanser ölümlerinin yaklaşık %2'sinden sorumludur. Glioblastoma Multiforme'de prognozu etkileyen faktörler yaş, tümör lokalizasyonu, tümör çapı, semptom süresi ve tipi, cerrahinin genişliği, postoperatif tümör volümü, adjuvan radyoterapi ve/veya kemoterapi durumu olarak sıralanabilir. GBM'de tedavi başarısızlığı ve ölüm lokal tümör büyümesinden ve beyindeki invazyonun artışından olmaktadır. Hücrelerin invazyonunda aktin mikofilamentleri, mikrotübüller, ara filamentler arasındaki etkileşimler, bunları düzenleyen çevresel faktörler ve intrasellüler sinyallerin etkisi vardır. Bu değişikliklerin oluşmasında Rho proteinleri ve dolayısı ile Rho-kinazın aktivasyonu önemli rol oynamaktadır.

Bu çalışmanın amacı Glioblastoma Multiforme'de Rho-kinaz yolağına ait genlerin ekspresyonlarının prognozla ilişkisini araştırmaktır. Bu çalışma bu konuda yapılan ilk çalışmadır.

Çalışmaya 2001-2010 yılları arasında Glioblastoma Multiforme tanısı almış 98 hasta dahil edildi. Hastaların parafine gömülü doku örneklerinden FFPE RNA izolasyon kiti kullanılarak RNA eldesi yapıldı ve Rho-kinaz yolağına ait olan toplam 26 genin gen ifadeleri mRNA düzeyinde araştırıldı.

Hastaların tanı sırasındaki yaşları ile yaşam süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon saptandı.

Rho-kinaz yolağındaki LIMK1, CFL1, CFL2, BCL2 genlerinin fazla ekspresyonu ve MAPK1 geninin az ekspresyonuyla hastaların yaşam süreleri arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Bu gen ekspresyonlarının tedaviye yanıtın artmasını sağlayabileceği veya tedaviye dirençli hastaların önceden tespit edilmesini sağlayabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Glioblastoma Multiforme, Rho-kinaz, ROCK1, ROCK2

IV. ABSTRACT

ASSOCIATION BETWEEN THE RHO-KINASE GENE EXPRESSION AND PROGNOSIS IN GLIOBLASTOMA MULTIFORME

Dr. Ahmet ÇİĞİLOĞLU

Residency Thesis, Department of Internal Medicine
Supervisor: Prof. Dr. Celalettin CAMCI
April 2011, 51 pages

Glioblastoma Multiforme(GBM) is the most common and the most aggressive primary malignant tumor of the brain. GBM is responsible for approximately 2% of adult cancer deaths. Prognostic factors in Glioblastoma Multiforme can be sorted as age, tumor localization, tumor diameter, symptom period and type, the width of surgery, postoperative tumor volume, adjuvant radiotherapy and/or chemotherapy status. Local tumor growth and brain invasion causes failure in treatment and death in GBM. The interactions between actin microfilaments, microtubules, intermediate filaments and environmental factors, intracellular signals which regulate them effect the cell invasion. Rho proteins and therefore Rho-kinase activation play important role at these interactions.

The aim of this study is to evaluate the relationship between the Rho-kinase pathway gene expressions and prognosis in Glioblastoma Multiforme. This is the first research at this issue.

98 patients diagnosed as GBM between 2001-2010 were taken into the study. RNA was obtained using FFPE RNA isolation kit from the parafinized tissue of the patients and the mRNA expressions of 26 genes were investigated.

There was a statistically significant negative correlation between the ages at the diagnosis and survival.

There was a significant relationship between the overexpression of Rho-kinase genes LIMK1, CFL1, CFL2, BCL2 and low expression of MAPK1 gene and the survival of the patients. In conclusion, the expression of these genes may be related to response of multimodal therapy or these parameters could be used to determine unresponsive patients before treatment.

Key words: Glioblastoma Multiforme, Rho-kinase, ROCK1, ROCK2

V. KISALTMALAR

GBM:	Glioblastoma Multiforme
ROCK:	Rho-kinaz
DNA:	Deoksiribonükleik asit
MRI:	Manyetik rezonans görüntüleme
EGFR:	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
u-PA:	Urokinaz plazminojen aktivatör
PAI-1:	Plazminojen aktivatör inhibitör-1
SERPINE1:	Plazminojen aktivatör inhibitör-1
GDP:	Guanozin difosfat
GTP:	Guanozin trifosfat
GTPaz:	Guanozin trifosfataz
GAP:	GTPaz aktive edici protein
RASA1:	RAS p21 protein activator 1, RASGAP
GDI:	GTPaz dissosiasyon inhibitörleri
GEF:	Guanin nükleotid değiş-tokuş faktörleri
ERM:	Ezrin-radiksin-moesin
MLCP:	Miyozin hafif zincir fosfataz
MPRIP:	Miyozin fosfataz Rho interacting protein
NHE:	Na/H exchanger (değiřtirici)
eNOS:	Endotelial nitrik oksit sentaz
ET-1:	Endotelin-1
MLCK:	Miyozin hafif zincir kinaz
PDGF:	Trombosit kökenli büyüme faktörü
PDGFR:	Trombosit kökenli büyüme faktörü reseptörü
VEGF:	Vasküler endotelial büyüme faktörü
PI3K:	Fosfatidil inositol 3-kinaz
BT:	Bilgisayarlı tomografi
mRNA:	Messenger RNA
RTK:	Tirozin kinaz reseptörü
CDK:	Cyclin-dependent kinase

TMZ:	Temozolomid
PTEN:	Phosphatase and tensin homolog
MGMT:	O6-metil-guanin DNA metiltransferaz
MPNST:	Malign periferel sinir kılıfı tümörü
WHO:	Dünya Sağlık Örgütü
PNET:	Primitif nöroektodermal tümör
LIMK:	LIM kinaz
ERK1:	Extracellular signal-regulated protein kinaz 1
MAPK3:	Mitogen-activated protein kinase 3 (ERK1)
ERK2:	Extracellular signal-regulated protein kinaz 2
MAPK1:	Mitogen-activated protein kinase 1 (ERK2)
SRE:	Serum response element
SRF:	Serum response factor
CFL:	Cofilin

VI. TABLO LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1. Yaşam süresi ve tedavi durumlarına göre yapılan gruplamada hasta sayısı ve hastaların tanı sırasındaki ortalama yaşları	27
Tablo 2. Yaşam süreleri ve aldıkları tedavilere göre yapılan gruplamada hasta sayısı ve cinsiyetlerinin karşılaştırılması	28
Tablo 3. Tedavi gruplarındaki yaş ortalamasının karşılaştırılması	29
Tablo 4. Tedavi gruplarındaki yaşam sürelerinin karşılaştırılması	29
Tablo 5. GBM'li hastalarda mRNA düzeyinde LIMK1 gen ekspresyonu ve gruplar arasında karşılaştırılması	30
Tablo 6. GBM'li hastalarda mRNA düzeyinde CFL1 gen ekspresyonu ve gruplar arasında karşılaştırılması	30
Tablo 7. GBM'li hastalarda mRNA düzeyinde CFL2 gen ekspresyonu ve gruplar arasında karşılaştırılması	31
Tablo 8. GBM'li hastalarda mRNA düzeyinde BCL2 gen ekspresyonu ve gruplar arasında karşılaştırılması	31
Tablo 9. GBM'li hastalarda mRNA düzeyinde MAPK1 gen ekspresyonu ve gruplar arasında karşılaştırılması	32
Tablo 10. Diğer gen ekspresyonlarının gruplar arasında karşılaştırılması	33
Tablo 11. Diğer gen ekspresyonlarının gruplar arasında karşılaştırılması	34

VII. ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1. RhoGTPaz'lar ve hücre içi etkileşimleri	14
Şekil 2. ROCK'un düz kas kasılması, hücre büyümesi, gen ekspresyonuna etkileri	16
Şekil 3. Rho-kinaz'ların aktivasyonu ile gelişen hücreyel olaylar	17
Şekil 4. Gruplar arasında cinsiyet dağılımı	28

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Primer beyin tümörleri, tüm malign hastalıkların yaklaşık %2'sini oluşturur. Erişkinlerde, en sık rastlanan histolojik tipler Anaplastik astrositom ve Glioblastoma multiforme (GBM) dir. GBM beynin en sık görülen ve en agresif primer malign tümörüdür. GBM'in standart tedavisi, uygun olgularda cerrahi rezeksiyonu takiben, adjuvan kemoterapi ile birlikte ya da tek başına radyoterapidir. Tanı, cerrahi, radyoterapi ve kemoterapideki gelişmelere rağmen GBM'deki ortalama yaşam süresi yaklaşık olarak 1 yıldır.

GBM'de tümörün yakın ve uzağındaki bölgelerin astrositom infiltrasyonuna uğraması tedavi başarısızlığı ve tümör rekürrensının ana nedenidir. İnvazyon; hücreler arası, hücre ile ekstrasellüler matriks arası adezyonu, ekstrasellüler matriks enzimlerini, hücre migrasyonunu gerektirir. Astrositom migrasyonunun intrasellüler mekanizmaları yeterince anlaşılamamıştır; ancak aktin mikofilamentleri, mikrotübüller, ara filamentler arasındaki etkileşimler, bunları düzenleyen çevresel faktörler ve intrasellüler sinyallerin etkisi vardır. Hücre morfolojik değişiklikleri aktin stres lifleri vasıtası ile sağlanmaktadır. Hücrelerin onkolojik değişikliğe uğramasında Rho proteinleri ve dolayısı ile Rho-kinazın aktivasyonu önemli rol oynamaktadır.

RhoA/Rho-kinaz yolağı, hücre adezyonu, migrasyonu, şekil değişimleri ve sitokinezde etkili olmaktadır. Bu etkileri ile kanser hücrelerinin invazyon ve metastatik aktivitelerini düzenlemektedir. Rho-kinaz inhibitörleri ile bu hücre fonksiyonların azaltıldığı ve kanser hücrelerinde metastazın baskılandığı gösterilmiştir.

Literatürde GBM'de Rho-kinaz yolağında ait genlerin eksresyonunun yapıldığı ve prognoza etkilerinin araştırıldığı bir çalışma mevcut değildir. Bu nedenle bu çalışmayı yapmayı planladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. GLİOBLASTOMA MULTİFORME

Merkezi sinir sistemi tümörleri, yeni tanı konulan tüm kanserlerin %2'sini, çocukluk çağı kanserlerinin ise %20'sini oluşturur (1,2). Primer beyin tümörleri; glial dokudan, nöronlardan, meninkslerden, damarlardan veya endokrin hücrelerden kaynaklanabilirler. Primer beyin tümörleri için en sık kullanılan sınıflandırma sistemi 2007 yılında yeniden gözden geçirilerek düzenlemeler yapılan Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) sınıflandırmasıdır (3).

WHO santral sinir sistemi tümörleri histolojik sınıflandırması:

1. Nöroepitelyal Tümörler

A. Astrositik Tümörler

- 1) Piloitik astrositom
 - a) Pilomixoid astrositom
- 2) Subependimal dev hücreli astrositom
- 3) Pleomorfik ksantostrositom
- 4) Diffüz astrositom
 - a) Fibriller astrositom
 - b) Protoplazmik astrositom
 - c) Gemistositik astrositom
- 5) Anaplastik astrositom
- 6) Glioblastom
 - a) Giant cell glioblastom
 - b) Gliosarkom
- 7) Gliomatosis cerebri

B. Oligodendroglial tümörler

- 1) Oligodendrogliom
- 2) Anaplastik oligodendrogliom

C. Oligoastroitik tümörler

- 1) Oligoastroitom
- 2) Anaplastik oligoastroitom

D. Ependimal tümörler

- 1) Subependimom
 - Mixopapiller ependimom
- 2) Ependimom
 - a) Sellüler
 - b) Papiller
 - c) Clear cell
 - d) Tanisitik
- 3) Anaplastik ependimom

E. Koroid plexus tümörleri

- 1) Koroid plexus papillomu
- 2) Atipik koroid plexus papillomu
- 3) Koroid plexus karsinomu

F. Diğer nöroepitelial tümörler

- 1) Astroblastom
- 2) 3. Ventrikül kordoid gliomu
- 3) Angiosentrik gliom

G. Nöronal and mixed nöronal-gliyal tümörler

- 1) Serebellum displastik gangliositomu (Lhermitte-Duclos)
- 2) Desmoplastik infantil astrositom/gangliogliom
- 3) Disembriyoplastik nöroepitelial tümör
- 4) Gangliositom
- 5) Gangliogliom
- 6) Anaplastik gangliogliom
- 7) Papiller glionöronal tümör
- 8) 4. Ventrikül rozet şekilli glionöronal tümörü
- 9) Santral nörositom
- 10) Ekstraventriküler nörositom
- 11) Serebellar liponörositom
- 12) Filum terminale paragangliomu

2. Pineal Bölge Tümörleri

- A. Pineositom**
- B. Orta derecede differansiye pineal parankimal tümör**
- C. Pineoblastom**
- D. Pineal bölge papiller tümörü**

3. Embriyonal tümörler**A. Medulloblastom**

- 1) Desmoplastik/nodüler medulloblastom
- 2) Dev nodüllü medulloblastom
- 3) Anaplastik medulloblastom
- 4) Large cell medulloblastom

B. SSS primitif nöroektodermal tümörleri (PNETs)

- 1) SSS nöroblastom
- 2) SSS ganglionöroblastom
- 3) Medulloepitelyom
- 4) Ependimoblastom

C. Atipik teratoid / rhabdoid tümörler**4. Kranial ve Paraspinal Sinir Tümörleri****A. Schwannom (Nörilemoma, nörinoma)**

- 1) Sellüler Schwannom
- 2) Plexiform Schwannom
- 3) Melanotik Schwannom

B. Nörofibrom

- 1) Plexiform nörofibrom

C. Perinörioma

- 1) Intranöral perinörioma
- 2) Yumuşak doku perinörioma

D. Malign periferik sinir kılıfı tümörü (MPNST)

- 1) Epitelioid MPNST
- 2) Farklı mezenkimal ve/veya epitelyal differansiasyon gösteren MPNST
- 3) Melanotik MPNST
- 4) Glandüler differansiasyon gösteren MPNST

5. Meninks Tümörleri

A. Meningotelyal hücre tümörleri

- 1) Meningiom

B. Mesenkimal tümörler

- 1) Lipom
- 2) Angiolipom
- 3) Hibernom
- 4) Liposarkom (intrakranial)
- 5) Soliter fibröz tümör
- 6) Fibrosarkom
- 7) Malign fibröz histiositom
- 8) Leiomyom
- 9) Leiomyosarkom
- 10) Rhabdomyom
- 11) Rhabdomyosarkom
- 12) Kondrom
- 13) Kondrosarkom
- 14) Osteom
- 15) Osteosarkom
- 16) Osteokondrom
- 17) Hemanjiom
- 18) Epitelyoid hemanjiendoetelyom
- 19) Hemanjioperisitom
- 20) Anjiosarkom
- 21) Kaposi sarkomu

C. Primer melanositik lezyonlar

- 1) Diffüz melanositoz
- 2) Melanositom
- 3) Malign melanom
- 4) Meningeal melanomatosis

D. Meninkslerle ilişkili diğer tümörler

- 1) Hemanjioblastom

6. Lenfomalar ve Hematopoietik Neoplazmlar

A. Malign lenfomalar

B. Plasmasitom

C. Granüositik sarkom

7. Germ Hücreli Tümörler

A. Germinom

B. Embriyonal karsinom

C. Yolk sac tümör

D. Koryokarsinom

E. Teratom

- 1) Matür
- 2) İmmatür
- 3) Malign tranformasyon gösteren teratom

F. Mixed germ hücreli tümörler

8. Sellar bölge tümörleri

A. Kraniofarinjiom

- 1) Adamantinomatöz
- 2) Papiller

B. Granüler hücre tümörü

C. Pituisitom

D. Adenohipofiz içsi hücreli onkositomu

9. Metastatik Tümörler

Astrositomlar tüm glial tümörlerin %80-85'ini oluştururlar (4,5). Grade arttıkça gerek atipi, damarlanma, mitoz özellikleri ile karakterize büyüme potansiyeli, gerekse prognoz bakımından giderek kötüleşme söz konusudur. Grade 1 astrositomlar iyi farklılaşmış gliomlardır. Grade 2 astrositomlar diffüz astrositomlar olarak da adlandırılırlar. Anaplastik astrositomlar grade 3 düzeyindeki, GBM grade 4 düzeyindeki astrositik tümörlerdir.

2.1.1. İnsidans, Yaş ve Cins Dağılımı

GBM en sık görülen ve en malign primer beyin tümörüdür (5-7). GBM yaklaşık 100.000'de 4-5 kişide görülür (8). Tüm intrakranial tümörlerin %12-15'ini ve tüm astrositik tümörlerin %50-60'ını GBM oluşturur (6,9,10). Her yaşta görülebilir, ancak olgular en sık 45-70 yaş arasındadır. Çocukluk yaşlarında görülmeleri nadirdir. Erkek/kadın oranı 1.5/1 civarındadır (10-12). Son zamanlarda özellikle 65 yaşından sonra GBM insidansının arttığına yönelik yaygın bir görüş mevcuttur. Bunun en önemli nedeni olarak görüntüleme yöntemlerinin gelişmesi düşünülmektedir (12).

GBM primer olarak gelişebilmekle birlikte, daha düşük evre glial tümörlerden de progresyon ile gelişebilmektedir. Bu iki tip GBM, primer ve sekonder olarak anılmaktadır. Primer GBM daha yaşlılarda ve daha kısa klinik tablo ve şikayetlerle karşımıza çıkan ilk histopatolojik incelemede GBM tanısı konan tümörlerdir, hızlı geliştikleri için genellikle ilk 3 ay içinde klinik belirti verirler. Sekonder GBM, daha gençlerde ve genellikle aylar veya yıllar süren klinik şikayetlerle seyreden tümörlerdir. Primer GBM tüm GBM'lerin %80-91'ini, sekonder GBM ise %9-20'sini oluşturmaktadır (6,13,14).

2.1.2. Genetik

GBM genellikle herhangi bir ailevi yatkınlık ya da tanımlanabilir bir çevresel etken olmaksızın sporadik olarak ortaya çıkarlar, çok küçük bir bölümü Li-Fraumeni veya Neurofibromatozis gibi genetik hastalıklar veya non-spesifik familial agregasyonlarla ilişkilendirilmiştir (15).

GBM'de moleküler bozukluk iki büyük kategoriye ayrılabilir: birincisi proto-onkojenlerin fazla ekspresyonu, ikincisi tümör supresör genlerin inhibisyonu. GBM'de en fazla görülen aktif onkojenler genellikle tirozin kinaz reseptörü (RTK) üzerinden ras veya AKT yollarının aktivasyonu ile ilişkilidirler. Bunlar arasında Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), Trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF), Trombosit kökenli büyüme faktörü reseptörü (PDGFR) ve ras sayılabilir. GBM'lerde kaybedilen çoğu tümör supresör geni hücre siklusu regülasyonunda rol almaktadır. Bunlara örnek olarak, p16, p14, p53, Rb, cyclin D, cyclin E, cyclin-depended kinase (CDK) 4/6 verilebilir. Bazı tümör supresör genler normalde RTK-Akt yolunu inhibe ederler, dolayısıyla bu genlerin inaktivasyonu RTK-AKT yolağında aktivasyona neden olur.

Yapısal ve sayısal kromozom bozuklukları astrositik tümörler içinde en sık GBM'de görülür. Yapısal kromozom bozuklukları; kromozomdaki translokasyonlar, kırılmalar ve delesyonlardır. GBM'de en sık karşılaşılan kromozomal kayıplar 9p, 10p, 10q, 13q, 17p ve 19q'da olmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ortaya atılan hipotezlere göre düşük grade astrositomlardan GBM'ye ilerleyiş kromozom 10 ve 17'de yerleşim gösteren supresör genlerin kademeli kayıplarından ileri gelmektedir. Bu kayıplar tümör büyümesini ve heterojenitesini artıran dominant onkojenlerin aktivasyonuna da yol açmaktadır. Ayrıca primer ve sekonder GBM'de genetik profiller de farklılık göstermektedir. Primer GBM'de phosphatase and tensin homolog (PTEN) mutasyon veya delesyonları saptanırken sekonder GBM'de ise sıklıkla p53 mutasyonları gözlenmektedir. Tüm bu bulgular glial tümörlerde bir genetik köken olduğunu göstermektedir (6,16,17).

2.1.3. Yerleşim

GBM en sık serebral hemisferi ve özellikle de subkortikal beyaz cevheri tutar (18). En sık olarak frontal, temporal ve parietal lob sınırlarında yerleşir. Genellikle dağınık yerleşim gösterme özellikleri ve derin yerleşimleri nedeniyle birden fazla fonksiyonel beyin bölgesini işgal eder ve bu da cerrahilerini zorlaştıran ana etkenlerdendir (19,20). Serebral hemisferler dışında da yerleşim

gösterebilirler. Beyin sapı glial tümörlerinin hemen hemen yarısı yüksek malignite özellikleri gösterirler. Ayrıca GBM'nin yaklaşık %10'u derin yerleşimli olmayıp, beyaz-gri cevher sınırında yerleşerek serebral metastazları taklit edebilirler (21,22). GBM'ler nadir olarak sistemik metastaz yapmalarına rağmen ölüm, lokal tümör büyümesinden ve beyin invazyonundan olmaktadır. Tümörün yakın ve uzağındaki bölgelerin astrositom infiltrasyonuna uğraması tedavi başarısızlığı ve tümör rekürrensının ana nedenidir. Rekürrenslerin %90'ı orijinal tümör yatağında olmaktadır, ancak %5'i tümör yatağından uzakta multipl lezyon olarak gelişmektedir (23,24).

2.1.4. Histopatoloji

Mikroskopik olarak GBM nükleer polimorfizm, mitotik aktivite, endotelial hiperplazi ve nekroz bulguları gösterir. Çoğu klasifikasyon şemasında bunlardan üçünün olması GBM tanısı için yeterlidir. Vasküler proliferasyon ve multiple nekroz alanları tipik olup diğer astrositomlarda genellikle görülmez (25). Nekroz, glial hücrelerin koagülasyon nekrozu ve nekrotik hücre artıklarından oluşur (6,26). GBM'de primer yayılım beyaz cevher traktlarının oluşturduğu yollar aracılığıyla ile olmaktadır (27). Gri cevher tutulumu daha az belirgindir.

2.1.5. Semptom ve Bulgular

Klinik bulgular, yer kaplayıcı kitleye özgü fokal nörolojik bulgular, konvülsiyonlar ya da nonfokal ensefalopati gibi belirtilerle ortaya çıkarlar. Fokal nörolojik defektler, nöronların sıkışması, ödem ve lokal perfüzyon değişikliklerinden kaynaklanır. Konvülsiyonlar, fokal ya da yaygın olabilir, vakaların yaklaşık üçte birinde bulunur. Nonfokal nörolojik değişiklikler genellikle kafa içi basıncı artışı ya da beyinin geniş bölgelerinin tutulmuş olduğuna işaret eder. Belirtilerden bazıları bulantı ve kusma, kişilik değişiklikleri, kognitif işlev bozukluğu, görsel bozukluklar, motor işlev bozukluğu, depresyon ya da baş ağrılarıdır. Genellikle bulgu ve belirtiler sabahları daha belirgindir ve gün içinde hafifler (28).

2.1.6. Tanı

GBM değişken radyografik görünümüne sahiptir. Bilgisayarlı tomografide (BT) hipodens veya izodens görülürler. Kontrast tutulumu değişkendir. Santralde nekroz alanını gösteren hipodens bir alan ve etrafında tümör bölgesini gösteren kalın kontrast tutan hiperdens alan gözlenir. Etrafında geniş bir ödem alanı ile çevrilidir. Kural olmamakla birlikte kontrastlanma tümörün agresifliği ile doğru orantılıdır. Manyetik rezonans incelemede (MRI) ise T1 ağırlıklı kesitlerde karakteristik olarak düşük sinyal intensitesi, T2 ağırlıklı kesitlerde ise yüksek sinyal intensitesi gözlenir. Kalsifikasyon, eğer düşük grade bir astrositer tümörden gelişmemişse beklenmedik bir bulgudur. Tümör dokusu derin beyaz cevherdedir. Beyaz cevher yolaklarını kullanarak infiltrasyon yapmaya ve sıklıkla korpus kalozumu kullanarak karşı hemisfere yayılım göstermeye yatkınlık gösterir (kelebek tipi gliom). Uniform veya halkasal tarzda kontrast tutulumu saptanır. GBM'in %10 kadarında kontrast tutulumu gözlenmeyebilir. Erişkin bir insanda, hemisferik beyaz cevherde tek bir halkasal kontrast tutan lezyon aksi ispatlanıncaya kadar malign astrositer bir tümör olarak ele alınmalıdır (29,30). GBM'de genellikle tümörün kendi çapı kadar da ödem bulunur. GBM'de hemoraji gözlenebilir. Cerrahi sonrası gelişen rekürrenslerde kontrast tutan lezyonun radyasyon nekrozundan ayrılması sorunu sık karşılaşılan bir sorundur. MRI ve BT bu ayırımda yetersiz kalabilir. Bu durumda MR spektroskopisi kullanılabilir.

2.1.7. Prognostik Faktörler

Yaş, sağkalımı bağımsız olarak etkiler. Genç hastalarda medyan sağkalım oranları daha uzundur. Laboratuvar araştırmaları genç hastalardaki tümörlerde radyasyon ya da kemoterapi sonucunda hücresel sitotoksitenin artmış olduğunu göstermiştir; bu da yaşın ilerlemesiyle tümörlerin tedaviye daha fazla direnç kazandığını düşündürür. Performans statüsü iyi olan hastalarda da sağkalım, performans statüsünün düşük olduğu hastalardakine kıyasla daha uzundur. Bunlarla birlikte tümör lokalizasyonu, tümör çapı, semptom süresi, semptom tipi, cerrahinin genişliği, postoperatif tümör volümü, adjuvan radyoterapi ve/veya kemoterapi eklenmesi diğer önemli prognostik faktörlerdir.

Bu klinik faktörlere ek olarak bazı moleküler ve sitogenetik faktörler de prognozu etkileyebilir. Normal p53 değerleri ile birlikte EGFR'nin artmış ekspresyonu uzamış yaşam süresi ile ilişkilendirilmiştir. Tanı, cerrahi, radyoterapi ve kemoterapideki gelişmelere rağmen GBM'deki yaşam süreleri yaklaşık 1 yıldır ve rekürren vakalarda bu süre yaklaşık 4 aydır (31,32).

2.1.8. Tedavi

2.1.8.1. Genel Tedavi Yaklaşımları

Hastalar, başları 45 derecede olacak şekilde yatırılmalıdır. Amaç, yer çekiminden faydalanılarak tümöre bağlı beyin ödeminin çözülmesine yardımcı olmaktır. Glukokortikoid, preoperatif dönemde uygulandığında belirgin klinik iyileşme görülmektedir (33). Günümüzde yaygın olarak deksametazon kullanılmaktadır. Deksametazon yetişkinde günde 16 mg dozunda 4 doza bölünmüş halde başlanır ve 3 günde bir 2 veya 4 mg azaltılır. Steroid tedavisinin beyin ödemi çözmesi ve klinik iyileşmeye yardımcı olması; değişmiş vasküler geçirgenliği azaltması, serebrospinal sıvı üretimini ve serbest radikal üretimini baskılaması yanında antineoplastik etki göstermesine bağlanmaktadır (34). Epileptik nöbet riskini azaltmak amacı ile fenitoin 300 mg/gün profilaktik olarak verilmektedir.

GBM invaziv bir tümör olduğundan tümör kitlesinden yakın ve uzak beyin bölgelerinde neoplastik hücreler saptanmıştır. Bu nedenle tedavide iki yol izlenmektedir: fokal ve diffüz tedavi. Fokal tedavi direkt olarak tümör kitlesine yönlendirilmiş tedavidir ve cerrahi, radyoterapi ve radyocerrahi tedavilerini kapsar. Diffüz tedavi kemoterapi ile yapılmaktadır.

2.1.8.2. Cerrahi Tedavi

Cerrahi tedavi halen ilk tedavi yaklaşımlarından biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Cerrahi tedavinin amacı, kitle etkisini ve mümkün olduğunca kitledeki hücre sayısını azaltmak ve tanı koymaktır. Mortalite oranı %3 dolayında ve belirgin morbidite oranı %10'un altındadır (35). Kitlenin gross olarak total rezeksiyonu yapılan hastalar, subtotal rezeksiyon ve biyopsi

yapılanlarla karşılaştırıldığında daha uzun sağkalım göstermişlerdir ve rekürrenslerin gelişimine kadar geçen süre daha uzun bulunmuştur (23,31,32).

2.1.8.3. Radyoterapi

GBM'de radyoterapi; lokalizasyon nedeni ile veya operasyon riski gibi tümörün opere edilemediği vakalarda primer tedavi yöntemi olarak veya tümörün subtotal/total rezeksiyon edildiği olgularda adjuvant tedavi olarak uygulanmaktadır (36).

GBM'de radyoterapi uygulanması sağkalım üzerinde olumlu etkisi ile bağımsız prognostik faktörlerden biridir (23,37). Yapılan bir çalışmada 340 opere olan GBM hastası takip edilmiş, hastaların %73'ünde cerrahiye takiben radyoterapi uygulanmıştır. Cerrahi ve takiben radyoterapi uygulanan hastalar ortalama 16 ay sağkalım gösterirken yalnız cerrahi yapılan hastalar ortalama 13,5 ay sağ kalım göstermişlerdir. Radyoterapi düşük doz (45 Gy) veya yüksek doz (>70 Gy) şeklinde uygulanabilir, ancak yüksek doz radyoterapinin sağkalım veya tümör rekürrensi kontrolünde daha fazla bir yararı bulunmamıştır (38). GBM radyoterapisinde bugünkü yaklaşım, günde tek fraksiyon ile 6 haftada toplam 60 Gy'lik dozu radyolojik görüntüleme kontrast tutan volüme eklenen 2-3 cm'lik bir alandan tümör yatağına verilmesi şeklindedir (39). Beynin normal doku toleransı ve yüksek dozlarda görülen nekroz, radyoterapiyi sınırlayan en önemli faktördür. Günlük doz, toplam tümör dozu veya ışınlanan hacim arttıkça risk artmaktadır.

2.1.8.4. Kemoterapi

Kemoterapi, oral veya intravenöz verilen tedavi şeklidir. Günümüze kadar, carmustine, procarbazine, vincristine ayrı ayrı veya bunların birleşimi halinde radyoterapi öncesinde veya sonrasında veya radyoterapi sırasında verilmiştir. Ancak yeterli başarı elde edilememiştir. Carmustine, bir maddeye emdirilmiş durumda tümör lojuna yerleştirilerek veya intraarteriyel verilerek fokal olarak kullanılmış ancak intraarteriyel verilimi toksik bulunmuştur. Carmustine, procarbazine ve vincristine ile toksik etkiler sık gözlenmiştir.

Temozolomid (TMZ) oral olarak kullanılan, GBM'de etkisi gösterilmiş ikinci jenerasyon alkilleyici bir ajandır (40). TMZ oral alım sonrası hızla emilir ve biyoyararlanımı %100'e yakındır (41). İlacın plazma konsantrasyonunun %40'ı serebrospinal sıvıya geçerek santral sinir sisteminde etkili konsantrasyonlara ulaşır (42). TMZ, DNA'nın en kritik bölgesi olan guanin'in O6 pozisyonunun metilasyonuna sebep olur (43,44). Bir DNA onarım enzimi olan O6-metil-guanin DNA metiltransferaz (MGMT) isimli enzimin tümörün tedavi direnci ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir (45). Çünkü bu enzim, alkilleyici ajanların hedeflerinden biri olan guanin'in O6 pozisyonundan alkil gruplarını uzaklaştırarak alkilleyici ilaçların etkisini azaltabilmektedir (42,46). TMZ sürekli bir şekilde uygulanırsa bu enzimin azalmasına yol açar (47). Radyoterapi ile TMZ'in kombine edilmesi sinerjistik etki ile TMZ doz yoğunluğunda iki kata varan artış ve MGMT'yi daha etkili bir şekilde tüketme ile sonuçlanır (48). TMZ'in GBM hücrelerinde hücre siklusunda radyosensitif bir faz olan G2-M'de arreste neden olduğu gösterilmiştir (49).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda radyoterapi ile TMZ kombinasyonunun tek başına radyoterapiye göre daha üstün olduğu gösterilmiştir ve radyoterapi ile TMZ kombinasyonu GBM'li hastalarda standart tedavi haline gelmiştir (50). TMZ radyoterapi ile eş zamanlı 75mg/m² her gün, sonrasında 200mg/m² 4 haftada bir 5 gün süreyle verilir.

Hafif ile orta derecede kemik iliği baskılanması, TMZ'nin primer doz sınırlayıcı yan etkisidir (51). Yapılan bir çalışmada 151 hastaya, 24'ü azaltılmış dozda (150 mg/m²/gün) olmak üzere toplam 581 siklus TMZ (200 mg/m²/gün) uygulanmıştır. Trombositopeni, lökopeni, ve anemi, hastaların sırasıyla % 9, % 2, ve % 8'inde ortaya çıkmıştır (52). En sık görülen hematolojik olmayan yan etkiler hafif/orta şiddette bulantı ve kusmadır.

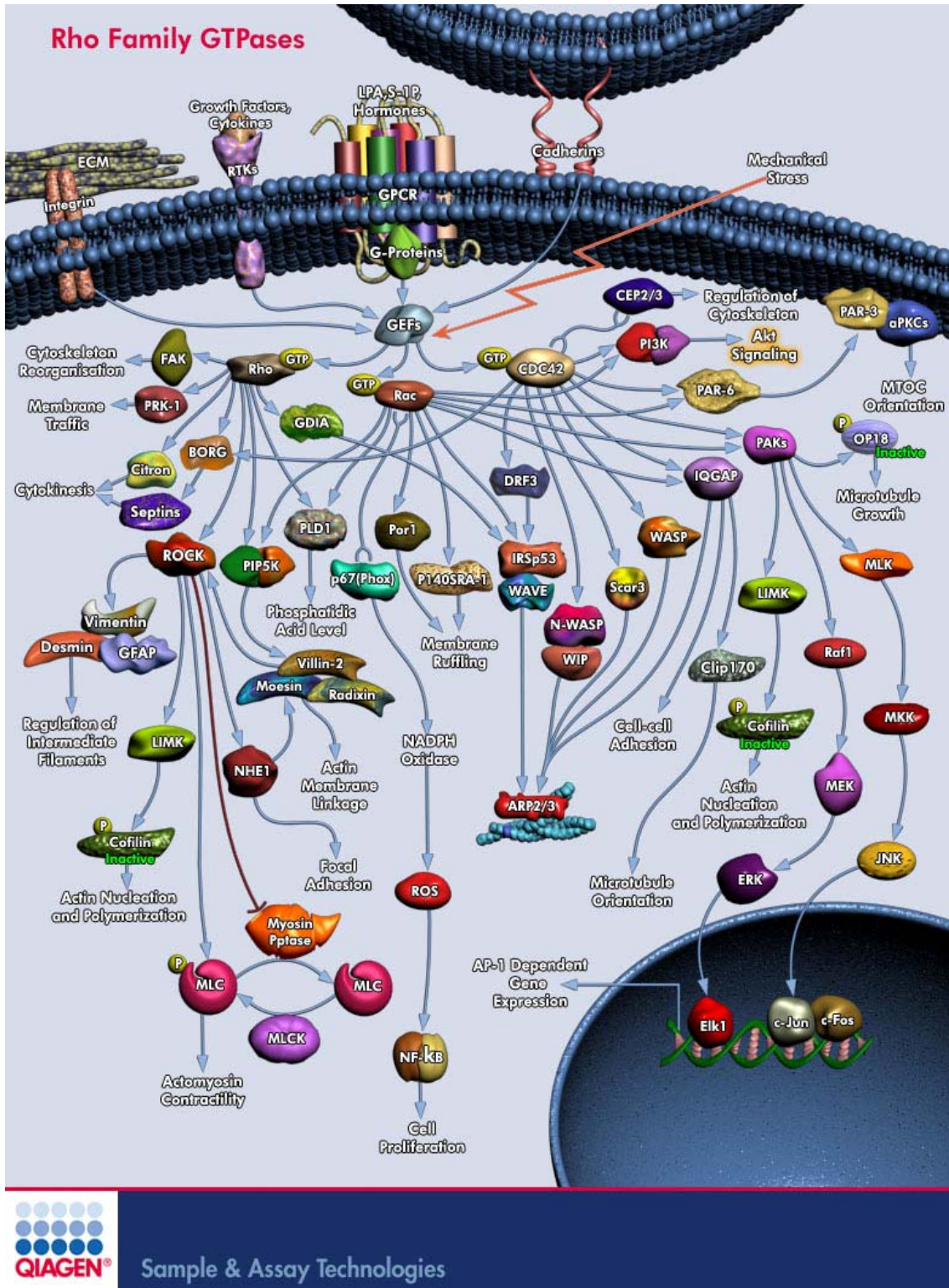
2.2. RHO-KİNAZ

2.2.1. Rho/Rho-Kinaz Yolağı

G proteini ile ilişkili reseptörleri aktive eden çeşitli agonistlere yanıt olarak Rho aktive olmaktadır. Rho, sitoplazmada bulunan guanozin difosfat/guanozin trifosfat (GDP/GTP) bağlayıcı bir proteindir, Ras ailesinin bir üyesidir ve guanozin trifosfataz (GTPaz) aktivitesi içerir (53,54), (Şekil 1).

Rho proteinleri GDP-bağlı iken inaktif haldedirler. Rho aktivitesini kontrol eden başlıca üç protein bulunur:

1. GTPaz aktive edici proteinler (GAP): İntrinsik GTPaz aktivitesini artırarak Rho'yu inaktive ederler.
2. GTPaz disosiyasyon inhibitörleri (GDI): Rho GTPaz'ların nükleotid disosiyasyonunu ve membrana bağlanmasını önleyerek Rho aktivasyonunu inhibe eder.
3. Rho-spesifik guanin nükleotid değiş-tokuş faktörleri (GEF): GDP'nin disosiyasyonunu hızlandırarak Rho'yu aktive eder (55).



Şekil 1. RhoGTPaz'lar ve hücre içi etkileşimleri (54)

Rho, başlıca aktin hücre iskeletinin organizasyonunun düzenlenmesinde, hücre göçü, hücre adezyonu ve sitokinez gibi çok çeşitli hücreyel olayın kontrolünde rol oynar. Rho ailesinin üyelerinin, aktinin yeniden şekillenmesinde ve farklı yönlerinin düzenlenmesindeki rolü, ilk olarak fibroblast büyüme faktörü uyarısına yanıt çalışmaları ile açığa çıkarılmıştır (56). Büyüme faktörleri uyarımı sonucunda oluşan hücre iskeleti değişiklikleri arasında yüzey uzantılarının (filopodlar, lamellipodlar ve zar kıvrımları), fokal adezyonların ve stres liflerinin oluşumu yer alır.

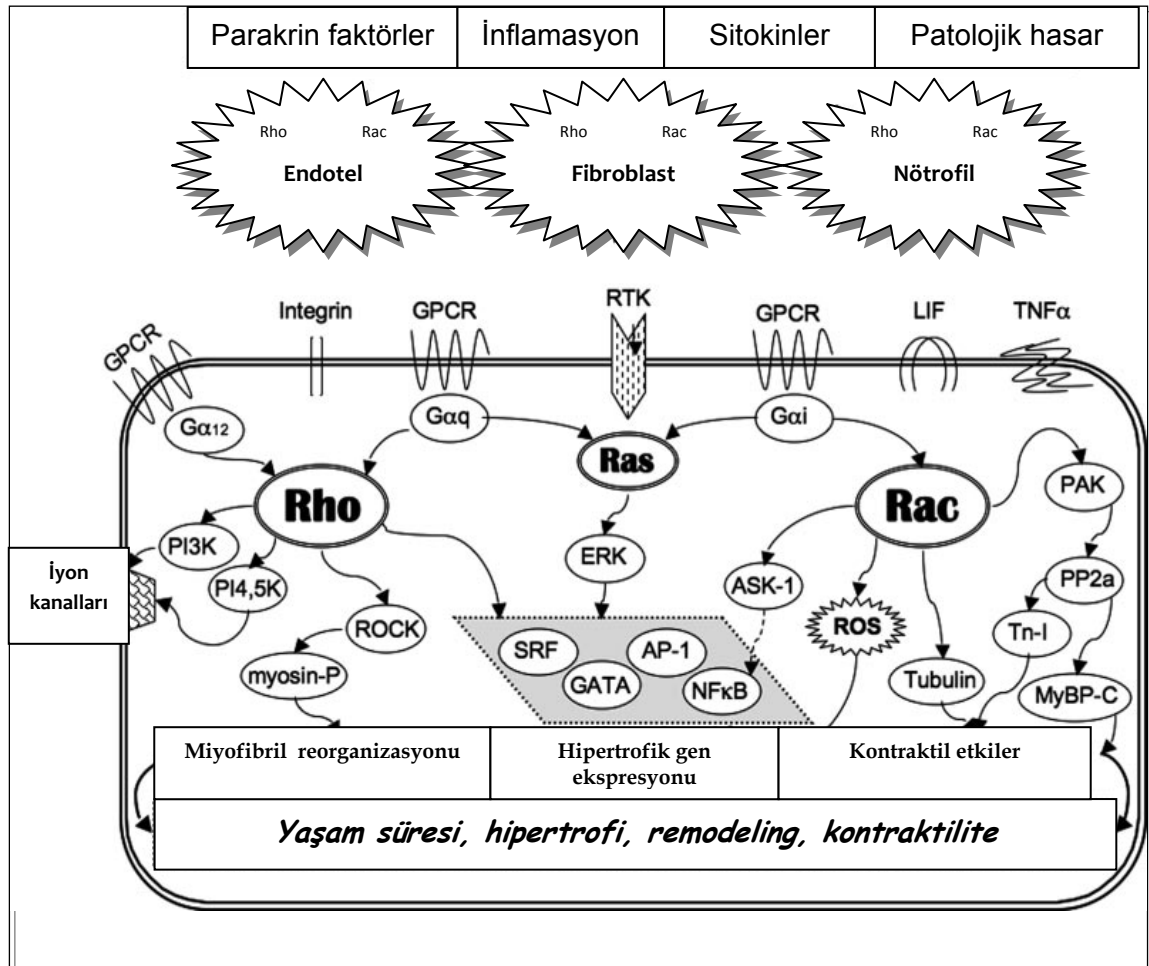
Çalışmalar, Rho ailesi üyelerinin fibroblastlarla sınırlı kalmadığını, bütün ökaryot hücre tiplerinde aktin hücre iskeletinin düzenlenmesinde benzer rol aldıklarını göstermiştir (56). Rho, sinir sistemi gelişimi sırasındaki akson uzama ve kısaltmalarını düzenler, düz kas hücrelerinin kasılmasının düzenlenmesine katılır, epitel hücrelerinde kaderinler ile aktin hücre iskeleti bağlantısını içeren adherens bağlantılarının oluşumunu düzenler. Bu yüzden Rho ailesi üyeleri, hücre dışı sinyaller ile hücre şekli, hareketi ve değişikliklerini ilişkilendiren aktin hücre iskeletinin genel düzenleyicileri olarak görev yaparlar (57). Rho proteinlerinin hücre iskeleti değişikliklerinin düzenlenmesindeki anahtar hedeflerden birisi, Rho-kinaz (ROCK) olarak adlandırılan enzimdir. Hücreye Rho'yu aktive eden uyarılar geldiğinde veya Rho'nun aşırı ekspresyonu olduğunda Rho-kinaz sitoplazmadan membrana göç eder (58). Rho proteini GTP ile bağlandıktan sonra aktif hale gelir ve Rho-kinaz üzerindeki Rho bağlayan bölgeye bağlanarak enzimi aktive eder.

Rho-kinaz bir serin/treonin protein kinazdır ve molekül ağırlığı yaklaşık 160 kDa'dur (53). Rho-kinaz enziminin ROCK1 ve ROCK2 olan iki izoformu vardır (59). Her iki enzim tüm hücrelerde eksprese edilir. ROCK2 mRNA özellikle kas ve beyin hücrelerinde daha fazla eksprese edilmektedir. Başlıca sitoplazmada çözünür halde dağılmıştır fakat RhoA aktivasyonu üzerinden kısmen periferel membranlara transloke olur. ROCK2'nin çekirdekte lokalize olduğu da gösterilmiştir (60). Bu proteinler sitoplazmada dağılmış halde bulunur ve özellikle gelişmekte olan hücrelerde membran içerisinde lokalize olurlar (61).

İnsan ROCK1 geni 18. kromozomda (18q11.1) ve ROCK2 geni ise 2. kromozomda (2p24) yerleşiktir.

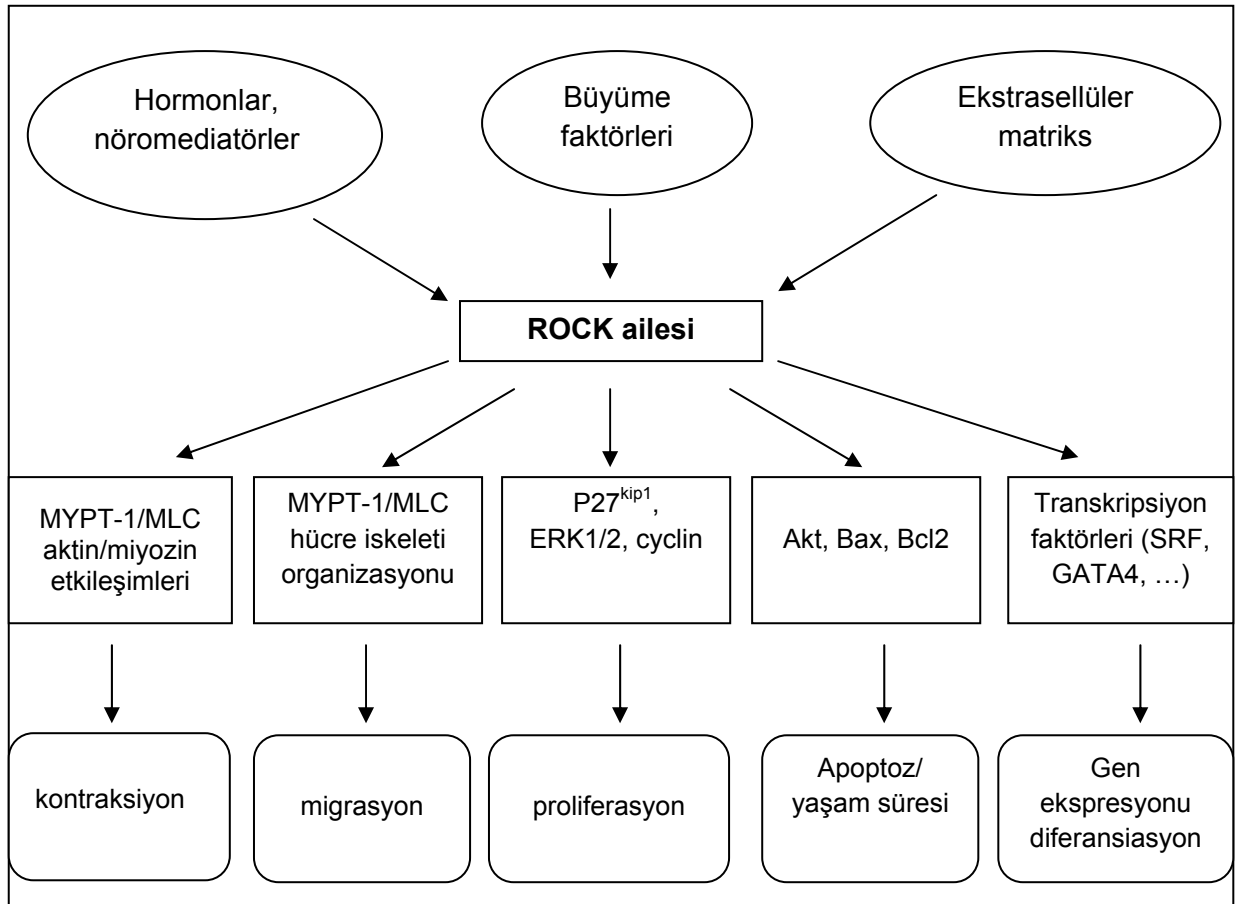
Rho ile etkileşen ve aktive olan Rho-kinaz, düz kas kasılması, hücre büyümesi, adezyonu, migrasyonu, motilitesi, gen ekspresyonu ve apoptozu da içeren farklı hücresel fonksiyonlara aracılık eder (62), (Şekil 2).

Rho-kinaz, addusin, ezrin-radiksin-moesin (ERM) proteinlerini, LIM kinaz, miyozin hafif zincir fostataz (MLCP) ve Na/H değiştirici (NHE) 1'in serin-treonin fosforilasyonu ile hücre kontraksiyonunu düzenler (63). Apoptozis sırasında kaspaz-3 enzimi ROCK1'i aktive edebilir (64).



Şekil 2. ROCK'un düz kas kasılması, hücre büyümesi, gen ekspresyonuna etkileri (62)

Rho-kinaz yolağında başlıca, RhoA, RhoB, RhoC, RhoD, RhoE, GTPaz aktive edici proteinler (GAP, RASA1), GTPaz disosiasyon inhibitörleri (GDI, ARHGDI, ARHGDIB, ARHGDIG), ROCK1, ROCK2, Miyozin fosfataz (MLCP, MPRIP), Extracellular signal-regulated protein kinaz 1 (ERK1, MAPK3), Extracellular signal-regulated protein kinaz 2 (ERK2, MAPK1), Akt-1, Akt-2, Akt-3, Bax, Bcl2, Serum response factor (SRF), GATA4, Plasminojen aktivatör inhibitörü 1 (PAI-1, SERPINE1), LIM kinaz 1 (LIMK1), LIM kinaz 2 (LIMK2), cofilin 1 ve 2 (CFL 1 ve 2) genleri rol oynar (65), (Şekil 3).



Şekil 3. Rho-kinaz'ların aktivasyonu ile gelişen hücresel olaylar (65)

Rho-kinaz aktivasyonu, miyozin II hafif zincirinin aktivasyonunu iki mekanizma ile artırır: Rho-kinaz miyozin hafif zincirini direkt olarak fosforile etmekle kalmaz, aynı zamanda miyozin hafif zincir fosfatazlarını da fosforilleyerek inhibe eder. Sonuçta miyozin hafif zincir fosforilasyonundaki artış, miyozini aktive eder ve aktin miyozin flamanlarının etkileşmesine yol açar (66). Bu da stres liflerinin, fokal adezyonların, adherens bağlantılarının ve sitokinezin oluşumu gibi hücre iskeleti değişiklikleri ile sonuçlanır.

ERK 1 ve 2 hücre büyümesi, farklılaşması ve motilitesini regüle eder ve Rho-kinaz'ın düz kas hücrelerinde ERK 1 ve 2'nin nükleer translokasyonunu indüklediği tespit edilmiştir.

Akt hücre büyümesi, proliferasyonu, metabolizması ve apoptozunda görevli birçok proteini fosforile eder. Migrasyon potansiyeli fazla olan GBM hücrelerinde Akt düzeylerinde artış saptanmıştır.

Bcl-2 ailesi anti-apoptotik (Bcl-w, Bcl-xL, MCL-1) ve proapoptotik (BAK, BAD, BAX) proteinler içerir ve tümör derecesi ile antiapoptotik Bcl-2 proteinleri ekspresyonu arasında korelasyon mevcuttur.

Serum response factor (SRF) aktin, miyozin ve nöronal genler gibi bir takım genlerle ilişkili olan serum response element (SRE) bağlanan bir transkripsiyon faktörüdür ve bu genlerin ekspresyonunun kontrolü ile SRF hücre büyümesi ve farklılaşması, nöronal iletimi kontrol eder.

GATA-4, RhoA sinyal yolağında görevli nükleer bir mediatördür ve GATA-4'ün kardiomyositlerde ve sarkomer oluşumunda görevli bir transkripsiyon faktörü olduğu tespit edilmiştir.

2.2.2. Rho-kinaz inhibitörleri

Rho-kinaz inhibitörleri arasında fasudil, hidroksifasudil, Y-27632, H-1152P, Wf-536 gibi maddeler bulunur. Hidroksifasudil, Rho-kinazın selektif bir inhibitörü olup, fasudilin aktif bir metabolitidir (67). Fasudil, subaraknoid hemoraji sonrasında serebral vazospazmı tedavi etmek amacıyla onaylanmıştır ve ilaç olarak kullanılmaktadır. Y-39983 (SNJ-1656) glokomun tedavisinde

oftalmik kullanım için geliştirilmiştir. Rho-kinaz inhibitörleri ROCK1 ve ROCK2 enzimini nonselektif olarak inhibe ederler, fakat XD-4000 gibi ROCK2 selektif inhibitörleri de geliştirilme aşamasındadır (61). Nonselektif Rho-kinaz inhibitörleri yüksek konsantrasyonlarda protein kinaz A ve protein kinaz C gibi diğer kinazları da inhibe edebilirler (63).

Rho/Rho-kinaz yolağının kardiyovasküler sistem fizyolojisi ve patofizyolojisinde yeri olduğunu gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (68). Vazospastik anjina, iskemik inme ve kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıklarda Rho-kinazın önemli rol oynadığı gösterilmiştir (63). Rho-kinaz, miyozin fosfataz inaktivasyonu ve direkt miyozin hafif zincir fosforilasyonu ile kalsiyumdan bağımsız olarak düz kas kasılmasını artırır (53,69).

Rho-kinaz, vasküler düz kas hücrelerinin adhezyonu, migrasyonu ve proliferasyonunda önemli rol oynar (53,68). Aterosklerozun patogenezinde de yer aldığı gösterilmiştir (70). Rho-kinazın kardiyovasküler yeniden yapılanma (remodeling) patogenezinde rolü olduğu ortaya konmuştur (68). Rho-kinaz aynı zamanda endotelial NO Sentaz'ın (eNOS) down regülasyonunda rol oynar (71). Rho-kinaz inhibisyonu; vazodilatasyona, spazmolitik etkilere, penis ereksiyonuna, nörotransmitter salınımının inhibisyonuna sebep olur (72,73). Rho-kinaz inhibisyonu vasküler ve solunum düz kas hücre migrasyonunu da bloke etmektedir (74).

Rho-kinaz proteini, arterlerde sentezlenir ve agonist kaynaklı düz kas kontraksiyonunu düzenler ve Rho-kinaz inhibitörünün vazodilatör etkisi endotel tabakasından bağımsızdır. Bu nedenle Rho/Rho-kinaz sinyali vasküler direncin kontrolünde rol oynayabilir ve Rho-kinaz inhibitörleri, hipertansiyon, vazospazm ve ateroskleroz gibi bazı kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde etkili olabilir. Rho-kinaz makrofaj fagositik aktivitesini ve endotel hücre permeabilitesini de düzenler (63).

RhoA/ROCK yolağı eNOS aktivitesinin düzenlenmesinde de önemlidir. Rho-kinaz direkt olarak eNOS'u Thr495'den fosforile eder ve endotelde NO oluşumunu baskılar (75). RhoA'nın veya Rho-kinazın inhibisyonu eNOS'un

Ser1177'den fosforilasyonu sonucu aktivasyonuna ve PI3K/Akt'nin hızlı aktivasyonuna yol açar (75).

RhoA/Rho-kinaz yolağının inhibisyonu kardiyovasküler hastalıklarda yararlı olduğu ve potansiyel terapötik hedef olabileceğine ilişkin kanıtlar artmaktadır. RhoA/Rho-kinaz yolağının anjiogenez, ateroskleroz, serebral ve koroner vazospazm, serebral iskemi, erektil disfonksiyon, glomeruloskleroz, hipertansiyon, miyokardiyal hipertrofi, miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarı, neointima oluşumu, pulmoner hipertansiyon, astım, glokom, osteoporoz, Alzheimer hastalığı, vasküler remodeling, diabetes mellitus ve kanserde katkısının olduğu gösterilmiştir (63).

2.2.3. Rho-kinaz ve Kanser

RhoA/Rho-kinaz yolağı, hücre adezyonu, migrasyonu, şekil değişimleri ve sitokinezde etkili olmaktadır (69). Bu etkileri ile kanser hücrelerinin invazyon ve metastatik aktivitelerini düzenlemektedir. Rho-kinaz inhibitörleri ile bu hücre fonksiyonların azaltıldığı ve kanser hücrelerinde metastazın baskılandığı gösterilmiştir (76).

Onkogenik değişim, hücre çoğalmasındaki kontrolün kaybı ve hücrenin morfolojik değişiklikleri ile karakterizedir. Hücre morfolojik değişiklikleri aktin stres lifleri vasıtası ile sağlanmaktadır. Hücrelerin onkolojik değişikliğe uğramasında Rho proteinleri ve dolayısı ile Rho-kinazın aktivasyonu önemli rol oynamaktadır (77). Metastatik özofajial kanser hücre kültüründe invazyon ve mobilitenin Rho-kinaz aracılı arttığı ve Y-27632 ile inhibe edildiği gösterilmiştir (78). Sıçanlarda karaciğer transplantasyonu sonrasında hepatosellüler karsinom modelinde, Y-27632 kanser hücre migrasyonunu baskılamış ve yaşam süresini uzatmıştır (79). Testiküler tümörlerde de RhoA ve Rho-kinaz mRNA ekspresyonu artmaktadır (80). B16 melanoma hücrelerinde Rho-kinaz inhibitörü invazyonu baskılamış ve farelerde yapılan in vivo denemelerde akciğer metastazını inhibe ettiği gösterilmiştir (81). Farelere oral uygulanan Rho-kinaz inhibitörü tümör hücrelerinin akciğere metastazını ve tümör hücresi tarafından indüklenen anjiogenetik yanıtı inhibe etmiştir (82). Rho-kinaz

inhibitörü tümör hücresi invazyon ve migrasyonunu anlamlı olarak inhibe etmiştir (82). İnsan over kanser hücrelerinde ROCK1 migrasyon ve invazyonunu artırırken antisens oligodeoksinükleotid uygulaması ile bu hücrelerin motilitesi ve invaziv özelliği inhibe olmuştur (83).

Trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF) uygulanan kültür hücrelerinde ROCK1'in aşırı ekspresyonuna ve kanser hücresi motilitesinin artmasına neden olduğu bulunmuştur (84). Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ile indüklenen endotel hücre migrasyon ve anjiogenezde Rho/Rho-kinaz yolağının aktive olduğu gösterilmiştir (85). Ayrıca, hipoksi ile indüklenen anjiogeneze Rho-kinaz aracılık eder ve Rho-kinaz inhibisyonu anjiogenezi inhibe eder (86). Kolon kanseri hücrelerinde hipoksi ile VEGF indüksiyonunun fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/Rho/ROCK ve c-Myc aracılıklı olduğu gösterilmiştir (87).

2.2.4. Glioblastoma Multiforme ve Rho-kinaz

GBM'de tümörün yakın ve uzağındaki bölgelerin astrositom infiltrasyonuna uğraması tedavi başarısızlığı ve tümör rekürrensini ana nedenidir. İnvazyon; hücreler arası, hücre ile ekstrasellüler matriks arası adezyonu, ekstrasellüler matriks enzimlerini, hücre migrasyonunu gerektirir (88). Astrositom migrasyonunun intrasellüler mekanizmaları yeterince anlaşılamamıştır; ancak aktin mikrofilamentleri, mikrotübüller, ara filamentler arasındaki etkileşimler, bunları düzenleyen çevresel faktörler ve intrasellüler sinyallerin etkisi vardır (88). Hücre hareketi esas olarak aktin iskeletinin düzenlenmesi ile sağlanır.

Rho aktivasyonu adezyon kompleksleri ve aktin stres liflerinin oluşumu ile sonuçlanır. Aktin organizasyonu cofilin olarak bilinen aktin bağlayan proteinlerle düzenlenir. Cofilin, LIMK substratıdır ve hücre göçü sırasında aktin polimerizasyonu ve depolimerizasyonunu düzenler. LIMK ailesi LIMK1 ve LIMK2 olmak üzere 2 üyeden oluşur ve başlıca Rho GTPaz'larla regüle edilir.

Yapılan çalışmalar Rho ekspresyonunun GBM'de arttığı, RhoA ekspresyonu fazla olan astrositik tümörlerin daha invaziv olduğu, RhoA

inhibisyonunun GBM migrasyonunu azalttığı gösterilmiştir (88,89). Rho-kinaz inhibisyonu hücrel kontraksiyon ve hücrel uzantılarda azalma ile sonuçlanmıştır (88,89). GBM hücrelerinin normal dokulara invazyonu ürokinaz-tipi plazminojen aktivatör (uPA), plazminojen aktivatör inhibitör 1 (PAI-1) gibi plazminojen aktivatör sistem proteinlerinin proteolitik ve nonproteolitik aktivitesine bağlı olarak gelişir. Radyoterapi verilen GBM hastalarında Rho-kinaz inhibisyonunun normal astrositlerde minimal morfolojik değişiklikler yaptığı, ancak tümör hücrelerinde anlamlı değişiklikler yaptığı saptanmıştır (90). Bir başka çalışmada Rho/ROCK inhibisyonunun GBM'de radyoterapi ve kemoterapiyle apoptoza karşı duyarlılaşmayı sağladığı görülmüştür (91). ROCK1 ekspresyonunun malignite derecesi ile doğru olarak arttığı, anaplastik astrositom ve GBM'de daha fazla eksprese olduğu, ROCK2 ekspresyonunun ise normal beyin dokusunda fazla eksprese olduğu ve invaziv tümörlerde baskılandığı saptanmıştır (92).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta grubu

Çalışmaya Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim Dalı'nda 2001-2010 yılları arasında opere olmuş ve Glioblastoma Multiforme tanısı almış 98 hasta dahil edildi. Çalışma sırasında halen hayatta olan 20 hastanın sağkalım süresi çalışmanın başlangıç tarihi esas alınarak hesaplandı.

Bu çalışma Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu 24.05.2010 tarih ve 15 sayılı kararı ile onay almıştır.

3.2. Klinik tanı ve veri toplanması için yapılan işlemler

Hastalar hazırlanmış standart bir protokole uygun olarak değerlendirildi. Değerlendirmeye alınan tüm hastaların Gaziantep Üniversitesi hasta dosyaları arşivinden dosya bilgileri incelendi, Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı raporları ve Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı kayıtları ile doğrulandı. Hastaların yaşları, cinsiyetleri, operasyon tarihleri, operasyon sonrasında almış oldukları tedaviler ve ölen hastaların ölüm tarihleri kaydedildi. Glioblastoma Multiforme tanısı ile raporlandırılan doku örneklerinden Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Laboratuvarı'nda Real-time PCR yöntemiyle, mRNA düzeyinde Rho-kinaz gen yolağı ekspresyonları değerlendirildi.

3.3. RNA izolasyonu

Parafine gömülü doku örneklerinden FFPE RNA izolasyon kiti kullanılarak RNA eldesi yapıldı. Elde edilen RNA UV spektrofotometre ile ölçülerek çalışmaya hazırlandı.

3.4. Real-Time PCR ile gen ekspresyonlarının tayini

Çalışmada, RhoA, RhoB, RhoC, RhoD, RhoE, GTPaz aktive edici proteinler (GAP, RASA1), GTPaz disosiasyon inhibitörleri (GDI, ARHGDI, ARHGDI, ARHGDI), ROCK1, ROCK2, Miyozin fosfataz (MLCP, MPRIP), Ekstrasellular signal-regulated protein kinaz 1 (ERK1, MAPK3), Ekstrasellular signal-regulated protein kinaz 2 (ERK2, MAPK1), Akt-1, Akt-2, Akt-3, Bax, Bcl2, Serum response factor (SRF), GATA4, Plasminojen aktivatör inhibitörü 1 (PAI-1, SERPINE1), LIM kinaz 1 (LIMK1), LIM kinaz 2 (LIMK2), cofilin 1 ve 2 (CFL 1 ve 2) genleri olmak üzere Rho-kinaz yolağı ile ilgili toplam 26 genin gen ifadeleri mRNA düzeyinde araştırıldı.

Her genin ekspresyon tayini için, primer prop tasarımı yapıldı. Elde edilen RNA'lardan cDNA sentez kiti kullanılarak cDNA sentezi yapıldı, daha sonra Biomark (Fluidigm, USA) cihazı ile floresan PCR yöntemi kullanılarak gen ekspresyon analizi yapıldı. Gen ekspresyonu sonucu olarak ΔCt değeri ve sonrasında $2^{-\Delta Ct}$ değeri hesaplandı.

3.5. İstatistiksel analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizinde SPSS 16.0 paket programı kullanıldı. Değerler ortalama \pm standart sapma şeklinde ifade edildi. $P < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İki'den fazla grubun değerlerinin karşılaştırılmasında nonparametrik Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Anlamlı çıkan sonuçlarda iki grubun birbiriyle karşılaştırılmasında ise Mann-Whitney U Testi kullanıldı. Farklı parametreler arasındaki korelasyonun araştırılmasında Pearson Korelasyon Analizi kullanıldı.

4. BULGULAR

Çalışmaya toplam 98 Glioblastoma Multiforme tanısı olan hasta dahil edildi. Normal beyin dokusunun operasyonda rutin olarak alınmaması ve alınmasının da etik olmaması nedeniyle hastalar kendi aralarında gruplamalar yapılarak değerlendirildi. Hastaların 64'ü (%65.3) erkek, 34'ü (%34.7) kadın idi. Tanı sırasında erkek hastaların yaş ortalaması 50.33 ± 16.11 yıl, kadın hastaların yaş ortalaması 54.71 ± 17.93 yıl, tüm hastaların yaş ortalaması 51.85 ± 16.80 yıl olarak saptandı.

Yaşam süresi ve aldıkları tedaviye göre yapılan gruplama:

1. grup: Ameliyat sonrası tedavi alarak 6 aydan kısa süre yaşayanlar (n=14, yaş ortalaması 56.50 ± 13.59 yıl)
2. grup: Ameliyat sonrası tedavi alarak 6 aydan uzun süre yaşayanlar (n=65, yaş ortalaması 49.50 ± 17.12 yıl)
3. grup: Ameliyat sonrası tedavi almadan ölenler (n=19, yaş ortalaması 56.83 ± 16.82 yıl) (Tablo 1).

1. gruptaki hastaların 11'i (%78.6) erkek, 3'ü (%21.4) kadın, 2. gruptaki hastaların 42'ü (%64.6) erkek, 23'ü (%35.4) kadın, 3. gruptaki hastaların 11'u (%57.9) erkek, 8'i (%42.1) kadın idi (Tablo 2), (Şekil 4).

Hastaların yaşam süresi ve tanı sırasındaki yaşları arasında negatif korelasyon saptandı ve istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirildi ($p=0.001$). Gruplar arasında ayrı ayrı yaş ortalamasına bakılarak yapılan değerlendirme istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.050$). Yaşam süresi ve cinsiyet arasında da korelasyon saptanmadı ($p>0.050$).

Hastalar ayrıca tedavi durumlarına göre de; operasyon sonrası sadece radyoterapi alanlar, operasyon sonrası radyoterapiyle eş zamanlı ve/veya adjuvan kemoterapi alanlar, operasyon sonrası tedavi almayanlar olmak üzere 3 gruba ayrıldı.

Tedavi durumlarına göre hastalar değerlendirildiğinde operasyon sonrası sadece radyoterapi alan grupta yaş ortalaması 61.00 ± 11.44 yıl, operasyon sonrası radyoterapiyle eş zamanlı ve/veya adjuvan kemoterapi alan grupta yaş ortalaması 48.94 ± 16.78 yıl, operasyon sonrası tedavi almayan grupta yaş ortalaması 57.58 ± 16.67 yıl saptandı.

Operasyon sonrası radyoterapiyle eş zamanlı ve/veya adjuvan kemoterapi alan gruptaki hastaların yaş ortalaması ile sadece radyoterapi alan grup arasında ve operasyon sonrası radyoterapiyle eş zamanlı ve/veya adjuvan kemoterapi alan gruptaki hastaların yaş ortalaması ile tedavisiz gruptaki hastaların yaş ortalaması arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.043$ ve $p=0.035$), (Tablo 3).

Operasyon sonrası radyoterapi alan grubun %60'ı erkek, %40'ı kadın, operasyon sonrası radyoterapiyle eş zamanlı ve/veya adjuvan kemoterapi alan grubun %68.1'i erkek, %31.9'u kadın, tedavi almayan hastaların %57.9'u erkek, %42.1'i kadın idi ($p>0.05$).

Çalışmaya alınan hastaların ortalama yaşam süresi 11.80 ± 8.54 ay olarak hesaplandı. Operasyon sonrası sadece radyoterapi alan grupta ortalama yaşam süresi 14.50 ± 7.56 ay, operasyon sonrası radyoterapiyle eş zamanlı ve/veya adjuvan kemoterapi alan grupta ortalama yaşam süresi 13.49 ± 7.67 ay, operasyon sonrası tedavi almayan grupta ortalama yaşam süresi 4.21 ± 8.10 ay saptandı ($p<0.001$), (Tablo 4).

Tedavi grupları arasında ayrı ayrı değerlendirme yapıldığında operasyon sonrası sadece radyoterapi alan grup ile tedavisiz grup arasında radyoterapi alan grup lehine, operasyon sonrası radyoterapiyle eş zamanlı ve/veya adjuvan kemoterapi alan grupla tedavisiz grup arasında tedavi uygulanan grup lehine yaşam süresi bakımından anlamlı farklılık saptandı ($p<0.001$ ve $p<0.001$),

(Tablo 4). Operasyon sonrası sadece radyoterapi alan grup ile operasyon sonrası radyoterapiyle eş zamanlı ve/veya adjuvan kemoterapi alan grup arasında yaşam süresi bakımından anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$).

Rho-kinaz yolağında rol alan toplam 26 gen ekspresyonu ile yaşam süresi ve tedaviye göre yapılan gruplar (1.,2.,3. grup) arasında değerlendirme yapıldığında operasyon sonrası tedavi alarak 6 aydan uzun süre yaşayan hastalarda LIMK1, CFL1, CFL2, BCL2 genlerinde operasyon sonrası tedavi alarak 6 aydan kısa süre yaşayan hastalara göre daha fazla ekspresyon, MAPK1 (ERK2) geninde daha az ekspresyon saptanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 5,6,7,8,9). Diğer genlerin ekspresyonunda gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır (Tablo 10,11).

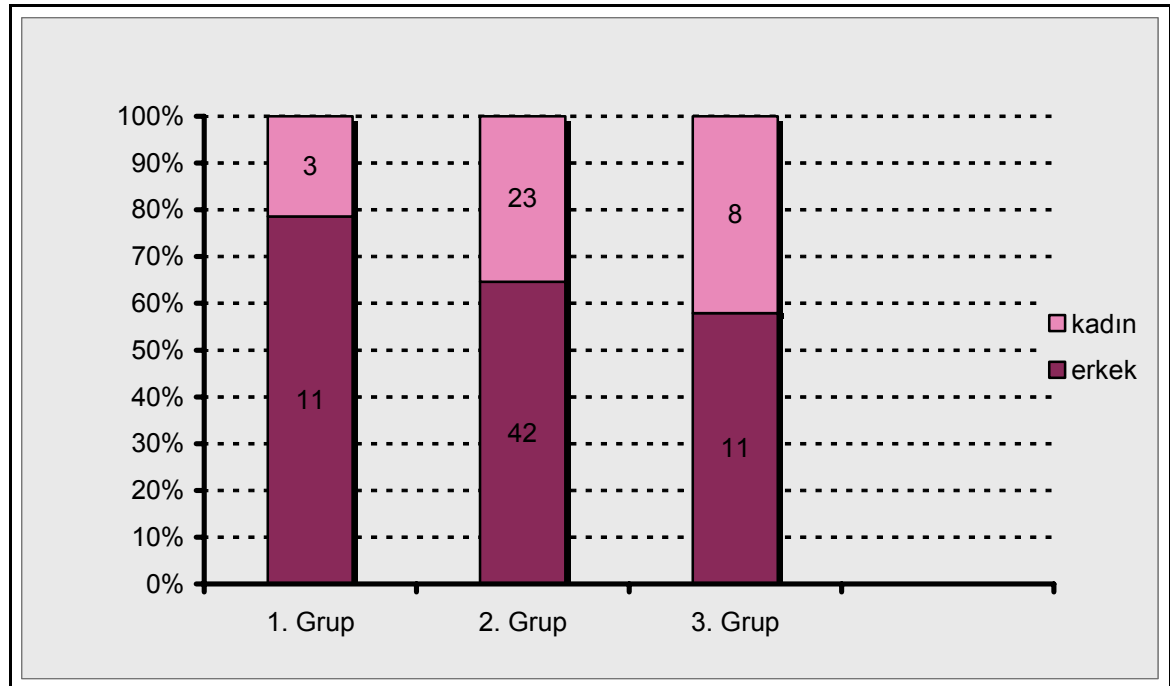
Yaş ve cinsiyet ile gen ekspresyonları arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

Tablo 1. Yaşam süresi ve tedavi durumlarına göre yapılan grupta hasta sayısı ve hastaların tanı sırasındaki ortalama yaşları

Grup	Hasta sayısı	Yaş ortalaması X±SD (yıl)
1	14	56.50±13.59
2	65	49.50±17.12
3	19	56.83±16.82
Toplam	98	51.85±16.80

Tablo 2. Yaşam süreleri ve aldıkları tedavilere göre yapılan grupta hasta sayısı ve cinsiyetlerinin karşılaştırılması

			GRUP			TOPLAM
			1	2	3	
CİNSİYET	ERKEK	Hasta sayısı	11	42	11	64
		Gruptaki yüzdesi	%78.6	%64.6	%57.9	%65.3
		Toplamdaki yüzdesi	%11.2	%42.9	%11.2	%65.3
	KADIN	Hasta sayısı	3	23	8	34
		Gruptaki yüzdesi	%21.4	%35.4	%42.1	%34.7
		Toplamdaki yüzdesi	%3.1	%23.5	%8.2	%34.7
TOPLAM	Hasta sayısı	14	65	19	98	
	Toplamdaki yüzdesi	%14.3	%66.3	%19.4	%100.0	



Şekil 4. Gruplar arasında cinsiyet dağılımı

Tablo 3. Tedavi gruplarındaki yaş ortalamasının karşılaştırılması

Tedavi grubu	Hasta sayısı	Yaş ortalaması X±SD (yıl)	p#
Radyoterapi	10	61.00±11.44	0.025
Radyoterapiyle eş zamanlı ve/veya adjuvan kemoterapi	69	48.94±16.78*	
Tedavisiz	19	57.58±16.67	
Toplam	98	51.85±16.80	

Kruskal-Wallis testi

*p=0.043 (Radyoterapi alan grupla karşılaştırıldığında), *p=0.035 (Tedavisiz grupla karşılaştırıldığında) Mann-Whitney U testi

Tablo 4. Tedavi gruplarındaki yaşam sürelerinin karşılaştırılması

Tedavi grubu	Hasta sayısı	Ortalama yaşam süresi X±SD (ay)	p#
Radyoterapi	10	14.50±7.56	<0.001
Radyoterapiyle eş zamanlı ve/veya adjuvan kemoterapi	69	13.49±7.68	
Tedavisiz	19	4.21±8.10 *	
Toplam	98	11.80±8.54	

Kruskal-Wallis testi

*p<0.001 (Radyoterapi alan grupla karşılaştırıldığında), *p<0.001 (Radyoterapiyle eş zamanlı ve/veya adjuvan kemoterapi alan grupla karşılaştırıldığında), Mann-Whitney U testi

Tablo 5. GBM'li hastalarda mRNA düzeyinde LIMK1 gen ekspresyonu ve gruplar arasında karşılaştırılması

LIMK1	Grup 1 (ameliyat sonrası tedavi alarak 6 aydan kısa süre yaşayanlar) (n=14) Median (min–max)	Grup 2 (ameliyat sonrası tedavi alarak 6 aydan uzun süre yaşayanlar) (n=63) Median (min–max)	Grup 3 (ameliyat sonrası tedavi almayanlar) (n=17) Median (min–max)
$\Delta CT = Ct(\text{target}) - Ct(\text{housekeeping})$	6.602(-3.460-11.701)	3.851(-10.289-10.123)*	3.712(-13.182-10.063)
Content = $2^{-\Delta CT}$	0.024(0.0003-11.004)	0.069(0.001-1250.81)*	0.076(0.001-9295.16)

*p=0.038 (Grup 1 ile karşılaştırıldığında). Mann-Whitney U testi

Tablo 6. GBM'li hastalarda mRNA düzeyinde CFL1 gen ekspresyonu ve gruplar arasında karşılaştırılması

CFL1	Grup 1 (ameliyat sonrası tedavi alarak 6 aydan kısa süre yaşayanlar) (n=14) Median (min–max)	Grup 2 (ameliyat sonrası tedavi alarak 6 aydan uzun süre yaşayanlar) (n=65) Median (min–max)	Grup 3 (ameliyat sonrası tedavi almayanlar) (n=18) Median (min–max)
$\Delta CT = Ct(\text{target}) - Ct(\text{housekeeping})$	3.810(-1.989-6.040)	1.832(-9.522-6.600)*	2.174(-8.805-6.043)
Content = $2^{-\Delta CT}$	0.073(0.015-3.969)	0.281(0.010-735.407)*	0.231(0.015-447.367)

*p=0.025(Grup 1 ile karşılaştırıldığında)

Tablo 7. GBM'li hastalarda mRNA düzeyinde CFL2 gen ekspresyonu ve gruplar arasında karşılaştırılması

CFL2	Grup 1 (ameliyat sonrası tedavi alarak 6 aydan kısa süre yaşayanlar) (n=13) Median (min-max)	Grup 2 (ameliyat sonrası tedavi alarak 6 aydan uzun süre yaşayanlar) (n=60) Median (min-max)	Grup 3 (ameliyat sonrası tedavi almayanlar) (n=16) Median (min-max)
$\Delta CT = Ct(\text{target}) - Ct(\text{housekeeping})$	8.380(4.812-11.006)	7.152(-4.438-11.994)*	6.985(-2.901-11.293)
Content = $2^{-\Delta CT}$	0.003(0.0005-0.036)	0.007(0.0003-21.668)*	0.008(0.0004-7.470)

*p=0.047 (Grup 1 ile karşılaştırıldığında). Mann-Whitney U testi

Tablo 8. GBM'li hastalarda mRNA düzeyinde BCL2 gen ekspresyonu ve gruplar arasında karşılaştırılması

BCL2	Grup 1 (ameliyat sonrası tedavi alarak 6 aydan kısa süre yaşayanlar) (n=13) Median (min-max)	Grup 2 (ameliyat sonrası tedavi alarak 6 aydan uzun süre yaşayanlar) (n=59) Median (min-max)	Grup 3 (ameliyat sonrası tedavi almayanlar) (n=18) Median (min-max)
$\Delta CT = Ct(\text{target}) - Ct(\text{housekeeping})$	7.606(0.610-14.075)	4.031(-7.447-11.384)*	6.681(-8.659-10.263)
Content = $2^{-\Delta CT}$	0.005(0.0001-0.655)	0.061(0.0004-174.470)*	0.010(0.0008-404.312)

*p=0.049 (Grup 1 ile karşılaştırıldığında). Mann-Whitney U testi

Tablo 9. GBM'li hastalarda mRNA düzeyinde MAPK1 gen ekspresyonu ve gruplar arasında karşılaştırılması

MAPK1	Grup 1 (ameliyat sonrası tedavi alarak 6 aydan kısa süre yaşayanlar) (n=13) Median (min-max)	Grup 2 (ameliyat sonrası tedavi alarak 6 aydan uzun süre yaşayanlar) (n=59) Median (min-max)	Grup 3 (ameliyat sonrası tedavi almayanlar) (n=17) Median (min-max)
$\Delta CT = Ct(target) - Ct(housekeeping)$	6.509(3.941-7.811)	6.761(3.666-10.163)*	6.734(5.716-10.220)
Content = $2^{-\Delta CT}$	0.011(0.004-0.065)	0.009(0.0009-0.079)*	0.009(0.0008-0.019)

*P=0.047 (Grup 1 ile karşılaştırıldığında). Mann-Whitney U testi

Tablo 10. Diğer gen ekspresyonlarının gruplar arasında karşılaştırılması

Content = 2^{-ACT}	Grup 1 (ameliyat sonrası tedavi alarak 6 aydan kısa süre yaşayanlar)	Grup 2 (ameliyat sonrası tedavi alarak 6 aydan uzun süre yaşayanlar)	Grup 3 (ameliyat sonrası tedavi almayanlar)	p#
	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	
RHOA	0.012(0.002-0.049)	0.005(0.00008-13.27)	0.005(0.00007-13.27)	0.30
ARHGDI3	0.00004(0.00008-0.001)	0.00007(0.0002-0.184)	0.00005(0.0001-0.0005)	0.53
AKT1	0.006(0.0007-0.107)	0.007(0.0003-33.75)	0.005(0.00009-49.98)	0.72
RHOB	0.207(0.006-277.70)	2.125(0.011-36736)	0.461(0.035-129183)	0.14
RHOC	0.011(0.0008-0.0744)	0.004(0.0002-30.436)	0.006(0.0007-0.558)	0.97
AKT3	0.0003(0.00002-0.0059)	0.0005(0.00001-0.0675)	0.0006(0.00001-0.0024)	0.86
RHOD	-	0.00003(0.00001-0.00004)	-	-
ROCK1	0.0306(0.005-0.564)	0.113(0.004-116.3)	0.052(0.008-29.744)	0.14
BAX	0.002(0.0004-0.010)	0.002(0.00009-4.368)	0.002(0.0002-0.047)	0.78
RHOE	0.00003(0.00003-0.00003)	0.00004(0.00002-0.0002)	0.008(0.0004-7.4699)	0.65
AKT2	0.025(0.0004-1.904)	0.056(0.0003-391.08)	0.015(0.0006-62.52)	0.69

Kruskal-Wallis testi

Tablo 11. Diğer gen ekspresyonlarının gruplar arasında karşılaştırılması

Content = 2^{-ΔCT}	Grup 1 (ameliyat sonrası tedavi alarak 6 aydan kısa süre yaşayanlar)	Grup 2 (ameliyat sonrası tedavi alarak 6 aydan uzun süre yaşayanlar)	Grup 3 (ameliyat sonrası tedavi almayanlar)	p#
	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	
ROCK2	0.011(0.0009-1.588)	0.142(0.001-39.425)	0.034(0.0008-33.384)	0.26
RASA1	0.008(0.002-0.276)	0.019(0.001-1.574)	0.013(0.0006-0.450)	0.51
MPRIIP	0.009(0.004-124.326)	0.357(0.006-1880.45)	0.218(0.0127-1415.29)	0.32
SRF	0.009(0.002-0.228)	0.007(0.001-0.186)	0.005(0.001-0.045)	0.46
ARHGDIA	0.032(0.005-1.429)	0.056(0.003-2.803)	0.035(0.003-1.419)	0.49
MAPK3	0.00005(0.000006-0.0007)	0.056(0.003-2.803)	0.035(0.003-1.419)	0.65
GATA4	0.0007(0.0003-0.0018)	0.0004(0.00004-0.187)	0.010(0.002-0.052)	0.20
ARHGDIB	0.0002(0.00001-0.0023)	0.0002(0.00005-0.0017)	0.0002(0.000004-0.0008)	0.94
SERPINE1	0.101(0.001-2.088)	0.035(0.001-1.515)	0.07(0.004-1.121)	0.64
LIMK2	0.00009(0.000006-0.0006)	0.0001(0.00002-0.0014)	0.0001(0.000004-0.0007)	0.89

Kruskal-Wallis testi

5. TARTIŞMA

GBM beynin en sık görülen ve en agresif primer malign tümörüdür, tüm intrakranial tümörlerin %12-15'ini, tüm astrositik tümörlerin %50-60'ını ve yetişkinlerde kansere bağlı ölümlerin %2'sini oluşturur. GBM olgularının çoğu 45-70 yaş arasındadır (5-7).

GBM gelişimindeki moleküler bozukluklar proto-onkojenlerin fazla ekspresyonu ve tümör supresör genlerin az ekspresyonu ile olabilmektedir. Astrositik tümörler içinde yapısal ve sayısal kromozom bozukluklarının en sık görüldüğü tümör GBM'dir. Yapısal kromozom bozuklukları; kromozomdaki translokasyonlar, kırılmalar ve delesyonlardır.

GBM'de en sık serebral hemisfer ve özellikle de subkortikal beyaz cevher tutulumu görülür. GBM'de primer yayılım beyaz cevher traktlarının oluşturduğu yollar aracılığıyla ile olmaktadır. GBM'de ölüm lokal tümör büyümesinden ve beyin invazyonundan olmaktadır (23,24).

GBM'in mikroskopik incelenmesinde nükleer polimorfizm, mitotik aktivite, endotelial hiperplazi ve nekroz bulguları saptanır ve bunlardan üçünün bulunması GBM tanısı için yeterlidir.

Prognozu etkileyen faktörler yaş, tümör lokalizasyonu, tümör çapı, semptom süresi, semptom tipi, cerrahinin genişliği, postoperatif tümör volümü, adjuvan radyoterapi ve/veya kemoterapi olarak sıralanabilir. Tanı, cerrahi, radyoterapi ve kemoterapideki gelişmelere rağmen GBM'deki yaşam süresi yaklaşık 1 yıldır (31,32).

GBM'de tedavi başarısızlığı ve rekürrens ana nedeni olan invazyon; hücreler arası, hücre ile ekstrasellüler matriks arası adezyonu, ekstrasellüler matriks enzimlerini, hücre migrasyonunu gerektirir. Astrositom migrasyonunda aktin mikofilamentleri, mikrotübüller, ara filamentler arasındaki etkileşimler, bunları düzenleyen çevresel faktörler ve intrasellüler sinyallerin etkisi vardır. Hücrelerin bu onkolojik değişikliklere uğramasında Rho proteinleri ve dolayısı ile Rho-kinazın aktivasyonu önemli rol oynamaktadır.

Rho aktivasyonu adezyon kompleksleri ve aktin stres liflerinin oluşumu ile sonuçlanır. Aktin organizasyonu cofilin olarak bilinen aktin bağlayan proteinlerle düzenlenir. Cofilin, LIMK substratıdır ve hücre göçü sırasında aktin polimerizasyonu ve depolimerizasyonunu düzenler.

Rho proteinleri ve Rho-kinaz aktivitesinin çeşitli kanser modellerinde etkin role sahip olduğu gösterilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda Rho ekspresyonunun GBM'de arttığı, RhoA ekspresyonu fazla olan astrositik tümörlerin daha invaziv olduğu ve RhoA inhibisyonunun GBM'de migrasyonu azalttığı gösterilmiştir (88,89). Yapılan diğer çalışmalarda ROCK1 ekspresyonunun da malignite derecesi ile doğru olarak arttığı, ROCK2 ekspresyonunun ise normal beyin dokusunda fazla eksprese olduğu ve invaziv tümörlerde baskılandığı saptanmıştır (92). Bizim çalışmamızda ise gruplar arasında RhoA, ROCK1 ve ROCK2 açısından fark saptanmamıştır.

Literatürde şu ana kadar GBM ve Rho-kinaz ile ilgili yapılan çalışmaların çoğunda Rho-kinaz inhibisyonunun etkileri araştırılmıştır. GBM'de Rho-kinaz yolağına ait genlerin ekspresyonlarının incelendiği ve hastaların prognozuyla ilişkilendirildiği bir çalışma yoktur. Bu çalışma bu konuda yapılan ilk çalışmadır.

Çalışmamıza alınan hastaların %65.3'ü erkek, %34.7'si kadındı ve yaş ortalaması 51.85 ± 16.80 olarak saptandı. Çalışmamızdaki hastaların ortalama yaşam süresi 11.80 ± 8.54 ay saptandı ve literatürde belirtilen ortalama yaşam süresine benzer bulundu.

Önemli prognostik faktörler arasında olan yaşın bizim hastalarımızda yaşam süresi ile negatif korele olduğu saptandı.

Hasta popülasyonumuzda operasyon sonrası sadece radyoterapi verilen gruptaki yaşam süresi literatürdekilerle benzerdir (14.50 ± 7.56 ay). Operasyon sonrası radyoterapiyle eş zamanlı ve/veya adjuvan kemoterapi alan hastalarda ortalama yaşam süresi sadece adjuvan radyoterapi verilen grupla aynı bulunmuştur. Literatürde ise adjuvan tedavilerin yaşam süresini uzattığı bilinmektedir. Bizim hasta popülasyonumuzda bu farkın çıkmaması, bu grup hastalara günümüzde uygulanmakta olan kemoterapi tedavilerinin yeterince kullanılmaması veya uzun süreli verilmemiş olmasından kaynaklanabilir.

Literatürde sadece cerrahi tedavi ile hastaların yaşam süresinin yaklaşık 13.5 ay olduğu belirtilmektedir (38). Hasta grubumuzda ise sadece cerrahi uygulanan hastaların yaşam süresi 4.21 ± 8.10 ay bulunmuştur, ancak hasta sayısı kesin yorum yapabilmek için yeterli değildir ($n=19$), ayrıca uygulanan cerrahinin tipi de önemlidir.

Operasyon sonrası tedavi alarak 6 aydan uzun süre yaşayan hastalarda LIMK1 ($p=0.038$), CFL1 ($p=0.025$), CFL2 ($p=0.047$), BCL2 ($p=0.049$) genlerinde operasyon sonrası tedavi alarak 6 aydan kısa süre yaşayan hastalara göre daha fazla ve MAPK1 ($p=0.047$) geninde daha az ekspresyon saptandı, istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

RhoA, RhoB, RhoC, RhoD, RhoE, RASA1, ARHGDI, ARHGDI, ARHGDI, ROCK1, ROCK2, MPRIP, MAPK3, Akt-1, Akt-2, Akt-3, Bax, SRF, GATA4, SERPINE1, LIMK2 genlerinin ekspresyonunda gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı.

Aktin polimerizasyonu ve hücre migrasyon/motilitesinde rol aldığı bilinen LIMK ve cofilin genlerinin ekspresyonunun artışı hastaların prognozu ile ilişkili olabilir. Bizim sonuçlarımızda saptamış olduğumuz LIMK1, CFL1 ve CFL2 ekspresyon artışları ameliyat sonrası tedavi almayan ve ortalama 4 aylık yaşam süresi olan grupta da yüksektir. Ayrıca bu yükseklik, hastaların büyük kısmında uygulanmış olan temozolomid tedavisinin etkili olabilmesi için de önemli olabilir. Grup 1'de ise ekspresyonların düşük olması ve bu gruptaki hastaların tedaviye rağmen 6 aydan az yaşamış olmaları bu hasta grubunda MGMT'den bağımsız

daha farklı moleküler mekanizmaların etkili olabileceğini ve bu nedenlerden dolayı bu hasta grubu için farklı tedavi yöntemlerinin aranması gerektiğini düşündürmektedir.

BCL2'nin birçok tümörde apoptoz inhibisyonu yönünde görev yaptığı bilinmektedir. Bizim çalışmamızda ortaya çıkan sonuca göre tedavi ile uzun süreli yaşam elde edilen grupta BCL2 ekspresyon artışının varlığı radyoterapi ve kemoterapiye cevap ile ilişkilendirilebilir. Grup 1 ve Grup 3 arasında fark olmayışı, kötü prognozlu grupta BCL2'nin rolünün daha az olduğunu ve/veya tedavi etkinliğinde BCL2 ekspresyon artışının pozitif yönde katkısı olabileceğini düşündürmektedir.

MAPK1 de hücre siklusunda proliferasyon sinyallerinin oluşması için gerekli nükleer faktörleri aktive etmektedir. Birçok solid tümörde kötü prognozla ilişkili olduğu bilinmektedir. Ras/raf yolağının aktivasyonu sonrasında etkinliği ortaya çıkmaktadır. Bizim hastalarımızda uzun süreli yaşam elde edilen grupta etkinliğin düşük olması, Grup 1'de ise yüksek aktivite görülmesi, mevcut tedavi yöntemlerinin MAPK üzerinden etkili olmadığı şeklinde yorumlanabilir. Ayrıca tedavi öncesi MAPK aktivite yüksekliğinin saptanması kötü prognostik alt grubun öngörülmesinde yardımcı olabilir. Ayrıca bu grup hastalar için farklı tedavi yaklaşımları (ras veya raf inhibisyonu gibi) denenebilir.

Bu bulgular ışığında GBM'de LIMK1, CFL1, CFL2, BCL2 genlerinin fazla ekspresyonunun, MAPK1 geninin az ekspresyonunun tedaviye yanıtın artması yönünde katkısının olabileceği düşünülmüştür.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu araştırmada aşağıdaki sonuçlara varılmıştır:

1. GBM'de Rho-kinaz yolağına ait RhoA, RhoB, RhoC, RhoD, RhoE, RASA1, ARHGDIA, ARHGDIB, ARHGDIG, ROCK1, ROCK2, MPRIP, MAPK3, Akt-1, Akt-2, Akt-3, Bax, SRF, GATA4, SERPINE1, LIMK2 genlerinin ekspresyonunda gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı.
2. LIMK1, CFL1, CFL2, BCL2 genlerinin fazla ekspresyonu ve MAPK1 geninin az ekspresyonu ile hastaların yaşam süreleri arasında anlamlı fark saptandı.
3. Aktin polimerizasyonu ve hücre migrasyon/motilitesinde rol aldığı bilinen LIMK ve cofilin genlerinin ekspresyonunun fazla olması temozolomid tedavisinin etkili olabilmesi için önemli olabilir. Tedaviye rağmen yaşam süresi az olan hastalarda da ekspresyonun düşük olması MGMT'den bağımsız daha farklı moleküler mekanizmaların etkili olabileceğini ve farklı tedavi yöntemlerinin aranması gerektiğini düşündürmektedir.
4. BCL2'nin ekspresyonunun kötü prognostik grupta düşük olarak saptanmış olması tedavi uygulamalarından bağımsız kötü gidişin habercisi olabilir.
5. MAPK1 ekspresyonunun yaşam süresi uzun olan grupta düşük, yaşam süresi az olan grupta yüksek saptanması, mevcut tedavi yöntemlerinin MAPK üzerinden etkili olmadığı şeklinde yorumlanabilir. Ayrıca tedavi öncesi MAPK aktivite yüksekliğinin saptanması kötü prognostik alt grubun öngörülmesinde yardımcı olabilir.
6. Hasta popülasyonumuzda yaş ve yaşam süresi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0.001$).
7. Yaş ve cinsiyet ile Rho-kinaz yolağına ait genlerin ekspresyonu arasında anlamlı fark saptanmadı.

8. Mevcut sonuçların normal beyin dokusuyla karşılaştırılmasıyla, GBM'de farklı moleküler mekanizmalar anlaşılabilir, bunlara yönelik tedavi stratejileri geliştirilebilir, mevcut genlerin GBM tümörünezdindeki rolleri daha açık ortaya koyabilmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Mason WP, Cairncross JG. Drug Insight: temozolomide as a treatment for malignant glioma impact of a recent trial. *Nat Clin Pract Neurol* 1. 2005:88-95.
2. Stupp R, Mason WP, Van Den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 10. 2005;352:987-996.
3. Louis DN, Ohgaki H, Westler OD, Cavenee WK. The 2007 WHO classification of tumours of the nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007;114(2):97–109.
4. Weil RJ. Glioblastoma multiforme treating a deadly tumor with both strands of RNA. *PLoS Med.* 2006;3(1):e31.
5. Giese A, Westphal M. Glioma invasion in the central nervous system. *Neurosurgery.* 1996;39:235–52.
6. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 2007;170(5):1445-53.
7. Burger PC, Dubois PJ, Schold SC Jr, Smit KR Jr, Odom GL, Crafts DC, Giangaspero F. Computerized tomographic and pathologic studies of the untreated, quiescent, and recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurosurg.* 1983;58:159-169.
8. Berens ME, Rutka JT, Rosenblum ML. Brain tumor epidemiology, growth and invasion. *Neurosurg Clin North Am.* 1990;1:1-18.

9. Surawicz TS, McCarthy BJ, Kupelian V, Jukich PJ, Bruner JM, Davis FG. Descriptive epidemiology of primary brain and CNS tumors: Results from the Central Brain Tumor Registry of the United States 1990-1994. *Neuro Oncol.* 1999;1:14-25.
10. Mahaley MS Jr, Mettlin C, Natarajan N, Laws ER Jr, Peace BB. National survey of patterns of care for brain tumor patients. *J Neurosurg* 1989;71:826-36
11. Berger SB, Prados DP, Textbook of neuro-oncology. Elsevier Saunders, Philadelphia. 2005;143-148.
12. Fleury A, Menegoz F, Grosclaude P, et al. Descriptive epidemiology of cerebral gliomas in France. *Cancer.* 1997;79:1195-202.
13. Kleihues P, Ohgaki H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro oncol.* 1999;1:44-51.
14. Newcomb EW, Cohen H, Lee SR, Bhalla SK, Bloom J, Hayes RL, Miller DC. Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or Bcl-2 genes. *Brain Pathol.* 1998;8:655-667.
15. Wrensc M, Minn Y, Chew T et al. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro Oncol.* 2002; 4:278-299.
16. Arslantas A, Artan S, Öner U, Müslümanoğlu H, Durmaz R, Coşan E, Atasoy MA, Başaran N, Tel E. The importance of genomic copy number changes in the prognosis of glioblastoma multiforme. *Neurosurg Rev.* 2004;27:58-64.
17. Burns KL, Ueki K, Jhung SL, Koh J, Louis DN. Molecular genetic correlates of p16, cdk4, and pRb immunohistochemistry in glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1998; 57:122-130.

18. Ringertz N Grading of gliomas. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1950;27(1):51-64.
19. Giese A, Loo MA, Norman SA, Treasurywala S, Berens ME. Contrasting migratory response of astrocytoma cells to tenascin mediated by different integrins. *J Cell Sci.* 1996;109:2161–8.
20. Burger PC, Heinz ER, Shibita T, Kleihues P. Topographic anatomy and CT correlations in the untreated glioblastoma multiforme. *J Neurosurg.* 1988;68:698–704.
21. Burger PC, Vogel FS, Green SB, et al. Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma: Pathologic criteria and prognostic implications. *Cancer.* 1985;56:1106-1111.
22. Burger PC, Green SB. Patient age, histologic features and length of survival in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer.* 1987;59:1617-1625.
23. Durmaz R, Erken S, Arslantas A, Atasoy MA, Bal C, Tel E. Management of glioblastoma multiforme: With special reference to recurrence. *Clin Neurol Neurosurg.* 1997;99:117-23.
24. Hou LC, Veeravagu A, Hsu AR, Tse VC. Recurrent glioblastoma multiforme: a review of natural history and management options. *Neurosurg Focus.* 2006;20.
25. Maity A, Pruitt AA, Judy KD, Phillips PC. Cancer of the central nervous system. In: *Abeloff MD, Armitage JO, Niederhuber JE, Kastan MB, McKenna WG, eds: Clinical Oncology. 3rd ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Churchill Livingstone. 2004;1347-1431.*
26. Homma T, Fukushima T, Vaccarella S, et al. Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006;65:846-54.
27. Kelly PJ, Daumas-Duport C, Kispert DB, et al. Imaging-based stereotactic serial biopsies in untreated glial neoplasms. *J Neurosurg.* 1987;66:865-874.

28. Harsh IV GR, Wilson CB. Neuroepithelial tumors of the adult brain. In: Youmans JR, ed. Youmans Neurological Surgery, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1990;3040-136.
29. Kyritsis AP, Levin VA, Yung WK, Leeds NE. Imaging patterns of multifocal gliomas. *Eur J Radiol.* 1993;16:163-70.
30. Osborn AG. *Diagnostic Neuroradiology*, St. Louis Missouri: Mosby; 1994;541-50.
31. Lamborn KR, Chang SM, Prados MD. Prognostic factors for survival of patients with glioblastoma: recursive partitioning analysis. *NeuroOncol.* 2004;6:227-35.
32. Barker FG II, Chang SM, Gutin PH, et al. Survival and functional status after resection of recurrent glioblastoma multiforme. *Neurosurgery.* 1998;42:709-20.
33. French LA, Galicich JH. The use of steroids for control of cerebral edema. *Clin Neurosurg.* 1964;10:212-23.
34. Maxwell RE, Long DM, French LA. The effects of glucosteroids on experimental cold induced brain edema. Gross morphological alterations and vascular permeability changes. *J Neurosurg.* 1971;34:477-87.
35. Hentschel SJ, Lang FF. Current Surgical Management of Glioblastoma. *Cancer J.* 2003;9:113-26.
36. Weingart J, Brem H. Brain Tumors and Cancers of the Central Nervous System. Neiderhuber JE. *Current Therapy. First ED.*, Decker: Mosby- Year Book Inc, 1993;538-546.

37. Hulshof MC, Koot RW, Schimmel EC, Dekker F, Bosch DA, Gonzalez Gonzalez D. Prognostic factors in glioblastoma multiforme. 10 years experience of a single institution. *Strahlenther Onkol.* 2001;177:283-90.
38. Chang CH, Horton J, Schoenfeld D, et al. Comparison of postoperative radiotherapy and combined postoperative radiotherapy and 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.
39. Kristiansen K, Hagen S, Kollevold T, et al: Combined modality therapy of operated astrocytomas grade III and IV: Confirmation of the value of postoperative irradiation and lack of potentiation of bleomycin on survival time-A prospective multicenter trial of the Scandinavian Glioblastoma Study Group. *Cancer.* 1981;47:649-652.
40. Newlands ES, O'Reilly SM, Glaser MG, et al. The Charing Cross Hospital experience with temozolomide in patients with gliomas. *Eur J Cancer.* 1996;32(A):2236-2241.
41. Reid JM, Stevens DC, Rubin J, et al. Pharmacokinetics of 3-methyl-(triazene-1-yl) imidazole-4-carboximide following administration of temozolomide to patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res.* 1997;3:2393-2398.
42. Marzolini C, Decosterd LA, Shen F, et al. Pharmacokinetics of temozolomide in association with fotemustine in malignant melanoma and malignant glioma patients: Comparison of oral, intravenous, and hepatic intra-arterial administration. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1998;42:433-440.
43. Reardon DA, Rich JN, Friedman HS, et al. Recent advances in the treatment of malignant astrocytoma *J Clin Oncol.* 2006;24:1253-1265.
44. Denny BJ, Wheelhouse RT, Stevens MF, et al. NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry.* 1994;33:9045-9051.

45. Stupp R, Hegi ME, Van Den Bent MJ, et al. Changing paradigms-an update on the multidisciplinary management of malignant glioma. *Oncologist*. 2006;11:165-180.
46. Jaeckle KA, Eyre HJ, Townsend JJ, et al. Correlation of tumor O6 methylguanine-DNA methyltransferase levels with survival of malignant astrocytoma patients treated with bis-chloroethylnitrosourea: a Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 1998;16:3310-3315.
47. Friedman HS, McLendon RE, Kerby T, et al. DNA mismatch repair and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase analysis and response to Temodal in newly diagnosed malignant glioma. *J Clin Oncol*. 1998;16:3851-3857.
48. Wedge SR, Porteous JK, Glaser MG, et al. In vitro evaluation of temozolomide combined with X-irradiation. *Anticancer Drugs*. 1997;8:92-97.
49. Hirose Y, Berger MS, Pieper RO. p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. *Cancer Res*. 2001;61:1957-1963.
50. Ozawa T, Faddegon AB, Hu JL, et al. Response of intracerebral human glioblastoma xenografts to multifraction radiation exposures. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006;66:263-270.
51. Newlands ES, Blackledge GRP, Slack JA, et al. Phase I trial of temozolomide (CCRG 81045: M&B 39831: NSC 362856). *Br J Cancer*. 1992;65:287-91.
52. Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, et al. Randomized phase III study of temozolomide versus decarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol*. 2000;18:158-66.
53. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22:32-39.

54. <https://www.qiagen.com/geneglobe/pathwayview.aspx?pathwayID=395>.
Eriřim tarihi: 04.03.2011.
55. Loirand A, Frishman WH. Rho-kinase inhibition in the therapy of cardiovascular disease. *Cardiol Rev.* 2005;13:285-92.
56. Katoh K, Kano Y, Amano M, Onishi H, Kaibuchi K, Fujiwara K. Rho-kinase-mediated contraction of isolated stress fibers. *J Cell Biol.* 2001;153:569-84.
57. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 2002;420:629-35.
58. Sin WC, Chen XQ, Leung T, Lim L. RhoA-binding kinase alpha translocation is facilitated by the collapse of the vimentin intermediate filament network. *Mol Cell Biol.* 1998;18:6325-39.
59. Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, Saito Y, Nakao K, Narumiya S. ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett.* 1996;392:189-93.
60. Tanaka T, Nishimura D, Wu RC, Amano M, Iso T, Kedes L, et al. Nuclear Rho kinase, ROCK2, targets p300 acetyltransferase. *J Biol Chem.* 2006;281:15320-9.
61. Sylvester Tumusiime et al. Regulation of ROCKII by localization to membrane compartments and binding to DynaminI. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2009;381:393-396.
62. Brown J. H. et al. The rac and rho hall of fame: a decade of hypertrophic signaling hits. *Circ Res.* 2006;98:730-742.
63. Noma K, Oyama N, Liao JK. Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;290:661-8.

64. Shi J, Wei L. Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2007;55:61-75.
65. Loirand G, Guérin P, Pacaud P. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circ Res*. 2006;98:322-34.
66. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol*. 2000;522 Pt 2:177-85.
67. Higashi M, Shimokawa H, Hattori T, Hiroki J, Mukai Y, Morikawa K, et al. Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses angiotensin II-induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo: effect on endothelial NAD(P)H oxidase system. *Circ Res*. 2003;93:767-75.
68. Shimokawa H. Rho-kinase as a novel therapeutic target in treatment of cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002;39:319-27.
69. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, et al. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*. 1996;273:245-8.
70. Masumoto A, Mohri M, Shimokawa H, Urakami L, Usui M, Takeshita A. Suppression of coronary artery spasm by the Rho-kinase inhibitor fasudil in patients with vasospastic angina. *Circulation*. 2002;105:1545-7.
71. Takemoto M, Sun J, Hiroki J, Shimokawa H, Liao JK. Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2002;106:57-62.
72. Shirao S, Kashiwagi S, Sato M, Miwa S, Nakao F, Kurokawa T, et al. Sphingosylphosphorylcholine is a novel messenger for Rho-kinase-mediated Ca²⁺ sensitization in the bovine cerebral artery: unimportant role for protein kinase C. *Circ Res*. 2002;91:112-9.

73. Shibata R, Kai H, Seki Y, Kato S, Morimatsu M, Kaibuchi K, et al. Role of Rho-associated kinase in neointima formation after vascular injury. *Circulation*. 2001;103:284-9.
74. Gerthoffer WT. Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration. *Circ Res*. 2007;100:607-21.
75. Sugimoto M, Nakayama M, Goto TM, Amano M, Komori K., Kaibuchi K. Rho-kinase phosphorylates eNOS at threonine 495 in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;361:462-7.
76. Takamura M, Sakamoto M, Genda T, Ichida T, Asakura H, Hirohashi S. Inhibition of intrahepatic metastasis of human hepatocellular carcinoma by Rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632. *Hepatology*. 2001;33:577-81.
77. Itoh K, Yoshioka K, Akedo H, Uehata M, Ishizaki T, Narumiya S. An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nat Med*. 1999;5:221-5.
78. Lawler K, Foran E, O'Sullivan G, Long A, Kenny D. Mobility and invasiveness of metastatic esophageal cancer are potentiated by shear stress in a ROCK- and Ras-dependent manner. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;291:668-77.
79. Ogawa T, Tashiro H, Miyata Y, Ushitora Y, Fudaba Y, Kobayashi T, et al. Rho-associated kinase inhibitor reduces tumor recurrence after liver transplantation in a rat hepatoma model. *Am J Transplant*. 2007;7:347-55.
80. Kamai T, Arai K, Sumi S, Tsujii T, Honda M, Yamanishi T, et al. The rho/rho-kinase pathway is involved in the progression of testicular germ cell tumour. *BJU Int*. 2002;89:449-53.
81. Nakajima M, Hayashi K, Egi Y, Katayama K, Amano Y, Uehata M, et al. Effect of Wf-536, a novel ROCK inhibitor, against metastasis of B16 melanoma. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2003;52:319-24.

82. Nakajima M, Hayashi K, Katayama K, Amano Y, Egi Y, Uehata M, et al. Wf-536 prevents tumor metastasis by inhibiting both tumor motility and angiogenic actions. *Eur J Pharmacol.* 2003;459:113-20.
83. Han Z, Xu G, Zhou J, Xing H, Wang S, Wu M, et al. Inhibition of motile and invasive properties of ovarian cancer cells by ASODN against Rho-associated protein kinase. *Cell Commun Adhes.* 2005;12:59-69.
84. Yoshinaga K, Inoue H, Tanaka F, Mimori K, Utsunomiya T, Mori M. Platelet-derived endothelial cell growth factor mediates Rho-associated coiled-coil domain kinase messenger RNA expression and promotes cell motility. *Ann Surg Oncol.* 2003;10:582-7.
85. van Nieuw Amerongen GP, Koolwijk P, Versteilen A, van Hinsbergh VW. Involvement of RhoA/Rho kinase signaling in VEGF-induced endothelial cell migration and angiogenesis in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:211-7.
86. Hyvelin JM, Howell K, Nichol A, Costello CM, Preston RJ, McLoughlin P. Inhibition of Rho-kinase attenuates hypoxia-induced angiogenesis in the pulmonary circulation. *Circ Res.* 2005;97:185-91.
87. Mizukami Y, Fujiki K, Duerr EM, Gala M, Jo WS, Zhang X, et al. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor through the induction of phosphatidylinositol 3-kinase/Rho/ROCK and c-Myc. *J Biol Chem.* 2006;281:13957-63.
88. Salhia B, Rutten F, Nakada M, Beaudry C, Berens M, Kwan A, Rutka JT. Inhibition of rho-kinase affects astrocytoma morphology, motility, and invasion through activation of rac1. *Cancer Res.* 2005;65(19):8792-8800.
89. Manning Jr. T.J., Parker J.C., Sontheimer H. Role of lysophosphatidic acid and rho in glioma cell motility, *Cell Motil. Cytoskeleton.* 2000;45:185–199.
90. Zhai G. G., Malhotra R, Delaney M, Latham D, Nestler U, Zhang M, Mukherjee N, Song Q, Robe P, Chakravarti A. Radiation enhances the invasive potential of primary glioblastoma cells via activation of the Rho signaling pathway. *Journal of Neuro-Oncology.* 2006;76:227–237.

91. Ader I, Delmas C, Bonnet J, et al. Inhibition of Rho pathways induces radiosensitization and oxygenation in human glioblastoma xenografts. *Oncogene*. 2003;22:8861–9.

92. Oellers P, Schroer U, Senner V, Paulus W, Thanos S. ROCKs are expressed in brain tumors and are required for glioma-cell migration on myelinated axons. *Glia*. 2009;57:499–509.