

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TİBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

BEYİN TÜMÖRLERİNDE SİTOGENETİK VE MOLEKÜLER
SİTOGENETİK ANALİZLER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZÜHRE KARAKAŞ

DANIŐMAN

YRD. DOÇ. DR. MUHSİN ÖZDEMİR

EKİM, 2007

Proje no: 20051123

KABUL VE ONAY SAYFASI

Zühre KARAKAŞ'ın Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı “Beyin Tümörlerinde Sitogenetik ve Moleküler Sitogenetik Analizler” başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek “KABUL” edilmiştir.

16.10.2007

Üye: Prof.Dr. Sevilhan ARTAN



Üye: Doç.Dr. Ali ARSLANTAŞ



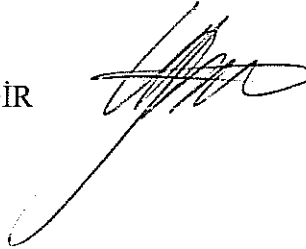
Üye: Yrd.Doç.Dr. Muhsin ÖZDEMİR



Üye: Yrd.Doç.Dr. Beyhan DURAK



Üye: Yrd.Doç.Dr. Oğuz ÇİLİNGİR



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 24.10.2007 tarih ve 716/2339. sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof.Dr.Ferruh YÜCEL

Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER	SAYFA
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	v
SUMMARY	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kanser	2
2.1.1. Kanser Nedir?	2
2.1.2. Tümör Nedir?	4
2.1.3. Tümör Hücrelerinin Özellikleri	5
2.1.4. Benign ve Malign Tümörlerin Özellikleri Nedir?	7
2.1.4.1. Diferansiyasyon ve anaplazi	7
2.1.4.2. Büyüme Hızı	8
2.1.4.3. Lokal invazyon	8
2.1.4.4. Metastaz	9
2.2. Beyin Tümörlerinin Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri	10
2.3. Beyin Tümörlerinin Sınıflandırılması	11
2.3.1. WHO nöroepitelyal doku tümörlerinin histolojik Sınıflandırması	13

2.4. Astrositomalar	14
2.4.1. Düşük Evreli Astrositomalar, Piloitik Astrositoma ve Düşük Evreli Diffüz Astrositoma	15
2.4.1.2. Düşük Evreli Diffüz Astrostoma (WHO Evre 2)	15
2.4.2. Yüksek Evre Astrositomalar, Anaplastik Astrositoma (AA) ve Glioblastome Multiforme (GBM)(WHO Evre 3 ve 4)	17
2.4.2.1. Yüksek Evre Astrositomaların Epidemiyolojisi (WHO Evre 3 ve 4)	17
2.4.2.2. Patoloji	18
2.5. Beyin Tümörlerinde Sitogenetik ve Moleküler Sitogenetik Analiz	19
2.5.1. Beyin Tümörlerinde Sitogenetik Analizler	19
2.5.2. Beyin Tümörlerinde Moleküler Sitogenetik Analizler	19
2.5.2.1. Floresan İn Situ Hibridizasyon	20
2.5.2.2. FISH Tekniğinde Kullanılan Problar ve Özellikleri	21
2.5.2.3. FISH Tekniğinin Temel Mekanizması	22
2.6. Astrositomalarda Meydana Gelen Genetik Değişimler	24
2.6.1. Piloitik Astrositoma (Evre 1) ve Diffüz Düşük Evre Astrositoma (Evre 2)	25
2.6.1.2. Anaplastik Astrositoma (WHO Evre 3)	26
2.6.1.3. Glioblastome Multiforme (WHO Evre 4)	27

2.7. Astrositoma Tumorogenezi İçin Bir Model	28
2.8. Ependimal Tümörler	28
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER	30
3.1. Gereç	30
3.1.1. Araştırma Grubu Bireyleri	30
3.1.2. Kullanılan Araçlar	30
3.1.2.1. Kullanılan Aletler	30
3.1.2.2. Cam Malzeme	31
3.1.3. Kimyasal Maddeler	32
3.1.4. Kullanılan Problar	34
3.2.Yöntem	34
3.2.1. Materyal Alımı	34
3.2.2. Sitogenetik Analiz	35
3.2.2.1. Preparatların Boyanması	36
3.2.3. Moleküler Sitogenetik Analiz	37
3.2.3.1. FISH Tekniğinin Uygulanması	38
3.2.3.1.1. Preparatların Ön Yıkaması ve Denatürasyonu	38
3.2.3.1.2. Prob Denatürasyonu	38

3.2.3.1.3. Hibridizasyon	39
3.2.3.1.4. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar	39
3.2.3.1.5. Hibridize Olan Bölgelerin Görüntülenmeye Hazırlanması	40
3.2.3.1.6. Preparatların Mikroskopta İncelenmesi	40
3.2.3.1.7. Değerlendirme	40
3.3. Kullanılan Stok Solüsyonlar	41
4. BULGULAR	44
4.1. Araştırma Grubu Bireyleri Sitogenetik Analizleri	44
4.2. Beyin Tümörlü Olgularda FISH Analizleri	54
5. TARTIŞMA	69
5.1. Sitogenetik Analiz Bulguları	70
5.1.1. GBM Hastalarının Sitogenetik Analiz Bulguları	70
5.1.2. GBM Hastalarının FISH Analiz Bulguları	71
5.1.3. Ependimom Hastalarının Sitogenetik ve FISH Analiz Bulguları	76
6. SONUÇ	78
7. KAYNAKLAR DİZİNİ	81
8. ÖZGEÇMİŞ	93

ÖZET

Beyin tümörlerindeki genetik mekanizmalar tam olarak ortaya konulamamıştır. Son yıllarda beyin tümörlerinde moleküler sitogenetik (FISH, CGH) ve moleküler analizler ile beyin tümör progresyonundaki genetik mekanizmaların belirlenmesi yoğun olarak araştırılmaktadır. Bu prospektif çalışmada Anabilim Dalına iletilen tümör örneklerinde sitogenetik ve moleküler sitogenetik analizler (FISH) ile sayısal/yapısal kromozom anomalilerinin saptanması ve tümör hücrelerinin 14 marker (1p36, 1q25, sentromer 7, EGFR, sentromer 9, 9p21/p16, sentromer 10, 10q23, PTEN, p53, TOP2A, Her2/neu, sentromer 17,19p13 ve 19q13) açısından değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmaya katılan beyin tümörlerinin 27 tanesi GBM, 3 tanesi ependimom idi. Bu olgulara GTG bantlama ile kromozom analizi ve FISH analizi yapılmıştır.

30 beyin tümörlü olgunun 22 tanesinde kromozom analizi gerçekleştirilmiş olup, 8 tanesinden metafaz elde edilememiştir. Beyin tümörü örneklerinde sitogenetik analiz başarı oranı %73,4'tür. Kromozom analizi gerçekleştirilen olguların birinde normal karyotip saptanırken, diğer tüm olgularda kompleks kromozomal anomaliler izlenmiştir.

Yapılan FISH çalışmalarında; olguların %53,3'ünde (16 olgu) 9p21 bölgesinde delesyon, %33,3'ünde (10 olgu) 17p13.1 bölgesinde delesyon, %60'ında (18 olgu) 7p12 ve CEP 7 bölgesinde amplifikasyon, %20'sinde (6 olgu) 1p36 bölgesinde delesyon, %6,6'sında (2 olgu) 1p36 bölgesinde amplifikasyon, %6,6'sında (2 olgu) 1q25 bölgesinde amplifikasyon, %60'ında (18 olgu) TOP 2A bölgesinde amplifikasyon, %60'ında (18 olgu) HER2 bölgesinde amplifikasyon, %10'unda (3 olgu) CEP 17 bölgesinde delesyon ve %10'unda CEP 17 bölgesinde amplifikasyon (3 olgu), %30'unda (9 olgu) 19q13 bölgesinde delesyon ve %36,6'sında (11 olgu) 19q13 bölgesinde amplifikasyon, %13,3'ünde (4 olgu) 10q23 bölgesinde delesyon ve %13,3'ünde (4 olgu) 10q23 bölgesinde amplifikasyon gözlenmiştir.

Bu bulgular sonucunda; beyin tümörlü olgularda sitogenetik analiz yanında, belli prognostik faktörler için FISH analizinin gerekliliği ortaya konmuştur. Kriptik delesyon ve yeniden düzenlenmelerin belirlenmesinde FISH analizinin kullanılması beyin tümörlerinin gradeleme sınıflamasının yapılmasını olanaklı kılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Beyin tümörü, GBM, Sitogenetik, FISH

SUMMARY

Glial tumors are the most common tumors of the nervous system, affecting individuals at any age. Glioblastoma multiforme is the most common as well as the most aggressive type of primary brain tumor of glial tumors. Genetic mechanisms involved in the carcinogenesis of glial tumors have not been established well. Recently, molecular cytogenetics (FISH, CGH) and molecular techniques showed importance of different cancer-related genes in GBM tumorigenesis. This prospective study was aimed to determine numerical/structural chromosome abnormalities by cytogenetic analysis and to establish deletions and/or gains of 14 different loci by FISH analysis.

Of the tumor samples, 27 were GBM and 3 were Ependymoma. Culture-based chromosome analysis and interphase-FISH analysis were performed.

Chromosome constitutions of tumor samples could be determined in 22 of 30 tumors and our success rate was 73,4%. All samples showed complex karyotypes, but one had normal karyotype.

In FISH analysis, 9p21 locus deletion in 53,3 % (16 cases), 17p13.1 locus deletion in 33 % (10 cases), 7p12 and CEP 7 locus amplifications in 60 % (18 cases), 1p36 locus deletions in 16,6 % (5cases) and 1p36 locus amplification in 13,3 % (4 cases), TOP2A locus amplification in 60 % (18 cases), HER2 locus amplification in 46,6 % (14 cases), CEP17 locus deletion in 10 % (3 cases) and CEP17 amplification in 6,6 % (2 cases), 19q13 locus deletion in 26,6 % (8 cases), 19q13 locus amplification in 23,3 % (7 cases), 10q23 locus deletion in 13,3 % (4 cases) and 10q23 locus amplification in 13,3 % (4 cases) have been determined. In some cases both cytogenetic and FISH analysis showed the same abnormalities. However, the distribution of that abnormalities in the tissue could be determined by the FISH.

The findings clearly showed intratumoral heterogeneity in GBMs and this heterogeneity could be revealed by the FISH analysis.

Keywords: Brain tumour, GBM, Cytogenetics, FISH

SEKİLLER DİZİNİ

SEKİL

SAYFA

Şekil 2.1. Malign neoplazm sistemin şematik olarak gösterilmesi

4

Şekil 2.2. .Kontakt inhibisyon

6

Şekil 2.3. FISH tekniğinin uygulama aşamaları

23

RESİMLER DİZİNİ

<u>RESİM</u>	<u>SAYFA</u>
Resim 4.1.1. Araştırma grubu olgularımızdan GBM türüne sahip 1 no'lu olguya ait karyotip analiz görüntüsü	60
Resim 4.1.2. Araştırma grubu olgularımızdan GBM türüne sahip 1 no'lu olguya ait karyotip analiz görüntüsü	60
Resim 4.2. Araştırma grubu olgularımızdan GBM türüne sahip 3 no'lu olguya ait karyotip analiz görüntüsü	61
Resim 4.3.1. Araştırma grubu olgularımızdan GBM türüne sahip 8 no'lu olguya ait karyotip analiz görüntüsü	61
Resim 4.3.2. Araştırma grubu olgularımızdan GBM türüne sahip 8 no'lu olguya ait karyotip analiz görüntüsü	62
Resim 4.4. Araştırma grubu olgularımızdan ependimom türüne sahip 9 no'lu olguya ait karyotip analiz görüntüsü	62
Resim 4.5. Araştırma grubu olgularımızdan ependimom türüne sahip 10 no'lu olguya ait karyotip analiz görüntüsü	63
Resim 4.6. Araştırma grubu olgularımızdan GBM türüne sahip 3 no'lu olguya ait 9p21/CEP9 Probe FISH analiz görüntüsü	63
Resim 4.7. Araştırma grubu olgularımızdan GBM türüne sahip 4 no'lu olguya ait p53 Probe FISH analiz görüntüsü	64
Resim 4.8. Araştırma grubu olgularımızdan GBM türüne sahip 5 n'olu olguya ait p53 Probe FISH analiz görüntüsü	64
Resim 4.9. Araştırma grubu olgularımızdan GBM türüne sahip 6 no'lu olguya ait 19q13/19p13 Probe FISH analiz görüntüsü	65
Resim 4.10.1. Araştırma grubu olgularımızdan GBM türüne sahip 8 no'lu olguya ait 1p36/1q25 Probe FISH analiz görüntüsü	65
Resim 4.10.2. Araştırma grubu olgularımızdan GBM türüne sahip 8 no'lu olguya ait PTEN/CEP10 Probe FISH analiz görüntüsü	66
Resim 4.11. Araştırma grubu olgularımızdan Ependimom türüne sahip 9 no'lu olguya ait 9p21/CEP9 Probe FISH analiz görüntüsü	66

Resim 4.12. Araştırma grubu olgularımızdan Ependimom türüne sahip 10 no'lu olguya ait 7p12/CEP7 Probe FISH analiz görüntüsü	67
Resim 4.13. Araştırma grubu olgularımızdan GBM türüne sahip 11 no'lu olguya ait TOP2A/HER2/CEP17 Probe FISH analiz görüntüsü	67
Resim 4.14.1. Araştırma grubu olgularımızdan GBM türüne sahip 14 no'lu olguya ait 7p12/CEP7 Probe FISH analiz görüntüsü	68
Resim 4.14.2. Araştırma grubu olgularımızdan GBM türüne sahip 14 no'lu olguya ait 10q23/CEP10 Probe FISH analiz görüntüsü	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE

SAYFA

Çizelge 4.1: Beyin tümörlü olguların Yaş,Cins,Tür ve Metafaz eldesi

49

Çizelge 4.2: Beyin tümörlü olgulara ait karyotip analiz sonuçları

50

Çizelge 4.3: Beyin tümörlü olguların FISH analiz sonuçları

57

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Acıklama</u>
µl	Mikrolitre
AA	Anaplastik Astrositoma
amp	Amplifikasyon
CCD Kamera	Cooled Charged Camera
DAPI	4',6'-diamino-2-fenilindol
del	Delesyon
DNA	Deoxyribonucleic acid
EGFR	Epidermal growth factor receptor
g	Gram
GBM	Glioblastome Multiforme
İnv	İnversiyon
IPSS	Uluslararası Prognostik Puanlama Sistemi
iso	İzokromozom
KH ₂ PO	Potassium Dihydrogen Phosphate
LOH	Loss of heterozgosity
ml	Mililitre
NaCL	Sodium Chloride
NaOH	Sodium Hydroxid
Na ₂ HPO ₄	Di-sodium Hydrogen Phosphate
NISH	Non İstopic In Situ Hybridization
PBS	Phosphate Buffer Saline
rpm	Round Per Minute
SSC	NaCl ₇ Trisodium Citrate
SSS	Santral Sinir Sistemi
WHO	World Health Organization

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, hücre proliferasyonunun kontrolünün kaybolduğu genetik orijinli hastalık grubudur. Bu hastalık normal hücre proliferasyonu ve diferansiasyonunda etkili olan protoonkogen, tümör süpressör gen ve DNA tamir genlerinin mutasyonları sonucu ortaya çıkar.

İnsan beynindeki neoplastik dönüşüm birtakım genetik değişimlerin neticesinde meydana gelir. Bu genetik değişimler hücre proliferasyonunun regülasyonunda önemli rol oynayan proteinlerin ekspresyonunun değişmesinde rolü olan farklı kromozomların artışı veya kaybını içerir (7, 11, 47, 50).

Beyin tümörlerindeki genetik mekanizmalar tam olarak ortaya konulamamıştır. Son yıllarda beyin tümörlerinde moleküler sitogenetik (FISH, CGH) ve moleküler analizler ile beyin tümör progresyonundaki genetik mekanizmaların belirlenmesi yoğun olarak çalışılmaktadır. Ancak bu yöntemlerle genomdaki belirli bölgeler incelenebilmektedir. Farklı derecelerde olan beyin tümörlerinin gelişiminde etkili farklı kromozom ya da kromozom bölgelerinin belirlenmesinde sitogenetik analizlerin önemi bilinen bir gerçektir (2, 5, 39, 59).

Bilindiği gibi, günümüzde hematolojik malignensilerin klasifikasyon ve tedavi seçiminde sitogenetik ve moleküler markerlar önemlidir. Beyin tümörlerinden elde edilen veriler, hastaya ve ilgili klinisyene, hastanın prognoz ve tedaviye yanıtı ile ilgili verilere bir temel oluşturacaktır.

Yukarıda belirtilen gerekçelere bağlı olarak bu çalışmada beyin tümörlerinde sayısal ve yapısal kromozom anomalilerinin sitogenetik analizlerle belirlenmesi ve tümör progresyonunda etkili olan onkogen ve tümör süpressör genlerin tümör hücrelerindeki durumunun FISH analizleri ile ortaya konması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. KANSER

Kanser, görülen en yaygın ve ciddi hastalıklardan biridir. Yapılan istatistiksel çalışmalar, kanserin toplumların yaklaşık üçte birinden fazlasında görüldüğünü, ölümlerin yüzde yirmisinden fazlasından sorumlu olduğunu ve gelişmiş ülkelerin toplam sağlık harcamalarının yaklaşık yüzde onundan fazlasının kanser harcamalarının oluşturduğunu göstermiştir (41).

2.1.1. KANSER NEDİR?

Kanser tek bir hastalık olmayıp, daha çok bir kitle veya tümör oluşumuna yol açan, kontrolsüz hücre proliferasyonu ile karakterize olan neoplazinin kesin formlarını tanımlamak için kullanılır. Neoplazinin kanser olabilmesi için malign özellik göstermesi gereklidir yani kontrolsüz büyümesi, komşu dokuları istila edebilmesi veya metastaz yapabilme özelliklerine sahip olmalıdır.

Anormal hücre birikimi olan neoplazi, hücre proliferasyonu ile hücre ölümü arasındaki dengesizlikten oluşur. Prolifere olan hücreler, hücre siklusuna girerler ve mitozu uğrarlar. Apoptozis ile de hücre ölümü gerçekleşir. Ancak çeşitli mekanizmaların sonucunda hücreler normalin üzerinde çoğalır ve apoptozu uğramazlar ise, o zaman hücre çoğalması ile hücre ölümü arasında bir dengesizlik meydana gelir ve bunun sonucunda anormal hücre birikimi meydana gelir. Tüm bu olaylar gen ürünü olan proteinler tarafından gerçekleştirilir ve ilgili gendeki bir başkalaşım o proteinin yanlış ya da az üretilmesine neden olur. Bunun sonucunda da ilgili proteinin rol oynadığı mekanizmalarda sapmalar meydana gelir (Şekil 2.1).

Kanser; genetik orjinli bir hastalıktır. Kanser oluşumuna neden olan genler üç kategoriye ayrılır:

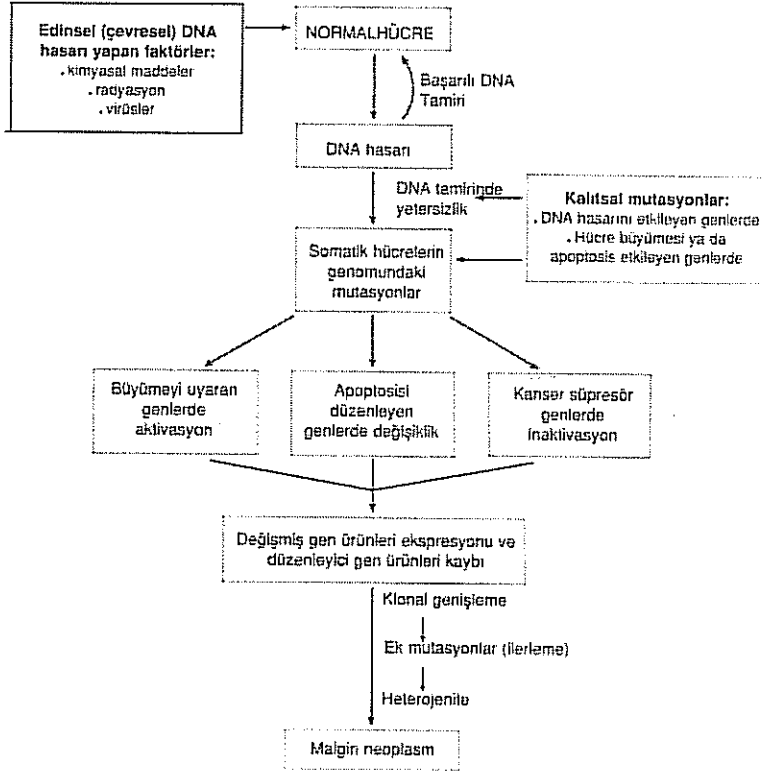
- 1-Onkogenler
- 2-Tümör süpressör genler
- 3-DNA tamir genleri

Normal fonksiyonu hücre bölünmesini teşvik etmek olan genler protoonkogenler olarak adlandırılır. Eğer protoonkogenler sürekli çalışır hale gelirse kontrolsüz hücre bölünmesine neden olur, bu da tümör oluşumuna öncülük eder. Protoonkogen mutasyonlarının bir sonucu olarak böyle bir durum oluştuğunda, bu genlere onkogen adı verilir. Tümör süpressör genlerin aksine başkalaşım dominant özelliğindedir, yani genin sadece bir alelinde meydana gelen mutasyon yeterlidir.

Tümör süpressör genler normal hücre büyümesinde, hücre döngüsünün differansiasyon ve progresyonunda önemli bir rol oynarlar. Tümör süpressör genin fonksiyon kaybı aberant hücre proliferasyonundan sorumlu olabilir. Bu başkalaşım resesif özelliğindedir, yani genin her iki alelinin de başkalaşıma uğraması gereklidir.

DNA replikasyonu sırasında yanlış bazların DNA ya katılması ve DNA'nın spontan veya kimyasal ajanlara, radyasyona maruz kalması durumunda DNA da çeşitli kimyasal değişiklikler ortaya çıkar. Hücre genomunun bütünlüğünün korunabilmesi için hücreler harap olan DNA yı tamir etmek için mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bu DNA tamir mekanizmaları, DNA harabiyetinden sorumlu kimyasal reaksiyonun direkt olarak önlenmesi ve harap olan bazların DNA'dan çıkarılması olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Bu ana gruplar içerisinde hatalı kısım çıkarılarak yapılan (baz çıkarılması, nükleotid çıkarılması) yanlış-eşleşme tamiri, replikasyon sonrası tamir gibi farklı tamir mekanizmaları bulunmakta ve her mekanizmada çeşitli gen ürünleri görev almaktadır. Ancak bu gruba dahil olan genlerde oluşacak başkalaşım, fonksiyonel ürün

sentezlenmesini engellediği için DNA tamir edilemeyecek ve genom dengesi bozulacaktır ki bu da karsinogeneziste önemli bir etkidir.



Şekil 2.1. Malign neoplazm sisteminin şematik olarak gösterilmesi. Kumar, V., Cotran, R. S., Robbins, S.L., 2003, Robbins Temel Patoloji, 7'inci baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul

2.1.2. TÜMÖR NEDİR?

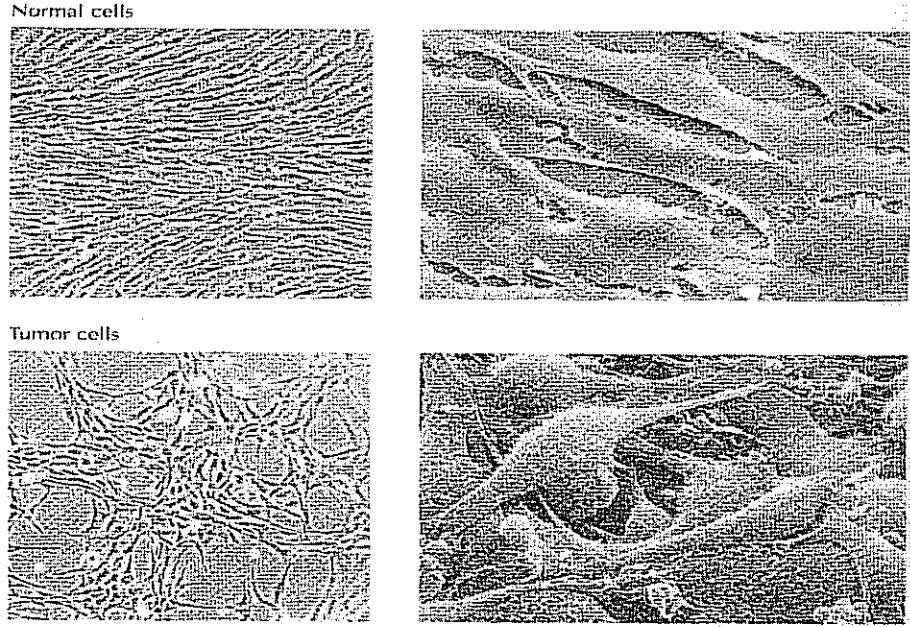
Tümör, kontrolsüz hücre proliferasyonu sonucu meydana gelen hücre kitlesine denir. Bu terim bir beden yüzeyinde şişliğe yol açan neoplastik kitleleri tanımlar. Tümör benign ve malign olmak üzere neoplazmin potansiyel klinik davranışının değerlendirilmesine göre ikiye ayrılır. Benign tümör terimi tümörün bulunduğu bölgede

lokalize kalacağı, diğer bölgelere yayılmayacağı ve lokal cerrahi rezeksiyonla alınıp hastanın sağ kalımını etkilemeyeceği düşünüldüğünde kullanılır. Ancak benign tümörlerin lokalize şişliklerden daha fazla sorun yaratabilecekleri ve bazen ciddi bir hastalığa yol açabileceklerine dikkat etmek gerekir. Malign tümör terimi ise komşu yapılara invaze olup, onları harap edebileceği ve uzak bölgelere yayılarak (metastaz yaparak) ölüme yol açabileceğini anlatmak amacıyla kullanılır. Malign tümörlerin hepsi kanser olarak adlandırılır.

2.1.3. Tümör Hücresinin Özellikleri

Normal hücrelerde oluşan başkalaşım ile uyaranların birlikte etkileşimi hücrenin tümör hücresi haline dönüşmesine neden olur. Bu değişimler, hücrenin normal fonksiyonlarının bozulması ve farklı özellikler kazanmasında etkilidir. Tümör hücresinin bu özellikleri genel olarak aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- 1- Tümör hücreleri çok yüksek hücre yoğunluğu olsa da çoğalmaya devam ederler yani kontrolsüz proliferasyon gösterirler.
- 2- Ekstrasellüler büyüme faktörlerine ihtiyaç azalmıştır. Proliferasyon için kendi büyüme faktörlerini kendileri üretirler.
- 3- Büyüme faktörlerinin aşırı şekilde üretilmesi, hücre bölünmesinin sürekli uyarılmasına neden olur ki bu da otokrin büyümeyi sağlar.
- 4- Normal hücrelerde hücrelerarası iletişim vardır ve bu ilişki hücre bölünmesinin kontrolünde çok önemlidir. Ancak tümör hücrelerinde, hücrelerarası iletişim bozulmuştur. Hücre bölünmesinin durdurulması özelliği yitirilmiştir. Bu nedenle, hücrelerde düzensiz çok katlı çoğalma ortaya çıkar (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Kontakt inhibisyon. Normal ve tümör hücrelerinin solda ışık, sağda elektron mikroskopundaki görüntüsü (*Cooper, M., 1997, The cell, A Molecular Approach, ASM Press Washington ,D.C,606 p. 'dan alınmıştır*).

- 5- Tümör hücreleri tarafından salgılanan proteazlarla, ekstrasellüler matriks elemanları parçalanır ve malign hücreler komşu dokuya invaze olur.
- 6- Tümör hücreleri yeni kan damarlarının formasyonunu (anjiogenezis) sağlayan büyüme faktörlerini salgılar. Bu sayede de proliferasyona giren tümör hücrelerine gerekli oksijen ve besin yeni kan damarları ile sağlanır.
- 7- Hücre farklılaşması yitirilmiştir.
- 8- Normal hücrelerde yaşanan hücreler apoptoza (programlanmış hücre ölümü) girerken kanser hücrelerinde apoptozis kaybı vardır. Bu nedenle tümör hücreleri normal hücrelere göre daha uzun yaşarlar.

2.1.4. Benign ve Malign Tümörlerin Özellikleri Nedir?

Bazı özellikler benign tümörleri işaret ederken, bazıları maligniteyi düşündürür. Bazı durumlarda da neoplazinin görünümüyle biyolojik davranışı arasında tam bir uyum bulunmayabilir. Ancak bu sorunlar her zaman görülmez ve genellikle benign ve malign tümörlerin ayırt edilebileceği güvenilir kriterler bulunur. Bu kriterler diferansiyasyon ve anaplazi, büyüme hızı, lokal invazyon ve metastazdır.

2.1.4.1. Diferansiyasyon ve anaplazi:

Diferansiyasyon (farklılaşma), tümör hücrelerinin normal hücrelere görünüş ve işlev yönünden ne kadar benzediklerini tanımlayan bir terimdir. "İyi farklılaşmış" bir tümör hücresi, normal hücreye çok benzer bir biçimdedir ve onun yaptığı işleri kusursuz bir biçimde yapar. Benign tümörler, iyi diferansiyasyonlu hücrelerden oluşur ve bu tümörlerde mitoz sayısı son derece düşük ve görünüşleri normaldir. Malign tümörler ise iyi diferansiyasyonlu ile indifferansiyasyonlu dereceleri arasındaki hücrelerden oluşabilir. İndifferansiyasyonlu hücrelerin oluşturduğu malign tümörlere "anaplastik" adı verilir. Aslında diferansiyasyon kaybı ya da anaplazi, malignitenin en önemli işareti olarak kabul edilir. Anaplazi, farklılaşmanın olmayışını anlatır. Ancak artık kanserlerin tamamının değilse bile çoğunun dokulardaki kök hücrelerden kaynaklandığını ve diferansiyasyon olmamasının spesifik hücrelerin farklılaşmamasından çok, diferansiyasyonlu olmamış tümörleri işaret ettiğini anlarız. Anaplastik bir tümörde pleomorfizm görülür, yani hücrelerin boyut ve şekilleri önemli ölçüde farklılık gösterir. Anaplastik tümörde, çekirdek morfolojisi değişmiş, çok sayıda ve atipik mitozlar, polarite yitimi, dev hücreler ve nekroz gibi bulgular görülür. Farklılaşma ile ilgili bir anormallik anlatan displazi terimi, epitel örtüsünde görülen ve neoplazi öncüsü olabilen bir durumu anlatır. Displastik hücreler morfolojik olarak birbirlerine az benzerler ve birbirlerine göre konumları da normale göre belirgin olarak değişkenlik gösterir. Bu bozuklukların yaygınlığı ve şiddeti çok arttığında "karsinoma in situ" olarak adlandırılan çevreye yayılma ve uzak organlara sıçrama yeteneği olmayan bir neoplazi söz konusudur.

2.1.4.2. Büyüme hızı:

Benign tümörlerin çoğunun yavaş büyüdüğü ve malign tümörlerin çoğunun çok daha hızlı büyüüp uzak bölgelere yayıldığı ve ölüme yol açtığı bilinir. Ancak bu genellenenin birçok istisnası bulunur ve bazı benign tümörler kanserden daha hızlı büyüeyebilirler. Malign tümörlerin büyüme hızı genel olarak diferansiasyon düzeyleriyle bağlantılıdır ve sonuç olarak büyüme hızları büyük bir değişkenlik gösterir.

Tümör hücrelerinin yalnızca çoğaldıkları ve ölümsüz oldukları varsayıldığında 1g ağırlıkta bir kitle oluşturabilmeleri için, ilk hücrenin ve ondan üreyen tüm hücrelerin otuz kez bölünmeleri gerekir. Bu kitlenin 1000g ağırlığa çıkması için ise on bölünme yeterlidir (çoğu tümör ölüme neden olduğunda 1000g dan az ağırlıktadır). Dolayısıyla, tümörlerin ömürlerinin büyük kısmını klinik bulgu vermeden geçirdikleri ve saptandıktan sonra kısa sürede çok fazla büyüyecekleri anlaşılır. Tümör hücreleri çoğaldıkları gibi ölmektedirler de. Ayrıca bütün tümör hücrelerinin sürekli olarak çoğalmakta oldukları doğru değildir. Bu hücrelerin bir kısmı ölür, bir kısmı yaşamını çoğalmadan sürdürür, yalnızca bir kısmı çoğalır. Tümörün büyüme hızını belirleyen, birim zamanda çoğalan hücre sayısı ile birim zamanda ölen hücre sayısı arasındaki farktır.

Bölünmenin ön koşulu, hücrelerin dinlenme durumundan çıkıp hücre döngüsüne (siklus) girmeleridir. Belli bir anda hücre döngüsünde bulunan hücrelerinin toplam hücre sayısına oranı, çoğalan bölüntü (growth fraction) olarak adlandırılır. Hızlı büyüyen tümörlerde bile bu oran %20'den düşüktür. Çoğalan hücresi yüksek olan tümörler kanser kemoterapisine daha duyarlı olurlar. Az farklılaşmış tümörler daha hızlı büyütler.

2.1.4.3. Lokal invazyon:

Benign tümörler, çevresindeki dokuyu itip sıkıştırarak büyür ve kaynaklandığı bölgede lokalize kalır. Bu yüzden benign tümörlerin çevresinde sıkışmış dokulardan

oluşan kapsül bulunur. Kapsüllü bir tümörün muayenede ele gelmesi yerinden oynatılması ve cerrahi olarak çıkarılması daha kolaydır. Ancak tüm benign tümörlerin kapsüllü olmadığını vurgulamak gerekir. Kan damarı oluşturan tümörler (hemanjiom) başta olmak üzere, bazı benign tümörler kapsülsüzdür.

Benign tümörlerin malign tümörlerde olduğu gibi infiltrasyon, invazyon ve uzak bölgelere metastaz yapma kapasiteleri yoktur. Oysaki malign tümörlerde durum tam tersidir. İlerleyici infiltrasyon, invazyon, harabiyet ve çevre dokulara penetrasyonla büyürler. Kapsül geliştirmezler. Lokal invazyon malign tümörü benign tümörden ayıran en duyarlı bulgulardan biridir.

2.1.4.4. Metastaz:

Metastaz, primer tümörle devamlılığı olmayan uzak dokulara yerleşebilen sekonder implantların (metastazlar) gelişmesi anlamına gelir. Metastaz gelişimi, bir tümörün malign olduğunun en güvenilir göstergesidir. Ancak tüm kanserler metastaz yapma yeteneğine sahip değildir. Önemli istisnalar olarak ciltte bazal hücreli karsinoma ve merkezi sinir sistemine ait primer tümörleri verebiliriz. Bu tümörler kaynaklandığı primer bölgede yüksek derecede invaziv olmalarına karşı seyrek olarak metastaz yaparlar.

Solid tümörü olan ve yeni tanı konan hastaların yaklaşık %30'u (melanoma dışındaki cilt kanserleri) metastazla belirti verir. Hastaların %20'sini oluşturan diğer bir grupta ise tanı sırasında gizli metastazlar görülür. Genel olarak primer neoplazm ne kadar anaplastik ve ne kadar büyük olursa metastatik yayılma olasılığı o kadar artar. Ancak bunun çok sayıda istisnasıda bulunur. Örneğin son derece küçük kanserlerin metastaz yaptığı bilinmektedir ve aksine bazı büyük lezyonlar yayılmayabilir. Yayılma bize hastalığın iyileşme olasılığının engellendiğini düşündürür (32, 41).

2.2. BEYİN TÜMÖRLERİNİN EPİDEMİYOLOJİSİ VE RİSK FAKTÖRLERİ

Beyin tümörleri tüm malign neoplazmların yaklaşık %2'sini oluşturmaktadır. Bununla beraber tüm çocukluk çağı malignitelerin ise %20'sini oluşturur ve böylece lösemiden sonra çocuklarda ikinci sıklıkla görülen kanser türüdür (45,66).

Santral sinir sistemi tümörleri içinde, ilk 15 yaşındaki primer tümörlerin %40-45'i, erişkin yaş grubundaki ise %50-60'ı astrositer kökenli tümörlerdir (45,66).

Santral sinir sistemi tümörlerinde yaş dağılımına bakıldığında yirmi yaşlarından yetmiş yaşına kadar giderek artan bir sıklık gösterdiği, yetmiş yaşından sonra ise tekrar sıklığında azalma gözlemlendiği görülmüştür. Hemen hemen tüm yaş gruplarında erkeklerde kadınlara göre hafif bir fazlalık saptanmaktadır.

Histolojik tiplerine göre insidans incelemelerinde ise çocukluk çağı ile erişkinlerde belirgin farklılık görülür. Çocukluk çağında primitif nöroektodermal tümörler (PNET) ve ependimomlar diğer tümör türlerine göre daha sık görülürken erişkin yaş grubunda ise glial tümörler ve menenjiomlar belirgin bir derecede daha sık görülür.

İnsidans çalışmaları, yıllar içinde santral sinir sistemi tümörlerinin sıklığında hafif bir artış olduğunu göstermektedir. Bunun oluşumunda çevresel etkenlerin etkinliği tartışmalı olmakla beraber bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans incelemelerin yaygın olarak kullanılmaya başlanmasının tanıyı kolaylaştırması açısından bu durumu açıklayabileceği düşünülmüştür (14,19, 22, 42, 55, 65).

Santral sinir sistemi tümörleri yaş, tür ve zaman içinde insidans oranlarında değişkenlik göstermekle birlikte popülasyonlar arasında da farklılık göstermektedir. Genetik ve çevresel etkenlerin önemli rol oynadığını gösteren kanıtlardan biri teknolojik olarak gelişmiş bir ülke olan Japonya' da, Amerika Birleşik Devletlerinden yaklaşık 3

kat daha az primer beyin tümörü saptanmasıdır. Aynı zamanda tüm Asya'da da santral sinir sistemi tümör sıklığı azdır. Yine aynı ülkede yaşayanlar arasında da beyaz ırkta SSS tümörü sıklığı siyah ırka göre belirgin derecede daha fazladır (42).

Çevresel faktörler: Literatürde çok sayıda çevresel ajanlarla SSS tümörleri sıklığı arasında ilişki kuran yayınlar mevcuttur. Çevresel faktörler içinde en iyi ortaya konulan faktör radyasyondur. İn utero dönemde, çocukluk çağında ya da erişkin çağda tedavi veya tanısız amaç ile radyasyona maruz kalma, artmış SSS tümörleri sıklığı ile karakterizedir (47,66).

N-nitrosa bileşenleri, organokloridler, nitrat ve nitritler, formaldehit, vinil klorid ve birkaç kimyasal potansiyel etken ajanı sayılabilir.

Sigaranın pasif veya aktif içiciliği ile SSS tümörlerinde artış gösteren çalışmalar olmakla beraber kanıtlanmış bir birliktelik mevcut değildir (66).

2.3. BEYİN TÜMÖRLERİNİN SINIFLANDIRILMASI

Santral sinir sistemi tümörlerinin belirgin bir derecede heterojen bir gruptan oluştuğu için herkes tarafından kabul görmüş bir sınıflama gerçekleştirmek zordur (15). Günümüzde sınıflandırma hemen hemen tamamen patolojiye dayanmaktadır.

Beyin tümörlerinin bugünkü sınıflanmasının temelini Virchow atmıştır. 1860'da beyin hücreleri arası matriksi olarak nöroglia'yı tarif etmiştir. Yine Virchow tarafından tümörlerin makroskobik ve mikroskobik özellikleri arasında bağlantı kurulmasını sağlamış ve "*glioma*" tanımını de ilk kez yapmıştır. Bailey ve Cushing 1926 yılında gliomaların bir sınıflamasını yapmışlardır. Yapmış oldukları şema tam 14 tümör tipini içermektedir. Ancak sınıflama karmaşıklığı dolayısıyla geniş bir kabul görmemiştir. Yirminci yüzyılın ortasında Kernohan yeni ve basit bir sınıflama geliştirmiştir. Daha önce tanımlanmış olan karmaşık sınıflama basit 5 glial tümör kategorisine

indirgenmiştir. Astrositoma, ependimoma, nöroastrositoma, medulloblastoma ve oligodendroglioma. Ancak daha önemlisi, glial tümörleri 4 evre şeklinde kendi içinde gruplandırma sistemini geliştirmiştir. Bu sistem artan anaplazi ve azalan farklılaşmayı göstermektedir. Ancak Evre I ve II arasında, Evre II ve IV arasında bir benzerlik olmasına karşılık, bu iki grup arasında belirgin bir biyolojik davranış farkı mevcut değildir. Bu nedenler ile Ringertz 1950'de 3 evre'li bir sistem ortaya koymuştur. Yine 1980'lerde Doumas ve Dupont şimdi St Anne-Mayo diye anılan hücre morfolojik özelliklerine dayanan bir 4 basamaklı evre sistemini ileri sürmüştür (19, 32, 55):

Bu evreleme sistemi 4 kriterin varlığı veya yokluğuna dayanmaktadır. Bu kriterler:

- 1-Nükleer Atipi
- 2-Mitozlar
- 3-Endotelyal Proliferasyon
- 4-Nekroz

Evre 1: Bu kriterlerden hiçbirine sahip değildir.

Evre 2: Bu kriterlerden birine sahiptir.

Evre 3: Bu kriterlerden ikisine sahiptir.

Evre 4: Bu kriterlerden en az üçüne sahiptir.

1993'de WHO (World Health Organization) tümörlerin sınıflandırmasını yayınlamış ve Evre I-IV arasındaki tümörler benign'den malign'e doğru sınıflandırılmıştır. Astrositik tümörlerin WHO tanımlanmasında selülarite, nükleer ve hücrel pleomorfizm, mitoz, endotelyal proliferasyon ve nekrozun derecesi vurgulanır. Glioblastomada yüksek oranda nükleer ve hücrel pleomorfizm, mitotik figürler, endotelyal proliferasyon ve nekroz görülür. Anaplastik astrositomada ise daha az

pleomorfik hücreler görülür ve nekroz görülmez. Bu sınıflama histopatolojik özellikler kadar yaşam süresi verilerine de dayanmaktadır (19,32).

Bugün için en sık kullanılan sistem ise 2000 yılında yeniden gözden geçirilerek düzenlemeler yapılan 1993'deki WHO sınıflandırmasıdır.

2.3.1. WHO Nöroepitelyal Doku Tümörlerinin Histolojik Sınıflandırması(32)

Nöroepitelyal Doku Tümörleri

1. Astrositik tümörler

- a. Diffüz astrositoma
 1. Fibriler astrositoma
 2. Protoplazmik astrositoma
 3. Gemiositik astrositoma
- b. Anaplastik astrositoma
- c. Glioblastoma multiforme
- d. Pilositik astrositoma
- e. Pleomorfik ksantroastrostitom
- f. Subependimal dev hücreli astrositom

2. Oligodendrogliyal tümörler

- a. Oligodendrogliom
- b. Anaplastik oligodendrogliom

3. Miks gliomalar

- a. Oligoastrostitom
- b. Anaplastik oligoastrostitom

4. Ependimal tümörler

- a. Ependimoma
- b. Anaplastik ependimoma

c. Miksopapiller ependimoma

d. Subependimoma

5. Koroid plexus tümörleri

a. Koroid pleksus papillomu

b. Koroid pleksus karsinomu

6. Nöronal ve mixt nöroglial tümörler

7. Nöroblastik tümörler

8. Pineal parenkimal tümörler

9. Embriyonal tümörler

10. Orijini belirsiz glial tümörler

2.4. ASTROSİTOMALAR

Astrositomalar, primer beyin tümörlerinin en yaygın formudur ve tüm erişkin glial tümörlerinin yaklaşık %80–90'ını ve tüm merkezi sinir sistemi neoplazmlarının %40'ından daha fazla bir miktarını oluşturur. Dünya sağlık örgütünün (WHO) evreleme sistemine göre astrositomalar histopatolojik ve biyolojik davranışlarına göre benignden maligne doğru 4 evrede incelenir (15, 16, 29, 43, 50, 51).

1-Pilositik astrositoma (WHO Evre 1)

2- Düşük Evreli Diffüz Astrositoma (WHO Evre 2)

3-Anaplastik astrositoma (WHO Evre 3)

4-Glioblastoma multiforme (WHO Evre 4)

2.4.1. Düşük Evreli Astrositomalar; Pilositik Astrositoma ve Düşük Evreli Diffüz Astrositoma (WHO Evre 1 ve 2)

2.4.1.1. Pilositik Astrositoma (WHO Evre 1)

WHO evreleme sistemine göre evre 1'de yer alır. Diğer astrositomalardan hemen hemen değişmeyen benign biyolojik davranışları ile ayırt edilir. Yavaş büyüyen bir lezyondur ve nadiren progresyonu neoplaziye doğru ilerler. Tipik olarak çocuklarda ve genç erişkinlerde görülüp genellikle iyi bir prognozuna sahiptir. Tüm intrakranial tümörlerin yaklaşık %4–5'ini oluşturur. Çocukluk çağı beyin tümörleri içinde ise %15'lik bir kısmı oluşturur. Makroskobik olarak sıklıkla bir kist duvarında bulunan nodül olarak kendini gösterir. İnfiltratif veya düzgün sınırlı solid kitle şeklinde olabilirler. Mikroskobik olarak sadece orta derecede hipersellüritiye sahiptirler. Sıklıkla vasküler endotelial proliferasyona rastlanır. Ancak bu bulgu diğer astrositomalarda olduğu gibi kötü prognoz belirtisi değildir ve anaplazinin diğer bulguları hemen hiçbir zaman görülmez ve cerrahi rezeksiyondan sonra hastalar uzun yıllar yaşayabilir (8,15, 32, 50, 59).

Pilositik astromalı hastalarda sitogenetik açıdan sıklıkla normal karyotipler gözlenmektedir. Anormal karyotipli hastalar arasında; en çok görülen kromozomal anomaliler; 17p kaybı, 22q kaybı ve X ve Y seks kromozom kaybıdır (8, 50, 66).

Klinik belirtiler olarak baş ağrısı (özellikle bifrontal veya suboksipital), kusma, uyuklama hali, optik papillanın ödemi görülür.

2.4.1.2. Düşük Evreli Diffüz Astrositoma (WHO Evre 2)

Düşük evreli diffüz astrositomalar, yaklaşık olarak astrositomaların %10–15'ini oluşturur. Genellikle daha genç yaşları etkilerler ve ortalama olarak etkilenen hasta yaşı 35 dolaylarındadır. Sıklıkla kendini nöbet, baş ağrısı ve yavaş ilerleyen nörolojik

bulgularla gösterir. Genellikle yıllar ile ölçülebilen bir periyot içerisinde semptomlar gelişir; hasta tanı konmadan önce bu semptomlara uzun dönem sahip olabilir. Karakteristik yerleşim bölgeleri subkortikal ak madde ve tercihen frontal bölgedir. İnfiltratif yapıya sahiptir. Sitogenetik açıdan kromozom 6q, 13q, 17p, 22q kaybı sıklıkla gözlenir (16, 22, 50).

Diffüz infiltratif astrositik tümörlerde tanımlanan histopatolojik tipler:

- 1-Fibriller astrositom
- 2-Gemistositik astrositom
- 3-Protoplazmik astrositom

Düşük evreli diffüz astrositomalar (evre 2) içinde her üç hücre tipi belli oranda bulunurken; en çok hangi hücre tipi bulunuyorsa o hücre tipine göre tümör sınıflandırılır. Bunların içinde en sık görülen fibriller tümördür. Gemistositik astrositom %20'lik oranda 2. sıklıkla görülür ve prognozu diğerlerine göre daha kötüdür. Protoplazmik astrositom ise %1'lik oranla çok nadir görülür.

Tüm diffüz düşük evre astrositomaların anaplastik astrositomaya progresyon riski bulunmaktadır. Özellikle fibriller astrositomalarda bu oran %80'e kadar çıkmaktadır. Ancak bu diferansiyasyon farklılığının ne kadar bir latent periyotdan sonra geliştiği konusu halen tartışmalıdır (55).

Diffüz düşük evre astrositomalarda ortalama yaşam süresi yaklaşık 7,5 yıldır.

2.4.2. Yüksek Evre Astrositomalar; Anaplastik Astrositoma (AA) ve Glioblastome Multiforme (GBM) (WHO Evre 3 ve 4)

2.4.2.1. Yüksek Evre Astrositomaların Epidemiyolojisi (WHO Evre 3 ve 4)

Yüksek evre astrositomalar (AA ve GBM) primer beyin tümörleri arasında en sık görülen türdür ve primer beyin tümörlerinin yaklaşık %40–50'sini oluşturur.

Primer beyin tümörlerinin dağılımı büyük oranda yaşla ilişkilidir. GBM ve AA'nın insidansı 14 yaş altında 100.000'de 0,2–0,5 iken, 45 yaş üzerinde ise 100.000'de 4-5'e çıkmaktadır. AA, 40–50 yaşları arasındaki bireylerde daha sık görülürken, GBM'ler biraz daha yaşlı bir grupta 50–60 yaşlarında daha sıktır.

Aynı şekilde astrositomaların yaş ile yerleşim alanları da değişkenlik göstermektedir. 25 yaş altındaki astrositomaların 2/3'ü infratentoryal iken 25 yaş üzerinde ise %90'ı supratentoryal yerleşim gösterir.

GBM, de nova olarak (primer) gelişebilmekle beraber, daha düşük evreli bir tümörden progresyon ile de gelişebilir (sekonder). Bu iki tip GBM, primer ve sekonder GBM olarak adlandırılır. Primer GBM, daha yaşlı bireylerde görülür ve prognozu daha kötüdür. Sekonder GBM ise daha genç bireylerde görülür ve düşük evre gliomanın progresyonu sonucu meydana geldiğinden dolayı genellikle aylar veya yıllar süren klinik tablolar ile kliniklere başvurulur.

Primer GBM ve sekonder GBM'de sitogenetik açıdan da önemli farklılıklar görülür. Örneğin primer GBM de EGFR amplifikasyonu, MDM2 amplifikasyonu sıklıkla görülürken, sekonder GBM de p53 mutasyonu görülmektedir (1, 8, 9, 38, 40).

Yıllar içinde de GBM sıklığı artmaktadır. Özellikle gelişmiş ülkelerde yapılan çalışmalarda ABD ve Kanada da 70'li yıllardan 80'li yılların ortalarına kadar tespit edilen glioblastom olguları yaklaşık 2 kat kadar artış göstermiştir. Bunun nedeni ise teknolojik gelişmeler ile tümörün tespit edilme oranının artması olarak ortaya konulmuştur. Yüksek evre glial tümörlerde buna benzer bir artış, son 7 yıl içinde %5'lik bir artış ile Fransa'da tespit edilmiştir.

AA ve GBM, erkeklerde kadınlara göre, beyaz ırkta da siyah ırka göre bir miktar daha sıktır.

2.4.2.2. Patoloji:

Histolojik özelliklerinden bazıları örneğin nükleer atipi, hücre dansitesi, mitoz, endotelial hiperplazi ve nekrozun yaşam süresine anlamlı derecede etkili olduğu gösterilmiştir.

AA'da artmış hücre yoğunluğu, sık mitotik figürler, atipik nükleus görülür, nekroz görülmez. GBM'de ise AA'lara benzer şekilde atipik nükleus, mitoz, endotelial proliferasyon görülür, ayrıca nekroz alanları da mevcuttur.

AA'nın ortalama yaşam süresi 36–50 ay, GBM'in ise yaklaşık 12 aydır (53).

2.5. BEYİN TÜMÖRLERİNDE SİTOGENETİK VE MOLEKÜLER SİTOGENETİK ANALİZ

2.5.1. Beyin Tümörlerinde Sitogenetik Analizler

Klinik sitogenetik, kromozomların yapılarını ve kalımlarını tıbbi genetiğe uygulayarak inceleyen bilim dalıdır. Kromozomların sayısında ve yapısında görülen değişikliklerin birtakım hastalıklara yol açtığı bilinen bir gerçektir (41).

Beyin tümörleri de diğer tümör tipleri gibi prekürsör hücrelerde bazı genetik aberasyonların kademeli birikimi sonucunda açığa çıkar. Bu genetik değişiklikler kromozomal düzeyde olabilir, bir kromozomun büyük bir kısmının kaybı veya tek bir gen içindeki nokta mutasyonundan dolayı olabilir. İlerleyen yıllarda gelişen bantlama ve farklı sitogenetik analiz yöntemleri ile kanser genetiğine ait bilgiler artmış olup birçok hastalığa özgün sitogenetik anomaliler tanımlanmış ve altta yatan moleküler mekanizmalar ortaya konmuştur. Bu yüzden sitogenetik analiz tartışmasız gereklidir (6, 7, 11, 47, 50).

Ayrıca beyin tümoreenezinin progresyonu aşamasında farklı evrelerde farklı kromozomların etkili olduğu bilinen bir gerçektir. Gelecekte, sitogenetik analizin hastalığın tipi ve tedavinin etkinliğiyle ilişkisi büyük önem kazanacaktır.

2.5.2. Beyin Tümörlerinde Moleküler Sitogenetik Analizler

Moleküler sitogenetik metodlar (ISH: In situ hibridizasyon, FISH: Floresan in situ hibridizasyon, CGH: Comparative genomic hybridization) klasik sitogenetik yöntemlerle tanımlanamayan kromozomal mikrolezyonlar ve yeniden düzenlenmeleri ortaya koyma olanağı sağlar. Sitogenetik rutin GTG bantlama tekniğinde >4Mb, HRB (2000 band düzeyinde) tekniğinde de >2Mb ye kadar olan düzensizlikler

saptanabilmektedir. FISH tekniği ile ise 1–3 Mb'a kadar olan yapısal düzensizlikler saptanabilmektedir (4, 7, 22).

2.5.2.1. Floresan İn Situ Hibridizasyon

Moleküler sitogenetik, işaretli DNA problemleri kullanılarak interfaz veya metafazdaki kromatin ve kromozomların mikroskobik analizi olarak tanımlanabilir. Bu yaklaşım, mitotik hücrelerin standart mikroskobik preparatlarında, denatüre edilmiş kromozomal DNA ile tek dallı DNA dizilerinin (prob) uygun koşullarda birleşebildiğinin gözlenmesi ile ortaya konmuştur (4).

İn Situ Hibridizasyon (ISH) tekniği spesifik DNA ve RNA sekanslarının doku kesitlerindeki her hücrede, kromozom preparasyonlarında veya interfaz nükleuslarında morfolojik olarak gösterilmesini ve nükleik asitlerin kendi doğal hücre ortamında incelenmesini sağlayan, doku/hücre arktektinin bozulmadığı bir tekniktir (4).

Non-İzotopik İn Situ Hibridizasyon (NISH), radyoaktif olmayan bir molekül ile kimyasal olarak modifiye edilen DNA problemlerinin immunolojik veya afinite reaksiyonları ile floresan veya enzimatik olarak görüntülediği bir ISH tekniğidir (4).

FISH ise probun haptenlerle ya da florokromlarla işaretlenip florokrom maddelerle görüntülenmesinden oluşan, floresan veren sinyaller ile değerlendirilmenin yapıldığı bir ISH tekniğidir (4).

Sitolojik preparatlarda RNA'nın DNA ile hibridizasyonu ilk kez 1969 yılında Gall ve Pardeu tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmacılar, işaretlenmiş DNA sekanslarının sitolojik preparatlarda lokalize olduklarını göstermişlerdir. Büyümekte olan hücrelere tritium verilmiş ve işaretli nükleik asitler nükleer emülsiyon aracılığı ile belirlenmiştir (4).

Başlangıçta ISH radyoaktif madde kullanılarak uygulamaya konulmuştur. Radyoaktif maddelerin pahalı oluşu, yarı ömürleri, toksik etkisi ve uzaklaştırılması gibi zorluklar nedeniyle yöntemin ilk dönemlerde kullanım alanı kısıtlanmıştır. 1970'lerde moleküler klonlama tekniklerinin gelişmesi, 1975'te biotin-avidin sisteminin bulunması, haptin molekülleri ile işaretlenmiş olan problemlerin florokrom enzim gibi aracı moleküllerle belirgin hale getirilmesi tekniğin hassasiyet ve güvenilirliğini etkilemiştir. Biotinin yanı sıra digoxigenin ve florescein ile işaretleme, farklı florokrom moleküllerin birlikte kullanılması Horgman ve arkadaşlarının iki renkli, Nedersof ve arkadaşlarının üç renkli hibridizasyonu gerçekleştirilmesini sağlamıştır. 1986'da Pinkel ve Cremer non-radyoaktif işaretli problemler kullanarak FISH'i geliştirmişlerdir (4).

2.5.2.2. FISH Tekniğinde Kullanılan Problemler ve Özellikleri

FISH tekniğinin uygulamasında en önemli aşama prob seçimidir. Kullanılacak probun incelenecek materyale, değerlendirilecek anomali tipine ve bölgesine uygun olması gerekir (3).

Prob; örneklerde aranan genetik materyale (DNA veya RNA) komplementer, radyoaktif veya nonradyoaktif madde ile işaretli DNA veya RNA segmentidir. Probun hangi yöntemle işaretlendiği, uzunluğu, RNA veya DNA kaynaklı olması, tek veya çift sarmallı olması spesifik olmayan sinyalleri artırabilir (3).

FISH tekniğinde sitogenetik alanında kullanılan başlıca problemler şunlardır;

- Tekrarlayan dizi problemleri (satellit problemler)
- Lokusa özgü problemler
- Tüm kromozomu boyayan problemler
- Banda özgü problemler
- Telomer bölgesine özgü problemler

2.5.2.3. FISH Tekniğinin Temel Mekanizması

FISH prosedürü 6 aşamada gerçekleştirilir (Şekil 2.3);

- 1.Preparatların Hazırlanması
- 2.Preparatların Ön Yıkaması
- 3.Prob ve Hedef DNA Denatürasyonu
- 4.Prob ve Hedef DNA Hibridizasyonu
- 5.Hibridizasyon sonrası Yıkamalar
- 6.Görüntüleme ve İnceleme

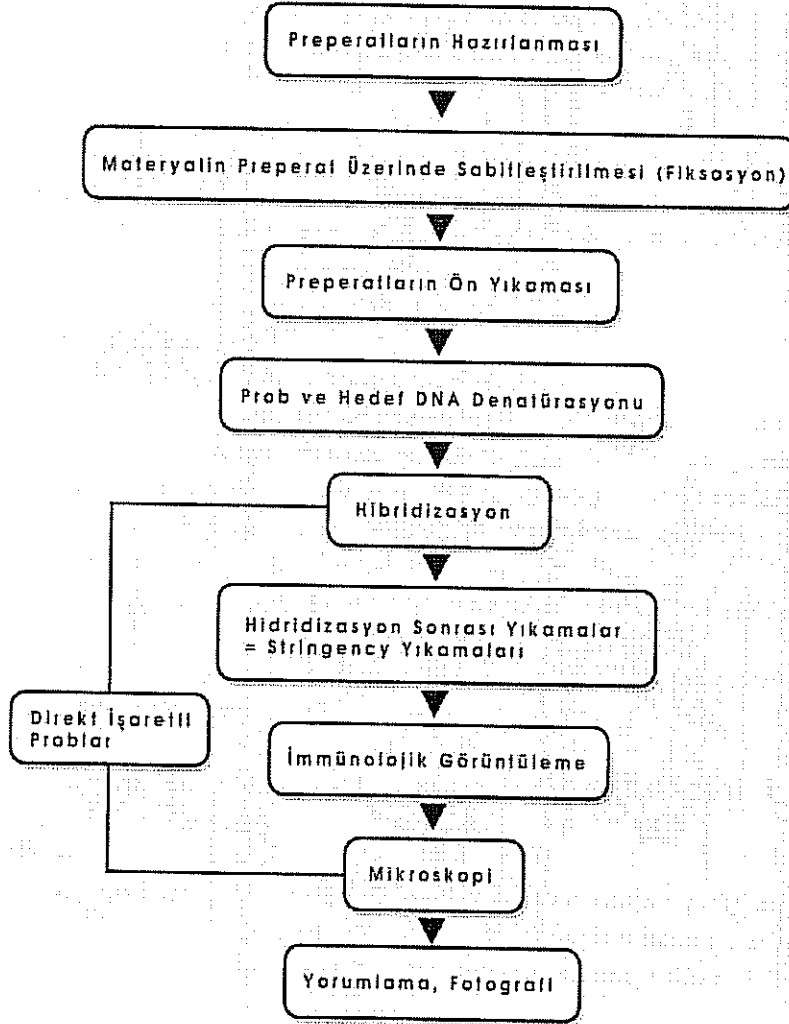
Moleküler hibridizasyona dayanan bütün yöntemlerin (Southern blotting, Northern blotting, PCR, ISH) altında yatan mekanizma iki komplementer daldan çift sarmal yapının oluşmasıdır. DNA-DNA hibridizasyonunda prob ve hedef DNA'ların denatürasyonunu takiben oluşan DNA fragment karışımı, tek dal halindeki fragmentlerin tekrar birleşmesini sağlayacak koşullarda gerçekleştirilir (3).

Bu koşullarda etkili olan dört parametre vardır;

- 1.Isı
- 2.pH
- 3.Monovalent katyon konsantrasyonu
- 4.Organik solvent varlığı

Hibridizasyonda üç temel aşama önemlidir;

- 1-Hedef dizilerin hibridizasyon sırasında geçirgenliklerini korumaları
- 2-Proba hedefin yüksek etkinlikle birbirlerine bağlanması
- 3-Hibridizasyonun spesifik aktivitesi yüksek bir aracı ile en az zemin sinyali olacak biçimde en parlak şekilde görüntülenmesidir (3).



Şekil 2.3: FISH tekniğinin uygulama aşamaları (Teorik ve Pratik Floresans İn Situ Hibridizasyon, 1996, Ed. Başaran N, GENTAM, Eskişehir, 34-39 s.'dan alınmıştır)

Bir hibridizasyon reaksiyonunda tolere edilebilen yanlış eşleşme derecesi 'stringency' olarak ifade edilir. Yüksek stringency koşullarında, sadece hedef sekansla tam homolog olan problar stabil hibridler oluştururlar. Düşük stringency koşullarında ise prob sadece %70–90 homoloji gösteren sekanslara bağlanabilir. Bu spesifik olmayan

sinyaller, hibridizasyon sonrası yıkamalarda yüksek stringency koşullarının (yüksek ısı + düşük tuz konsantrasyonu) sağlanmasıyla ortamdan uzaklaştırılır (4).

FISH sonrası problemlerden elde edilen sinyaller floresan mikroskopta incelenirler. Kullanılan florokromların gözlenebilmesi için doğru prob setleri ve uygun filtrelerin seçilmesi gerekmektedir. Birden fazla hedef dizinin görüntülenmesi gerektiğinde doğru filtreler ile yeşil, kırmızı ve mavi florokromlar gözlenebilmektedir (3).

2.6. ASTROSİTOMALARDA MEYDANA GELEN GENETİK DEĞİŞİMLER

İnsan beyindeki neoplastik dönüşüm, birtakım genetik değişimlerin birikimi sonucunda meydana gelir. Bu genetik değişimler hücre proliferasyonunun değişiminde rolü olan farklı kromozomların amplifikasyonu veya artışı ya da kaybını içerir.

Gliomalarda yapılan sitogenetik analizler sıklıkla kromozom 7'nin artışı, kromozom 10 ve 22'nin kaybını ve kromozom 1, 6, 7, 9'un yapısal anomalilerini göstermektedir.

Yapılan sitogenetik ve moleküler genetik çalışmalar göstermektedir ki p53 mutasyonu ve 17p'nin kaybı beyin tümörögenezinin başlangıç aşamasında, kromozom 9p'nin delesyonu ara (intermediate) dönemde ve epidermal büyüme faktör geninin (EGFR) amplifikasyonu ve kromozom 10 kaybı tümörögenezin geç döneminde meydana gelmektedir.

İnsan genomunun yaklaşık 60.000–70.000 gen den oluştuğu ve bunların yaklaşık 30.000'inin beyinde ekspresse edildiği tahmin edilmektedir. Beyinde bulunan genler en çok yapısal ve regülatör (transkripsiyon faktörler ve sinyal transdüksiyon) fonksiyonları içerir (50, 53, 65).

Beyin tümörleri de diğer tümör tipleri gibi prekürsör hücrelerde birkaç genetik değişimin kademeli bir birikimi sonucunda meydana gelir. Beyin tümorogenezi boyunca meydana gelen genetik değişimler ya kromozomal düzeyde ya da gen ekspresyon düzeyindedir. Ayrıca genetik düzeydeki değişiklikler, bir kromozomun büyük bir kısmının kaybı olabileceği gibi tek bir gen içindeki nokta mutasyonundan dolayı da olabilir.

2.6.1. Piloitik Astrositoma (WHO Evre 1) ve Diffüz Düşük Evre Astrositoma (WHO Evre 2)

Piloitik astrositoma, astrositik tümörler içinde en düşük malignensiye sahip olan grubu oluşturmaktadır. Yapılan sitogenetik analizler sonucu pilositik astrositomalı hastalarda sıklıkla normal karyotipler gözlenmektedir. Anormal karyotipli hastalar arasında en çok görülen kromozomal anomaliler X ve Y kromozom kaybı, 22q kaybı, p53 mutasyonudur.

CGH ile yapılan çalışmalarda kromozom 5, 6, 7, 9, 16p, 19, 22'ye ait tüm kayıplar ve kromozom 1p, 2p, 9q, 12q, 17q kayıpları görülmüştür (59).

TP53 gen mutasyonları ya da TP53'ü içeren 17p kromozom (17p 13.1) bölgesi delesyonu veya her ikisi meme, over, mesane, serviks, osteojenik sarkoma, hepatosellüler karsinom, beyin tümörleri gibi sıklıkla sporodik kanserlerde izlenir.

p53 proteini, DNA hasarına hücresel yanıtın önemli bir parçası olan bir DNA-bağlayıcı proteindir. Hücre bölünmesini durduran ve DNA hasarının düzeltilmesini sağlayan genlerin transkripsiyonunu aktive eden bir transkripsiyon faktörü olmasının yanında, p53 onarılmayan DNA hasarlı hücrelerde de apoptozisi sağlayan bir role sahiptir. p53 fonksiyon kaybı, hasarlı DNA'nın yaşamasına ve bölünmesine izin vermekle birlikte potansiyel onkojenik mutasyonları yaygın hale getirmiş olur (11,19, 38).

Beyin tümörlerinde meydana gelen p53 mutasyonları astrositik tümörlerin gelişme ve başlangıç aşamasının ikisinde de gereklidir. Diğer orijinli tümörlerde (kolon, pankreas, özofagus) p53 mutasyonlarının tümör başlangıcının aksine tümör gelişiminde önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir. Yapılan birkaç çalışma, astrositomaların patogenezinde p53 mutasyonunun en erken meydana gelen genetik olaylardan biri olduğunu rapor etmiştir(50).

Kromozom 22q'nun kaybının astrositoma gelişiminin erken döneminde meydana gelen önemli bir olay olduğu düşünülmektedir. Diffüz düşük evre astrositomalı (WHO evre 2) tümörlerde yapılan moleküler genetik analizler sonucunda 6q, 10p, 13q, 17p ve 22q bölgelerinin kayıpları gösterilmiştir. Kromozom 7 aberasyonlarının diffüz astrositomanın ilerlemesiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir (27, 29, 57).

2.6.1.2. Anaplastik Astrositoma (WHO Evre 3)

Diffüz düşük evre astrositomada (WHO evre 2) görülen 6q, 10p, 13q, 17p, 22q alellerinin kayıpları anaplastik astrositomada da benzer veya daha yüksek sıklıkla gözlenmektedir. Bunlara ek olarak evre 2 astrositomadan anaplastik astrositomaya ilerlemede kromozom 9p,10q, 13q kaybı, kromozom 7p, 7q, 12q, 19q amlifikasyonu önemli bir rol oynar.

Bir tümör supressör gen olan CDKN2, kromozom 9p21 bölgesinde lokalizedir. Bu gen hücre siklus progresyonunda önemli bir rol oynar. CDKN2, siklin-bağlı kinaz (CDK4) ve siklin D kompleksine bağlanarak anormal hücre büyümesi ve proliferasyonunu genellikle bloke eden 16KD'lik hücre siklus inhibitör proteinini kodlar. Bu bağlanma, CDK'nın inhibisyonunda rol oynar ve G1 fazında hücre siklusunu durdurur.

Kromozom 9'un kaybının, düşük evre astrositomadan yüksek evre astrositomaya gelişiminde önemli bir adım olduğu gözlenmektedir.

2.6.1.3. Glioblastome Multiforme (WHO Evre 4)

GBM, astrositomaların en malign formu olmakla beraber, merkezi sinir sisteminde en yaygın görülen sitogenetik olarak en iyi çalışılabilen primer beyin tümörüdür ve çok sayıda genetik anomali gösterir. Yapılan sitogenetik çalışmalarda kromozom 6, 10, 11, 13 ve Y'nin kaybı, kromozom 7, 12q ve 19' un artışı ve kromozom 1 ve 9'un yapısal anomalileri görülen ortak bulgulardır (16, 38, 53).

GBM de yapılan sitogenetik analizler kromozom 10 monozomisini çok yüksek oranda olduğunu göstermiştir. Bu görülen monozomi en yaygın bulgu olmakla beraber tümörlerin %80'inden fazlasında görülmüştür (50).

PTEN geni 10q23 lokusunda lokalizedir ve PTEN gen mutasyonunun hücre büyüme regülasyonunda, apoptotik cevapta, hücre göçünde, ekstraselüler matriksle ilişkili hücre yolunda bozulmaya neden olduğu düşünülmektedir. Kromozom 10 kaybı, AA'dan GBM'e ilerlemede gereken en önemli olaylardan biridir. GBM in büyük bir kısmında kromozom 10'da LOH görülürken, bu durum hastanın yaşam süresini anlamlı derecede azaltmasıyla ilişkilidir (11).

Epidermal büyüme faktör reseptör geni (EGFR) kromozom 7p12 lokusunda lokalizedir. GBM'in yaklaşık % 40'ında EGFR geni amplifikasyona uğramıştır. EGFR amplifikasyonu ve yeniden düzenlenmesi glioblastomaların oluşumunda sıklıkla görülen bir olaydır (2, 7, 36, 38, 52).

Glioma hastaları için 9p21'de lokalize p16 (CDKN2A) geninin homozigot delesyonu da kötü prognoz ve yaşam süresiyle ilişkilidir. P16 hücre siklusunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan bir tümör süpressör gendir ve çoğunlukla yüksek evre gliomalarda delesyona uğramıştır (16).

GBM, kendi içinde primer ve sekonder GBM olmak üzere ikiye ayrılır. Primer ve sekonder GBM'in oluşumunda da farklı genetik yolların rol oynadığı düşünülmektedir. Primer GBM de EGFR gen amplifikasyonu ve daha az sıklıkla MDM2 gen amplifikasyonu ve p16 protein delesyonu görülürken, sekonder GBM'de sıklıkla TP53 gen mutasyonu görülür (8, 9, 38, 39).

GBM hastalarının ortalama yaşam süreleri bugünkü standart terapiyle beraber yaklaşık bir yıl kadardır (47).

2.7. ASTROSİTOMA TÜMOREGENEZİ İÇİN BİR MODEL

Farklı histolojik ve malignensi derecesinde gözlenen moleküler değişimlerin temelinde gliomaların tümörogenezi için bir model oluşturmak mümkündür. 17p'nin delesyonu ve/veya TP53 mutasyonu astrositomalarda görülür ve bu tümörneğin erken aşamasında olduğunu işaret eder. 22q kaybı daha az sıklıkla görülmekle beraber, gliomaların tüm evrelerinde rapor edilmiştir. Kromozom 13'ün kaybı da tüm evrelerde görülmüştür, fakat yüksek evreli astrositomalarda daha yüksek orandadır. Bir sonraki adım ise 9p'nin alellik kayıplarını içerir ve bu durum ara ve yüksek evre gliomalarda görülür. 10q kaybı GBM'lerin %80'inden fazlasında görülür ve 10q'da bulunan genin fonksiyon kaybı GBM'in gelişiminde hayati bir rol oynar. EGFR geninin amplifikasyonu yüksek evre gliomaların %40-50'sinde görülür ve gliomaların progresyonunda önemli bir rol oynar (7).

2.8. EPENDİMAL TÜMÖRLER

Ependimal neoplazmlar, merkezi sinir sistemi tümörlerinin yaklaşık %3-5'ini oluştururlar. Çocuklarda 3. sıklıkla görülen beyin tümörüdür. Bu tümörlerin %90'ı intrakranial, %10'u intraspinaldir. Yetişkinlerde ise %60'ı spinal kordun tümörü, %40'ı intrakranial tümördür. Ependimomlar; ependimom (Derece 2) ve anaplastik ependimom (Derece 3) olmak üzere subgruplara ayrılır. Ependimom (Derece 2)'da, kromozom

22q'daki kayıplar en fazla bildirilen anomalilerdir. Bu bölgede NF2 tümör süpressör geni bulunmaktadır. Kromozom 22q'daki LOH yetişkinlerde, çocuklardan daha sık görülmektedir. Kromozom 22'de olan kayıplar monozomi şeklinde olabildiği gibi 22q'da parsiyel delesyon veya translokasyonlar halinde de olabilir. Kromozom 6q delesyonları ependimomlarda sıklıkla izlenmektedir. Bunlara ek olarak az oranda da olsa X kromozom anomalileri rapor edilmiştir. Ependimomların daha malign formlara dönüşüm göstermesindeki genetik temel tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak, kromozom 7'de görülen kazanımlar, 10q ve 10p'deki kayıplar anaplastik ependimomda düşük bir oranda gözlenmiştir (17, 37, 45, 54, 56).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereç

3.1.1. Araştırma Grubu Bireyleri

Beyin tümörlü olgulardan alınan tümör dokusunun sitogenetik ve FISH ile kromozom analizi Eylül 2005 - Eylül 2007 tarihleri arasında Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ve GENTAM Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Araştırma grubunu; Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin Cerrahi Anabilim Dalı'nda beyin tümörü teşhisi konulan toplam 30 olgu oluşturmaktadır.

3.1.2. Kullanılan Araçlar

3.1.2.1. Kullanılan Aletler

Ben Mari (Heto-DT Hetoterm)

Buzdolabı (Arçelik 415)

CCD Kamera (Photometrics)

CO₂'li etüv

Deep-Freeze (Heraeus)

Elektronik Terazi (Seuter, Ainworth-AA-250, Setra-M2000L)

Enjektör

Etüv (Friocell MMM Med Center)
Floresan mikroskop (Olympus BX61)
Image Analyser (Oncor)
İnvert mikroskop
Kronometre
Lamin Air Flow (Heraeus ELB2448)
Mikropipet (Eppendorf)
Mikroskob (Olympus CH-2)
Mikrosantrifüj (Eppendorf Centrifuge 5415)
pH Metre (Nel PH890)
Pipet Uçları
Termometre
Vortex (Janke and Kunkel, UF-2)
Zaman Ayarlı Santrifüj (Heraeus)

3.1.2.2. Cam Malzeme

Beher (500 ml, 1000 ml)
Erlenmayer (500 ml, 1000 ml)
Flask

Lam

Lamel

Mezür

Petri kabı

Santrifüj Tüpü

Yatay ve dikey Şale

3.1.3. Kimyasal Maddeler

Absolü Ethonol (Merck)

Amniomed

Antifade (Vector)

Chang Medium In Situ

DAPI (Sigma)

Democolcine Solution (Sigma)

Distile Su

Entellan (Merck)

Gentamisin

Giemsa (Merck)

Glacial acetic acid (Merck)

HCL (Merck)
Immersion yağı (Merck)
KCL (Merck)
KH₂PO₄ (Merck)
Ksilol (Merck)
Methanol (Merck)
MgCl₂ (Merck)
Na Citrat (Merck)
Na₂HPO₄ (Merck)
NaCl (Merck)
NaOH (Merck)
Nevparin (Mustafa Nevzat)
Penisilin-.Streptomisin
Parafilm
RPMI 1640
Rubber Cement (Sanford 00491)
Serum Fizyolojik
Trypsin (Difco)
Tripsin-EDTA 1x
Tween 20 (Sigma)

3.1.4.Kullanılan Problar

LSI p53 (17p13.1) Spectrum Orange Probe (Vysis)

LSI p16 (9p21)/ CEP 9 Dual Color Probe (Vysis)

LSI 1p36 / 1q25 ve LSI 19q13 / 19p13 Dual Color Probe Sets (Vysis)

LSI EGFR Spectrum Orange/ CEP 7 Spectrum Green Probe (Vysis)

LSI PTEN (10q23) / CEP 10 Dual Color Probe (Vysis)

LSI TOP 2A Spectrum Orange / HER 2 Spectrum Green / CEP 17 Spectrum Aqua Probe (Vysis)

3.2. Yöntem

Beyin tümörlü olgularda konvansiyonel sitogenetik yöntemler kullanılarak karyotip değerlendirmesi yapılmış ve FISH analizi uygulanmıştır.

3.2.1. Materyal Alımı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin Cerrahisi Anabilim Dalında çeşitli tetkikler sonucu beyninde tümör olduğu sonucuna varılan ve ameliyata alınan olgulardan sitogenetik analiz için tümör dokusu alınarak transport medium içerisinde Anabilim Dalımız Sitogenetik Laboratuvarına ulaştırılmıştır.

3.2.2 Sitogenetik Analiz

Beyin tümörü dokusundan kromozom analizi için Law ve arkadaşlarınca kullanılan doku kültür yöntemi kullanılmıştır (34).

- Transport medium içerisinde gelen beyin dokusu petri kabına aktarılır ve transport mediumla (100 cc besiyeri + 1cc penisilin + 1 cc heparin + 0,1 cc gentamisin) ile yıkanır.
- Doku parçaları Tripsin- EDTA solüsyonu içerisinde mekanik olarak parçalandıktan sonra farklı petri kablarna aktarılır.
- Petri kabı 37 derecede 30 dakika % 5'lik CO₂'li etüvde bekletilir.
- Süre sonunda dokuların üzerine transport medium eklenir.
- Doku pipetle iyice süspanse edildikten sonra 3 ayrı flaska ekim yapılır.
- 3 ayrı flaska 2 farklı besiyerinden (amniomed, chang in situ) 3 cc konur, CO₂'li etüvde üremeye bırakılır.
- Ertesi gün kontaminasyon durumuna bakılır.
- Üreme durumları takip edilir.
- Harvest yapılmasına karar verilen kültür kabındaki (flask) tüm besiyeri bir gece önce alınır ve yerine 4cc yeni besiyeri ilave edilir.
- Ertesi gün 0,1 cc kolsemid eklenerek 4 saat bekletilir.
- Süre sonunda flasktaki tüm sıvı ekim tüpüne aktarılır.
- Flaska daha önceden 37 °C'ye getirilmiş Tripsin-EDTA solüsyonundan 1 cc eklenir ve eklenen bu sıvı flasktan alınarak tüpe aktarılır.

- Sonra bir kez daha 1 cc Tripsin-EDTA solüsyonu eklenir ve 2–3 dakika kadar etüvde bekletilir.
- Süre sonunda inverted mikroskopta flask yüzeyindeki hücrelerin ayrılıp ayrılmadığı kontrol edilir.
- Eğer hücreler yüzeye yapışık ise flask sallanarak hücrelerin kalkması sağlanır.
- Daha sonra flaska 3 cc transport medium eklenir ve ekim tüpüne aktarılır.
- Ekim tüpleri 1300 rpm’de 8 dakika santrifüj edilir ve süpernatant atılır.
- 37 derecedeki KCL (0,075 M) den 5 cc ekim tüpüne eklenir ve yavaşça pipetaj yapıp etüvde 35 dakika inkübe edilir.
- Süre sonunda 5–6 damla fiksatif damlatılarak prefiksasyon yapılır.
- Santrifüj edilir ve süpernatant atılır.
- 3 kez Carnoy fiksatifi (3 metanol: 1 glacial asetik asit) ile yıkama yapılır.
- Lamlara yayma işlemi yapılır.

3.2.2.1. Preperatların Boyanması (GTG Bantlama)

Bu boyama yöntemi uygulanmadan önce yayma işlemi yapılmış lamlar, 1 gece 65°C’lik etüvde yaşlandırılır.

- 0,05 gr toz halinde tripsin (Bacto-Tripsin) tartılır.
- Bir şale içerisinde bulunan 100ml 1 X PBS (Phosphate buffered saline) içerisine tartığımız 0,05 g toz halindeki tripsin eklenerek şale 26°C’deki su banyosuna

konulur.

- Preparatlar önce 10–20 saniye arasında su banyosu içine konulan şaledeki tripsin-PBS karışımından geçirilir.
- Süre bitiminden sonra çeşme suyundan geçirilir.
- Her preparat için 2ml PBS + 5 damla Giemsa karışımı hazırlandıktan sonra bu karışım preparata damlatılarak 3 dakika bekletilir.
- Çeşme suyunda çalkalanır.
- Boyanmış olan preparatlar oda ısısında kurutularak ksilolden geçirilip entellan ile kapatılır.
- Boyası yapıp kapatılan preparatlar mikroskopta incelenir.

Sitogenetik değerlendirme International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) kriterlerine göre yapılmıştır.

3.2.3. Moleküler Sitogenetik Analiz

FISH tekniğinde Rieder ve arkadaşları tarafından kullanılan protokol kullanılmıştır (46).

FISH analizleri için preparasyon aşaması oldukça önemlidir. Kaliteli sinyal almak ve ideal şartlarda analizi gerçekleştirmek için lamın belirli bölgelerine yayılmış yeterli sayıda ve kalitede (stoplazmadan arındırılmış) metafaz plaklarının ya da interfaz hücrelerinin bulunması gerekmektedir.

3.2.3.1. FISH Tekniğinin Uygulaması

FISH tekniğinde Rieder ve arkadaşları tarafından kullanılan protokol uygulanmıştır (46).

3.2.3.1.1. Preparatların Ön Yıkaması ve Denatürasyonu

- Preparatlar her biri 1 dakika olmak üzere sırasıyla %100–70–50–30'luk alkol serisinden ve 1 dakika 0.1 X SSC solüsyonundan geçirilerek dehidre edilmiştir.
- Preparatlar 30 dakika 70°C'deki 2 X SSC solüsyonunda bekletilmiştir.
- Daha sonra 2 X SSC solüsyon ısısının 37 °C'ye gelmesi için beklenmiş ve
- Bunun sonunda preparatlar 0.07 M'lık NaOH solüsyonunda 1 dakika denatüre edilmiştir.
- Denatürasyonu takiben her biri 1 dakika olmak üzere sırasıyla + 4 °C'de 1XSSC- +4 °C'de 2XSSC de bekletilmiştir. Preparatlar % 30 – 50 – 70 – 100'lük alkol serisinden geçirilerek dehidrate edilip, kurumaya bırakılmıştır.

3.2.3.1.2. Prob Denatürasyonu

- Problar benmaride 5 dakika 74 °C'de bekletilerek denatüre edilmişlerdir.

3.2.3.1.3. Hibridizasyon

- Denatüre edilen preparatlarda belirlenen alanlara prob (5 µl) eklenir ve üzerlerine 18mm'lik lamel kapatılır.
- Lamel çevresi su girmemesi için rubber sementle yalıtılır.
- Preparatlar 37 °C'de bir gece nemli ortamda hibridizasyona bırakılır.

3.2.3.1.4. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar

Bu yıkamalarda spesifik olarak bağlanmayan prob DNA'sının ortamdan uzaklaştırılması ve olgu DNA'sına tam komplementer olan (% 80–100) dizilerin hedef bölgede sabit hale getirilmesi amaçlanmaktadır. Aşamaları:

- Hibridizasyonu tamamlanan preparatlar etüvden çıkartılarak lamellerin çevresindeki yalıtım maddesi dikkatlice temizlenmiştir.
- Preparatlar, oda ısısındaki 2 X SSC solüsyonunda hafifçe karıştırılarak lameller preparatlardan uzaklaştırılmıştır.
- Preparatlar 1 X SSC solüsyonu ile 74 °C'de 5 dakika yıkanmışlardır.
- Sonrasında 2 X SSC / T–20 solüsyonunda 5 dakika yıkanmışlardır.

3.2.3.1.5. Hibridize Olan Bölgelerin Görüntülenmeye Hazırlanması

Bu aşamada prob ve nükleus DNA'sının hibridize olduğu bölgelerin görünür hale getirilmesi amaçlanmaktadır.

Hibridizasyon sonrası yıkamaları yapılan preparatlar 4XSSC / DAPI solüsyonunda 2 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda preparata 15 µl antifade eklenmiş ve lamel ile kapatılmıştır. İnceleme aşamasına kadar – 20 °C'de ve karanlıkta bekletilmişlerdir.

3.2.3.1.6. Preparatların Mikroskopta İncelenmesi

Preparatlar Olympus BX61 Floresan mikroskobunda uygun filtrelerle incelenmiştir. Floresan mikroskoba bağlı bilgisayar sistemi (PSI Image Analyser) ile sinyaller değerlendirilmiş ve CCD kamera aracılığıyla FISH sinyalleri içeren metafaz plakları ve/ya da interfaz hücreleri resimlendirilmiştir.

3.2.3.1.7. Değerlendirme

Beyin tümörü dokusundan hazırlanan preparatlara uygulanan FISH analizlerinde her olguda her prob için en az 200 interfaz nükleusu değerlendirilmiştir. Sinyaller değerlendirilirken birbirine çok yakın olan sinyaller ve sinyal çap büyüklüğü birbirinden farklı olan (iki katı ya da daha fazla olan) yalancı sinyaller değerlendirmeye alınmamıştır.

İncelenen problemler için laboratuvarında daha önceden belirlenen cut off değeri kullanılmıştır. Cut off, sağlıklı 10 insandan alınan kan hücrelerinde en az 200 interfaz nükleusu değerlendirilerek belirlenmiştir. LSI p53 (17p 13,1), LSI p16 (9p21)/CEP 9, LSI 1p36/1q25, LSI 19q13/19p13, LSI EGFR/CEP 7, LSI PTEN (10q23)/CEP 10, LSI TOP2A / HER2 / CEP 17 probe'un (Vysis) her biri için belirlenen cut off değeri %3'dür.

3.3. Kullanılan Stok Solüsyonlar

Çizelge 3.1.: Hipotonik Solüsyonu (0.075 M)

KCl	1.398 g
Distile su	250 ml

Çizelge 3.2.: Carnoy's Fiksatif Solüsyonu

Methanol	3 kısım
Glacial Acetic Acid	1 kısım

Çizelge 3.3.: GTG Bantlama Solüsyonları

Trypsin Solüsyonu

Trypsin (% 5'lik Bacto Tripsin)	0, 05 g
PBS	100 ml

PBS Solüsyonu

NaCl	0, 4 g
KCl solüsyonu	0,1 g
Na ₂ HPO ₄	0, 57 g
KH ₂ PO ₄	0, 1 g

Distile Su	500ml
------------	-------

Giemsa Solüsyonu

Giemsa	5 damla
--------	---------

PBS	2 ml
-----	------

Çizelge3.4.: Preparatların Ön Yıkama Sölüsyonları

20XSSC Solüsyonu

NaCl (3 M)	175,3 g
--------------	---------

Tri Sodyum Sitrat (0,3 M)	88,24 g
-----------------------------	---------

Distile su	1000 ml
------------	---------

HCl ile pH 7.0'a ayarlanır.

2 X SSC Solüsyonu

20 X SSC	40 ml
----------	-------

Distile su	360 ml
------------	--------

HCl ile pH 7,0'a ayarlanır.

0,1 X SSC Solüsyonu

20 X SSC	3 ml
----------	------

Distile su	597 ml
------------	--------

Çizelge 3.5.: Preparatların Denatürasyon Solüsyonu

0,07 M NaOH	14 ml
-------------	-------

Distile su	200 ml
------------	--------

Çizelge 3.6.: Hibridizasyon Sonrası Solüsyonlar

1 X SSC Solüsyonu

20 X SSC	10 ml
Distile su	190 ml

2 X SSC Solüsyonu

20 X SSC	20 ml
Distile su	180 ml

2 X SSC / Tween-20 Solüsyonu

20 X SSC	20 ml
Tween 20	100 µl
Distile su	180 ml

Tüm solüsyonlar HCl ile pH 7.0 a ayarlanır.

Çizelge 3.7.: Görüntüleme Sistemleri Solüsyonları

DAPI / Antifade Solüsyonu

2XSSC	20 ml
DAPI	100 µl
Distile su	80 ml

4. BULGULAR

Bu çalışma beyin tümörlü olgularda sitogenetik ve moleküler sitogenetik analizleri kapsamaktadır. Çalışma grubunu, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin Cerrahi Anabilim Dalı Polikliniği'ne başvuran 30 beyin tümörlü olgu oluşturmaktadır. Olguların yaş ortalaması 48, erkek/ kadın oranı 17/13'dür. Çalışmaya katılan olguları 27 GBM, 3 ependimom hastası oluşturmaktadır. Tümör dokuları kromozom kuruluşları açısından değerlendirilmiş, kanserle ilgili genlerin tümörlerdeki durumu ise FISH analizi ile incelenmiştir.

4.1. Araştırma Grubu Bireyleri Sitogenetik Analizleri

30 beyin tümörlü olgunun 22 tanesinde kromozom analizi gerçekleştirilmiş olup, 8 tanesinden metafaz elde edilememiştir. Beyin tümörü örneklerinde sitogenetik analiz başarı oranı %73,4'tür. Kromozom analizi gerçekleştirilen olguların birinde normal karyotip saptanırken, diğer tüm olgularda kompleks kromozomal anomaliler izlenmiştir.

Çalışmamızda hasta olgularının bilgileri çizelge 4.1'de, sitogenetik analizleri yapılmış olan olguların karyotipleri ise çizelge 4.2'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

1 no'lu olgunun 10 metafazında normal karyotip gözlenirken, 9 metafazında Y kromozom monozomisi, 3 metafazında Y kromozom trizomisi saptanmıştır.

2 no'lu olgunun 1 metafazında normal karyotip gözlenirken, 1 metafazında kromozom 8, 13, 14, 15, 21 monozomisi ile kromozom 10 trizomisi saptanmıştır.

3 no'lu olgunun 3 metafazında normal karyotip gözlenirken, 4 metafazında Y kromozom monozomisi, 2 metafazında 9. kromozom monozomisi, 2 metafazında 21. kromozom monozomisi ve 1 metafazında da kromozom 17 ve 19 monozomisi saptanmıştır.

4 no'lu olgunun 1 metafazında kromozom 1p kaybı gözlenirken, 1 metafazında kromozom 14 ve 22 monozomisi saptanmıştır.

5 no'lu olgunun 4 metafazında normal karyotip gözlenirken, 2 metafazında Y kromozom monozomisi, 2 metafazında 11. kromozom monozomisi, 2 metafazında marker kromozom, 1 metafazında kromozom 10, 12, 14, 19 monozomileri saptanmıştır.

6 no'lu olgudan kromozom elde edilememiştir.

7 no'lu olgunun 5 metafazında normal karyotip saptanmıştır.

8 no'lu olgunun 14 metafazında 1p monozomisi gözlenirken, 2 metafazında 1. kromozom monozomisi, 12 metafazında 22. kromozom monozomisi, 2 metafazında 17. kromozom monozomisi, 5 metafazında 5. kromozom monozomisi, 2 metafazında 19. kromozom monozomisi, 2 metafazında 7. kromozom monozomisi, 2 metafazında 14. kromozom monozomisi saptanmıştır.

9 no'lu olgunun 3 metafazında 7. kromozom tetrazomisi, 2 metafazında 9. kromozom tetrazomisi, 2 metafazında 12. kromozom trizomisi, 2 metafazında 6. kromozom monozomisi, 2 metafazında 8. kromozom monozomisi, 2 metafazında 16. kromozom monozomisi, 2 metafazında 22. kromozom monozomisi saptanmıştır.

10 no'lu olgunun 1 metafazında 7. kromozom tetrazomisi ve 1 metafazında 7. kromozom trizomisi, 2 metafazında 9. kromozom tetrazomisi ve 1 metafazında 9. kromozom trizomisi, 2 metafazında 4. kromozom trizomisi, 2 metafazında 12. kromozom trizomisi ve 1 metafazında 12. kromozom tetrazomisi, 1 metafazında 15. kromozom trizomisi ve 1 metafazında 15. kromozom tetrazomisi, 2 metafazında 22.

kromozom monozomisi, 2 metafazında 6. kromozom monozomisi, 2 metafazında 16. kromozom monozomisi saptanmıştır.

11 no'lu olgunun 2 metafazında normal karyotip gözlenirken, 2 metafazında 20. kromozom monozomisi, 2 metafazında 11. kromozom monozomisi, 2 metafazında 2. kromozom monozomisi saptanmıştır.

12 no'lu olgudan kromozom elde edilememiştir.

13 no'lu olgunun 3 metafazında normal karyotip gözlenirken, 1 metafazında kromozom 3, 22 monozomisi ile kromozom 15, 21 trizomisi saptanmıştır.

14 no'lu olgunun 1 metafazında kromozom Y monozomisi saptanmıştır.

15 no'lu olgudan kromozom elde edilememiştir.

16 no'lu olguda klasik sitogenetik yöntemlerle incelenen tüm metafazlarında Y kromozom monozomisi görülürken, 2 metafazında 16. kromozom monozomisi, 1 metafazda 17. kromozom monozomisi saptanmıştır.

17 no'lu olgunun bir metafazında kromozom 9 monozomisi saptanmıştır.

18 no'lu olgudan kromozom elde edilememiştir.

19 no'lu olgunun 1 metafazında kromozom 1, 9, 12, 13, 17, 18, X monozomileri ile marker kromozom saptanmıştır.

20 no'lu olgudan kromozom elde edilememiştir.

21 no'lu olgunun 2 metafazında normal karyotip gözlenirken 1 metafazında kromozom 3, 14, 19, 21, 22, X monozomileri ile kromozom 12, 19 trizomileri saptanmıştır.

22 no'lu olgunun 8 metafazında normal karyotip gözlenirken, 1 metafazında kromozom 11q, 15, 17, X monozomileri saptanmıştır.

23 no'lu olgunun 6 metafazında normal karyotip gözlenirken, 2 metafazında 9. kromozom monozomisi, 3 metafazında 11. kromozom monozomisi, 2 metafazında 18. kromozom monozomisi, 3 metafazında 19. kromozom monozomisi görülen ortak bulgulardır.

24 no'lu olgudan kromozom elde edilememiştir.

25 no'lu olgunun bir metafazında kromozom 11, 15, 22 monozomisi ile kromozom 3 trizomisi saptanmıştır

26 no'lu olgunun 2 metafazında normal karyotip gözlenirken, 2 metafazında 12. kromozom monozomisi, 2 metafazında 19. kromozom monozomisi, 2 metafazında X kromozom monozomisi saptanmıştır.

27 no'lu olgunun 1 metafazında normal karyotip gözlenirken, 1 metafazında kromozom 10, 12, 15p, 16, 18, 20 monozomileri ile kromozom 2, 7 trizomisi ve marker saptanmıştır.

28 no'lu no'lu olgudan kromozom elde edilememiştir.

29 no'lu olgunun 2 metafazında 9. kromozom monozomisi, 4 metafazında 22. kromozom monozomisi saptanmıştır.

30 no'lu olgudan kromozom elde edilememiştir.

Beyin tümörü örnekleri kromozom anomalileri açısından değerlendirildiğinde tümör örneklerindeki heterojenite en belirgin bulgulardan biridir. Farklı hücre dizileri dikkati çekmiştir. Yukarıda da ifade edildiği gibi kromozom analizi gerçekleştirilen 22 örneğin 2 tanesi ependimom, geri kalan 20 tanesi de GBM'dir. Ependimom örneklerinde kromozom 7, 9, 12'deki artış ile kromozom 6, 16 ve 22 kaybı ortak anomaliler olarak dikkati çekmiştir. GBM örneklerinde ise tüm ve/veya parsiyel kromozom monozomileri anlamlı düzeyde sık görülmüştür. Üç veya daha fazla örnekte gözlenen kromozom anomalileri arasında 1p delesyonu, monozomi 9, 16, 19 ve Y ile trizomi 7 ve 20 sık gözlenen anomalilerdi.

Çizelge 4.1:Beyin tümörlü olguların Yaş, Cins, Tür ve Metafaz eldesi

Hasta No	Yaş	Cins	Tür	Metefaz eldesi
1	48	E	GBM	+
2	36	E	GBM	+
3	44	E	GBM	+
4	44	E	GBM	+
5	38	E	GBM	+
6	57	E	GBM	-
7	45	E	GBM	+
8	52	K	GBM	+
9	45	K	Ependimom	+
10	45	E	Ependimom	+
11	29	E	GBM	+
12	18	E	Ependimom	-
13	34	K	GBM	+
14	62	E	GBM	+
15	48	K	GBM	-
16	48	E	GBM	+
17	57	E	GBM	+
18	54	E	GBM	-
19	33	K	GBM	+
20	52	E	GBM	-
21	69	K	GBM	+
22	52	E	GBM	+
23	26	K	GBM	+
24	57	K	GBM	-
25	42	E	GBM	+
26	40	K	GBM	+
27	69	K	GBM	+
28	50	K	GBM	-
29	52	K	GBM	+
30	73	K	GBM	-

Çizelge 4.2:Beyin tümörlü olgulara ait karyotip analiz sonuçları

Hasta No	Tür	Sitogenetik Sonuç
1	GBM	48,XY,+mar 47,XY 47,X,+8,+20,-Y 46,XY[10] 46,XY,del(1)(1pter→p31:) 46,X,+3,-Y 46,X,+10,-Y 45,X,-Y[5] 45,XY,-2 45,X,+6,+11,-16,-17,+19,-22,-Y
2	GBM	46,XY 42,XY,-8,-13,-14,-15,-21,+10
3	GBM	48,XY,-8,+15,-17,+3mar 46,XY[3] 46,XY,+20,-22[2] 46,XY,-13,+mar 45,X,-Y 43,X,-6,-16,-Y 41,X,-9,-10,-20,-21,-Y 41,X,-9,-11,-19,-21,-Y
4	GBM	46,XY,del(1)(1pter→p31:) 44,XY,-14,-22
5	GBM	47,XY,-10,-11,+3mar 47,XY,+mar 46,XY[4] 45,XY,-16 45,XY,-12 45,X,-Y 43,X,-11,-19,-Y 47,XY,+1(?),-14,+15

Hasta No	Tür	Sitogenetik Sonuç
6	GBM	Üreme gerçekleşmedi
7	GBM	46, XY[5]
8	GBM	47, XX, del(1)(1pter→p31:),+5p(?) 46, XX, del(1)(1pter→p31:) 45,X,del(1)(1pter→p31:),-7(q11→qter), t(7pter→7p12::10q21→qter,+8,+10(q21→qter)-19, -X 45, XX, del(1)(1pter→p31:), -22[3] 45, XX, del(1)(1pter→p31:), +14, -17, -22 45, XX, del(1)(1pter→p31:), +2, -5, -22 45, XX, del(1)(1pter→p31:), -19 44, XX, del(1)(1pter→p31:), -5, -22 44, XX, -1, -22 44,XX,- del(1)(1pter→p31:),-14,-22 44, XX, del(1)(1pter→p31:), -7, -22 43, XX, del(1)(1pter→p31:), -5, -13, -22 42, XX, del(1)(1pter→p31:), -5, -5p(?), -17, -18, -22 38, XX, -1, -5, -6, -14, -15, -16, -22, -22
9	Ependimom	47,XX,+7,+7, -8, +9,+9,+12, -16,-21,-22 48,XXY,-6,+7,+7,-8,+9,+9,+12,-16,-16,-17,-19, +21,-22,-22,+3mar 49,XXY,-2,-6,+7,+7,+8,+15,+17,-18
10	Ependimom	49,XX,+4,-6,+7,+9,+9,+12,-16,-22,+mar 49,XX,-6,-6,+7,+7,-8,-8,+9,+9,+12,+12,+15,-18,-19,-19,+3mar 51,X,+4,+8,+9,+10,+11,+12,+15,+15,-16,-17,-22,-X,+mar
11	GBM	46, XY[2] 46, XY, -16p(?) 45, X, -Y 45, XY, -5 45, XY, -11 40, X, -2, -3, -13, -17, -20, -Y 39, X, -2, -2, -9, -11, -19, -20, -Y

Hasta No	Tür	Sitogenetik Sonuç
12	Ependimom	Üreme gerçekleşmedi
13	GBM	46,XX[3] 47,XX,-3,+15,+21 45,XX,-22
14	GBM	45,X,-Y
15	GBM	Üreme gerçekleşmedi
16	GBM	44,+12,+20,-X,-Y 44,X,-16,-Y 45,X,+5p(?),-17,-Y 45,X,-16,-Y,+mar
17	GBM	45,X,-9
18	GBM	Üreme gerçekleşmedi
19	GBM	43,X,-1,-13,-17,-X,+mar 43,XX,-9,-12,-18
20	GBM	Üreme gerçekleşmedi
21	GBM	47,XX,+12,+19,-21 46,XX[2] 45,X,-X,t(8qter—8p?::18p—18qter) 41,XX,-3,-14,-14,-19,-22
22	GBM	46,XX[8] 47,XX,-11q,+mar (11q?) 45,XX,-15 44,X,-17,-X

Hasta No	Tür	Sitogenetik Sonuç
23	GBM	46,XY[6] 46,XY,-5p(?) 46,XY,+7,-8[2] 45,XY,+6,-9,-11 45,XY,-14,-20,+21 45,XY,-19 44,XY,-12,-16,-19,+22 44,XY,-2,-9 43,XY,-7,-11,-19 43,XY,-6,-13,-18 41,XY,-3,-4,-11,-15,-18
24	GBM	Üreme gerçekleşmedi
25	GBM	44,XY,+3,-11,-15,-22
26		46,XX[2] 45,XX,-22[2] 47,XX,+mar 45,X,-X 42,XX,-5,-12,-12,-19 45,XX,-15,-17,+20 45,X,+7,-12,-X 43,XX,-14,-16,-19
27	GBM	46,XX 46,XX,-15p(?) 44,XX,+2,+7,-10,-12,-18,-20 46,XX,-16,+mar
28	GBM	Üreme gerçekleşmedi
29	GBM	45,XX,-9,+11,-22 45,XX,+7,-22,-22 43,XX,-10,-19,-22 43,XX,-2,-6,-9 43,X,-18,-21,-22,-X,+mar
30	GBM	Üreme gerçekleşmedi

4.2. Beyin Tümörlü Olgularda FISH Analizleri

Araştırma grubunu oluşturan 30 olguya lokus spesifik ve sentromerik proplar uygulanarak FISH analizleri yapılmıştır (çizelge 4.3.).

Kullanılan proplar; LSI p53 (17p 13,1), LSI p16 (9p21)/CEP 9, LSI 1p36/1q25 ve LSI 19q13/19p13, LSI EGFR/CEP 7, LSI PTEN (10q23)/CEP 10, LSI TOP2A / HER2 / CEP 17'dir.

Çalışmaya dahil edilen GBM ve ependimom tümör dokularında yapılan FISH analizlerinde; olguların %53,3'ünde (16 olgu) 9p21 bölgesinde delesyon, %20'sinde (6 olgu) CEP9 bölgesinde delesyon, %33,3'ünde (10 olgu) 17p13.1 bölgesinde delesyon, %60'ında (18 olgu) 7p12 bölgesinde amplifikasyon, %20'sinde (6 olgu) CEP 7 bölgesinde amplifikasyon, %20'sinde (6 olgu) 1p36 bölgesinde delesyon, %6,6'sında (2 olgu) 1p36 bölgesinde amplifikasyon, %6,6'sında (2 olgu) 1q25 bölgesinde amplifikasyon, %60'ında (18 olgu) TOP2A gen bölgesinde amplifikasyon, %60'ında (18 olgu) HER2 gen bölgesinde amplifikasyon, %10'unda (3 olgu) CEP 17 bölgesinde delesyon ve %10'unda CEP 17 bölgesinde amplifikasyon (3 olgu), %30'unda (9 olgu) 19q13 bölgesinde delesyon ve %36,6'sında (11 olgu) 19q13 bölgesinde amplifikasyon, %13,3'ünde (4 olgu) 10q23 bölgesinde delesyon ve %13,3'ünde (4 olgu) 10q23 bölgesinde amplifikasyon gözlenmiştir.

Tümör örneklerindeki sitogenetik ve FISH analiz verileri karşılaştırılarak her iki yöntemle ortaya konan sonuçların birbirleriyle uyumluluğu değerlendirilmiştir.

Buna göre; 3 no'lu olguda klasik sitogenetik yöntemlerle 2 metafazında 9. kromozom monozomisi belirlenmiş, yapılan FISH analizleri sonucunda 9p21 bölgesine özgü delesyon %26 hücrede gözlenmiştir.

8 no'lu olguda klasik sitogenetik yöntemlerle incelenen tüm metafazlarında 1p monozomisi belirlenmiş, yapılan FISH analizleri sonucunda 1p36 bölgesi delesyonu hücrelerin %73'ünde saptanmıştır.

9 no'lu olgunun klasik sitogenetik yöntemlerle 3 metafazında 7. kromozom tetrazomisi ve 2 metafazında 9. kromozom tetrazomisi belirlenmiş, yapılan FISH analizleri sonucunda da 7p12 ve 9p21 gen bölgeleri amplifikasyonu doğrulanmıştır.

10 no'lu olgunun 1 metafazında 7. kromozom tetrazomisi ve 1 metafazında 7. kromozom trizomisi, 2 metafazında 9. kromozom tetrazomisi ve 1 metafazında 9. kromozom trizomisi belirlenmiş olup bu anomaliler lokus spesifik FISH analizleri (7p12 ve 9p21) ile doğrulanmıştır.

23 no'lu olguda klasik sitogenetik yöntemlerle 3 metafazında 19. kromozom monozomisi belirlenirken, interfaz FISH analizlerinde nükleusların %12'sinde 19q13 delesyonu gözlenmiştir.

26 no'lu örnekte klasik sitogenetik yöntemlerle 2 metafazında 19. kromozom monozomisi belirlenmiş, FISH analizi ile 19q13 bölgesi delesyonu %16 hücrede gözlenmiştir

29 no'lu olguda klasik sitogenetik yöntemlerle 2 metafazında 9. kromozom monozomisi belirlenirken tümör hücrelerinin %36 kadarında 9p21 bölgesi delesyonu saptanmıştır.

1, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 23, 25, 26, 28, 29 no'lu olgularda yapılan FISH analizleri sonucunda 7p12 bölgesinde amplifikasyon gözlenmiştir. 9 no'lu olgunun klasik sitogenetik yöntemlerle incelenen 3 metafazında 7. kromozom tetrazomisi, 10 no'lu olgunun 1 metafazında 7. kromozom tetrazomisi ve 1 metafazında

7. kromozom trizomisi, 23 no'lu olgunun 2 metafazında 7. kromozom trizomisi ve 1 metafazında 7. kromozom monozomisi, 26 no'lu olgunun 1 metafazında 7. kromozom trizomisi, 29 no'lu olgunun 1 metafazında 7. kromozom trizomisi görülmüştür. 6, 12, 15, 18, 20, 24, 28, 30 no' lu olgularda kromozom elde edilemezken, 1, 3, 5, 7, 11, 13, 14, 15, 16, 19, 25 no'lu olguların karyotip analizlerinde 7. kromozom anomalisi saptanmamıştır. Ancak bu olgularda yukarıda da ifade edildiği gibi FISH analizi ile 7p12 amplifikasyonu gözlenmiştir.

Sitogenetik ve özellikle FISH analiz bulguları kromozom 7 amplifikasyonunun sık gözlenen bir anomali olduğunu ortaya koymuştur.

Çizelge 4.3: Beyin tümörlü olguların FISH analiz sonuçları

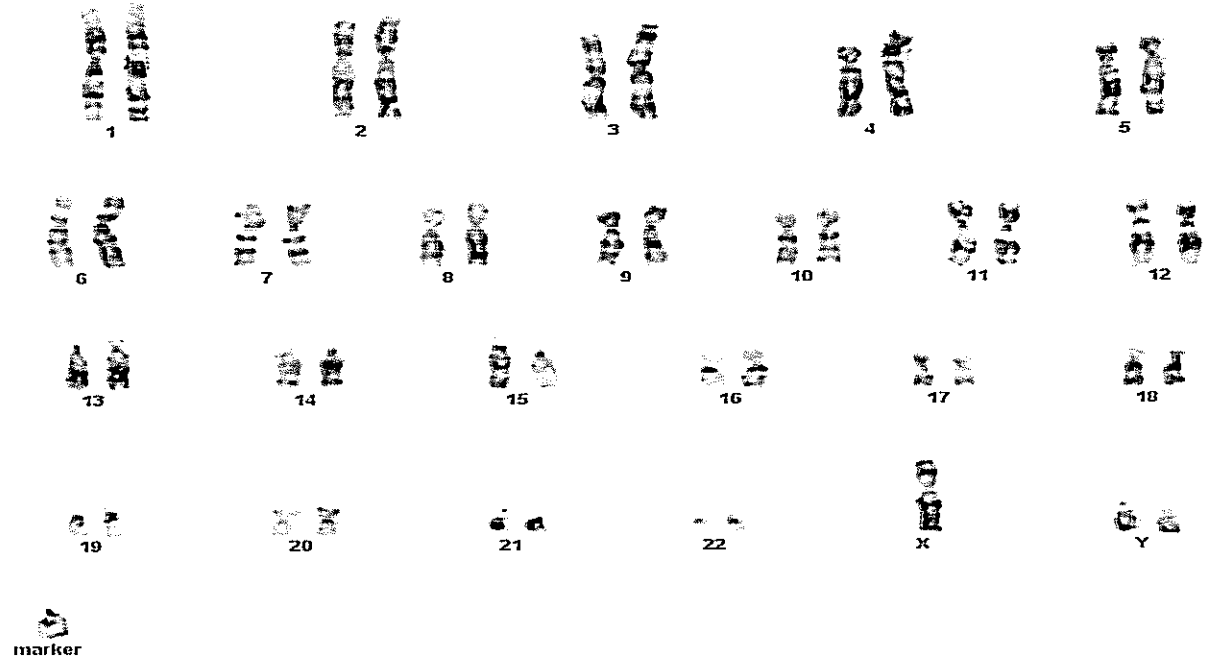
Hasta no	p16 (9p21) / CEP 9	p53 (17p13.1)	EGFR (7p12) / CEP 7	TP73/EGFL3 (1p36) / 1q25	TOP2A (17q21-q22)	HER2 (17q11.2-q12)	CEP 17	19q13 / 19p13	PTEN (10q23) / CEP10
1	%26del/N	N	%32amp/N	N/N	%17amp	%15amp	N	N	N/N
2	N/N	%2del	N/N	N/N	N	%7 amp	N	%7amp/N	N/N
3	%26del/N	%7 del, %8 amp	%11amp/N	%17del/N	%22amp	%12amp	N	%10del/N	N/N
4	N/N	%8 del	N/N	N/N	N	N	N	N/N	N/N
5	N/N	%8 del	%5 amp/N	N/N	N	N	N	%12amp/N	N/N
6	N/N	N	N/N	N/N	%11amp	N	N	%11amp/N	N/N
7	N/N	%8 del	%6 amp/N	N/N	%8 amp	N	N	N/N	N/N
8	%7 del, %6amp/N	%7 del	%7 del/N	%73del/N	%7 amp	%8 amp	%7del	%9 del, %8 amp/N	%34 amp/ %12amp
9	%82amp /%20amp	N	%80 amp/ %25amp	%9del/ %12amp	%6 amp	%6 amp	N	%12amp, %9 del/N	N%N
10	%78amp/ %25 amp	%9 del	%76amp/ %30 amp	%11del/N	%8 amp	%8 amp	%9 amp	%10del/N	%10amp /N

Hasta no	p16 (9p21) / CEP 9	p53 (17p 13.1)	EGFR (7p12) / CEP 7	TP73/EG FL3 (1p36) / 1q25	TOP2A (17q21- q22)	HER2 (17q11.2 -q12)	CEP 17	19q13 / 19p13	PTEN (10q23) / CEP10
11	%75 LOH/ %20 del	%12amp	%66 amp/ %35amp	%7amp/ N	%34amp	%27amp	%32amp	%75amp/N	%20amp /N
12	%8 del/N	N	%10amp/ N	N/%9 amp	N	%6 amp	N	%12 amp/N	%10 amp/N
13	%60del/ %10 del	N	%27 amp/N	N/N	%18amp	%16amp	N	%12 del/N	%43del/ %25 del
14	%44del/ %12 del	N	%61amp/ %27 amp	N/N	N	N	N	N/N	%44del/ %14 del
15	%27del/ %7del	N	%30 amp/ %7amp	N/N	%14amp	%18amp	N	%26 del/N	%20del/ N
16	%10 del/N	N	%9 amp/N	N/N	%10amp	%15amp	N	N/N	N/N
17	N/N	N	N/N	N/N	%9 amp	%10amp	N	%18amp/ N	N/N
18	N/N	N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	N/N
19	N/N	%27 del	%11amp/N	N/N	N	N	N	N/N	N/N
20	N/N	N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	N/N
21	%15 del/N	%10 del	N/N	N/N	%8 amp	%10amp	N	%20amp/N	N/N

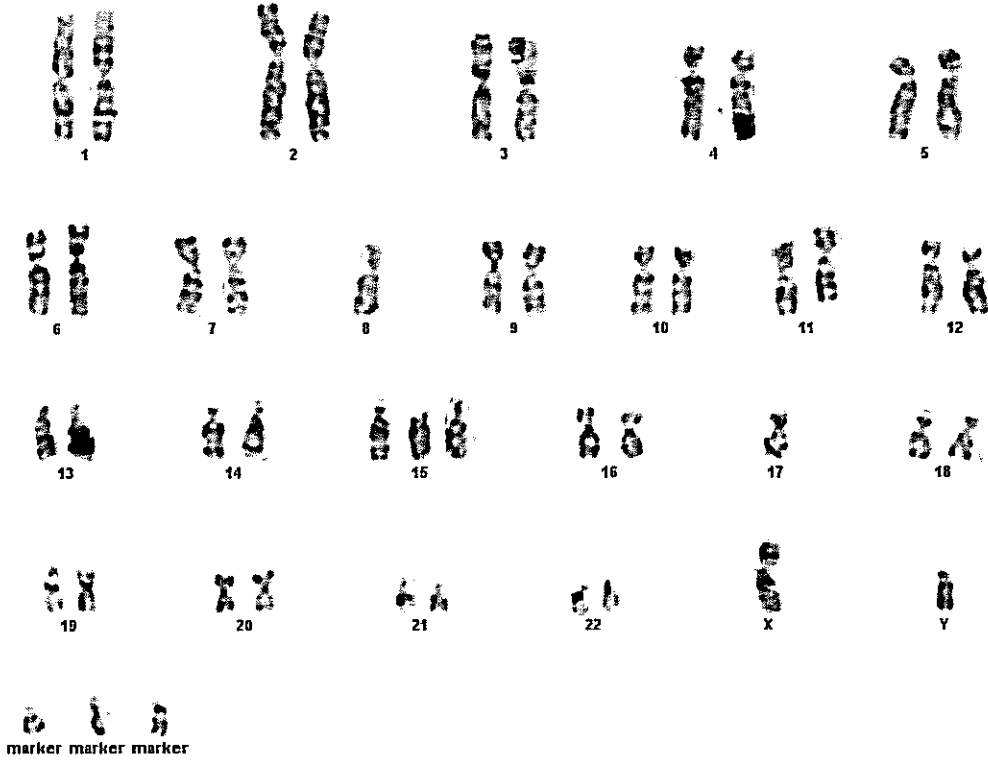
Hasta no	p16 (9p21) / CEP 9	p53 (17p 13.1)	EGFR (7p12) / CEP 7	TP73/EG FL3 (1p36) / 1q25	TOP2A (17q21- q22)	HER2 (17q11.2 -q12)	CEP 17	19q13 / 19p13	PTEN (10q23) / CEP10
22	%12del/N	%7 del	N/N	N/N	N	N	N	N/N	N/N
23	N/N	N	%10amp/N	N/N	%8 amp	%9 amp	N	%12 del/N	N/N
24	N	N	N	%6 del	N	N	%12 del	N	N/N
25	%77del/ %18 del	N	%87 amp/ %45amp	%49amp /N	%24 amp	%28 amp	N	%17amp/N	%42del/ N
26	%45del/ %26 del	N	%13amp/N	N/N	%11amp	%12amp	N	%16 del/N	N/N
27	N/N	N	N/N	N/N	N	N	N	N/N	N/N
28	%17 del/N	N	%12amp/ N	N/N	%17amp	N	N	%13amp/N	N/N
29	%36 del/N	%8del/ N	%14amp/ N	%16del/ N	N	%9 amp	%7 del	%14 del/N	N/N
30	%9 del/N	N	N/N	N/N	%5 amp	%5 amp	%5 amp	N/N	N/N



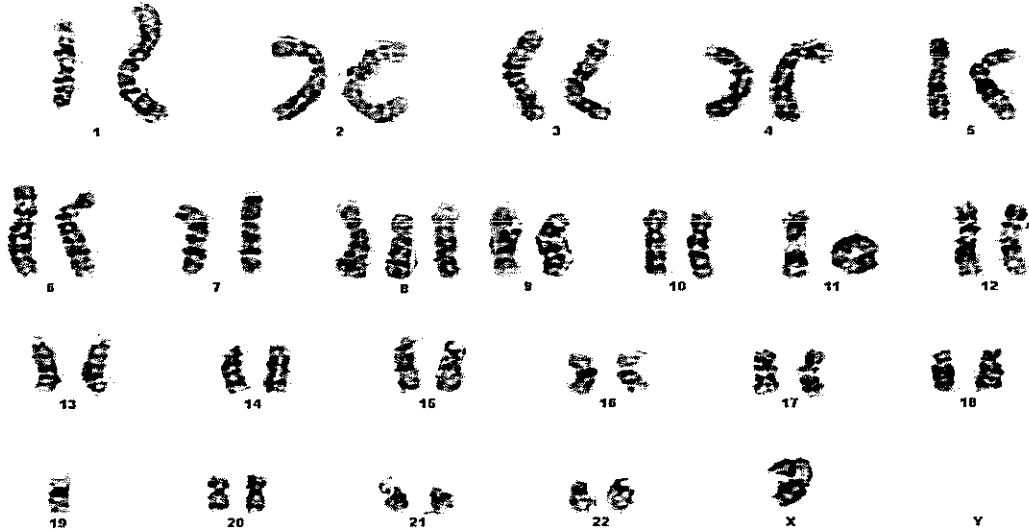
Resim 4.1.1 Araştırma grubu olgularımızdan GBM türüne sahip 1 no'lu olguya ait karyotip analiz görüntüsü. Karyotip analiz sonucu: 45,X,+6,+11,-16,-17+19,-22,-Y



Resim 4.1.2. Araştırma grubu olgularımızdan GBM türüne sahip 1 no'lu olguya ait karyotip analiz görüntüsü. Karyotip analiz sonucu: 48,XXX,+mar



Resim 4.2. Araştırma grubu olgularımızdan GBM türüne sahip 3 no'lu olguya ait karyotip analiz görüntüsü. Karyotip analiz sonucu: 48,XY,-8,+15,-17,+3mar



Resim 4.3.1. Araştırma grubu olgularımızdan GBM türüne sahip 8 no'lu olguya ait karyotip analiz görüntüsü. Karyotip analiz sonucu:

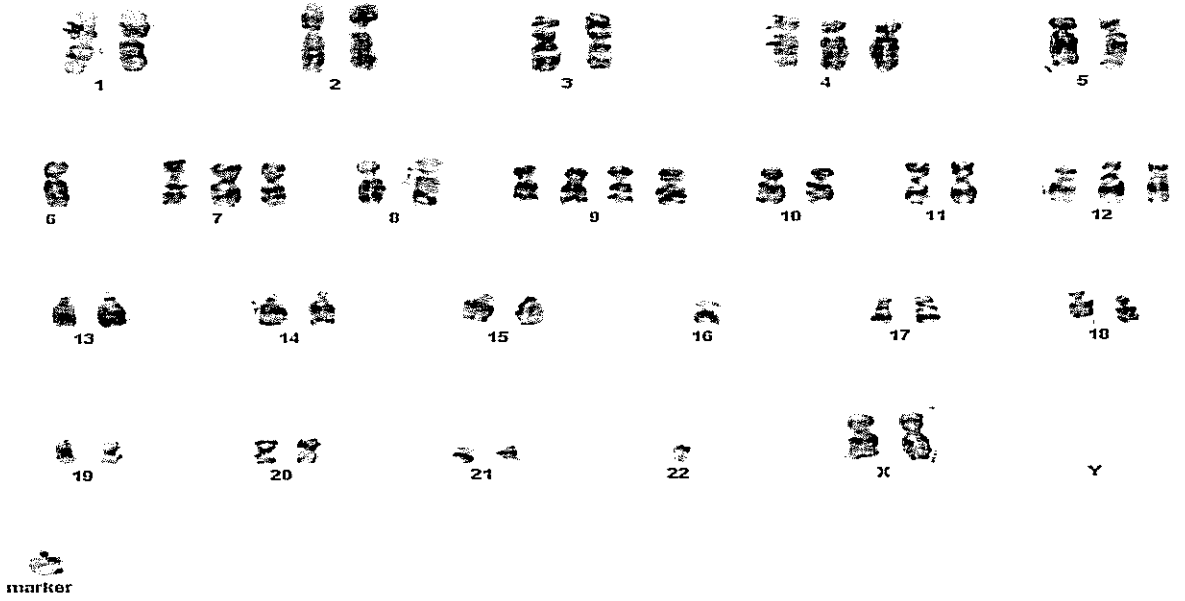
45,X,del(1)(1pter→p31:),-7(q11→qter), t(7pter→7p12::10q21→qter),+8,+10(q21→qter)-19,-X



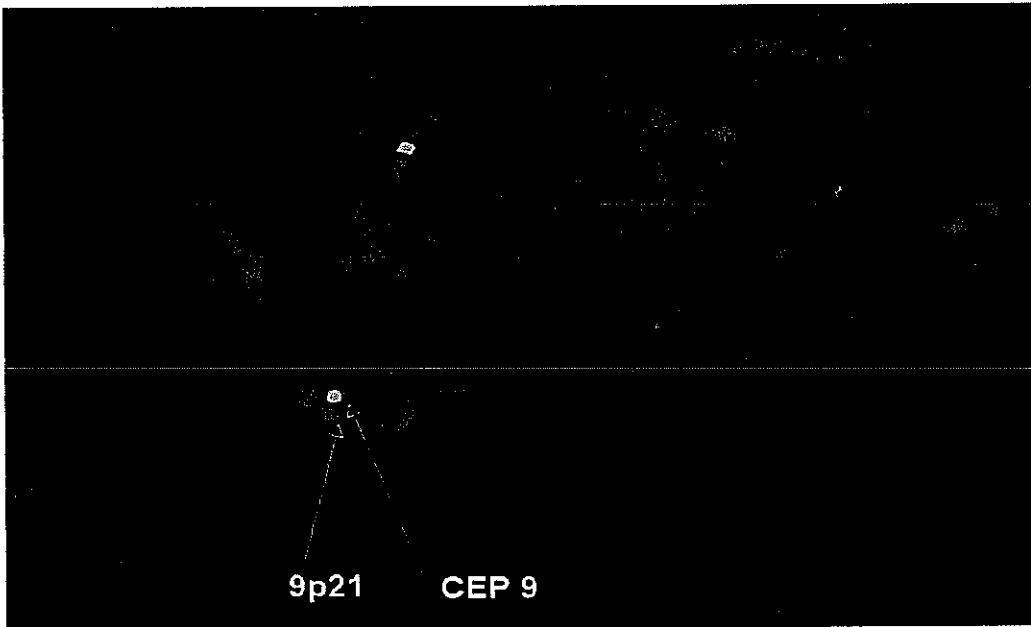
Resim 4.3.2. Araştırma grubu olgularımızdan GBM türüne sahip 8 no'lu olguya ait karyotip analiz görüntüsü. Karyotip analiz sonucu: 44,XX,del(1)(pter→p31:), -14,-22



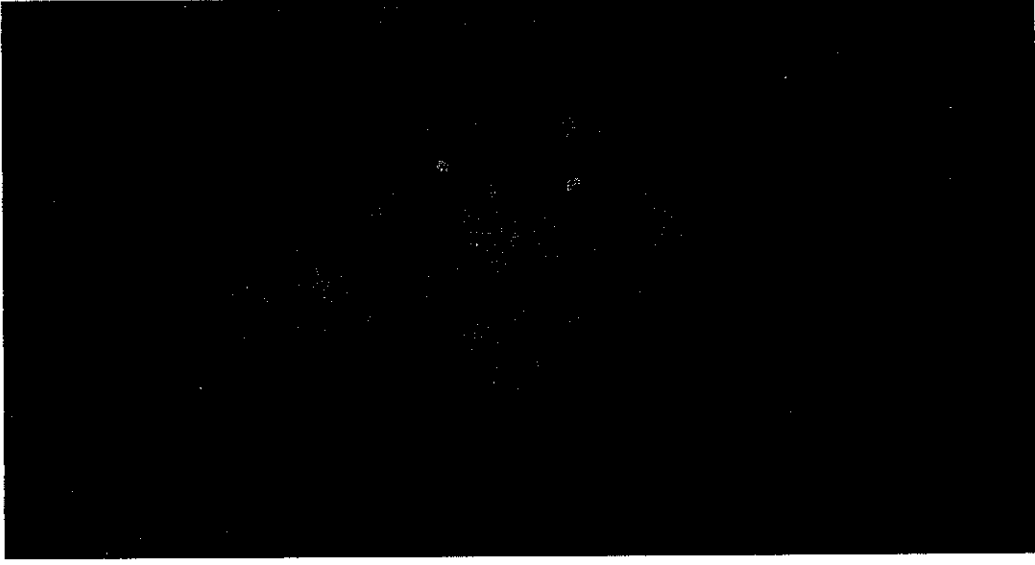
Resim 4.4. Araştırma grubu olgularımızdan ependimom türüne sahip 9 no'lu olguya ait karyotip analiz görüntüsü. Karyotip analiz sonucu: 47,XX,+7,+7,-8,+9,+9,+12, -16,-17qdel,-21,-22



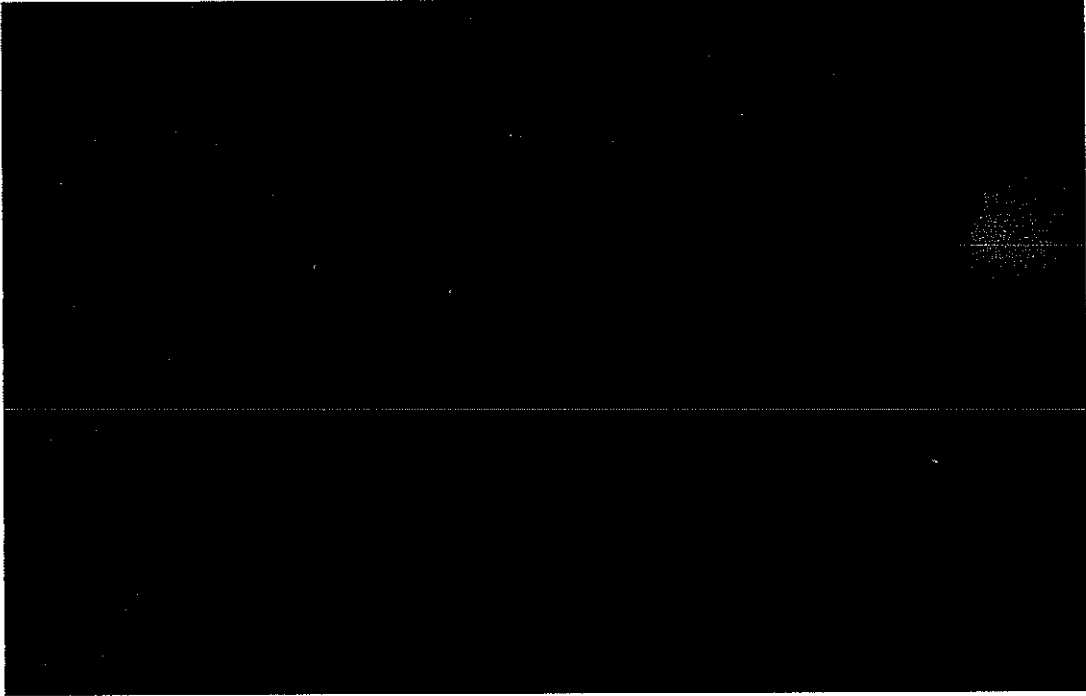
Resim 4.5. Araştırma grubu olgularımızdan ependimom türüne sahip 10 no'lu olguya ait karyotip analiz görüntüsü. Karyotip analiz sonucu: 49,XX,+4,-6,+7,+9,+9,+12,-16,-22+mar



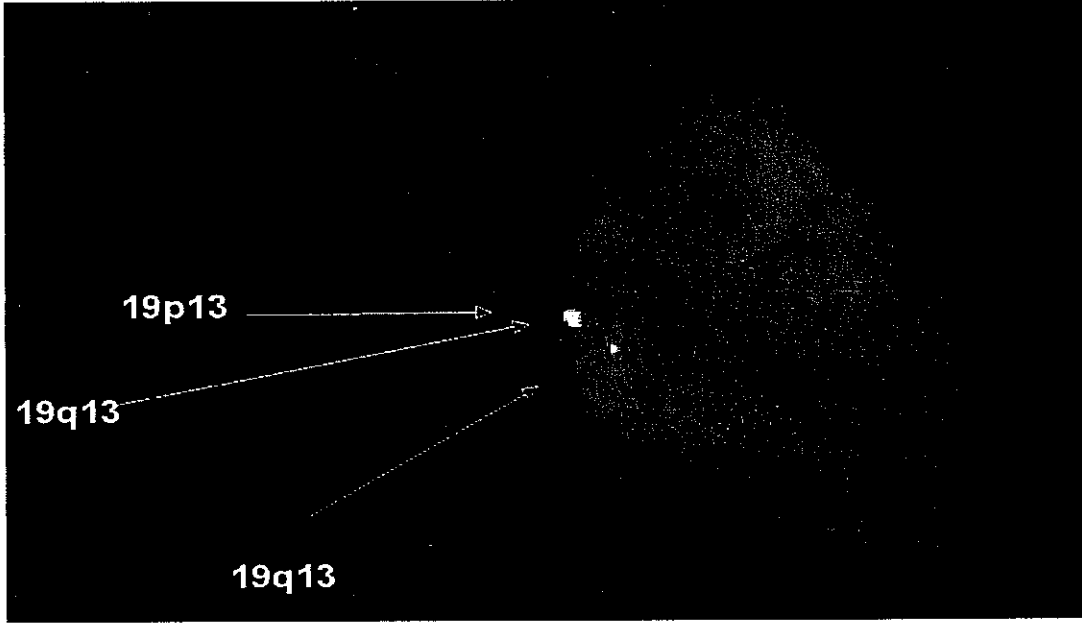
Resim 4.6. Araştırma grubu olgularımızdan GBM türüne sahip 3 no'lu olguya ait 9p21/CEP9 Probe FISH analiz görüntüsü (Delesyonlu metafaz plağı) (9p21 Spectrum Orange, CEP9 Spectrum Green)



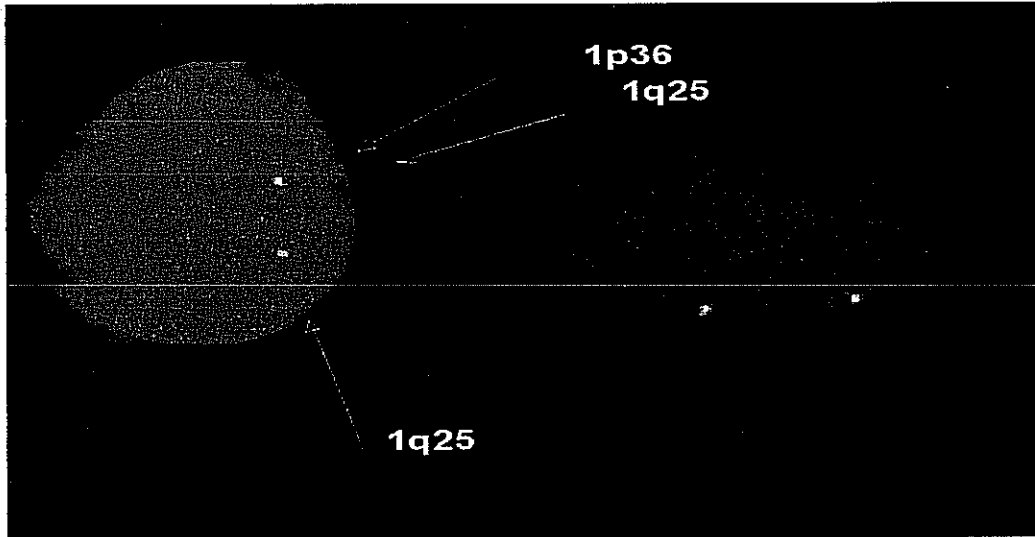
Resim 4.7. Araştırma grubu olgularımızdan GBM türüne sahip 4 no'lu olguya ait p53 Probe FISH analiz görüntüsü (Normal interfaz nükleusu) (p53 Spectrum Orange)



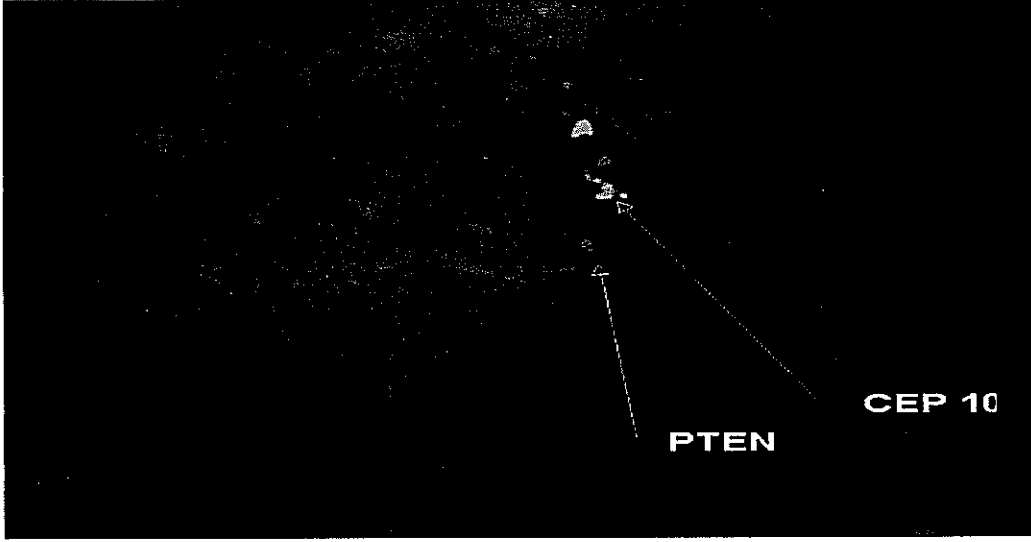
Resim 4.8. Araştırma grubu olgularımızdan GBM türüne sahip 5 nolu olguya ait p53 Probe FISH analiz görüntüsü(Normal metafaz plağı,normal ve delesyonlu interfaz nükleusu) (p53 Spectrum Orange)



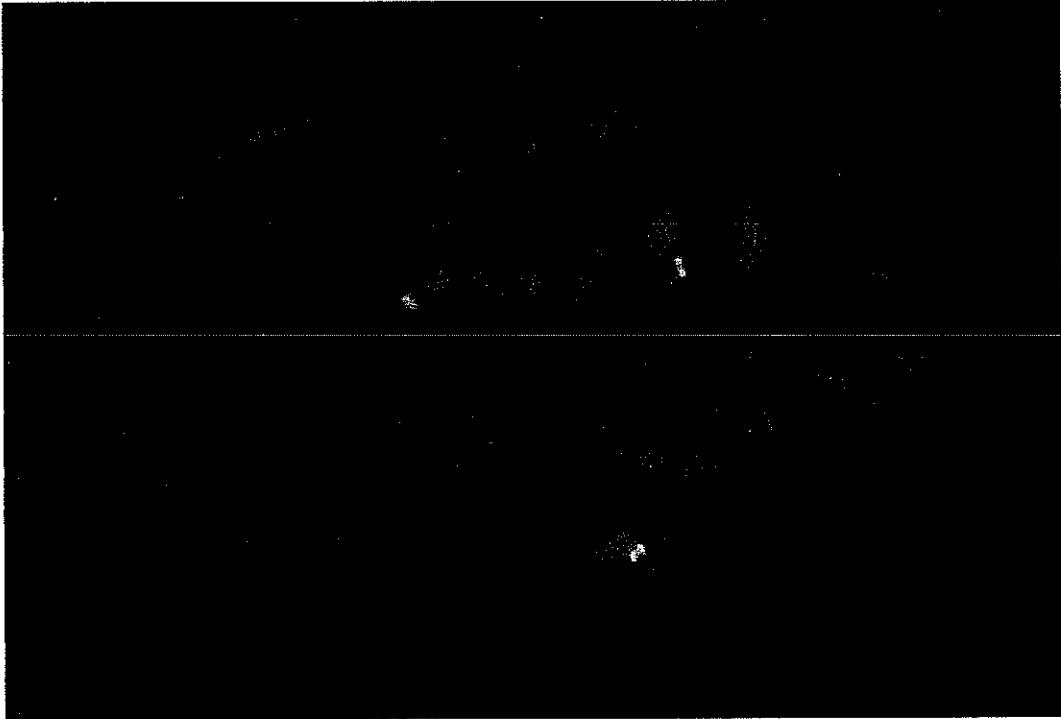
Resim 4.9. Araştırma grubu olgularımızdan GBM türüne sahip 6 no'lu olguya ait 19q13/19p13 Probe FISH analiz görüntüsü (ok ile gösterilen interfaz nukleusunda 19q13 bölgesinde trizomi gözlenmiştir) (19q13 Spektrum Orange, 19p13 Spectrum Green).



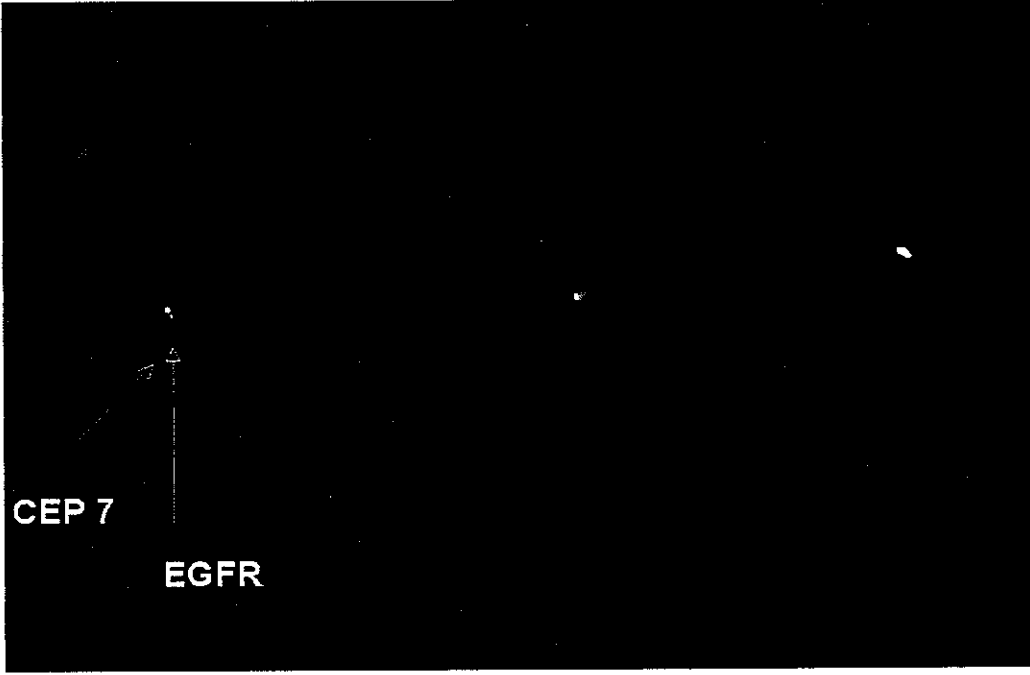
Resim 4.10.1. Araştırma grubu olgularımızdan GBM türüne sahip 8 no'lu olguya ait 1p36/1q25 Probe FISH analiz görüntüsü (ok ile gösterilen interfaz nukleusunda 1p36 bölgesinde delesyon gözlenmiştir) (1p36 Spektrum Orange, 1q25 Spectrum Green).



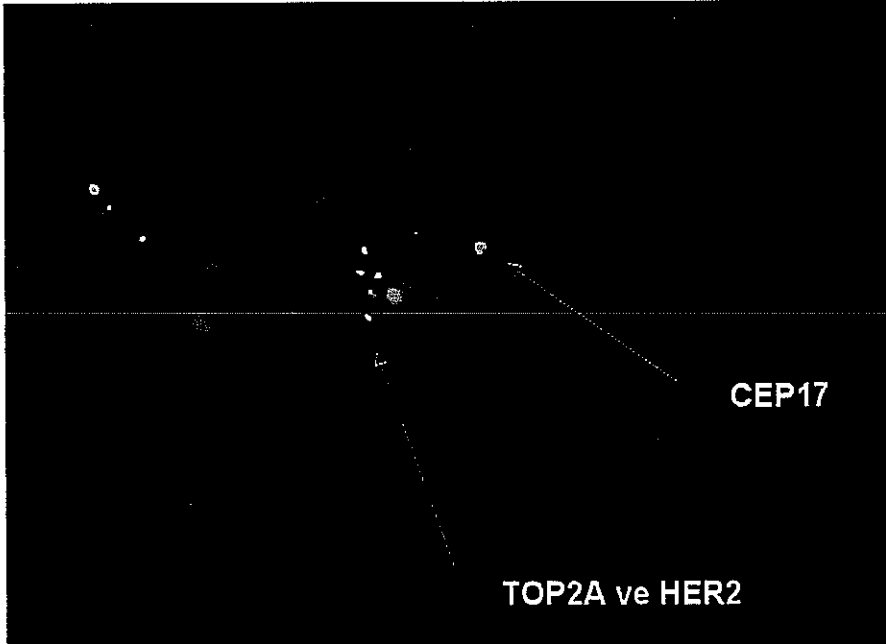
Resim 4.10.2. Araştırma grubu olgularımızdan GBM türüne sahip 8 no'lu olguya ait PTEN/CEP10 Probe FISH analiz görüntüsü (PTEN amplifikasyonu interfaz nükleusunda gözlenmiştir) (PTEN Spectrum Orange, CEP10 Spectrum Green).



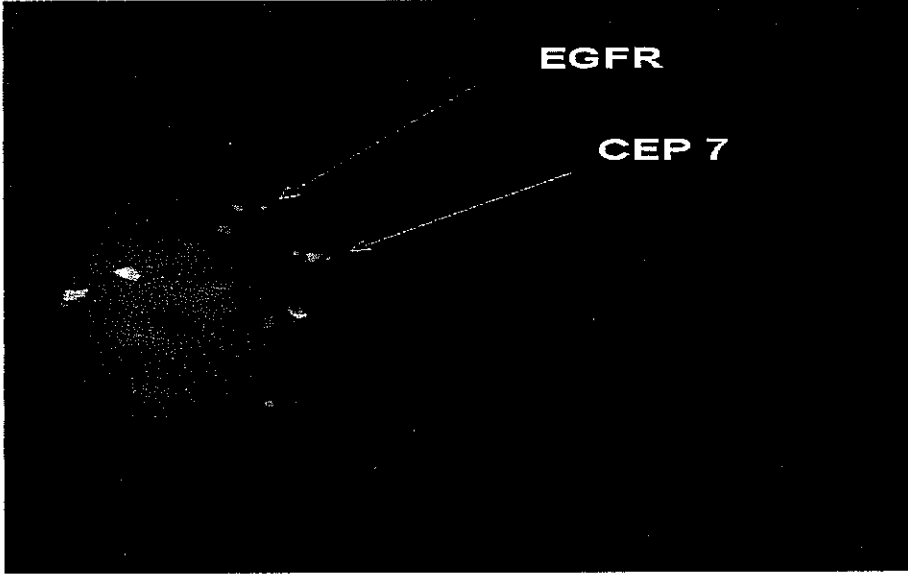
Resim 4.11. Araştırma grubu olgularımızdan Ependimom türüne sahip 9 no'lu olguya ait 9p21/CEP9 Probe FISH analiz görüntüsü (Trizomi 9 metafaz plağı) (9p21 Spectrum Orange, CEP9 Spectrum Green)



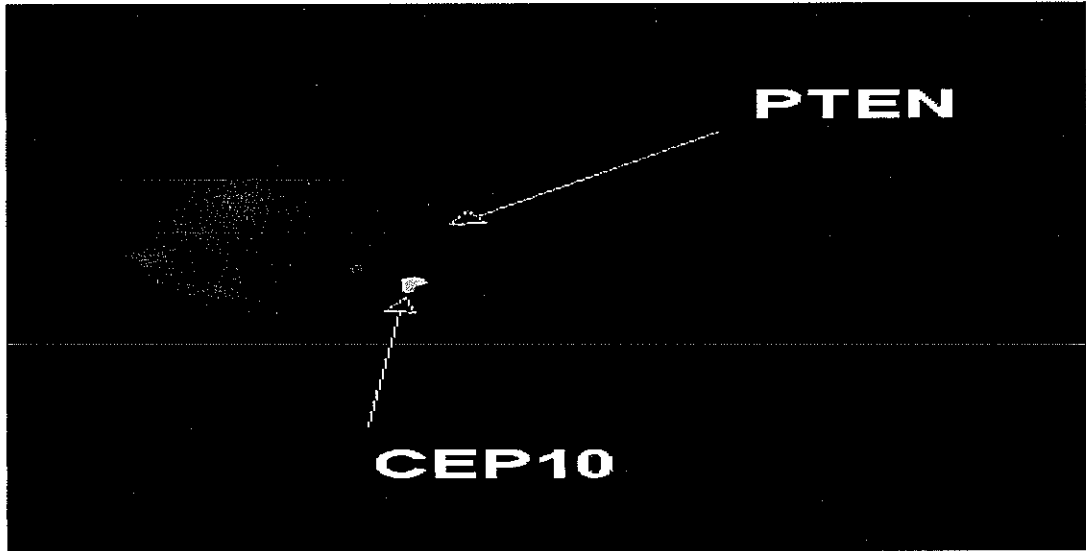
Resim 4.12. Araştırma grubu olgularımızdan Ependimom türüne sahip 10 no'lu olguya ait 7p12/CEP7 Probe FISH analiz görüntüsü (Trizomi 7 metafaz plağı) (7p12 Spektrum Orange, CEP7 Spektrum Green).



Resim 4.13. Araştırma grubu olgularımızdan GBM türüne sahip 11 no'lu olguya ait TOP2A/HER2/CEP17 Probe FISH analiz görüntüsü (TOP2A amplifikasyonu, HER2 amplifikasyonu, trizomi 17 interfaz nükleusunda gözlenmiştir) (TOP2A Spektrum Orange, HER2 Spektrum Green, CEP17 Spektrum Aqua).



Resim 4.14.1. Araştırma grubu olgularımızdan GBM türüne sahip 14 no'lu olguya ait 7p12/CEP7 Probe FISH analiz görüntüsü (Amplifikasyonlu interfaz nükleusu) (7p12 Spektrum Orange, CEP7 Spektrum Green).



Resim 4.14.2. Araştırma grubu olgularımızdan GBM türüne sahip 14 no'lu olguya ait 10q23/CEP10 Probe FISH analiz görüntüsü (Monozomi 10 interfaz nükleusunda gözlenmiştir) (PTEN Spektrum Orange, CEP10 Spektrum Green).

5.TARTIŞMA

Beyin tümörü örneklerindeki sayısal/yapısal kromozom anomalilerini belirlemek, kanser genlerine ilişkin değişimleri saptamak amacıyla yapılan bu çalışmada, olgulardan alınan tümör örnekleri, standart uzun süreli doku kültürü yöntemi ile kültüre edilerek hazırlanan preparatlarda, klasik sitogenetik ve moleküler sitogenetik (FISH) analiz gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda 30 beyin tümörünün 22 tanesinde kromozom analizi gerçekleştirilmiş, 8 örnekte metafaz kromozomları elde edilememiştir. Tümör örneklerindeki başarı oranı %73,4'tür. Örneklerin sadece birinde normal karyotip gözlenirken, diğer tüm örneklerde kompleks kromozomal anomalileri izlenmiştir.

Araştırma grubunu oluşturan 30 örnekte lokus spesifik ve sentromerik problemler uygulanarak FISH analizleri gerçekleştirilmiştir. Kullanılan FISH problemleri onkogen ve tümör baskılayıcı genlere spesifik problemlerdi. Kromozom 9p21 bölgesindeki p16 geni, 7p12 bölgesindeki EGFR geni, 17q11.2 bölgesindeki HER2 geni, 17q21-q22 bölgesindeki TOP2A geni, 17p13.1 bölgesindeki p53 geni, 1p36 da p73, 10q23 de PTEN geni tümör örneklerinde değerlendirilen kanser genleridir. Ayrıca glial tümörlerde delesyonu yüksek sıklıkla gözlenen kromozom 19q13/19p13 bölgeleri ile kromozom 17 sayısal anomalilerini değerlendirmek için sentromer bölgesine spesifik CEP17 probu kullanılmıştır. Klasik FISH analizleri ile çok sayıda farklı kanser geninin beyin tümörlerindeki durumları değerlendirilmiştir.

5.1. Sitogenetik Analiz Bulguları

5.1.1. GBM Hastalarının Sitogenetik Analiz Bulguları

Çalışmaya dahil edilen 30 örneğin 27 tanesi GBM ve 3 tanesi de ependimomdu. Glioblastome Multiforme erişkinlerde astrositik orjinli primer beyin tümörlerinin en sık görüleni ve en agresif olanıdır. Hem histomorfolojik olarak hem de genetik değişiklikler açısından yüksek oranda intratumoral heterojenite gösteren tümördür. Glioblastomalar (GBM) diffüz ya da anaplastik astrositomadan gelişebildiği gibi herhangi bir malign prekürsörü olmadan de novo olarak da gelişebilir ki bu grup primer GBM olarak ifade edilir. Bu iki grubu ayırmada genetik markerlardan yararlanılmaktadır. Tümör örneğinde EGFR gen amplifikasyonu olması tümörün spontan geliştiğini, p53 tümör baskılayıcı geni mutasyonları görülmesi ise bir malignite sürecinin olduğunu göstermektedir (8).

Toplam 410 yüksek dereceli glial tümör (Derece 3 ve GBM) konvansiyel sitogenetik analiz bulguları açısından değerlendirildiğinde normal karyotip ya da sadece bir gonozomal kromozom kaybının olduğu karyotipten kompleks kromozom anomalilerinin gözleendiği karyotipe kadar değiştiği gözlenmiştir. Kromozom 7, 9, 10, 17, 19 ve 22 deki sayısal anomaliler sık gözlenen anomalilerdir. Ayrıca tetraploid/triploid hücre dizileri sıklıkla görülmektedir ki bu da genomik dengesizliğin arttığını gösteren bir bulgudur. Dengesiz translokasyon, halka kromozom, orjini belirlenemeyen ‘marker kromozom’ sık gözlenen dengesiz yapısal anomalilerdir ki bu da onkogenlerin bulunduğu kromozom bölgelerinin amplifikasyonunu açıklamaktadır (8).

Çalışmamıza dahil edilen 27 GBM örneğinin 20 tanesinde sitogenetik analiz gerçekleştirilebilmiştir. Bu 20 tümör örneğinden bir tanesinde normal karyotip gözlenirken, diğer 19 örnekte farklı kromozom anomalileri saptanmıştır. Sıklıkla görülen sayısal kromozom anomalileri; monozomi 22 (8 hasta), monozomi 17 (7 hasta),

monozomi Y (6 hasta), monozomi 16 (6 hasta), monozomi 19 (6 hasta), monozomi 9 (5 hasta), monozomi 13 (6 hasta), monozomi X (5 hasta), monozomi 2 (4 hasta), monozomi 3 (4 hasta), monozomi 10 (4 hasta), monozomi 11 (4 hasta), monozomi 12 (4 hasta), monozomi 15 (4 hasta), monozomi 20 (4 hasta), monozomi 1p (3 hasta), trizomi 7 (6 hasta), trizomi 20 (4 hasta)'dir.

Sitogenetik analiz verilerimiz intratumoral heterojeniteyi destekler niteliktedir. Bulgular bölümünde çizelge 4.2'de de görüleceği üzere aynı olguda dahi farklı hücre dizileri görülebilmektedir ki bu heterojenite FISH analiz verilerinde de anlamlı oranda gözlenmiştir.

Gözlenen sayısal ve yapısal kromozom anomalileri literatür verileri ile karşılaştırıldığı zaman geniş serilerde elde edilen verilerle uyum içerisinde olduğu gözlenmiştir (1, 7, 8, 13, 16, 33, 36, 39, 40,44, 50, 61, 63).

Bayani ve ark. (2005), kromozom 7, 9, 10, 19 ve 22 deki sayısal anomalilerin yüksek sıklıkla gözlendiğini ifade ederken Ja ve ark. (1987) malign astrositomalarda en çok sayısal değişimlerin kromozom 7, 19, 20 artışı ve kromozom 10, 22, Y kaybı olduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da kromozom 7 (6/20) ve 20 (4/20) trizomisi ile kromozom 10 (4/20), 22 (8/20) ve Y (6/20) monozomileri saptanmıştır. Kromozom 7'nin yapısal yeniden düzenlenmesi ve polizomisinin epidermal büyüme faktör geninin aşırı ekspresyonuyla ilişkili olduğu ve bu durumun bazı malign gliomalarda gözlendiğini belirtmişlerdir. Bu çalışma sonuçlarımız ile uygunluk göstermektedir.

5.1.2. GBM Hastalarının FISH Analiz Bulguları

Solid tümörlerden metafaz kromozomlarının elde edilmesindeki düşük başarı oranı, ayrıca kromozom morfolojisinin yüksek rezolüsyonlu analize olanak vermemesi ve çok fazla zaman ve emek harcanması son dönemlerde sitogenetik analizler yerine

tümör örneklerinin moleküler sitogenetik yöntemlerle değerlendirilmesine neden olmuştur. FISH analizlerinin interfaz nükleuslarında gerçekleştirilebilmesi ve tümör heterojenitesi açısından etkin bir yöntem olması solid tümör örneğinde FISH analizinin yaygın olarak kullanılmasında etkindir. Günümüzde hem tanı hem de araştırma amaçlı FISH analizleri tümör sitogenetiğinin temelini oluşturmaktadır.

Glial tümörlerde sitogenetik ve CGH analiz verilerinin retrospektif ve prospektif konfirmasyonunda FISH yöntemi tercih edilen yöntem olmuştur.

Çalışmaya dahil edilen 27 GBM tümör örneğinde yapılan FISH analizinde en sık gözlenen delesyon 9p21 (15 olgu) delesyonudur. Bunu %33,3 sıklıkla (9 olgu) 17p13.1, %25,9 (7 olgu) ile 19q13, %14,8 (4 olgu) ile 1p36 ve 10q23, %11.1 (3 olgu) ile CEP17 delesyonu izlemiştir.

GBM örneklerinde saptanan artış/amplifikasyonlar ise görülme sıklığına göre %55,5 (15 olgu) ile EGFR (7p12), %59,2 (16 olgu) ile TOP2A ve %55,5 (15 olgu) ile HER2, %33,3 (9 olgu) ile 19q13, %7,4 (2olgu) ile 10q23 ve CEP17 şeklinde sıralanabilir.

GBM tümör örneklerinin FISH yöntemi ile değerlendirilmesi sonucu 9p21 ve 17p13.1 delesyonu ile 7p12 amplifikasyonu sık görülen anomaliler olarak bildirilmiştir ve kötü prognostik gruba dahil edilmektedir. Çalışmamızda da 9p21 (%55,5), 17p13.1 (%33,3), 1p36 (%14,8), 10q23 (%14,8) delesyonu ve 7p12 (%55,5) amplifikasyonu yüksek oranda saptanmış olup, literatür ile uyumlu olduğu gözlenmiştir. Yüzdelerdeki farklılıkların öncelikle tümör heterojenitesinden kaynaklandığı, bunun yanı sıra analizi yapılan örneğin tümör bölgesini içerip içermemesi ve teknik farklılıklarda anomali sıklığının değişken olmasında rol oynar ve farklı tümör örneklerindeki farklı uygulamalardan dolayı olduğu düşünülmektedir (18, 20, 28, 49, 53, 59, 61).

Brat ve ark (2004) tarafından incelenen 74 GBM olgusunda 1p delesyonu gözlenmezken, 9p21 (%68) ve 10q23 (%71) bölgesi delesyonları yüksek sıklıkta saptanmıştır. Olguların %10 kadarında ise 19q13 delesyonu olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda elde edilen verilerle karşılaştırıldığı zaman 9p21 bölgesi delesyonu yüksek sıklıkla gözlenen anomali olarak uyum göstermektedir. Diğer bölge delesyonlarının görülme sıklıkları da benzerdir.

Oligodendrogliomaların %60-80'i kromozom 1p/19q kaybına sahiptir ve prognostik olarak artmış PCV (procarbazine, lomustine, vincristine) ve kemoterapi cevabıyla karakterizedir ve uzamış yaşam süresine sahiptir. Astrositomaların insidansı oligodendrogliomalardan 8-10 kat daha büyüktür. GBM'de ise kromozom 1p/19q kayıpları daha düşük frekansda görülmektedir ve kromozom 1p/19q kaybı saptanan olguların saptanmayan olgulara göre uzamış yaşam süresine sahip olduğu bildirilmektedir (12, 13, 20, 23, 31, 47, 48, 50, 58).

Gonzales ve ark.(2006) tarafından yapılan ilk çalışmada incelenen 97 GBM olgusunun beşinde (5/97) kombine 1p/19q delesyonu saptanmış ve bu olguların yaşam sürelerine bakıldığında delesyon görülmeyenlere oranla daha uzun olduğu bildirilmiştir. (del 1p/19q~yaklaşık 22 ay, sağlam 1p/19q~10 ay). Yapılan ikinci çalışmada ise sadece 19q delesyonunun varlığına bakılmış ve 19q delesyonuna sahip bireylerin olmayanlara oranla yine daha uzun yaşam süresine sahip olduğu bildirilmiştir ve glioblastomalarda 19q ve/veya kombine 1p/19q delesyonlarının bazı kemoterapik ajanlara karşı duyarlılığı ve yaşam süresini arttırdığı sonucuna varılmıştır (20, 23, 31, 48, 58).

Çalışmamızda 1p(%20) ve 19q(%30) delesyonları yüksek sıklıkta gözlenen anomalilerdi. Ancak olgularda hastalığa ilişkin prognoz verileri olmadığından anomali saptanan olgulardaki yaşam sürelerine ilişkin bir yorum yapılamamaktadır.

Gliyal tümörlere ek olarak, 1p delesyonu göğüs, akciğer, endometrial, over, koleraktel karsinoma ve nöroblastomada bulunmuştur. Bu durum 1p'nin güçlü olarak 1 veya daha fazla tümör süpressör geni barındırdığını ifade etmektedir. 19q'da da henüz kesinleşmiş bir tümör süpressör gen ifade edilmemekle beraber, yapılan birkaç çalışmadan elde edilen verilere göre p19RhoGAP aday tümör süpressör gendir (26).

Çalışmamızda GBM olgularının %55,5'inde (15 olgu) 9p21 bölgesinde delesyon belirlenmiştir. Bir tümör süpressör gen olan CDKN2 kromozom 9p21 bölgesinde lokalizedir. Bu gen hücre siklus progresyonunda önemli bir rol oynar. CDKN2, 156 aminoasitten oluşan, siklin-bağlı kinaz (CDK4) ve siklin D kompleksine bağlanarak anormal hücre büyümesi ve proliferasyonunu bloke eden 16 KD'lik hücre siklus inhibitör proteinini kodlar. Bu bağlanma, CDK'nun inhibisyonunda rol oynar ve G1 fazında hücre siklusunu durdurur. Kromozom 9 kaybının, düşük evre astrositomadan yüksek evre astrositomaya gelişiminde önemli bir adım olduğu gözlenmektedir ve kısalmış yaşam süresiyle ilişkilidir. 9p21 gen delesyonu astrositomun değişiminde anaplazi derecesine göre artarak, GBM'de %57 düzeyine kadar görülmektedir.

GBM olgularının %33,3'ünde (9 olgu) 17p13.1 bölgesinde delesyon belirlenmiştir. TP53 gen mutasyonları ya da TP53'ü içeren 17p kromozomu (17p 13.1) parçasının delesyonu ya da her ikisi meme, over, mesane, serviks, osteojenik sarkoma, hepatosellüler karsinom, beyin tümörleri gibi sıklıkla sporodik kanserlerde izlenir. p53 proteini, DNA hasarına hücreyel yanıtın önemli bir parçası olan bir DNA-bağlayıcı proteindir. Hücre bölünmesini durduran ve DNA hasarının düzeltilmesini sağlayan genlerin transkripsiyonunu aktive eden bir transkripsiyon faktörü olmasının yanında, p53 onarılmayan DNA hasarlı hücrelerde de apoptozisi sağlayan bir role sahiptir. p53 fonksiyon kaybı, hasarlı DNA'nın yaşamasına ve bölünmesine izin vermektedir. p53 gen delesyonu astrositom(derece 2) ve anaplastik astrositomada glioblastomdan daha yüksek oranda görülmektedir.

GBM olgularının %14,8'inde (4 olgu) 10q23 gen bölgesinde delesyon belirlenmiştir. PTEN geni 10q23 lokusunda lokalizedir ve PTEN gen mutasyonunun

hücre büyüme regülasyonunda, apoptotik cevapta, hücre göçünde, ekstraselüler matriksle ilişkili hücre yolunda bozulmaya neden olduğu düşünülmektedir. Kromozom 10 kaybı, AA'dan GBM'e ilerlemede gereken en sık olaylardan biridir. PTEN gen mutasyonu, primer GBM'de ~ %25, sekonder GBM'de ~ %10 oranla daha fazla sıklıkta dörülmeştir. Diğer taraftan primer GBM de 10. kromozomun q ve p kolunu içeren tam kaybına karşın, sekonder GBM de 10q koluna sınırlı ve lokalize parsiyel kayıplar vardır. Bu veriler astrositomun daha malign formlara dönüşümünde PTEN geninin yanı sıra 10q'da lokalize diğer tümör baskılayıcı gen delesyonlarının da rol aldığını göstermektedir (55).

GBM olgularının %59,2'sinde (16 olgu) TOP2A bölgesinde amplifikasyon belirlenmiştir. TOP2A geni 17q21-q22 gen bölgesinde lokalizedir ve hücre siklus progresyonunda, DNA replikasyonunda ve kromozom segregasyonunda anahtar bir enzim olan topoizomeraz 2'yi kodlar. TOP2A geni birçok inhibitör için özellikle kanser kemoterapisinde kullanılan ilaçlar için moleküler bir hedefdir. TOP2A geni HER2 onkogeninin telomerine lokalizedir (59). Glial tümörlerde TOP2A geni ile ilgili veriler çok kısıtlıdır. Ancak GBM olgularındaki sıklığın düşük dereceli astrositomlardaki sıklığa göre daha yüksek olduğu ifade edilmektedir. Çalışmamızda da TOP2A anomalisinin yüksek sıklıkta gözlenmesi bunu destekler niteliktedir.

GBM olgularının %55,5'inde (15 olgu) HER2 bölgesinde amplifikasyon belirlenmiştir. HER2 onkogeni 17q11.2-q12 bölgesinde lokalizedir. HER2 onkogeni intrasellüler tirozin kinaz aktiviteli bir transmembran glikoprotein kodlar. HER-2 reseptörü epitel hücre büyümesi ve diferansiasyonunu kontrol eden subselüler sinyal transdüksiyonunun aktivasyonunda kritik bir öneme sahip olan epidermal büyüme faktör reseptör ailesine aittir. HER2 gen amplifikasyonu meme kanserlerinin %10-34'ünde görülür ve kötü prognostik bir faktördür (24, 62).

Haynik ve ark. (2007) 44 GBM hastasını FISH ile HER2/ neu geni açısından incelemişler ve hiçbirinde HER2/neu amplifikasyonu görmemişlerdir. Bizim çalışmamızda ise HER2/neu amplifikasyonu %60 oranında gözlenmiştir. Bu çalışma

bizim çalışmamızla uyumluluk göstermemektedir. Koka ve ark. (2003) 23/149 (%15,4) GBM hastasında HER2/neu amplifikasyonunu görmüşlerdir. HER2/neu amplifikasyonunun belirgin derecede erken mortalite olasılığını arttırdığını ve GBM'li hastalarda kötü prognostik bir marker olabileceğini söylemektedirler. Bizim çalışmamızda ise %60'lık oranla daha yüksek amplifikasyon gözlenmiştir. Bu farklılığın, tümör heterojenitesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

GBM olgularının %55,5'inde (15 olgu) 7p12 bölgesinde amplifikasyon belirlenmiştir. EGFR geni 7p12 gen bölgesinde lokalizedir. Alternatif olarak HER1/erb-B1 olarak da bilinen EGF reseptörü, EGFR ailesinin bir üyesidir. Bu ailede ayrıca HER2/erb-B2, HER3/erb-B3 ve HER4/erb-B4 de yer almaktadır. EGFR geni hücre çoğalmasının kontrolünde anahtar rol oynayan tirozin kinaz aktivitesine sahip bir transmembran glikoproteini kodlamaktadır. EGFR gen amplifikasyonu primer glioblastomda ~%70 iken, sekonder glioblastomda ~%10 düzeyinde bulunmuştur.

5.1.3 Ependimom Hastalarının Sitogenetik ve FISH Analiz Bulguları

Çalışmaya dahil edilen 30 örneğin 3 tanesi ependimomdu. Üç ependimom örneğinin 2 tanesinde sitogenetik analiz gerçekleştirilebilmiştir. Hastaların ikisinde de görülen ortak anomaliler kromozom 7, 8, 9, 12, 15'in artışı ve kromozom 6, 8, 16, 18 22'in azalmasıdır.

Gözlenen sayısal ve yapısal kromozom anomalileri literatür verileri ile karşılaştırıldığı zaman geniş serilerde elde edilen verilerle uyum içerisinde olduğu gözlenmiştir (17, 25, 35, 37, 54, 61, 64).

İki hastada da görülen ortak amplifikasyon EGFR gen amplifikasyonudur. Bu amplifikasyon ependimom hastaları için kötü bir prognozdur (37).

Diğer taraftan iki olguda 1q25 amplifikasyonu ortak anomali olarak izlenmiştir. Gerek EGFR gerekse 1q25 bölge amplifikasyonlarının kötü prognozla bağlantılı olduğu ifade edilmektedir (37). Her iki olgumuzun bu yönde takip edilmesi hedeflenmektedir.

6. SONUÇ

Çalışmamızda, ileri dereceli glial tümörlerde sayısal/yapısal kromozom anomalilerinin sitogenetik analizlerle belirlenmesi ve kanser-spesifik genlerin tümör hücrelerindeki durumunun FISH analizleri ile ortaya konması amaçlanmıştır.

Araştırma grubunu 27 glioblastome multiforme (GBM) ve 3 ependimom olmak üzere toplam 30 örnek oluşturmuştur. Kültüre edilen tümör örneklerinden hazırlanan preparatlarda GTG bantlama tekniği ile kromozom analizi ve LSI p53 (17p 13.1), LSI p16 (9p21)/CEP 9, LSI 1p36/1q25, LSI 19q13/19p13, LSI EGFR/CEP 7, LSI PTEN (10q23)/CEP 10, LSI TOP2A/HER2/CEP 17 problemleri kullanılarak FISH analizi gerçekleştirilmiştir.

Çalışma bulguları değerlendirildiğinde aşağıda maddeler halinde belirtilen sonuçlara ulaşılmıştır:

1- Çalışmada uygulanan sitogenetik ve FISH verileri intratümoral (tümör içi) heterojenitenin önemini ortaya koymuştur.

2- İleri dereceli tümörlerde bir olguda normal karyotip gözlenirken, diğer olgularda gerek sayısal gerek yapısal kromozom anomalilerinin bulunduğu kompleks karyotipler gözlenmiştir. İleri dereceli glial tümörlerde kromozom instabilitesi önemli bir bulgudur. Özellikle monozomi 9, 16, 17, 19, 22 ve kromozom 7 amplifikasyonu rastgele olmayan anomaliler olarak belirlenmiştir.

3- Kromozom 9p21 bölgesinde lokalize p16 gen delesyonu, 7p12 bölgesinde lokalize EGFR gen ile total kromozom 7 amplifikasyonu, HER2 ve TOP2A

genlerin amplifikasyonu FISH ile saptanmış ve olguların yarısından çoğunda gözlenmiş anomalilerdir.

TOP2A bu güne kadar GBM örneklerinde detaylı olarak değerlendirilmeyen bir aday onkogendir. Çalışmamızda TOP2A amplifikasyonunun GBM örneklerinde yüksek sıklıkla gözlenmesi, bu genin detaylı olarak incelenmesinin gerekliliğini ortaya koymuştur.

4- Konvansiyonel sitogenetik analiz başarı oranı %73,4 iken, FISH başarı oranı %100 olmuştur. İş, zaman ve emek kriterleri birlikte değerlendirildiğinde FISH analizinin, gerek uygulanabilirliği, gerekse hücrelerdeki çeşitliliği ve frekansları ortaya koymak açısından daha etkili olduğu görülmüştür. Ancak farklı anomalilerin belirlenmesi, dengeli/dengesiz yapısal anomalilerin ortaya konması için hala sitogenetik analizler değerliliğini sürdürmektedir.

5- Sitogenetik ve FISH analiz bulguları GBM tümör örneklerinde gen/kromozom delesyon sıklığının artış/amplifikasyon görülme sıklığına göre daha fazla olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak glial tümörlerde sitogenetik ve moleküler sitogenetik analizlerin gerçekleştirildiği bu çalışmada GBM olgularındaki genetik markerların belirlenmesinde özellikle FISH yönteminin etkin ve duyarlı bir yaklaşım olduğu düşüncesindeyiz. Özellikle tümör heterojenitesinin belirlenmesi, anomalili hücre frekansının saptanmasında FISH yönteminin diğer moleküler sitogenetik yöntemlere göre üstünlük sağladığı düşüncesindeyiz. Çalışmamızda saptanan genetik markerların prognozdaki etkileri değerlendirilememiştir. Ancak çalışmanın ilerleyen aşamalarında bulgularımızın bu açıdan değerlendirilmesi hedeflenmektedir. Glial tümörlerde gerek histopatolojik verilere destek verebilecek genetik markerların ortaya konması

klinisyenlerin tedavi protokollerinin belirlenmesinde klinisyenlere büyük faydalar sağlayacaktır. Bu nedenle geniş araştırma populasyonlarının incelenmesi ve en kısa süre içerisinde tanı amaçlı analizlerin uygulanmasının uygun olacağına inanıyoruz.

KAYNAKLAR

- 1- Amalfitano, G., Chatel, M., Paquis, P., Michiels, J.-F., 2000, Fluorescence in situ hybridization study of aneuploidy of chromosomes 7, 10, X, and Y in primary and secondary Glioblastomas. *Cancer Genet Cytogenet* 116: 6–9
- 2- Arslantas, A., Artan, S., Oner, U., 2004, The importance of genomic copy number changes in the prognosis of Glioblastoma Multiforme, *Neurosurg Rev*, 27: 58-64.,
- 3- Artan, S., FISH tekniğinde kullanılan problr ve özellikleri, 1996 Teorik ve Pratik Floresan İn Situ Hibridizasyon, Ed. Başaran, N., GENTAM, Eskişehir, s:14–25,
- 4- Artan, S., 1996, Rutin FISH uygulamaları, Teorik ve pratik Floresan İn Situ Hibridizasyon, Ed. Başaran, N, GENTAM, Eskişehir, 51–59 s.
- 5- Balesaria, S., Brocj, C., Bower, M. ve ark., 1999, Loss of chromosome 10 is in independent prognosis factor in-high grade Gliomas, *Br J Cancer*, 81, 1371–7
- 6- Başaran, N., 1999, Tıbbi genetik, 7. Baskı, Güneş ve Nobel Tip Kitabevi, Bursa
- 7- Batra, S. K., Rasheed, B. K. A., Bigner, S. H., Bigner, D. D., 1994, Biology of disease, Oncogenes and anti-oncogenes in human Central Nervous Systems, 621 – 637 p.
- 8- Bayani, J., Pandita, A., M.D.V., Squire, J. A., 2005, Molecular cytogenetic analysis in the study of brain tumors, finding and applications, *Neurosurg Focus* 19 (5): E1

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- 9- Biernat, W., Tohma, Y., Yonekawa, Y., Kleihues, P., Ohgaki, H., 1997, Alteration of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas, *Acta Neuropathol*, 94, 303–309
- 10- Brat, D.J., Seiferheld, W. F., Perry, A., Hammond, E. H., Murray, K. J., Schulsinder, A. R., Mehta, M. D., Curran, W. J., 2004, Analysis Of 1p, 19q, 9p And 10q as prognostic markers for high-grade astrocytomas using fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays from radiation therapy oncology group trials, *Neurooncology*, Volume 6, Issue 2
- 11- Boudreau, C. R., Yangi, Liau L. M., 2005, Gliomas advances in molecular analysis and characterization, *Surgical Neurology*, 64, 286–294
- 12- Cairncross, J.G., Ueki, K., Zlatescu, M.C., Lisle, D.K., Finkelstein, D.M., Hammond, R.R., Silver, J.S., Stark, P.C., Macdonald, D.R., İnto, Y., Ramsay, D.A., Louis D.M., 1998, Specific genetic predictors Of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic Oligodendrogliomas, *J. Natl. Cancer Inst*, 90, 1473–1479,
- 13- Cianciulli, A. M., Morace, E., Coletta, A. M., Occhipinti, E., Gandolfo, G. M., Leonardo, G., Carapella, C. M., 2000, Investigation of genetic alterations associated with development and adverse outcome in patients with astrocytic tumor, *Journal of*

Neuro-Oncology, 48: 95 -101

- 14- Cohen, N., Betts, D. R., Tavori, U., Toren, A., Ram, T., Constantini, S., Grotzer, M. A., Amariglio, N., Rechavi, G., Trakhtenbrot, L., 2004, Karyotypic evolution pathways in medulloblastoma / primitive neuroectodermal tumor determined with a combination of spectral karyotyping, G-banding, and fluorescence in situ hybridization, *Cancer Genetics and Cytogenetics*,149: 44–52
- 15- Collins, V. P., 2004, Brain tumors, Classification and genes, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 75 (Suppl II), ii2-ii1 1. doi: 10,1136/ jnnp.2004. 040337
- 16- Collins, V. P., 1999, Progression as exemplified by human astrocytic tumors, *Cancer Biology*, Vol 9, 267–276 p.
- 17- Debiec-Rychter, M., Biernat, W., Zakrzewski, K., Krul, W., Liberski, PP., 2003, Loss of chromosome 22 and proliferative potential in Ependymomas, *Folia Neuropathol*, 41 (4), 191–5
- 18- Dehais, C., Laigle-Donadey, F., Marie, Y., Kujas, M., Lejeune, J., Benouaich-Amiel, A., Pedretti, M., Polivka, M., Xuan, K. H., Thillet, J., Delattre, J. Y., Sanson, M., 2006, Prognostic stratification of patients with anaplastic gliomas according to genetic

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

profile, American Cancer Society

- 19- Fetell, M.R., Rowland L.P. (ed), Merrit's textbook of neurology ninth Edition, 336–351 p.
- 20- Fuller, C. E., Perry, A., 2005, Molecular Diagnostics in Central Nervous System Tumors, Adv Anat Pathol, 12:180-194
- 21- Gentam Bülteni, 1993, Kromozom düzensizliği olan anne-babalarda çocukların Durumu, 3, 27–34
- 22- Giles, G.G., Gonzales, M.F., Kaye, H.A., Laws, E.R. (ED)., 2001, Brain Tumors, 2nd edn, Churchill Livingstone, 51–70 p.
- 23- Gonzales, M., Dale, S., Susman, M., Mills, J., 2006, Qantitaion of chromosome 1p and 19q deletions in glial tumors by interphase, fíSH on formalin-fixed parafin-embedded tissue, Journal of Clinical Neuroscience 13, 96-101 p.
- 24- Haynik D.M., Roma, A.A., Prayson, R.A., 2007 Mar, HER-2/Neu expression in glioblastome multiforme, Appl İmmunohistochem Mol Morphol, 15 (1), 56–8
- 25- Hirose, Y.,Yoshida, K., June 2006, Chromosomal abnormalities subdivide neuroepithelial tumors into clinically relevant groups, Keio J Med 55 (2), 52–58

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- 26- İno, Y., Zlatescu, M.C., Sasaki, H., Macdonald, D.R., Stemmer-Rachamimov, A.O., Jhung, S., Ramsay, D.A., Von Deimlig, A., Louis, D.N., Cairncross J. G., 2002, Long survival and therapeutic responses in patients with histologically disparate highgrade gliomas demonstrating chromosome 1p loss, *J. Neurosurg*, 92, 983–990
- 27- Kaye, A. H., Laws, E. R. JR., 2001, *Brain Tumors*, second edition, London
- 28- Kelley, T. W., Tubbs, R. R., Do, Prayson, R. A., 2005, *Diagn Mol Pathol*, Volume 14, Number 1
- 29- Krupp, W., Geiger, K., Schober, R., Siegert, G., Froser, U.G., 2004, Cytogenetic and molecular cytogenetic analysis in diffuse astrocytomas, *Cancer Genetics and Cytogenetics* 153, 32–38 p.
- 30- Koka, Vijay., Potti, Anil., Forseen, E. Scott., Pervez, Hassan., Fraiman, N. Genise., Koch, Michael., Lewitt, R., 2003, Role of Her2/neu overexpression and clinical determinants of early mortality in Glioblastoma multiforme, *Am j Clin Oncol*, 26 (4), 332–5
- 31- Korshunov, A., Sycheva, R., Golanov, A., 2004, Molecular Stratification of Diagnostically Challenging High-Grade Gliomas Compased of Small Cells: The utility of Fluorescence İn Situ Hybridization, *Clinical Cancer Research*, Vol 10,

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

7820-7826 p.

- 32- Kumar, V., Cotran, R. S., Robbins, S.L., 2003, Robbins temel patoloji, 7'inci baskı, Nobel Tip Kitabevi, İstanbul
- 33- Kunwar Sandeep., Mohapatra, Gayatry., Bollen, Andrew., Lamborn, R. Kathleen., Prados, Michael., Feuerstein, G. Burt., 2001, Genetic subgroups of anaplastic astrocytomas correlate with patient age and survival, Cancer Research 61, 7683–7688
- 34- Law, M. E., Templeton, K. L., Kitange, G., Smith, J., Misra, A., Feuerstein, B. G., Jenkins, R. B., 2005, Molecular cytogenetics analysis of chromosomes 1 and 19 in glioma cell lines, Cancer Genetics and Cytogenetics, 1–14
- 35- Mahler-Araujo, M. B., Sanoudou, D., Tingby, O., Liu, Coleman, N., Ichimura, K., Peter, V., 2003, Structural Genomic Abnormalities of Chromosomes 9 and 18 in Myxopapillary Ependymomas, Journal of Neuropathology and Experimental Neurology: Vol 62, No 9, p 927–935
- 36- Mao, X., Hamoudi, A. R., 2000, Molecular and cytogenetics analysis of glioblastome multiforme, Cancer. genetics and Cytogenetics 122, 87–9
- 37- Mendrzyk, F., Korshunov, A., Benner, A., Toedt, G., Pfisher, S., Radlwimmer, B.,

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Lichter, P., 2006, Identification of gains 1q and epidermal growth factor receptor overexpression as independent prognosis markers in intracranial ependymoma, Clin Cancer, 12 (7)
- 38- Mulholland, P. J., Fiegler, H., Mazzanti, C., Gorman, P., Sasieni, P., Adams, J., Jones, T.A., Babbage, J.W., Watchevo, R., Ichimura, K., East, P., Poulikas, C., Collins, V.P., Carter, N.P., Tamlinson, I.P.M., Sheer, D., 2006, Genomic profiling identifies discrete deletions associated with translocations in glioblastoma multiforme, cell cycle 5, 7, 783–791
- 39- Nishizaki, T., Harada, K., Kuboto, H., Harada, K., Furuya, T., Suuki, M., Sasaki, K., 2002, Chromosome instability in malignant astrocytic tumors detected by fluorescence in situ hybridization, Journal of Neuro-Oncology, 56, 159–165
- 40- Nishizaki, T., Ozaki, S., Harada, K., Ito, H., Arai, H., Beppu, T., Sasaki, K., 1998, Investigation of genetic alterations associated with the grade of astrocytic tumor by comparative genomic hybridization, Genes, Chromosomes & Cancer 21, 340–346
- 41- Nussbaum, R. L., McInnes, R. R., Willard, H. F., 2005, Thompson & Thompson Tibbi Genetik, Güneş Kitabevi
- 42- Parkin, D., Whelan, S., Ferlay, J., Cancer incidence in five continents, Lyon.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

International Agency for Research on Cancer (IARC), Vol 7, IARC Scientific

Publication No 143

- 43- Rasheed, A., Herndon, J. E., Stenzel, T. T, Roetz, J. G. M., Kendelhardt, J.,
Friedman, H. S., Friedman, A. H., Bigner, D. D., Bigner, S. H., MC Lendon, R. E.,
2002, Molecular markers of prognosis in astrocytic tumors, Cancer, Volume 94,
Number 10
- 44- Rey, J. A., Bella, M. J. ,De Campos, J. M., Kusak, M. E., Ramas, C., Beniyez, J.,
1987, Chromosomal patterns in human malignant astrocytomas, Cancer Genet
Cytogenet, D 29 (2): 201- 21
- 45- Rickert, C. H., Prognosis-related molecular markers in pediatric central nervous system
tumors., Journal of Neuropathology and Experimental Neurology. 63, 12, 1211–1224
- 46- Rieder, H.,: FISH Protokoll, 2003, AG Tumorgenetik, Institut für klinische genetik,
klinikum der philipps-universitat, Marburg, Almanya
- 47- Ruano, Y., Mollejo, M., Ribalta, T., Concepcion, F., Camacho, F. Í., Gomez, E.,
Rodriguez De Lope, A., Hernandez-Moneo, J. L., Martinez P. and Melendez, B.,
2006, Identification of novel candidate target genes in amplicons of glioblastoma

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

multiformetumors detected by expressionand CGH microarray profiling, *Molecular Cancer*, 5, 39

48- Salvati, M., Frati, A., Russo, N., Caroli, E., Polli, M. F., Minniti, G., Delfini, R., 2003,

Radiation induced gliomas: Report of 10 cases and review of the literature, Elsevier

49- Sanson, M., Laigle-Donadey, F., Benouarich-Amiel, A., 2006, *Molecular Changes in*

Brain Tumors: Prognostic and Therapeutic Impact, *Current Opinion in Oncology*, 18,

623-630 p.

50- Sehgal, A., 1998, *Molecular changes during the genesis of human gliomas*, *Seminars in*

Surgial Oncology, 14: 3–12

51- Smith, J. S. ,Perry, A., Borell, T. J., Lee, H. K., O’Fallon, J. ,Hosek, S. N., Kimmel,

D.,Yates, A., Burger, P. C., Scheithauer, B.W., Jenkins R. B., 2002, *Alterations of*

chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas,

astrocytomas and mixed oligoastrocytomas, *J. Clin. Oncol*, 18, 636 – 645

52- Smith, J. S., Tachibana, İ., Passe, S. M., Huntley, B. K., Barell, T. J., İturria, N.,

O’Fallon, J. R., Schaefer, P. L., Scheithauer, B. W., James, C. D., Buckner, J. C.,

Jenkins, R. B., *PTEN mutation, EGFR amplification and outcome in patients with*

anaplastic astrocytomas and glioblastome multiforme

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- 53- Squire, J. A., Arab, S., Marrano, P., Karaskova, J., Taylor, M., Becker, L., Rutka, J., Zielenska, M., 2001, Molecular cytogenetic analysis of glial tumors using spektral karyotyping and comparative genomic hybridization, *Molecular Diagnosis*, vol. 6,no2
- 54- Tamiolakis, D., Papadopoulo, N., Venizelos, I., Lambropoulou, M., Nikolaidou, S., Bolioti, S., Kiziridou, A., Manavis, J., Alexiadis, G., Simopoulos, C., 2006, Loss of chromosome 1 in myxopapillary ependymoma suggests a region out of chromosome 22 as critical for tumour biology, a FISH of four cases on touch imprint smears, *Cytopathology*, 17 (4),199–204
- 55- Tugcu, B., Malign astrositer tümörlü hastalarda yaşam süresini etkileyen faktörler ve KI-67 (MİBİ) proliferasyon indeksinin prognoz üzerine etkisi, Uzmanlık Tezi 2004, Bakirköy Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul
- 56- Türk Nöroşirürji Derneği (TND), Haziran 2004, Nöro-Onkoloji Grubu, Bülten 3
- 57- Ueki, K., Nishikawa, R., Nakazato, Y., Hirose, T., Hirato, J., Funada, N., Ujimaki, T., Hojo, S., Kubo, O., Ide, T., Usui, M., Ochiai, C., İto, S., Takahashi, H., Mukasa, A., Asai, A., Kirino, T., 2002, Correlation of histology and molecular genetic analysis of 1p, 19q, 10q, TP53, EGFR, CDK4 and 91 astrocytic and oligodendroglial tumors, *Clinical Cancer Research*, Vol 8, 196–201

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- 58- Urban, N.,2002, Genetic Markers in Glioblastoma: Prognostic ,Significance and Future Therapeutic İmplications, J Neuropathol Exp Neurol, 61, 321-328
- 59-Ushio, T., Tada, K., Shiroishi, S. ve ark., 2003, Correlation of molecular genetic analysis of p53, MDM2, p126, PTEN and EGFR and survival of patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma, Front Biosci, 8: 281–8
- 60- Wiltshire, N. Rodney., Herndon II, E. James., Lloyd, Annie., Friedman, S. Henry., Bigner, D. Darell., Bigner, H. Sandra., Mclendon, E. Roger., 2004, Comparative genomic hybridization analysis of astrocytomas, Journal of Molecular Diagnostics, vol 6, no
- 61- Vagner-Capodano, A. M., Zattara-Cannoni, H., Gambrelli, D., Figarella-Branger, D., Lena, G., Dufour, H., Grisoli, F., Choux, M. 1999, Cytogenetic study of ependymomas, Cancer Genet Cytogenet, 115: 96-99
- 62- Villman, Kenneth., Sjöstrom, Johanna., Heikkilä, R., Hultborn, Ragnar., Malmstrom, Per., Bengtsson, Nils-Olof., Soderberg, Martin., Saksela, Eero., Blomqvist, Carl., 2006, TOP2A and HER2 gene amplification as predictors of response to anthracycline Treatment in breast cancer, Acta Oncologica, 45: 590–596
- 63-Yoshida, Kazunari., Hirose, Yuichi., 2006, Chromosomal Abnormalities subdivide

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

neuroepithelial tumors into clinically relevant groups, Keio J. Med 55 (2): 52–58

- 64- Zheng, P., Chung, J., Pang, S., Bik, A., Hui, Y., Keung, H., Comparative genomic hybridization detects losses of chromosomes 22 and 16 as the most common recurrent genetic alterations in primary ependymomas
- 65- <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/tumors/astrocyt/D5007.html>
- 66- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Adapazarı'nda doğan Zühre KARAKAŞ ilköğrenimini Atatürk İlkokulunda, ortaokulu Dr. Nuri Bayar ortaokulunda ve lise öğrenimini Ali Dilmen Lisesinde tamamladı. 2002 yılında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimleri bölümünden mezun oldu. 2003 yılında Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilimdalı'nda lisansüstü eğitimine başladı.