

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

**GLİAL TÜMÖRLÜ DOKULARIN FISH YÖNTEMİ İLE
AMPLİFİKASYON VE DELESYON PATERNLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ceylan KARAKURT

**DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. MUHSİN ÖZDEMİR**

KASIM, 2011

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

**GLİAL TÜMÖRLÜ DOKULARIN FISH YÖNTEMİ İLE
AMPLİFİKASYON VE DELESYON PATERNLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ceylan KARAKURT

**DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. MUHSİN ÖZDEMİR**

KASIM, 2011

ÖZET

Gliomalar beyin dokusundan kaynaklanan tümörler arasında en sık gözlenen olup histopatolojik olarak çeşitli alt grupları ve malignite dereceleri vardır. Dünya Sağlık Örgütü Sınıflamasına göre Glioblastoma Multiforme (GBM) (evre IV), gliomalar arasında en malign olanı ve en sık görülenidir. Tümörü oluşturan genetik mekanizmalar henüz açıklığa kavuşturulamamıştır.

Son yıllarda beyin tümörü dokusunun fenotipik özelliklerinin yanı sıra genetik özelliklerinin de önemli olacağı düşünülmekte ve bununla ilgili birçok moleküler sitogenetik (FISH) ve moleküler analizler (Array CGH, Southern blot vb.) kullanılarak yeni araştırmalar yapılmaktadır.

Bu çalışmada Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim Dalı'na başvuran ve Patoloji Anabilim Dalı tarafından histopatolojik olarak incelenerek "Glioblastoma Multiforme" tanısı alan 40 olgu çalışılmıştır. Bu çalışmada alınan doku örneklerinde moleküler sitogenetik (FISH) analiz yöntemi kullanılarak, son yıllarda GBM hastalarında prognozun belirlenmesinde etkisi olduğu düşünülen ve üzerinde çalışılan genlerden *MDM2* ve *CDK4* genleri için amplifikasyon ve *RBI* geni için delesyon paternlerinin saptanması amaçlanmıştır.

Çalışmaya dahil edilen toplam 40 GBM'li olgunun 26'sı(%65) erkek, 14'ü(%35) kadın, olguların yaş ortalaması $55,45 \pm 2,25$, sağ kalım süresi ortalaması $11,17 \pm 1,07$ olarak tespit edilmiştir.

Bu çalışmada incelenen primer GBM'li olgular; %62,5'inde (25/40) *MDM2* gen bölgesinde amplifikasyon, %60'ında (24/40) *CDK4* gen bölgesinde amplifikasyon ve %47,5 (19/40) *RBI* gen bölgesinde delesyon saptanmıştır.

Türkiye'de Glioblastoma Multiforme'li olgularla yapılan bir çalışmaya rastlanılmamış olup *CDK4* ve *RBI* gen bölgeleri için Array CGH ve Southern blot yöntemleri kullanılmıştır. Bizim çalışmamız, GBM'li olgularda FISH yöntemi uygulanarak *MDM2*, *CDK4* ve *RBI* genlerinin incelendiği ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Beyin tümörü, GBM, FISH

SUMMARY

Cause of brain tissue Glioblastoma Multiforme (GBM) the most observe tumour between all tumours and being histopatologic it has different under groups and malignite degree. Acording to World Health Organization Glioblastoma Multiforme is the most observe and the most being malign between GBM's and not yet the genetic mechanizms which creat the tumour can be explain.

In the last years it is considered not only phenotypic characteristics of brain tumours tissue but also genetic characteristics will be important in this subject, new researches are being done with using lots of molecular cytogenetic (FISH) and molecular analiysis. In our study we examined 40 patients that applied Neurosurgery Department in Eskisehir Osmangazi University Faculty of Medicine and histopathologically diagnosed as "Glioblastoma Multiforme" by the Pathology department. In this study we aim to determine amplification of *MDM2*, *CDK4* and *RBI* gene deletion patterns which are supposed to be markers for the prognosis in patients with GBM in recent years via molecular cytogenetic methods (FISH).

Total of 40 patients with GBM occured from 26 male (65%), 14 female (35%), the age average of the patients $55,45 \pm 2,25$ and the survival period average is determined to be as $11,17 \pm 1,07$.

In our study the cases including primer GBM; in 62,5% (25/40) amplification in *MDM2* gene region, in 60% (24/40) amplification in *CDK4* gene region and 47,5% (19/40) deletion in *RBI* gene region.

There is a study in Turkey that done with Glioblastoma Multiforme patients by Arrey CGH and Southern bloting for detecting *CDK4* and *RBI* genes. Therefore, this present study can be seen as the first study which examines the *MDM2*, *CDK4* and *RBI* genes together with using FISH methods in the cases of GBM.

Keywords: Brain tumour, GBM, FISH

İÇİNDEKİLER

ÖZET	V
SUMMARY	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser	3
2.1.1. Kansere Neden Olan Etkenler.....	3
2.1.2. Kanser Biyolojisi	4
2.1.3. Kanserin Genetik Yapısı	5
2.1.4.Kanser Oluşumundan Sorumlu Genler ve Fonksiyonları	6
2.2. Tümör	8
2.2.1. Tümör Hücrelerinin Özellikleri.....	8
2.3. Beyin Tümörlerinin Sınıflandırılması	9
2.3.1. Beyin Tümörlerinin Evrelendirilmesi.....	11
2.3.2. Who Evreleme Sistemi	11
2.4. Glioblastoma Multiforme (GBM) ve Anaplastik Astrositoma (AA)(Who Evre III ve IV).....	13
2.4.1. Epidemiyoloji:.....	13

2.4.2. Primer ve Sekonder Glioblastoma Multiforme.....	14
2.5. <i>TP53/MDM2/P21</i> Yolağı.....	15
2.6. <i>P16INK4A/CDK4/RBI</i> Yolağı.....	17
2.7. Türkiyede Yüksek Dereceli Gliomlar	21
2.8. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH).....	22
2.8.1. FISH Tekniğinde Kullanılan Problar ve zellikleri.....	23
2.8.2. FISH Tekniğinin Temel Mekanizması.....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	26
3.1. Gereç.....	26
3.1.1. Kullanılan Gereçler.....	26
3.1.2. Cam Malzeme.....	27
3.1.3. Kimyasal Maddeler.....	27
3.1.4. Kullanılan Problar	28
3.1.5. Kullanılan Stok Solüsyonlar.....	29
3.2. Yöntem	31
3.2.1. Materyal Alımı.....	31
3.2.2. Moleküler Sitogenetik Analiz.....	31
3.2.2.1. Direkt Doku Preparasyonu.....	32
3.2.2.2. FISH Tekniğinin Uygulanması	33
3.2.2.2.1. Preparatların n Yıkaması ve Denatürasyonu.....	33
3.2.2.2.2. Prob Denatürasyonu.....	33
3.2.2.2.3. Hibridizasyon.....	34
3.2.2.2.4. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar	34
3.2.2.2.5. Hibridize Olan Bölgelerin Görüntülenmesi	34

3.2.2.2.6. Preparatların Mikroskopta İncelenmesi	35
3.2.2.2.7. Değerlendirme	35
3.3. İstatistiksel Analiz	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. Gliomalı Olgularda FISH Analizleri	37
4.2. Yöntem ve Değerlendirmeye İlişkin Bulgular.....	38
4.2.1. Olguların Fısh Analiz Bulguları.....	40
4.2.1.1. <i>MDM2</i> Gen Bölgesine Ait Anomaliler	43
4.2.1.2. <i>CDK4</i> Gen Bölgesine Ait Anomaliler	43
4.2.1.3. <i>RB1</i> Gen Bölgesi Ait Anomaliler	44
4.2.1.4. <i>MDM2/CDK4</i> Gen Bölgelerine Ait Anomaliler	45
4.2.1.5. <i>MDM2/CDK4/RB1</i> Gen Bölgelerine Ait Anomaliler.....	45
4.3. Çalışmanın İstatistiksel Bulguları.....	46
5.TARTIŞMA.....	51
5.1.FISH Yöntemi ile Saptanan Anomalilerle Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması.....	51
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	56
7.KAYNAKLAR DİZİNİ.....	58

ÖZGEÇMİŞ

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.Fizyolojik şartlarda p53 proteininin <i>MDM2</i> geni tarafından etkisizleştirilmesi	16
Şekil 2.2.Primer GBM patogenezinde önemli rol oynayan <i>TP53/MDM2/p21</i> yolağı.....	17
Şekil 2.3.Hücre döngüsünde yer alan genler ve Primer ve Sekonder GBM patogenezinde önemli rol oynayan <i>P16/P15/CDK4/CDK6/RBI</i> yolağı	19
Şekil 2.4.Primer ve sekonder glioblastoma yolundaki genetik değişiklikler	20
Şekil 2.5.Türkiye’deki yüksek dereceli gliomların illere göre görülme sıklığı.....	21
Şekil 4.1. <i>MDM2</i> geni normal hücre yapısına sahip olgu 6’ya ait FISH görüntüsü.....	47
Şekil 4.2. <i>MDM2</i> geni amplifikasyonuna sahip olgu 7’ye ait FISH görüntüsü.....	47
Şekil 4.3. <i>MDM2</i> geni tetrazomisine sahip olgu 38’e ait FISH görüntüsü.....	48
Şekil 4.4. <i>CDK4</i> geni normal hücre yapısına sahip olgu 34’e ait FISH görüntüsü.....	49
Şekil 4.5. <i>CDK4</i> geni amplifikasyonuna sahip olgu 11’e ait FISH görüntüsü.....	49
Şekil 4.6. <i>RBI</i> geni normal hücre yapısına sahip olgu 13’e ait FISH görüntüsü.....	50
Şekil 4.7. <i>RBI</i> geni delesyonuna sahip olgu 10’a ait FISH görüntüsü.....	50

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. WHO merkezi sinir sistemi tümörlerinin sınıflandırması, 2007	10
Tablo3. 1. Carnoy's fiksatif solüsyonu.....	29
Tablo 3. 2. Preparatların ön yıkama solüsyonları.....	29
Tablo 3. 3. Preparatların denatürasyon solüsyonu.....	29
Tablo 3. 4. Hibridizasyon sonrası solüsyonlar.....	30
Tablo 3. 5. Görüntüleme sistemleri solüsyonu.....	31
Tablo 4. 1. GBM'li olguların durum/cinsiyet/yaş/sağ kalım süresi/evre bilgileri	38
Tablo 4. 2. GBM'li olgularda FISH analizi sonuçları.....	41
Tablo 4.3. <i>MDM2</i> gen bölgesine ait anomaliler.....	43
Tablo 4.4. <i>CDK4</i> gen bölgesine ait anomaliler	44
Tablo 4.5. <i>RBI</i> gen bölgesine ait anomaliler	44
Tablo 4.6. <i>MDM2/CDK4/RBI</i> gen bölgelerine ait anomaliler	45
Tablo 4.7. <i>MDM2/CDK4</i> gen bölgelerine ait anomaliler.....	46
Tablo 5.1. <i>MDM2,CDK4</i> gen amplifikasyonu ve <i>RBI</i> geni delesyon sonuçlarının literatür verileri ile karşılaştırılması	55

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
GBM	Glioblastoma Multiforme
MDM2	Murine Double Minute 2
CDK4	Cyclin Dependent Kinase 4
RB1	Retinoblastoma
Who	World Healt Organization
SSS	Santral Sinir Sistemi
µl	Mikrolitre
AA	Anaplastic Astrostoma
A	Astrocytoma
PA	Pilocytic Astrostoma
N	Normal
amp	Amplifikasyon
Del	Delesyon
E3	Ubiquitin Ligase
DNA	Deoxyribonucleotic acid
g	Gram
Dapi	4', 6'-diamino-2-fenilindol
KH₂PO	Potasyum dihidrojen Fosfat
LOH	Loss of Heterosyosity
ml	Mililitre
NaCL	Sodium Chloride
NaOH	Sodium Hydroxid
Na₂HPO₄	Di-Sodium Hydrogen Phosphote
PBS	Phosphoten Buffer Saline
rpm	Round Per Minute
SSC	NaCL ₇ Trisodium Citrate

1.GİRİŞ VE AMAÇ

İnsan beynindeki neoplastik dönüşüm birçok genetik değişimler sonucunda meydana gelir. Bu genetik değişimler hücre proliferasyonunun regülasyonunda önemli rol oynayan proteinlerin ekspresyonunun değişmesinde önemli rolü olan kromozomların amplifikasyonu veya delesyonunu içerir.

Ortak bir glial hücre prokürsörü olan kök hücreden gelişen astrosit, oligodendroglia ve ependinom hücreleri glial hücreler terimi altında toplanmakta bu glial hücrelerin de malign transformasyonu sonucu glial tümörler gelişmektedir. Gliomlar primer beyin tümörlerinin yarısından fazlasını oluşturmaktadır (17). Glial beyin tümörleri her yaştaki bireyleri etkileyen ve sinir sisteminde en sık gözlenen beyin tümörü çeşididir.

Sağlık Bakanlığı Kansere Savaş Dairesi 2004-2006 verilerinde beyin tümörlerinin erkeklerde 8., kadınlarda görülen kanserler arasında ise 10. sırada yer aldığı bildirilmektedir (17,50).

Cerrahi, radyoterapi ve kemoterapiye rağmen ortalama 1 yıl yaşam süresi ile vücuttaki en kötü huylu tümörlerden birisidir. En uygun tedavi koşullarında bu süre iki yıla uzayabilmektedir (5,35,38).

Glioblastomlarda, gerek cerrahi, gerekse diğer tedavi yaklaşımlarıyla sonuçların memnun edici olmaması, bu tümörlerin onkogenezi üzerinde ayrıntılı çalışma ihtiyacı doğurmuştur (16,53). Beyin tümörlerinde özellikle malignant gliomalarda yapılacak olan çalışmalar, yüksek dereceli gliomaların alt sınıfları hakkında tanı ve tedavide bize yardımcı olacağı ve yeni terapi metotlarının gelişmesine olanak sağlayacağı düşünülmektedir (22,23). Son yıllarda beyin tümörlerinde moleküler sitogenetik (FISH)

ve moleküler analizler ile (Array CGH, Southern blot vb.) beyin tümör progresyonundaki genetik mekanizmaların belirlenebilmesi için yoğun çalışmalar sürdürülmektedir.

Beyin tümörlerinden elde edilen veriler, hastaya ve ilgili klinisyene, hastanın prognoz ve tedavisine yönelik yanıt ile ilgili bilgi oluşturacaktır.

Yukarıda belirtilen nedenlere bağlı olarak GBM'li olgulardan alınan tümör örneklerinde FISH yöntemiyle *MDM2*, *CDK4* ve *RBI* gen kopya sayısı değişikliklerinin, tümör hücrelerindeki durumunun ortaya konması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser hücrenin normal davranışlarını düzenleyen mekanizmalarının bozulması sonucu oluşan bir durumdur (34).

Kanser klinikte görülen en yaygın ve ciddi hastalıklardan biridir. Yapılan istatistiksel çalışmalar, kanserin toplumların yaklaşık üçte birinden fazla görüldüğünü, ölümlerin yüzde yirmiden fazlasından sorumlu olduğunu ve gelişmiş ülkelerin toplam sağlık harcamalarının yaklaşık yüzde onundan fazlasını kanser tedavileri harcamalarının oluşturduğunu göstermektedir. Kanser, tedavi edilmediğinde ölümlü sonuçlanmaktadır. Kanser araştırmalarında erken tanı ve tedavi son derece önemli olup, kansere yakalanma riski yüksek olan bireylerde kanser gelişmeden önce saptanabilmesi büyük önem taşımaktadır (13,25,34).

2.1.1. Kansere neden olan etkenler

Literatürde çok sayıda çevresel ajanlarla Santral Sinir Sistemi (SSS) tümörleri sıklığı arasında ilişki kuran yayınlar mevcuttur.

Karsinojen, kansere sebep olan etkenlere denir. Tümörlerin gelişimi çok aşamalı bir işlem olduğundan birçok değişik faktör kanserin ortaya çıkma olasılığını etkileyebilir. Kansere neden olan ajanları 3 geniş grupta inceleyebiliriz (20);

Bunlar radyasyon, kimyasal bileşikler ve virüslerdir. Çevresel faktörler içinde en iyi ortaya konulan faktör radyasyondur (20,56).

Radyasyon ve kimyasal bileşikler dışında bazı virusler de kanser nedeni olabilir. Virüslerin neden olduğu insan kanserlerinin başında, karaciğer ve serviks kanserleri gelir. Bu iki kanser dünyada görülen kanserlerin % 10-20'sini oluşturur (20,56).

2.1.2. Kanser biyolojisi

Kanser tek bir hastalık olmayıp, daha çok bir kitle ya da tümör oluşumuna yol açtığını bildiğimiz kontrolsüz hücre proliferasyonu ile karakterize olan neoplazinin daha kesin formlarını tanımlamak için kullanılır (34).

Neoplazi “normal dokuları aşan, onlarla koordine olmayan ve değişime yol açan uyarı durduktan sonra bile aynı şekilde aşırı büyümeye devam eden anormal bir doku kütle” şeklinde tanımlanmıştır. Neoplazi, hücresel proliferasyon ile hücresel yok oluş arasındaki dengesizlik nedeniyle oluşur (34). Prolifere olan hücreler, hücre döngüsüne girer ve mitozu uğurlar. Programlanmış hücre ölümü nedeniyle oluşan hücresel yok oluş ise, normal bir işlem olan DNA fragmanlarının bir dokudan uzaklaştırılmasıdır ve bu, apoptozis olarak adlandırılan hücresel ölüm şeklinde gerçekleşir (34).

Kanserler temelde üç gruba ayrılır:

1. Karsinomalar: Bronşlar, bağırsak mukozası veya meme duktusları gibi epitelyum hücrelerinden kaynaklanırlar ve insan kanserlerinin yaklaşık % 90'ını oluştururlar.

2. Sarkomalar: Kemik, kas ya da bağ doku gibi mezenşimal dokulardan kaynaklanırlar. İnsan kanserlerinin yaklaşık % 1'ini oluştururlar.

3. Hematopoetik: Kemik iliği ya da lenfatik sistemi tutan ve damarlar yoluyla yayılan lösemi ve lenfomalardır. İnsan kanserlerinin yaklaşık % 8-9'unu oluştururlar.

Bu tümörlerin her biri yerleşim yerine, doku tipine, histolojik yapısına ve malignansinin derecesine göre de sınıflandırılmaktadır (20,34).

2.1.3. Kanserin genetik yapısı

Kanser hücrenin temel düzenleyici mekanizmalarındaki kusurlardan kaynaklandığı için, özellikle hücresel ve moleküler düzeyde değerlendirilmesi gereken bir hastalıktır (34).

Kanser, basit bir ifadeyle kontrolsüz hücre çoğalması olarak tanımlanabilir. “Kontrolsüz çoğalma”, esas özellik olmakla birlikte, kanser hücresinin başka biyolojik karakteristikleri de vardır. Bunlar arasında hücre kültürlerinde kontakt inhibisyonundan kaçabilme, bölünebilmek için dış uyarılara gereksinim göstermeme, çoğalmayı baskılayıcı sinyallere duyarsızlık, apoptozisten kaçabilme, anjiyogenezi uyarabilme ve metastaz yapabilme sayılabilir. Böylelikle tümör vücudun diğer bölgelerine yayılarak normal doku ve organların işlevlerini etkiler (13, 20).

Hücre bölünmesi ve hücre ölümünü kontrol eden çok çeşitli genler bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan yoğun araştırmalar hücre proliferasyonu ve hücre ölümünü kontrol eden genlerin mutasyonlarının kanserden sorumlu olduğunu göstermiştir. Mutasyonların gen ifadesini değiştirmesi tüm kanserlerin ortak özelliği olarak kabul edilmektedir (3,57).

Bazen kalıtsal mutasyonlar kanser oluşumunda tek başına yetersiz kalır. Kanser oluşumunun tamamlanması ve homozigot genlerin oluşması için homolog lokuslara ilave somatik mutasyonlar gerekir. Hangi durumda olursa olsun kanser, hücre seviyesinde genetik bir bozukluk olarak kabul edilmektedir (3,13).

Birçok kanserde, mutasyonlar tek bir somatik hücrede oluşur ve daha sonra bölünerek kanser gelişimine yol açarlar. Neoplastik hücrelerin orijinal klonu, her biri

birbirinden farklı bir grup mutasyon taşıyan ancak birbirleri ile üst üste çakışan mutasyonlar şeklinde malignansinin çeşitli derecelerinin alt grupları içerisinde gelişebilir (9,34).

Kanserin başlangıcında farklı kanser türlerinde farklı genlerin varlığı bildirilmektedir. Bu grupta yer alan genler:

- Mitotik döngü düzenleyicilerini kodlayan genler
- Programlanmış hücre ölümü elemanlarını kodlayan genler
- Kontakt inhibisyon oluşumunda etkili olan elemanları kodlayan genler
- Hasarlı DNA'nın tamirinden sorumlu proteinleri kodlayan genler

Oluşum mekanizması ne olursa olsun, kanser oluşumu bir kez başladığında, sitogenetik yapının korunmasından ve DNA' da oluşabilecek hasarı tamirden sorumlu hücrel mekanizmaları kodlayan genlerdeki mutasyonlar kümülatif olarak bir artış göstererek kanseri yaygınlaştırırlar (9,34).

2.1.4.Kanser oluşumundan sorumlu genler ve fonksiyonları

Karsinogenezisin meydana gelmesinde sürekli değişime uğrayan 100'ün üzerinde gen tanımlanmıştır. Ancak keşfedilmeyi bekleyen daha pek çok sayıda gen olduğu ortadadır (2).

Hücrelerin poliferasyonunu, farklılaşmasını ve sağ kalımını denetleyen genlerde gerçekleşen değişimler kanserin oluşumuna neden olur (20,36). Kanser oluşumunda etkili olan genler;

1-Tümör süpresör genler

2- DNA tamir genleri

3-Onkogenlerdir (22,34,57)

Kanser hücrelerinin tipik kontrolsüz çoğalma isteği ve invaze olabilme yeteneği yukarıda gruplanan genlerde ve onların sahip oldukları mekanizmalarda ortaya çıkan bozulmalardan dolayıdır (58). Bu genler normal bir hücrenin programlanmış hücre ölümünün ve hücre döngüsünün kontrol yolunda bulunmaktadırlar. Karsinojenik mutasyonlar çoğunlukla kontrol yolunda bulunan genleri etkileyebilmektedir. Normal regülatör gen ürünleri, hücre sayısının artırılması ya da hücre sayısı artışının inhibe edilmesine göre gruplandırılır (2,53).

Tümör süpresör genler hücre çoğalmasını inhibe eder. Bu genlerin her iki allelinin de değişimi söz konusu olup, bu genlerdeki değişimler resesif özellik gösterir.

DNA tamir genleri, yanlış eşleşme tamiri, nükleotit eksizyon tamiri ve baz kesip çıkarma tamiri genlerini içerir. Bunlar dışında, kromozomal segregasyon ve mitotik rekombinasyon gibi büyük kromozom parçalarını ilgilendiren kontrol sürecinde de yer alır.

Onkogenler ise, hücre proliferasyonunun normal olarak aktivasyonunu yönetir. Bu genlerin tek bir allelindeki mutasyon hücre fenotipinin değişmesi için yeterli olup bu genlerdeki değişimler dominant özellik gösterir. Onkogenler mutasyon taşımayan normal hücrede ise protoonkogen adını alır (34,59).

2.2. Tümör

Tümör, kontrolsüz hücre bölünmesi sonucunda oluşan hücre kitlesine denir. Tümör benign ve malign olmak üzere ikiye ayrılır. Benign tümör terimi tümörün bulunduğu bölgede lokalize kalacağı, diğer bölgelere yayılmayacağı ve lokal cerrahi yöntemlerle alınıp hastanın sağ kalımını etkilemeyeceği düşünüldüğünde kullanılan bir terimdir, ancak benign tümörlerin lokalize şişliklerden daha fazla sorun yaratabilecekleri ve bazı durumlarda ciddi bir hastalığa yol açabileceklerine dikkat etmek gerekir. Malign tümör terimi ise komşu yapılara invaze olup, onları harap edebileceği ve uzak bölgelere metastaz yaparak ölüme yol açabileceğini anlatmak amacıyla kullanılır ve malign tümörlerin hepsine kanser denilmektedir (9,59).

2.2.1. Tümör hücresinin özellikleri

Somatik hücrelerde meydana gelen değişimler ile uyaranların birlikte etkileşimi sonucunda normal hücrenin tümör hücresi haline dönüşmesine neden olmaktadır. Bu değişimler, somatik hücrenin normal fonksiyonlarının bozulmasına ve farklı özellikler kazanmasına neden olur. Tümör hücresinin bu özellikleri genel olarak aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- 1- Tümör hücreleri kontrolsüz proliferasyon gösterirler.
- 2- Ekstrasellüler büyüme faktörlerine gereksinim azalmıştır. Proliferasyon için kendi büyüme faktörlerini kendileri üretirler.
- 3- Büyüme faktörlerinin aşırı şekilde üretilmesi, hücre bölünmesinin sürekli uyarılmasına neden olur ki bu 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.

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 yaşlanan hücreler apoptoza girerken kanser hücrelerinde apoptozis kaybı vardır. Bu nedenle tümör hücreleri normal hücrelere göre daha uzun yaşarlar (9,25,29).

2.3. Beyin Tümörlerinin Sınıflandırılması

Beyin tümörlerinin hücresel kökenlerinin farklılığı, tek ve yaygın kabul gören bir sınıflandırma sisteminin oluşturulmasını zorlaştırmaktadır. Günümüzde sınıflandırma patolojiye dayanmaktadır.

Beyin tümörlerinin sınıflandırmasının temelini Virchow atmıştır. 1864'da beyin hücrelerarası matriksi olarak nörogliaı tariflemiştir. Yine Virchow tarafından tümörlerin makroskopik ve mikroskopik özellikleri arasında bağlantı kurulmasını sağlamış ve "glioma" tanımını yapmıştır (1,21,57).

1993 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO: World Health Organisation) tümörlerin sınıflandırmasını yayınlamış ve evre I-IV arasında tümörler benign'den malign'e doğru sınıflanmıştır (21,56). Bu sınıflama histopatolojik özellikler kadar yaşam süresi verilerine de dayanmaktadır. Bugün için en sık kullanılan sistem ise 2007 yılında yeniden gözden geçirilerek düzenlemeler yapılan WHO sınıflamasıdır (Tablo 2.1) ve bu sınıflandırmaya göre merkezi sinir sistemi tümörleri primer ve sekonder (metastazlar) tümörler olarak ikiye ayrılmıştır (31);

Tablo 2.1. WHO merkezi sinir sistemi tümörlerinin sınıflandırması, 2007 (31)

1. Nöroepitelial doku tümörleri	Ganglioglioma
Astrositik Tümörler	Anaplastik gangliogliom
Pilositik astrositom	Santral nörositom
Pilomiksoid astrositom	Ekstraventricüler nörositom
Subependimal dev hücreli astrosito	Serebellar liponörositom
Pleomorfik ksantoastrositom	Papiller glionöronal tümör
Diffüz astrositom	Paragangliom
Fibriler astrositom	4. ventrikülün glionöral tümörü
Gemistositik astrositom	Pineal bölge tümörleri
Protoplasmik astrositom	Pineositoma
Anaplastik astrositom	Pineoblastoma
Glioblastoma	İntermediyer farklılık gösteren pineal tm
Dev hücreli glioblastom	Pineal bölge papiller tümörü
Gliosarkom	Embriyonal tümörler
Gliomatosis serebri	Medulloblastom
Oligodendroglial tümörler	Primitif nöroektodermal tümör
Oligodendroglioma	Atipik teratoid/rabdoid tümör
Anaplastik oligodendrogliom	2.Kranial ve paraspinal sinir tümörleri
Oligoastrositik tümörler	Scwannom
Oligoastrositom	Nörofibrom
Anaplastik oligoastrositom	Perinörom
Ependimal tümörler	Malign periferel sinir kılıfı tümörleri
Subependimoma	3.Meninkslerin tümörleri
Miksopapiller ependimom	Meningoepitelial hücre tümörleri
Ependimoma	Mezenkimal tümörler
Sellüler	Primer melanositik lezyonlar
Papiller	Histogenezi bilinmeyen tümörler
Clear cell	4.Lenfoma ve hematopoetik tümörler
Tanisitik	5.Germ hücreli tümörler
Anaplastik ependimom	Germinom
Koroid pleksus tümörleri	Embriyonal karsinom
Koroid pleksus papillomu	Yolk sak tümörü
Atipik koroid pleksus papillomu	Koryokarsinom
Koroid pleksus karsinomu	Teratom
Diğer nöroepitelial tümörler	Mikst germ hücre tümörleri
Astroblastom	6.Sellar bölge tümörleri
3.ventrikülün kordoid glioması	Kraniofarengiom
Angiosentrik glioma	Granüler hücreli tümör
Nörönl ve miks nörönl-gliyal tümörler	Pituisitoma
Serebellum displastik gangliositoması	Adenohipofiz onkositoması
Desmoplastik infantil astrositom	7.Metastatik tümörler
Gangliositom	

2.3.1. Beyin tümörlerinin evrelendirilmesi

Tıp bilimciler arasında iletişimin kolaylaştırılması ve tedavinin planlanması için tümörler evrelendirilmektedir. Bir tümörün evresi malignite derecesini göstermektedir. Tümörün evresi aşağıda belirtilen kriterlerin bazıları ya da tamamı kullanılarak mikroskopik görünümü ile belirlenir;

- Normal hücreler ile benzerlik (atipi)
- Büyüme hızı (mitotik indeks)
- Kontrolsüz büyümeyi gösteren bulgular
- Tümörün santral kesiminde ölü tümör hücreleri (nekroz)
- İnvazyon ve/veya yayılım potansiyeli
- Vaskülarite

2.3.2. WHO evreleme sistemi

- Evre 1
 - Yavaş büyüyen hücreler
 - Normale yakın mikroskopik görünüm
 - Düşük malignite
 - Survey genellikle uzun

- Evre 2

- Diğer evrelere oranla yavaş büyüyen hücreler

- Anormal mikroskopik bulgular

- Normal komşu dokuyu invaze edebilir

- Daha yüksek evreli olarak nüks edebilir

- Evre 3

- Aktif anormal hücre yapımı

- Belirgin anormal mikroskopik bulgular

- Normal komşu dokuda infiltrasyon

- Genellikle daha yüksek evreli olarak nüks etme eğilimi

- Evre 4

- Hızlı anormal hücre yapımı

- İleri derecede anormal mikroskopik bulgular

- Hızlı büyümeyi sürdürebilmek için neovaskülarizasyon

- Santral kesimde nekroz

2.4. Glioblastoma Multiforme (GBM) ve Anaplastik Astrositoma (AA)(WHO Evre III ve IV)

2.4.1. Epidemiyoloji:

Glioblastoma multiforme (GBM) erişkin yaş grubundaki en sık rastlanılan primer beyin tümörüdür. Primer beyin tümörlerinin dağılımları büyük oranda yaşla ilintilidir. Bunlar farklı histolojik tümör tipleri ve malign evreleri içerisinde barındırır ve hızlı progresyon gösterir (36,39,42,43).

Glioblastoma ve anaplastik astrositomaların insidansı 14 yaş altında 100.000'de 0.2-0.5 iken, 45 yaş üzerinde ise 100.000'de 4-5'e çıkmaktadır. En sık tuttuğu lokalizasyon frontal, en az tuttuğu lokalizasyon ise oksipital lob'dur. Korpus kallozum aracılığıyla kolaylıkla karşı hemisfere geçer (Kelebek tipi gliom). Glioblastoma multiforme tedavisinde son yıllarda gen tedavisi, antiangiogenez tedavi, lokal polimer ilaç uygulaması gibi farklı deneysel ve klinik çalışmalar yürütülmüş, çok ümit verici olmasa da bazı serilerde tüm hastaların bir yıllık, %30 kadarının da iki yıllık yaşam süresine ulaşabildiği bildirilmiştir (1, 57).

Aynı şekilde anaplastik astrositomaların yaş ile yerleşim alanları da değişkenlik göstermektedir. Anaplastik astrositomalar için ortalama yaş 46'dır. 25 yaş altında anaplastik astrositomaların %66'sı serebellum da iken, 25 yaş üzerinde ise %90 serebral yerleşim gösterirler. İnfiltratif oluşları ve histolojik özelliklerinden dolayı malign kabul edilirler. Anaplastik astrositomalar diğer astrositomalara göre daha hızlı büyüme eğilimindedirler, Tedavisinde cerrahi girişim ve postoperatif radyoterapi uygulanır. Yeterli süre izlenen olgularda, daha yüksek dereceye progrese oldukları görülebilir. Uygun tedavi ile yaşam süresi iki yıl için %40-50, 5 yıl içinse yaklaşık %18 olarak bulunmuştur.

GBM ve AA'nın tüm primer beyin tümörleri içindeki oranı değişik yayınlarda %20'den %50'e kadar değişmektedir. Erişkin yaş grubu primer beyin tümörlerinin yarısından fazlasını GBM oluşturur. ABD'de GBM için ortalama yaş 60 iken, AA veya diğer astrositomalarda ortalama yaş 50 olarak tespit edilmiştir. Yıllar içinde de GBM sıklığı artmıştır. Özellikle gelişmiş ülkelerde yapılan çalışmalarda ABD ve Kanada'da yetmişli yıllardan seksenli yılları ortalarına kadar tespit edilen glioblastom olguları yaklaşık 2 kat kadar artış göstermiştir. Bunun nedeninin ise teknolojik gelişmeler ile tespit edilme oranının artması olarak ortaya konmuştur. Yüksek evre glial tümörlerde buna benzer bir artış, son 7 yıl içinde %5'lik bir artış ile Fransa'da tespit edilmiştir. GBM ve AA erkeklerde kadınlara göre, beyaz ırk da siyah ırka göre bir miktar daha sıktır. GBM ve AA genellikle herhangi bir ailevi yatkınlık ya da tanımlanabilir bir çevresel etken olmaksızın sporadik olarak ortaya çıkarlar (1,21,45,55,57).

2.4.2. Primer ve Sekonder Glioblastoma Multiforme

GBM'ler iki ayrı yolla oluşur; Primer ve sekonder glioblastome (24,26,30,54).

İlk kez Scherer tarafından tanımlanan primer ve sekonder glioblastom kavramları, bugün için histopatolojik birer gözlem olmanın ötesinde, moleküler yolları tanımlanmaya başlanmış iki farklı antite olarak karşımıza çıkmaktadır.

Primer GBM'lerde *EGFR* amplifikasyonu, *PTEN* kaybı, kromozom 10 LOH, *MDM2* overekspresyonu, *P16* delesyonu gözlenirken sekonder GBM'lerde ise düşük dereceli gliomaların zaman içinde değişime uğraması ile oluşan *TP53* mutasyonu ve *PDGFRα* anormal aktivasyonu, growth faktör sinyalinin etkileyen değişiklikler, hücre döngüsünü deregüle eden değişiklikleri içerir, daha çok genç yaş grubunu etkiler (45 yaş ve altı) (18,19,39,46,54).

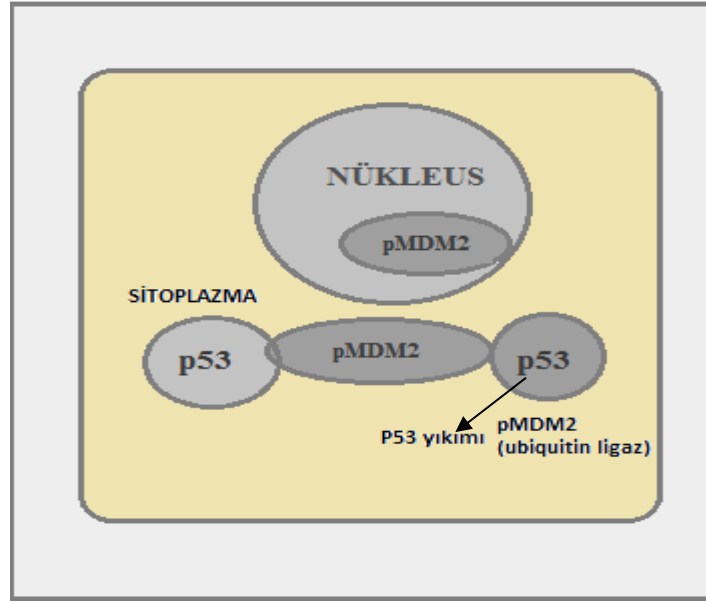
Primer glioblastomlar, yaşlılarda (ortalama 55 yaş), 3 ay gibi kısa bir klinik öyküyü takiben, klinik veya histopatolojik olarak bir lezyon varlığının gösterilemediği, *de novo* ortaya çıkan neoplazilerdir. Sekonder glioblastomlar ise, daha genç yaş grubunda (45 yaş altı), düşük dereceli astrositoma veya anaplastik astrositoma gibi öncül bir lezyonun malign progresyonu sonucunda gelişirler (17,26,47,54).

Glioblastomalarda en çok anormallik gözlenen yollar *TP53/MDM2/P21* ve *P16^{INK4a}/CDK4/RB1* yollarıdır.

2.5. *TP53/MDM2/P21* Yoluğu

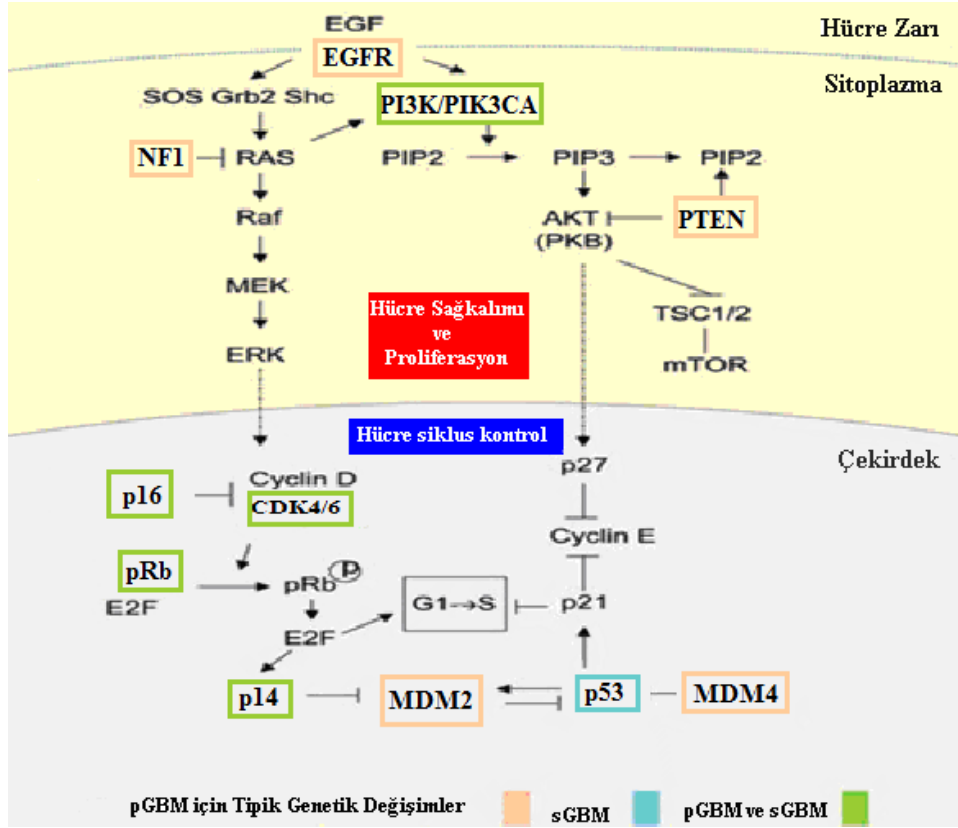
TP53 tümör baskılayıcı geni kısa ömürlü bir protein üretir ve normal hücrelerde genellikle düşük düzeyde tutulur (30). Hücre döngüsünü düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Genomda mutasyon olmasını önleyerek genom stabilitesini korur. *P53*, hücre içerisinde dörtlü bağ yapmış halde işlevseldir.

TP53 yoluğunun sekonder glioblastoma gelişiminde önemli rol oynadığı bilinmektedir (40). *MDM2* geni 12q13-14 kromozom bölgesinde lokalizedir. Buradan kodlanan *MDM2* proteini (pMDM2), p53'e bağlanarak pMDM2-P53 oluşumuna neden olmaktadır(Şekil 2.1). pMDM2-p53 kompleksi, *P53* ün transkripsiyonel indüksiyonuna engel olarak G₁ kontrol noktasında hücrenin S fazına geçmesine neden olacaktır. Öte yandan, wild-tip p53 düzeyi pMDM2 tarafından kontrol edilmektedir. Hücre içinde yer alan pMDM2, nükleusta bulunan p53'ün sitoplazmaya geçişini sağlar. Sitoplazmadaki "E3 ubiquitin ligase", p53'ün parçalanmasını sağlamaktadır. Bu da p53 ün fonksiyon görmemesi ile sonlanır (Şekil 2.2) (18,38,59).



Şekil 2. 1. Fizyolojik şartlarda p53 proteininin *MDM2* geni tarafından etkisizleştirilmesi (Adilay ve Durmaz'dan değiştirilerek alınmıştır) (1,17).

MDM2 proteini hem mutant hem de wild-tip p53'ü bağlayabilir ve wild-tip P53'ün, transkripsiyon aktivasyonunu inhibe eder (27,33). Ayrıca, *MDM2* geninin transkripsiyonu da wild-tip *TP53* ile indüklenir. Somatik hücrelerde, söz konusu otheregülatuar döngü, *TP53* protein aktivitesi ve *MDM2* ekspresyonunu düzenler ve p53 degradasyonunu sağlar. Sonuç olarak, *MDM2* amplifikasyonu veya overekspresyonu ile *TP53* tarafından düzenlenen hücre büyümesi kontrolünden kurtulmak mümkündür. *MDM2* geni amplifikasyonu, yüksek gliomalarda %10-15 oranında ve *TP53* mutasyonu içermeyen primer glioblastomların yaklaşık %10'unda görülmektedir. MDM2 proteininin overekspresyonu immünohistokimyasal olarak primer glioblastomların yaklaşık %50'sinde saptanmaktadır. Sekonder glioblastomların çok az bir kısmında *MDM2* overekspresyonu izlenmekle birlikte, *MDM2* overekspresyonu, tipik olarak *TP53* mutasyonu göstermeyen primer glioblastomların genetik karakteristiğidir (11,18,28,37,40,58).



Şekil 2.2. Primer GBM patogenezinde önemli rol oynayan *TP53/MDM2/p21* yolağı (Ohgaki'den değiştirilerek alınmıştır)(35).

2.6. $P16^{INK4a}/CDK4/RB1$ Yolağı

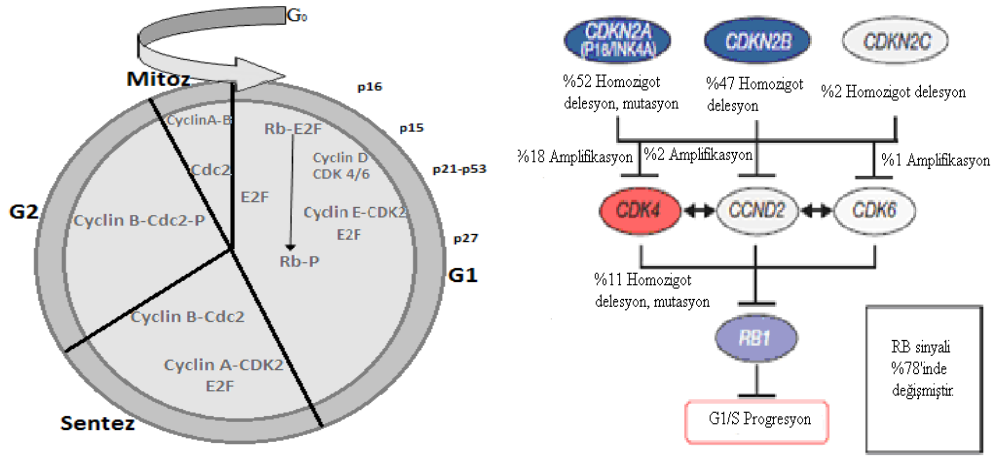
Retinoblastoma lokusunda meydana gelen delesyon ve mutasyonlar yalnızca anaplastik astrositomalar ve glioblastomalarda saptandığından, *RB1* geninin inaktivasyonu astrositoma progresyonunda rol oynayan patogenetik mekanizmalardan biri olarak kabul edilmektedir (51).

$P16^{INK4a}/CDK4/RB1$ yolağında görülebilecek bir anomali primer ve sekonder glioblastomalar için önemlidir (6,40). Anaplastik astrositomaların büyük bir kısmı ve glioblastomaların hemen hemen tamamında $p16/p15/CDK4/CDK6/RB1$ yolağındaki öğelerden herhangi birinde değişiklik izlenmektedir.

Düşük evreli astrositomadan anaplastik astrositoma geçişe sıklıkla kromozom 9p ve 13q allelik kaybı ve 12q amplifikasyonu gibi genetik olaylar eşlik etmektedir. Son yıllarda, söz konusu genetik değişikliklerin hücre döngüsü sisteminin parçaları olan genleri işaret ettiği bulunmuştur. Hücre döngüsünün ilerlemesi esnasında CDK aktivitesi en az 4 moleküler mekanizma ile düzenlenir. İlk basamak CDK'ların kendi siklinleri ile eşleşmesidir. İkinci basamak CDK/Cyclin kompleksinde CDK'nın 160. Pozisyonu civarında fosforile edilmesidir. CDK'ların fosforilasyon ile aktivasyonu 'CAK' (CD aktive edici kinaz) ile katalizlenir. Bu katalizörün esasında yine bir CDK kompleksi olan CDK/Cyclin-h kompleksidir. Ayrıca RNA polimeraz II ile yapılan transkripsiyonda ve DNA tamirinde de görev alır. Üçüncü basamak ise CDK proteinlerinin amino ucundaki threonin ve tirozin 15'in fosforilasyonu ile inhibe edilir ardından CDK25 fosfataz ile defosforile edildiğinde aktif hale gelir. Son basamak ise CDK/Cyclin kompleksine inhibitör proteinlerinin bağlanmasıyla gerçekleştirilir. Ayrıca inhibitörlerde bir CDK inhibitör ailesi oluşturur. *P16* CDK inhibitör proteinin CDK4-CDK6/Cyclin D kompleksine bağlanarak hücreyi özellikle G1 evresinde inhibe eder (Şekil 2.3) (4,14,15,23,52).

CDK4 33 kDa'luk CDK4 proteinini kodlayan gen olup kromozom 12q13-q14 bölgesinde lokalizedir. *CDK6* 38 kDa'luk CDK6 proteinini kodlayan geni kromozom 7q21-q22' de lokalizedir. Her iki protein de katalitik kinaz aktivitesine sahiptir.

Cyclin D ailesi üyeleri ile kompleks bir yapı oluştururlar. p15 ve p16 tarafından inhibe edilirler ve *CDK* overekspresyonu, p15/p16 mutasyonunun etkisini taklit eder. Yüksek dereceli gliomalann %15 ila 18'inde *CDK4* gen amplifikasyonu saptanmaktadır.



Şekil 2. 3. Hücre döngüsünde yer alan genler ve Primer ve sekonder GBM patogenezinde önemli rol oynayan *p16/p15/CDK4/CDK6/RB1* yolu (Durmaz ve The cancer genome atlas research 'den değiştirilerek alınmıştır)(17,56).

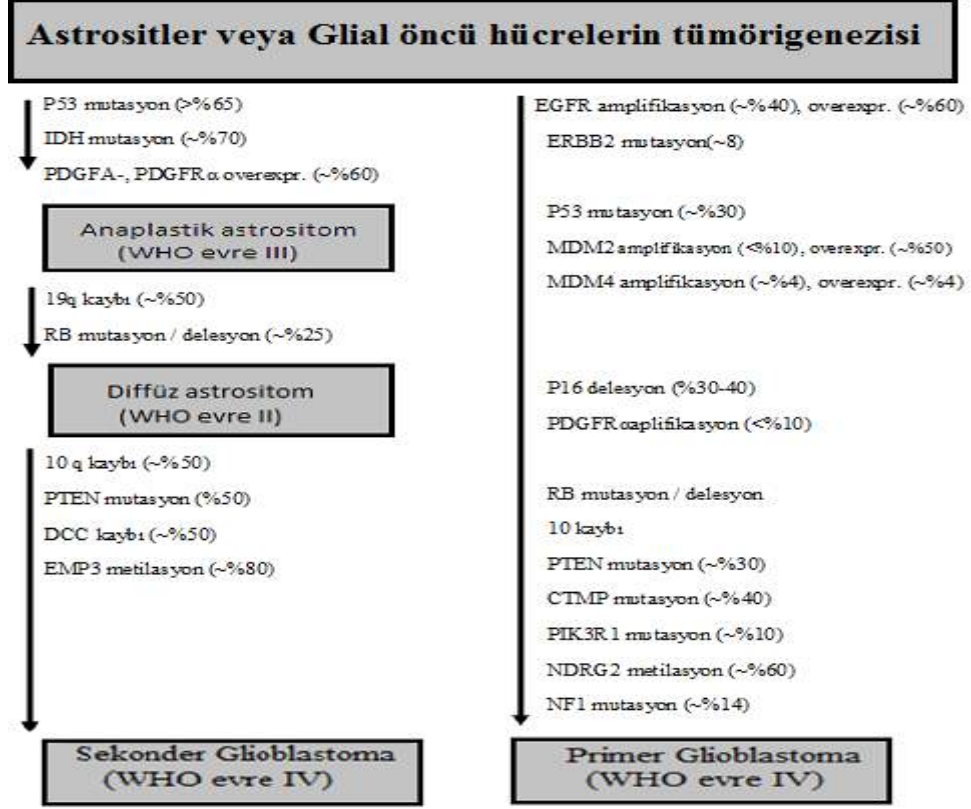
RB1/CDK4/CDK6-cyclin D kompleksinin oluşmasının esas amacı 107 kDa'luk retinoblastoma (Rb) proteininin fosforilasyonudur. Rb fosforilasyonu, E2F transkripsiyon faktorünün serbestleşmesine neden olur. E2F, hücre proliferasyonu için gerekli diğer genleri aktive eder.

Retinoblastoma geni kromozom 13q14'de yer alır ve yüksek dereceli gliomaların üçte birinde bu bölgede değişiklik saptanır. *RB1* mutasyonu, *CDK4/CDK6* amplifikasyonu veya *CDKN2A/CDKN2B* mutasyonu gibi fonksiyonel sonuçlar doğurur.

Kromozom 9p21'de; p15'i kodlayan *CDKN2B* ve p16'yı kodlayan *CDKN2A* genleri lokalizedir. Siklin bağımlı kinaz inhibitörü olarak p15 ve p16 proteinleri rol oynamaktadır.

Özellikle p15 ve p16 G1 siklinlerini bağlayan CDK4 ve CDK6'nin inhibitörü olarak çalışırlar ve CDK4/6'nın cyclin D ile birlikte, hücrenin G1 den S-fazına geçiş için gerekli kilit bir olay olan, Rb proteininin fosforilasyonunu gerçekleştirmesine engel olurlar (Şekil 2.4). Kısaca, p15 ve p16 aktivitesinin ortadan kalkması, kontrolsüz hücre büyümesine neden olabilir (4,12,20,34,35,36).

Primer ve sekonder glioblastoma multiforme oluşumunda *TP53* ve *RBI* yolları dışında *IDH*, *PTEN*, *EMP3*, *ERBB1*, *EGFR*, *CTMP*, *PIK3R1*, *NF1*, *DCC*, *10q*, *PDGFA*- ve *PDGFRα* gen bölgelerinde de değişikliklere rastlanmaktadır (Şekil 2.5).



Şekil 2. 4. Primer ve sekonder glioblastoma yolundaki genetik değişiklikler (Riemenschneider ve arkadaşlarından değiştirilerek alınmıştır) (44).

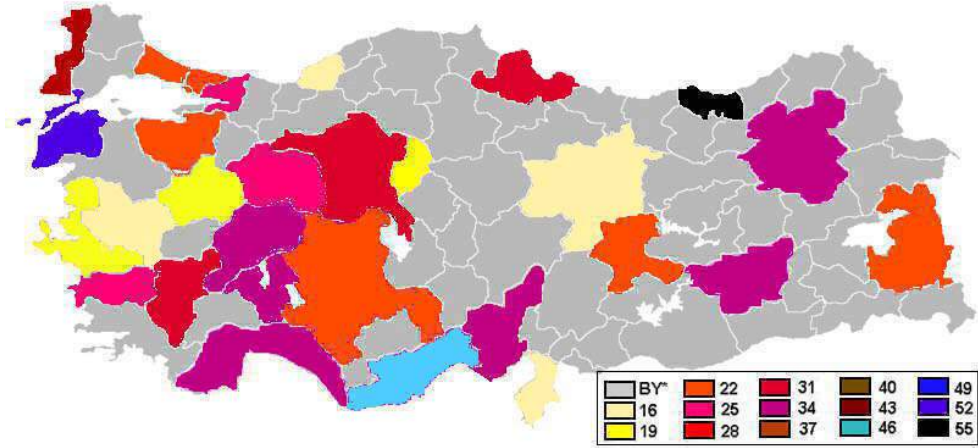
Yapılan çalışmalarda ortalama 12q13-q15 bölgelerinde %15 oranında amplifikasyon ve overekspresyon görüldüğü ve 13q14 gen bölgesinde %11 oranında delesyon gözlemlendiği rapor edilmiştir (35,41,44,52).

Sonuç olarak gliomların gelişiminde ve daha malign formlara dönüşümünde çok sayıda onkogen ve tümör baskılayıcı genin önemli roller üstlendiği çalışmalarla ortaya konmaktadır. Her genin mutasyonu ile ortaya çıkacak fonksiyon bozukluğunun açıklığa kavuşturulması, tedavide yeni yaklaşımlar getireceği açıktır. Ayrıca gliomların sınıflandırılmasında histolojik kriterler yanında moleküler kriterlerin de göz önüne alınması gerekmektedir (15,45).

2.7. Türkiye'de Yüksek Dereceli Gliomlar

Ülkemizde konu ile ilgili yapılan araştırmalarda; Türkiye'nin 28 ilinden toplanan 37 merkez dahil olmuş, beyin tümörü nedeniyle operasyon geçiren 14176 olgu dahil edilmiş ve bu olguların 3180'inin Yüksek Dereceli Glioma (YDG) olduğu bildirilmiştir. Söz konusu operasyonlar son 10 yılı kapsamaktadır. Büyük çoğunluğunu 2006 yılı verileri oluşturmaktadır. Bu veriler ışığında Türkiye ortalaması %22,4 olurken bazı yörelerde %54,4 [Trabzon] gibi çok yüksek bir orana ulaşılırken bazı yörelerde ise bu oran %9,6 [Hatay] gibi daha dūřük bir ortalama değere dūřmektedir.

Türkiye'deki yüksek dereceli gliomların elimize ulaşan güvenilir veriler ışığında illere göre dağılımı (sarıdan- kırmızıya, maviden- siyaha) Şekil 2.5'de gösterilmektedir (39).



Şekil 2.5. Türkiye'deki yüksek dereceli gliomların illere göre görölme sıklığı. Şekilde yer alan renk dağılımında (sarıdan- kırmızıya, maviden- siyaha) opere edilen yüksek dereceli gliomların oranları verilmektedir. [*BY: Bilgi yetersiz ya da yok; açık sarı %15-17; sarı %18-20; turuncu %21-23; açık kırmızı %24-26; kırmızı %27-29; koyu kırmızı %30-32; bordo %33-35; açık kahve %36-38; kahve %39-41; koyu-kahve %42-44; açık mavi %45-47, mavi %48-50; lacivert %51-53; siyah %54-56] (39)

2.8. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH)

Moleküler sitogenetik, işaretli DNA problemleri kullanılarak interfaz veya metafazdaki kromatin ve kromozomların mikroskopik analizi olarak tanımlanabilir. Bu yaklaşım, mitotik hücrelerin standart mikroskopik preparatlarında, denatüre edilmiş kromozomal DNA ile tek dallı DNA dizilerinin (prob) uygun koşullarda birleşebildiğinin gözlenmesi ile ortaya çıkmıştır (7,8).

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 doğal hücre ortamında incelenmesini sağlayan, doku/hücre iskeletinin bozulmadığı bir tekniktir.

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.

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

İlk kez 1969 yılında Gall ve Pardeu tarafından gerçekleştirilen sitolojik preparatlarda RNA'nın DNA ile hibridizasyonu, işaretlenmiş DNA sekanslarının sitolojik preparatlarda lokalize olduklarını göstermişlerdir. Büyümekte olan hücrelere tritium verilmiş ve işaretli nükleik asitler nükleer emülsiyon aracılığı ile belirlenmiştir (7,8).

İlk önceleri ISH, radyoaktif madde kullanılarak uygulamaya konulmuştur. Radyoaktif maddelerin pahalı olması, yarı ömürleri, özellikle toksik etkisi ve uzaklaştırılması gibi zorluklardan dolayı bu yöntemin kullanım alanı azalmıştır. 1970 lerde gelişen moleküler klonlama teknikleri, 1975 te biotin-avidin sisteminin bulunması, hapten molekülleri ile işaretlenmiş olan problemlerin florokrom enzim veya koloidal altın gibi aracı moleküllerle belirgin hale getirilmesini sağlamıştır. Tekniğin rezolüsyonu ve güvenilirliğini etkilemiştir. Biotinin yanı sıra digoxigenin ve florescein ile işaretleme, farklı florokrom moleküllerin birlikte kullanılması ikili ve üçlü işaretlemelemlere olanak vermiştir. 1986 da non-radyoaktif işaretli problemler kullanılarak FISH yöntemi ortaya çıkmıştır (8).

2.8.1. FISH tekniğinde kullanılan problemler ve özellikleri

FISH tekniğinin uygulamasında en önemli ve ilk basamak prob seçimidir. Kullanılacak probun incelenecek materyale, değerlendirilecek anomali tipine ve bölgesine uygun olması gerekir (7).

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 arttırabilir (8).

FISH tekniğinde sitogenetik alanda kullanılan başlıca problemler şunlardır;

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

2.8.2. FISH tekniğinin temel mekanizması

FISH prosedürü 6 aşamada gerçekleştirilir;

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 dayalı bütün yöntemlerin (Southern blotting, Northern blotting, PCR, ISH) ana mekanizması 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.

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-Probun hedefin yüksek etkinlikle birbirlerine bağlanması,

3-Hibridizasyonun spesifik aktivitesi yüksek bir reporter ile en az zemin sinyali olacak biçimde en parlak şekilde görüntülenmesidir.

Bir hibridizasyon reaksiyonunda tolere edilebilen yanlış eşleşme derecesi 'stringency' olarak ifade edilir. Yüksek stringency koşullarında, sadece hedef sekansla tam homolog olan probunlar 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.

FISH sonrası problemlerden elde edilen sinyaller epifloresan 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. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan gereçler

Sensys kamera (Sensys)

Derin dondurucu (Heraeus)

Elektronik terazi (Seuter, Ainworth-AA-250. Setra-M2000L)

Etüv (Friocell MMM Med Center)

Buzdolabı (Arçelik 415)

Floresan mikroskop (Olympus BX-61)

Image Analyser (Applied Imaging)

Su banyosu (Nüve)

Mikropipet (Eppendorf)

Mikrosantrifüj (Eppendorf Centrifuge 5415)

Vortex (Janke and Kunkel, UF-2)

pH Metre (Jenco)

Pipet uçları

Pastör Pipeti

Kronometre

Eppendorf tüpü (1, 5 ml lik)

Enjektör

Termometre

Cam kalemi

3.1.2. Cam malzeme

Beher (500 ml, 1000 ml)

Erlenmayer (500 ml, 1000 ml)

Lam

Lamel

Mezür

Yatay ve dikey şale

Cam pastör pipeti

3.1.3. Kimyasal maddeler

Metanol (Riedel-de Haen)

Asetik Asit (Riedel-de Haen)

Etil Alkol(Genkim)

Antifade (Vector)

DAPI (Sigma)

Distile Su

HCl (Merck)

Immersiyon yağı (Merck)

Sitrik asit (Sigma)

$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Carlo ERB1a)

NaCl (Merck)

NaOH (Merck)

Pepsin (Sigma)

Parafilm

Rubber Cement (Marabu Fixo gum)

Tween 20 (Sigma)

3.1.4. Kullanılan problemler

1- LSI *DDIT3* (12q12) Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe, *CDK4* spectrum green / Cep 12 spectrum red (Vysis)

2-LSI *RBI* (13q14) spectrum orange (Vysis)

3-KBI-10717 ON *MDM2* (12q15)/SE 12 Probe, *MDM2* spectrum red / cep 12 spectrum green (Kreatech)

3.1.5. Kullanılan stok solüsyonlar

Tablo3. 1. Carnoy's Fiksatif Solüsyonu

Metanol	3 kısım
Glasiyal Asetik Asit	1 kısım

Tablo 3. 2. Preparatların Ön Yıkama Solüsyonları

<u>20XSSC Solüsyonu</u>	
NaCl (3 M)	175, 3 gr
Tri Sodyum Sitrat (0.3 M)	88, 24 gr
Distile su	1000 ml
<u>0. 1XSSC Solüsyonu</u>	
20XSSC	3 ml
Distile su	597 ml
Tüm solüsyonlar HCl ile pH 7.0 a ayarlanır.	

Tablo 3. 3. Preparatların Denatürasyon Solüsyonu

<u>0. 07 M NaOH</u>	
1M NaOH	14 ml
Distile su	200 ml

Tablo 3. 4. Hibridizasyon Sonrası Solüsyonlar

<u>1XSSC Solüsyonu</u>	
20XSSC	10 ml
Distile su	190 ml
<u>2XSSC Solüsyonu</u>	
20XSSC	20 ml
Distile su	180 ml
<u>2XSSC/Tween-20 Solüsyonu</u>	
20XSSC	20 ml
Tween 20	100 µl
Distile su	180 ml
Tüm solüsyonlar HCl ile pH 7.0 a ayarlanır.	

Tablo 3. 5. Görüntüleme Sistemleri Solüsyonu

<u>DAPI/Antifade Solüsyonu</u>	
2XSSC	20 ml
DAPI	100 µl
Distile su	80 ml

3.2. Yöntem

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalından gelen ve Patoloji Anabilim dalında Glioblastoma multiforme (GBM) tanısı almış 40 olgudan alınan doku örneklerine *MDM2*, *CDK4* ve *RBI* genleri açısından FISH analizi yapılmıştır.

3.2.1. Materyal alımı

Yaptığımız çalışmaya Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı'na başvuran ve Patoloji Anabilim Dalı tarafından histopatolojik olarak incelenerek "Glioblastoma Multiforme" tanısı alan 40 olgu dahil edilmiştir. Çalışmamız Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Moleküler Genetik laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Olgulara ait dokular ESOGÜ Nöroşirürji Anabilim Dalı'na operasyon esnasında alınan numunelerden oluşmaktadır.

3.2.2. Moleküler sitogenetik analiz

3.2.2.1. Direkt doku preparasyonu

1. Transport medium içine konulmuş beyin tümörü doku örnekleri en az iki kez transport medium ile yıkanmıştır.
2. Daha sonra doku örnekleri steril küçük boy petri kabına aktarılmıştır. Steril makas ve penset ve bistüri yardımıyla mekanik olarak çok küçük parçalara ayrılmıştır.
3. Petriye 37°C'deki 1XTripsin EDTA solüsyonundan 1.5 ml eklenerek 20 dk arası etüvde bekletilmiştir.
4. Süre sonunda enzimatik olarak da parçalanan hücre süspansiyonu cam pipetle ekim tüpüne aktarılıp üzerine 5 ml besi yeri eklenmiştir.
5. Besi yeri ve doku örnekleri bulunan tüplere Vortex eşliğinde taze hazırlanmış Carnoy's Fiksatif Solüsyonundan, yavaşca damla damla koyulacak şekilde 5 damla ilave edilerek prefiksasyon yapılmıştır.
6. Prefiksasyon yapıldıktan sonra tüm sıvı plastik pipet ile ortamdaki uzaklaştırılmıştır.
7. Ekim tüpüne 4 ml taze hazırlanmış Carnoy fiksatifi eklenip tüpler 1300 rpm'de 8 dakika santrifuj edilmiş ve supernatant atılmıştır.
8. Fiksatif ortamdaki uzaklaştırılarak beş kez daha fiksatif ile yıkanmıştır.
9. Son fiksatif ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra taze hazırlanmış %50'lik asetik asitten 2 ml eklenip 10 dakika kadar bu solüsyonla muamele edilmiştir.
10. Süre sonunda parçalanmış dokulardan temiz lamların üzerine birkaç damla yerleştirilip dokular bir bent pipet tarafından aşağı yukarı hareket ettirilerek yayılmıştır.
11. Hazırlanan preparatlar 1 gece oda ısısında ve 50°C 2saat hot blade bekletilerek hücrelerin yaşlanması sağlanmıştır.

3.2.2.2. FISH tekniğinin uygulanması

FISH tekniğinde Rieder ve arkadaşları tarafından geliştirilen protokol uygulanmıştır (43).

3.2.2.2.1. Preparatların ön yıkaması ve denatürasyonu

1. Preparatlar 1'er dakika olmak üzere sırasıyla % 100-%70-%50-%30 luk alkol serisinden ve 0.1XSSC solüsyonundan geçirilerek dehidre edilmiştir.
2. Dehidratasyon sonrası preparatlar 70°C deki 2XSSC solüsyonunda 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
3. İçersinde preparatların bulunduğu 2XSSC solüsyonu içeren şale soğuk su içerisine konulmuş ve solüsyon ısısının 37°C'ye gelmesi sağlanmıştır.
4. Sıcaklığı 37 °C'ye düşen 2XSSC içerisindeki preparatlar oda sıcaklığında bulunan 0.07 M'lık NaOH solüsyonuna alınmış ve 1 dakika bekletilerek denatüre edilmiştir.
5. Denatürasyonu takiben oda sıcaklığında bulunan 0.1XSSC ve ardından +4°C'de olan 0.1XSSC ve 2XSSC solüsyonlarında 1'er dakika bekletilerek dehidratasyon ile ön yıkama tamamlanmıştır. Dehidratasyon, preparatların sırasıyla %30-%50-%70-%100'lük alkollerde 1'er dakika tutularak gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.2.2. Prob denatürasyonu

- Problar 5 dakika 70°C de bekletilerek denatüre edilmiştir.

3.2.2.2.3. Hibridizasyon

1. Probun bulunduğu ependorf tüpü santrifüj edilerek tüm probun dibe çökmesi sağlanmıştır.
2. Denatüre edilen preparatlarda belirlenen alana prob (5 µl) eklenmiş ve üzerlerine 24mm'lik lamel kapatılmıştır.
3. Lamel çevresi su girmemesi için rubber cement ile yalıtılmıştır.
4. Preparatlar 37°C'de bir gece nemli ortamda hibridizasyona bırakılmıştır.

3.2.2.2.4. 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:

1. Hibridizasyonu tamamlanan preparatlar etüvden çıkartılarak lamellerin çevresindeki yalıtım maddesi dikkatlice temizlenmiştir.
2. Preparatlar, oda ısısındaki 2XSSC solüsyonunda hafifçe karıştırılarak lameller preparatlardan uzaklaştırılmıştır.
3. Preparatlar 1XSSC solüsyonu ile 74°C'de 7-8 dakika bekletilmiştir.
4. Sonrasında 2XSSC/T-20 solüsyonunda 5 dakika bırakılmıştır.

3.2.2.2.5. Hibridize olan bölgelerin görüntülenmesi

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

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

3.2.2.2.6. Preparatların mikroskopta incelenmesi

Preparatlar Olympus BX-61 Floresan mikroskobunda uygun filtrelerle incelenmiştir. Floresan mikroskoba bağlı kamera ve görüntü analiz sistemi (Applied Imaging) aracılığı ile her olguya ilişkin FISH analiz verileri fotoğraflanmış ve arşivlenmiştir.

3.2.2.2.7. Değerlendirme

Çalışmamızda glioblastoma multiforme tanısı almış (Evre IV) 40 olgudan alınan doku örneklerine FISH analizi yapılmıştır. Her olguda 3 farklı FISH probuna ilişkin değerlendirmede prob başına 100 hücre analiz edilmiştir. Analiz edilen hücre sayısı, doku ve görüntü kalitesine bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Her hücre için hedef gene ya da kromozom sentromerine ait sinyaller sayılmıştır. Atipik hücrelerle beraber normal hücrelerde sayılmıştır. Sinyaller değerlendirilirken birbirine çok yakın olan sinyaller ve sinyal çap büyüklüğü birbirinden farklı olan (iki katı ya da daha fazla olan) sinyaller değerlendirmeye alınmamıştır.

İncelenen problemler için literatürler baz alınarak cut off değeri kullanılmıştır. Cut off, %5 olarak değerlendirilmiştir (15,19).

3.3. İstatistiksel Analiz

SPSS 13. 0 istatistik programında χ^2 istatistik testi kullanılarak hastaların cinsiyet, yaş ve sağ kalım süresi ile çalışmada saptanan gen amplifikasyon ve delesyon arasındaki ilişki araştırılmıştır. Fisher ve Pearson'a göre p değerleri hesaplanmıştır ($p < 0.05$).

4. BULGULAR

Çalışmamız Glioblastoma Multiforme'li olguların moleküler sitogenetik analizlerini kapsamaktadır. Çalışma grubunu, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı Polikliniği' ne başvuran 40 beyin tümörlü olgu oluşturmaktadır ve olguların tamamı Evre IV GBM tanısı almıştır.

Çalışmamız GBM'li hastaların *MDM2*, *CDK4* genlerindeki amplifikasyonlar, *RBI* genindeki delesyonlar saptanarak GBM'li hastalar için geliştirilecek tedavi yöntemlerine de ışık tutmak, hastalığın evresi ve prognozu arasında ilişki kurabilmek, hastalarımıza ait demografik ve histopatolojik bilgilerle bulduğumuz sonuçlar arasında ilişki saptayabilmek amacıyla yapılmıştır.

Çalışmaya dahil edilen toplam 40 olguda Kaplan Meier değerlendirmesine göre ortalama yaş $55,45 \pm 2,25$ olup hastaların yaşı en küçük olan 14, en büyük olan ise 86 yaşındadır. Sağ kalım süresi en az 1 ay, en çok 26 ay, ortalama $11,17 \pm 1,07$ olarak tespit edilmiştir. Toplam 40 olgunun 26'sı(%65) erkek, 14'ü(%35) kadın, erkeklerin yaş ortalaması $58,07 \pm 2,71$ olup, kadınların yaş ortalaması $51,71 \pm 3,98$ olarak saptanmıştır.

Toplam 24 yaşayan olgunun 13(%54,2)'ü erkek, 11(%45,8)'i kadındır. Toplam 16 ölü olgunun 13 (%81,25) ü erkek, 3'ü(%18,75) ü kadındır.

4.1. Gliomalı Olgularda FISH Analizleri

Araştırma grubunu oluşturan 40 olguya lokus spesifik ve sentromerik problar uygulanarak FISH analizleri yapılmıştır.

4.2. Yöntem ve Değerlendirmeye İlişkin Bulgular

Çalışmamızda GBM tanısı almış 40 olgudan alınan doku örneklerine FISH analizi yapılmıştır. Doku örneklerinden direk doku preparasyonu yapıldıktan sonra floresan işaretli DNA propları ile hibridizasyon gerçekleştirilmiştir. Hibridizasyon sonrası *MDM2*, *CDK4* ve *RBI* genlerine özgü tasarlanan proplardan alınan sinyaller analiz edilmiştir. Analiz edilen 40 olgunun tümünden sonuç alınmıştır. Çalışmamızın başarı oranı %100 olarak saptanmıştır.

Çalışmaya dahil edilen 40 olgunun klinik özellikleri ve histopatolojik tanıları Tablo 4.1 'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 4. 1. GBM'li olguların durum/cinsiyet/yaş/sağ kalım süresi/evre bilgileri

GBM Olgu No	Durum (+:Sağ, -:Ölü)	Cinsiyet	Yaş	Sağ Kalım Süresi (Ay)	Evre
1	+	E	56	7	IV
2	-	E	71	1	IV
3	-	E	51	2	IV
4	+	E	40	10	IV
5	+	K	52	9	IV
6	+	E	64	15	IV
7	+	E	21	18	IV
8	-	E	40	4	IV

9	+	E	48	26	IV
10	-	E	54	14	IV
11	-	E	75	15	IV
12	+	K	59	17	IV
13	-	E	50	22	IV
14	-	E	85	22	IV
15	-	E	77	6 gün	IV
16	+	E	56	21	IV
17	-	E	74	22	IV
18	+	E	59	16	IV
19	-	E	65	8	IV
20	+	K	14	16	IV
21	-	E	63	3	IV
22	-	E	59	10	IV
23	+	K	58	10 gün	IV
24	+	E	67	12	IV
25	-	K	51	11	IV
26	-	E	43	3	IV
27	+	K	46	13	IV
28	+	K	61	12	IV
29	+	K	74	10	IV
30	+	E	50	12	IV

31	+	K	73	13	IV
32	+	E	66	12	IV
33	+	K	58	5	IV
34	+	K	38	17	IV
35	+	K	48	12	IV
36	-	E	54	2	IV
37	+	E	55	2	IV
38	+	K	47	15	IV
39	+	E	63	14	IV
40	-	K	45	2	IV

4.2.1. Olguların FISH analiz bulguları

Çalışmamızda 40 olgu *MDM2*, *CDK4* ve *RBI* genleri açısından FISH analizi ile değerlendirilmeye alınmış ve 4 olguda herhangi bir anomaliye rastlanmamıştır. Olguların 7'sinde 3 gendede anomali tespit edilmiştir ve olguların 36'sında ise FISH analizi ile tespit edilen en az bir anomaliye rastlanmıştır.

Çalışmamızda olguların FISH analizi sonuçları Tablo 4.2'te ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 4.2. GBM'li olgularda FISH analizi sonuçları

GBM Olgu No	<i>MDM2</i>	<i>CDK4</i>	<i>RBI</i>
1	%29,8 amp+	%17,5 amp+	%47,8 del.
2	%34,8 amp+	%5,9 amp+	%9,5 del.
3	%33 amp+	N	N
4	N	%12,6 amp+	%6,3 del.
5	N	N	N
6	N	%13,1 amp+	N
7	%25amp+	%30,3 amp+	N
8	N	N	N
9	N	%37,4 amp+	%6,3 del.
10	%51,2 amp+	N	%8del.
11	%42amp+	%45,5 amp+	%7,6 del.
12	%10,1 amp+	%13,6 amp+	N
13	%35,7 amp+	N	N
14	N	N	N
15	%46,1 amp+	N	%29,4 del.
16	%28,3 amp+	N	N
17	%25,7 amp+	%6,3 amp+	%7,4 del.
18	N	%12,9 amp+	N
19	N	%31,8 amp+	%8,6 del.

20	%18,8 amp+	N	N
21	N	%18,8 amp+	N
22	N	%12,9 amp+	%8,9 del.
23	N	N	N
24	%28,1 amp+	N	%13,2 del.
25	%20,4 amp+	%21,5 amp+	%8,3 del.
26	%31,9 amp+	%42,6 amp+	N
27	N	%55,3 amp+	N
28	%41,1 amp+	%36,9 amp+	N
29	%51,8 amp+	N	N
30	%19,2 amp+	N	%10,7 del.
31	%54amp+	N	%13,5 del.
32	%42,6 amp+	%43,3 amp+	N
33	%21,4 amp+	%72,3 amp+	N
34	%17,8 amp+	N	%11,2 del.
35	N	%6,6 amp+	N
36	%32,2 amp+	N	%9,6 del.
37	%29,3 amp+	%15amp+	%10,7 del.
38	Tetrazomi	%28,3 amp+	%20,2 del.
39	N	%36amp+	N
40	N	%10,2 amp+	%15,5 del.

Hastaların %62,5 (25/40)'inde *MDM2* gen bölgesinde amplifikasyon, %60 (24/40) *CDK4* gen bölgesinde amplifikasyon ve %47,5 (19/40) *RBI* gen bölgesinde delesyon tespit edilmiştir.

4.2.1.1. *MDM2* gen bölgesine ait anomaliler

40 GBM'li olgunun 25(%62,5)'inde *MDM2* amplifikasyonu gözlenmiş olup 26 erkek olgunun 17 (%65,4)'si, 14 kadın olgunun 8 (%57,1)'inde amplifikasyon olarak değerlendirilmiştir. Amplifikasyon görülmeyen 15(%37,5) olgunun 9'u (%34,6) erkek, 6(%42,9)'sı kadın olarak tespit edilmiştir. 38 nolu kadın olguda (1/40) ise yüksek oranda tetrazomi tespit edilmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. *MDM2* gen bölgesine ait anomaliler

<i>MDM2</i>	Olgu sayısı	Erkek	Kadın
<i>MDM2</i> amp+	25/40 (%62,5)	17/26 (%65,4)	8/14 (%57,1)
<i>MDM2</i> amp-	15/40 (%37,5)	9/26 (%34,6)	6/14 (%42,9)

4.2.1.2. *CDK4* gen bölgesine ait anomaliler

40 GBM'li olgunun 24(%60)'inde *CDK4* amplifikasyonu gözlenmiş olup 26 erkek olgunun 16 (%61,5)'sı, 14 kadın olgunun 8 (%57,1)'inde amplifikasyon saptanmıştır. Amplifikasyon görülmeyen 16 (%40) olgunun 10(%38,5)'u erkek, 6(%42,9)'sı kadın olarak tespit edilmiştir. Farklı olarak 6 nolu olgunun sayılan interfaz hücrelerinin 3'ünde amplifikasyon ve 2'sinde delesyon, 37 nolu olgunun sayılan interfaz hücrelerinin 11'inde amplifikasyon ve 2'sinde delesyon gözlenmiştir (Tablo4.4).

Tablo 4.4. *CDK4* gen bölgesine ait anomaliler

<i>CDK4</i>	Olgu sayısı	Erkek	Kadın
<i>CDK4</i> amp+	24/40 (%60)	16/26 (%61,5)	8/14 (%57,1)
<i>CDK4</i> amp-	16/40 (%40)	10/26 (%38,5)	6/14 (%42,9)

4.2.1.3. *RBI* gen bölgesine ait anomaliler

40 GBM'li olgunun 19 (%47,5)'unda *RBI* delesyonu gözlenmiş olup 26 erkek olgunun 14 (%53,8)'ünde, 14 kadın olgunun 5 (%35,7)'inde delesyon gözlenmiştir. Delesyon görülmeyen 21(%52,5) olgunun 12 (%46,2)'si erkek, 9(%64,3)'u kadın olarak tespit edilmiştir. Farklı olarak 3 nolu olgunun sayılan interfaz hücrelerinin 4'ünde amplifikasyon 16'sında delesyon, 8 nolu olgunun sayılan interfaz hücrelerinin 2'sinde amplifikasyon ve 40 nolu olgunun sayılan interfaz hücrelerinin 3'ünde amplifikasyon 17'sinde delesyon gözlenmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. *RBI* gen bölgesine ait anomaliler

<i>RBI</i>	Olgu sayısı	Erkek	Kadın
<i>RBI</i> delesyon+	19/40 (%47,5)	14/26 (%53,8)	5/14 (%35,7)
<i>RBI</i> delesyon-	21/40 (%52,5)	12/26 (%46,2)	9/14 (%64,3)

4.2.1.4.MDM2/CDK4 gen bölgelerine ait anomaliler

40 GBM'li olgunun sadece 13(%32,5)'ü *MDM2/CDK4* Gen Bölgeleri bakımından ortak amplifikasyon gözlenmiş olup 9(%34,6)'u erkek, 4(%28,5)'ü kadın olarak saptanmıştır. Amplifikasyon görülmeyen 27(%67,5) olgunun 17(%65,4)'si erkek, 10(%71,5)'u kadın olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. *MDM2/CDK4* gen bölgelerine ait anomaliler

<i>MDM2/CDK4</i>	Olgu sayısı	Erkek	Kadın
<i>MDM2/CDK4</i> amp+	13/40 (%32,5)	9/26 (%34,6)	4/14 (%28,5)
<i>MDM2/CDK4</i> Amp-	27/40 (%67,5)	17/26 (%65,4)	10/14 (%71,5)

4.2.1.5.MDM2/CDK4/RB1 gen bölgelerine ait anomaliler

40 GBM'li olgunun sadece 7(%17,5)'sinde *MDM2/CDK4/RB1* Gen Bölgeleri bakımından ortak anomali gözlenmiş olup 6(%23)'sı erkek, 1(%7,1)'i kadın olarak saptanmıştır. Anomali görülmeyen 33(%82,5) olgunun 20(%77)'si erkek, 13(%92,9)'ü kadın olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. *MDM2/CDK4/RB1* gen bölgelerine ait anomaliler

<i>MDM2/CDK4/RB1</i>	Olgu sayısı	Erkek	Kadın
<i>MDM2/CDK4/RB1</i> anomali +	7/40 (%17,5)	6/26 (%23)	1/14 (%7,1)
<i>MDM2/CDK4/RB1</i> anomali -	33/40 (%82,5)	20/26 (%77)	13/14 (%92,9)

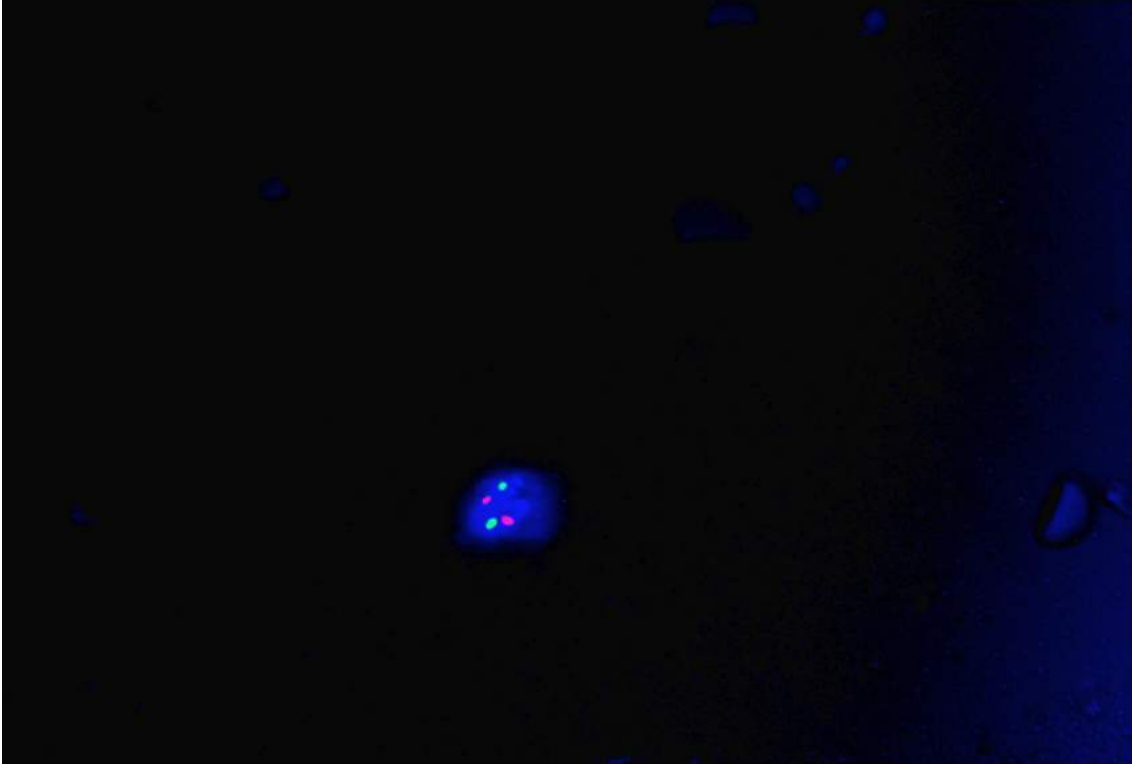
4.3.Çalışmanın İstatistiksel Bulguları

Çalışmamızda söz konusu parametreler ve hedef genlerin amplifikasyon durumları için SPSS 13.0 istatistik programında χ^2 istatistik testi kullanılarak Fisher ve Pearson'a göre p değerleri hesaplanmıştır.

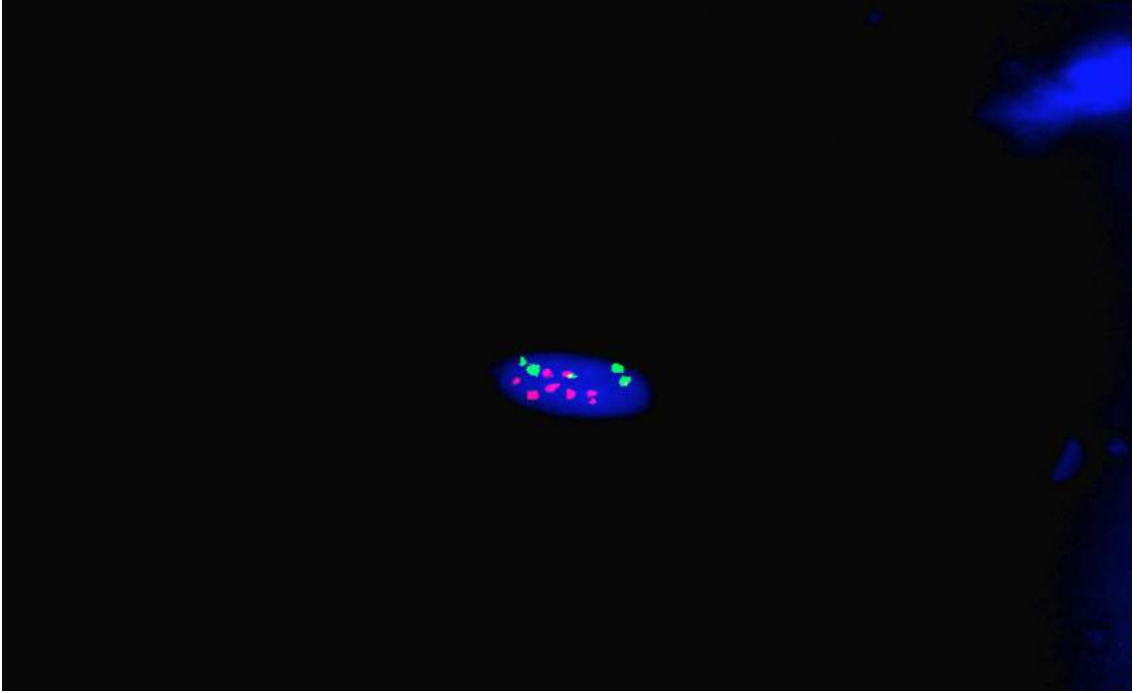
Bu çalışmada elde edilen sonuçlar Chi-Square teste göre; *MDM2*, *CDK4* genlerinde tespit edilen amplifikasyon ve *RB1* geninde gözlenen delesyonlu tümörler ayrı ayrı değerlendirildiğinde, cinsiyet, yaş ve sağ kalım süresi parametreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamamıştır ($P>0.05$).

40 GBM'li olgunun 7'sinde gözlenen ortak *MDM2*, *CDK4* ve *RB1* gen anomalisi açısından yapılan istatistiksel analiz sonucunda yukarıda belirtilen parametreler açısından anlamlı bir ilişki saptanamamıştır ($p>0.05$).

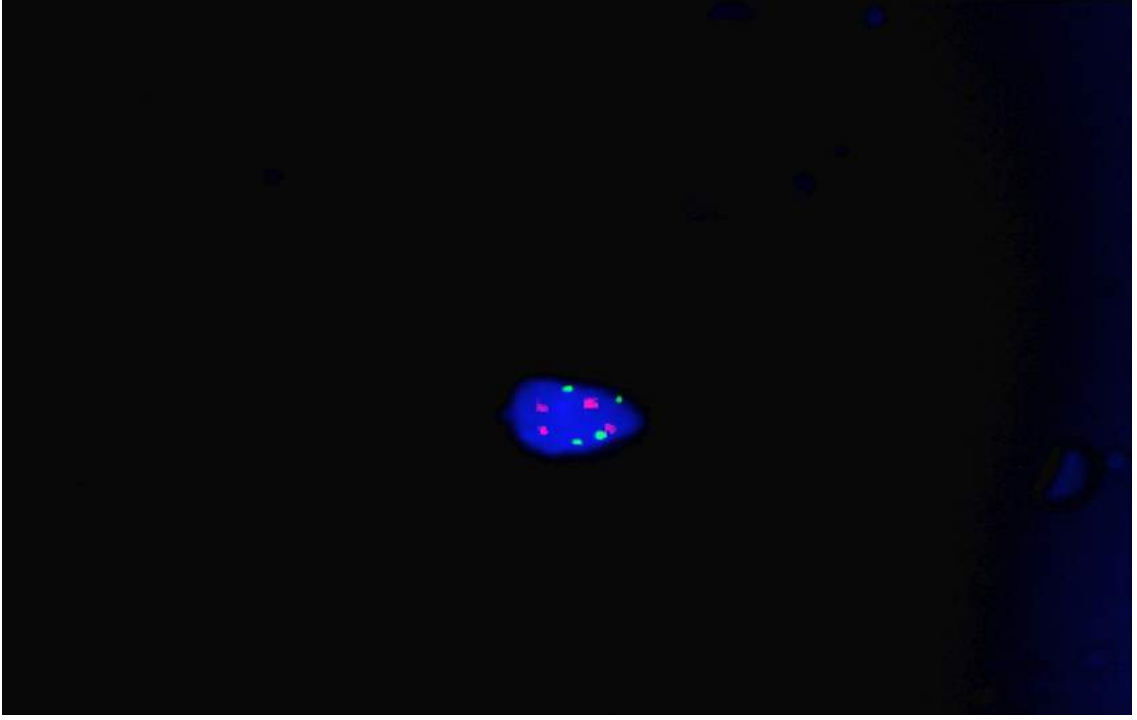
MDM2, *CDK4* ve *RB1* genlerinde gözlenen amplifikasyon ve delesyonları saptamak amacı ile FISH yöntemi uygulanarak elde edilen görüntüler Şekil 4.1-4.7'de gösterilmiştir.



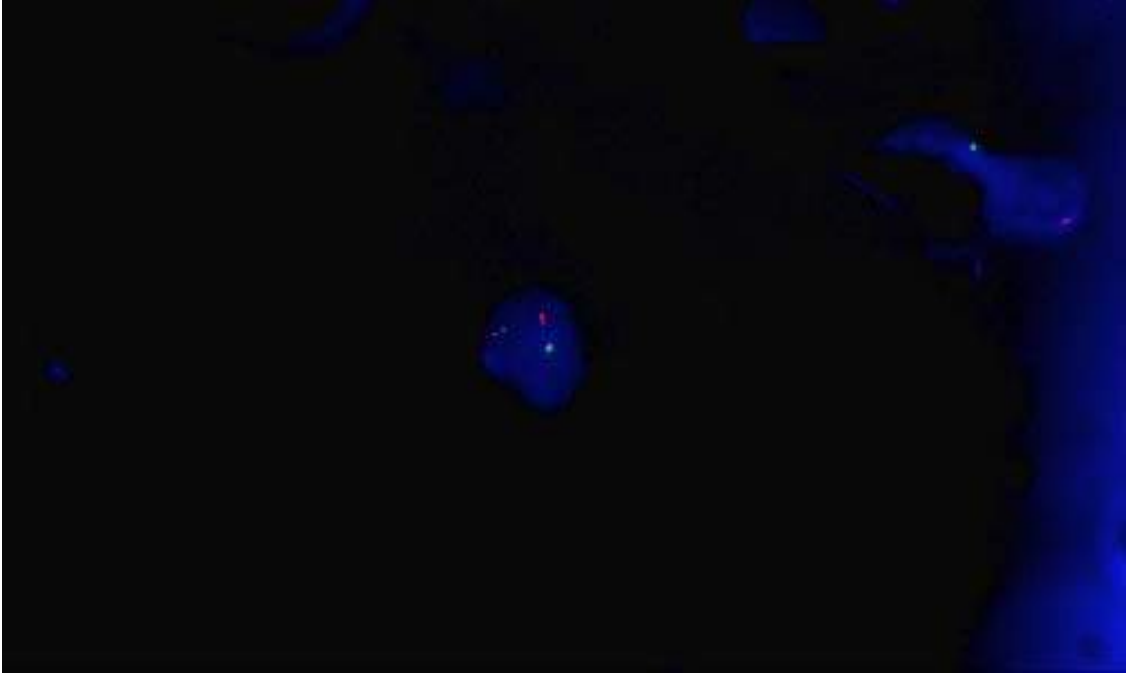
Şekil 4.1. *MDM2* geni normal hücre yapısına sahip olgu 6'ya ait FISH görüntüsü (Cep12 yeşil sinyal, *MDM2* kırmızı sinyal)



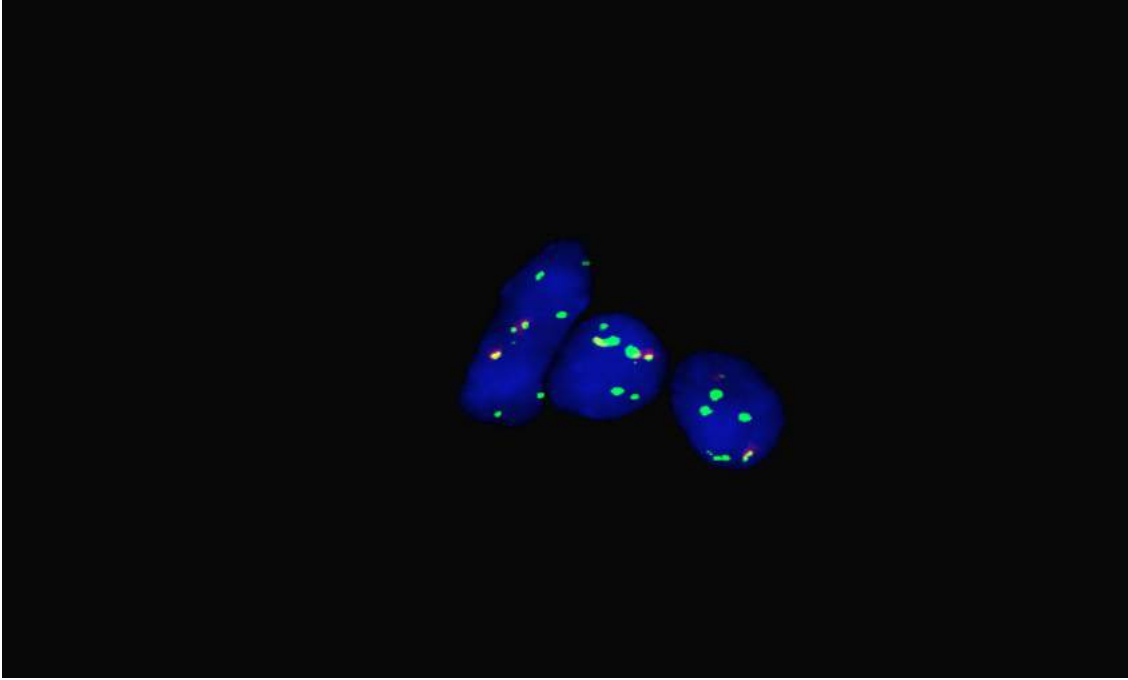
Şekil 4.2. *MDM2* geni amplifikasyonuna sahip olgu 7'e ait FISH görüntüsü (Cep12 yeşil sinyal, *MDM2* kırmızı sinyal)



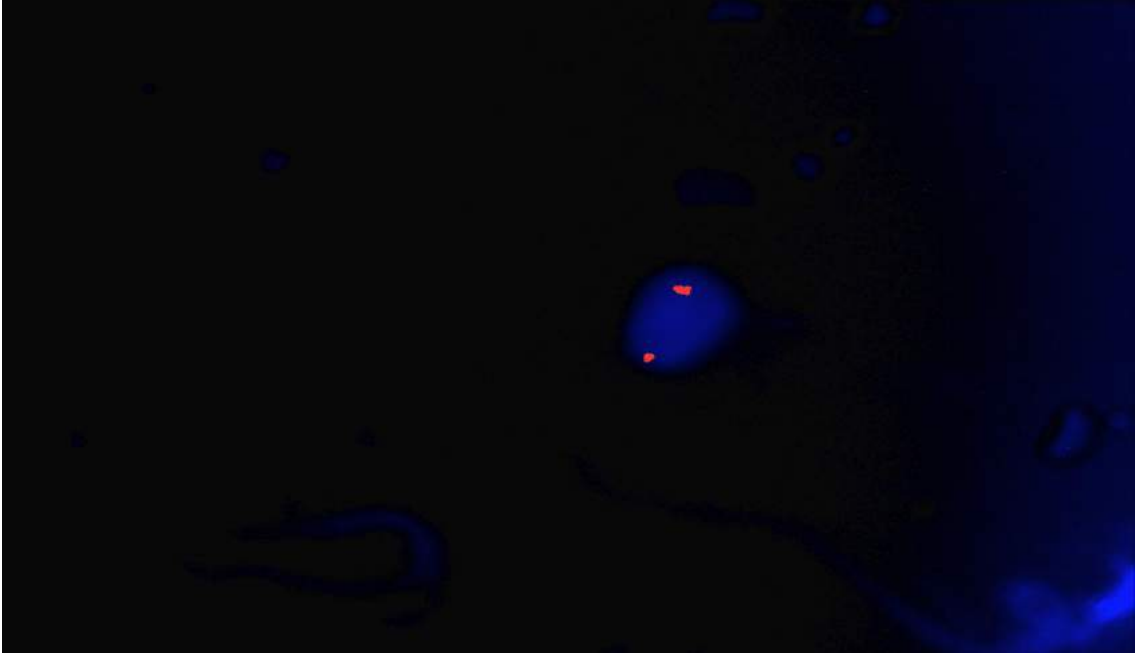
Şekil 4.3. *MDM2* geni tetrazomisine sahip olgu 38'e ait FISH görüntüsü (Cep12 yeşil sinyal, *MDM2* kırmızı sinyal)



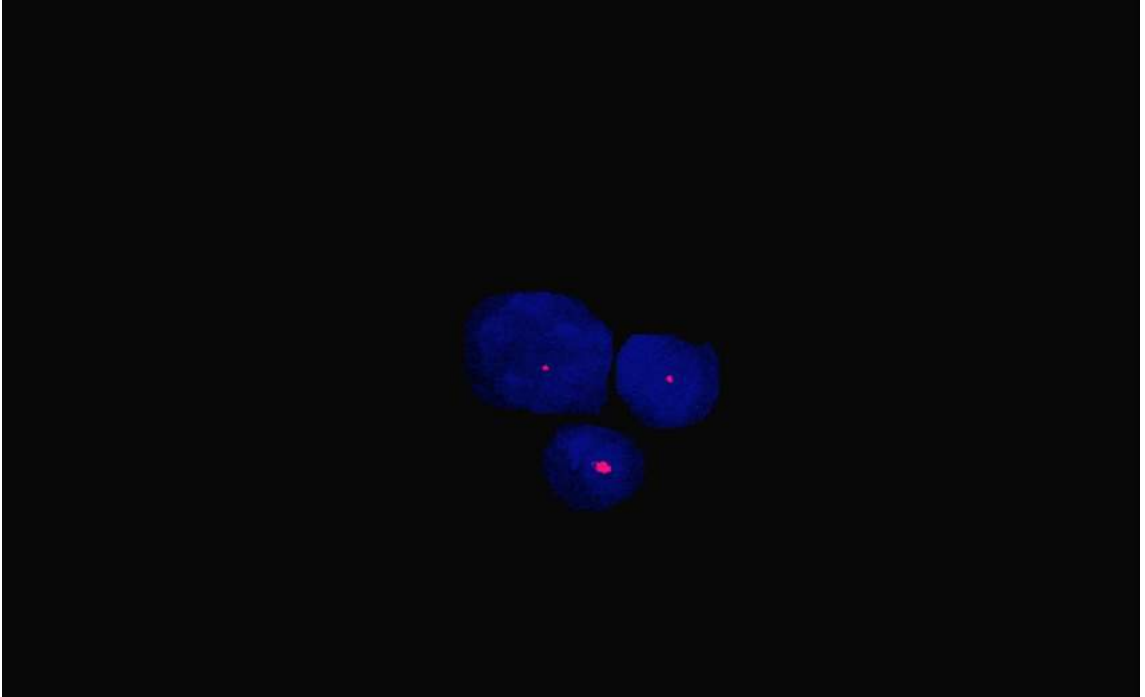
Şekil 4.4. *CDK4* geni normal hücre yapısına sahip olgu 34'e ait FISH görüntüsü (Cep12 kırmızı sinyal, *CDK4* yeşil sinyal)



Şekil 4.5. *CDK4* geni amplifikasyonuna sahip olgu 11'e ait FISH görüntüsü (Cep12 kırmızı sinyal, *CDK4* yeşil sinyal)



Şekil 4.6.*RB1* geni normal hücre yapısına sahip olgu 13'e ait FISH görüntüsü (*RB1* kırmızı sinyal)



Şekil 4.7.*RB1* geni delesyonuna sahip olgu 10'a ait FISH görüntüsü (*RB1* kırmızı sinyal).

5.TARTIŞMA

Çalışmamıza Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim Dalına başvuran ve Patoloji Anabilim Dalı tarafından histopatolojik olarak incelenerek “Glioblastoma Multiforme” tanısı alan 40 olgu alınmıştır. Olgulara ait tümör dokularından elde edilen interfaz hücrelerine, *MDM2*, *CDK4* ve *RBI* gen bölgelerini incelemek amacı ile FISH yöntemi uygulanmış olup elde edilen bulgular literatür eşliğinde tartışılmıştır.

5.1.FISH Yöntemi İle Saptanan Anomalilerle Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması

GBM gelişimi hakkında çok az moleküler bilgi bulunmaktadır. Bunu açıklığa kavuşturmak için Mao ve arkadaşlarının (32) 2000 yılında yaptıkları çalışmada 5 GBM’li olgu için sitogenetik, FISH, CGH sekanslama analizi yapmışlardır. İncelenen olguların hepsinde kromozomal değişiklikler gözlenmiş ve karmaşık kromozom translokasyonları [(der(18)t(2;4;12;18), der(X)t(X;10)(q27.1;p12.1), der(10)t(10;15)(p11.23;q11.2), der(1) (:1p31→1q44::7q11.3→7qter)] olarak bildirilmiştir. 5 olgunun 2’sinde ise (1 ve 3.olgu) *MDM2* ve *CDK4* amplifikasyonu %30 oranında gözlenmiş olup 3 nolu olgu için *MDM2/CDK4* koamplifikasyonu %44 oranında bulmuşlardır. Sonuç olarak, GBM’li olgularda elde edilen bu verileri desteklemek amaçlı daha fazla araştırma yapılması gerektiğini bildirmişlerdir.

Ruano ve arkadaşları (48) tarafından 2006 yılında yapılan çalışmada, *MDM2* ve *CDK4* gen kopya sayısı değişikliklerini incelemişlerdir. Primer GBM’li 20 olgu için mikroarray ve CGH yöntemi, 111 primer GBM’li olgu için FISH yöntemi kullanmışlardır. CGH ve Microarray yöntemleri ile incelenen 20 olgunun 3’ünde *MDM2* (%15), 2’sinde *CDK4* (%10) amplifikasyonu saptamışlardır. Ayrıca FISH yöntemiyle çalışılan 111 primer GBM’li olguda %11 oranında *MDM2* ve *CDK4*

amplifikasyonu saptamışlardır. Bu sonuçlar doğrultusunda *MDM2* ve *CDK4* genlerinin birçok primer GBM’de bağımsız olarak amplifiye olabileceğini bildirmişlerdir.

Zemanova ve arkadaşları (60) tarafından 2006 yılında yapılan çalışmada Oligodendroglioma’lı olgularda *RBI* gen delesyonu incelenmiş ve analizler için FISH yönteminden yararlanmışlardır. Oligodendroglioma’lı 15 olgunun yalnız 1’inde *RBI* delesyonu (1/15) saptanmıştır. Tespit edilen bu delesyonun Oligodendroglioma’lı olgularda anlamlı olmadığını ve bu bulgular ışığında *RBI* delesyonunun hastalıkla alakalı herhangi bir ilişkisinin bulunmadığını bildirmişlerdir.

Fisher ve arkadaşlarının (19) 2008 yılında yaptığı çalışmada gliomalı olgularda 12q13-21 gen bölgeleri kopya sayısı artışına farklı bir bakış getirmek amacı ile FISH, Southern blot ve Northern blot tekniğini uygulanmış olup 40 gliomalı (16 GBM, 10AA, 7A, 7PA) olguyu incelemiştir. Bütün GBM’li olgularda, 7 Pilositik astrositom (PA)’lı olguda ve Anaplastik astrositom (AA)’ların en az 1 bölgesinde; 12q13-21 (*MDM2* ve *CDK4*) amplifikasyonu tespit edilmiş olup saptanan bu amplifikasyonun düşük evreli glial tümörlerde GBM’den farklı olarak gözlemlendiğini vurgulamışlardır.

Rodriguez ve arkadaşları (47) tarafından 2008 yılında yapılan çalışmada beyin tümörlerinde Pseudoepidermal ve Epidermal farklılaşmanın tanıda önemli bir yer teşkil edebileceğini düşündükleri için *RBI* gen bölgesinde gözlenebilecek değişiklikleri saptamak amacıyla immunohistokimyasal (IHK) ve FISH yöntemlerini kullanılmışlardır. Çalışmalarında 3 grup oluşturulmuş olup (A-GBM, E-GBM, TE-GBM), *RBI* delesyonu sırasıyla %50, %0, %14 olarak tespit edilmiştir. Çalışılan 58 olgu için A-GBM’li olgularda *RBI* delesyon oranının yüksek bulunduğu ve diğer elde edilen verilerin birbirinden farklı olarak saptandığı için epidermal bölgelerin sağ kalım açısından dikkate alınması gerektiğini belirtmişlerdir.

MDM2 ve *CDK4* gibi büyüme kontrol genlerinin primer GBM'ler için prognostik anlamlılığını ortaya çıkarmak amacıyla Ruano ve arkadaşlarının (49) 2009 yılında yaptıkları çalışmada FISH yöntemi kullanılarak 194 primer GBM'li olguyu moleküler değişiklikler ve sağ kalım analizi için incelemişlerdir. Olguların ortalama yaşı 59,5 (16-81), yaşam süresi 10 ay (1-72) olarak tespit edilmiş olup 20 olguda *MDM2* gen amplifikasyonu (%11,4), 23 olguda *CDK4* gen amplifikasyonu (%19,8) amplifikasyonu tespit edildiğini bildirmişlerdir. *CDK4* gen amplifikasyonu sağ kalım açısından (P=0.01) kötü prognozla ilişkili olduğunu, *MDM2* gen amplifikasyonunun ise sağ kalımla bir ilişkisi olmadığını ifade etmişlerdir. Yaptıkları bu çalışmada primer GBM'li hastaların klinik sonuçlarındaki *CDK4* amplifikasyonunun prognostik değerine dikkat çekmişlerdir.

Bax ve arkadaşları (10) tarafından 2010 yılında yapılan çalışmada yetişkinler ve çocukluk çağı yüksek evre gliomalı olgular arasındaki genomik farklılıkları araştırmak amacıyla FISH analizi yapılmıştır. 63 gliomalı olgunun 14'ünde *RBI* gen bölgesinde (%22) delesyon, *MDM2*, *CDK4* gen bölgelerinde düşük derecede amplifikasyon bulunmuştur. *MDM2*, *CDK4* ve *RBI* genleri için istatistiksel olarak bir anlam bulunamamış olup, tüm yüksek evre gliomalı olgulardan elde edilen bulguların örtüşmesine rağmen çocukluk çağı gliomalı olguların yetişkinlere oranla daha geniş aralıkta anomali barındıracağını rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda FISH yöntemi ile incelediğimiz 40 GBM'li olgunun 25'inde *MDM2* (%62,5) ve 24'ünde *CDK4* (%60) amplifikasyonu, ayrıca 19 olguda *RBI* (%47,5) delesyonu saptanmış olup, istatistiksel olarak sağ kalım süresiyle ve kötü prognozla ilişkili bulunmadığı saptanmıştır.

Glioblastome Multiforme'li olgular için FISH yönteminin uygulandığı araştırmalar çok az olup literatürlerde belirtilen oranlar ile karşılaştırıldığında; yalnız Ruano ve arkadaşlarının 2006 (48) ve 2009 (49) yıllarında yapmış oldukları

çalışmalarda MDM2 gen amplifikasyonu açısından elde ettikleri veriler (MDM2 gen amplifikasyonu %11 ve %11,4 oranında) birbirine yakın olarak değerlendirilmiştir. Tartışmada yer alan diğer literatürlerdeki (10, 19, 32, 47, 60) sonuçlar Tablo 5.1.'de de görüldüğü gibi birbirleri ve çalışmamız ile karşılaştırıldığında, farklı oranlardaki verilerle karşılaşmaktayız. Literatürler ve bizim çalışmamızda gözlenen bu farklılığı tümör heterojenitesi ile ilişkilendirilebileceği düşüncesindeyiz.

Türk populasyonunda yapılan ve Türkiye verileri olarak nitelendirdiğimiz çalışmamızda GBM'li 40 olguda FISH yöntemi uygulanarak yapmış olduğumuz bu çalışma gelecekte bu alanda yapılacak olan araştırmalara kaynak ve bilgi verici olabileceğini kanaatindeyiz.

MDM2, *CDK4* ve *RBI* gen bölgelerinde saptanan anomali sonuçlarının literatür verileri ile karşılaştırılması Tablo 5.1'de verilmiştir.

Tablo 5.1. *MDM2*,*CDK4* gen amplifikasyonu ve *RBI* gen delesyonu sonuçlarının literatür verileri ile karşılaştırılması

Çalışmalar	Olgu Sayısı	Örnek	Yöntem	<i>MDM2</i>	<i>CDK4</i>	<i>RBI</i>
Mao ve ark. 2000	5	GBM	FISH	% 30 amplifikasyon %44 Koamplifiye	%30 amplifikasyon %44 Koamplifiye	-
Ruano ve ark.2006	111	GBM	FISH	% 11 amplifikasyon	%11 amplifikasyon	-
Zemanova ve ark. 2006	16	Oligodendrogliom	FISH	-	-	Delesyon-
Fisher ve ark.2008	40	Glioma	FISH	Amp+	Amp+	-
Rodriguez ve ark. 2008	58	Glioma	FISH	-	-	Delesyon +
Ruano ve ark.2009	194	GBM	FISH	%11,4 amp+	%19,8 amp+	-
Bax ve ark. 2010	63	Glioma	FISH	Düşük amplifikasyon	Düşük amplifikasyon	%22 delesyon
Bizim çalışmamız 2011	40	GBM	FISH	%62,5 amplifikasyon	%60 amplifikasyon	%47,5 delesyon

6.SONUÇ ve ÖNERİLER

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim Dalı tarafından opere edilen ve Patoloji Anabilim Dalı tarafından histopatolojik olarak incelenerek “Glioblastoma Multiforme” tanısı alan 40 olgunun tümör örnekleri çalışmaya alınmıştır. Araştırma grubunu oluşturan 40 GBM’li olgunun tümör örneklerine direk doku preparasyonu yapıldıktan sonra *MDM2*, *CDK4* ve *RBI* genleri için FISH analizi yapılmıştır. Olguların yaşları, cinsiyetleri, sağ kalım ve evreleri GBM’li olgu dosyalarından temin edilmiştir. Elde edilen veriler literatürlerle birlikte tartışılmıştır.

Çalışmamızda beyin tümörü gelişiminde etkili olacağı düşünülen *MDM2*, *CDK4* ve *RBI* gen bölgelerinde gözlenebilecek kopya sayısı değişikliklerini incelemek amacı ile FISH yöntemi uygulanarak primer GBM’li (evre IV) olgulardan elde edilen doku örnekleri incelenmiştir.

Çalışmaya dahil edilen ve FISH yöntemi ile incelenen GBM’li 40 olgunun tümünden sonuç alınmıştır. GBM’li dokulardan elde edilen interfaz hücreleri FISH preparatı haline getirilmiş olup yaptığımız çalışmada direk doku preparasyonu işlemi gerçekleştirilmiştir.

GBM’lerde gerçekleştirdiğimiz çalışmamızın sonucunda;

1- Yapılan FISH analizi sonucunda; olguların %62,5’inde *MDM2*, %60’ında *CDK4* gen amplifikasyonu ve %47,5’inde *RBI* gen bölgesinde delesyon tespit edilmiştir.

2- Bu çalışmada 38’ nolu olguda *MDM2* gen bölgesinde tetrazomi saptanmıştır.

3- İstatistiksel olarak, *MDM2*, *CDK4* ve *RBI* genlerindeki kopya sayısı artışları ve ifade kaybı arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığı saptanmıştır.

4- GBM'li 40 olgunun 8'inde *MDM2* ve *CDK4* genlerinin birlikte amplifiye olduğu saptanmış ve yapılan istatistiksel çalışmalar sonucunda elde edilen *MDM2* ile *CDK4* amplifikasyonu verileri ile sağ kalım süresi arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığı tespit edilmiştir.

5- Türkiye'de Glioblastoma Multiforme'li olgularla yapılan bir çalışmaya rastlanılmış olup *CDK4* ve *RBI* gen bölgeleri için Array CGH ve Southern blot yöntemleri kullanılmıştır. Bizim çalışmamız, GBM'li olgularda FISH yöntemi uygulanarak *MDM2*, *CDK4* ve *RBI* genlerinin incelendiği ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

Literatürlerde görüldüğü üzere FISH yöntemi uygulanarak yapılan çalışmaların az olması ve çalışmamızdan elde edilen verilerin daha da anlam kazanabilmesi için; farklı evrelerde beyin tümörleri ve sekonder GBM'lerin de dahil olduğu geniş bir olgu serisi ile çalışmaların arttırılmasının Glial tümörlerin genetik yapısını anlamamızda yardımcı olacağını düşünmekteyiz.

7.KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Adilay, H.U., 2006, Glioblastoma multiforme ve benign meningo olgularında tümör dokusunda ölçülen çinko, demir ve admiyum düzeylerinin karşılaştırılması, Bakırköy Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Uzmanlık Tezi,
2. Albert, B., Brey, D., Lewis, J., Raff, M., Robert, K., Whatson, J.D., 2002, The molecular biology of the cell, third addition, Gartlard Publishing New York
3. Albertson, D.G., Collins, C., McCormick, F., Gray, J.W., 2003, Chromosome aberrations in solid tumors, Nature Genetics, 34, 4, 369-372p.
4. Arı, B., 2008, P53 yolağında yer alan mdm2 ve P53 genlerinde görülen tek nükleotid polymorfizmlerinin meme kanserli hastalarda araştırılması, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Adana
5. Arslantaş, A., Artan, S., Oner, U., 2004, The Importance of Genomic Copy Number Changes in the Prognosis of Glioblastoma Multiforme Neurosurg Rev.27, 58-64p.
6. Arslantaş, A., Artan, S., Öner, Ü., Müslümanoğlu, M.H., Özdemir, M., Durmaz, H., 2007, Genomic alterotions in low-grade anaplastic astrocytomas and glioblastomas, Pathology Oncology Research 13,1,39-46 p.
7. Artan, S., 1996, FISH tekniğinde kullanılan problr ve özellikleri, Teorik ve Pratik Floresan İn Situ Hibridizasyon, Ed.Başaran, N.; ETAM, Eskişehir, 14-25s.
8. Artan, S.,1996, Rutin FISH uygulamaları, Teorik ve Pratik Floresan İn Situ Hibridizasyon, Ed.Başaran, N.; GENTAM, Eskişehir, 34-59 s.
9. Başaran, N., 1999, Tıbbi Genetik.7.Baskı, Güneş ve Nobel Tıp Kitabevi, Bursa,
10. Bax, D.A., A.M., Little, S.E., Carvalho, D., Pereira, M.V., Tamber, N., Grigoriadis, A.E., Ashworth, A., Reis, R.M., Ellison, D.W., Sarraj, S., Hargrave, D., Jones, C., 2010. A distinct spectrum of copy number aberrations in pediatric high-grade gliomas, Clinical Cancer Research, 10. 1158-1078p.
11. Bogler O, Huang HI, Kleihues P, Cavenee WK.The TP53 gene and its role in human brain tumors.Glia,15:308-27.199p.
12. Burns, K., Ueki, K., Jhung, S.L., Koh, J., Louis, D.N., 1998, Molecular genetics of p16, CDK4, and pRb immunohistochemistry in glioblastomas, J Neuropathol Exp Neurol, 57,2, 122-130p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

13. Çefle, K., 2009, Kanser Genetiği, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Bilim Dalı, Klinik Gelişim, 50-59s.
14. Çiçek., E, İ, , 2011, Glioblastoma multiformeli olgularda IDH2 gen mutasyonu ve RAR β genmetilasyonunun hastalık prognozu ile birlikte değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, 75s.
15. Dönmez, M., 2005, Larinksin yassı epital hücreli karsinomalarında p16 ekspresyonu ve hpv ile ilişkisi, İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji AD, Uzmanlık Tezi,18-20s.
16. Durmaz, R.ve Oktar, N., 2004, Gliom gelişimi ve değişimine moleküler bir bakış, Türk Nöroloji Dergisi, 3, 3-8s.
17. Durmaz, R.ve Vural, M., 2007, Primer ve sekonder glioblastoma multiforme genetiği, Türk Nöroşirürji Dergisi, 17, 80-90s.
18. Eisele, G., Weller, M., 2011, Targeting apoptosis pathways in glioblastoma, Cancer Letters,10.1016
19. Fischer, U., Keller, A., Leiddinger, P., Deutscher, S., Heisel, S., Urbschat, S., Lenhof, H.P., Meese, E., 2008, A different view on dna amplifications indicates frequent, highly complex, and stable amplicons on 12q13-21 in glioma, Mol Cancer Res, 6(4).
20. Geoffey, M.C., Hausman, Er., Hucre: Molekuler Yaklaşım, 2006, (Cev: Sakızlı, M., Atabey, N.), İzmir Tıp Kitabevi, İzmir, 592-640s.
21. Günal, M., 2006, Glioblastoma multiforme ve benign meningeom olgularında tümör dokusunda ölçülen kurşun ve nikel düzeylerinin karşılaştırılması, Bakırköy Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Uzmanlık Tezi,
22. He, J., Allen, J.V., Collins, V.P., Turner, M.J.A., Godbout, R., Day, R.S., James, C.D., 1994, CDK4 amplification is an alternative mechanism to p16 gene homozygous deletion in glioma cell lines, Cancer Research, 54,5804-5808p.
23. Hofer, S., Lassman, A.B., 2010. Molecular markers in gliomas: impact for the clinician, Springer, 5, 201-210p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

24. Kalkan, R., 2011, Glioblastomalı olgularda mutasyon ve metilasyon paternlerindeki değişikliklerin araştırılması, Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, 112 s.
25. Karakaş, Z., 2007, Beyin tümörlerinde sitogenetik ve moleküler sitogenetik analizler, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, 93 s.
26. Kleihues, P., and Ohgaki, H., 1999, Primary and secondary glioblastomas From concept to clinical diagnosis, *Neuro Oncology* 18,44-51p.
27. Kraus, J.A., Felsberg, J., Tonn, J.C., Reifenberger, G., Pietsch, T., 2002, Molecular genetic analysis of the TP53, PTEN, CDKN2A, EGFR, CDK4 and MDM2tumour-associated genes in supratentorial primitive neuroectodermal tumours and glioblastomas of childhood, *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 28, 325-333p.
28. Kubbutat, M.H.G., Jones, S.N., Vousden, K.H.,1997, Regulation of p53 stability by MDM2, *Nature*, 387, 289-303p.
29. Kumar, V., Cotran, R., S., 2003, Robbins, S.L., 2003, Robbins Temel Patoloji, 7.baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul
30. Kurtcu,K., 2009, Akciğer kanserli vakalarda, bronşial lavaj materyalinden elde edilecek hücrelerde; genetik markerların flouresan in-situ hibridizasyon (FISH) yöntemi ile incelenmesi, ESOĞÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik AD, Doktora Tezi
31. Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., et al., 2007, The 2007 WHO classification of tumors of the central nervous system, *Acta Neuropathol*, 114,97-109p.
32. Mao, X.and Hamoudi, R.A., 2000. Molecular and cytogenetic analysis of glioblastoma multiforme, *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 122, 87-92p.
33. Newcomb, E.W., Cohen,H., Lee, S.R., Bhalla, S.K., Bloom, J., Hayes, R.L., Miller, D.C., 1998, Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by alternative expression of P16, P53, EGFR, MDM2 or BCL-2 genes, *Brain Pathology*, 8, 655-667p.
34. Nussbaum, R.L., Mcinnes, R.R., Willard, H.F., Thompson&Thompson, 2005, Tıbbi Genetik, Guneş Kitabevi, 592-640s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

35. Ohgaki, H., 2005, Genetic pathways to glioblastomas, *Neuropathology*, 25,1-7 p.
36. Ohgaki, H., Kleihues, P., 2007, Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma, *Am J Pathol* , 170. 1445–1453p.
37. Ohgaki, H., Watanabe, K., Peraud, A., Biernat, W., Deimling, A., Yasargil M.G., 1999, A case history of glioma progression. *Acta Neuropatho*,97:525-32.
38. Ohgaki, H.and Kleihues, P., 2009, Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas, *Cancer Science*, 100. 12, 2235-2241p.
39. Oktar, N., Akakin, A., Hakan, T., Kılıç, K., Basmacı, M., Hamzaoğlu, V., Türkoğlu, Ö.F., Yener, U., Kocaeli, H., 2006, Turnog yüksek evreli gliomlar çalışmayı 2.grup elemanları
40. Olson, J.J., Barnett, D., Yang,J., Assietti, R., Cotsonis, G.C., David James, D., 1998, Gene amplification as a prognostic factor in primary brain tumors, *Clinical Cancer Research*, 4, 215-222p.
41. Reifenberger, G., Reifenberger, J., Ichimura, K., Meltzer, P.S., Collins, V.P, 1994, Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13-14in human malignant gliomas: preliminary mapping of the amplicons shows preferential involvement of CDK4, SAS, and MDM2, *Cancer Research*, 54, 4299-4303p.
42. Reis, R.M., Leblebicioğlu,D.K., Lopes, J.M., Kleihues, P.,Ohgaki, P., 2002, Short communication: genetic profile of gliosarcomas, *American Journal of Pathology*, 156, 2
43. Rieder, H., 2003, FISH Protokol, AG Tumorgenetik, Institut fur Klinische Genetik Klinikum der Philipps- Universitat, MaRB1urg.
44. Riemenschneider, M.J., Jeuken, J.W.,Wesseling, P.& Reifenberger, G., 2010. Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathol*.120. 567–584p.
45. Riemenschneider, M.J., Wolter, R.M., Reifenberger, J., Kraus, J.B.A., Schlegel, U., Reifenberger, G., 1999,Amplification and overexpression of the mdm4 (mdmx) gene from 1q32 in a subset of malignant gliomas without TP53 mutation or mdm2 amplification, *Cancer Research*, 59, 6091–6096p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

46. Riemenschneider, M.J. and Reifenberger, G., 2009, Molecular neuropathology of gliomas, *Int.J.Mol.*,10. 184-212p.
47. Rodriguez, F.J., Bernd W.Scheithauer, B.W., Caterina Giannini, C., Bryant, S.C., Jenkins, R.B., 2008, Epithelial and pseudoepithelial differentiation in Glioblastoma and Gliosarcoma, *Cancer*, 113, 10. 2779-2789p.
48. Ruano, Y., Mollejo, M., Riberta, T., Fiano, C., Camacho, F., Gomez, E., Moneo, J.H., Martinez, P., Melendez, B., 2006, Identification of novel candidate target genes in amplicons of glioblastoma multiforme tumors detected by expression and cgh microarray profiling, *Molecular Cancer*, 5:39 1476-4598p.
49. Ruano, Y., Ribalta.T., M.D., Rodriguez, A., Martin, Y.C., Fiano, C., Magan, E.P., Moneo, J.H., Mollejo, M., Melendez, B., 2009, Worse outcome in primary glioblastoma multiforme with concurrent epidermal growth factor receptor and P53 alteration, *Anatomic*, 131, 257-263p.
50. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı Epidemiyoloji ve Koruma Şube Müdürlüğü 2004-2006 Yılları Türkiye Kanser İnsidansı.
51. Sav, A., 2006, Beyin tümörlerinin tanı ve evrelemesinde genetik yöntemler, *Türk Nöroşirüji Dergisi*, 16, 1, 2-5s.
52. Schmidt, E.E., Ichimura, K., Reifenberger, G., Collins, P., 1994, Cdkn2 gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas, *Cancer Research*, 54,6321-6324p.
53. Söylemezoğlu, F., 2000. Astrositoma progresyonunun moleküler genetik temelleri, *Türk Nöroşirüji Dergisi*, 10. 169 – 175s.
54. Strachan, S., T., Andrew, P., 1999, *Human molecular genetics* 2nd edition, Wiley Liss, 10,202-205 p.
55. Sümbül, A.Y., 2002, MDM2 tp 53 mutasyonları ilişkisi hepatosellüler karsinomlu hastalarda P53 kodon 72 ve mdm2 snp 309 gen polimorfizim sıklığı ve tümöre ait karakteristiklerle karşılaştırılması, Çukurova Üniversitesi Tıp Fak. İç Hastalıkları AD Uzmanlık Tezi
56. The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008, Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways, *Nature*, 455, 23
57. Tuğcu, B., 2004, Malign astroziter tümürlü hastalarda yaşam süresini etkileyen faktörler ve i-67 proliferasyon indeksin prognoz üzerine etkisi, Bakırköy Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Uzmanlık Tezi,

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

58. Ushio, Y., Tada, K., Shiraishi, S., Kairyo, T., Shionojima, N., Kochi, M., Saya, H., 2003, Correlation of molecular genetic analysis of TP53, MDM2, P16, PTEN, and EGFR and survival of patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma, *Frontiers in Bioscience* 8, 281-288p.
59. William, S.K., Cummings, M.R., 2000. *Genetik Kavramlar*, (Cev.: Oner, C.), Palme Yayıncılık, Ankara, 635-636s.
60. Zemanova, Z., Kramar, F., Babicka L., Ransdorfova, Ş., Melichercıkova, J., Hrabal, P., Kozler P., Michalova, K., 2006, Molecular cytogenetic stratification of recurrent oligodendrogliomas: utility of interphase fluorescence in situ hybridization (I-FISH), *Folia Biologica*, 52, 71-78p.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı : Ceylan KARAKURT
Doğum Tarihi : 17.10.1987
Doğum Yeri : Isparta/merkez
Uyruğu : T.C.
Cinsiyet : Kadın
Medeni Hali : Bekar
Adres : Hoşnudiye mah.Safiyet sok.Yağmur apt 19/7.kat:1
TÜRKİYE/ESKİŞEHİR MERKEZ
E-Posta : ceylankarakurt@mynet.com , cylnnn@gmail.com
Telefon : 0 (555) 836 88 93

Eğitim Durumu

İlk Okul : 1993-2001 Denizli Gazi ilköğretim Okulu
Lise : 2001-2004 Denizli Cumhuriyet Lisesi
Üniversite : 2004-2008 Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen
Edebiyat Fak. Biyoloji bölümü
Yüksek Lisans : 2008-2011 Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık
Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı

Yabancı Dil

İngilizce (Orta Seviyede)

Mesleki Deneyim

2008-2011 ESOĞÜ Tıbbi Genetik A.D.Postnatal ve Moleüler Sitogenetik Laboratuvarı

Bilgisayar Bilgisi :

- Microsoft Windows 95/98/XP/NT/VİSTA (orta Derecede)
- Microsoft Office Word – Excel – Powerpoint (orta Derecede)
- Adobe Photoshop CS3 Orta Derecede)
- Adobe Premier(Orta Derecede)
- Cyto Vision

Sertifikalar ve katıldığı Kongreler:

- TS EN ISO 9001:2001 Kalite yönetimi sistemi sertifikası
- 14.Biyoteknoloji kongresi
- TÜBA 4.KÖK Hücre Sempozyumu
- 11.Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi