



T.C.

BEZMÎÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

NÖROŞİRURJİ ANABİLİM DALI

Yüksek Gradeli Glial Tümörlerde
EGFR,EPOR,VEGF Düzeylerinin
Araştırılması

Dr. Serdar ÇEVİK

Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Saffet TÜZGEN

İSTANBUL

2014

ÖNSÖZ

Öncelikle beni bugünlere getiren, şu an burada olmamı sağlayan, sevgilerini hiç esirgemeyen annem, babam ve kardeşime;

Ve her zaman yanımda olan, desteğini ve sevgisini üzerimde hissettiğim, müstakbel eşim ve hayat arkadaşım Yüksel Aybüke KÖMÜRCÜOĞLU'na sonsuz TEŞEKKÜRLER.

Nöroşirürji uzmanlık eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, mesleki eğitimimde büyük katkısı olan, bizlere her durumda en iyi ortamı sunmaya çalışan, bana her zaman kişiliği ve iş ahlakı ile örnek olan, sevgili hocam Prof. Dr. Mehmet Yaşar KAYNAR'a; asistanlığımın son dönemlerinde bize tecrübeleri ve cerrahi becerisi ile ışık tutan sayın Rektörümüz ve değerli hocamız Prof. Dr. Saffet TÜZGEN'e; yetişmemde büyük katkısı olan, sakin tavırları, mesleki bilgisi ve insani yönden örnek aldığım, asistan dostu AD başkanımız Yrd. Doç. Dr. Op. Dr. M.Hakan SEYİTHANOĞLU'na; nöroşirürjiyi belki de en çok seven ve en özverili olarak çalışan, hayatını bu mesleğe adadığını düşündüğüm, bana her zaman sert de olsa içten tavırları ile yaklaşan, yetişmemde en fazla katkı sahiplerinden biri olan, ağabeyim Doç. Dr. Hakan HANIMOĞLU'na; asistanlığımıza başladığım dönemde kısa bir süre de olsa bir dönem deneyimlerinden yararlandığımız, pratik ve becerikli, işine özveriyle bağlı ağabeyimiz Doç. Dr. Erhan EMEL'e ve ablamız Doç. Dr. Feyza Karagöz GÜZEY'e çok teşekkür ederim.

Her zaman bana destek olan, kendime güvenmemi sağlayan, tezimin hazırlanmasında yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Prof. Dr. İhsan SOLAROĞLU'na; tezimin hazırlanmasında en az benim kadar özveri ile çaba sarf eden ve asistanlığım boyunca maddi, manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Op. Dr. Serkan KİTİŞ'e; tezimin hazırlanmasında bana yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Sedat ZİYADE'ye çok teşekkür ederim.

Birlikte çalıştığım ve çok şey öğrendiğim, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim, bir aile oluşturduğumuz, Op. Dr. Meliha Gündoğ PAPAĞER'e, Yrd. Doç. Dr. Mustafa Aziz HATİPOĞLU'na, kıdemlilerim Op. Dr. Burak EREN'e, Op. Dr. Murat KARACAN'a, Op. Dr. Kazım DOĞAN'a; Op. Dr. Şeref ÖZTÜRK'e, Op. Dr. Tolga Turan DÜNDAR'a, ve asistan arkadaşlarım Dr. Şevket EVRAN'a, Dr. Enes AKKAYA'ya, Dr. Fatih ÇALIŞ'a ve Dr. Abdurrahim Tekin'e;

Nöroşirürji eğitimimde bana her anlamda destek olan yıllar boyu kahrımı çeken Bezmi Alem Vakıf Üniverstesi Tıp Fakültesi Hastanesi Nöroşirürji Servisimizin ve ameliyathanemizin çok değerli hemşireleri ve personeline çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
GRAFİKLER DİZİNİ.....	v
RESİMLER DİZİNİ.....	vi
KISALTMALAR	vii
ÖZET.....	1
ABSTRACT	2
1.GİRİŞ	3
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1.Beyin Tümörleri Sınıflandırılması:	4
2.2.Glioblastome Multiforme(GBM) :	5
2.2.2. Patoloji:	6
2.2.3. Moleküler Patogenez ve Genetik:	7
2.2.4. Görüntüleme Teknikleri:	11
2.2.5. Tedavi:.....	12
2.2.6. Prognoz:	15
2.3.EGFR.....	16
2.4. VEGF	19
2.5.Eritropoetin	21
2.6.Eritropoetin Reseptörü	21
3.MATERYAL METHOD.....	24
3.1.Hasta Seçimi:	24
3.2.İmmünohistokimyasal Boyama:.....	24
4.BULGULAR	25
4.1.immünohistokimyasal Boyanma Sonuçları.....	26
4.2.Spearman Korelasyonu:	28
4.3.Sağ kalım Sonuçları:	29
4.4.Cox Regresyon Analiz Sonuçları	32
5.TARTIŞMA	33
5.SONUÇ	37
7.KAYNAKLAR	37

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1:WHO 2007 sınıflamasına göre SSS ‘nin Nöroepitelyal doku tümörleri.....	5
Tablo 2: Glioblastoma da genetik değişiklikler, mekanizmaları ve sıklıkları	7
Tablo 3:GBM tedavisinde kullanılan ve araştırmaları devam eden inhibitör ajanlar ve etki yolakları.....	15
Tablo 4: Gradelere göre median yaş ortalaması	26
Tablo 5: Gradelere göre EPOR, EGFR, VEGF boyanma derecelerinin dağılımını	26



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Primer ve Sekonder Glioblastoma'da genetik ve kromozomal değişiklikler	8
Şekil 2: GBM oluşumunda etkin RTK/RAS/PI3K sinyal yolağı:	10
Şekil 3: Glioblastoma suptipleri genetik ve kromozomal değişiklikler	11
Şekil 4: EGFR Sinyal Yolakları:	18
Şekil 5: VEGF Sinyal Yolakları:	20
Şekil 6:EPOR sinyal yolakları.....	23



GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1: Boyanma derecelerine göre EPOR, EGFR, VEGF'nin tüm hastalardaki görünümü	29
Grafik 2: EPOR spesifik yaşam eğrisi.....	30
Grafik 3: EGFR spesifik yaşam eğrisi.....	31
Grafik 4: VEGF spesifik yaşam eğrisi.....	32



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1:Yüksek gradeli olguda, yüksek pozitif İHK boyanma paternleri x200.....	27
Resim 2:Yüksek gradeli olguda, düşük pozitif İHK boyanma paternleri x200	27
Resim 3:Düşük gradeli olguda, negatif İHK boyanma paternleri x200	28



KISALTMALAR

AKT:	Aktin
ARF:	Alternative Reading Frame
BSA:	Bovin Serum Albümin
BT:	Bilgisayarlı Tomografi
c-IAP2:	c apoptozis inhibitör-2
CDK4:	Siklin Bağımlı Kinaz
CDKN2A:	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2
cDNA:	Komplementer DNA
dH ₂ O:	Distile Su
DNaz:	Deoksiribonükleaz
DNA:	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP:	Deoksinükleosit Trifosfat
DTT:	Dithiothreitol
EGFR:	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EPO:	Eritropoetin
EPOR:	Eritropoetin Reseptörü
FDG:	¹⁸ F-florodeoksiglukoz
G-CSF:	Granülosit Koloni Sitümüle Edici Faktör
GBM:	Glioblastoma Multiforme
GSK:	Glaskov Koma Skalası
GM-CSF:	Granülosit Makrofaj Koloni Sitümüle Edici Faktör
Gy:	Gray
HE:	Hemotoksilen-Eozin
HIF1:	Hipoksinin İndüklediği Faktör 1
HSP27:	Heat Şok Protein 27
HSP70:	Heat Şok Protein 70
İHK:	İmmünohistokimyasal
IDH:	İzositrat Dehidrogenaz
kD:	kilo Dalton
KT:	Kemoterapi
LOH:	Heterozigosite Kaybı
MAPK:	Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz

MBD:	Membran Desalting Buffer
MDM:	Mürin Double Minute
MRG:	Manyetik Rezonans Görüntüleme
mRNA:	Mesenger Ribonükleik asit
MRS:	Proton Magnetik Rezonans Spektroskopi
mTOR:	Mammalian Target of Rapamycin
NF- κ B:	Nükleer Faktör κ B
P53:	Tümör Baskılayıcı Protein 53
p70S6K:	p70 Ribozomal S6 Kinazı
PAGE :	Polyakrilamide jel
PBS:	Fosfat Tuz Tamponu
PDGF:	Platelet Kökenli Büyüme Faktörü
PDGFR:	Platelet Kökenli Büyüme Faktörü
PDGFRA:	Platelet Kökenli Büyüme Faktörü Reseptörü A Protein
PKD1:	Fosfoinosit Bağımlı Kinaz 1
PET:	Pozitron Emisyon Tomografisi
PI3K:	Fosfotil İnositol 3 Kinaz
pRB1:	Retinoblastom Yatkınlık Lokusu Protein 1
PKB:	Protein Kinaz B
PL:	Fosfolipaz
PMSF:	Fenil Metil Sulfonil Folorür
PNET:	Primitif Nöroektodermel Tümör
PTEN:	Fosfat ve Tensin Homolog
PVDF:	Polivinilid Florür
RNA:	Ribonükleik Asit
RNAaz:	Ribonükleaz
RPM:	Dakikadaki Devir Sayısı
RT:	Radyoterapi
RTK:	Tirozin Kinaz Reseptörü
SPECT:	Single Photon Emisyon Tomografisi
SSS:	Santral Sinir Sistemi
STAT5:	Sinyal Transducer ve Aktivatör Transkripsiyon 5
TBS-T:	Tris-Borik Asit Testi

TcHMPAO: Tc 99m Hekzametilpropilen Amin–oksim
WHO: World Health Organization
XIAP: X-linked Apoptozis inhibitör
VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGF(R) : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (Reseptör)
201 TI : Talyum 201



ÖZET

AMAÇ:

Bu çalışmanın amacı, yüksek dereceli glial doku tümörlü hastalarda Eritropoetin Reseptörü (EPOR), Epidermal Büyüme Faktörü (EGFR), Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) seviyelerinin araştırılması ve bu bulguların hastaların sağ kalım süreleri ile ilişkisini değerlendirmektir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER:

Bezmialem Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin Cerrahi Anabilim Dalı'nda 2013-2014 yılları arasında ameliyat edilen 26 yüksek dereceli ve 5 düşük dereceli tümör dokusu çalışmaya dahil edildi. İmmünohistokimyasal olarak tümör dokularında EPOR, EGFR, VEGF boyanma paternleri değerlendirildi. Tümör dokuları boyanma şiddetine göre (1+), (2+) ve (3+) olarak derecelendirildi. Sonuçlar sağ kalım süreleri ile karşılaştırıldı.

BULGULAR:

EPOR 1(+) boyanan grupta median sağ kalım 8 ay (95% confidence interval [CI] 0,954 – 15,046 ay) ve EPOR 3(+) olanlarda median sağ kalım; 2 ay (95% confidence interval [CI] 0,400 – 3,600), EGFR ile boyanmayan grupta median sağ kalım; 10 ay (95% confidence interval [CI] 1,041-18,959) ve EGFR 3(+) olanlarda median sağ kalım; 5 ay (95% confidence interval [CI] 1,494 – 8,506), VEGF ile boyanmayan grupta median sağ kalım; 16 ay (95% confidence interval [CI] 3,522 – 28,478 ay) ve VEGF 3(+) olanlarda median sağ kalım; 3 ay (95% confidence interval [CI] 0 – 7,809) olarak bulundu. (Kaplan Meier; EPOR (p=0.002), EGFR (p=0.003), VEGF (p=0.006))

SONUÇ:

Bu sonuçlar, EPOR, EGFR, VEGF seviyeleri ile ortalama yaşam süresi arasında ters orantı olduğunu göstermiştir. Bu moleküllere yönelik tedavinin yüksek gradeli glial tümörlü hastaların survisine yararlı etkilerinin olabileceğini düşündürmektedir.

ABSTRACT

AIM:

In this study; the investigation of Eritropoetin Receptor (EPOR), Epidermal growth factor receptor (EGFR) vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in high grade glial tumor patients and the relation between survival and these findings were aimed.

MATERIAL AND METHODS:

26 high grade and 5 low grade glial tissue which operated in Bezmialem Medical Faculty Neurosurgery Department between 2103-2014 were evaluated. EPOR, EGFR, VEGF staining results in tumor tissue were evaluated immunohistochemically. Tumour tissues was classified as (1+), (2+) and (3+) according to staining level. The results were compared with survival time.

RESULTS:

Median survival time in EPOR 1+ stained group is 8 ay ± 3.59 (%95'ci 0,954 – 15,046) and EPOR 3+ stained group is 2 ay $\pm 0,81$ (%95'ci 0,400 – 3,600), the group which was not stained with EGFR is 10 ay $\pm 4,57$ (%95'ci 1,041-18,959) and EGFR 3+ stained group is 5 ay $\pm 1,78$ (%95'ci 1,494 – 8,506), the group which was not stained with VEGF is 16 ay $\pm 6,36$ (%95'ci 3,522 – 28,478) and VEGF 3+ stained group is 3 ay $\pm 2,44$ (%95'ci 0 – 7,809). (Kaplan Meier; EPOR (p=0.002), EGFR (p=0.003), VEGF (p=0.006))

CONCLUSION:

These findings suggest that there is an inverse correlation between level of EPOR, EGFR, VEGF and median survival time. Treatment targeting to decrease these molecules may be beneficial effects on' survival time of patients with high grade glial tumours.

1.GİRİŞ

Glioblastome Multiforme (GBM), astrositlerden köken aldığı düşünülen, agresif bir beyin tümörüdür. Beynin en sık görülen, primer habis tümörüdür. GBM, kanser nedeniyle ölümlerin %3-4'ünden sorumludur.[63] Beklenen 5 yıllık yaşam oranı, her yaş grubunda %5 'ten azdır. Her yaşta görülebilmeye karşın, 65-74 yaşları arasında pik yapar.

Maksimum cerrahi rezeksiyon, rezeksiyon kavitesine radyoterapi(RT) ve adjuvan kemoterapi (temozolomid) standart tedavi protokolü olarak kabul görmektedir.[101] Sadece cerrahi yapılan hastalarda ortalama yaşam süresi 6 ay, cerrahi sonrası RT alan hastalarda 12.1 ay ve adjuvan temozolomid alan hastalarda 14.6 aydır.[102]

GBM'nin genetik temelleri anlaşıldıkça, yeni tedavi seçenekleri oluşmaktadır. GBM'nin yüksek derecede heterojen tümör olması, tedavi protokollerinin standart bir tedavi protokolü oluşturmasını engellemektedir. GBM patogenezinde ve malignensinde; tekrarlayan veya tekrarlamayan genetik değişiklikler, sitogenetik olarak kolon kayıpları, yolaklardaki aktivasyonlar, genetik mutasyonlar etkili olmaktadır. [4,93] Bu sebeplerden kaynaklı son zamanlarda, moleküler hedefli tedavi yaklaşımları oluşmaktadır.

Epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) geninin amplifikasyonu, glioblastomların %40'ında bulunmuştur. Artmış EGFR ekspresyonu, tümörde büyümeye neden olması yanında artmış proliferasyon, invazyon, kemoradyoterapiye direnç ve dirençli apoptoza sebep olur.[100]

GBM'de nekrotik alanlarda daha fazla oranda vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) mRNA'sının bulunması, hipoksinin tümör dokularında anjiogenezisi arttırdığını düşündürmektedir. Hipoksi, glioblastom hücrelerinde VEGF ligandının ekspresyonunu artırırken, tümör endoteliumunda da VEGF reseptörlerinin ekspresyonunu artırır.[38,81] VEGF'nin patolojik anjiogenezdeki mekanizmasının önemini anlaşılması ile anti-VEGF antikoları ve VEGF reseptör inhibitörleri üzerine birçok çalışma yapılmıştır.[32,93] Yeni tedavi stratejileri geliştirilmeye hala devam edilmektedir.

Eritropoetin reseptörü (EPOR), eritropoezisin primer regülatörü olarak bilinir. Aynı zamanda, santral sinir sistemi içerisinde EPOR sinyal yolları nöroprotektif etki etmekte ve kan beyin bariyerinin korunmasında da rol almaktadır. [68]

Ancak EPOR'un son yapılan araştırmalarda tümör büyümesinde ve onkolojik tedavide de anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. EPOR yolağı, neoplastik hücrelerin iyonize

radyasyon ve kemoterapiye dirençli olmasında katkı sağlamaktadır.[6] Moleküler hedefli onkolojik tedavi stratejileri için yeni potansiyel hedef konumundadır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Beyin Tümörleri Sınıflandırılması:

Santral sinir sistemi tümörleri çok çeşitlilik göstermesi nedeniyle, herkes tarafından kabul gören bir sınıflandırma yapabilmek zordur. Günümüzde sınıflandırma patolojiye göre yapılmaktadır.[63] Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) tarafından en son sınıflama 2007'de güncellenmiştir.(Tablo 1) Bu sınıflandırmaya göre sinir sisteminin başlıca tümörleri;

1. Nöroepitelyal,
2. Metastatik,
3. Germ hücreli tümörler,
4. Kranial ve paraspinal sinirlerin tümörleri,
5. Meninksin tümörleri,
6. Sellar bölgenin tümörleri,
7. Lenfomalar ve hematopoietik neoplazmlardan oluşur.

Astrositolar, yapılan bu sistemde nöroepitelyal tümörler içerisinde yer almaktadır. (Tablo1) Histopatolojik olarak 4 dereceye ayrılır. Piloitik astrositom ve subependimal astrositom grade 1 olarak değerlendirilir ve iyi farklılaşmış gliomlardır. Diffuz astrositom grede 2'dir. Anaplastik astrositom (malign astrositom, yüksek dereceli astrositom) grade 3'tür. Beyin tümörlerinin en malign tümörü, glioblastome multiformedir ve grade 4 olarak kabul edilir.[48]

Nöroepitelyal doku tümörleri			
<i>Grade</i>		<i>Grade</i>	
1. Astroitik tümörler		6. Diğer nöroepitelyal tümörler	
Pilositik astrositoma	I	Astroblastom	III
Pilomiksoid astrositoma	II	Üçüncü ventrikülün kordoid gliomu	II
Subependimal dev hücreli astrositom	I	Angiosentrik gliom	I
Pleomorfik ksantroastrositoma	II	7. Nöronal ve mixt nöroglial tümörler	
Diffüz astrositoma	II	Serebellumun displastik gangliositomu	I
Anaplastik astrositom	III	Desmoplastik infantil astrositom / gangliogliom	I
Glioblastom	IV	Disembriyoplastik nöroepitelyal tümör	I
Dev hücreli glioblastom	IV	Gangliositoma	I
Gliosarkom	IV	Ganglioglioma	I
2. Oligodendroglial tümörler		Anaplastik gangliogliom	III
Oligodendroglom	II	Santral nörositom	II
Anaplastik oligodendroglom	III	Ekstraventriküler nörositom	II
3. Oligoastroitik tümörler		Serebellar liponörositom	II
Oligoastroitom	II	Papiller glionöral tümör	I
Anaplastik oligoastroitom	III	Dördüncü ventrikülün roset formasyonlu glionöral tümörü	I
4. Ependimal tümörler		Paragangliom	I
Subependimom	I	8. Pineal bölgenin tümörleri	
Miksopapiller ependimom	I	Pineositom	I
Ependimom	II	Pineoblastom	IV
Anaplastik ependimom	III	Orta derecede diferansiyasyon gösteren pineal parenkimal tümör	II/III
5. Koroid plexus tümörleri		Pineal bölgenin papiller tümörü	II/III
Koroid pleksus papillom	I	9. Embriyonal tümörler	
Atipik koroid pleksus papillomu	II	Medulloblastom	IV
Koroid pleksus karsinomu	III	SSS primitif nöroektodermel tümör (PNET)	IV
		Atipik teratoid/rabdoid tümör	IV

Tablo 1:WHO 2007 sınıflamasına göre SSS ‘nin Nöroepitelyal doku tümörleri

2.2.Glioblastome Multiforme(GBM) :

Yetişkinlerde saptanan en yaygın primer beyin tümörü Glioblastoma Multiforme (GBM)'dir. GBM, tüm beyin tümörlerinin %20-25'ini oluşturur ve kanser nedeniyle ölümlerin %3-4'ünden sorumludur ve oldukça kötü prognoza sahiptir. Beklenen 5 yıllık yaşam oranı, her yaş grubunda %5'ten azdır.[63] Her yaşta görülebilmeye karşın, 65-74 yaşları arasında pik

yapar. Erkek kadın oranı 1.58/1'dir. İnsidansının etnik grup ve coğrafi koşullarda farklılık gösterdiği düşünülmektedir; beyaz ırkta, afriko-amerikanlara göre 2 kat daha sık görülmektedir.[17]

GBM gelişiminde etki eden faktörler henüz tam olarak tespit edilememiştir. İleri sürülen birçok teoriye rağmen kesin bir kaniya ulaşılmamıştır. Risk faktörleri içerisinde en önemlisinin radyasyon olmasının yanı sıra travma, hormonal faktörler, genetik ve çevresel faktörlerin de üzerinde durulmaktadır.[18, 63, 83]

GBM'lerin, ailesel birtakım hastalıklar (nörofibromatozis, tuberoz skleroz, li-fraumeni sendromu, turcot sendromu) ile birliktelik gösterdiği bildirilmiş olsa da, bu tüm GBM olgularının %5'lik kısmını oluşturmaktadır.[28]

2.2.1. GBM'de Klinik Özellikler:

GBM genellikle supratentoryal yerleşim gösteren, sıklıkla frontal ve paryetal lobları tutan infiltratif tümörlerdir. Santral sinir sistemin her yerinde tutulum yapabilirler. Hastalar genellikle nonspesifik semptomlar (baş ağrısı (%68), motor defisit(%44), nöbet(%32)) ile başvurur. İntrakranial basınç artışına bağlı semptomlarda (bulantı, kusma, kognitif değişiklikler) sık görülür.[20]

GBM'nin neden olduğu semptomlar kitlenin lokalizasyonuna, çevresel ödemine, infiltrasyonu ve çevre dokuya yapmış olduğu basıya göre değişiklik gösterebilir. Frontal lob tutulumuna bağlı olarak anosmi, kognitif bozukluklar, olfaktor halusilasyonlar, temporal tutulumuna bağlı olarak nöbet ve yakın hafıza kayıpları, paryetal tutluma bağlı olarak hemipleji, hemiparezi, afazi, agnozi, kortikal apreksi ve oksipital lob tutulumuna bağlı olarak ise görme alanı bozuklukları görülebilir.[20]

2.2.2. Patoloji:

GBM'ler genellikle ilkel astrositle benzeyen hücrelerden oluşmuş, diffüz ileri derecede infiltratif intraaksiyel tümörlerdir. Makroskopik olarak çevre normal dokudan iyi sınırlarla ayrılmasına karşın, mikroskopik olarak normal doku içerisine de infiltrasyonları görülmektedir.[63]

Histolojik ve sitolojik olarak değişik varyasyonlar gösterir. Genellikle pleomorfik, hiperkromatik nükleus ve geniş stoplazmalı hücrelerin düzensiz karışımından oluşur. Palizatlaşan nekroz ve mikrovasküler proliferasyon GBM tanısı için karakteristik iki özelliktir.[33]

2.2.3. Moleküler Patogenez ve Genetik:

Fizyolojik koşullarda doku gelişimi protoonkogen ve tümör süpresör genlerin kontrolündedir. Canlının gelişimi sırasında büyümeden, doku rejenerasyonu ve tamirinden sorumlu genlere, proto-onkogen denir. GBM'lerde moleküler bozukluğun sebebi, proto-onkogenlerin fazla ekspresyonu veya tümör süpresör genlerin az ekspresyonu olarak özetlenebilir.[93]

GBM'lerde çok sayıda onkogen saptanmıştır ve fazla aktif onkogenler genellikle tirozin kinaz reseptörü (RTK) –ras-AKT mekanizmasına aittir. (EGFR, PDGFR, PDGF) GBM'lerde kaybedilen çoğu tümör süpresör gen ise, hücre döngüsünde rol almaktadır. (Rb, p16, p53, p14, cyclin D, cyclin depended kinase 4 (CDK) (Tablo 2).[46,93]

Gen	Kromozom	Mekanizma	Sıklık (%)
MGMT	10q26	Metilasyon	75
NF1	17q11	Mutasyonla İnaktivasyon	-
NF2	22q11	Delesyon	-
EGFR	7q21	Amplifikasyon	40-60
EGFRvIII	7q21	Amplifikasyon	20-30
MDM2	12q15	Amplifikasyon	10
MYC	8q24	Amplifikasyon	-
PDGFRA	4q12	Amplifikasyon	65
RB1	13q14	Mutasyonla İnaktivasyon	30
PTEN	10q23	Mutasyonla İnaktivasyon	40-60
p53	17p13	Mutasyonla İnaktivasyon	30-60
p16-p14	9p21	Homozigot Delesyonu	50
p16INK4a	9p21	Delesyon ve Metilasyon	40-60

Tablo 2: Glioblastoma da genetik değişiklikler, mekanizmaları ve sıklıkları [46]

GBM'ler klinik ve moleküler faktörler göz önüne alınarak primer ve sekonder olmak üzere ikiye ayrılırlar.(Şekil 1) Primer GBM'ler, direkt olarak daha önceden düşük grade'li astrositom olmadan oluşurlar. Buna karşın, sekonder olanlarda önce düşük gradeli astrositom oluşur, sonrasında GBM'ye dönüşürler.[46]

Primer glioblastom birçok anormalliğin görüldüğü alt tiptir. Epidermal Growth Faktör (EGFR) amplifikasyonu ve mutasyonu, PTEN'de delesyonlar, Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2 (CDKN2A) (p16)'da homozigot delesyonlar, Mouse Double Minute 2 (MDM2) fazla ekspresyonu ve kromozom 10q23'te heterozigosite kaybı (LOH) en sık saptanan genetik

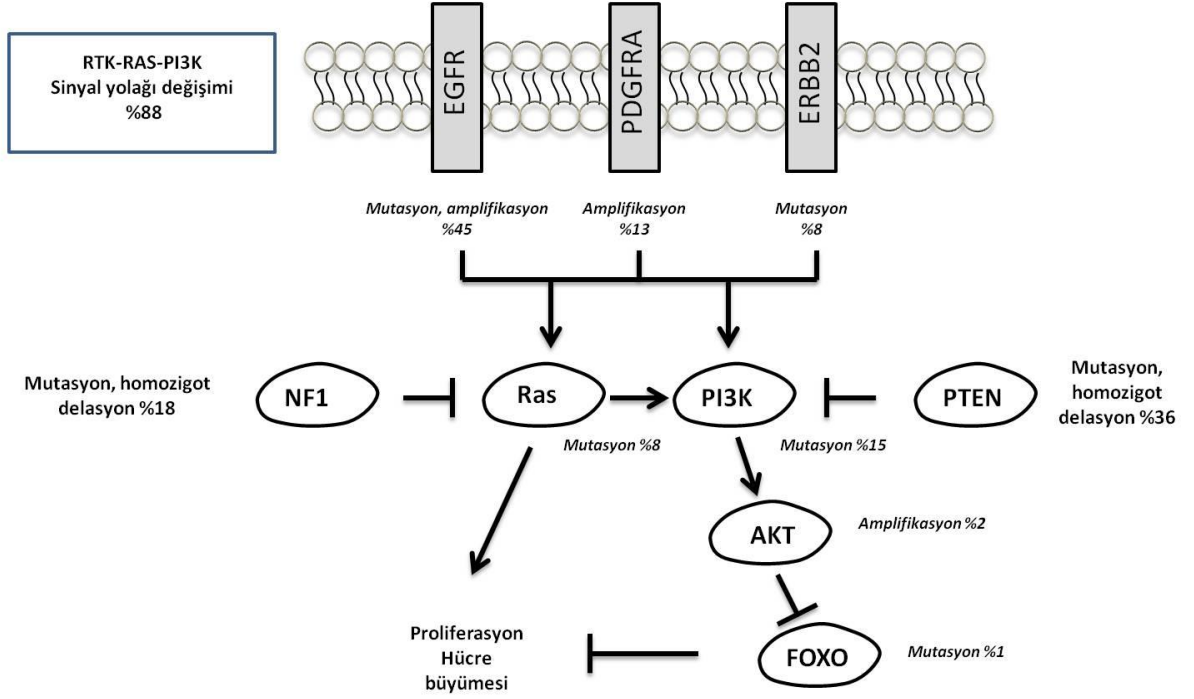
anaplastik astrositom ve sekonder glioblastom gelişmektedir. İsoisitrat dehidrogenaz 1 gen mutasyonu da yüksek oranda sekonder GBM'de görülmektedir.[114]

GBM' de saptanan ve canlılığı etkileyen 3 yolak bulunmaktadır; Tirozin Kinaz Sinyal Sistemi (RTK-RAS-MAPK-PI3KA), p53 yolağı (TP53,p14ARF,MDM2,MDM4) ve Retinablastom (RB) Yolağı (CDKN2A-CDKN2B, CDK4-CDK6, RB1).[11] Bunların içerisinde en önemli olanı Tirozin Kinaz Sinyal Sitemi yolağıdır. (Şekil 2) Tirozin Kinaz Reseptörlerinin (EGFR, PDGFR vb.) büyüme faktörleri ile aktive edilmesi sonucu, PI3K/Protein Kinaz B (PKB, AKT) yolağı aktifleşir ve Nükleer Faktör κB (NFκB) aracılığı ile proliferasyonu düzenleyen genlerin aktive edilmesi sağlanır. Tirozin kinazların aktivasyonu sonucu tetiklenen diğer bir yol ise; ras onkogeni aracılığı ile Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz (MAPK) yolağıdır. Bu yolağın aktivasyonu da, glia hücresinde yaşam ve büyümeyi kontrol eden genlerin ekspresyonunu sağlayan transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu tetikler.

GBM SUBTİPLERİ:

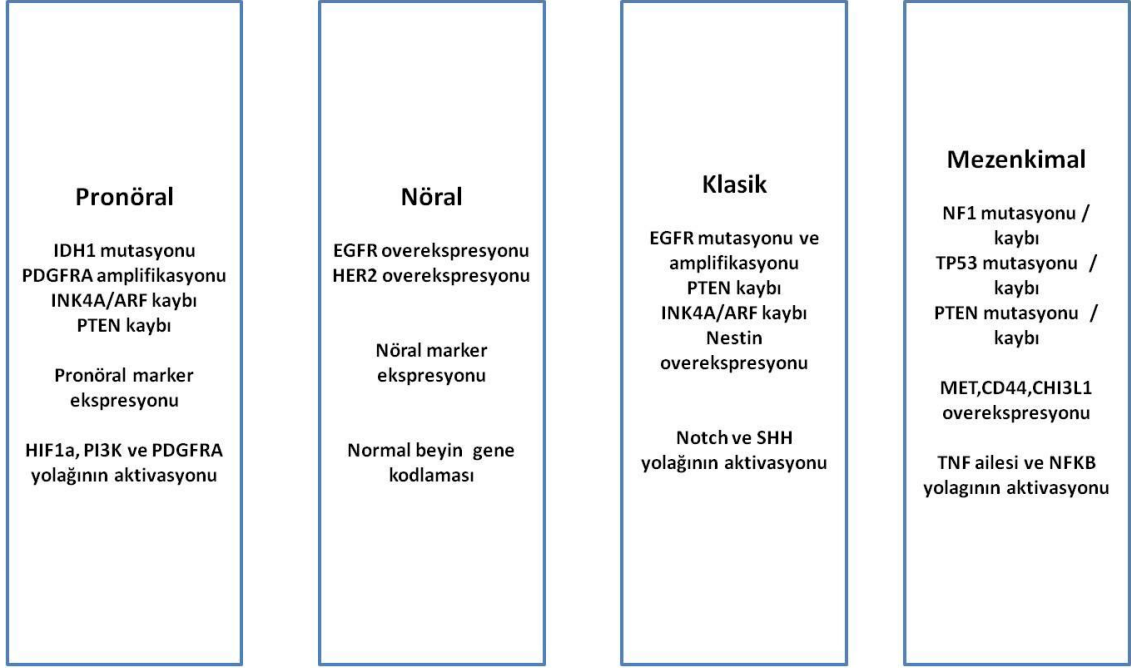
GBM'de altta yatan genetik değişikliklerin belirlenmesi, etkili tedavinin düzenlenmesinde kritik önem taşımaktadır. GBM, yapılan multigemomik profiller sonucu sınıflandırılmıştır.GBM; klasik, mezenkimal, pronöral ve nöral olarak 4 subtipe ayrılır. (Şekil 3)

Her subtip kendine özgü genetik değişiklikler ve ekspresyon profillerine sahiptir.[105] Klasik tip, genetik değişikliklerin en fazla görüldüğü tipidir. [105] Anormal EGFR aktivitesi ve EGFR overekspresyonu, kromozom 10 delesyonu ve p53, NF1 ve IDH1 mutasyonları en sık klasik tipe gözlenmektedir.[11, 105] Mezenkimal tipe de genetik değişiklikler sık görülmektedir. Mezenkimal tip NF1 gen değişikliği ile karakterizedir. PTEN delesyonu, PI3K/AKT/mTOR intraselüler yolakta yaptığı değişiklikler de mezenkimal tip için sıkça karşılaşılan özelliklerdendir. EGFR overekspresyonu diğer GBM suptiplerine oranla, mezenkimal tipe daha azdır.[105] Pronöral tip, GBM oligodentrosit hücresine benzer gen ekspresyonuna sahiptir. P53 mutasyonu, Platelet-Derived Growth Factor Reseptör (PDGFR) ve IDH1 ile karakterizedir.[33, 105, 114] PDGFR overekspresyonu birçok GBM hücresinde görülebilmektedir. Ancak fokal PDGFR gen amplikasyonuna bağlı overekspresyon sıklıkla pronöral tipe görülmektedir.[105]



şekil 2: GBM oluşumunda etkin RTK/RAS/PI3K sinyal yolağı:

H¼ce membranında b¼y¼me fakt¼rlernin bağlanması ile aktive olan Tirozin Kinaz Resept¼rleri (RTK), Ras ve PI3K'ı fosforilleyerek aktif hale ge¼irir. Aktifleřen bu yolaklar Akt üzerinden n¼kleolusta proliferasyonu sağlayan genlerin transkripsiyonu başlatır.



Şekil 3: Glioblastoma suptipleri genetik ve kromozomal değişiklikler [2]

2.2.4. Görüntüleme Teknikleri:

Kontrastsız Bilgisayarlı Tomografide (BT) GBM'ler genellikle hipodens görülürler. Kontrastlı BT'de, kontrast tutan düzensiz halka paterni alırlar. Nekrotik bölge hipodens olarak gözlenmekte aynı zamanda tümör çevresindeki ödem de hipodens olarak görülür. Genellikle kontrastlanma tümörün agresifliği ile doğru orantılıdır, ancak bu durum kural değildir. BT, tanı ve cerrahi rezeksiyon sonrası rezidüel tümörün boyutunu belirlemek için de kullanılmaktadır.

Günümüzde GBM tanısında cerrahinin ve radyoterapinin planlamasında Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG), BT'nin büyük ölçüde yerini almıştır. Gerek yumuşak doku anatomisini daha iyi göstermesi, gerekse multiplanar görüntü sağlaması MRG'ye bu konuda büyük üstünlük sağlamaktadır. MRG'de glioblastom heterojen kitle şeklinde görünür. Bu heterojen görünüm nekroz ve/veya kist oluşumuna bağlıdır. T1 görüntüsünde genellikle santral yerleşimli hipointens alan mevcuttur. Bu hipointens alanı çevreleyen kalın, düzensiz duvar ve solid nodüller parankime göre izointens veya hafif hipointens sinyal paternine sahiptir. T2 incelemede heterojen yapıda hiperintens görünüm vardır. Çevresel ödem alanı T2 görüntüleme belirgindir.

İntravenöz gadolinyum sonrası yapılan incelemelerde opaklaşma çoğu zaman saptanır. Bu boyanma genellikle tümörün kalın, düzensiz duvarında halkasal olmaktadır. Her ne kadar MRG ilk tedavi için yeterli ise de gerek cerrahi, gerekse radyoterapi sonrasında dokümantasyon

için yeterli olmayabilir. Cerrahi sırasında oluşan travma ve inflamasyon nedeniyle 48 saat sonrasında 4 haftaya kadar kontrastlanma gösterebilmektedir. 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. Pozitron Emisyon Tomografi (PET) malign büyüme nedeniyle, metabolizması hızlı alanların farklılaşması sonucunda ortaya çıkan, doku değişkenliğini saptamaya yardımcı olan bir tanı yöntemidir. Single Photon Emisyon Tomography (SPECT) ve PET, tümör metabolizmasını anlamak ve radyasyon nekrozundan neoplaziyi ayırtetmek için kullanılmaktadır. Malign hücrelerin daha fazla glukoz kullandığının bulunması üzerine, 18F-Florodeoksiglukoz (FDG) ile, PET çalışmaları genişletilmiştir. FDG-PE'in tanı ve tümör yönetiminde kullanılması birçok fayda sağlamıştır. Malignensinin derecesi, biyopsi alanının lokalizasyonu, tedavi sonrası metabolizma ölçümleriyle tümör nüksünün tespiti ve tümör nüksünü radyasyon nekrozundan ayırtetmek olanaklı hale gelmiştir. Talyum 201 (201 TI) tutulumunun, tümörü çevre beyin dokusundan ayırt ettiğinin bulunması ile, stereotaksik biyopsi alanının lokalize edilmesinde kullanılmıştır. Tümör nüksünün teşhisinde oldukça duyarlı bir tekniktir. Radyasyona bağlı gelişen değişikliklerden, tümör nüksünü ayırt etmekte ise duyarlılığı yetersizdir. TI 201 ve Tc 99m heksametilpropilen amin–oksim (99mTcHMPAO)'in birlikte kullanımı ve bu maddelerin ardışık tutulumları sonucunda, radyasyon nekrozu ve nüks gliom ayırt edilebilmiştir. TcHMPAO, kan beyin bariyerini geçebilir. Nekrotik dokuda kan akımı azaldığı için, radyasyon nekrozunu tespit etmekte yardımcıdır.

Proton Magnetik Rezonans Spektroskopi (MRS) normal ve anormal doku metabolitlerini ayırt edebilir. Yaygın olarak choline, creatine, N-acetyl aspartate, lactate ve lipid metabolit pikleri kullanılır. Aktif tümör, genellikle normal dokudan daha fazla choline ve daha az n-acetyl-aspartate aktivitesi gösterir. Nekrotik dokuda lipid haricindeki metabolitlerin hepsinin genel olarak aktivitesi düşmüştür. Benzer olarak MR perfüzyon çalışmaları, aktif agresif tümördeki artmış kan volümünü ve nekrotik dokudaki azalmış kan volümünü gösterir.

2.2.5. Tedavi:

GBM hastalarının genellikle ilk tedavileri semptomatiktir. Çünkü henüz tanı patolojik olarak verifiye edilmemiştir. Beyin tümörlü hastaların %20 ile %40 arasında nöbet geçirme hikayesi vardır. Bu hastaların %20 ile %45' lik kısmı hastalığın seyri esnasında nöbet geçirecektir. Fakat profilaktik olarak antiepileptikler yeni teşhis edilmiş beyin tümörlerinde rutin olarak kullanılmamalıdır.[123] Bu amaçla sık kullanılan ajanlar; karbamezapin ve

phenytoindir. Asetaminofen gibi kodein içermeyen hafif analjezikler baş ağrısının kontrolünde kullanılabilir.

Maksimum cerrahi rezeksiyon, rezeksiyon kavitesine radyoterapi (RT) ve adjuvan kemoterapi (temozolomid) standart tedavi protokolü olarak kabul görmektedir. Sadece cerrahi yapılan hastalarda ortalama yaşam süresi 6 ay, cerrahi sonrası RT alan hastalarda 12.1 ay ve adjuvan temozolomid alan hastalarda 14.6 aydır.[102]

Cerrahi rezeksiyonda amaç, norolojik harabiyete sebep olmadan maksimum çıkartılmasıdır. Cerrahinin genişliği sağ kalımı arttıran en önemli faktördür. 2001 yılında Lacroix ve arkadaşlarının yaptıkları 416 vakalık seride %98' den fazla tümör rezeksiyonu yapılan hastalarda ortalama sağ kalım süresi 13 ay, %98'den az tümör rezeksiyonu yapılan hastalarda 8.8 ay olarak bulunmuştur.[125]

Konvansiyonel radyoterapi, tüm GBM hastalarında tedavinin vazgeçilmez parçasıdır. Tipik olarak erken postoperatif dönemde verilir. Genellikle rezeksiyon kavitesine ve 2 cm'lik çevre dokuya, 6 hafta boyunca ve haftanın 5 günü 2 Gy olarak fraksiyone, toplam 60 Gy dozunda verilir. Radyoterapinin diğer formları; steriotaksik radyoşirurji, brakiterapi ve particle beam terapi standart RT'den daha efektif değildirler.[102]

Kemoterapi de GBM tedavisinde önemli rol oynamaktadır. RT ile birlikte temozolomid kombine tedavi olarak 75 mg/m²/gün 6 hafta boyunca kullanılır. RT sonrası adjuvan olarak 150mg/m²/gün 4 haftalık periyotlarda 5 gün KT verilir ve 6 siklus tamamlanır.[102]

GBM nin genetik temelleri anlaşıldıkça yeni tedavi seçenekleri oluşmaktadır. GBM'nin yüksek derecede heterojen tümör olması, tedavi protokollerinin standart bir tedavi protokolü oluşturmasını engellemektedir. GBM patogenezinde ve malignensinde; tekrarlayan veya tekrarlanmayan genetik değişiklikler, sitogenetik olarak kolon kayıpları, yolaklardaki aktivasyonlar ve genetik mutasyonlar etkili olmaktadır.[4, 93] Bu sebeplerden dolayı, son zamanlarda moleküler hedefli tedavi yaklaşımları çok önem kazanmaktadır. (Tablo 3)

a) **Growth Faktör Yolağının İnhibisyonu:**

EGFR amplikasyonu, GBM'de en sık görülen genetik değişikliktir.[4] EGFR overekspresyonu tümör büyümesini, proliferasyonunu, anjiogenezisini ve invazyonunu arttırmaktadır.[69] Gefitinib ve erlotinib EGFR spesifik tirozin kinaz inhibitörleridir. İntraselüler EGFR'ye bağlanarak aktivasyonunu engeller ve sinyal yolağını baskılar.

PDGFR overekspresyonu da GBM'de sık görülen genetik değişikliklerdendir. PDGF otokrin sinyal sistemi ile tümör büyümesini ve entotlyal çevre dokudaki parakrin etkisiyle

anjiogenezi tetikler.[73] İmatinib küçük moleküllü multikinaz inhibitörüdür ve PDGFR'ye bağlanarak aktivasyonunu ve sinyal yolağını baskılar.

b) Anjiogenetik Yolakların İnhibisyonu:

GBM vasüler yapıdan çok zengin bir tümördür. Bunun sebebi de, anjiogenezin çok etkin olmasıdır.[80] Vasküler Endotelial Growth Faktör (VEGF) anjiogenez için en önemli mediatördür ve GBM'de yüksek oranda ekspresyon olur.[26, 29, 85] VEGF, klinik gidiş, nüks ve surviyi ile ilişkili bulunmuştur. [94] Küçük moleküllü inhibitör ajanlar ve monoklonal antikolar bu sinyal yolağını durdurmak için kullanıma girmiştir. Antianjiogenetik tedavi GBM için hedefe yönelik tedavi seçeneklerinde en etkili tedavi olduğu klinik çalışmalar ile desteklenmiştir.[85] Bevacizumab humanize monoklonal antikordur ve VEGF'ye bağlanarak nötralize eder.[51, 104] Klinik çalışmalarda, nüks GBM tedavisinde klinik yararlılığı ve surviyi arttırdığı görülmüştür.[107]

Cedarinib, sunitinib ve vatalanib VEGF'ye etkili multikinaz inhibitörleridir. Cilengitide de çalışma aşamasında olan selektive $\alpha\beta3$ ve $\alpha\beta5$ integrin inhibitörüdür.

c) İntraselüler Sinyal Yolakları İnhibitörleri:

Tirozin kinaz reseptörlerinin etkileşimi ile hücre içerisinde PI3K/AKT/mTOR ve RAS/RAF/MAPK sekonder mesaj yolakları aktifleşmektedir. GBM'de bu sekonder mesaj sisteminin sıklıkla disregülasyonu görülmektedir.[4] PTEN ve NFI, PI3K ve RAS'ın endojen inhibitörleridir ve GBM'de bu iki inhibitör mekanizmanın sıklıkla kaybı veya mutasyonu mevcuttur.[19] Rapamycin, temsirolimus, sirolimus ve everolimus küçük moleküllü mTOR inhibitörleridir. Yapılan klinik çalışmalarda bu ajanların klinik yararlılığı sınırlı kalmıştır.[19, 34, 84] Sorafenib de multikinaz RAF inhibitörüdür ve diğer ajanlar gibi sorafenibin de klinik yararlılığı sınırlıdır.[87] Bütün bunların yanında, biyolojik bazlı deneysel tedavi seçenekleri üzerinde halen çalışılmaktadır. Bunlara örnek olarak; gen tedavileri, immunoterapiler ve sitotoksik viral terapiler sayılabilir.

Yolak	İnhibe edilen hedef ajan	Mono- terapi	Kombine terapi
RTK	EGFR EGFRvIII VGFR and multi-RTK	Erlotinib Gefitinib Cetuximab mAb 806 AZD2171 Vatalanib Sunitinib malate AEE788 ZD6474 Lapatinib Sorafenib Pazopanib Tandutinib	Erlotinib + RT Erlotinib + Temozolomide, Erlotinib + Temozolomide, Erlotinib + Sorafenib Gefitinib + Everolimus Cetuximab + Temozolomide + RT Sorafenib + Temozolomide Pazopanib + Lapatinib
Signal transduction	Akt PKC mTOR	Perifosine Tamoxifen Enzastaurin AP23573 Everolimus Siroloimus Temozolomide	Tamoxifen + Bortezomib Everolimus + Temozolomide Temozolomide + RT
Ligand	VEGF	Bevacizumab VEGF-Trap	Bevacizumab+irinotecan
Other	$\alpha\beta3$ İntegrin Sp1 Trankripsiyon Faktör	Cilengitide Tetra-O-etil Norhidrogualaretik Asit	Cilengitide + RT

Tablo 3:GBM tedavisinde kullanılan ve araştırmaları devam eden inhibitör ajanlar ve etki yolakları

2.2.6. Prognoz:

Tanıda, cerrahide, radyoterapi ve kemoterapideki gelişmelere rağmen GBM'lerdeki ortalama sürvi yaklaşık olarak 14,6 aydır. Bununla beraber bazı hastalar 5 yıldan uzun yaşam süresine sahiptir. Hangi hastanın bu kategoriye gireceği tanı anında mümkün olmamakla beraber, bazı faktörler iyi prognoza işaret edebilir. 45 yaşından genç olmak, iyi fonksiyonel durum ve gross-total rezeksiyon iyi prognoza işaret eder. Bu klinik faktörlere ek olarak, bazı moleküler ve sitogenetik faktörler de prognozu etkileyebilir. Normal P53 değerleri, 1p, 19q kromozom delesyonları uzamış sürvi ile ilişkilendirilmiştir.

Yaklaşık 17000 vakalık bir çalışmada 1 yıllık sağ kalım oranı %33.67, 5 yıllık sağ kalım oranı %4.46 ve 10 yıllık sağ kalım oranı %2.70 olarak bulunmuştur.[17] Cerrahi rezeksiyon ve kemoterapi sonrası 6 aylık nüks oranı %66.7, 12 aylık nüks oranı %85.8' dir.[124]

2.3.EGFR

Kromozom 7q12.2'de bulunan EGFR sinyal yolu de novo glioblastom gelişmesinde temel genetik değişikliklerden biridir.[61] EGFR gen amplifikasyonu ilk olarak 1985 yılında tespit edilmiştir.[55] Daha sonrasında birçok yapılan çalışma ile de desteklenmiştir. EGFR, Tirozin Kinaz (TK) ailesinden bir transmembran proteini ve ErbB ailesinin bir üyesi olan reseptördür.[121] Büyüme faktörleri EGFR'nin ekstraselüler parçasına bağlanması ile intraselüler ortamda fosforillenen tirozin kinaz aktivasyonu sonucu hücre içi EGFR aktivasyonu başlar. [121] EGFR aktivasyonu ile Ras - Mitojen ile Aktive Protein Kinaz (MAPK), fosfotilinositol 3-kinaz (PI3K – AKT), sinyal transducer ve aktivatör transkriptiyon 3 (STAT3) fosfolipaz C (PLC) ve SRC/FAK yolağı gibi hücrenin çoğalması ve yaşamından sorumlu sinyal yollarının aktivasyonuna neden olmaktadır.(Şekil 4) [60,121]

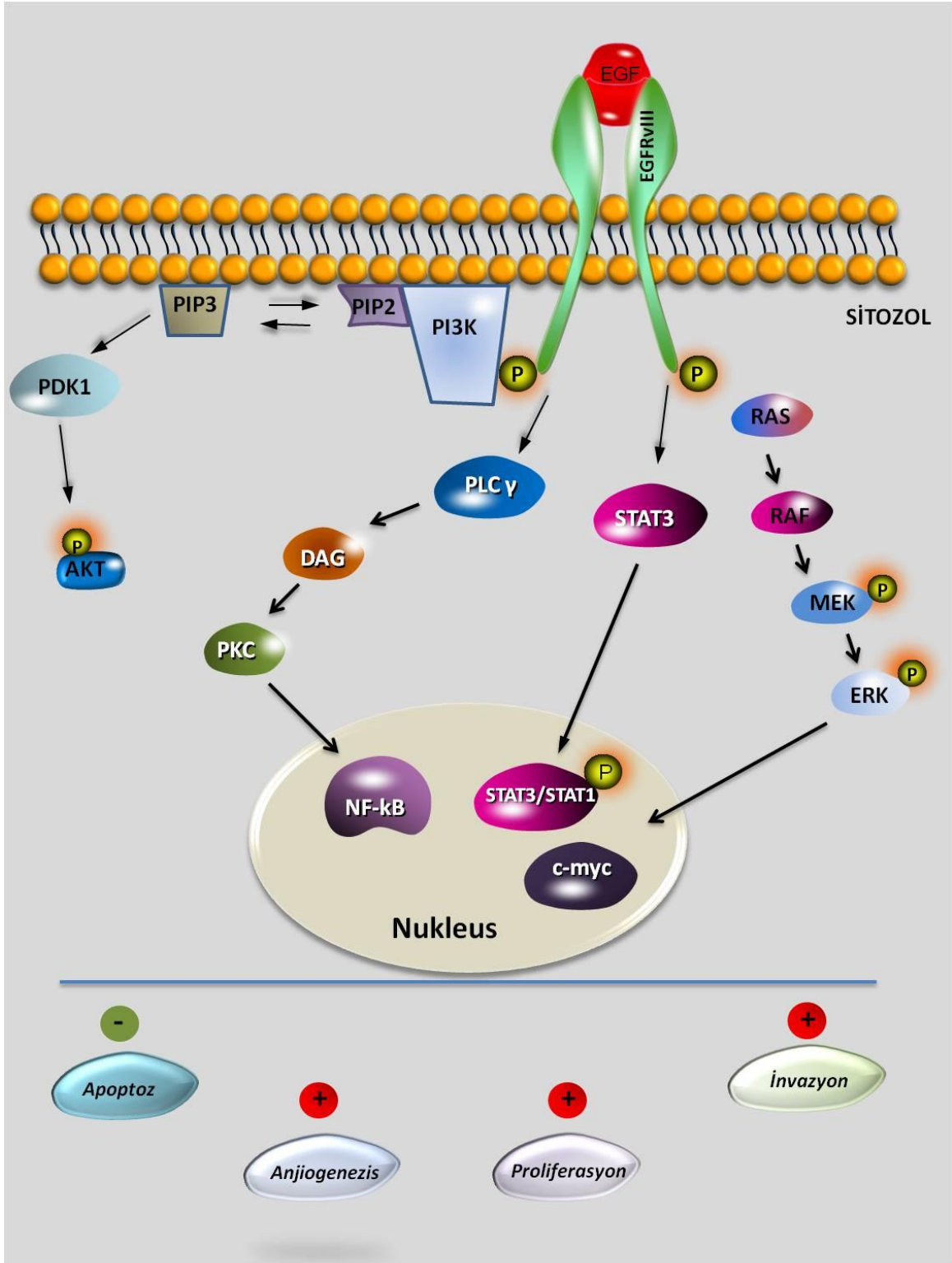
EGFR geninin amplifikasyonu, glioblastomların %40'ında bulunmuştur ve yaklaşık %50'sinde aşırı ekspresyona sebep olmaktadır.[33, 103] EGFR amplifikasyonu, sekonder GBM'de %8 oranında görülmesine karşın, primer GBM'de %40 oranında görülür ve primer GBM'de %60 oranında fazla ekspresyonu vardır. EGFR amplifikasyonu klasik tip GBM subtipi için karakteristiktir.[105] Fazla EGFR ekspresyonu tümörde sadece büyümeye sebep olmaz, ayrıca artmış proliferasyon, invazyon, kemoradyoterapiye direnç ve dirençli apoptoza sebep olur.[100]

EGFR'de en sık görülen mutasyon ise; gen delesyonu sonucu oluşan (6-273 aminoasit dizisi kaybı ve buna bağlı olarak ekzon 2-7 delesyonu) vIII varyantıdır. (EGFRvIII) EGFR amplifikasyonu olan glioblastomaların %20-40'ında vIII varyantı (EGFRvIII) belirlenmiştir.[90] EGFR vIII mutantının wild tip EGFR'den glioblastomda daha kötü prognoz etkeni olduğu bulunmuştur. [95]

EGFR sinyal yolları, biyolojik etkilerini 2 ana model üzerinden, sitoplazmik (geleneksel) ve çekirdek (nükleer), gösterirler.[12, 59] EGFR sitoplazmik etkileri 5 yolak üzerinden gerçekleştirir. Bunlar; PI-3K-Akt-mTOR, Ras-Raf-MAPK, JAK2-STAT3, PLC-gama-CaMK/PKC ve STAT3'dir. EGF (Epidermal Büyüme Faktörü), EGFR reseptörünün ekstraselüler parçasına bağlanınca, PI-3K hücre membranından aktifleşerek, fosfodilinositol-4-5 bifosfatı (PIP2) fosfatlayarak fosfodilinositol-3 fosfata (PIP3) dönüştürür. PIP3, AKT

(protein kinaz B) ve mTOR uyararak hücre proliferasyonunu artırır ve apoptozisi önler. [71] EGFR, sitoplazmik yollarından herhangi birini aktive ederek etkilerini oluşturabilir. Gene transaktivasyonu, tirozin fosforilasyonu ve protein-protein interaksyonu, EGFR'nin nükleer sinyal modelleridir. [23, 58, 108] Nükleer EGFR nükleoplazmada ve nükleer membranda bulunur. [49, 56, 58] EGFRvIII normal glial hücrede ve GBM hücresinde tespit edilmiştir. Nükleer EGFRvIII normal glial hücrelerde STAT 3 üzerinden etki ederek malign hücre oluşumunu sağladığı görülmüştür. Sonuç olarak; nükleer EGFR'nin gliomagenizde önemli rol aldığı düşünülmektedir. [60] GBM'de EGFR'nin amplifikasyonu sonucu oluşan ve hücre içi sinyal yollarının aktivasyonu ile hücre büyümesi ve proliferasyonun kontrol altına almak için, EGFR inhibitörleri (erlotinib, gefitinib) ile ilgili geliştirme çalışmaları devam etmektedir.[50]





Şekil 4: EGFR Sinyal Yolakları:

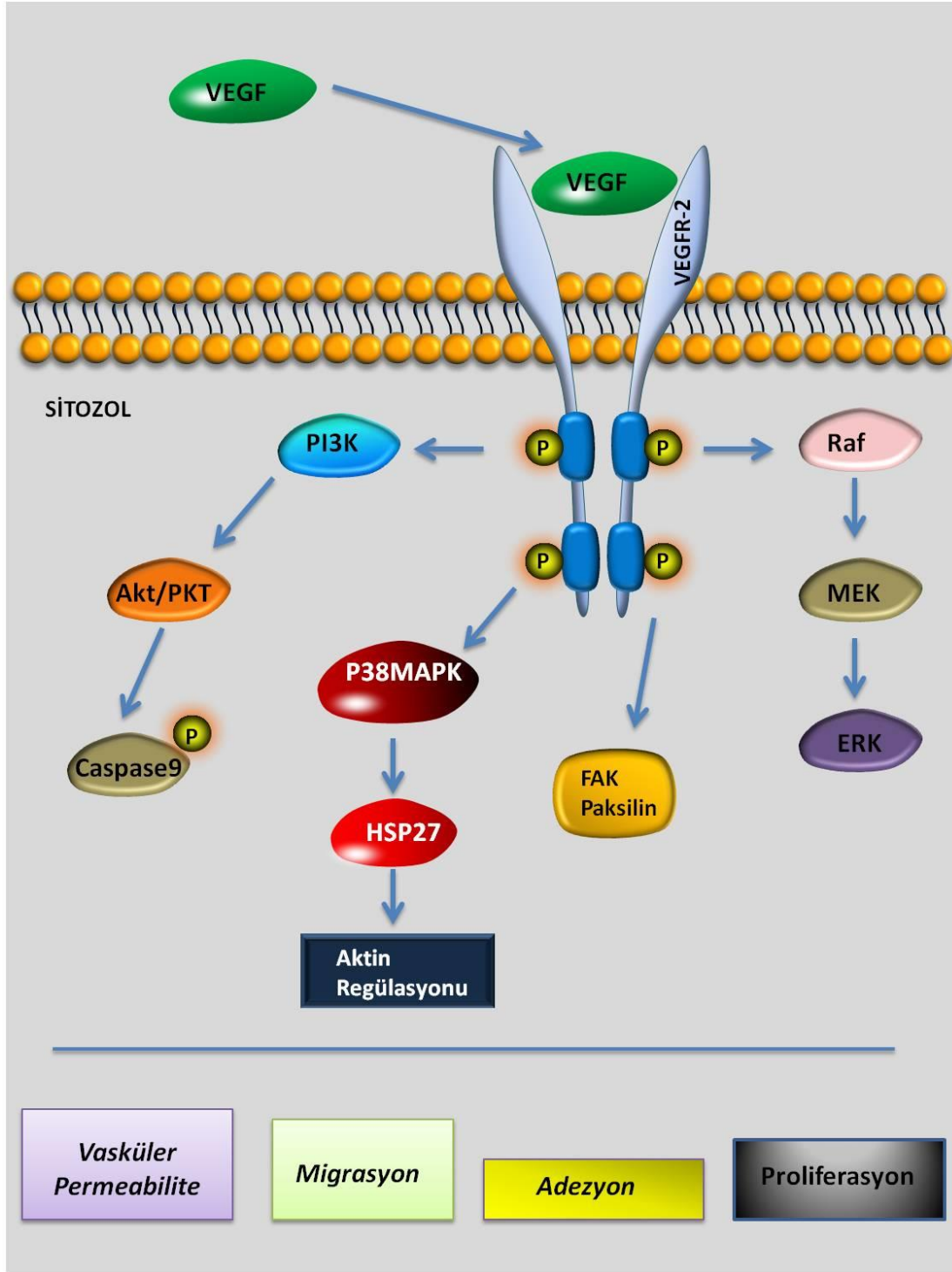
EGF hücre yüzeyinde transmembranöz restörüne bağlandıktan sonra birçok intraselüler yolağın aktivasyonuna sebep olmaktadır. EGFR'nin aktivasyonu ile RAS/ERK, PI3K/Akt, STAT3, PLCγ/PKC intraselüler yolaklar aktif hale gelir. Bu sinyal sistemleri nükleolusta gen regülasyonunu tetikleyerek hücre büyümesi, tümörögenesis, tümör proliferasyonu, kemoradyoresistansa sebep olur.

2.4. VEGF

Damar endotel hücrelerine özgü homodimerik glikoprotein yapısında heparin bağlayan büyüme faktörüdür. VEGF geni kromozom 6p21.3 üzerinde yer alır. Endotel hücrelerine özgün bir mitojen olan VEGF ailesi, beyinde görülen hem fizyolojik hem de patolojik anjiogeneze önemli rol oynar.[64] Endotel hücreleri üzerinde salgılanan VEGF, transmembran trozin kinaz reseptörlerine bağlanarak endotel aktivasyonuna, vasküler geçirgenliğe ve anjiogenezin artmasına yol açar. (Şekil 5) [81] VEGF ekspresyon seviyesi, gliom malignite derecesi ile ilişkilidir ve glioblastom dokusunda VEGF'nin 50 kat fazla eksprese edildiği gösterilmiştir.[109]

GBM'de nekrotik alanlarda daha fazla oranda VEGF mRNA'sının bulunması hipoksinin tümör dokularında anjiogenezisi arttırdığını düşündürmektedir. Hipoksi, glioblastom hücrelerinde VEGF ligandının, tümör endotelyumunda da VEGF reseptörlerinin ekspresyonunu artırır.[81] Gliomlarda görülen vasküler geçirgenlik, kan-beyin bariyerinin ortadan kalkması ve ödem oluşumu, VEGF ekspresyonunun fazla ekspresyonu ile ilişkilidir. [101] Peritümoral ödem dolayısıyla artan intrakranial basınç, klinik olarak hızla kötüye gidişe neden olur. Brem ve arkadaşları, gliomların derecelendirmesinde endotelial hiperplazinin, damar proliferasyonunun tümör evresi ile ilişkili olduğunu düşünmüşler ve yüksek VEGF seviyelerinin ortalama yaşam süresini kısalttığını göstermişlerdir. [9]

VEGF'nin, patolojik anjiogenezdeki mekanizmasının önemini anlaşılması ile anti-VEGF antikoları ve VEGF reseptör inhibitörleri üzerine birçok çalışma yapılmıştır ve halen yeni tedavi stratejileri geliştirilmeye çalışılmaktadır.



Şekil 5: VEGF Sinyal Yolakları:

VEGF hücre membranında VEGFR-2'ne bağlandıktan sonra intraselüler ortamda RAF/MEK/ERK yolağını aktifleştirerek hücre proliferasyonunu, MAPK/HSP27 aktivasyonu ile hücre migrasyonunu, PI3K/Akt aktivasyonu ile kaspas 9'u fosforilleyerek vasküler permeabilite artışına sebep olmaktadır.

2.5.Eritropoetin

Eritropoetin (EPO), primer olarak eritropoezi uyaran 165 aminoasit zincirinden oluşan, 30.4kDa ağırlığında 4 adet oligosakkarid zincirine sahip, glikoprotein yapıda bir hormondur.[70] Eritropoezisin bir hormon tarafından uyarıldığı 1906 yılında Fransız bilim adamları tarafından bulunmuştur. EPO, fetal yaşam boyunca kırmızı kan hücrelerinin yapımından sorumludur. Neonatal ve erişkinde ise, eritroid prekürsör hücrelerin apoptozisini önleyerek, normoblasta dönüşümünü proliferere eder, diferansiyasyonunu sağlar.[112] EPO reseptörüne bağlandıktan sonra hücre yüzeyinde reseptörünün hemodimerizasyonunu indükler ve Janus Kinaz 2 (JAK2) / Sinyal Transducer ve Aktivatör Transkripsiyon 5 (STAT5) sinyal kaskadını aktive eder. Reseptörünün fosforilasyonu ile nükleer transkripsiyon başlar. Hedef gen transkripsiyonu başlatır ve sonuç olarak, eritrositin proliferasyonu ve diferansiyasyonu gerçekleşir. [70]

EPO, en sık böbreklerde (korteksteiki peritubuler hücreler) üretilir ve primer olarak eritrosit üretiminin kontrolünden sorumludur. Bunun yanı sıra EPO, pleiotrofik bir sitokindir ve nonhemotopoetik hücreler üzerinde de biyolojik etkileri bulunmaktadır.[88] Nonhemotopoetik (endotel, miyokard, mezenkim, glial) hücrelerde mitozu uyararak proliferasyonu ve diferansiyasyonu indüklediği ve aktive ettiği bilinmektedir.[88]

2.6.Eritropoetin Reseptörü

Eritropoetin reseptör geni, 1989 yılında fare eritro lösemi hücrelerinden klonlanarak bulunmuştur.[120] Beyin, kalp, böbrek, retina, düz kas hücreleri ve vasküler endotel gibi çeşitli dokularda, nöronal hücreler üzerinde EPOR tespit edilmiştir.[3] Santral sinir sistemi içerisinde EPO reseptörünün en sık bulunduğu yerler; kapsula interna, hipokampus, korteks ve orta beyindir.[35]

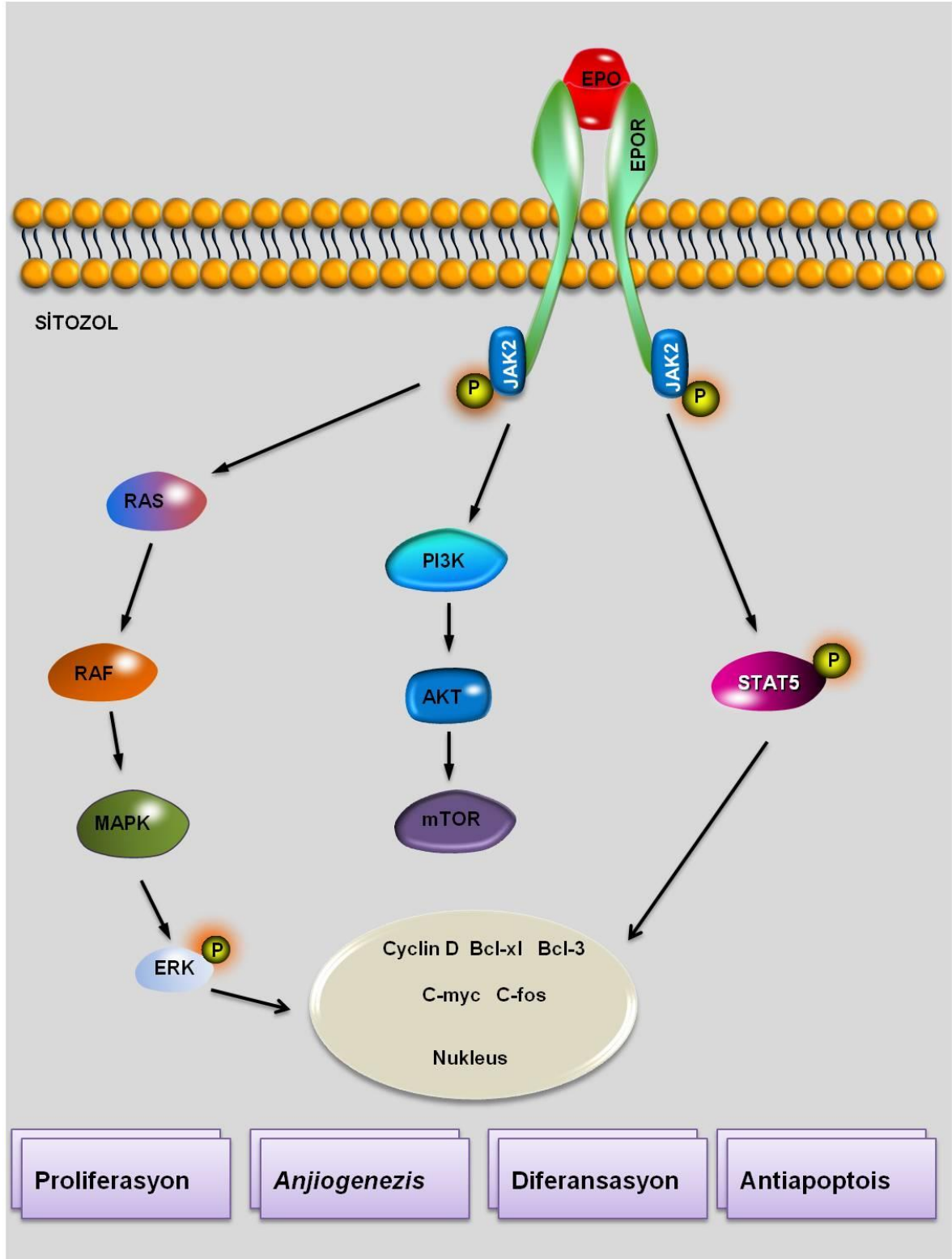
EPOR, gelişme çağındaki ve yetişkin insanda, primat ve diğer memelilerde beyinde ekspresyonu gösterilmiştir.[66] Yapılan fare deneylerinde, mid gestasyonda kadar EPOR'nün nöral tüpte ve nöroepitelyumda lokalize olduğu bulunmuş ve nöroepitelyum hücrelerinin gelişiminden sorumlu olduğu gözlenmiştir. [57]

EPO reseptörü 66-78kD arasında, sitokin reseptör süper ailesine ait bir yapıdır. Ekstraselüler parçası diğer sitokin reseptörleri, Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör (G-CSF) ve Granülosit Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör (GM-CSF) ile benzerdir. [53] EPO-R'nin 3 farklı varyantı bildirilmiştir; full-length EPOR (f-EPOR), truncated EPOR (t-

EPOR) ve soluble EPOR (s-EPOR). Bütün EPOR formlarının ekstraselüler domainleri aynıdır. Fakat f-EPOR ve s-EPOR intraselüler ve transmembranöz komponentleri kısadır.

Eritropoetin reseptörü, eritropoezisin primer regülatörü olarak bilinir. Aynı zamanda santral sinir sistemi içerisinde EPOR, sinyal yolları nöroprotektif etki ve kan beyin bariyerinin korunmasında da rol almaktadır. [68] EPOR posttravmatik hasar sonrası nörogenesis ve nöranal rejenerasyon için de önemlidir. İskemik ve hipoksik beyin hasarı sonrası EPOR artışı görülür. EPOR'un glutamat ve reaktif oksijen moleküllerinin üretimini azaltarak, anjiogenezisi arttırarak, vazospazmı azaltarak, apoptozisi azaltarak, kök hücre iyileşmesini sağlayarak, inflamasyonu düzenleyerek glial hücreler ve nöronlar üzerinde koruyucu etki ettiği düşünülmektedir.[35] Ayrıca, nörotransmitter sentezi ve membran depolarizasyonu gibi nöronal hücrelerin fonksiyonlarında etkilidir. İskemik hipokampal hücrelerde EPO'nin sinaptik transmisyonunun arttığı gösterilmiştir. Bunun sonucunda da, nörotransmitterlerin stimülasyon veya inhibisyonunda rol alarak nöroprotektif etkileri bildirilmiştir.[52]

Fakat son yapılan araştırmalarda tümör büyümesinde de anahtar rol oynadığı düşünülmekte ve onkolojik tedavi için yeni potansiyel hedef konumundadır. EPO-EPO-R yolağı, neoplastik hücrelerin iyonize radyasyon ve kemoterapiye dirençli olmasında katkısı bulunmaktadır. [6] EPO-R tümör hücresinde apoptozisin inhibisyonunu ve tümör büyümesini indükler. Bunu; STAT5'in fosforilize ederek, Bcl-XL gibi nükleer anti-apoptotik genlerin transkripsiyonunu arttırarak,[97] Kaspas 9, Bad, Glikojen Sentaz Kinaz -3b (GSK-3b) gibi PI3K i fosforilize ederek ve protein kinaz B/Akt'ni aktive ederek, proapoptotik proteinleri inaktive ederek, anti-apoptotik protein XIAP ve nuclear faktör kapa B inhibitörünü c-IAP2 ile inhibe ederek [22], ve son olarak heat şok protein 70'i indükleyerek[116] sağlar. EPOR neoanjiogenezisi arttırarak tümör profilerasyonunda da önemli rol oynar (Şekil 6) [88].



Şekil 6:EPOR sinyal yolları

EPOR'nün hücre yüzeyinde aktifleşmesi ile intraselüler 3 farklı sinyal yolağı aktifleşir. EPOR'ne hücre içinde bağlı olan JAK2 sinyal sistemi aktifleşir ve STAT5'in fosforillenmesini sağlar. STAT5 DNA üzerine etkiyerek hücrede anti-apoptozise, proliferasyona ve anjiogenezise sebep olur. EPO'nin reseptörüne bağlanması ile aktiflenen diğer yollar, PI3K/Akt/mTOR ve Ras/MAPK/ERK sinyal yollarıdır. Bu yolların aktifleşmesi de hücrede differansiyasyona, proliferasyona sebep olmaktadır.

3.MATERYAL METHOD

3.1.Hasta Seçimi:

Çalışmaya Bezmialem Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı Kliniğinde 2012-2014 yılları arasına cerrahi tedavi uygulanmış hastalar dahil edilmiştir. Akut veya kronik enfeksiyonu olan, immünolojik veya metabolik hastalığı olan, başka neoplastik hastalığı olan, kardiyopulmoner hastalıkları olan ve son zamanlarda majör cerrahi geçirmiş olan hastalar bu çalışmanın dışında bırakılmıştır.

Çalışmamız Koç Üniversitesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.(karar no: 2014.079.IRB2.022)

3.2.İmmünohistokimyasal Boyama:

Her vakayı en iyi şekilde örnekleyen formalinde fikse edilmiş parafine gömülü dokulardan 2 mikron kalınlığındaki kesitler adeziv (polilizin) kaplı lamlara alındı. 70°C'lik etüvde 25 dakika bekletilerek dokuların lama tamamen yapışması sağlandı. Otomatize Benmark XT immunohistokimya cihazında kullanılacak antikorun etiketi yazdırıldı. Etiketleri yazdırılan lamlar cihaza yerleştirildi. Cihazda sırasıyla deparafinizasyon işlemi yapıldı ve antijen retrieval aşamasına geçildi. Bu aşamada lamlar, EPOR (sc-5624 Erythropoietin Receptor [Polyclonal] Santa Cruz), EGFR (EGFR Antibody (A-10): sc-373746, Santa Cruz), VEGF (VEGF Antibody (C-1): sc-7269, Santa Cruz antikorları için 1 saat EDTA solüsyonunda bekletildi. Antijen retrievalden sonra antikorlar damlatıldı ve 32 dakika antikor titrasyonu yapıldı. Antikor titrasyon süresi bittikten sonra, cihaz uyumlu dab detection kiti damlatıldı. Son olarak lamlar 16 dakika hematoksilin ve 4 dakika bluing reagentta bekletildi. Cihazdan çıkan lamlar sabunlu su ile yıkandıktan sonra alkolden geçirildi. Tamamen kurduktan sonra ksilenden geçirilerek kapatıldı.

Değerlendirme:

Tüm antikorların değerlendirilmesinde, tümör hücrelerinin %50'sinden fazlasında boyanma olduğunda pozitif olarak değerlendirilmiştir. Boyanma şiddeti hafif (1+), orta (2+) ve

kuvvetli (3+) olarak değerlendirilmiştir. EGFR antikoru ile membranöz ve sitoplazmik boyanma, EPOR ve VEGF ile sitoplazmik boyanma, spesifik kabul edilmiş olup, her 3 antikor için nükleer boyanma nonspesifik olarak yorumlanmıştır. VEGF antikoru ile özellikle damar yapılarının çevresindeki tümör hücrelerinde kuvvetli boyanma dikkati çekmiştir.

Çalışmaya dahil edilen hastalar taburculuk sonrası 10 gün, 1 ay, 3 ay, 6 ay ve 12 ay poliklinik kontrolü yapıldı. Takiplerinde norolojik defisit gelişen hastalara kontrastlı kranial MR ile radyolojik takip yapıldı. Takiplerinde patolojik durum ile karşılaşılmayan hastalara 3. ve 6. ay kontrol MR ile takipleri yapıldı.

İstatistiksel analizler SPSS 15.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistik olarak çalışma populasyonuna ait medyan (ortanca), minimum ve maksimum değerler ele alınmıştır. Karşılaştırma için nonparametrik Mann-Wihitney U testi kullanıldı. Nonparametrik Spearman korelasyon testi ise ilişkilendirmek için kullanılmıştır. Sağkalım analizi “Kaplan Meier ve cox regresyon analizi” ile değerlendirildi. Anlamlılık için $p < 0,05$ olarak kabul edildi. Spearman korelasyon testi için r değerleri Spearman’s Rho Table kullanılarak yorumlanmıştır.

4.BULGULAR

Bu prospektif klinik çalışma için 2012-2014 yılları arasında Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi/Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği’nde opere edilen, 26’sı yüksek derece (Grade IV), 5’i düşük derece (Grade I - Grade II) hastalardan elde edilen doku örneği elde edildi. Tüm örnekler, immünohistokimyasal boyanma derecelerine göre değerlendirildi.

Yüksek dereceli (Grade IV) olguların yaşları, 28 ile 83 arasında değişmekte olup, median yaş 59’dur. Olguların 15’i erkek (%57.7), 11’i (%42.3) kadındır. (Tablo-1)

Düşük grade (grade I-grade II) olguların yaşları 9 ile 50 arasında değişmekte olup, median yaş 28’dir. Bu grubun 3’ü (%60) erkek, 2’si (%40) kadındır. (Tablo-1)

Olguların yaş ortalamasına göre grade grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.002$) (Tablo 4). Fakat cinsiyetlere göre dağılımlara bakıldığında, gradeler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. ($p>0.05$) (Mann-Whitney U)

Yaş Ortalaması (median)	Erkek	Kadın	
59	15(%57.7)	11(%42.3)	Yüksek Grade
28	3(%60)	2(%40)	Düşük Grade

Tablo 4: Gradelere göre median yaş ortalaması

Grade IV olguların tümör yerleşim yerleri şu şekildedir: 7'si parietal lob, 6'sı temporal lob, 6'sı oksipital lob, 6'sı frontal lob ve 1 olgu multipl yerleşimlidir. Düşük grade olgularda ise; 3'ü serebellum, 2'si frontal lob yerleşimlidir.

Hastaların 15'i radyoterapi (RT) ve temozolomid tedavisi alırken, 6 hasta sadece RT aldı. 3 hasta kemoradyoterapi almadı ve 2 hastanın ise bilgilerine ulaşılamadı. Hastalara operasyon skarı iyileştikten sonra tüm beyine 40 Gy ve operasyon lojuna 20 Gy olmak üzere toplam 60 Gy RT ve eş zamanlı olarak 150 mg temozolomid p/o olarak 6 hafta boyunca tedavi verildi.

4.1. immünohistokimyasal Boyanma Sonuçları

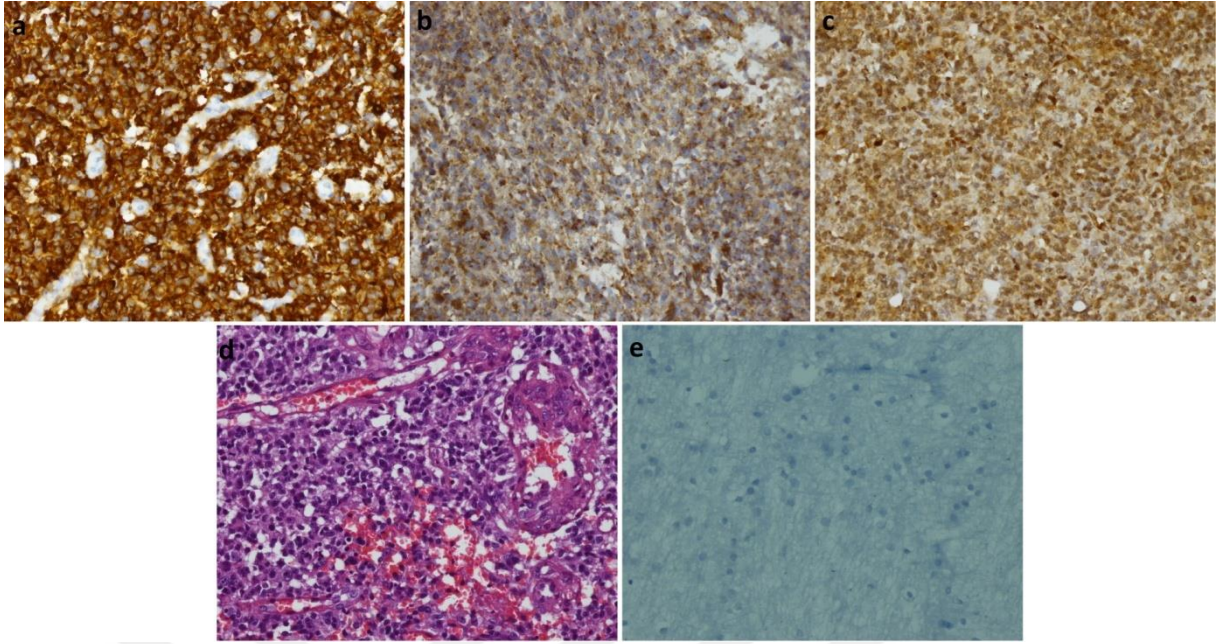
İmmünohistokimyasal yöntem ile EPOR, VEGF ve EGFR boyanma paternleri incelendi (Tablo 5). EPOR ile yüksek dereceli hastaların 13'ü (%50) 1(+), 10'u (%38.4) 2(+) ve 3'ü (%11.5) 3(+) boyandı. EPOR ile negatif boyanan yüksek gradeli hasta yoktu. VEGF ile yüksek dereceli 5 (%19.2) hastada boyanma olmadı, 7 (%26.9) hastada 1(+), 8 (%30.7) hastada 2(+) ve 6 (%23.1) hastada 3 (+) boyanma oldu. EGFR ile yüksek dereceli 12 (%46.1) hastada boyanma olmadı, 5 (%19.2) hastada 1(+), 4 (%15.3) hastada 2(+) ve 5 (%19.2) hastada 3(+) boyanma oldu.

Düşük gradeli hastalarda ise; EPOR ile 2 (%40) hastada 1(+) boyandı ve 3 (%60) hastada boyanma olmadı. VEGF ile 1 (%20) hastada 1(+) boyanırken, 4 (%80) hastada boyanma olmadı. EGFR ile boyanma bütün düşük gradeli hastalarda negatifti.

Olguların EPOR (p=0.002), VEGF (p=0.01) ve EGFR (p=0.039)' nin boyanma dereceleri ile tümör evreleri arasında fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (Mann-Whitney U)

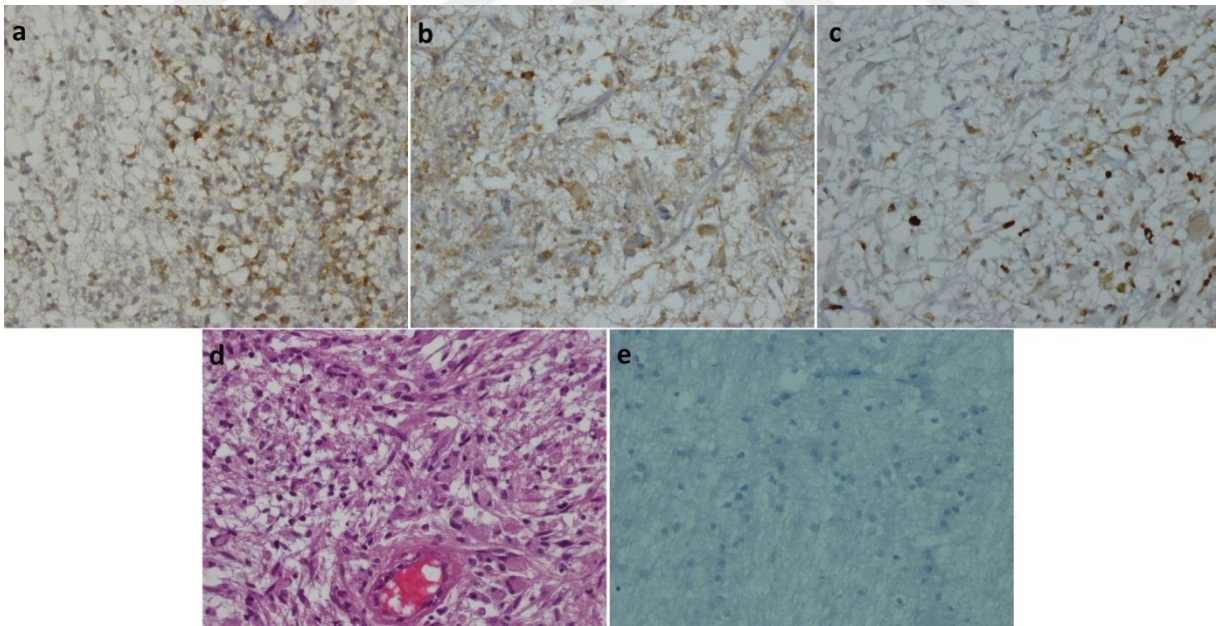
	EPOR		EGFR		VEGF	
	Yüksek Evre	Düşük Evre	Yüksek Evre	Düşük Evre	Yüksek Evre	Düşük Evre
Negatif	0	3(%40)	12(%46.1)	5(%100)	4(%15.3)	4
1+	13(%50)	2(%60)	5(%19.2)	0	7(%26.9)	1
2+	10(%38.4)	0	4(%15.3)	0	8(%30.7)	0
3+	3(%11.5)	0	5(%19.2)	0	6(%23.1)	0

Tablo 5: Gradelere göre EPOR, EGFR, VEGF boyanma derecelerinin dağılımı



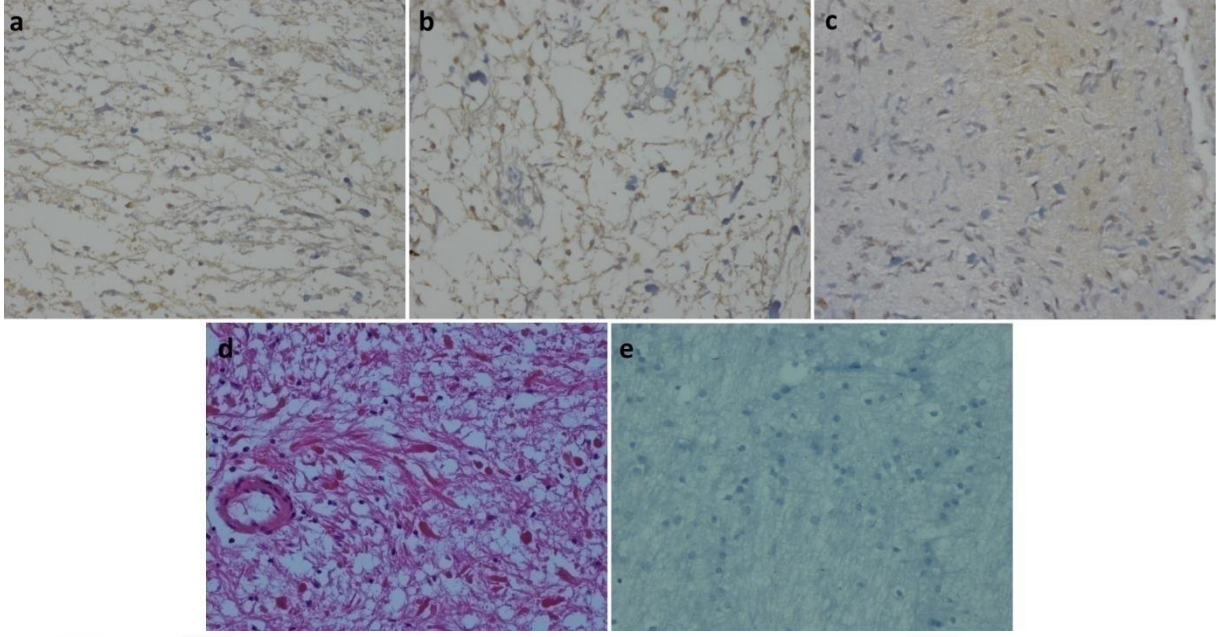
Resim 1:Yüksek gradeli olguda, yüksek pozitif İHK boyanma paternleri x200

a)EGFR, b)EPOR, c)VEGF, d)HE, e)Negatif kontrol



Resim 2:Yüksek gradeli olguda, düşük pozitif İHK boyanma paternleri x200

a)EGFR, b)EPOR, c)VEGF, d)HE, e)Negatif kontrol

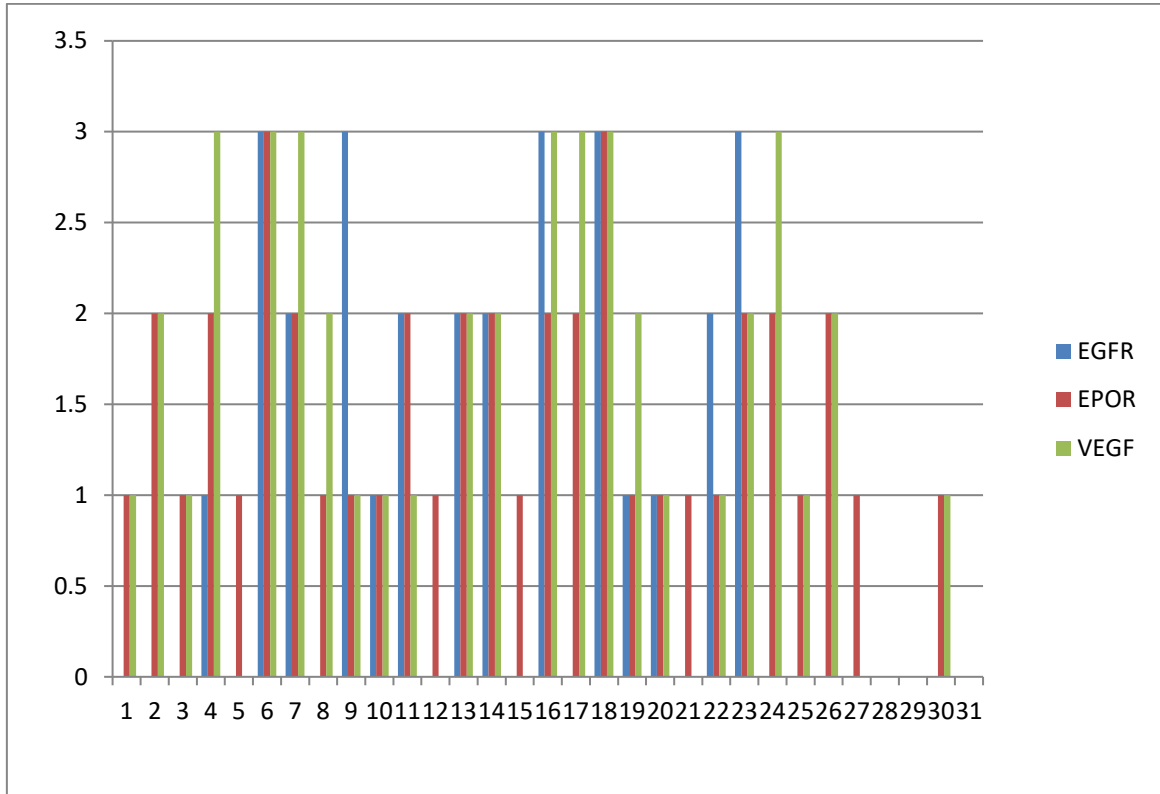


Resim 3:Düşük gradeli olguda, negatif IHC boyanma paternleri x200

a) EGFR b) EPOR c) VEGF d) HE e) Negatif kontrol

4.2.Spearman Korelasyonu:

EPOR, VEGF ve EGFR ile yapılan immünohistokimyasal boyanma dereceleri arasında Spearman Korelasyon Testi uygulanmıştır. EPOR ile VEGF arasında olumlu, güçlü ve anlamlı bir korelasyon bulunmuştur. ($r = 0.779$, $p = 0.001$) EPOR ile EGFR arasında olumlu, orta düzeyde ve anlamlı bir korelasyon bulunmuştur. ($r = 0.465$, $p = 0.017$) EGFR ile VEGF arasında olumlu, orta düzeyde ve anlamlı bir korelasyon bulunmuştur. ($r = 0.484$, $p = 0.012$). Bu patolojik dokularda korelasyon katsayısının pozitif olması, ilişki yönünden EPOR ile EGFR ve VEGF boyanma seviyeleri arasında doğrusal ilişki olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda, EPOR seviyesinin arttığında EGFR ve VEGF seviyelerinin de arttığını göstermektedir. (Grafik 1)

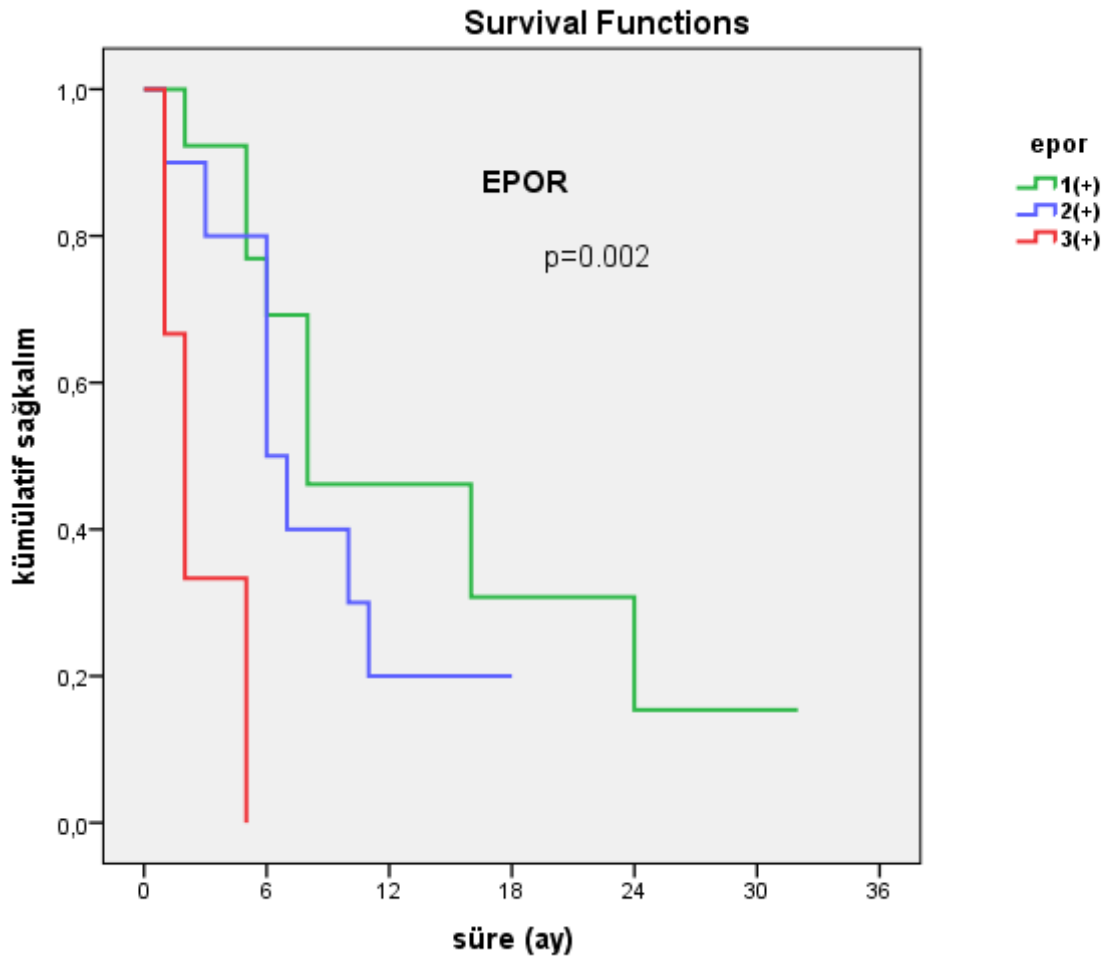


Grafik 1: Boyanma derecelerine göre EPOR, EGFR, VEGF'nin tüm hastalardaki görünümü
(alt sütun hasta numaralarıdır)

4.3. Sağ kalım Sonuçları:

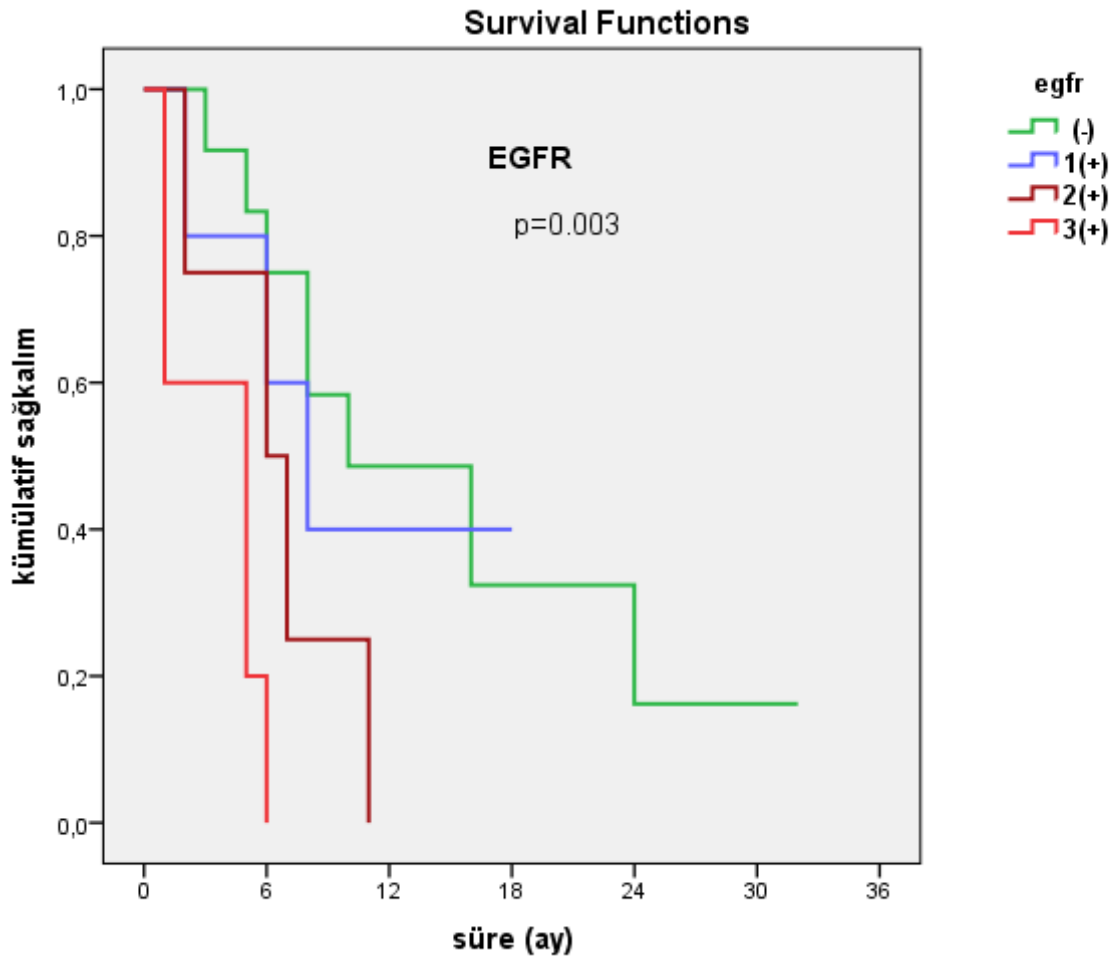
Olgularımızın takip süresi 1 ile 32 ay arasında değişmektedir. Düşük gradeli hastaların ortalama takip süresinin, ortalama yaşam süresi değerlendirilmesi açısından yeterli olmaması nedeniyle sağ kalım sonuçları sadece yüksek gradeli hastalar arasında değerlendirilmiştir. 26 yüksek dereceli hastanın 6'sı (%23.07) halen hayattadır. EPOR, EGFR ve VEGF grupları arasında ortalama sağ kalım analizleri, Kaplan Meier Survival Testi ile değerlendirildi. İstatistiksel analizler İHK boyanma şiddetine göre yapılmıştır.

EPOR 1(+) boyanan grupta median sağ kalım; 8 ay (95% confidence interval [CI] 0,954 – 15,046). EPOR 2(+) boyananlarda median sağ kalım; 6 ay (95% confidence interval [CI] 2,901 – 9,090) ve EPOR 3(+) olanlarda median sağ kalım; 2 ay (95% confidence interval [CI] 0,400 – 3,600) olarak değerlendirilmiştir. EPOR ile yapılan immünokimyasal boyanma dereceleri ile ortalama sağ kalım analizleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur. (Kaplan Meier p=0.002) (Grafik 2)



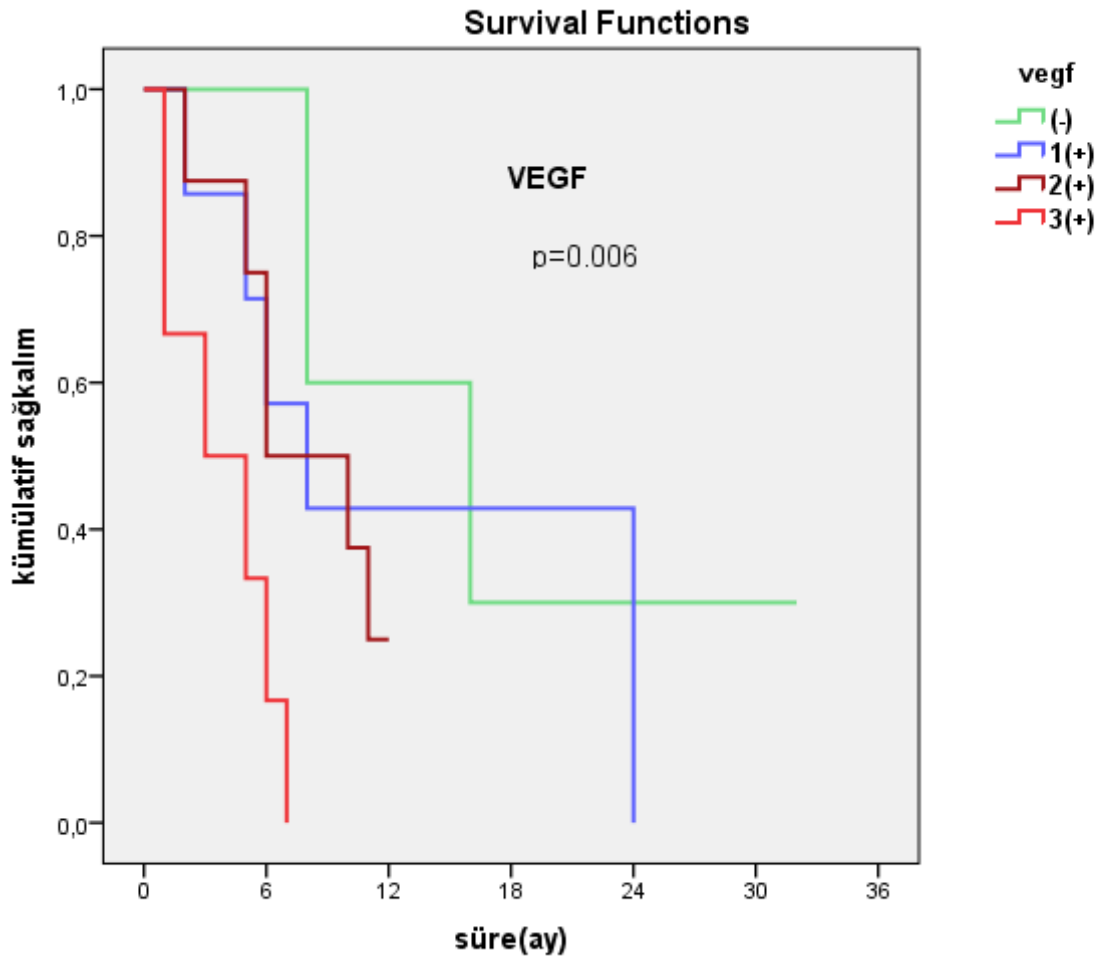
Grafik 2: EPOR spesifik yaşam eğrisi

EGFR ile boyanmayan grupta median sağ kalım; 10 ay (95% confidence interval [CI] 1,041-18,959). EGFR 1(+) boyanan grupta median sağ kalım; 8 ay (95% confidence interval [CI] 3,706 – 12,294). EGFR 2(+) boyananlarda median sağ kalım; 6 ay (95% confidence interval [CI]1,100 – 10,900) ve EGFR 3(+) olanlarda median sağ kalım; 5 ay (95% confidence interval [CI] 1,494 – 8,506) olarak değerlendirilmiştir. EGFR ile yapılan immünokimyasal boyanma dereceleri ile ortalama sağ kalım analizleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur. (Kaplan Meier p=0.003) (Grafik 3)



Grafik 3: EGFR spesifik yaşam eğrisi

VEGF ile boyanmayan grupta median sağ kalım; 16 ay (95% confidence interval [CI] %95'ci 3,522 – 28,478). VEGF 1(+) boyanan grupta median sağ kalım; 8 ay (95% confidence interval [CI] 2,868 – 13,132). VEGF 2(+) boyananlarda median sağ kalım; 6 ay (95% confidence interval [CI] 1,380 – 10,620) ve VEGFR 3(+) olanlarda median sağ kalım; 3 ay (95% confidence interval [CI] 0 – 7,809) olarak değerlendirilmiştir. VEGF ile yapılan immünokimyasal boyanma dereceleri ile ortalama sağ kalım analizleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur. (Kaplan Meier p=0.006) (Grafik 4)



Grafik 4: VEGF spesifik yaşam eğrisi

4.4.Cox Regresyon Analiz Sonuçları

EPOR ekspresyonunun artışıyla, ortalama sağ kalım süresinin azalması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur. (p= 0.003)

EGFR ekspresyonunun varlığı ile ortalama sağ kalım süresinin azalması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur. (p= 0.005)

VEGF ekspresyonunun varlığı ile ortalama sağ kalım süresinin azalması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur. (p= 0.01)

5.TARTIŞMA

GBM, primer beyin tümörleri içinde en kötü prognoza sahip ve en kısa sağ kalımı olan tümördür. Standart tedavi yöntemi olarak cerrahi, RT ve KT kabul görmektedir. Bu tedavi yaklaşımlarının tamamının kullanılmasına karşın, sağ kalım üzerinde yeterli başarı elde edilememiştir. Gelişen teknoloji ile bu hastalarda moleküler temelli tedavi arayışları hız kazanmıştır. Bu nedenle, moleküler bazda etkin proteinler ve etki mekanizmaları üzerinde birçok çalışma yapılmaktadır. EPOR, EGFR, VEGF'nün prognoz üzerine etkinliği kanıtlanan birçok çalışma yapılmıştır. Bu proteinler üzerine tedavi seçenekleri üzerinde çalışmalar devam etmektedir.

Glioblastomada EGFR amplifikasyonunun, klinik ile ilişkisi üzerine birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen halen yeterli sonuç elde edilememiştir. Birçok çalışmada tartışmalı sonuçlar elde edilmiştir. Bazı çalışmalarda, EGFR amplifikasyonunun, ortalama yaşam süresi ile ilgisiz olduğu belirtilmiştir. [5] Bazı çalışmalarda kötü prognoz sebebi ve ortalama yaşam süresini azalttığı gösterilmiştir. [95] Bazı çalışmalarda ise ortalama yaşam süresini uzattığı söylenmiştir. [42] Bu durum, EGFR amplifikasyonu ile ilişkili olabileceği kuşkusunu uyandırmaktadır. 2012 yılında Hobbs ve arkadaşları, EGFR gen amplifikasyonu yüksek olan hastaların, EGFR amplifikasyonu düşük veya olmayan glioblastoma hastaları üzerinde yapılan çalışmada; ortalama yaşam süresinin yüksek seviye EGFR amplifikasyonu olan hastalarda yüksek olduğunu göstermişlerdir. [40] Heimberger ve arkadaşlarının yaptıkları 54 GBM olgusunda EGFR ve EGFRvIII aşırı ekspresyonunun, ortalama sağ kalım süresi ile alakalı olmadığını bulmuşlardır. Fakat bu çalışmada, hastalarda tümörün gros rezeksiyonu yapılmamış.[39] Bizim çalışmamızda da, 26 glioblastoma hastasında yapılan immünohistokimyasal boyama derecelerine göre; EGFR seviyesinin ortalama yaşam süresinin, EGFR aşırı ekspresyonu ile azaldığı gösterilmiştir.

Gliomalar en sık görülen santral sinir sistemi tümörleridir. Lokal invazyon nedeniyle total ekzisyona çok olanak olmaması nedeniyle, rekürrens riski çok fazladır. VEGF sadece vasküler endotel hücrelerde büyümeye sebep olmaz, aynı zamanda tümör hücrelerinden vasküler permeabilite faktörünün salınımına da sebep olur. [41, 82] VEGF, vasküler endotel hücrelerde proliferasyon, bölünme, filizlenme ve anjiogenezisi uyarır, vasküler remodelingi ve bütünlüğü kontrol eder. Hem anjiogenezise sebep olması hem peritümoral ödeme sebep olması nedeniyle VEGF, gliomalarda lokal invazyonun en önemli mediatörlerinden biridir. [106]

Anjiogenezis, tümör büyümesi için en önemli ön koşullardan biridir. Tümör dokusu, 1-2mm³'ten daha büyük boyutlara ulaştığında, lokal difüzyon ile beslenebilmesi zorlaşır ve

anjiogenezis uyarılmaya başlar. Tümör hücrelerinde anjiogenezis için primer efektör VEGF'dir.[26, 29] Tümör hücrelerden salınan VEGF, endotel hücre yüzeyinde bulunan reseptörüne bağlanarak endotel prekürsör hücrelerin mobilizasyonunu, vasküler permeabiliteye ve endotel hücre migrasyonuna sebep olur.[26] Endotel hücrelere özgün bir mitojen olan VEGF, glial hücrelerde hem fizyolojik hem de patolojik anjiogenezde önemli rol oynar. [64] Weindel ve arkadaşları, VEGF ekspresyon seviyesinin, gliom malignite derecesi ile direkt ilişki bulmuşlar ve glioblastomada 50 kat fazla ekspresyona ulaştığını bildirmişlerdir. [109] Hipoksi, glioblastom hücrelerinde VEGF ligandını, tümör endotel hücrelerinde ise VEGF reseptör ekspresyonunu artırır. [37,81] Bizim çalışmamızda ise, 26 GBM hastası ve 5 düşük grade hasta değerlendirilmiştir. VEGF ekspresyon derecelerinin yüksek grade olgularda, yüksek pozitif olduğu tespit edilmiştir.

VEGF vasküler permeabilite faktörü olarak da bilinmektedir. [10] Glioblastoma hücrelerinde hipoksi ile VEGF salınımı artar ve damar etrafında birikmeye başlar. [25] Daha sonra hipoksik malign hücrelerden salınan VEGF, hem perisitlere hem de vasküler endotelial hücelere bağlanır. Perisit hücreleri, bilindiği üzere vasküler endotelial hücrelerin dış yüzeyini sararak, kan beyin bariyerinin devamlılığını sağlayan en önemli hücrelerdir. VEGF salgılanması ile perisit hücreleri, damar duvarından ayrılırlar ve sonuç olarak damar bazal membran yapısı bozulur. Bununla birlikte kan beyin bariyeri bütünlüğünü kaybeder. [44] Bunun sonucu olarak da; plazma ekstravazasyonu ile peritümöral ödeme ve damar permeabilitesinde artışa sebep olur. [115]

Hipoksi sonucu VEGF ekspresyonunun artışı 2 mekanizma ile tetiklenir. Birinci mekanizma, VEGF gen transkripsiyonu; Hipoksinin indüklediği faktör-1 (HIF 1) VEGF promoter bölgesine bağlanır ve gen transkripsiyonunu artırır. [30] İkinci mekanizma ise, VEGF mRNA upregülasyonu; Hipoksinin indüklediği faktör-1'in artışıyla VEGF sekresyonu artar ve neovaskülerizasyon mekanizması tetiklenir. [73] VEGF, glioma hücrelerinin progresyonunda sırasıyla şu 4 yolu izler; perivasküler organizasyon, proliferasyon, nekroza bağlı vasküler regresyon ve anjiogenezis. [86]

EPO tarafından uyarılan EPO reseptörlerinin asıl görevi, eritroid öncü hücrelerde yaşamın devamlılığını ve kırmızı kan hücrelerinin proliferasyonu sağlamaktır. Fakat son yapılan birçok çalışmada EPOR ekspresyonunun nöral kök hücrelerde, endotelial hücrelerde ve kanser hücrelerinde olduğu gösterilmiştir. [6] EPOR santral sinir sisteminde ekspresyona sahiptir ve nöroprotektif etkiye sahiptir. EPOR ekspresyonunun hipoksi ve iskemi beyin dokusunda arttığı gösterilmiştir. [1,67] Hipoksi gelişmesi durumunda EPO ve EPOR salınımı hipoksi ile

indüklenen faktör (HIF1) tarafından kontrol edilir. [98] Hipoksi sonucu oluşan serbest radikaller nöronal hücrelerde HIF1 ekspresyonunu uyarmasıyla aktive olan HIF1, EPO gen bölgesine bağlanarak, EPO ve EPOR gen transkripsiyonu kontrol eder. [65] Gen transkripsiyonu ile EPO ve EPOR ekspresyonunun artışı, serebral endotelial hücrelerde apoptozisi önleyerek nöroprotektif etki sağlar. [14, 47] EPO beyinde, normal nöral öncü hücrelerin büyümesi ve diferansiyasyonunu düzenlemesinin yanı sıra, tümör hücrelerini apoptozisten korur ve tümör hücresinin büyümesine katkı sağlayarak kanser progresyonunu sağlar.[6] Yapılan birçok klinik çalışma asıl olarak EPO ve EPOR'un birlikte salgılanmasının tümör malignensi ve düşük yaşam kalitesi ile ilgili olduğunu bildirmektedir. [54]

EPO'nun hücre yüzeyinde EPOR'a bağlanması ile JAK/STAT, PI3K/Akt, Ras/ ERK sinyal yollarını aktive ettiği gösterilmiştir. Shi ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan bir çalışmada, EPOR'un JAK/STAT, PI3K/Akt, Ras/ ERK yollarının üçünü de aktive ettiği görülmüştür. Yapılan bu in vivo çalışmada EPOR ile yolların 5'inci dakikada aktivasyonu başlamış ve 15'inci dakikada maksimum seviyesine ulaşmıştır. [122] EPOR aktivasyonu ile fosforillenen STAT, Nükleer Faktör kB (NFkB) aracılığı ile anti apoptotik proteinler olan X-linked Apoptosis İnhibitör(XIAP) ve c Apoptosis İnhibitör-2 (cIAP2) ekspresyonunu artırır.[22] XIAP ve cIAP2 kaspas 3 süpresyonunu sağlayarak apoptozomda prokaspas 9 oluşumunu inhibe ederek apoptozisi önler. [35, 48, 96] STAT sinyal yolağının EPOR tarafından aktivasyonu, glioma hücrelerindeki survival ile doğrudan bağlantılıdır. Cao ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, eksojen EPO tedavisinin EPOR seviyelerinin azalmasına ve in vitro olarak glial kök hücre sayısının azaldığını ve buna bağlı olarak in vivo tümör büyümesinin yavaşladığını ve EPOR seviyelerinin 2 kattan fazla olması, ortalama yaşam süresinde önemli bir azalmaya neden olmaktadır. [13] 2007 yılında 194 hasta ile yapılan bir başka çalışmada, düşük evreli astrositik tümörlerde yüksek EPOR ekspresyonunun malign progresyonu arttırdığı görülmüştür. Aynı çalışmada yüksek evreli tümörlerde EPOR seviyelerinin yüksekliğinin ortalama sağ kalım üzerine etkili olmadığı savunulmuştur, hastalar genç ve yaşlı olarak 2 farklı gruba ayrıldığında yüksek EPOR seviyelerinin genç hastalarda en iyi ortalama sağ kalım sürelerine sahip olduğu gösterilmiştir.[126] Bizim çalışmamızda ise, EPOR ekspresyonunun ortalama sağ kalım süresi ile istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulduk. (p= 0.002) EPOR 1(+) boyanan hastalarda ortalama sağ kalımı 8 ay, 2(+) boyanan hastalarda 6 ay, 3(+) boyanan hastalarda 2 ay olarak bulundu. Fakat çalışmamızda sadece İHK sonuçları ile sağ kalım oranları değerlendirildiği için kantitatif sonuçlarla karşılaştırılması ve daha fazla veri ile ortalama sağ kalım analizlerinin yapılması daha değerli olacaktır.

EPO'nun nöral dokuda olan bu fizyolojik etkilerinin yanında, tümör dokusunda patolojik angiogenezis üzerine de etkileri mevcuttur. [54, 113] Nico ve arkadaşlarının 2011 yılında yapmış olduğu çalışmada, EPO'nun glioma tümör hücrelerinde salgılandığını ve reseptörü aracılığı ile vasküler endotelial hücreler üzerinde etki göstererek, anjiogeneze etkin olduğu gösterilmiştir. [72] Okazaki ve arkadaşları akciğer kanseri farelerde yapılan bir çalışmada ise; subkutanöz verilen EPO'nun, anjiogenezi arttırarak tümör büyümesini sağladığını göstermişlerdir. [76] Hardee ve arkadaşları da, kemirgen meme kanseri hücreleri ile yaptıkları çalışmada, EPO verilen kemirgenlerin neovaskkülerizasyonunda artış olduğu görülmüş ve EPO antogonisti verilen hastalarda ise anjiogenezin azaldığı ve tümör büyümesinin bozulduğu görülmüştür. GBM 'de moleküler tedavi seçenekleri üzerine yapılan çalışmalarda etkin moleküller aranmaktadır. EGFR ve VEGF üzerine yapılan birçok çalışma olmasına karşın EPOR ile yeterli çalışma mevcut değildir. EPOR tedavi seçenekleri için 3 stratejik yol bulunmaktadır, 1) dolaşımdaki EPO' ni antibodylerle nötralize ederek tümör hücresi üzerindeki EPOR uyarımını azaltmak, 2) direkt EPOR' nü hedef alarak aktivasyonunu engellemek, 3) EPOR sinyal yollarının aktivasyonunu engellemek örneğin STAT3.[13]

Anjiogenezin yanı sıra, EPO – EPOR ekspresyonu kanser hücrelerinde ve vasküler endotelial dokuda tümör büyümesine ve anti-apoptozisin artışına sebep olur. [54, 113] Yin ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, EPO ekspresyonunun antiapoptik proteinlerin, Bcl-2 ve Bcl-xl artışına sebep olduğu gösterilmiş ve bu mekanizmanın tümör hücrelerinin yaşam sürelerinin uzadığını düşünmüşlerdir. EPO'nun hem normal beyin dokusunda hem de kanser beyin dokusunda yaşamı uzattığı kanısına varmışlardır. [119] Bizim çalışmamızda ise; EPOR sekresyonun ortalama sağ kalım süresi ile ilişkili olduğunu gözlemledik. İnsan ve şıçan renal adenokarsinoma hücre kültürlerinde ve MCF-7, BT549 meme kanseri hücre serilerinde yapılan çalışmalarda, EPOR proliferasyonu situmile ettiği görülmüştür. [111] Bu sonuçlarla EPO varlığı, böbrek ve meme kanseri hastalarında tümör büyümesini agreve ettiği düşünülmüştür. Yasuda ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada, EPO sinyal yolağının monoclonal antikor veya sEPOR ile bloke edilmesi sonrası farelere enjekte edilen, insan over ve uterin kanser xeno greftlerinin büyümesinin inhibisyonu gerçekleşmiştir. [118]

EPO'nun hücrenel mekanizmaları üzerine yapılan bir araştırmada, EPO'nun EPOR'u aktive ederek, ERK yolağını fosforilleyerek hücre proliferasyonunu arttırdığı görülmüştür. Aynı çalışmada, glioma hücre kültürlerinde yapılan EPO/EPOR inhibisyonu ile tümör hücre büyüme hızının azaldığı gözlemlenmiştir. İn vivo ve in vitro yapılan bu çalışmada, EPOR

inhibisyonu yapılması ile tümör volümünün azaldığı ve ortalama yaşam süresinin uzadığı sonucuna varılmıştır. [80]

Sunulan bu çalışmada EPOR seviyeleri araştırılmış ve ortalama yaşam süreleri ile karşılaştırılması yapılmıştır. Daha geniş hasta sayıları ve kantitatif değerler ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılacak bu çalışmalar ışığında GBM moleküler tedavi seçenekleri arasında EPOR yer alacağını düşünmekteyiz.

5.SONUÇ

Bu çalışma ile yüksek gradeli glial tümörlü hastalarda EGFR, VEGF, EPOR seviyelerinin ortalama sağ kalım ile ters orantılı olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda EGFR, VEGF ve EPOR' nün aşırı sekresyonun kötü prognoz sebebi olduğunu işaret etmektedir. Bu moleküllerin seviyelerini azaltmaya yönelik tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi ve prognoza olan etkilerinin belirlenmesi için daha fazla ve büyük çaplı çalışmalara ihtiyaç olduğu aşikardır.

7.KAYNAKLAR

1. Acs, G., et al., Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. *Cancer Res.* 2001;61: p.3561-3565.
2. Agnihotri, S., et al., Glioblastoma, a Brief Review of History, Molecular Genetics, Animal Models and Novel Therapeutic Strategies. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2013;61:p.25-41.
3. Arcasoy MO. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. *Br J Haematol.* 2008;141(1):p.14-31.
4. Bai, R.Y., et al., Molecular targeting of glioblastoma: Drug discovery and therapies. *Trends Mol Med.* 2011;17:p.301-312
5. Batchelor, T.T., et al., Age-dependent prognostic effects of genetic alterations in glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: p.228-233.
6. Belenkov, A.I., et al., Erythropoietin induces cancer cell resistance to ionizing radiation and to cisplatin. *Mol Cancer Ther.* 2004; 3: p.1525-1532
7. Blumenthal, D.T., et al., Survival outcomes in glioblastoma multiforme, including the impact of adjuvant chemotherapy. *Expert Rev Neurother.* 2005;5(5):p.683-690.
8. Bonavia, R., et al., EGFRvIII promotes glioma angiogenesis and growth through the NF- κ B, interleukin-8 pathway. *Oncogene* 2012; 31:p. 4054-4066.
9. Brem S. The role of vascular proliferation in the growth of brain tumors. *Clin Neurosurg.* 1976;23:p.440-453
10. Brown, L.F., et al., Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med.* 1992;176(5):p.1375-1379.
11. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 2008;455: p.1061-1068.
12. Carpenter, G., et al., Trafficking of receptor tyrosine kinases to the nucleus. *Exp. Cell. Res.* 2009;315:p.1556-1566.
13. Cao, Y., et al., Erythropoietin Receptor Signaling through STAT3 Is Required for Glioma Stem Cell Maintenance *Genes Cancer.* 2010; 1(1): p.50-61.

14. Chong, Z.Z., et al., Apaf-1, Bcl-xL, Cytochrome c, and Caspase-9 form the critical elements for cerebral vascular protection by erythropoietin. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2003; 23: p.320–330.
15. Chong, Z.Z., et al., EPO relies upon novel signaling of Wnt1 that requires Akt1, FoxO3a, GSK-3 β , and β -catenin to foster vascular integrity during experimental diabetes. *Curr. Neurovasc. Res.* 2011; 8: p.103–120.
16. Chong, Z.Z., et al., Cardiovascular disease and mTOR signaling. *Trends Cardiovasc. Med.* 2011;21:p.151–155.
17. CBTRUS (2010) statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2004–2006. Central Brain Tumor Registry of the United States, <http://www.cbtrus.org>
18. Davis, F.G., et al., Epidemiology of brain tumors. *Curr opin in neurology.* 2000;13:p.635-640.
19. Day, S.E., et al., Clinical trials of small molecule inhibitors in high-grade glioma. *Neurosurg Clin N Am.* 2012;23:p.407–416.
20. DeAngelis, L.M., Brain tumors. *N Engl J Med.* 2001;344(2):p.114-123.
21. Deveraux, Q.L., IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* 1998;17:p.2215–2223
22. Digicaylioglu, M., Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature* 2001; 412: p.641–647
23. Dittmann, K., et al., Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 2005; 280:p.31182–31189.
24. Dormond, O., et al., The effects of mTOR-Akt interactions on anti-apoptotic signaling in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2007; 282:p. 23679–23686
25. Dvorak, H.F., et al., Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors: concentration in tumor blood vessels. *J Exp Med.* 1991;174:1275-1278
26. Dvorak, H.F., Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: A critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol.* 2002;20:p.4368–4380.
27. Ekstrand, A.J., et al. Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Res.* 1991;51:p.2164-2172.
28. Farrell, C.J., et al., Genetic causes of brain tumors: neurofibromatosis, tuberous sclerosis, von Hippel-Lindau, and other syndromes. *Neurol Clin.* 2007;25:p.925-946.
29. Ferrara, N., et al., The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003;9:p.669-676.
30. Forsythe, J.A., et al., Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell Biol.* 1996;16:p.4604–4613.
31. Frederick, L., et al., Analysis of genomic rearrangements associated with EGRFvIII expression suggests involvement of Alu repeat elements. *Neuro Oncol.* 2000;2:p.159-163.
32. Friedman, H.S., et al., Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol.* 2009;27:p.4733–4740.
33. Furnari, F.B., et al., Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* 2007;21:p.2683-2710.
34. Galanis, E., et al., Phase II trial of temsirolimus (CCI-779) in recurrent glioblastoma multiforme: A North Central Cancer Treatment Group Study. *J Clin Oncol.* 2005;23:p.5294–5304.
35. Genc, S., et al., Erythropoietin and the nervous system. *Brain Res.* 2004;1000:p.19-31.
36. Gong, K., et al., The relationship of erythropoietin overexpression with von Hippel-Lindau tumour suppressor gene mutations between hypoxia-inducible factor-1a and -2a in sporadic clear cell renal carcinoma. *Int J Mol Med* 2010;26:p.907–912.
37. Grzybowska-Izydorczyk, O., P. mTOR kinase inhibitors as a treatment strategy in hematological malignancies. *Future Med. Chem.* 2012;4: p.487–504
38. Hatva, E., et al., Expression endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases and growth factors in human brain tumors. *Am J Pathol.* 1995;146:p.368-378
39. Heimberger, A.B., The natural history of EGFR and EGFRvIII in glioblastoma patients. *J. Transl. Med.* 2005; 3:p.38.
40. Hobbs, J., et al., Paradoxical relationship between the degree of EGFR amplification and outcome in glioblastomas. *Am J Surg Pathol.* 2012; 36:p.1186–1193.

41. Holash, J., et al., Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science*. 1999;284:p.1994–1998
42. Houillier, C., et al., Prognostic impact of molecular markers in a series of 220 primary glioblastomas. *Cancer*. 2006; 106:p. 2218–2223.
43. Huang, H.S., 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:p.2927–2935
44. Inai, T., et al., Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts. *Am J Pathol*. 2004;165:p.35–52.
45. Inda, M-d-M., et al., Tumor heterogeneity is an active process maintained by a mutant EGFR-induced cytokine circuit in glioblastoma. *Genes Dev*. 2010; 24:p.1731–1745.
46. Kanu, O.O., et al., Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. *Clin Med Oncol*. 2009;8:p.39-52.
47. Keswani, S.C., et al., Nitric oxide prevents axonal degeneration by inducing HIF-1-dependent expression of erythropoietin. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2011; 108:p.4986–4990.
48. Kleihues P, Ohgaki H. Primary and secondary glioblastomas: From concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol*. 1999;1;p.44–51.
49. Klein, C., et al., 120 kDa nuclear phospholipase Cgamma1 protein fragment is stimulated in vivo by EGF signal phosphorylating nuclear membrane EGFR. *Biochemistry*. 2004; 43:p.15873–15883.
50. Krakstad, C., et al., Survival signaling and apoptosis resistance in glioblastoma: opportunities for targeted therapeutics. *Molecular cancer*. 2010; 9:p.135.
51. Kreisl, T.N., et al., Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol*. 2009; 10;27:740-745.
52. Kumral, A., et al., Erythropoietin increases glutathione peroxidase enzyme activity and decreases lipid peroxidation levels in hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Biol Neonate*. 2005; 87:p.15-18.
53. Leyland-Jones, B., Evidence for erythropoietin as a molecular targeting agent. *Semin Oncol*. 2002; 29:p.145-154.
54. Leyland-Jones, B., et al., Maintaining normal hemoglobin levels with epoetin alfa in mainly nonanemic patients with metastatic breast cancer receiving first-line chemotherapy: a survival study. *J Clin Oncol*. 2005;23:p.5960-5972.
55. Libermann, T.A., et al., Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature*. 1985; 10;313(5998):p.144–147.
56. Lin, S.Y., et al., Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat. Cell. Biol*. 2001; 3:p.802–808.
57. Liu, C., et al., Regulated human erythropoietin receptor expression in mouse brain. *J Biol Chem*. 1997;272:p.32395–32400.
58. Lo, H.W., et al., Nuclear Interaction of EGFR and STAT3 in the Activation of iNOS/NO Pathway. *Cancer Cell*. 2005; 7:p.575–589.
59. Lo, H.W., et al., Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival. *Br. J. Cancer*. 2006;94:p.184–188.
60. Lo, H.W., et al., COX-2 is a Novel Transcriptional Target of the Nuclear EGFR-STAT3 and EGFRvIII-STAT3 Signaling Axes. *Mol Cancer Res*. 2010;8:p.232-245.
61. Louis, D.N., et al., A tiger behind many doors: multiple genetic pathways to malignant glioma. *Trends Genet*. 1995;11:p.412- 415.
62. Louis, D.N., A molecular genetic model of astrocytoma histopathology. *Brain Pathol* 1997;7:p.755–764.
63. Louis, D.N., et al., The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica*. 2007;114:p.97-109.
64. Machein, M.R., et al., VEGF in brain tumors. *J Neuro-Oncol*. 2000;50:p.109-120.
65. Maiese, K., et al., Raves and risks for erythropoietin. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008;19:p.145–155.
66. Marti HH, et al. Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci*. 1996;8:p.666–676.

67. Marti HH: Erythropoietin and the hypoxic brain. *J Exp Biol* 207: 3233-3242, 2004.
68. Martinez-Estrada, O.M., et al., Erythropoietin protects the in vitro blood-brain barrier against VEGF-induced permeability. *Eur J Neurosci*. 2003; 18:p.2538-44
69. Mischel, P.S., et al., Identification of molecular subtypes of glioblastoma by gene expression profiling. *Oncogene*. 2003;22:p.2361-73.
70. Mulcahy, L., The erythropoietin receptor. *Semin Oncol*.2001; 28:p.19-23.
71. Narita, Y., et al., Mutant epidermal growth factor receptor signaling down-regulates p27 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in glioblastomas. *Cancer Res*. 2002;62:p.6764-6769.
72. Nico, B., et al., Epo is involved in angiogenesis in human glioma. *J Neurooncol*.2011; 102:p.51-58
73. Onesto, C., et al., Poly(A)-binding protein-interacting protein 2, a strong regulator of vascular endothelial growth factor mRNA. *J. Biol. Chem*. 2004; 279:p.34217-34226.
74. Ostman, A., PDGF receptors-mediators of autocrine tumor growth and regulators of tumor vasculature and stroma. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15:p.275-286.
75. Ostrom, Q.T., et al., CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol*. 2014;16:p.1-63.
76. Okazaki, T., et al., Erythropoietin promotes the growth of tumors lacking its receptor and decreases survival of tumor-bearing mice by enhancing angiogenesis. *Neoplasia*. 2008;10:p.932-939
77. Park, D.M., et al., von Hippel- Lindau disease-associated hemangioblastomas are derived from embryologic multipotent cells. *PLoS Med*. 2007;4: e60.
78. Pastor, M.D., et al., mTOR/S6 kinase pathway contributes to astrocyte survival during ischemia. *J. Biol. Chem*. 2009; 284:p.22067-22078.
79. Pepper, M.S., et al., Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (flk-1) expression in endothelial cells. *Exp Cell Res*. 1998;241:p.414-425.
80. Pérès, E.A., et al., Targeting the erythropoietin receptor on glioma cells reduces tumour growth. *Experimental Cell Research*. 2011;317;p. 2321 - 2332.
81. Plate, K.H., et al., Vascular endothelial growth factor is a potential tumor angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature*. 1992;359:p. 845-848.
82. Plate, K.H., et al., Vascular endothelial growth factor. *J Neurooncol*. 1997;35:p.365-372
83. Prasad, G., et al., Radiation-induced gliomas. *Expert review of Neurotherapeutics* 2009; 9(10):p.1511-1517.
84. Prasad, G., et al., Inhibition of PI3K/mTOR pathways in glioblastoma and implications for combination therapy with temozolomide. *Neuro Oncol*. 2011;13:p.384-392.
85. Rahmathulla, G., et al., Bevacizumab in high-grade gliomas: A review of its uses, toxicity assessment, and future treatment challenges. *OncoTargets Ther*. 2013;6:p.371-389.
86. Raudino, G., et al., *From Gliomagenesis to Multimodal Therapeutic Approaches into High-Grade Glioma Treatment; Chapter 7 Evolution of the Molecular Biology of Brain Tumors and the Therapeutic Implications* Edited by Terry Lichtor, IARC press Lyon.
87. Reardon, D.A., et al., Phase I study of sunitinib and irinotecan for patients with recurrent malignant glioma. *J Neurooncol*. 2011;105:621-627.
88. Ribatti, D., et al., Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood*. 1999; 93:p.2627-2636.
89. Ribatti, D. Erythropoietin, the first century. *Leuk Res*. 2008;32:p.1169-1172.
90. Robertsan, T., et al., Overview and recent advances in neuropathology. Part 1: Central nervous system tumours. *Pathology*, 2011; 43:p.88-92.
91. Rosell, R., et al., Translational research in glioblastoma multiforme: molecular criteria for patient selection. *Future Oncology*. 2008;4:p.219-228.
92. Sacko, O., et al., Hemangioblastoma of the corpus callosum: A case report and review of the literature on its origin. *Neurochirurgie*. 2010;56:p.382-385.
93. Sathornsumetee, S., et al., Molecularly targeted therapy for malignant glioma. *Cancer*. 2007;110:p.13-24.
94. Schmidt, N.O., et al., Levels of vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor/scatter factor and basic fibroblast growth factor in human gliomas and their relation to angiogenesis. *Int J Cancer*. 1999;84:p.10-18.

95. Shinojima, N., et al., Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res.* 2003;63:p.6962-6970.
96. Shiozaki, E.N., et al., Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell.* 2003;11:p.519-527.
97. Silva, M., et al., Erythropoietin can induce the expression of bcl-x(L) through Stat5 in erythropoietin-independent progenitor cell lines. *J Biol Chem.* 1999;274:p.22165-22169.
98. Singh, N., et al., Hypoxia inducible factor-1: Its potential role in cerebral ischemia. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2012; 32:p. 491-507.
99. Smith, J.S., et al., Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance, and prognostic implications. *Front Biosci.* 2000;5:p.213-231.
100. Squatrito, M., et al., DNA damage response and growth factor signaling pathways in gliomagenesis and therapeutic resistance. *Cancer Res.* 2011;71:p.5945-5949.
101. Strugar, J., et al., Vascular permeability factor in brain metastasis: Correlation with vasogenic brain edema and tumor angiogenesis. *J Neurosurg.* 1994;81:p.560-566.
102. Stupp, R., et al., Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352:p.987-996.
103. The Cancer Genome Atlas (TCGA) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 2008;455:p.1061-1068.
104. Thomas, A.A., et al., Immunotherapy for the treatment of glioblastoma. *Cancer J.* 2012;18:p.59-68.
105. Verhaak, R.G., et al., Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell.* 2010;17:p.98-110.
106. Verheul, H.M., et al., Vascular endothelial growth factor trap blocks tumor growth, metastasis formation, and vascular leakage in an orthotopic murine renal cell cancer model. *Clin Cancer Res.* 2007;13:p.4201-4208.
107. Vredenburgh, J.J., et al., Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol.* 2007;25:p.4722-4729.
108. Wang, S.C., et al., Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability. *Nat. Cell. Biol.* 2006; 8:p.1359-1368.
109. Weindel, K., et al., Detection and quantification of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in brain tumor tissue and cyst fluid: the key to angiogenesis? *Neurosurgery.* 1994;35:p.439-448.
110. Wen, P.Y., et al., Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med.* 2008;359:p.492-507.
111. Westenfelder, C., et al., Erythropoietin stimulates proliferation of human renal carcinoma cells. *Kidney Int.* 2000;58:p.647-657.
112. Wu, H., et al., Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell.* 1995;83:p.59-67.
113. Wun, T., et al., Increased incidence of symptomatic venous thrombosis in patients with cervical carcinoma treated with concurrent chemotherapy, radiation, and erythropoietin. *Cancer.* 2003;98:p.1514-1520.
114. Yan, H., et al., IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 2009;360:p.765-773.
115. Yancopoulos, G.D., et al., Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature.* 2000;407:p.242-248.
116. Yang, C.W., et al., Preconditioning with erythropoietin protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *FASEB J.* 2003;17:p.1754-1755.
117. Yarden, Y., The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur. J. Cancer.* 2001;37:p.3-8.
118. Yasuda, Y., et al., Inhibition of erythropoietin signalling destroys xenografts of ovarian and uterine cancers in nude mice. *Br J Cancer.* 2001;84:p.836-843.
119. Yin, D., et al., Glioblastoma multiforme cells: Expression of erythropoietin receptor and response to erythropoietin. *Int J Oncol.* 2007;31:p.1193-1198.
120. Yoshimura, A., et al., Physiology and function of the erythropoietin receptor. *Opin Hematol.* 1998;5:p.171-176.
121. Zhang, H., et al., ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *J Clin Invest* 2007;117:p.2051-2058.

122. Zhanzhong, Shi., et al., *Erythropoietin-Induced Activation of the JAK2/STAT5, PI3K/Akt, and Ras/ERK Pathways Promotes Malignant Cell Behavior in a Modified Breast Cancer Cell Line. Mol Cancer Res.* 2010;8:p. 615.
123. Glantz, M.J., et al. *Practice parameter: Anticonvulsant prophylaxis in patients with newly diagnosed brain tumors. Neurology.* 2000;54: p. 1886-1893
124. Ogura, K., et al., *Initial and cumulative recurrence patterns of glioblastoma after temozolomide-based chemoradiotherapy and salvage treatment: a retrospective cohort study in a single institution. Radiation oncology.* 2013; 8:p.97
125. Lacroix, M., et al., *A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. J Neurosurg.* 2001;95(2):p.190-198
126. Mittelbronn, M., et al., *De novo erythropoietin receptor (EPO-R) expression in human neoplastic glial cells decreases with grade of malignancy but is favourably associated with patient survival. Neuropathology and Applied Neurobiology.* 2007; 33:p. 299–307

