

T.C.

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

Patoloji Anabilim Dalı

**GLİOBLASTOMLARDA NÖRONAL DİFERANSİYASYON, EGFR AŞIRI
EKSPRESYONU VE EGFR GEN AMPLİFİKASYONUNUN
BİRBİRLERİYLE VE PROGNOZLA İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Fazilet Uğur Duman

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Aydın İŞİSAĞ

Manisa, 2012

Patoloji eğitimim ve tez hazırlığım boyunca bilgisini, desteğini ve anlayışını benden esirgemeyen, yol göstericim, tez hocam Prof. Dr. Aydın İşisağ'a, deneyimlerini benimle paylaşan, meslek hayatıma katkılarını asla unutmayacağım Prof. Dr. Ali Rıza Kandiloğlu'na, bilgisi yanında enerjisi ve titizliğiyle kendisinden çok şey öğrendiğim Prof. Dr. Semin Ayhan'a, sabrı, şefkati ve öğretmedeki ustalığıyla bana çok şey katan Doç. Dr. Peyker Temiz'e, eğitimimin her aşamasında bana destek olan, mesleğe ve hayata yaklaşımını her zaman örnek aldığım Doç. Dr. Nalan Neşe'ye, birlikte çalışmaktan büyük zevk aldığım asistan arkadaşlarıma, patoloji laboratuvarında görevli tüm teknisyen ve arşiv görevlisi arkadaşlarıma, hayattaki en büyük destekçilerim olan aileme ve bana sınırsız anlayış ve yardımını sunan, varlığıyla bana güç veren sevgili eşime teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Fazilet Uğur Duman

İÇİNDEKİLER

I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER.....	2
1. Glioblastom	2
i. Genel özellikler	2
ii. Dev hücreli Glioblastom.....	17
iii. Gliosarkom.....	18
iv. Gliofibrom	20
2. Sinaptofizin	21
3. Nörofilament proteini.....	21
4. Glial fibriler asidik protein	21
5. Nöronal nükleer antijen	22
6. Epidermal büyüme faktörü reseptörü	22
7. Ki-67.....	23
8. Glioblastomda nöronal diferansiyasyon	24
9. Hibridizasyon	24
III. GEREÇ VE YÖNTEM	31
IV. BULGULAR	41
V. TARTIŞMA	63
VI. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	72
VII. ÖZET	76
VIII. İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	78
IX. KAYNAKLAR	80

KISALTMALAR

CISH.....	Kromojen in situ hibridizasyon
DSÖ.....	Dünya Sağlık Örgütü
EGFR.....	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
FISH.....	Floresan in situ hibridizasyon
GB.....	Glioblastom
GFAP.....	Glial fibriler asidik protein
IHK.....	İmmunohistokimya
ISH.....	İn situ hibridizasyon
NEU-N.....	Nöronal nükleer antijen
NFP.....	Nörofilament proteini
PTEN.....	Fosfataz ve tensin homologu
SISH.....	Gümüş in situ hibridizasyon

GİRİŞ

Glioblastom (GB) en sık görülen ve en malign primer beyin tümörüdür. Tüm intrakranial neoplazmların yaklaşık olarak %12-15'ini ve astrositik tümörlerin %60-75'ini oluşturur.

GB'da nöronal diferansiyasyon, üzerinde fazla çalışılmamış bir konu olduğu gibi nöronal diferansiyasyonla Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) gen amplifikasyonunun ilişkisini araştıran çalışmalara literatürde rastlanmamaktadır. GB'da nöronal diferansiyasyon, EGFR aşırı ekspresyonu ve EGFR gen amplifikasyonunun prognostik önemi ile ilgili çelişkili yayınlar bulunmaktadır. GB'da klasik-pronöral-nöral-mezenkimal tümör ayrımı yeni yeni yapılmakta olup Dünya Sağlık Örgütü sınıflandırmalarında yer almamaktadır. Önümüzdeki yıllarda yapılması beklenen yeni sınıflamalara esas olmak üzere bu konularda yapılacak çalışmaların değerinin fazla olacağı açıktır. Son yıllarda EGFR, anti-EGFR ajanlarının kullanılmasıyla birlikte önemli bir terapötik hedef tedavisi haline gelmiştir. Dolayısıyla GB'larda EGFR gen amplifikasyonunu göstermek prognozu öngörmek yanı sıra tedaviyi belirlemek açısından da büyük yarar sağlamaktadır.

Bu çalışmada gerek nöronal diferansiyasyon gösteren gerekse göstermeyen tümörlerde EGFR aşırı ekspresyonu ile gen amplifikasyonunu araştırarak bu değişkenlerin birbirleriyle ve sağkalım süresiyle ilişkisini ortaya çıkarmak, patoloji raporlarında tedavi ve prognozla bağlantılı olarak nöronal diferansiyasyonun vurgulanmasının gerekliliğini araştırmak, dual immunohistokimya ile kromojen in situ hibridizasyon yöntemini kullanıma sokmak yanı sıra bahsedilen değişkenlerin tümör yerleşimi, radyolojik ve cerrahi özellikleri ve uygulanan tedavi yöntemleriyle ilişkisinin olup olmadığını açığa çıkarmak, ek olarak da demografik verileri ortaya koymak amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

GLİOBLASTOM

Tanım:

Glioblastom (GB), en sık görülen ve en malign primer beyin tümörüdür. Nükleer atipi, selüler pleomorfizm, mitotik aktivite, vasküler tromboz, mikrovasküler proliferasyon ve nekroz gibi histopatolojik özellikleri içeren, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından derece IV olarak nitelenen tümörlerdir. Çoğu glioblastom tanınabilir bir prekürsör lezyon olmadan, kısa bir öyküyü takiben *de novo* gelişir (primer GB). Sekonder GB ise DSÖ derece II diffüz astrositom ya da DSÖ derece III anaplastik astrositomlardan gelişir.

Sıklık:

GB en sık görülen beyin tümörüdür. Tüm intrakranial neoplazmların yaklaşık olarak %12-15'ini ve astrositik tümörlerin %60-75'ini oluşturur (1, 2). Çoğu Avrupa ve Kuzey Amerika ülkelerinde insidens 100.000 nüfusta her yıl 3-4 yeni vakadır.

Yaş ve cinsiyet:

Herhangi bir yaşta görülebilse de özellikle erişkinlerin hastalığıdır. Tümörün en sık ortaya çıktığı yaş aralığı 45-75'tir. Erkek-kadın oranı Amerika'da 1.26, İsviçre'de 1.28'dir.

Yerleşim:

GB sıklıkla serebral hemisferlerde, subkortikal beyaz cevherde izlenir. 987 glioblastom olgusunun ele alındığı büyük bir çalışmada temporal, pariyetal,

frontal ve oksipital loblarda yerleşim oranları sırasıyla %31, %24, %23 ve %16 olarak saptanmıştır (3). Kombine fronto-temporal lokalizasyon özellikle tipiktir. Tümör infiltrasyonu sıklıkla komşu kortekse ve kontrateral hemisfer içinde korpus kallozum boyunca ilerler. Bazal ganglia ve talamus yerleşimi özellikle çocuklarda nadir değildir. İntraventriküler GB nadirdir. Beyin sapı GB'u sık değildir ve daha çok çocuklarda görülür. Serebellum ve spinal kord bu tümör için nadir lokalizasyonlardır.

Klinik özellikler:

Neoplazm daha düşük dereceli bir astrositomdan gelişmediği sürece hastalığın klinik öyküsü genellikle kısadır (olguların yarısında 3 aydan kısadır). Baş ağrısı, bulantı, kusma, papilödem gibi intrakranial basınç artışı semptomları sıktır. Hastaların üçte birinden fazlasında epileptik nöbetler görülür. Baş ağrısı ve kişilik değişikliği gibi non-spesifik semptomlar da görülebilir.

Makroskopi:

Lezyon genellikle unilateraldir. Ancak beyin sapı ve korpus kallozumda bilateral ve simetrik. GB'lar kötü sınırlıdır. Santral nekroz alanını çevreleyen periferik hiperselüler zon makroskopik olarak yumuşak gri bir band şeklindedir. Santral nekroz total tümör kitlesinin %80'nini oluşturabilir. Makroskopik kistler bulunduğu zaman, diffüz astrositomlardaki retansiyon kistlerinden farklı olarak likefiye nekrotik tümör dokusunu yansıtan sıvı içerir. GB'ların çoğu belirgin olarak intraparakimaldir. Bazıları süperfisyal olup, leptomeningeal ve dura ile ilişkilidir. Bu lezyonlar cerrah ya da nöroradyolog tarafından metastatik karsinom ya da meningiom gibi ekstraaksiyal lezyon olarak yorumlanabilir.

Yayılım ve metastaz:

İnfiltratif yayılım tüm diffüz astrositik tümörlerin ortak bulgusu olmasına rağmen, GB'lar özellikle komşu beyin yapılarına hızlı invazyonları ile ünlüdür. Oldukça yaygın bir bulgu, tümör ekstansiyonunun korpus kallozum boyunca

karşı hemisfere girmesi, bilateral görüntü ve simetrik lezyon oluşumudur. (kelebek gliom). Benzer hızlı yayılım, internal kapsül, forniks, anterior komissür ve optik radyasyonda gözlenir. İnfiltratif büyüme hızlı olmasına rağmen subaraknoidal boşluğa uzanmaz. Bundan dolayı serebrospinal sıvı yoluyla metastaz nadirdir. Perivasküler boşluklar içinde ve boyunca yayılım diğer bir infiltrasyon biçimidir. Fakat vasküler lümen invazyonu nadir görülür. Ekstranöronal dokulara hematojen yayılım daha önce cerrahi işlem görmemiş hastalarda nadirdir. Ventriküloperitoneal şant yoluyla peritoneal metastaz gözlemlenebilir. Dura, venöz sinüs ve kemik penetrasyonu nadirdir.

Primer ve sekonder GB:

Primer ve sekonder GB tanımları ilk kez Scherer tarafından 1940'da kullanılmış ve klinik ve biyolojik görünüm açısından astrositomlardan gelişen sekonder GB'ların primer GB'lardan ayrılımları gerektiği bildirilmiştir.

Sekonder GB'lar muhtemelen uzun klinik süreli GB'ların çoğunu oluşturmaktadır. Tüm GB'ların yaklaşık %10'unu oluşturan bu tümörler daha genç hastalarda (ortalama 45 yaş) görülür ve diffüz astrositomları takiben 1-10 yıl (ortalama 4-5 yıl) arasında ortaya çıkar.

GB'ların %90'dan fazlası ise, daha yaşlı hastalarda (ortalama 62 yaş), öncesinde klinik bulgu olmaksızın genellikle 3 aydan kısa bir sürede hızla gelişir. (primer ya da *de novo* GB). Sekonder GB'da yaşam süresi (ortalama 7.8 ay) primer GB'lardan (ortalama 4.7 ay) daha uzundur. Bu durumda, sekonder GB'lu hastaların daha genç olmasının bir etkisi de olabilir. Farklı genetik yollardan gelişmeleri, farklı yaş gruplarını etkilemeleri ve tedaviye yanıtlarının farklı olmaları, primer ve sekonder GB'ların farklı antiteler olarak ele alınmasını gerektirmektedir (3).

Histopatoloji:

GB, kötü diferansiye, sıklıkla pleomorfik, belirgin nükleer atipi ve mitotik aktivite gösteren astrositik hücrelerden oluşan anaplastik, selüler bir gliomdur. Belirgin mikrovasküler proliferasyon ve/veya nekroz esas tanısal özelliklerdir. Glioblastoma multiforme terimi bu tümörün görünüm çeşitliliğini

ifade eder. Bazı lezyonlar yüksek derecede selüler ve çok sayıda multinükleer dev hücrelerle karakterli nükleer pleomorfizm gösterirken bazıları selüler fakat monotondur. Lezyonun astrositik doğası en azından fokal alanlarda kolayca tanınabilir. Fakat bazı tümörleri yüksek dereceli anaplazi içermelerinden dolayı tanımak güç olabilir. GB'daki bölgesel heterojenite özellikle stereotaksik biopsiye dayanan tanılarda ciddi zorluklara yol açabilir.

Doku paternleri:

GB'larda tanı, tipik olarak ana hücre tipinin belirlenmesinden çok doku paternine bağlıdır. Oldukça anaplastik glial hücrelerin, mitotik aktivitenin, vasküler proliferasyonun ve/veya nekrozun varlığı gereklidir. Bu anahtar özelliklerin tümör içinde dağılımı çeşitlidir. Ancak geniş nekrotik alan, genellikle tümörün ortasını işgal eder. Tümör hücreleri periferde toplanma eğilimindedir. Vasküler proliferasyon esas olarak nekroz çevresinde ve periferel infiltrasyon zonunda olmakla birlikte tüm lezyon içinde görülebilir.

Sekonder yapılar:

GB hücreleri, bariyer oluşturan sınırlara ulaştıkları zaman kolayca görülürler. Tümör hücrelerinin kortikal subpial zonda, subependimal bölgede, damarlar çevresinde ve nöronların etrafında (satellitozis) birikmesi oldukça karakteristiktir ve "sekonder yapılar" olarak adlandırılırlar. Bu yapılar gliomatozis serebri ve oligodendrogliom gibi diğer oldukça infiltratif gliomlarda da görülebilir. Sıklıkla hastalığın terminal döneminde, subependimal bölge diffüz olarak infiltre olur. Sekonder yapılar, santral sinir sisteminde glial hücrelerinin göç yollarını gösterir.

Epitelyal yapılar:

Seyrek olarak GB'lar glandüler ve bant şeklinde epitelyal odaklar içerir. Bu elemanlar büyük oval nükleus, belirgin nükleolus ve yuvarlak iyi sınırlı sitoplazmaya sahiptir. Bu lezyonların izlendiği tümörler "adenoid GB" olarak

da isimlendirilir. Bu alanlarda GFAP ekspresyonu azalmış olabilir de, bu yapıların astrositik doğası ortaya konabilir. Müsinöz zemin ve mezenkimal bir komponent (gliosarkom) bu tür tümörlerde yaygındır.

Heterojenite:

Az sayıda insan neoplazmı GB kadar heterojendir. Kötü diferansiye alanlarda fusiform, yuvarlak ve pleomorfik hücreler hakim olabilir. Daha diferansiye neoplastik astrositler, fokal olarak fark edilebilir. Bu durum özellikle diffüz astrositomun progresyonu sonucunda gelişen GB'lar için geçerlidir. Alanlar arasındaki geçiş hala tanınabilir.

Morfolojideki ani bir değişiklik, bir ya da daha fazla ek genetik değişikliklerin kazanılmasıyla, yeni bir tümör fenotipini yansıtabilir (4). Selüler pleomorfizm, küçük indiferansiye, lipidize, granüler ve dev hücreleri içerir. Ek olarak sıklıkla bipolar fusiform hücrelerin kesiştiği demetler ve fasiküllerin hakim olduğu alanlar vardır. İyi sınırlı plazma membranlı oldukça pleomorfik tümör hücrelerinin birikimi ve hücre uzantılarının yokluğu, metastatik karsinomu ya da melanomu taklit edebilir.

Küçük hücreli GB:

GB'da küçük hücreler görülebilmesine karşın, bu hücreler baskın olduğunda "küçük hücreli GB" olarak isimlendirilir (5). Bu tümörler yüksek nükleo-sitoplazmik oranlı, hafif atipili ve hiperkromatik nükleuslu, yuvarlak ya da elonge, küçük monomorfik hücre popülasyonu ile karakterlidir. Glial fibriler asidik protein (GFAP) immunreaktivitesi minimal olabilir. Bu tümörler az diferansiye anaplastik oligodendrogliomdan ayrılmalıdır. Küçük hücreli GB'lar yüksek proliferasyon aktivitesine sahiptir.

Oligodendrogliom komponentli GB:

Bazen GB'lar oligodendroglioma benzer odaklar içerirler. Bu alanlar değişken boyutta ve sıklıktadır. Hem oligodendrogliyal hem de astrositik komponenti olan anaplastik gliomlarda nekroz, belirgin olarak kötü prognozla

ilişkilidir. Bu tümörler "oligodendrogial komponentli GB" olarak sınıflandırılır. Standart GB'lara göre daha iyi prognozludurlar.

Multinükleer dev hücreler:

Artmış boyut ve pleomorfizm gösteren büyük multinükleer tümör hücreleri sıklıkla GB'un işareti olarak kabul edilir. Tipik olarak bulunduğu, multinükleer dev hücrelerin varlığı daha malign klinik gidiş ile ilişkili değildir. Malign görünümüne rağmen, bu hücreler regresif değişiklik olarak kabul edilirler. Multinükleer dev hücreler baskın histolojik yapıyı oluşturuyorsa tümör "dev hücreli GB" olarak isimlendirilir.

Gemistositler:

GB'da çeşitli yoğunlukta gemistositler ve fibriler astrositler vardır. Gemistositler bol, parlak, fibriler olmayan sitoplazmaya; koyu, anguler, periferik yerleşimli nükleusa sahiptir. Uzantılar sitoplazmadan her yöne doğru olup kısa ve kütüttür. GFAP boyanması çoğunlukla hücrenin periferine sınırlıdır. Santral zon genelde boyanmaz. Perivasküler lenfositler sıklıkla gemistositik bölgelerde birikir.

İmmunhistokimyasal çalışmalar, neoplastik gemistositlerde, proliferasyon indeksinin düşük olduğunu vurgular. Buna rağmen, DSÖ derece II veya III gemistositik astrositler GB'a hızla ilerlemeye yatkındır. Daha iyi diferansiye alanlar, radyolojik olarak kontrast tutmayan periferik bölge olarak belirlenebilir. Radyolojik olarak tüm beyin kesitlerinde Derece II-III astrositom, GB odağından açıkça farklıdır.

Granüler hücreler:

PAS pozitif sitoplazmalı granüler büyük hücreler GB içinde dağınık olarak görülebilir. Nadir olgularda dominant olabilir ve granüler hücreli tümör izlenimi oluşturabilir. Bazı olgularda, serebral hemisferde granüler hücreler ile neoplastik astrosit arası geçiş formu tanımlanmıştır. Granüler hücreler daha büyük ve kaba granüler olduğunda makrofajlara da benzer.

Lizozomal içeriklerinden dolayı tümör hücreleri CD68 gibi makrofaj

belirleyicileri ile immunreaktivite gösterebilir. Nadiren GFAP ile periferik immun pozitiflik olabilir, fakat çoğu hücre negatiftir. Granüler hücrelerin gliom hücrelerinin farklı bir dejeneratif yolağını temsil ettiği düşünülmektedir.

Lipidize hücreler:

Köpüklü sitoplazmalı hücreler GB'larda seyrek olarak gözlemlenen bir özelliktir. Nadir vakalarda baskın olabilir ve bu tümörler lipidize (köpüklü) hücreli GB olarak isimlendirilirler. Eğer bu lezyonlar genç bireylerde süperfisyal olarak yerleşmiş ve özellikle ksantomatoz hücreler retikülün ile pozitif boyanan bazal membran ile çevrelenmişlerse, pleomorfik ksantoastrositom ayırıcı tanısı akılda tutulmalıdır.

Perivasküler lenfositler:

Perivasküler lenfositik topluluklar GB'ların az bir kısmında izlenir. Tipik olarak gemistositik komponentin olduğu alanlarda bulunur. CD8 (+) T lenfositler baskındır ve perivasküler lenfositlerin baskın olduğu tümörlerin yaklaşık %75'inde görülür. CD 4 (+) lenfositler daha az sayıdadır. B lenfositler %10'dan daha az sayıda olguda saptanır. CD44 ve ICAM-1 ekspresyonu gliom hücrelerinde gözlenirken, tümörü infiltre eden lenfositlerde izlenmez. Perivasküler lenfosit infiltrasyonunun tümör büyümesine etkisi olup olmadığı tartışmalı bir konudur. Bazı çalışmalar yararlı bir etki gösterirken, bazıları hastaların yaşam süresi ile korele olmadığını belirtmektedirler.

Metaplazi:

Sıklıkla epitelyal dokuların preneoplastik lezyonları olarak gözlenir. Bu terim neoplazmlarda aberan diferansiyasyon tanımlamasında da kullanılır. GB'larda skuamöz epitel özelliği sergileyen odaklar izlenebilir. Adenoid ve skuamöz epitelyal metaplazi gliosarkomda klasik GB'dan daha yaygındır. Bu kemik ve kırık oluşumu için de geçerlidir.

Mikrovasküler proliferasyon:

Nekroza ek olarak mikrovasküler proliferasyonun bulunması GB'un

histopatolojik işarettir. Işık mikroskopunda klasik mikrovasküler proliferasyon tipik olarak nekrozun çevresine lokalize glomerüloid yumaklar olarak görülür. Histolojik olarak mikrovasküler proliferasyonlar tipik olarak çok tabakalı, mitotik olarak aktif endotelial hücreler, düz kas hücreleri ve perisitler ile birliktedir. Morfolojik olarak göze çarpmayan damarların MIB-1 indeksi %2-4 iken, proliferatif tümör damarlarında %10'un üzerindedir. Vasküler tromboz sıkça izlenir ve iskemik tümör nekroz patogeneğinde rolü olabilir.

Proliferasyon:

Proliferatif aktivite genellikle belirgindir. Atipik mitoz sıklıkla izlenir. Mitotik aktivite ve Ki-67/MIB-1 proliferasyon indeksi tümör içerisinde bölgesel heterojenite gösterir. Ortalama Ki-67 indeksi %15-20 olarak bildirilmiştir. Tipik olarak daha az proliferasyon derecesine sahip neoplastik gemistositlerden oluşan tümörlerin tersine, küçük, indifferansiyel, fusiform hücrelerden oluşan tümörler belirgin proliferatif aktiviteye sahiptir. GB'larda proliferasyon indeksi ve klinik gidiş arasındaki ilişki henüz kanıtlanamamıştır (6).

Nekroz ve apoptoz:

Nekroz GB'un temel özelliğidir ve varlığı, agresif klinik davranışın en güçlü öngörülerinden biridir. Nekroz, radyolojik olarak kontrast tutmayan korlar olarak görülebilir ve total tümör kitlesinin %80'inden fazlasını oluşturabilir. Bu alanlar makroskopik olarak sarı ya da beyaz granüler alan olarak görülür. Mikroskopik olarak, nekrotik gliom hücreleri belli belirsiz seçilebilir. Nekroz alanları genellikle çok sayıda fagositi kendine çekmez. Seyrek olarak yoğun nekroz içinde canlı tümör hücrelerinin kümeleri ile korunmuş tümör damarları görülür. Bu geniş nekrozun yetersiz kan kaynağına bağlı olduğu kabul edilir. Nekrozun ikinci formu, multipl, küçük, düzensiz şekilli band benzeri ya da serpijinöz alanlardan meydana gelir. Bu psödopalizadlanan nekroz primer ve sekonder GB'larda eşit sıklıkta görülür. Daha küçük psödopalizadlanan yapıların merkezinde yaşayan ya da nekrotik gliom hücreleri olmaksızın ince fibriller bir ağ izlenirken, daha büyük psödopalizadlanan yapıların merkezi her zaman nekroz içerir.

Komşuluğundaki tümör hücresi ile kıyaslandığında, psödopalizadlanan hücreler daha yüksek apoptoz oranı ve daha düşük proliferasyon oranı içerir. Malign gliomlarda koagülasyon nekrozuyla kıyaslandığında, apoptoza bağlı hücre ölümleri daha azdır ve apoptotik hız prognozla korele değildir.

Genetik:

Nöroepitelyal hücrelerin malign transformasyonu çok basamaklı genetik değişiklikler sonucu meydana gelir. TP53 mutasyonu, kromozom 10 ve 17p'de heterozigosite kaybı (LOH) ve EGFR amplifikasyonu GB'da bildirilen farklı genetik değişikliklerdir (7).

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor):

EGFR kromozom 7 üzerinde lokalize, 170 kDA molekül ağırlığında, hücre proliferasyonunun kontrolünde yer alan bir transmembran proteindir. EGF ve TGF- α gibi ekstraselüler ligandlara bağlanarak proliferasyon sinyallerini başlatır. EGFR, GB'da en sık amplifiye olan gendir (8). EGFR amplifikasyonu aşırı ekspresyonla ilişkilidir. EGFR amplifikasyonlu tüm GB'lar EGFR aşırı ekspresyonu gösterir ve EGFR aşırı ekspresyonu gösteren hastalarda %70-90 EGFR amplifikasyonu gözlenir (9). EGFR amplifikasyonu primer GB'ların yaklaşık %40'ında görülürken sekonder GB'larda nadirdir (3,10-20). 35 yaş altındaki GB hastalarının hiçbirinde EGFR amplifikasyonu saptanmamıştır. EGFR geni bazen yapısal değişikliklerle ilişkilidir ve birkaç varyantı tanımlanmıştır. En iyi bilineni EGFR vIII varyantıdır (20). EGFR vIII varyantı, EGFR amplifikasyonlu GB'ların %20-50'sinde bulunur. Yapısal ve fonksiyonel olarak v-erbB'ye benzerdir. Temel olarak liganddan bağımsız bir yolla PI3-kinaz, RAS ve mitojen aktive protein kinaz sinyal aracılığıyla hücre proliferasyonuna yol açar. EGFRvIII, hedefe yönelik tedavide ümit vericidir (21). EGFR nokta mutasyonları Avrupa ve Asyalı GB hastalarında nadirdir (%3-5).

PI3K/PTEN/AKT yolağı:

EGFR ya da diğer büyüme faktör reseptörleri büyüme faktörlerini (EGF,TGF- α) bağlayarak aktive olur ve PI3K'yı (fosfatidilinositol 3-kinaz) hücre membranına toplar. PI3K, PIP2'yi (fosfatidinositol-4,5-bifosfat) PIP3'e dönüştürür. PIP3 ise AKT gibi efektör molekülleri akım yönünde aktive ederek hücre proliferasyonunu sağlar. PTEN (fosfataz ve tensin homolog) geni 10q23.3'de lokalizedir. Protein fosfataz ve 3' fosfoinositol fosfataz aktivitesinde önemli olan protein tirozin fosfataz katalizörü olan bir proteini kodlar. PTEN mutasyonu özellikle primer GB olgularında olmak üzere, olguların %15-40'ında görülür (22,23).

TP53/MDM2/p14^{ARF} yolağı:

TP53 geni 17p13.1'de lokalize olup hücre siklusu, DNA hasarına yanıt ve neovaskülarizasyon gibi pekçok hücre sel süreçte rol oynar. DNA hasarını takiben p53 aktive olur ve gen transkripsiyonuna neden olur. MDM2 geni, mutant ve wild-tip p53'ü bağlayan 54 kDa molekül ağırlığında bir proteini kodlar. P53 ile kompleks oluşturan MDM2 proteini, onun transkripsiyonel aktivitesini yok eder. Bu yüzden, MDM2 amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonu, p53'ün düzenlediği hücre büyüme kontrolünden kaçışın alternatif yoludur. Kromozom 9p21'de lokalize CDKN2A kompleksinin bir parçası olan p14^{ARF} geni, direkt olarak MDM2'ye bağlanan ve MDM2 aracılı p53 azalmasını inhibe eden bir protein kodlar. Tersine p14^{ARF}, p53 tarafından negatif düzenlenir. Bu nedenle, p53 fonksiyon kaybı, TP53, MDM2 yada p14^{ARF}'nin herhangi birinin bozulmuş ekspresyonuna neden olur. TP53 mutasyonu sekonder GB'ın genetik bir işaretidir (>%65) ve prekürsör düşük dereceli astrositom ve anaplastik astrositomların hemen hemen hepsinde bulunur (10). TP53 mutasyonu primer GB'da daha az sıklıkta görülür (yaklaşık %25). MDM2 aşırı ekspresyonu immunohistokimyasal olarak primer GB'ların 50'sinden fazlasında saptanmıştır. P14^{ARF} kaybı GB'da sıktır (%76).

P16^{INK4a}/CDK4/RB1 yolağı:

Bu sinyal yolağı, hücre siklusunda G1'den S fazına geçiş kontrolünde önemlidir. RB1 geni retinoblastom (RB1) proteinini kodlar. CDK4/Siklin D1 kompleksi, RB1 proteinini fosforiller ve böylece G1-S transizyonu ile ilişkili genleri aktive eden E2F transkripsiyon faktör salınımını indükler. P16^{INK4a} CDKN2A2'nin diğer gen ürünüdür ve hücre büyümesini siklin bağımlı kinazlardan Cdk4 ve Cdk6'yı inhibe ederek kontrol eder. P16 ekspresyon kaybı durumunda, Cdk'ların aşırı ekspresyon ve amplifikasyonu veya RB fonksiyon kaybı sonucunda hücre siklusunun kontrolü bozulur. Bu yoldaki bozukluklar primer ve sekonder GB'ların her ikisinde de yaklaşık %40-50'nin üzerinde görülür.

Kromozom 10 kaybı:

10p, 10q23 ve 10q25-26 lokuslarında veya tüm kromozom 10'da LOH, GB'larda en sık görülen genetik değişikliktir. Tümör supresör gen olan PTEN, GB'ların yaklaşık %30'unda mutasyona uğramıştır. DMBT1 ("the deleted in malignant brain tumors") geni kromozom 10q25-26'da yerleşir ve tümör supresör gendir. GB'ların %23-38'inde delesyonları görülür.

Diğer kromozomal lokusların kaybı:

1p kaybı primer ve sekonder GB'larda benzer sıklıkta görülür (%12-15). 19q kaybı sekonder GB'larda daha sıktır (%54). 22q kaybı tüm gliomlarda %20-30 oranında görülür.

GB'da birlikte bulunan genetik değişiklikler:

10q kaybı en sık görülen genetik değişiklik olup aynı zamanda diğer genetik değişiklikler ile birlikte görülür. EGFR amplifikasyonu tipik olarak p16 delesyonu ile ilişkilidir. Tp53 mutasyonu, EGFR amplifikasyonu ve PTEN mutasyonu ters ilişkilidir (14).

Genetik değişiklikler ve histolojik özellikler arasındaki korelasyon:

Küçük hücreli GB fenotipi sıklıkla EGFR amplifikasyonu, p16 delesyonu, PTEN mutasyonu ve 10q kaybı gösterir. %5'in üzerinde multinükleer dev

hücre içeren GB'lar sıklıkla TP53 mutasyonu ile ilişkilidir. EGFR amplifikasyonu nadirdir.

Ekspresyon profilleri:

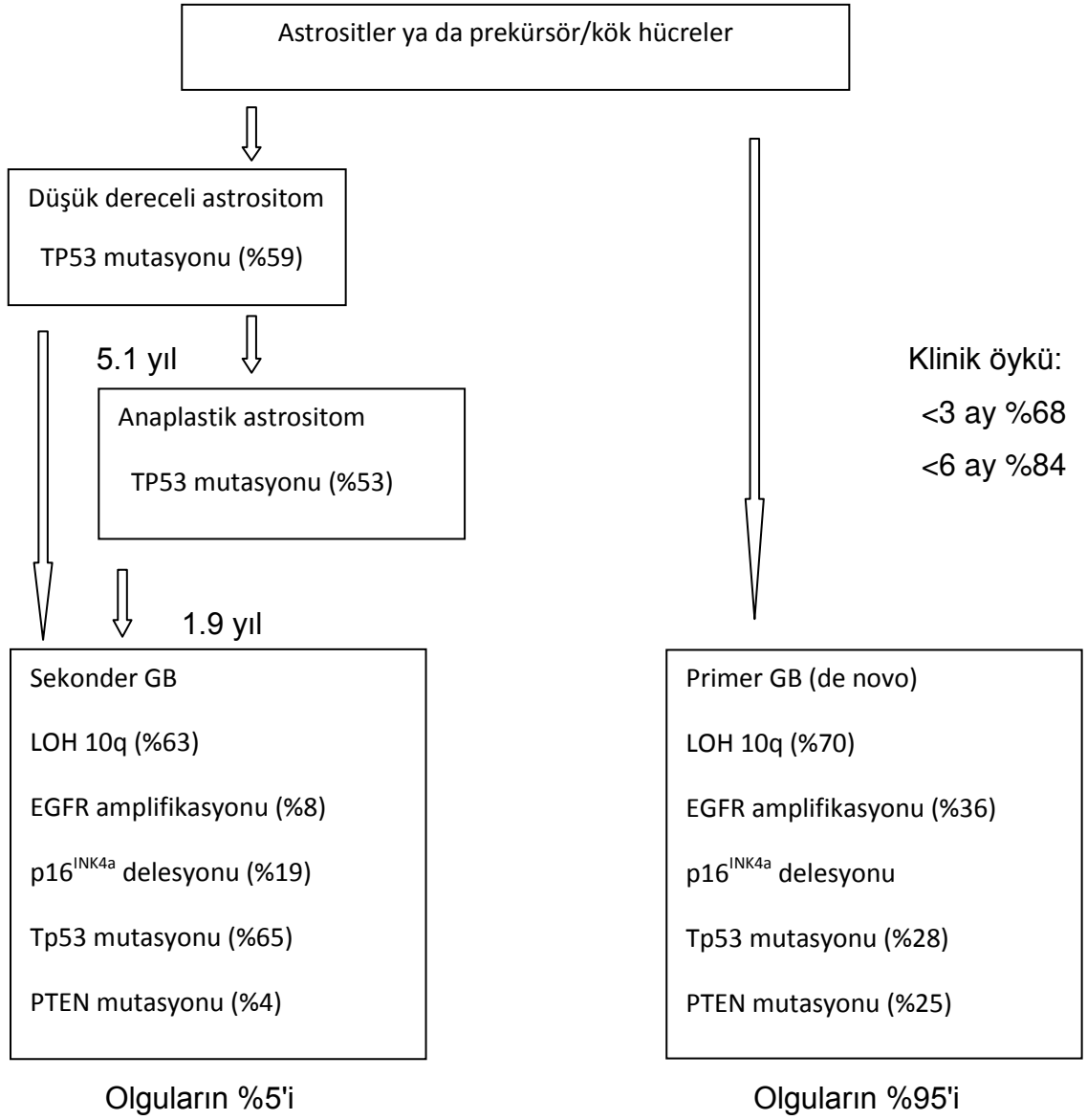
GB'lar ekspresyon paternlerine dayanarak pilositik astrositom, düşük dereceli astrositom, anaplastik astrositom ve oligodendrogliomdan ayrılabilirler (24). Bununla birlikte GB olguları arasında ekspresyon paternleri oldukça değişkendir (25). Yapılan çalışmalar, GB'un tipik olarak büyüme faktörü, angiogenezis ve hücre göçü ile ilişkili genlerin aşırı ekspresyonunu gösterdiklerini ortaya koymaktadır (26). EGFR aşırı ekspresyonu gösteren GB'lar farklı bir global gen transkripsiyonel profili içerirler. EGFR aşırı ekspresyonu gösteren GB'lar ve EGFR aşırı ekspresyonu göstermeyen GB'ların farklı gen ekspresyon profilleri vardır (27). Primer ve sekonder GB'lar da ayrıca farklı ekspresyon profilleri içerirler (28).

Pediyatrik GB:

Çocuklardaki GB'lar erişkinlerdekinden farklı bir genetik profil içerirler (29,30). Pediyatrik GB'lar genellikle de novo gelişmesine rağmen, erişkinlerdeki primer GB'lardan farklı genetik özellikler gösterirler. P53 mutasyonu sık olup (%40), EGFR amplifikasyonu (%6) ve p16^{INK4a} delesyonu nadirdir. MDM2 amplifikasyonu gözlenmez (31).

Genetik duyarlılık:

Bir ailede birden fazla kişide GB görülebilir. Bu sıklıkla Turcot ve Li-Fraumeni sendromları, nörofibromatozis tip 1 ve multipl enkondromatozis gibi kalıtsal tümör sendromlarında izlenir.



Şekil 1: GB'da genetik özellikler. (3)

Prognostik faktörler:

Beyin tümörlerinde operasyon, radyoterapi ve kemoterapinin gelişmesine rağmen, GB hastalarının prognozu oldukça kötüdür. İsviçre ve Kanada'da yapılan retrospektif çalışmalara göre, hastaların %20'sinden azı 1 yıldan, %3'ten azı da 3 yıldan fazla yaşamaktadır (2,3). İyileşme eğilimi daha fazla ve yüksek preoperatif Karnofsky performans skoru olan genç hastalarda yaşam süresi ortalama 12 ay olup klinik gidiş daha iyidir. Tanı anında genç

yaş, gros total eksizyon ve kombine radyoterapi ve kemoterapi en önemli prognostik faktörlerdir.

Yaş:

Daha genç GB hastalar (tanı anında <50 yaş) belirgin olarak daha iyi prognoza sahiptir. Yapılan bir çalışmada yaşın en belirgin prognostik faktör olduğu vurgulanmıştır (3,32,33). Sekonder GB'lu hastalar primer GB'lu hastalardan daha uzun yaşam süresine sahiptir.

Histopatoloji:

Nekrozun varlığı ve yaygınlığı kısa yaşam süresi ile ilişkilidir (34).

Genetik değişiklikler:

Literatürde TP53 mutasyonunun prognostik değeri olmadığını ya da iyi prognozla ilişkili olduğunu belirten tutarsız veriler bulunmaktadır. EGFR amplifikasyonu ve yaşam süresi ile ilişkili tutarlı bir korelasyon bulunmamaktadır (35). Kromozom 10 kaybı, GB'da izlenen en sık genetik değişikliktir ve kısa yaşam süresi ile ilişkilidir. PTEN mutasyonunun prognozla ilişkili olmadığını belirten yayınlar bulunmaktadır (3,14,36,37).

Tedavi yanıtının mekanizması:

GB tedaviye oldukça dirençlidir. Sadece agresif cerrahi rezeksiyon, eksternal radyoterapi ve temozolomid ya da nitrosürea gibi ajanlarla maksimum dozda kemoterapi alabilen az sayıda hastada yaşam süresi daha uzayabilir. Terapötik direncin başlıca nedenleri:

1- Kan-beyin bariyeri parsiyel koruması ve tümörün interstisiyel basınç yüksekliği

2- Herhangi tek bir terapötik yaklaşıma dirençli hücrelerin klonal popülasyonu ile sonuçlanan genotipik ve fenotipik heterogeniteye neden olan, gen amplifikasyonu, heterozigosite kaybı, kromozom delesyonu ve yeniden düzenlenimi ile nokta mutasyonları tarafından üretilen genom instabilitesi

3- Malign hücrelerin korpus kallozuma geçmesi, beyin sapı ve spinal korda yayılması ve intakt kan-beyin bariyerinin arkasında bulunmasını sağlayan invaziv özellikler

4- Direnç mekanizmalarını barındıran nöral kök hücre benzeri hücre popülasyonunun varlığı

5- Radyoterapi ve kemoterapinin etkilerini yok eden DNA onarım mekanizması retansiyonu

GB'da moleküler anormallikler, terapiye duyarlılık ya da direnç mekanizmalarından sorumludur. TP53 yolağındaki inaktivasyon apoptoz ve hücre siklusunun arrestine neden olur. Hem primer hem de sekonder GB'da retinoblastom yolağındaki mutasyon, hücre siklusunda bozukluğa yol açar (38). Ras geninde nokta mutasyon nadir olmasına karşın, Ras yolağı IGFR, EGFR ve PDGFR sinyal aracılığıyla sekonder olarak aktive olur. Benzer olarak PI3K yolağı, anormal IGF1, EGF yada PDF sinyalleri ya da PTEN geni anormallikleri aracılığıyla aktive olabilir. Bu sinyal yolağı anormallikleri GB tedavisinde bir tek, spesifik, küçük molekül sinyal yolağı inhibitörünün etkisiz olabileceğini göstermektedir.

Bir EGF tirozin kinaz inhibitörü olan gefitinib ile yapılan bir çalışmada, minimal bir yanıt saptanmıştır. Diğer taraftan EGFRvIII ve PTEN için yapılan GB biopsilerinde hastaların erlotinib ya da gefitinib EGFR kinaz inhibitörlerine duyarlı oldukları tanımlanabilmiştir. Bu durum bize GB'da sık rastlanan mutasyonların, bu terapötik yaklaşımları gerek gördüklerini düşündürmektedir (39).

Büyüme faktörü ya da reseptörlerine duyarlı monoklonal antikorlar, küçük-molekül sinyal transdüksiyon inhibitörleri, selüler immunoterapideki gelişmeler, terapötik taşıyıcı ya da terapi olarak nöral kök hücrelerin kullanımı ve tümör kök hücreleri gibi çoklu yeni moleküler hedef terapilerinin hepsi, GB tedavisindeki gelişmelerin kanıtıdır.

Dev hücreli GB:

Tanım:

Bizar multinükleer dev hücrelerin hakim olduğu, ara sıra yoğun stromal retikülin çatı ve yüksek sıklıkta TP53 mutasyonu ile birlikte olan histolojik bir GB varyantıdır.

İnsidens:

Dev hücreli GB nadir bir varyanttır. Tüm beyin tümörlerinin %1'inden azını, GB'ların %5'ini oluşturur.

Yaş ve cinsiyet dağılımı:

Ortalama 41 yaşında görülür. Ancak bu tümörlerin yaş dağılımı diğer diffüz astrositomlardan daha geniş bir yelpazeyi kapsar, çocukları da içine alır. Erkek ve kadınlar eşit olarak etkilenir.

Semptom ve bulgular:

Dev hücreli GB, klinik ve radyolojik olarak daha az malign öncü lezyon olmaksızın kısa bir klinik öyküyü takiben de novo gelişir. Semptomlar klasik GB'a benzerdir.

Histopatoloji:

Çok sayıda dev hücreler, küçük, fusiform sinsityal hücreler ve çeşitli dereceye kadar retikülin çatı ile birlikte olan GB'dur. Dev hücreler lipidize olabilir. Nükleus sayısının dağılımı birkaç taneden 20'den fazlaya kadar değişir. Bazen sitoplazmik inklüzyonlar içerebilir. Atipik mitoz sıktır. Dev hücreler S-100, vimentin, p53 ve EGFR pozitif olup GFAP ekspresyonu değişkendir (40, 41). Nöronal belirleyiciler pleomorfik ksantoastrositomun tersine negatiftir (42).

Genetik:

Dev hücreli GB'lar sıklıkla TP53 mutasyonları (olguların %75-90'ında) ve PTEN mutasyonları (%33) ile birlikte dir. Fakat tipik olarak EGFR amplifikasyonu/ aşırı ekspresyonu yoktur (43).

Kısa klinik öykü, malign prekürsör lezyon olmayışı, PTEN mutasyonunun sıklığı ile dev hücreli GB, primer GB'a benzer. Sekonder GB'larda TP53 mutasyonu sıktır.

Prognostik faktörler:

Çoğu dev hücreli GB'lar kötü bir prognoza sahiptir. Ancak bazı yayınlarda muhtemelen daha az infiltratif davranışı nedeniyle klinik gidişin klasik GB'dan daha iyi olduğu bildirilmiştir.

Tablo 1: Primer, sekonder ve dev hücreli GB'un klinik ve genetik profili

	Primer GB	Dev hücreli GB	Sekonder GB
Klinik başlangıç	De novo	De novo	Sekonder
Preoperatif öykü	1,7 ay	1,6 ay	>25 ay
Tanı anında yaş	55	42	39
K:E oranı	1.4	1.1	0,8
PTEN mutasyonu	%32	%33	%4
EGFR amplifikasyonu	%39	%5	%0
TP53 mutasyonu	%11	%84	%67
P 16 ^{INK4a} delesyonu	%36	%0	%4

Gliosarkom:

Tanım:

Glial ve mezenkimal diferansiyasyon sergileyen bifazik doku paterni ile karakterize bir GB varyantıdır.

İnsidans, yaş ve cinsiyet dağılımı:

GB'ların %2'sini oluşturur. Yaş dağılımı GB'a benzer. Dağılım 40 ile 60 arası değişir. (ortalama 52.1) Nadiren çok genç ve çocuk hastada görülebilir. Erkeklerde daha sık görülür.

Lokalizasyon:

Genellikle serebral hemisferde lokalize olup azalan sıklıkla temporal, frontal, pariyetal ve oksipital lobda izlenir.

Semptom ve bulgular:

Semptomlar tümör lokalizasyonunu ve artmış intrakranial basıncı yansıtır. Klinik öykü genelde kısadır.

Histopatoloji:

Gliomatöz ve mezenkimal diferansiyasyon sergileyen alanlardan oluşan bifazik patern gliosarkom tanısı için esastır. Glial alanlar GB'un tipik özelliklerini sergiler. Glial odaklarda skuamöz metaplazi ve bez benzeri yapılar ile karakterli karsinomatöz özellikler sergileyen epitelial diferansiyasyon alanları görülebilir. Sarkomatöz alanlar, sıklıkla içsi hücrelerin gruplaşmış uzun demetleri ile karakterli fibrosarkomun tipik paternini gösterir. Bazen histoloji malign fibröz histiositoma benzer. Sarkomatöz komponentte nükleer atipi, mitotik aktivite ve nekroz gibi malign transformasyon bulguları da görülür. Bazı tümörlerde kıkırdak, kemik, osteoid-kondral doku, düz ve çizgili kas ve lipomatöz özellikler gibi mezenkimal diferansiyasyon alanları da görülebilir.

Mezenkimal alanlarda kollogen birikimi trikrom boyası ile gösterilebilir. Benzer olarak retikulin boyası geniş bağ dokusu liflerini gösterir. Bu komponent GFAP eksprese etmez. GFAP negatif malign mezenkimal komponenti tanımak, gerçek gliosarkomu florid fibroblastik proliferasyon gösteren GB'dan ayırmak için oldukça önemlidir.

Genetik:

Gliosarkom PTEN mutasyonu (%38-45), p16^{INK4a} delesyonu (%38) ve TP53 mutasyonu (%23-24) içerirken EGFR amplifikasyonu nadirdir (%0-8). EGFR amplifikasyonu dışında bu bulgular primer glioblastoma benzer bir profildir (44). Kromozom 7 (%75), X (%20), 9q ve 20q'da (%15) artış ile kromozom 10 ve 9p (%35) ve 13q'da (%15) kayıp bildirilmiştir. Gliomatöz ve sarkomatöz komponentte monoklonal orjini gösteren benzer genetik değişiklikler tanımlanmıştır.

Tablo 2: Primer GB ve gliosarkomda genetik ve klinik profil

	Primer GB	Gliosarkom
Preoperatif öykü	1.7 ay	2 ay
E:K	1.4	1.65
Tanı anında yaş	55	56
TP53 mutasyonu	%11	%23
PTEN mutasyonu	%32	%38
P16 ^{INK4a} delesyonu	%36	%37
MDM2 amplifikasyonu	%8	%5
EGFR amplifikasyonu	%39	%0

Prognoz:

Gliosarkomun klasik glioblastomdan daha iyi prognoza sahip olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Ancak geniş klinik deneyimler klinik gidişte anlamlı bir fark ortaya koymamıştır.

Gliofibrom:

Genellikle çocuklarda izlenen çok nadir bir tümördür. Yaş aralığı 11 gün-54 yaşa kadar değişken olup ortalama 14'tür. Kadınlarda biraz daha sıktır. Sıklıkla serebrumda (%36) ve spinal kordda (%28) izlenir. Düşük ya da yüksek dereceli diferansiyasyon alanları içeren glial komponent ve non-sarkomatöz fibroblastik komponentten oluşan bifazik bir tümördür. Nekroz ve vasküler mikroproliferasyon gliofibromun tipik özelliği değildir. Selülarite,

nükleer pleomorfizm ve artmış mitotik aktivite nadirdir ve daha agresif klinik gidişi gösterir. Bu tümörler "malign ya da anaplastik gliofibrom" olarak isimlendirilir. Prognoz genelde daha iyidir. Tümörlerin çoğunda rezeksiyondan yıllar sonra rekürrens ve metastaz izlenmez.

SİNAPTOFİZİN:

Nöronal presinaptik veziküllerden izole edilen molekül ağırlığı 38000 olan major glikosil transmembran glikoproteindir. Nöroektodermal ve nöroendokrin tipte normal, reaktif ve neoplastik hücrelerde eksprese edilir. Sinaptofizin immunreaktivitesi primer santral sinir sistemi tümörleri arasında, gliom spektrumu boyunca glionöronal tümörlerden en az diferansiye primitif nöroektodermal tümörlere dek geniş bir spektrumda gösterilmiştir (45). Sinaptofizin reaktivitesi, ya mikroveziküllerin dağılımına uygun granüler ya da punktat paternde hücrelerin periferinde ya da sitoplazmiktir. Astrositik tümörlerde sinaptofizin immunpozitifliği yayınlarda bildirilmiştir (46-48)

NÖROFİLAMENT PROTEİNİ (NFP):

Nöron ve uzantılarının intermedier filamentlerini temsil eder. İmmunhistokimyasal olarak farklı 3 major altbirimden oluşur. NFP, nöroblastom, medullablastom ve retinoblastom gibi nöronal kökenli ya da nöronal diferansiyasyon gösteren tümörlerde eksprese edilir. NFP ekspresyonunun aynı zamanda düşük dereceli astrositomların fokal bir bulgusu olduğunu da bildirilen yayınlar mevcuttur (49).

NFP aynı zamanda yüksek dereceli astrositik ve oligoastrositik tümörlerde en sabit nöronal marker olarak tanımlanmıştır (olguların %100'ü). Donev ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise olguların üçte birinden azında pozitiflik saptanmıştır (45).

GLİAL FİBRİLER ASİDİK PROTEİN (GFAP):

Molekül ağırlığı 48000-52000 olan, sitoplazmik intermedier filamentlerin 5 major tipinden biridir. Normal, reaktif ve neoplastik astrositlerde; gelişmekte olan, reaktif ve neoplastik ependimal hücrelerde; gelişmekte olan ve

neoplastik oligodendrositlerde bulunur. Bu belirleyicilerin ekspresyonu aynı zamanda periferik sinir kılıfı tümörlerinde ve mikst tükrük bezi tümörlerinde de bildirilmiştir. Nöron spesifik intermedier filamentlerin tersine GFAP, glial hücrelere özgü olup matür astrositlerde eksprese edilir.

NÖRONAL NÜKLEER ANTİJEN (Neu-N):

Neu-N, matür nöronlarda eksprese edilen bir nöronal markerdir. Çok az çalışma astrositlerde varlığını bildirmiştir. Varlet ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, yüksek dereceli glial tümörlerde %63 oranında Neu-N reaktivitesi saptanmıştır (46). Donev ve arkadaşlarının çalışmasında ise Neu-N immunreaktivitesi primer olarak dev hücreli ve küçük hücreli GB 'da saptanmıştır (45).

EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ (EGFR):

EGFR /HER1, aynı zamanda HER2, HER3 ve HER4'ü de içeren klas I epidermal büyüme faktörü ailesinin bir üyesidir (12). EGFR, reseptörün ekstraselüler bölümünü bağlayan, TGF- α ve EGF ligandı olarak adlandırılan büyüme faktörleri tarafından stimüle edilen bir transmembran glikoproteindir. EGFR primer GB'larda %40 olmak üzere yüksek dereceli gliomlarda en sık amplifiye olan onkogendir (11,12).

EGFR, malign gliomlarda oldukça merak uyandıran bir terapötik hedeftir. Gliomlarda henüz onaylanmış bir anti-EGFR ajanı bulunmamaktadır. Tirozin kinaz inhibitörleri ve monoklonal antikorlarla ilgili pek çok klinik çalışma devam etmektedir. Önceki çalışmalarda daha yaşlı GB hastalarında EGFR aşırı ekspresyonu ve amplifikasyon oranının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (11,32). Yapılan bazı diğer çalışmalarda ise hasta yaşları arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır (12).

EGFR aşırı ekspresyonu ve gen amplifikasyonunun prognoza etkisi tartışmalıdır (11-13). Çoğu yayınlar kötü prognostik faktör olduğunu belirtirken bazıları da yaşam süresini etkilemediğini bildirmişlerdir (11,12,19,32,36,39,50-54). Houillier ve arkadaşları EGFR amplifikasyonunun iyi prognostik faktör olduğunu bildirmişlerdir (13, 55). Simmons ve

arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, aberan p53 ekspresyonu göstermeyen genç hastalarda (<60 yaş) EGFR aşırı ekspresyonu ile yaşam süresi arasında negatif ilişki saptanırken, yaşlı hastalarda (>60 yaş) yaşam süresinin daha uzun olduğu belirtilmiştir. Tüm bu çalışmalardaki uyumsuzluğun nedeninin yaş dağılımındaki farklılıktan dolayı olabileceği vurgulanmıştır (32). Korshunov ve arkadaşlarının çalışmasında EGFR amplifikasyonunun genç hastalarda (<50 yaş) kötü prognostik faktör olduğu bildirilmiştir (33). Heimberger ve arkadaşlarının çalışmasında ise EGFR, gross total rezeksiyon yapılamayan hastalarda negatif prognostik faktör olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada EGFR ekspresyonu gösteren hastalar ve gross total rezeksiyon yapılamayan hastalar arasında ortalama yaşam süresi arasında belirgin bir fark saptanmamıştır (20). Heimberg ve arkadaşları başka bir çalışmada ise 1 yıldan fazla yaşam süresi olan hastalarda EGFRvIII ekspresyonunun negatif prognostik faktör olduğunu belirtmişlerdir (19). Bir diğer çalışmada GB hastalarında uzun yaşam süresinden sorumlu tek bir moleküle belirleyicinin olmadığı, tüm moleküler değişikliklerin birlikte neden olabileceği ve EGFR amplifikasyonunun özellikle genç hastalarda olmak üzere her zaman kötü prognostik faktör olmayacağı da vurgulanmıştır (37). Yine başka bir çalışmada ise uzun yaşam süresi (>36 ay) olasılığının EGFR amplifikasyonu olmayan GB hastalarında daha yüksek olduğu bildirilmiştir (35).

Tüm bu verilerdeki farklılıkların nedenleri arasında seçilen hastaların standart dozda tedavi almamaları, çalışılan astrositik gliomların sayısında ve derecesinde büyük farklılıklar olması ve farklı tipte EGFR antikorlarının uygulanmış olması gösterilmiştir (56).

Ki-67 (MIB-1):

G1, G2, M ve S proliferatif fazdaki hücreler tarafından eksprese edilen bir nükleer nonhiston proteine benzer bir antijendir. Yapılan pekçok çalışmada glioblastomlarda Ki-67 proliferasyon indeksi ile yaşam süresi arasında negatif korelasyon saptanmıştır (32). Jaros ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada EGFR overekspresyonu ve yüksek Ki-67 proliferasyon indeksinin kötü

prognostik faktörler olduğu belirtilmektedir. Ki-67, EGFR ve p53'e kıyasla yaşam süresinde en önemli faktördür (56,57). Başka bir çalışmada ise Ki-67 proliferasyon indeksi %20'nin üzerinde olanlarda ölüm riskinin 2.2 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (58). Çoğu çalışmada yaş, cinsiyet ve Ki-67'nin yaşam süresi ile ilişkili en güçlü faktörler olduğu belirtilmiştir.

GLİOBLASTOMDA NÖRONAL DİFERANSİYASYON:

Mikst glionöronal fenotip gösteren değişik tipte santral sinir sistemi tümörleri DSÖ 2007 sınıflamasında yer almış ve bu kategoriye ilgilendiren pekçok yayın yapılmıştır (1, 42, 45-48, 60-71). Diffüz astrositomlar, pleomorfik ksantoastrositom, subependimal dev hücreli astrositom, GB ve dev hücreli GB'larda nöronal diferansiasyon görülebileceğini bildiren (42, 46, 48, 59, 63, 65-71) ya da bu durumun embriyolojik, fizyolojik veya elektron mikroskopik kanıtlarını ortaya koyan (48, 60-64) yayınların sayısı hiç az değildir. Yüksek dereceli glial tümörlerde nöronal diferansiasyonun olumlu bir prognostik faktör olduğunu savlayan araştırmacılar olduğu gibi (46), bunun tersini savunanlar da vardır (45, 64). Bu çalışmada araştırılması amaçlanan başlıca konulardan biri de GB'larda nöronal diferansiasyonun varlığını ve varsa bu faktörün prognoz üzerindeki etkisini ortaya koymaktır.

HİBRİDİZASYON:

Hibridizasyon, özgün nükleik asit dizilerini tanımlamak için kullanılan bir yöntemdir. İki tamamlayıcı nükleik asit dizisinin uygun ortamda çiftli DNA-DNA, DNA-RNA, RNA-RNA yapılar oluşturması olarak tanımlanabilir. Tek zincirli nükleik asitlerin çift zincirli yapılar oluşturmaya eğilimi bu yöntemin temelini oluşturur. Bu yöntemin ilk aşaması DNA'nın çift heliks yapısının ısı veya yüksek PH (>13) ile karşılaştığında bozulması ve tekli diziler halini almasıdır (denatürasyon). Ancak tekli diziler uygun tamamlayıcı dizilerle tekrar ikili yapılar halini alırlar (Hibridizasyon-DNA renatürasyon). Tekli dizilerden en az birinde işaretleyici bir molekül (radyoizotop, floressein vb.) bağlandığı takdirde özgün ikili yapılar çeşitli yöntemlerle saptanabilir.

Hibridizasyonda kullanılan problar:

Tamamlayıcı sekanslarını bulmak için kullanılan işaretli dizilere prob adı verilir. Probun özgün olduğu nükleik asit dizisi ise hedef olarak adlandırılır. Problar hazırlandıklarında tekli veya çiftli yapılar şeklinde olabilir ancak hibridizasyon aşamasında tekli yapıda olmaları gerekir. Bu diziler radyoaktif veya radyoaktif olmayan belirleyicilerle işaretlenirler ve böylece hibridizasyon gerçekleştiğinde filtre kağıdında, X-ray filminde veya dokuda görünür hale getirilebilirler. Problar çeşitli uzunlukta olabilirler ancak sıklıkla hedef diziden daha kısadırlar. Problar DNA, RNA veya oligonükleotid şeklinde olabilir. DNA problar çok hassas ve seçici olup tek kopyaya kadar saptayabilirler. Problar mRNA'da saptanabilir ve bir genin eksprese olup olmadığı gösterilebilir (72,73).

Prob bazlı tekniklerin kullanım alanları:

Probların kullanıldığı yöntemler, moleküler patolojide çeşitli amaçlar için kullanılabilir. Bunlar:

- Gen ekspresyonlarındaki kantitatif veya kalitatif değişikliklerin saptanması
- Gen amplifikasyonlarının veya delesyonların saptanması
- Gen yeni düzenlenmelerinin gösterilmesi
- Kromozomal translokasyonların gösterilmesi
- Nokta mutasyonların saptanması
- Patojenlerin saptanmasıdır.

Probların hazırlanması:

Probların hibridize oldukları hedefleri görünür hale getirmesi gerekir. Bunun için birçok işaretleme yöntemi geliştirilmiştir. Klasik yöntem radyoizotoplarla işaretlemedir ancak kullanıcı için tehlikeli olmaları ve kullanım açısından zorlukları nedeniyle non-izotopik işaretleme yöntemleri daha yaygınlaşmıştır. Temel işaretleme yöntemleri şunlardır:

- Radyoizotop işaretleme: Çok hassas bir yöntem olmakla birlikte izotopun yarılanma ömrü, potansiyel sağlık sorunları yaratması, maliyet ve uzun saptama süresine ihtiyaç duyulması kullanımını kısıtlar. Sık kullanılan izotoplar ^{32}P , ^{125}I , ^{35}S , ^3H 'dir.
- Hapten bağlı işaretleme (biotin, floresans boyalar, digoksijenin)
- Direk enzim bağlı işaretleme: Gluteraldehiti köprü olarak kullanarak enzimi direk olarak DNA'ya bağlama yöntemidir (72,73).

İşaretleme 5' veya 3' uçlarında veya tüm prob boyunca olabilir. Hangi işaretleme yönteminin kullanılacağı;

- Probun DNA/ RNA olduğuna
- Probun tek / çift olduğuna
- İstenen duyarlılığa
- Probun uzunluğuna bağlıdır

Hibridizasyon yöntemleri:

Hibridizasyon temeline dayanan çok sayıda teknik günlük laboratuvar ortamına girmiş ve başarıyla uygulanmaktadır. Bu teknikler basitçe aranan nükleotid dizisinin (DNA veya RNA) var olup olmadığını gösterebildiği gibi bir hücredeki tüm gen ekspresyonunu ortaya koyacak tekniklere kadar uzanan bir spektrumdur. İki tip temel yaklaşımdan söz edilebilir. Standart yöntemlerde prob işaretlidir. Karşıt (reverse) yöntemlerde ise prob işaretli değildir ve katı haldedir. Oysa hedef sıvı halde ve işaretlidir. Karşıt yöntemlerin kullanımı son yıllarda artmıştır. Temel yöntemler şunlardır:

1- Standart yöntemler

- Southern blot
- Northern blot
- İn situ hibridizasyon (kromozom İSH (DNA), doku İSH (mRNA))

2- Karşıt yöntemler

- Reverse dot blot
- Mikroarray (DNA mikroarray, oligonükleotid mikroarray)

İn situ hibridizasyon (ISH):

ISH yöntemiyle, işaretlenmiş komplementer nükleik asid sekansı ya da probu kullanarak doku kesitlerinde ya da hücre preparatlarında spesifik DNA ya da RNA sekansı saptanabilir (72-74). En önemli avantajı parafine gömülü dokuda da çalışması ve morfolojiyle hibridizasyon yönteminin bir arada karşılaştırılmasına izin vermesidir. Temel hibridizasyon basamaklarının (denaturasyon, hibridizasyon, yıkama) hepsi bu yöntemde de kullanılır. Probların işaretleme yöntemlerine göre isimlendirilirler. Bu yöntemler fluoresan in situ hibridizasyon (FISH) ve kromojen in situ hibridizasyondur (CISH). Hem hedef hem de prob nükleik asitin hibridizasyonunun gerçekleşmesi için tek sarmala ihtiyacı vardır. ISH, HPV, EBV ve HIV gibi viral enfeksiyonları saptamada kullanılabilir. İnfekte hücrelerin içindeki viral genomu direkt olarak tanımlar. ISH yöntemiyle aynı zamanda gen ekspresyonları da saptanabilir.

FISH, uzun yıllar boyunca solid tümörlerde EGFR ve diğer onkogenlerin amplifikasyonunu saptamada altın standart yöntem olagelse de, rutinde oldukça pahalı olması, özel mikroskop gerektirmesi ve uzman değerlendirmesine ihtiyaç duyulması nedeniyle son yıllarda FISH'e alternatif olarak CISH yöntemi kullanılmaya başlanmıştır. CISH yönteminin avantajları, sadece normal ışık mikroskopuna ihtiyaç duyulması, daha kısa sürede sonuç vermesi, değerlendirmesinin daha kolay olması ve CISH materyallerinin arşivlenebilmesidir. Son ürün peroksidaz reaksiyonu ile saptanır ve ışık mikroskopunda görüntülenebilir. Ön işlem (pretreatment) ve hibridizasyon protokolleri FISH ve CISH'de benzerdir. Sadece problemler farklıdır. CISH yönteminin diğer bir üstünlüğü, tümör hücrelerinin kolaylıkla tanımlanabilmesi ve morfolojiye hakim olunabilmesidir (15-17,52,75-79).

Genel ISH protokolü denatürasyon, hibridizasyon ve posthibridizasyon olmak üzere üç temel aşamadan oluşmaktadır :

1) DENATÜRASYON : DNA/DNA *in-situ* hibridizasyonu için, prob ve hedef dizilerin tek iplikli hale getirilmesi (denatürasyon) gerekir. Denatürasyon; asit, ısı veya alkali uygulaması ile yapılabilir. Isı ile denatürasyon, uygulamanın basitliği ve daha etkili olması nedeni ile en çok kullanılan yöntemdir .

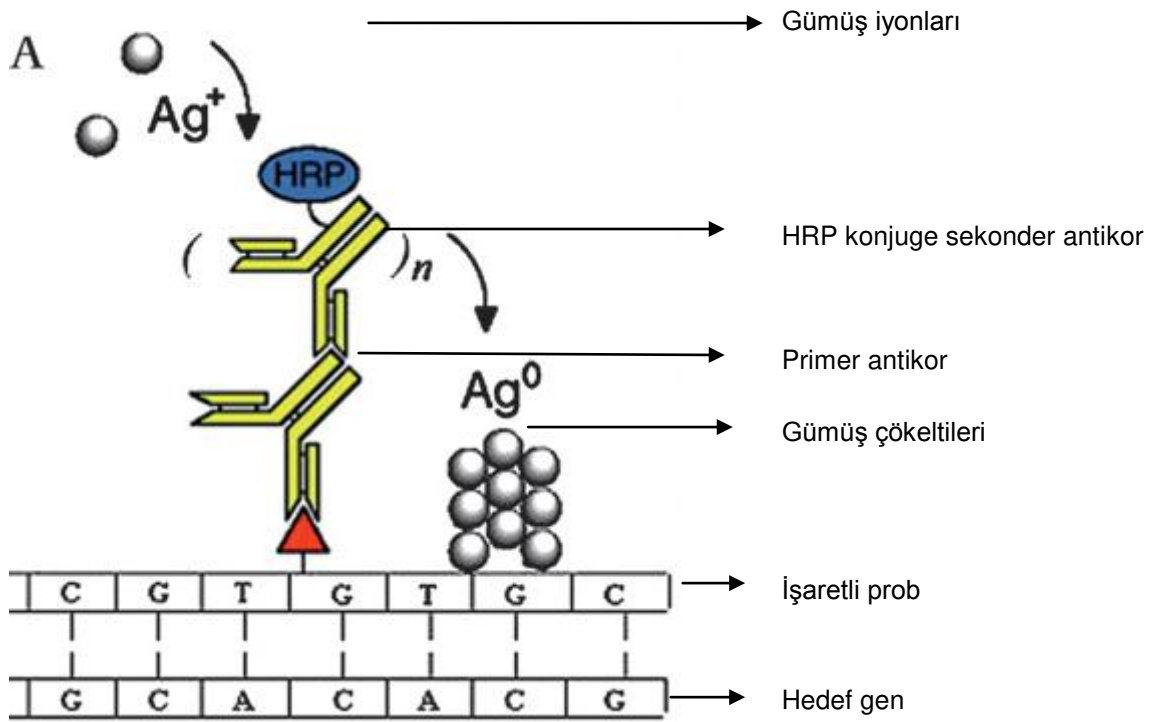
2) HİBRİDİZASYON : Prob ve hedef nükleik asitler tek iplikli hale getirildikten sonra, DNA/DNA melezleri 37⁰C, RNA/RNA melezleri ise 50-55 ⁰C'de bir gece inkübasyona bırakılırlar. Hibridizasyon oranı prob uzunluğuna, konsantrasyonuna ve dizinin kompleksliğine bağlıdır. Optimal hibridizasyon için prob uzunluğunun 200-500 bp uzunlukları arasında olması gerekir.

3) POSTHİBRİDİZASYON : İşaretli prob, hedef dizi dışında homoloji gösteren başka dizilerle özgün olmayan melezlenmeler yapabilir. Bu tür melezler, doğru eşleşmiş olanlara göre daha dayanıksızdır; bu nedenle çeşitli yıkama işlemleri ile çözülebilir. Hibridizasyon sonrası yıkamalar, zayıf bağlanan probu temizlemek ve sadece doğru eşleşmiş olanları bırakmak amacı ile yapılır.

ISH yöntemleri:

a) Silver (gümüş) ISH (SISH) yöntemi:

Gümüş ISH boyama çalışması sırasında, DNP işaretli problemler hücrelerdeki ve dokudaki spesifik hedef DNA sekanslarına bağlıdır. DNP işaretli prob Tavşan antiDNP primer antikoru ve ultraview SISH Detection Kit kullanılarak görüntülenir. Ölçüm kiti, kromojenik enzim olarak kullanılan horseradish peroksidaza (HRP) konjuge keçi anti-tavşan antikoru içerir. Kısaca tanımlanan SISH reaksiyonunun kimyası, Silver A (gümüş asetat), Silver B (hidrokinon) ve Silver C'nin (H₂O₂) sıralı bir şekilde eklenmesiyle yürütülür. Bu aşamada gümüş iyonları (Ag⁺) hidrokinon ile metalik gümüş atomlarına (Ag⁰) indirgenir. Bu reaksiyon HRP substratı hidrojen peroksit (Silver C) ile harekete geçirir. Gümüş çökelti çekirdekte birikir ve genin bir kopyası siyah bir nokta olarak görüntülenir. Örnek daha sonra ışık mikroskobu altında incelenmek üzere zıt boyama işlemine tabi tutulur (Şekil 2).



Şekil 2: SISH reaksiyonu

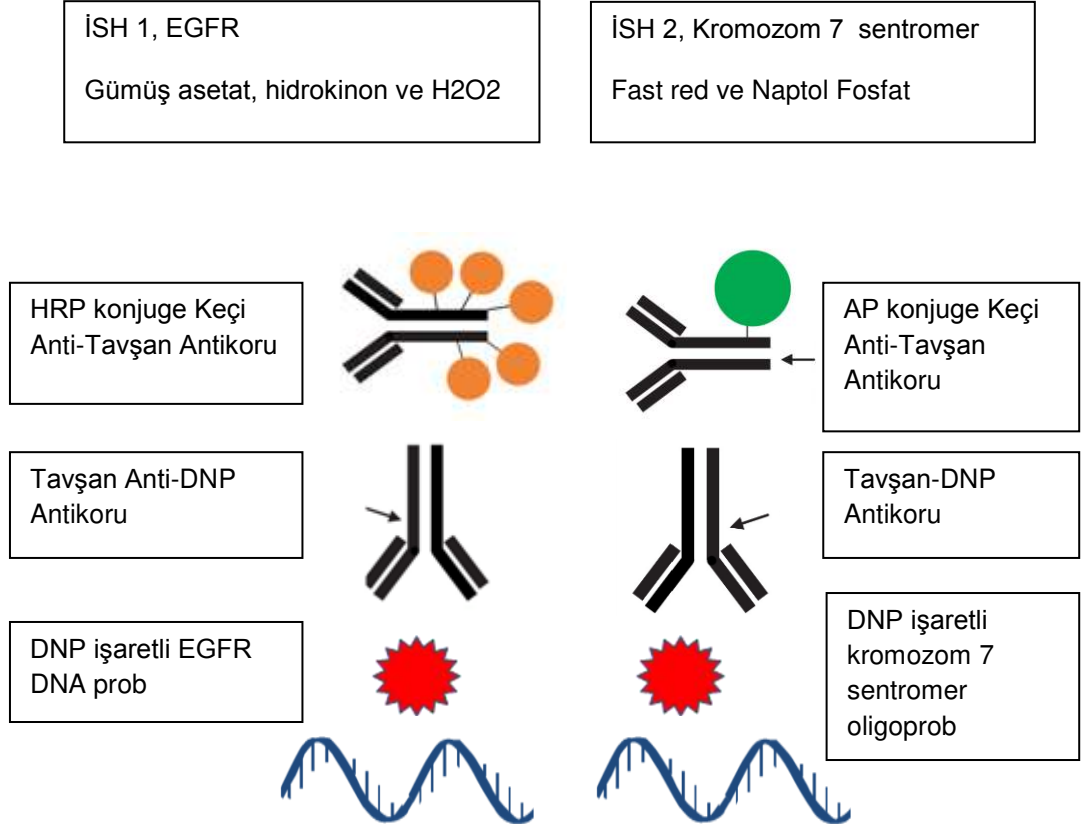
b) B-DISH (Bright Field Dual In Situ Hybridization) yöntemi:

ISH'de tek veya dual renk analizleri uygulanabilir. Tek renk analizi ile araştırmak istenen gen (EGFR, HER-2 gibi) ve kromozom sentromeri (Chr 7 veya chr 17 gibi) farklı slaytlarda saptanır. Dual renk analizi bunların aynı slaytta saptanabilmesine izin verir. Örneğin Her-2 ve EGFR sinyalleri SISH (silver in situ hibridizasyon) yöntemi ile siyaha, kromozom 17 ve kromozom 7 sinyalleri CISH yöntemi ile kırmızıya boyanır. EGFR gen sinyali, DNP işaretli DNA prob hibridizasyonu ardından gümüş sinyal saptama sistemi (gümüş asetat, hidrokinon ve H_2O_2) ile alınır. Daha sonra kromozom 7 sentromer (CEN 7) sinyali ise, DNP işaretli CEN 7 oligoprob hibridizasyonu ardından fast red ve naphthol fosfat reaksiyon saptama sistemi ile alınır (Şekil 3) (80).

B-DISH yönteminin avantajları:

- Sonuçlar ışık mikroskobu ile izlenebilir
- Sonuçlar arşivlenebilir
- Tek bir lam üzerinde iki parametre incelenir

- İncelemede ve skorlamada kolaylık sağlar
- Tüm doku morfolojisi incelenebilir
- Zamandan ve maliyetten tasarruf edilir



Şekil 3: Brightfield double İSH (B-DISH)

GEREÇ VE YÖNTEM

OLGULAR

Çalışmamızda, Celal Bayar Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinde yer alan 2001-2012 yılları arasında tanı almış 52 primer GB olgusu değerlendirildi. Olgulara ait hematoksilen&ezin (H&E) boyalı preparatlar tekrar değerlendirilerek tanımlar doğrulandı. Hastaların dosyalarından operasyon bilgileri (gros total/parsiyel rezeksiyon), klinik gidişi (tanı aldığı andan itibaren yaşam süresi, son durumu vb.), tedavisi (kemoterapi, radyoterapi alıp almadığı, kaç kür, ne süreyle aldığı), nüks olup olmadığı öğrenildi. Lezyonu temsil eden, en çok doku içeren preparat ve parafin blok seçildi. Blok seçiminde kanama ve nekroz içermeyen ve mümkünse olağan beyin dokusu içeren alanlar olmasına dikkat edildi.

Olgulara daha önce uygulanan immunohistokimyasal çalışmalar da tekrar değerlendirildi ve rutinde kullanılan NFP, sinaptofizin ve Ki-67 gibi belirleyicilerden eksik olanlar tamamlandı. Daha sonra, dual immunohistokimya yöntemi ile nükleer bir nöronal belirleyici olan Neu-N ve sitoplazmik bir glial belirleyici olan GFAP boyanması değerlendirildi. EGFR aşırı ekspresyonu immunhistokimyasal yöntemle, EGF reseptörünün gen amplifikasyonu da, dual EGFR (SISH)/kromozom 7 (CISH) yöntemiyle ortaya kondu.

İMMUNHİSTOKİMYASAL BOYAMA YÖNTEMİ

Formalin tespitli, parafine gömülü dokulardan elde edilen dört mikron kalınlığındaki kesitler pozitif elektrik yüklü lamlara (Isotherm Technical Laboratory Glass Materials) alındı ve 60°C'lık etüvde ortalama 2 saat parafin eriyinceye kadar tutuldu. Elde edilen tüm kesitlere aşağıdaki tabloda (Tablo

3) ayrıntıları verilen NFP, Sinaptofizin, Ki-67 ve EGFR immunohistokimyasal boyaları uygulandı.

Tüm preparatlar deparafinizasyon ve antijen açığa çıkarma işlemleri de dahil olmak üzere tüm İHK boyama işlemleri için tam otomatik Immunohistokimyasal boyama cihazına (Ventana, Benchmark, XT İHC/ISH) yerleştirildi. İHK boyamaları için cihaz ile uyumlu Ultraview Universal DAB Detection Kit ve EZ prep, LCS, SSC, Cell Condition 1 (CC1), Reaction Buffer Concentrate solüsyonları ile Rabbit Anti-DNP Antibody, Amplifikasyon, ISH proteaz 3, Endogenous Biotin Blocking Kit, Hematoksilen ve Blue Reagent kullanıldı.

Tüm primer antikolar için antijen açığa çıkarmak amacıyla CC1 mild ön işlemi seçildi ve 37°C'de inkübe edildi. Primer antikolar manuel olarak damlatıldı. Antikorlardan EGFR ve sinaptofizinin zemin boyanmasını engellemek amacıyla A/B Block işlemi seçildi.

Cihazda boyama işlemi tamamlandıktan sonra lamlar deterjanlı su ile yıkanıp alkol serilerinden geçirildi. Şeffaflandırma işlemi için ksilolden geçirildi ve Entellan (GBL^R GulmountTM PAX, Örtme Ortamı PA) ile kapatıldı.

DUAL İMMUNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA YÖNTEMİ

Formalin tespitli, parafine gömülü dokulardan elde edilen dört mikron kalınlığındaki kesitler pozitif elektrik yüklü lamlara (Isotherm Technical Laboratory Glass Materials) alındı ve 60°C'lık etüvde ortalama 2 saat parafin eriyinceye kadar tutuldu. Elde edilen tüm kesitlere aşağıdaki tabloda (Tablo 3) ayrıntıları verilen Neu-N ve GFAP immunohistokimyasal boyaları uygulandı.

Tüm preparatlar deparafinizasyon ve antijen açığa çıkarma işlemleri de dahil olmak üzere tüm İHK boyama işlemleri için tam otomatik immunohistokimyasal boyama cihazına (Ventana, Benchmark, XT İHC/ISH) yerleştirildi. İHK boyamaları için cihaz ile uyumlu Ultraview Universal DAB Detection Kit, Ultraview Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit ve EZ prep, LCS, SSC, Cell Condition 1 (CC1), Reaction Buffer Concentrate

solüsyonları ile Rabbit Anti-DNP Antibody, Amplifikasyon, ISH proteaz 3, Endogenous Biotin Blocking Kit, Hematoksilen ve Blue Reagent kullanıldı. Her iki antikor için antijen açığa çıkarma amacıyla CC1 mild ön işlemi seçildi ve 37°C'de inkübe edildi. Bu yöntemle çalışılan sitoplazmik bir belirleyici olan GFAP ilk antikor olarak DAB Detection Kit ile, nükleer bir nöronal belirleyici olan Neu-N ise ikinci antikor olarak Red Detection kit ile boyandı. İlk antikor olan GFAP'ın inkübasyon süresi dolduktan sonra ikinci antikor olan Neu-N manuel olarak damlatıldı.

Cihazda boyama işlemi tamamlandıktan sonra lamalar deterjanlı su ile yıkanıp alkol serilerinden geçirildi. Şeffaflandırma işlemi için ksilolden geçirildi ve Entellan (GBL^R GulmountTM PAX, Örtme Ortamı PA) ile kapatıldı.

Tablo 3. Primer antikorlara ilişkin İHK boyama yöntemi ayrıntıları

Primer Antikor/Clone	Ambalaj	Katalog no	Marka	Dilüsyon oranı/inkübasyon süresi	Pozitif kontrol
Anti-Neu-N Monoclonal Antibody (A60)	0.5 ml konsantre	MAB 377	Millipore Corporation, Billerica, MA, USA	1/100 60 dk	Olağan beyin dokusu
GFAP Rabbit Monoclonal Antibody (EP672Y)	0.1 ml konsantre	258 R-14	Cell Marque, Rocklin, CA, USA	1/100 16 dk	Olağan beyin dokusu
EGFR Rabbit Monoclonal Antibody (EP38Y)	7 ml kullanıma hazır	RM-2111-R7	Thermo Scientific, Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA	20 dk	Skumöz hücreli karsinom
Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen (MIB-1)	6 ml kullanıma hazır	IS 626	DakoCytomation Denmark A/S, Denmark	32 dk	Olağan tonsil dokusu
Synaptophysin (SP11)	7 ml kullanıma hazır	RM-9111-R7	Thermo Scientific, Anatomical Pathology, Fremont, CA, USA	16 dk	Olağan pankreas dokusu
Monoclonal Mouse Anti-Human Neurofilament Protein(2F11 ¹)	7 ml kullanıma hazır	N 1591	DakoCytomation, Inc., California, USA	32 dk	Olağan beyin dokusu

DUAL İN SİTU HİBRİDİZASYON YÖNTEMİ

Formalin tesbitli, parafine gömülü dokulardan elde edilen dört mikron kalınlığındaki kesitler pozitif elektrik yüklü lamlara (Isotherm Technical Laboratory Glass Materials) alındı ve 60°C'lık etüvde ortalama 2 saat parafin eriyinceye kadar tutuldu. Preparatlar tüm İSH işlemleri için tam otomatik immunohistokimyasal boyama cihazına (Ventana, Benchmark XT, IHC/ISH) yerleştirildi. Dual ISH işlemleri için cihaz ile uyumlu Inform EGFR DNA Probe, Inform Chromosome 7 Probe, Ultraview SISH Detection Kit, Ultraview Alkaline Phosphatase Red ISH Detection Kit, Ultraview Silver Wash II, EZ prep, LCS, SSC, Reaction Buffer Concentrate solüsyonları ile Rabbit Anti-DNP Antibody, Amplifikasyon, ISH proteaz 3, Hematoksilen II ve Blue Reagent kullanıldı.

EGFR sinyali için Ultraview SISH kiti ile renk maddesi gümüş olan SISH yöntemi, Kromozom 7 sinyali için ise Ultraview AP Red ISH Kiti ile renk maddesi kromojen olan CISH yöntemi uygulandı. Kaynatma, deparafinizasyon, ön işlem, hibridizasyon, yıkama, sinyal saptama ve arka plan boyama işlemlerinin hepsi tek basamakta tam otomatik cihazda tamamlandı.

Yöntem sırasıyla şöyleydi:

- 1- Parafin doku kesitleri 65°C'de 20 dakika kaynatıldı.
- 2- EZ prep solüsyonu ile 75°C'de 16 dakika deparafinizasyon işlemi uygulandı.
- 3- Deparafinize doku kesitleri, DNA hedef bölgeyi açmak amacıyla Reaction Buffer (Tris bazlı pH 7.6 solüsyon) ve ISH Proteaz III kombinasyonu ile ısıtma önışlemine tabi tutuldu. Tüm yıkama aşamalarında Reaction Buffer uygulandı.
- 4- İşlem boyunca sıvı buharlaşmasını ve kurumayı önlemek amacıyla hidrofobik bir reaktif olan Liquid Coverslip (LCS) kullanıldı.
- 5- EGFR DNA probu uygulandı ve 95°C'ye kadar ısıtıldı.
- 6- 52°C'de 6 saat hibridizasyon işlemi uygulandı.
- 7- 72°C'de 2xCSS solüsyonu ile 3 kez sert yıkama yapıldı.

- 8- 20 dakika monoklonal tavşan anti-DNP antikoru ile, ardından 37°C'de 16 dakika HRP konjuge anti-tavşan antikoru ile inkübe edildi.
- 9- EGFR ISH sinyali için, UltraView SISH Detection Kit içindeki HRP varlığında gümüş asetat, hidrokinon ve H₂O₂ kullanarak metalik gümüş çökeltileri geliştirildi.
- 10- Kromozom 7 sinyali için DNP işaretli Kromozom 7 oligoprobu uygulandı.
- 11- 95°C'de denatürasyon, 44°C'de 6 saat hibridizasyon uygulandı.
- 12- 59°C'de 2xSCC solüsyonu ile 3 kez sert yıkama uygulandı.
- 13- 20 dakika tavşan monoklonal anti-DNP antikoru ile ardından 37°C'de 12 dakika alkalın fosfataz konjuge anti-tavşan antikoru ile inkübe edildi.
- 14- Kromozom 7 sinyali, ultraView Red ISH Detection kullanarak fast red ve naphthol fosfat reaksiyonu ile saptandı.
- 15- 8 dakika Hematoksilen II ile, 4 dakika Blue Reagent ile arka plan boyama uygulandı.
- 16- Cihazda boyama işlemi tamamlandıktan sonra lamalar deterjanlı su ile yıkandı.
- 17- 60°C'lik etüvde 15 dakika kurutuldu.
- 18- Şeffaflandırma işlemi için ksilolden geçirildi ve Entellan (GBL^R GulmountTM PAX, Örtme Ortamı PA) ile kapatıldı.

Tüm vakalarda bu yöntem ile olumlu sonuçlar alınamadı. İlk denemelerde denatürasyon amacıyla CC2 solüsyonu kullanıldı. Bu solüsyon ile kırmızı bulanıklık artefaktı saptandı ve denatürasyon aşamasında Reaction Buffer solüsyonu kullanılarak bu artefakt giderildi. Kuruma artefaktı gösteren vakalarda hibridizasyon süresi 2 saate kadar düşürüldü. Sinyalin az ya da hiç alınamadığı vakalarda proteaz enzim süresi ve gümüşle inkübasyon süresi artırıldı.

İMMUNHİSTOKİMYASAL SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Tüm değerlendirmeler standart ışık mikroskopunda yapıldı. Boyanma yoğunlukları ve oranları iki çalışmacı tarafından (Aİ ve FUD) konsensusla saptandı.

EGFR immunreaktivitesi: Sadece membranöz ya da membranöz ve sitoplazmik boyanma pozitif kabul edildi. Yalnızca sitoplazmik boyanma negatif kabul edildi. Pozitif tümör hücrelerinin yüzdesi ve dominant boyanma paterninin yoğunluğu (0: negatif, 1: zayıf, 2: orta, 3:güçlü) çarpıldı

Skorlama:

0-100 (0,1): Negatif ya da düşük ekspresyon seviyesi

101-200 (2): Orta ekspresyon seviyesi

201-300 (3): Yüksek ekspresyon seviyesi olarak değerlendirildi.

NFP ve Sinaptofizin immunreaktivitesi: Sitoplazmik ve granüler boyanma pozitif kabul edildi.

Skorlama:

0: negatif

1: 10'luk büyütmede 1-2 alanda pozitif

2: 10'luk büyütmede 3-4 alanda pozitif

3: 10'luk büyütmede 3-4 alandan fazla pozitif ya da yaygın pozitif

Ki-67 immunreaktivitesi: Nükleer boyanma pozitif kabul edildi. X40 objektif ile boyanma şiddetinin ve yüzdesinin en fazla olduğu alanda 1000 hücre sayıldı. Bu alanda pozitif boyanan hücrelerin oranı proliferasyon indeksi olarak değerlendirildi.

DUAL İMMUNHİSTOKİMYA SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ:

GFAP ve Neu-N immunreaktivitesi: Tümör hücrelerinde GFAP için sitoplazmik boyanma, Neu-N için nükleer boyanma pozitif kabul edildi.

Birden fazla aşık tümör hücresinde hem sitoplazmik GFAP pozitifliği hem de nükleer Neu-N pozitifliği nöronal diferansiyasyon olarak değerlendirildi.

Nükleer Neu-N pozitifliği gösteren fakat sitoplazmik GFAP pozitifliği göstermeyen hücreler, tümörün infiltratif gelişim gösterdiği alanlardaki olağan nöronlar olarak yorumlandı.

DUAL İN SİTU HİBRİDİZASYON SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Tüm değerlendirmeler standart ışık mikroskopunda 40x objektifle yapıldı. Hücre başına 1-2 kopya EGFR ve Chr7 sinyali içeren neoplastik olmayan glial hücreler ve endotelial hücreler iç pozitif kontrol olarak kullanıldı. Nekroz içermeyen, sayılabilir bir sinyal alanını gösteren üç farklı hedef alan seçildi. Üst üste binme gösteren hücreler, tümör hücrelerinin ortalama iki katından daha büyük olan dev hücreler ya da yarısından daha küçük olan hücreler sayıma dahil edilmedi. Her hedef alanda 20 hücre olmak üzere toplam 60 hücre sayıldı.

Gen durumunun belirlenmesi:

A- Genomik kazanç yok:		B-Genomik kazanç var	
Dizomi		Yüksek polizomi ≥ 4 kopya $\geq 40\%$	
Trizomi		≥ 15 kopya $\geq 10\%$	
Düşük polizomi ≥ 4 kopya $< 40\%$ hücre		Küme	
		EGFR/Kromozom 7 oranı ≥ 2	

Sinyal sayımı ve görüntülenmesi:

ISH sinyalleri tek kopyalar, çoklu kopyalar ve kümeler şeklinde saptandı. Normal hücrelerdeki tek kopyalar sinyal sayımı için referans olarak kullanıldı.

- Tek kopya: Farklı bir sinyal EGFR ve Chr7 için tek kopya olarak sayıldı.

Çoğu örnekte hedef bölgelerinin boyutunun ve kimyasının farklı olmasından dolayı tipik olarak SISH sinyallerinin (siyah) kırmızı ISH sinyallerinden daha

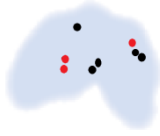
küçük olduğunu saptandı. Dolayısıyla SISH sinyallerinin büyüklüğü için pozitif iç kontrol hücrelerinde görüntülenen tek sinyaller referans alındı.

- Çoklu kopyalar: Farklı tek sinyalden fazla kopyalar çoklu kopya olarak değerlendirildi. EGFR/ Chr7 çoklu kopyaların oranı ikinin üzerinde olanlar amplifikasyon olarak değerlendirildi.

- Kümeler: Birden fazla, üst üste binen ve sayılamayan sinyaller dikkate alındı. Bir küçük küme 6 sinyal, bir büyük küme 12 sinyal olarak değerlendirildi.

- Düşük amplifikasyon: 6-10 kopya ya da küçük kümelerin varlığı düşük amplifikasyon olarak değerlendirildi.

- Yüksek amplifikasyon: 10 kopyadan fazla ya da büyük kümelerin varlığı yüksek amplifikasyon olarak değerlendirildi.



Üst üste binmiş hücreler değerlendirilmedi



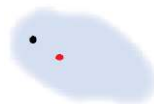
Sinyal olmayan hücreler değerlendirilmedi



Tek renkte sinyali olan hücreler değerlendirilmedi



Hücre dışında sinyaller değerlendirilmedi



1 siyah (EGFR), 1 kırmızı (Chr7) sinyal olarak değerlendirildi



2 siyah (EGFR), 2 kırmızı (Chr7) sinyal olarak değerlendirildi



1 siyah (EGFR), 2 kırmızı (Chr7) sinyal olarak değerlendirildi. Birbirine bitişik aynı renkte iki sinyal değerlendirilmedi.



1 küçük SISH kümesi +2 sinyal=8 sinyal, 2 kırmızı sinyal olarak değerlendirildi. Küçük SISH kümeleri, iç kontrol hücreindeki tek sinyal boyutu referans alınarak hesaplandı.



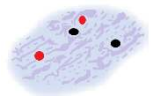
1 büyük SISH kümesi+ 4 sinyal=16 sinyal, 2 kırmızı sinyal olarak değerlendirildi



Birbirine çok yakın iki farklı renkte sinyal ayrı ayrı sayıldı. 4 siyah, 2 kırmızı sinyal olarak değerlendirildi



Siyah sinyal kümesi kırmızı sinyali engellemişse, kırmızı sinyal varlığı 100'lük objektifte değerlendirildi



2 siyah, 2 kırmızı sinyal. Eğer zemindeki SIGH tozları hücrenin içinde de bulunuyorsa, zeminden farklı net seçilebilen siyah sinyaller değerlendirildi



2 siyah, 2 kırmızı sinyal. Zemindeki kırmızı bulanıklık kırmızı sinyal olarak değerlendirilmedi.

Ek gözlemler:

- Heterojenite: Çoğu vakada hedef alanının içerisinde veya farklı hedef alanlarında farklı gen kopya sayısı içeren, amplifiye olan ya da olmayan,

heterojenite gösteren tümör hücreleri saptandı. Bu alanlarda sayım için daha yüksek sayıdaki kopya sayısının olduğu hücreler değerlendirildi.

-Monozomi: Tümör hücresinin sadece bir Chr7 kopyası içermesi olarak değerlendirildi.

-Polizomi: Tümör hücresinin normal nükleusa göre 3 ya da daha fazla Ch7 kopyası içermesi olarak değerlendirildi.

-Monoallelik delesyon: EGFR gen kopyasının yaklaşık 2, Ch7'nin ise polizomik olduğu vakalar EGFR allelinde genetik kayıp olarak değerlendirildi (EGFR/Chr7 oranı <1).

İstatistiksel değerlendirme

Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde kişisel bilgisayarda çalışan SPSS (Statistical Package for Social Sciences) programının 15.0 versiyonu kullanıldı. Korelasyonun araştırılmasında Pearson ve Spearman korelasyon analizi, farklı serilerin anlamlılığının sınanmasında Fischer exact test ve grupların birbirine göre ilişkilerinin saptanmasında One-Way Anova kullanıldı. Sonuçlar $p < 0.05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Olguların Cinsiyet ve Yaş Dağılımı

Çalışmaya alınan olguların cinsiyet dağılımı Tablo 4'te gösterildi. Olguların 18'i (% 34,6) kadın, 34'ü (% 65,4) erkek hastadan oluşuyordu.

Tablo 4: Olguların cinsiyet dağılımı

Cinsiyet	Olgu Sayısı	%
Kadın	18	34,6
Erkek	34	65,4
Toplam	52	100

Olguların yaşları 26 ile 81 arasında değişmekte olup (ortalama $56,2 \pm 13,6$), en büyük olgu grubu 60-69 yaş arasında bulunmaktaydı (Tablo 5). Yaşla cinsiyet arasında anlamlı bir ilişki görülmedi.

Tablo 5: Olguların yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş Grupları	Olgu Sayısı	%
0-19	0	0
20-29	1	1,9
30-39	7	13,5
40-49	8	15,4
50-59	12	23,1
60-69	15	28,8
70-79	8	15,4
80-89	1	1,9
TOPLAM	52	100

Olguların tümünün son durumu öğrenildi. 6 olgu dışında tüm hastalar kaybedilmişti (%88,5). Hastaların tanıdan ölüme kadar geçen yaşam süreleri 1 ila 32 ay arasında değişmekte olup ortalama yaşam süresi $9,8 \pm 8,6$ ay, ortanca yaşam süresi ise 7,5 ay olarak saptandı (Tablo 6). Yaşayan 6 olgunun 5'inde izlem süresi 12 aydan daha kısa olduğundan bu olgular yaşam süresi ile ilgili istatistiksel çalışmalara dahil edilmedi. Kalan 1 olgu ise 74 ay gibi oldukça uzun bir yaşam süresine sahipti. Bu olguya ait tüm preparatlar tekrar gözden geçirildi ancak tanıda bir değişiklik öngörülmedi.

Tablo 6: Olguların yaşam sürelerine göre dağılımı

Yaşam süreleri (ay)	Toplam	%
1-12	33	71,8
13-18	7	15,2
19-24	1	2,1
25-32	5	10,9
Toplam	46*	100

**Olgu sayısındaki farklılık için metne bakınız*

Yaşla yaşam süresi arasında negatif korelasyon saptandı ($p=0,001$). İleri yaş olgularda yaşam süresinin kısaldığı görüldü.

Operasyon şekli:

Olguların 40'ına (%77) gros total, 12'sine (%23) subtotal eksizyon uygulandı (Tablo 7). Operasyon şekli ile yaşam süresi arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 7: Olguların operasyon şekline göre dağılımı

Operasyon şekli	Olgu sayısı	%
Gros Total	40	77
Subtotal	12	23
Toplam	52	100

Yerleşim:

Olguların 6'sının tümör yerleşim bilgilerine ulaşamadı. 46 olgunun 14'ü temporal, 8'i pariete-okspital, 7'si frontal, 6'sı fronto-parietal, 4'ü parietal, 2'si

temporo-okspital, 2'si temporo-parietal , 1'i fronto-temporal, 1'i oksipital ve 1'i ise fronto-parieto-temporal lob yerleşimliydi. Fronto-parietal lob yerleşimi frontal ve parietal, parieto-okspital lob yerleşimi parietal ve oksipital, temporo-okspital lob yerleşimi temporal ve oksipital, temporo-parietal lob yerleşimi temporal ve parietal, fronto-temporal lob yerleşimi frontal ve temporal ve fronto-parieto-temporal yerleşim ise frontal, temporal ve parietal tümörler olarak kabul edildi. İstatistiksel çalışma amacıyla bu şekilde sayısı toplam 52'den 68'e çıkan çalışma grubu yerleşimleri itibariyle lokalizasyonları böylece frontal, temporal, parietal ve oksipital lob tümörleri olarak dört ana gruba ayrıldı. Olguların 21'inin (%30,9) temporal lob, 20'sinin (%29,4) parietal lob, 15'inin (%22,1) frontal, 12'sinin (%17,6) oksipital lob yerleşimli oldukları saptandı (Tablo 8).

Tablo 8: Olguların tümör yerleşim yerine göre dağılımları

Tümör yerleşim yeri	Olgu sayısı	%
Temporal	21	30,9
Parietal	20	29,4
Frontal	15	22,1
Oksipital	12	17,6
Toplam	68*	100

**Olgu sayısındaki farklılık için metne bakınız*

18 ayın altında ve üstünde yaşam süresine sahip olgular arasında frontal lob yerleşimi istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdi. Frontal lob yerleşimli olguların frontal lob yerleşimli olmayanlara göre 18 aydan daha fazla yaşam süresine sahip olduğu saptandı (p= 0,018).

Olguların 47' sinin (%90,3) tedavi bilgilerine ulaşıldı. Bunlardan 32'si (%68,1) radyoterapi (RT) + kemoterapi (KT) + temozolomid (T), 6'sı (%12,8) sadece RT almış olup 9'unun (%19,1) hiçbir tedavi almamış/alamamış olduğu saptandı (Tablo 9).

Tablo 9: Olguların tedavi bilgileri

Tedavi	Olgu sayısı	%
RT+KT+T	32	68,1
Yalnızca RT	6	12,8
Almayanlar	9	19,1
Toplam	47*	100

**Olgu sayısındaki farklılık için metne bakınız. RT: Radyoterapi KT: Kemoterapi T: Temozolamid*

RT +KT+T alanlar ile yalnızca RT alanlar arasında yaşam süresi açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık saptandı (p=0,006). RT+ KT +T alan grupta yaşam süresi daha uzun bulundu.

İHK ve İSH Sonuçları

NFP, Sinaptofizin ve EGFR boyanma özellikleri:

NFP ile 20 (%38,5), sinaptofizin ile 25 (%48,1) ve EGFR ile 10 (%19,2) olguda boyanma saptanmazken, EGFR ile 25 (%48,1), NFP ile 17 (%32,7) ve sinaptofizin ile 13 (%25,0) olguda 3+ boyanma saptandı. Olguların boyanma skorlarına göre dağılımı Tablo 10'de verilmektedir.

Tablo 10: Olguların NFP, Sinaptofizin ve EGFR boyanma skorlarına göre dağılımı

Skor	NFP olgu sayısı (%)	Sinaptofizin olgu sayısı (%)	EGFR olgu sayısı (%)
0	20 (38,5)	25 (48,1)	10 (19,2)
1	2 (3,8)	2 (3,8)	7 (13,5)
2	13 (25,0)	12 (23,1)	10 (19,2)
3	17 (32,7)	13 (25,0)	25 (48,1)
Toplam	52 (100)	52 (100)	52 (100)

Neu-N boyanma özellikleri:

Aşıkâr tümör hücrelerinde GFAP ile birlikte Neu-N pozitifliği saptanan olguların sayısı 13 (%25,0) iken, tümör hücrelerinde Neu-N pozitifliği saptanmayan olguların sayısı ise 39 (%75,0) olarak saptandı (Tablo 11).

Tablo 11: Neu-N boyanma oranları

Neu-N	Olgu sayısı	%
Negatif	39	75,0
Pozitif	13	25,0
Toplam	52	100

Nöronal diferansiasyon:

Nöronal belirleyicilerden NFP ve sinaptofizinin 3+ olması ve/veya Neu-N'in GFAP (+) aşıkâr tümör hücrelerinde pozitif olması kriter olarak alındığında, olguların 23'ünde (%44,2) nöronal diferansiasyon olduğu saptandı. Bu olguların 6'sı her üç belirleyici ile, 9'u iki belirleyici ile ve 8'i de bir belirleyici ile pozitif (Tablo 12). NFP, üç nöronal belirleyici içinde en yüksek ekspresyon oranına sahip olup 18 olguda (%34,6) 3+ boyanma gösterdi. Nöronal diferansiasyon ile sağkalım süresi arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı.

Tablo 12: Olguların nöronal belirleyicilerle boyanma özelliklerine göre dağılımı (n=23)

Yalnız NFP(+)	Yalnız Sin(+)	Yalnız Neu-N(+)	NFP(+)/Sin(+)	NFP(+)/Neu-N(+)	Sin(+)/Neu-N(+)	NFP(+)/Sin(+)/Neu-N(+)
5	–	3	5	2	2	6

NFP: Nörofilament protein Sin: Sinaptofizin Neu-N: Nöronal nükleer antijen

Ki-67 boyanma özellikleri:

Ki-67 proliferasyon indeksi %7 ile %90 arasında değişiyordu (ortalama $32,4 \pm 21,1$, ortanca 25,0). Düşük ve yüksek ekspresyon seviyeleri için %20 cut-off değeri kabul edildi. Buna göre, olguların 24'ünde (%46,2) düşük, 28'inde (%53,8) ise yüksek proliferasyon indeksi saptandı (Tablo 13).

Tablo 13: Ki-67 proliferasyon indeksine göre olguların dağılımı

Ki-67 proliferasyon indeksi	Olgu sayısı	%
<%20	24	46,2
$\geq$ %20	28	53,8
Toplam	52	100

Ki-67 proliferasyon indeksi %20'nin altında olanlarla olmayanlar arasında yaşam süresi açısından anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

EGFR/CISH boyanma özellikleri:

Olguların 39'unda (%75) amplifikasyon saptanmadı. 5 olguda (%9,6) düşük amplifikasyon, 8 olguda (%15,4) ise yüksek amplifikasyon saptandı (Tablo 14). EGFR amplifikasyonu gösteren olguların tümünde EGFR aşırı

ekspresyonu gözlenirken, EGFR aşırı ekspresyonu gösteren olguların ancak %31,0'ında amplifikasyon saptandı.

Tablo 14: EGFR amplifikasyonuna (EGFR/CISH) göre olguların dağılımı

EGFR amplifikasyonu	Sayı	Yüzde (%)	EGFR amplifikasyonu	Sayı	Yüzde (%)
negatif	39	75,0	negatif	39	75,0
düşük	5	9,6	pozitif	13	25,0
yüksek	8	15,4			
Toplam	52	100	Toplam	52	100

İmmunhistokimyasal ve ISH incelemelerinin birbirleri ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi:

Yaş ve cinsiyet ile çalışılan belirleyiciler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı.

İmmunhistokimyasal belirleyicilerin ekspresyonları ile sağkalım süresi arasında herhangi bir ilişki saptanmadı. Ancak 18 ayın altında ve üstünde yaşam süresine sahip olgular arasında EGFR gen amplifikasyonu istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdi. 18 aydan daha fazla yaşam süresine sahip olan olgularda EGFR gen amplifikasyonu daha yüksek bulundu ($p=0,018$).

Frontal lob yerleşimli olgularla frontal lob dışı yerleşimli olgular arasında EGFR gen amplifikasyonu istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdi. Frontal lob yerleşimli olgularda EGFR gen amplifikasyonu daha yüksek bulundu ($p=0,006$).

NFP–sinaptofizin, NFP–Neu-N ve sinaptofizin–Neu-N ekspresyonları arasında pozitif korelasyon saptandı (Sırasıyla $p=0,000$, $p=0,002$, $p=0,015$).

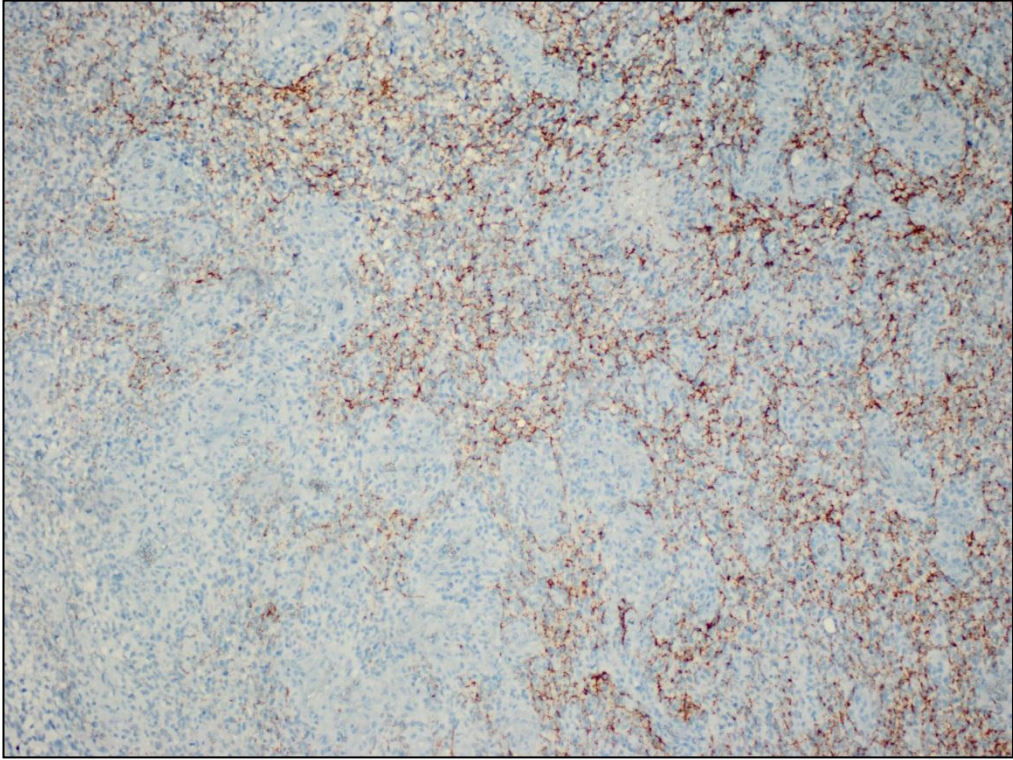
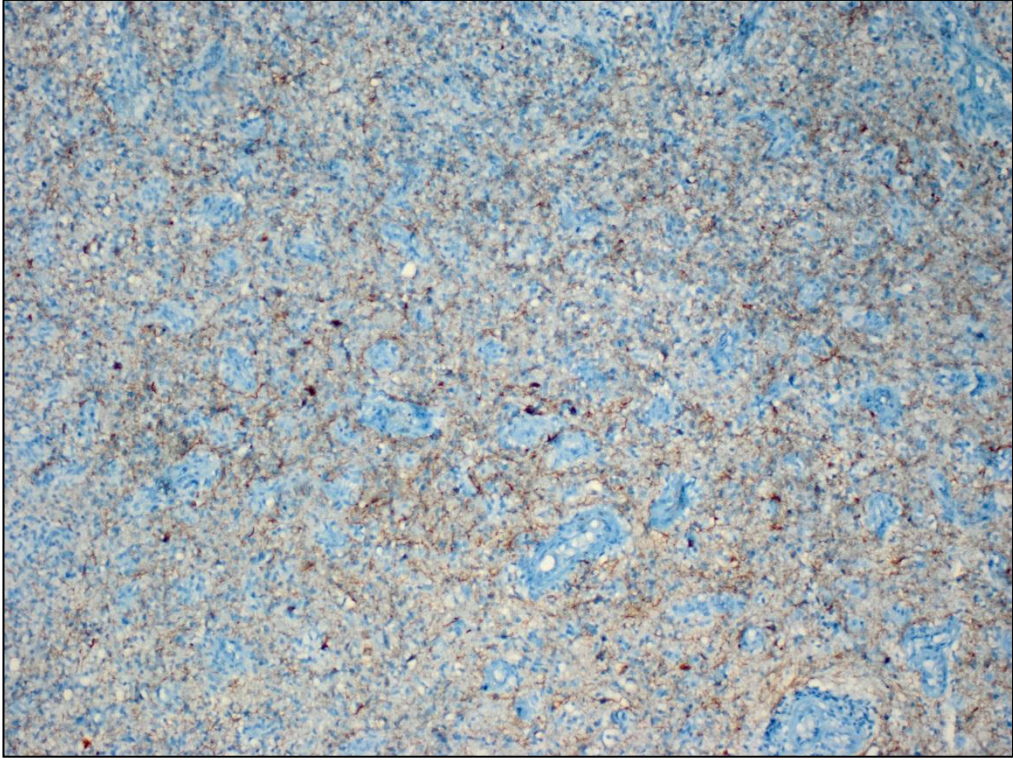
Sinaptofizin ve/veya NFP'nin 3+ boyanması ve/veya Neu-N'in GFAP (+) aşıkâr tümör hücrelerinde pozitif bulunması ile tanımlanan nöronal diferansiasyon ile sağkalım süresi arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı.

İmmunhistokimyasal yöntemle saptanan EGFR ekspresyonu ile CISH yöntemiyle saptanan EGFR gen amplifikasyon seviyesi arasında korelasyon saptandı ($p=0,001$). Neu-N ekspresyonu ile EGFR gen amplifikasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p=0,012$).

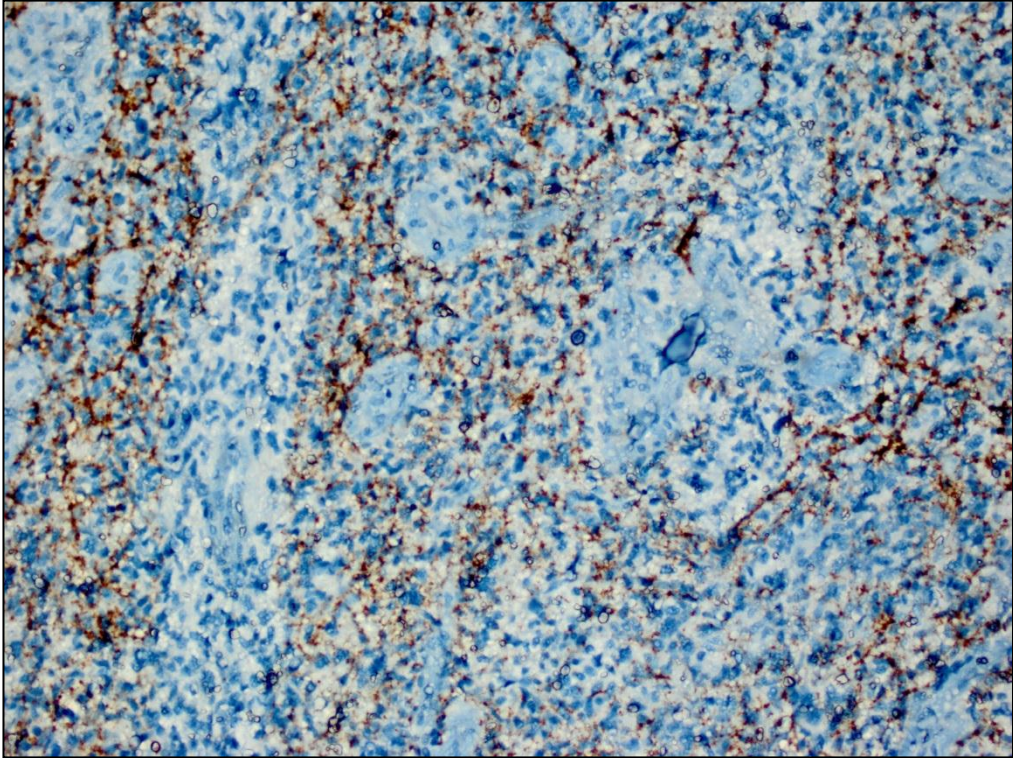
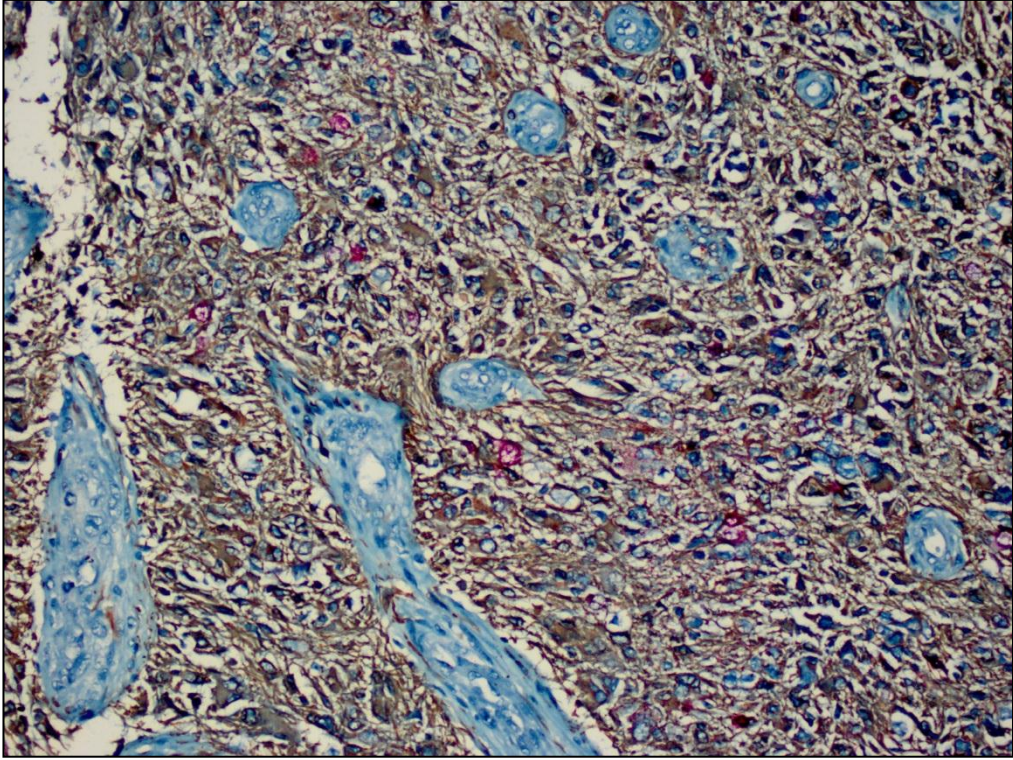
İstatistiksel çalışmalar sonunda aralarında anlamlı ilişki çıkan parametreler ve bu ilişkilerin ortaya çıkardığı sonuçlar Tablo 15'de özetlenmektedir.

Tablo 15: Aralarında anlamlı ilişki olduğu ortaya konan parametreler ve elde edilen sonuçlar

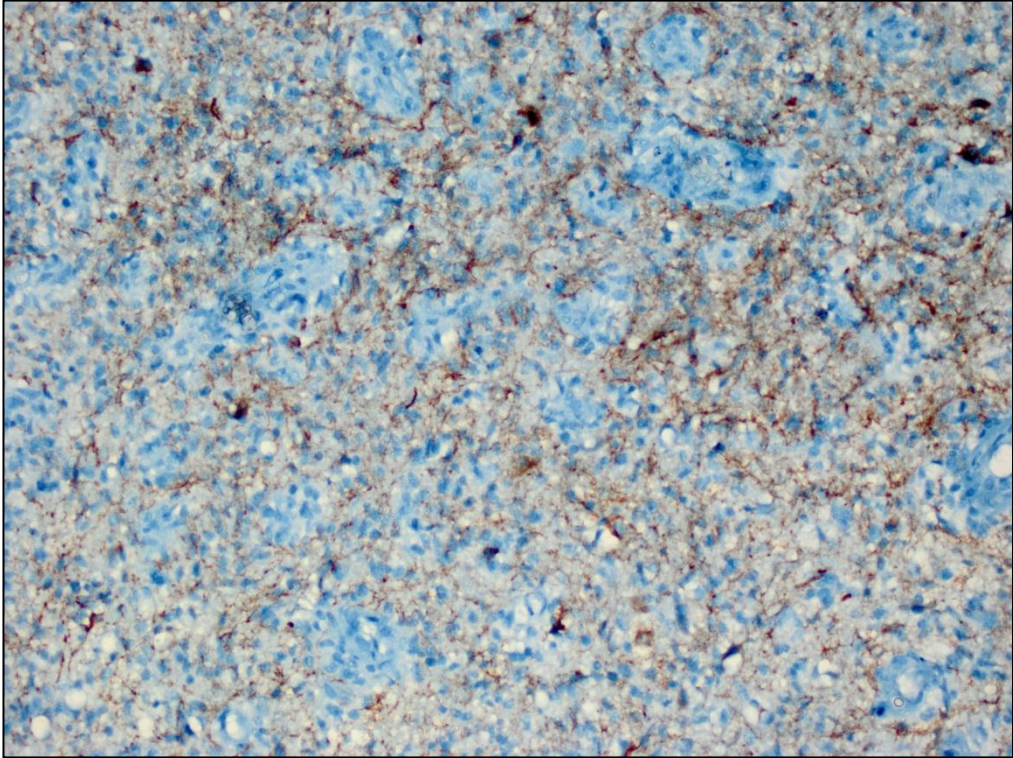
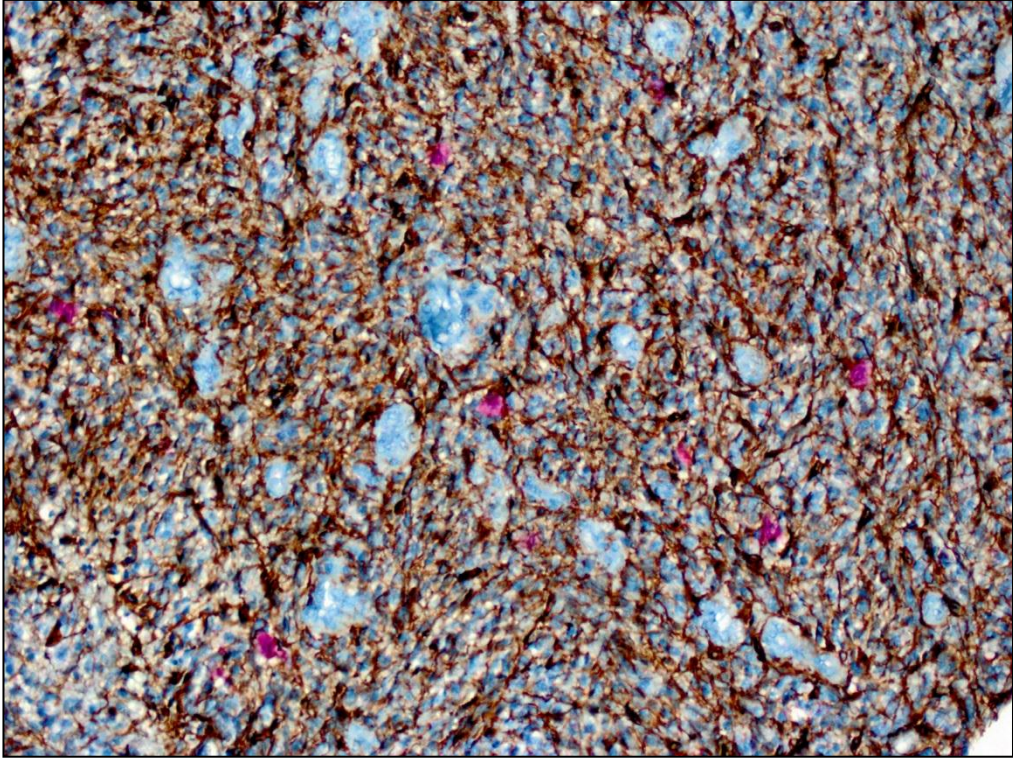
Parametreler/Sonuç	P değeri
Yaşla sağkalım süresi arasında negatif korelasyon var	0,001
Radyoterapi+kemoterapi+temozolamid alanların sağkalım süreleri yalnızca radyoterapi alanların yaşam sürelerinden daha uzun	0,006
NFP ile sinaptofizin ekspresyonu arasında pozitif korelasyon var	0,000
NFP ile Neu-N ekspresyonu arasında pozitif korelasyon var	0,002
Sinaptofizin ile Neu-N ekspresyonu arasında pozitif korelasyon var	0,015
Neu-N ekspresyonu ile EGFR amplifikasyonu arasında pozitif korelasyon var	0,012
EGFR ekspresyonu ile EGFR amplifikasyonu arasında pozitif korelasyon var	0,001
Frontal lob yerleşimi olan hastalarda 18 aydan fazla yaşama şansı yüksek	0,018
EGFR gen amplifikasyonu olan olgularda 18 aydan fazla yaşama şansı yüksek	0,018
Frontal lob yerleşimi ile EGFR amplifikasyonu arasında pozitif korelasyon var	0,006



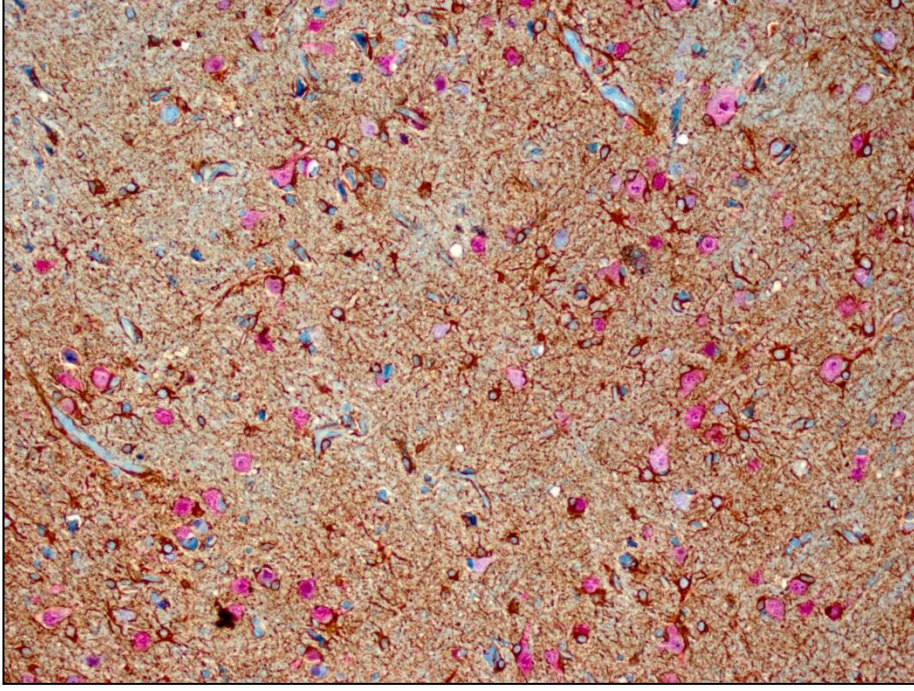
Resim 1. Aynı olguya ait NFP ve sinaptofizin güçlü pozitifliği (x20)



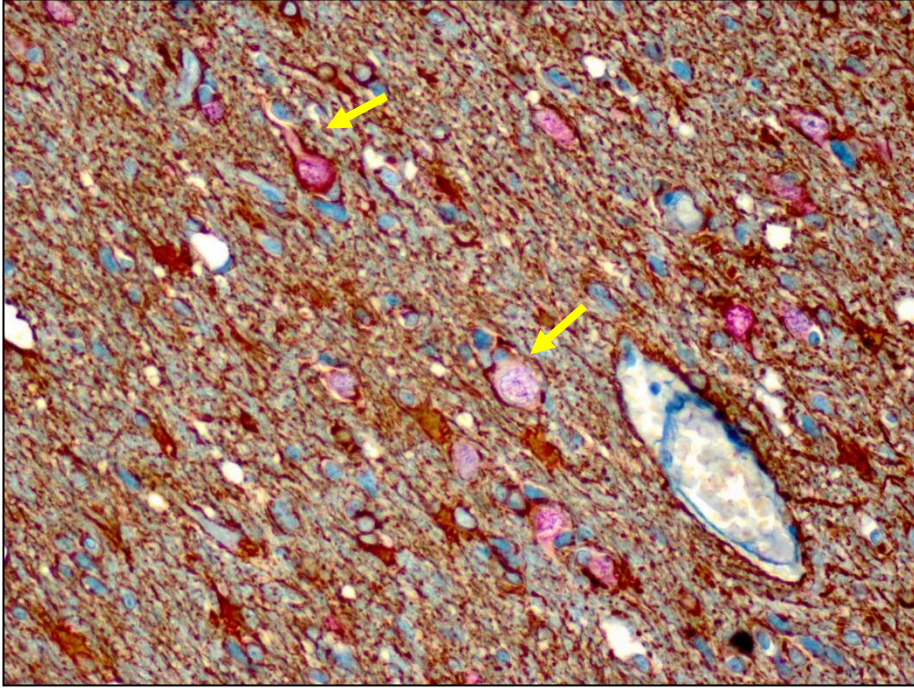
Resim 2. Aynı olguya ait dual GFAP-Neu pozitifliği ile sinaptofizin güçlü pozitifliği (x20)



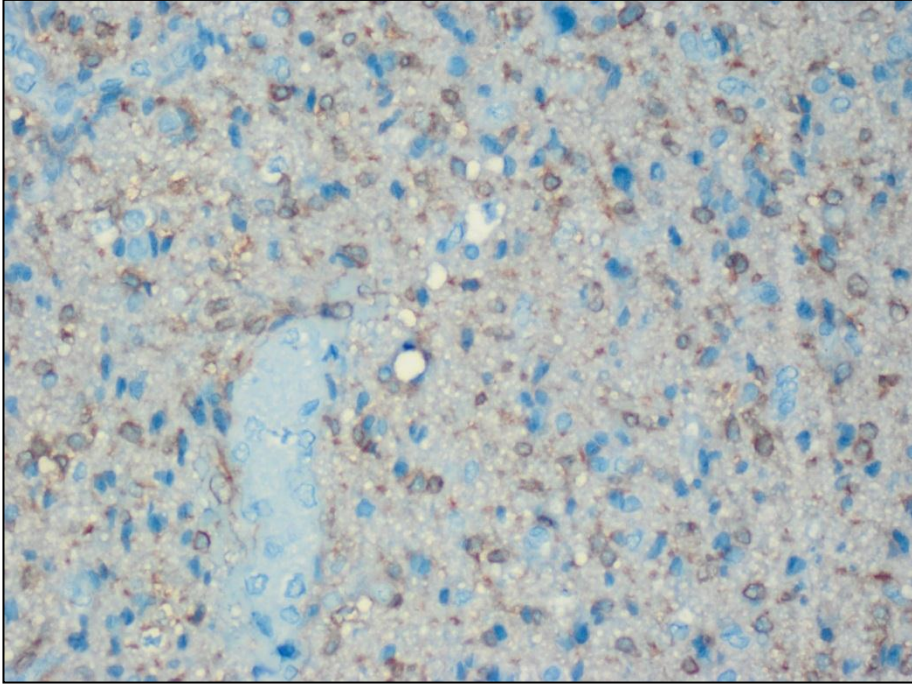
Resim 3. Aynı olguya ait dual GFAP-Neu pozitifliği ile NFP güçlü pozitifliği (x20)



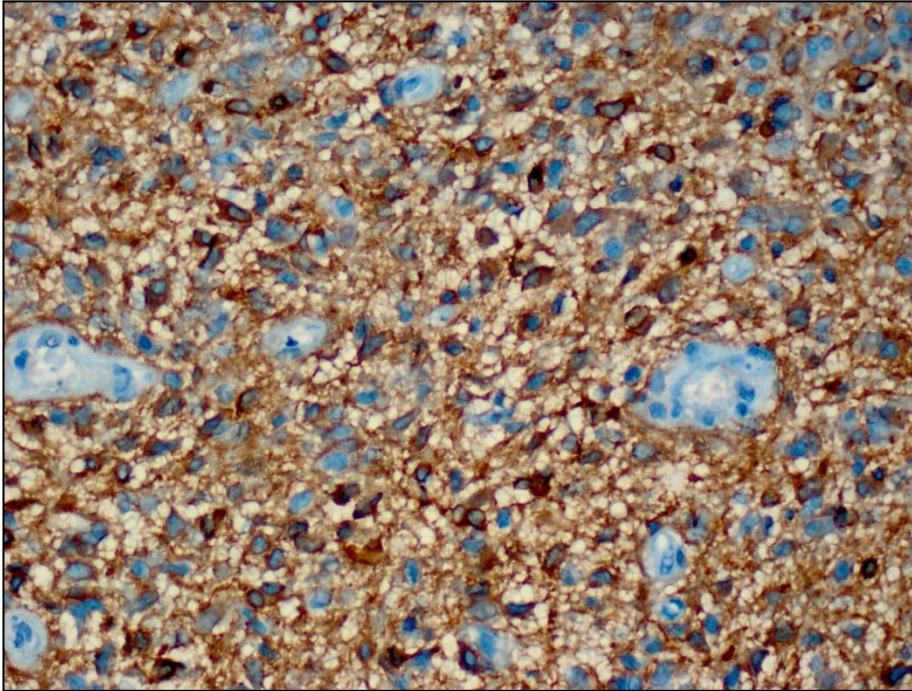
Resim 4. Olağan beyin dokusunda Neu-N pozitif nöronlar (x10)



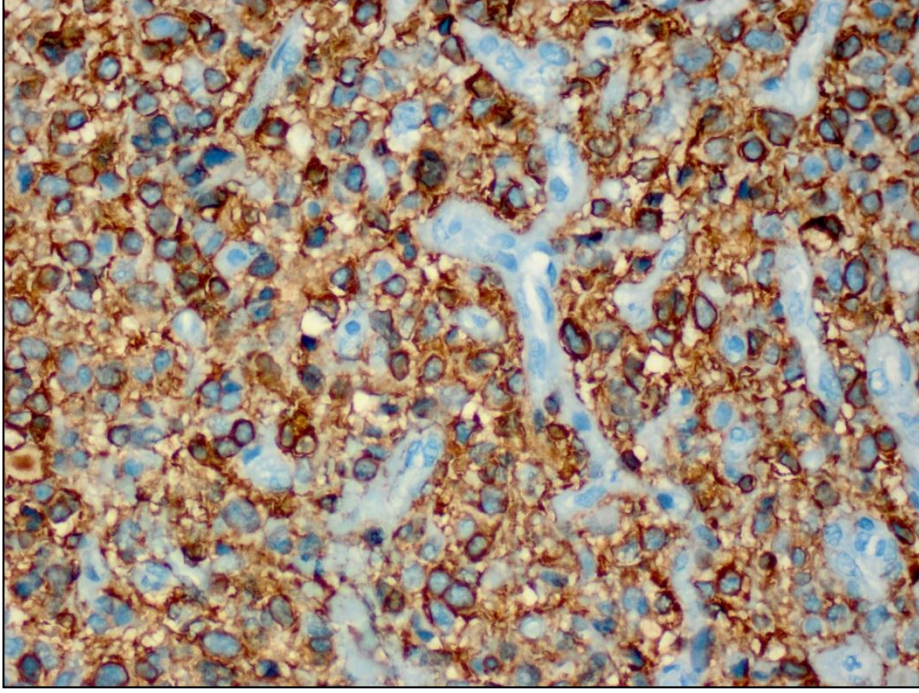
Resim 5. Tümörün infiltratif gelişim gösterdiği alanlarda olağan nöronların Neu-N pozitifliği ve tümör hücrelerinin dual GFAP-Neu-N pozitifliği (x40)



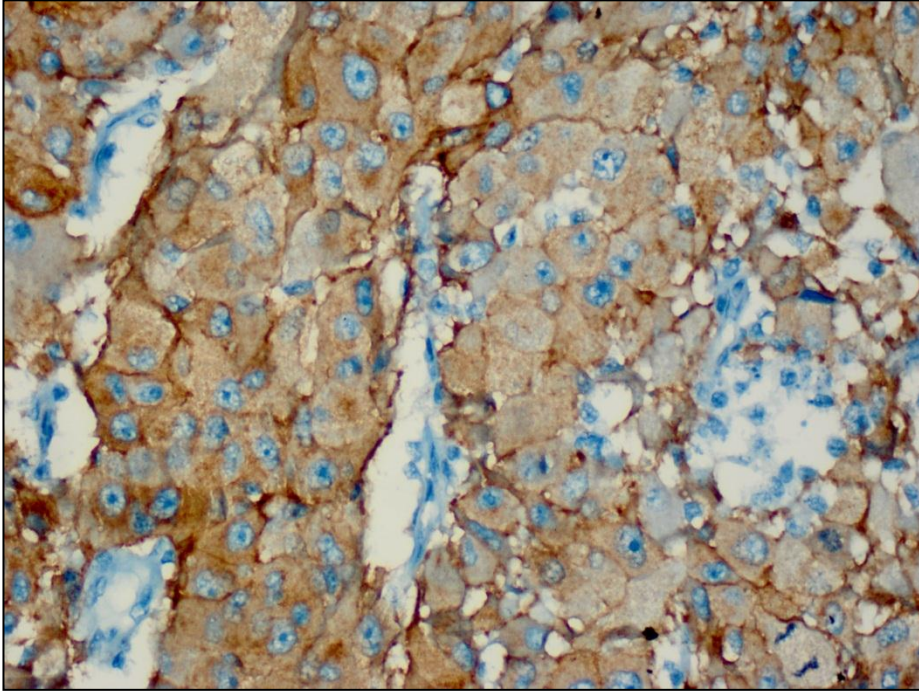
Resim 6. EGFR membranöz+sitoplazmik düşük ekspresyon seviyesi (x20)



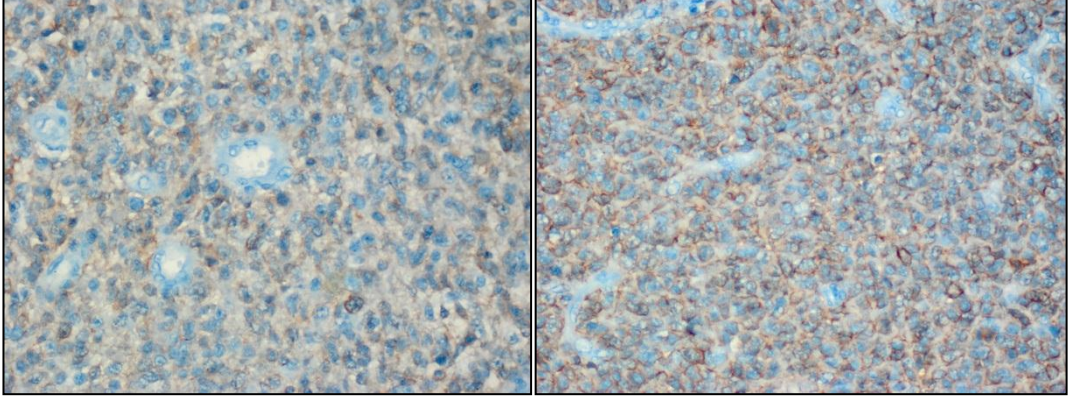
Resim 7. EGFR membranöz+sitoplazmik orta ekspresyon seviyesi (x20)



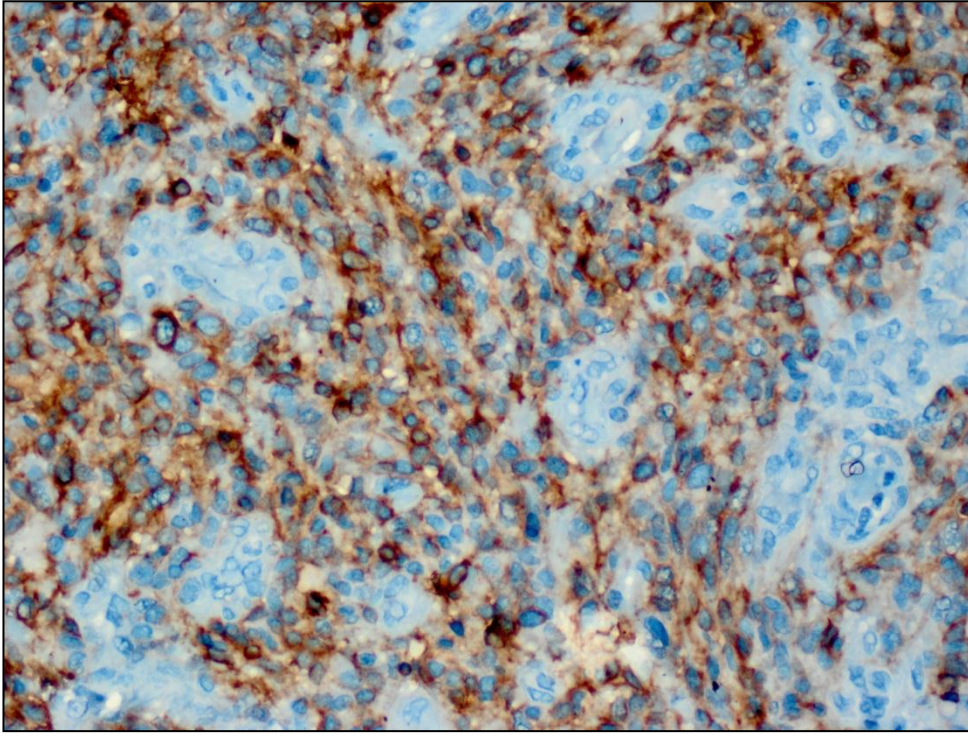
Resim 8. EGFR membranöz+sitoplazmik yüksek ekspresyon seviyesi (x40)



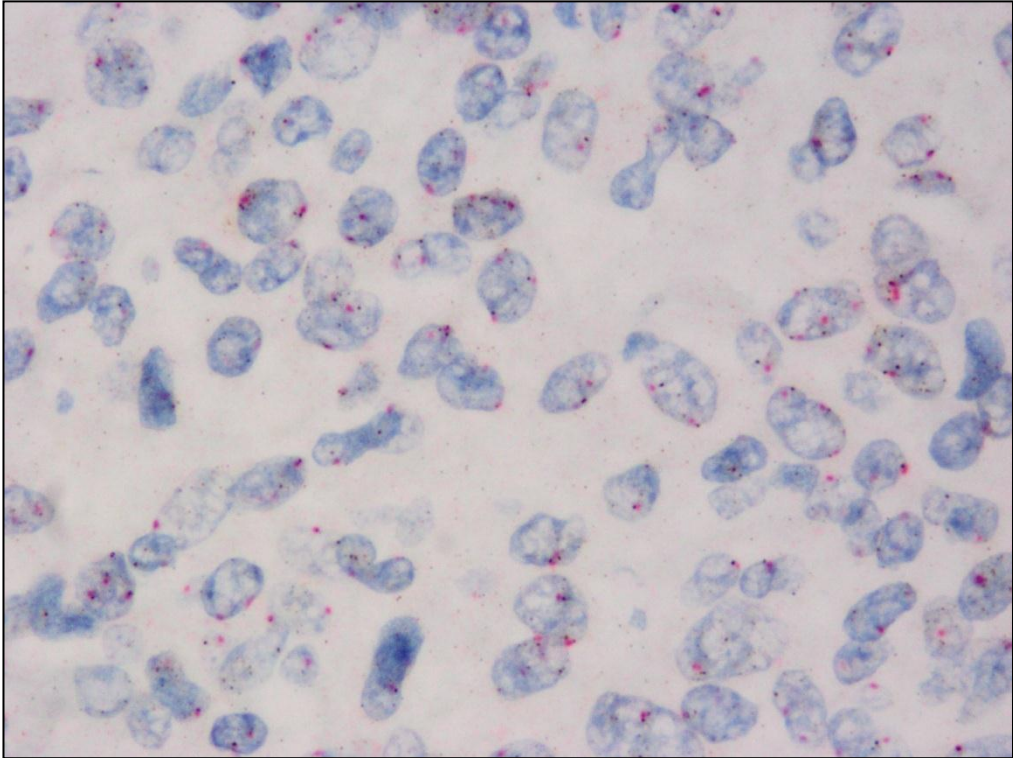
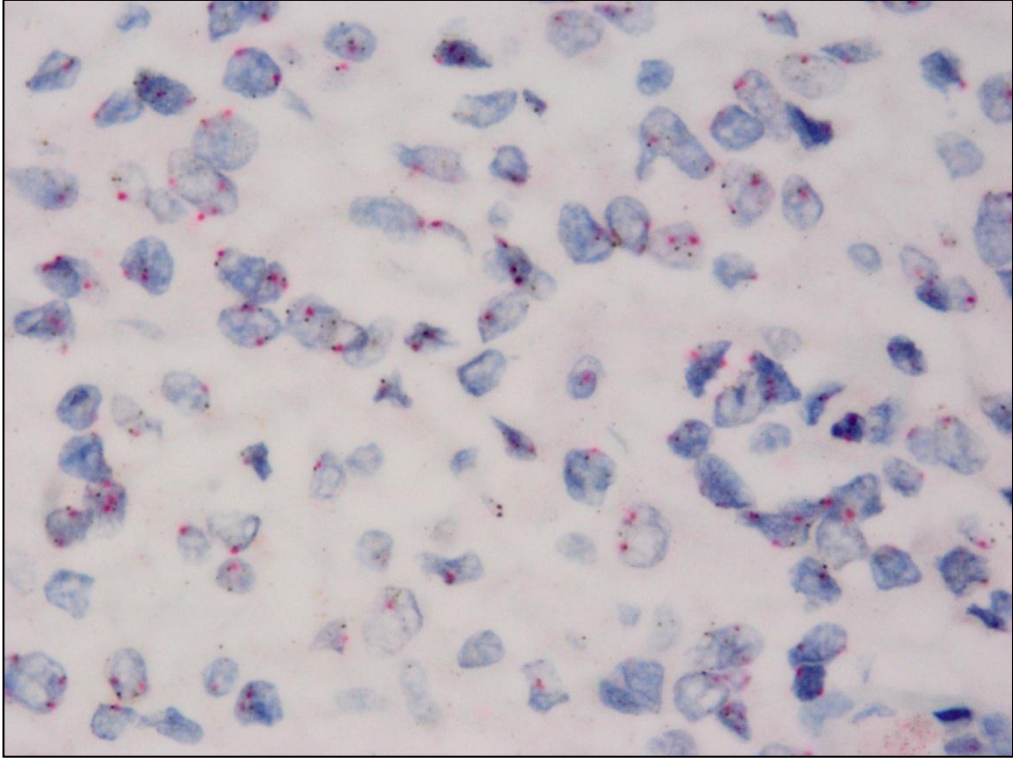
Resim 9. Dev tümör hücrelerinde EGFR membranöz+sitoplazmik yüksek ekspresyon seviyesi (x40)



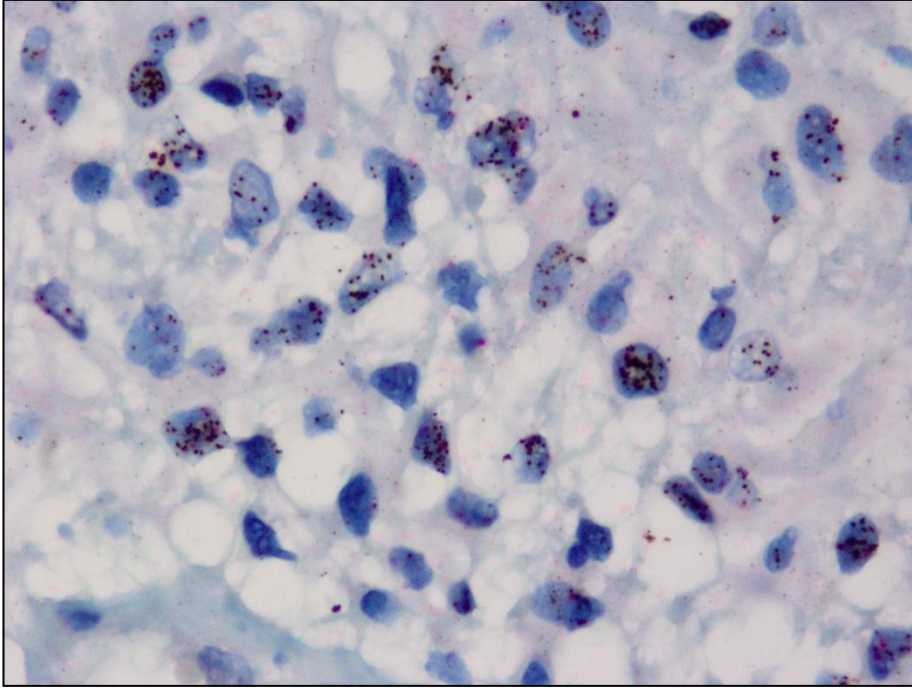
Resim 10. EGFR membranöz düşük ve orta ekspresyon seviyesi (x20)



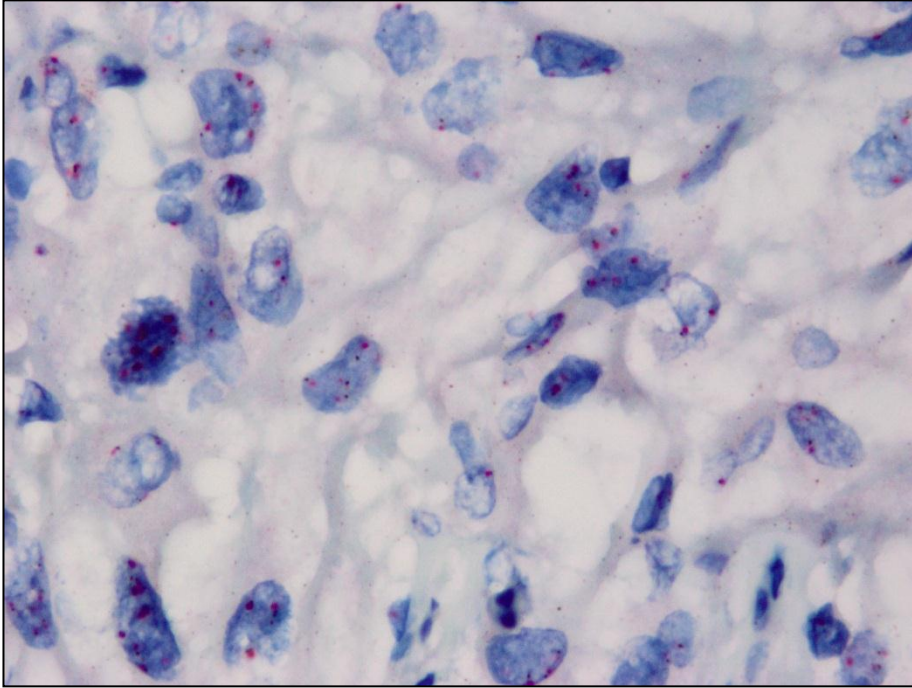
Resim 11. EGFR membranöz güçlü ekspresyon seviyesi (x40)



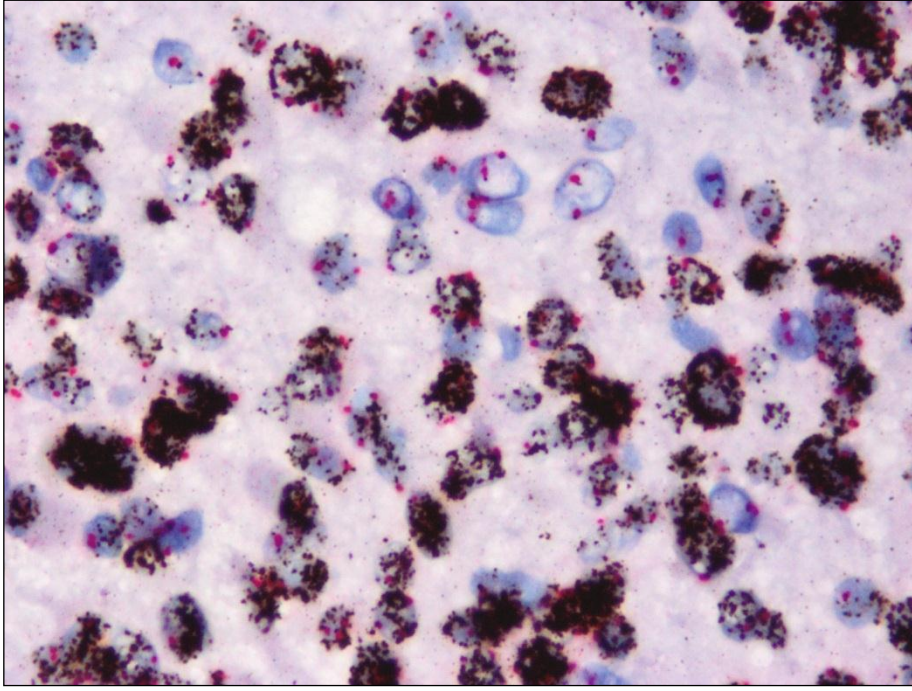
Resim 12. EGFR/CH7 tekli ve çoklu kopyalar (x100)



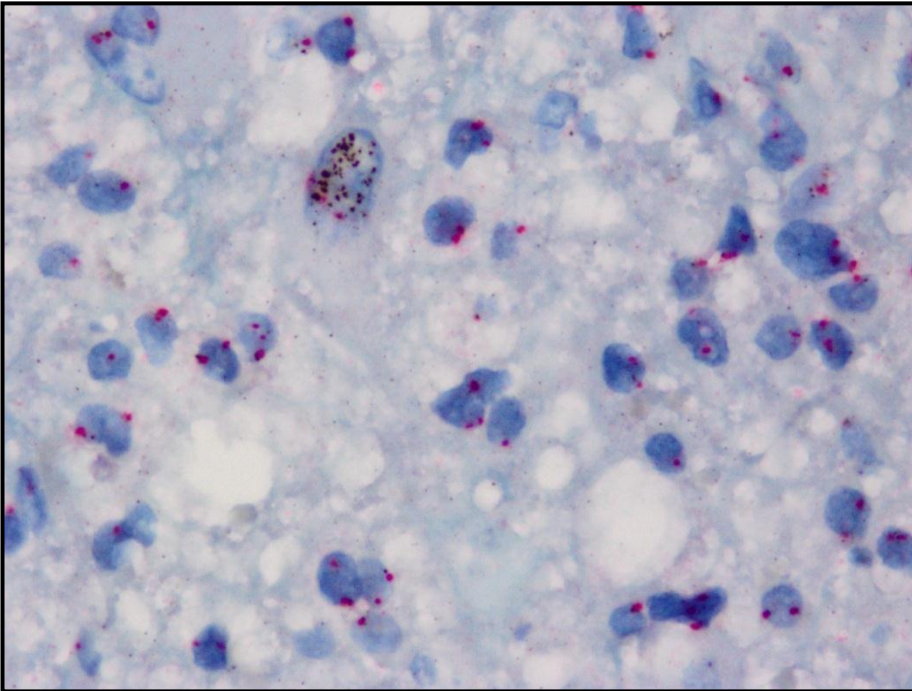
Resim 13. EGFR/CH7 hafif amplifikasyon (x100)



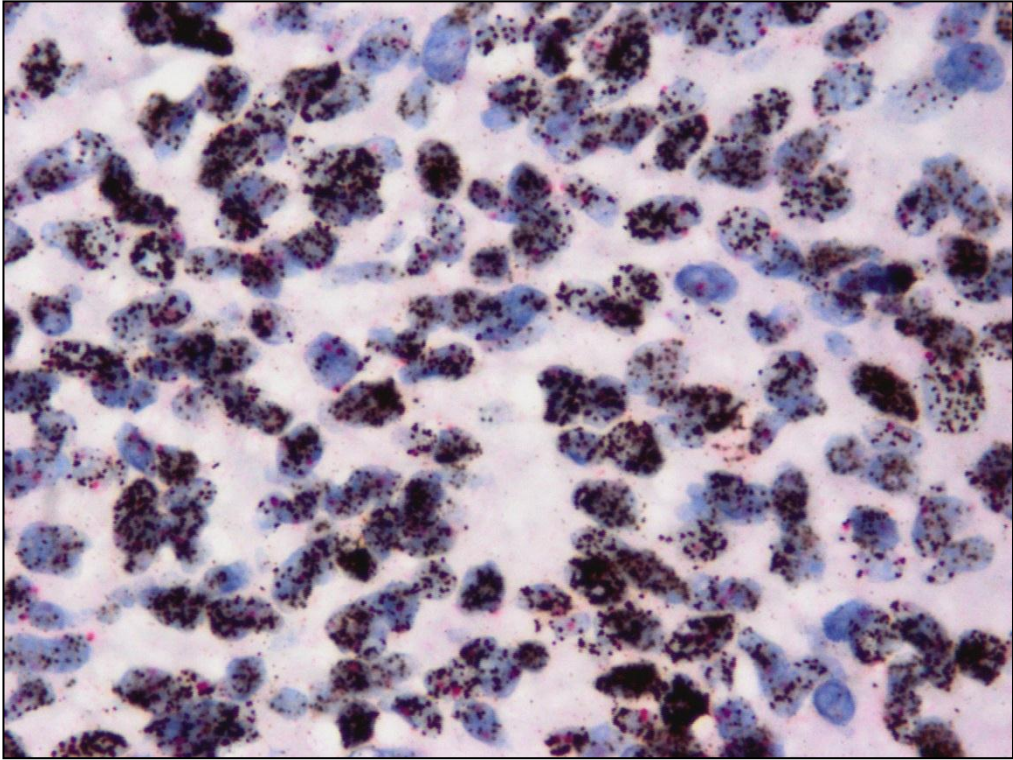
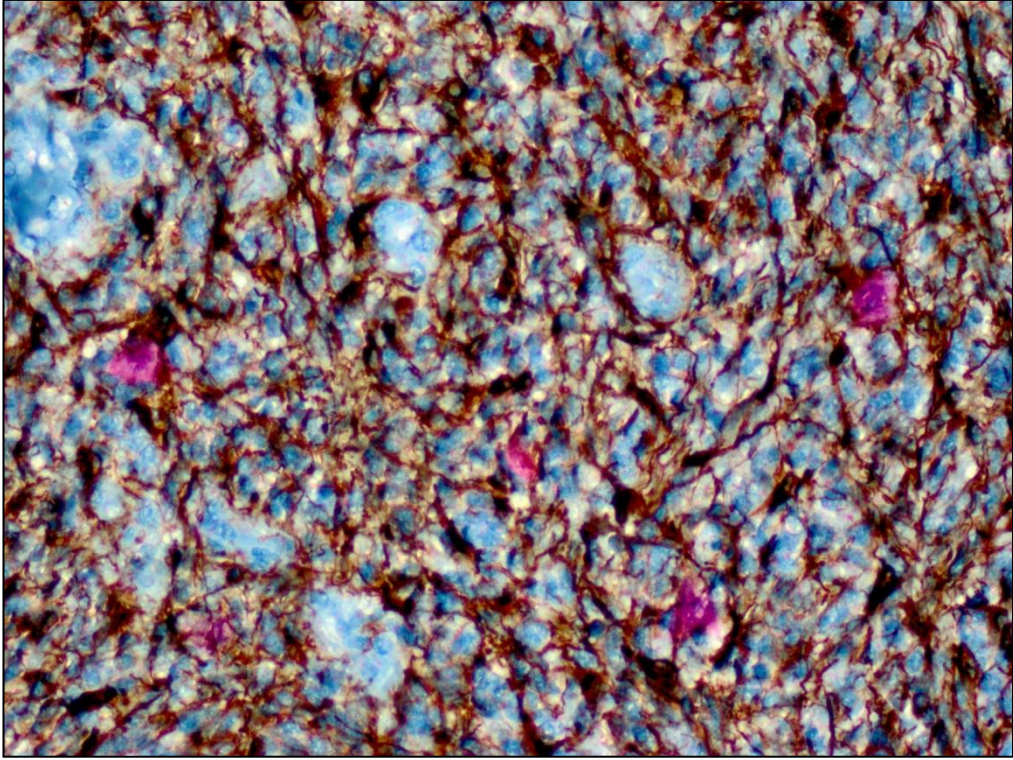
Resim 14. EGFR/CH7 aynı tümörün farklı bir hedef bölgesi tekli ve çoklu kopyalar (heterojenite) (x100)



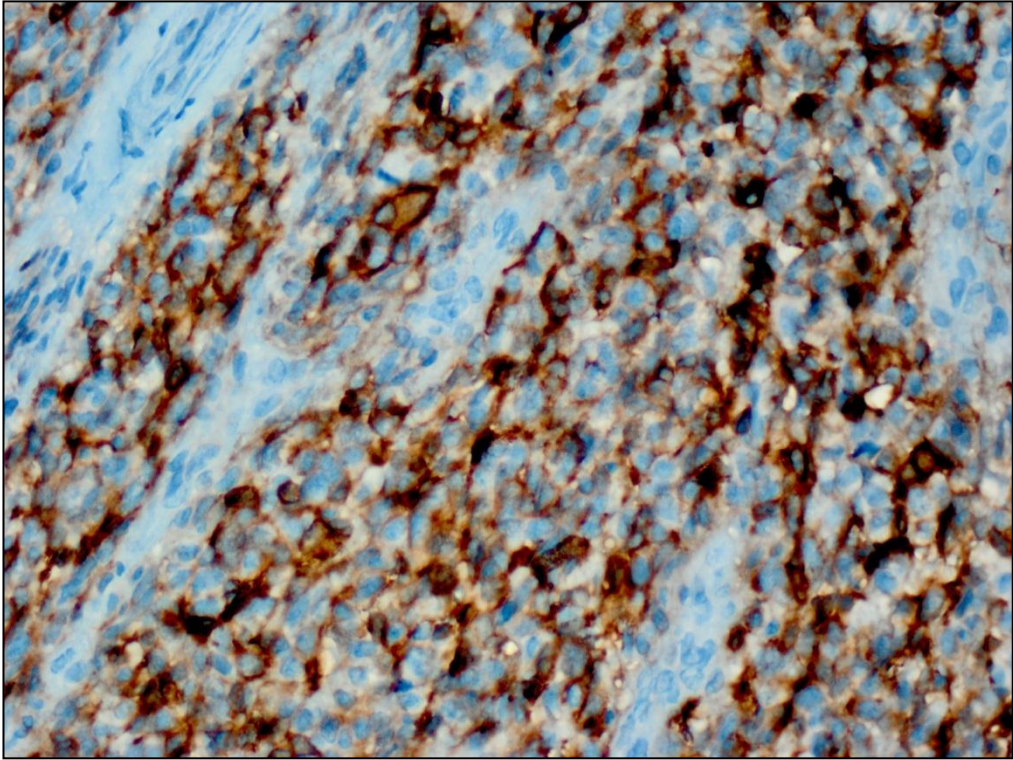
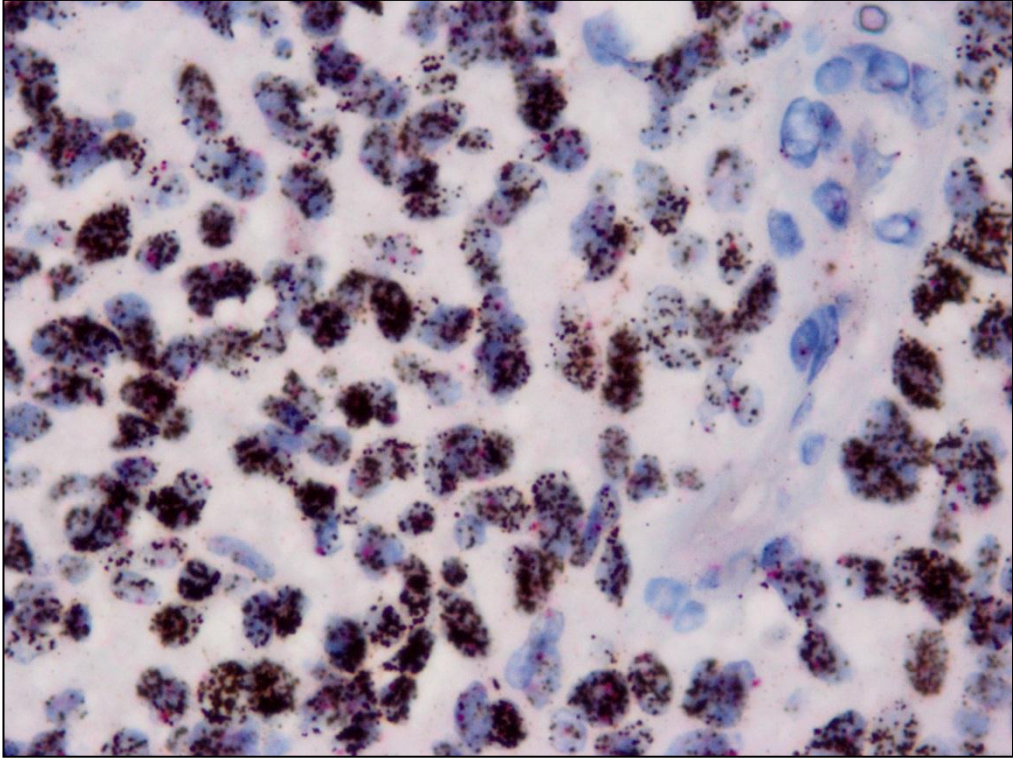
Resim 15. EGFR/CH7 güçlü amplifikasyon (x100)



Resim 16. EGFR/CH7 aynı tümörün farklı bir hedef bölgesi (heterojenite) (x100)



Resim 17. Aynı olguya ait dual GFAP-Neu-N pozitifliği ve EGFR/CH7 güçlü amplifikasyonu (x100)



Resim 18. Aynı olguya ait EGFR/CH7 güçlü amplifikasyonu ve EGFR membranöz güçlü ekspresyon seviyesi (x100)

TARTIŞMA

GB en sık görülen ve en malign primer beyin tümörüdür. Tüm intrakranial neoplazmların yaklaşık olarak %12-15'ini ve astrositik tümörlerin %60-75'ini oluşturur (1, 2). Herhangi bir yaşta görülebilse de özellikle erişkinlerin hastalığıdır. Tümörün en sık ortaya çıktığı yaş aralığı 45-75'tir. Bizim olgu serimizde olguların yaşları 26 ile 81 arasında değişmekte olup (ortalama $56,2 \pm 13,6$) en büyük olgu grubu 60-69 yaş arasında bulunmaktaydı. GB'ların erkek-kadın oranı 1,26'dır. Bizim serimizde ise erkek hastalar olguların %65,3'ünü, kadın hastalar olguların 34,7'sini oluşturmakta olup erkek/kadın oranı 1,8 olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmadaki veriler yaş açısından literatürle uyumlu bulunurken, erkek hastaların sayısının belirgin biçimde fazla olması rastlantısal olarak değerlendirilmiştir.

GB'ların %90'dan fazlası daha yaşlı hastalarda (ortalama 62 yaş), öncesinde klinik bulgu olmaksızın genellikle 3 aydan kısa bir sürede hızla gelişir (primer ya da *de novo* GB). Sekonder GB'da yaşam süresi (ortalama 7.8 ay) primer GB'lardan (ortalama 4.7 ay) daha uzundur. Bu durum, sekonder GB'lu hastaların daha genç olmasının bir etkisi de olabilir. Farklı genetik yollardan gelişmeleri, farklı yaş gruplarını etkilemeleri ve tedaviye yanıtlarının farklı olmaları, primer ve sekonder GB'ların farklı antiteler olarak ele alınmasını gerektirmektedir (3).

Beyin tümörlerinde operasyon, radyoterapi ve kemoterapinin gelişmesine rağmen, GB hastalarının prognozu oldukça kötüdür. İsviçre ve Kanada'da yapılan retrospektif çalışmalara göre, hastaların %20'sinden azı 1 yıldan, %3'ten azı da 3 yıldan fazla yaşamaktadır (2,3). İyileşme eğilimi daha fazla ve yüksek preoperatif Karnofsky performans skoru olan genç hastalarda yaşam süresi ortalama 12 ay olup klinik gidiş daha iyidir. Literatürde tanı anında genç yaş, gros total eksizyon ve kombine RT ve KT'nin en önemli prognostik faktörler olduğu belirtilmiştir. Daha genç GB hastaları (tanı anında

<50 yaşı) belirgin olarak daha iyi prognoza sahiptir. Yapılan çoğu çalışmada yaşı en belirgin prognostik faktör olduğu vurgulanmıştır (3,32,33,35,37).

Bu çalışmadaki olguların tümü primer GB olup tanıdan ölüme kadar geçen yaşam süreleri 1 ila 32 ay arasında değişmektedir (ortalama $9,8 \pm 8,6$ ay, ortanca 7,5 ay). 6 olgu dışında tüm hastalar yitirilmiştir (%88,5). Yaşayan 6 olgunun 5'inde izlem süresi 12 aydan daha kısa olduğundan bu olgular yaşam süresi ile ilgili istatistiksel çalışmalara dahil edilmemişlerdir. Kalan 1 olgu ise 74 ay gibi GB için çok uzun bir yaşam süresine sahip olup NF ve sinaptofizin ile 3+ boyanma göstermiştir. Neu-N boyanması göstermeyen bu hastada 3+ EGFR immunhistokimyası ve yüksek EGFR amplifikasyonu bulunmuştur. Çalışmada yaşla yaşam süresi arasında negatif korelasyon saptanmış, ($p=0,001$) literatürle uyumlu olarak ileri yaş olgularda (>50) yaşam süresinin kısaldığı görülmüştür.

Glioblastomda uzun sağ kalım ile ilişkili pek çok klinik, histopatolojik ve moleküler belirleyiciler bildirilmiştir. Pek çok yayında genç yaş, unilateral yerleşimli tümör, yüksek Karnofsky skoru, gros total eksizyon ve adjuvan tedavilerin uzun sağ kalım ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (37,82-85). Bu çalışmaların birinde genç yaş, kadın cinsiyet, gros total eksizyon ve postoperatif kombine tedavinin iyi prognostik faktörler olarak değerlendirilmiştir (83). Tait ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 625 GB hastası retrospektif olarak incelenmiş ve 60 yaş altı, yüksek Karnofsky skoru, tümör rezeksiyonu, sağ lob ve unilateral yerleşim ile radyoterapi pozitif prognostik faktörler olarak saptanmışlardır (84). Yine benzer bir çalışmada gros total eksizyon ardından kombine radyoterapi ve kemoterapi alan GB hastalarında sağkalımın daha uzun olduğu bildirilmiştir (85). Gros total rezeksiyonun parsiyel rezeksiyona göre sağ kalımı uzattığı çoğu yayında vurgulanmıştır (86,87). Olguların 40'ına (%77) gros total, 12'sine (%23) subtotal eksizyon uygulandığı saptanan bu çalışmada yayınlarda belirtilenlerden farklı olarak operasyon şekli ile yaşam süresi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Bu durum prognozu belirlemede operasyon şeklinin tek parametre olarak değerlendirilemeyeceğini düşündürmüştür.

Stupp ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada operasyon öncesi radyoterapiye ek olarak temozolomid alan GB hastalarının sağ kalımının sadece radyoterapi alanlara göre daha uzun oldukları belirtilmiştir (89). Benzer bulgular pek çok çalışmada bildirilmiştir (89-91). Bizim çalışmamızda olguların 47'sinin (%90,3) tedavi bilgilerine ulaşılmış, bunlardan 32'sinin (%68,08) radyoterapi (RT) + kemoterapi (KT) + temozolomid (T), 6'sının (%12,8) sadece RT almış olup 9'unun (%19,1) ise hiçbir tedavi almadığı saptanmıştır. RT +KT+T alanlar ile sadece RT alanlar arasında yaşam süresi açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık saptanmış, başka yayınlarda belirtildiği gibi RT+KT+T alan grupta yaşam süresi daha uzun bulunmuştur ($p=0,006$).

GB sıklıkla serebral hemisferlerde, subkortikal beyaz cevherde izlenir. 987 glioblastom olgusunun ele alındığı büyük bir çalışmada temporal, pariyetal, frontal ve oksipital loblarda yerleşim oranları sırasıyla %31, %24, %23 ve %16 olarak saptanmıştır (3). Bu çalışmada ise aynı oranlar %30,9-%29,4-%22,1 ve %17,6 olarak saptanmış olup genel olarak literatürle uyumlu bulunmuştur. 18 ayın altında ve üstünde yaşam süresine sahip olgular tümör yerleşimi açısından karşılaştırıldığında, frontal lob yerleşimli olguların olmayanlara göre sağkalım şansının daha yüksek olduğu saptandı ($p=0,018$). Bu çalışmada tümör lokalizasyonu ve operasyon şekli arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

GB'da ortalama Ki-67 indeksi %15-20 olarak bildirilmiş, proliferasyon indeksi ve klinik gidiş arasındaki ilişki ise kanıtlanamamıştır (6). Bir çalışmada glioblastomlarda Ki-67 proliferasyon indeksi ile yaşam süresi arasında negatif korelasyon saptanmıştır (32). Jaros ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da EGFR overekspresyonu ve yüksek Ki-67 proliferasyon indeksinin kötü prognostik faktörler olduğu belirtilmektedir (57). Bazı yazarlara göre Ki-67, EGFR ve p53'e kıyasla yaşam süresinde en önemli faktördür (56,57). Yine başka bir çalışmada ise Ki-67 proliferasyon indeksi %20'nin üzerinde olanlarda ölüm riskinin 2.2 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (58). Başka çalışmalarda da yaş, cinsiyet ve Ki-67'nin yaşam süresi ile ilişkili en güçlü önemli faktörler olduğu belirtilmiştir (92-94). Bunlara karşın, Moskowitz ve

arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Ki-67 proliferasyon indeksinin hasta sağkalımında ve tedaviye yanıtta bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada sağ kalımın yüksek Karnofsky performans skoru, yaş, total eksizyon ve adjuvan radyoterapi ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır (6). Bu çalışmada olguların 24'ünde (%46,2) Ki-67 proliferasyon indeksi %20'nin altında olup, 28'inde (%53,8) ise %20 ve üstünde bulunmuştur. Moskowits ve arkadaşlarının çalışmasına benzer olarak bizim çalışmamızda da Ki-67 proliferasyon indeksi ile sağkalım arasında bir ilişki saptanmamıştır.

Mikst glionöronal fenotip gösteren değişik tipte santral sinir sistemi tümörleri tanımlanmıştır (1). Bu kategori hala büyümektedir. Nadir istisnalar dışında (anaplastik gangliogliom), tümü düşük dereceli olup benign davranış gösterirler. Tümü değişik nöronal belirleyicilerle immunreaktivite gösteren bir nöronal komponent ve GFAP pozitif bir glial element içerir. Histolojik olarak diffüz astrositom görünümde olanlar oligodendrogliom ya da ependimoma göre daha fazla nöronal diferansiyasyon gösterirler (48). Pleomorfik ksantoastrositom ve subependimal dev hücreli astrositom da benzer özellikler gösterir. Bu tümörlerin parsiyel nöronal immunfenotip sergilemeleri ayırıcı tanıda yardımcıdır (59).

Birçok çalışmada yüksek dereceli astrositomlarda, özellikle GB'da farklı nöronal antijen ekspresyonu tanımlanmıştır (95,96). Bunlar, hem nöronal diferansiyasyonun erken evresinde eksprese edilen OLİG2, DLL-3, BCAN, Klass III beta-tubulin gibi antijenler, hem de nöronal diferansiyasyon spektrumunun büyük ölçüde eksprese edilen bir parçası olan sinaptofizin, NFP, NeuN ve kromogranin gibi antijenlerdir.

Varlet ve arkadaşlarının çalışmasında, çoğu yüksek dereceli olan astrositik tümörlerde nöronal belirleyici ekspresyonunun daha iyi bir klinik gidişi yansıttığı bildirilmiştir (46). Bu seride NFP, başlıca pozitif nöronal belirleyicidir. NFP, nöroblastom, medullablastom ve retinoblastom gibi nöronal kökenli ya da nöronal diferansiyasyon gösteren tümörlerde eksprese edilir. NFP ekspresyonunun aynı zamanda düşük dereceli astrositomların fokal bir bulgusu olduğunu da bildirilen yayınlar da mevcuttur (49). NFP

yüksek dereceli astrositik ve oligoastrositik tümörlerde en sabit nöronal belirleyici olarak tanımlanmıştır. Yazarlar serilerinin immunfenotip ve klinik özelliklerine dayanarak, "malign glionöronal tümör" kategorisini önermişler ve nöronal diferansiasyonun olumlu prognostik bir faktör olduğunu savlamışlardır. Donev ve arkadaşları ise klinik gidişte bir farklılık saptamadıklarından "malign glionöronal tümör" kategorisinin anlamsız olduğunu belirtmişlerdir (45). Bu çalışmada 82 GB hastasında sinaptofizinin en çok eksprese edilen nöronal belirleyici olduğu bildirilmiştir. Sinaptofizin immunreaktivitesi primer santral sinir sistemi tümörleri arasında, gliom spektrumu boyunca glionöronal tümörlerden en az diferansiye primitif nöroektodermal tümörlere dek geniş bir spektrumda gösterilmiştir (45). Astrositik tümörlerde sinaptofizin immunpozitifliği yayınlarda bildirilmiştir (46-48). Bu çalışmada eksprese edilen diğer belirleyiciler azalan sıklıkla Neu-N, NFP ve kromogranindir (45).

Nöronal belirleyicilerle immunpozitif GB'lar ile immunnegatif GB'lar arasında klinik gidişte bir fark tespit edemeyen araştırmacılar, tek bir nöronal belirleyici pozitifliği gösteren dev hücreli GB'lar ile birden fazla belirleyici pozitifliği gösteren dev hücreli GB'lar arasında klinik gidişte anlamlı farklılıklar saptamışlardır. Aynı çalışmada, Varlet ve arkadaşlarının sonuçlarıyla çelişen biçimde, NFP pozitif tümöre sahip olanların negatif olanlara göre daha kısa yaşam süresine sahip oldukları bildirilmiş, immunpozitif tümörler arasında en yüksek oranda nöronal marker pozitifliği dev hücreli GB'larda saptanmıştır. Bu son gözlem Varlet ve arkadaşlarının serilerinde de bildirilmiştir (46). Donev ve arkadaşlarının çalışmasında GB'da nöronal belirleyici ekspresyonunun oldukça sık görüldüğü, prognostik öneminin iki ya da daha fazla nöronal belirleyici eksprese eden dev hücreli GB'larda sınırlı olduğu ve bunlarda da kötü prognostik faktör olduğu vurgulanmıştır. Literatürde dev hücreli GB'daki multinükleer dev hücrelerin tümör gelişiminin erken evresindeki küçük hücrelerden ya da glionöronal differansiasyon kapasitesindeki multipotent kök hücrelerden köken aldığı bildirilmektedir (42).

Yapılan başka bir çalışmada sinaptofizin ve Neu-N ekspresyonunun nöronal fenotip kanıtı için yeterli olduğu, genellikle NFP ekspresyonu

göstermeyen bir nöronal tümör olan santral nörositomda olduğu gibi, NFP ekspresyonunun çok da gerekli olmadığı belirtilmiştir (47).

Embriyolojideki gelişmeler, santral sinir sisteminin nöronal ve glial hücrelerinin ortak multipotent kök hücrelerinden köken aldığını açıklığa kavuşturmuştur (60). Singh ve arkadaşları, nöral kök hücre yüzey belirleyicisi CD133 ve nestin eksprese eden gliomlardan beyin tümörü kök hücresi izole etmişlerdir. Bu bulgular santral sinir sistemi nöroektodermal tümörlerinin ortak prekürsörden köken alan hem nöronal hem de glial neoplastik hücreleri içerebileceğini açıklamaktadır (60-63). Ayrıca GB'dan elde edilmiş hücrelerde nöronal tip iyon kanallarının varlığı gliomlarda nöronal diferansiyasyon varlığını desteklemektedir (48).

Edgar ve arkadaşlarının bir çalışmasında genellikle sinaptofizin gibi tek bir nöronal belirleyici ile pozitif olan histolojik olarak tipik GB olguları olduğu bildirilmektedir (81). Aynı yayında bu tümörlerin klasik GB'dan farklı bir davranış göstereceğine dair herhangi bir kanıt bulunmadığı belirtilmektedir. Bu tümörlerin yanı sıra elektron mikroskopik çalışmalarla nöronal diferansiyasyonu gösterilmiş, nöronal antijen ekspresyonu gösteren küçük hücre komponentli yüksek dereceli astrositik tümörler de tanımlanmıştır. Bu tümörlerin klasik GB'lardan ayırmanın faydalı olacağı vurgulanmaktadır (81).

Rodriguez ve arkadaşları, Varlet ve arkadaşlarının tanımladığı kategoriye uyan tümörler bildirmiş, nöronal diferansiyasyon varlığının sadece immunohistokimyasal olarak değil aynı zamanda elektron mikroskopik çalışmalarla da kanıtlanması gerektiğini belirtmişlerdir (65). Literatürde tipik infiltratif astrositomlardan farklı kategoride olan "malign mikst glionöral tümör" sınıflamasına uyacak pek çok olgu bildirilmiş, ancak bu durumun prognostik önemine ilişkin bir vurgu yapılamamıştır (65-71). Günümüzde klasik astrositomlarda nöronal hücrelerin önemi ve anlamı henüz net değildir.

Bizim çalışmamızda NFP ve/veya sinaptofizinin güçlü pozitifliği (3+) ve/veya GFAP (+) aşikar tümör hücrelerinde Neu-N pozitifliği nöronal diferansiyasyon olarak kabul edilmiş ve bu kriterleri taşıyan 23 olguda (%44,2) nöronal diferansiyasyon saptanmıştır. Başlıca pozitif nöronal belirleyici NFP olup olguların 18'inde (%34,6) güçlü biçimde (3+) eksprese

edilirken, diğer belirleyicilerden sinaptofizinin 3+ ve Neu-N'in pozitif olduğu olguların sayısının ise aynı (13-%25) olduğu saptanmıştır. Sinaptofizinin hiçbir olguda tek başına eksprese edilmemesi ya da en sık eksprese edilen belirleyici olmaması, başka yayınların tersine (45, 82) dikkati çeken bir durum olarak değerlendirilmiştir. NFP-sinaptofizin, NFP-Neu-N ve sinaptofizin-Neu-N ekspresyonları arasında pozitif korelasyon saptanmış olmasına karşın, (sırasıyla $p=0,000$, $p=0,002$, $p=0,015$) nöronal diferansiyasyon ile sağkalım süresi arasında Varlet ve arkadaşlarının (46) tersine, bazı başka yayınlarla da paralel olarak (45, 64) anlamlı bir istatistiksel ilişki bulunamamış ve bu konunun daha geniş serilerle çalışılmasının gerekli olduğu düşünülmüştür.

EGFR, GB'da en sık amplifiye olan gendir (8). EGFR amplifikasyonu primer GB'ların yaklaşık %40'ında görülür (3,10-20). EGFR amplifikasyonu aşırı ekspresyonla ilişkilidir. EGFR amplifikasyonlu tüm GB'ların EGFR aşırı ekspresyonu gösterdiği ve EGFR aşırı ekspresyonu gösteren hastalarda %70-90 EGFR amplifikasyonu gözleendiği bildirilmiştir (9). Bu çalışmada 7 olgu (%13,5) düşük seviyede, 10 olgu (%19,2) orta seviyede, 25 olgu (%48,1) ise yüksek seviyede aşırı ekspresyon gösterirken, 13 (%25) olguda da EGFR gen amplifikasyonu saptanmıştır. Serimizde literatürle uyumlu olarak immunhistokimyasal yöntemle EGFR ekspresyonu ile CISH yöntemiyle saptanan EGFR gen amplifikasyon seviyesi arasında pozitif korelasyon saptanmış ($p=0,001$), EGFR amplifikasyonu gösteren olguların tümünde EGFR aşırı ekspresyonu gözlenirken, EGFR aşırı ekspresyonu gösteren olguların ancak %31,0'ında amplifikasyon saptanmıştır. Bu durum, EGFR aşırı ekspresyonundan daha çok, amplifikasyonun daha güvenilir bir parametre olduğunu ortaya koymaktadır.

Önceki çalışmalarda daha yaşlı GB hastalarında EGFR aşırı ekspresyonu ve amplifikasyon oranının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (11,32). Yapılan bazı çalışmalarda ise hasta yaşları arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır (12). Bizim çalışmamızda da 50 yaş altı ve üstü hastalarda EGFR aşırı ekspresyon seviyesi ve gen amplifikasyonu açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır.

EGFR aşırı ekspresyonu ve gen amplifikasyonunun prognoza etkisi tartışmalıdır (11-13). Çoğu yayınlar kötü prognostik faktör olduğunu belirtirken bazıları da sağkalım süresini etkilemediğini bildirmişlerdir (11,12,19,32,36,39,50-54). Houillier ve arkadaşları EGFR amplifikasyonunun iyi prognostik faktör olduğunu bildirmişlerdir (13,55). Simmons ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, aberan p53 ekspresyonu göstermeyen genç hastalarda (<60 yaş) EGFR aşırı ekspresyonu ile yaşam süresi arasında negatif ilişki saptanırken, yaşlı hastalarda (>60 yaş) sağkalım süresinin daha uzun olduğu belirtilmiştir. Tüm bu çalışmalarda uyumsuzluğun nedeninin yaş dağılımındaki farklılıktan dolayı olabileceği vurgulanmıştır (32). Korshunov ve arkadaşlarının çalışmasında EGFR amplifikasyonunun genç hastalarda (<50 yaş) kötü prognostik faktör olduğu bildirilmiştir (33). Heimberger ve arkadaşlarının çalışmasında ise EGFR, gross total rezeksiyon yapılamayan hastalarda negatif prognostik faktör olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada EGFR ekspresyonu gösteren hastalar ve gross total rezeksiyon yapılamayan hastalar arasında ortalama sağkalım süresi arasında belirgin bir fark saptanmamıştır (20).

Heimberg ve arkadaşları başka bir çalışmada ise 1 yıldan fazla yaşam süresi olan hastalarda EGFRvIII ekspresyonunun negatif prognostik faktör olduğunu belirtmişlerdir (19). Bir diğer çalışmada GB hastalarında uzun sağ kalım süresinden sorumlu tek bir moleküler belirleyicinin olmadığı, tüm moleküler değişikliklerin birlikte neden olabileceği ve EGFR amplifikasyonunun özellikle genç hastalarda olmak üzere her zaman kötü prognostik faktör olmayabileceği de vurgulanmıştır (37). Yine başka bir çalışmada ise uzun yaşam süresi (>36 ay) olasılığının EGFR amplifikasyonu olmayan GB hastalarında daha yüksek olduğu bildirilmiştir (35). Tüm bu verilerdeki farklılıkların nedenleri arasında seçilen hastaların standart tedavi almamaları, çalışılan astrositik gliomların sayısında ve derecesinde büyük farklılıklar olması ve farklı tipte EGFR antikorlarının uygulanmış olması gösterilmiştir (56). Bizim çalışmamızda 18 ayın altında ve üstünde sağkalım süresine sahip olgular arasında EGFR gen amplifikasyonu istatistiksel olarak

anlamli farklilik gostermiss ve 18 aydan daha fazla yasam suresine sahip olan olgularda EGFR gen amplifikasyonu daha yuksek bulunmustr (p=0,018).

Serimizde frontal lob yerlesimli olgularla frontal lob disı yerlesimli olgular arasında EGFR gen amplikasyonu istatistiksel olarak anlamli farklilik gostermiss, frontal lob yerlesimli olgularda EGFR gen amplifikasyonu daha yuksek bulunmustr (p=0,006). Frontal lob yerlesimli olguların aynı zamanda daha uzun yasam suresine sahip olmalarının nedeninin EGFR gen amplifikasyonunun daha yuksek olması ile iliskili olabilecegi dusunulmustr.

Literatürde GB'da nöronal diferansiyasyon ve EGFR gen amplifikasyonu arasındaki iliskiyi gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda nöronal belirleyicilerden Neu-N ekspresyonu ile EGFR gen amplifikasyonu arasında istatistiksel olarak anlamli pozitif bir korelasyon saptanmış (p=0,012), ancak sağkalım süresiyle ilinti kurulamamamıştır. Bu konunun daha geniş serilerde çalışılmasına gereksinim bulunduğu kanısına varılmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada EGFR gen amplifikasyonu olan olgularda sağkalım süresinin daha uzun olduğu ve bulguların nöronal diferansiyasyon ile EGFR gen amplifikasyonu arasında anlamli bir iliski olduğu yönünde yorumlanabilecegi dusunncesine ulasilmıştır. GB'da EGFR gen amplifikasyonu ve nöronal diferansiyasyon varlığı ile ilgili çelişkili literatürler bulunmasından dolayı daha geniş serilerin irdelendiği daha fazla araştırmaya gereksinim bulunmaktadır. Bu nedenle, EGFR gen amplifikasyonunu ortaya koyacak yöntemlerin patoloji laboratuvarlarında rutin olarak uygulanmasının ve hem EGFR amplifikasyonunun hem de güvenilir belirleyicilerle ortaya konacak olan nöronal diferansiyasyonun raporlarda belirtilmesinin teşvik edilmesinin gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, 52 primer GB olgusu NFP, sinaptofizin, Neu-N, Ki-67 ve EGFR ekspresyonu ile EGFR gen amplifikasyonu açısından değerlendirilmiştir.

Olguların tanıdan ölüme kadar geçen yaşam süreleri 1 ila 32 ay arasında değişmektedir (ortalama $9,8 \pm 8,6$ ay, ortanca 7,5 ay). Çalışmamızda yaşla yaşam süresi arasında negatif korelasyon saptanmış, literatürle uyumlu olarak ileri yaş olgularda (>50) yaşam süresinin kısaldığı görülmüştür ($p=0,001$).

Literatürde gross total eksizyon uygulanabilen hastaların yaşam süresinin daha uzun olduğu belirtilmektedir. Bizim olgularımızın 40'ına (%77) gross total, 12'sine (%23) subtotal eksizyon uygulanmıştır. Operasyon şekli ile yaşam süresi arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p>0,005$). Bu durum prognozu belirlemede operasyon şeklinin tek parametre olarak değerlendirilemeyeceğini düşündürmüştür.

Olguların 32'si (%68,1) radyoterapi (RT) + kemoterapi (KT) + temozolomid (T), 6'sı (%12,8) sadece RT almış olup 9'u (%19,1) hiçbir tedavi almamıştır. RT +KT+T alanlar ile sadece RT alanlar arasında yaşam süresi açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($p=0,006$). Diğer yayınlarda da belirtildiği gibi RT+ KT +T alan grupta yaşam süresi daha uzun bulunmuştur.

Olguların %30,9'u temporal, %29,4'ü parietal, %22,1'i frontal ve %17,6'sı da oksipital lob yerleşimlidir. 18 ayın altında ve üstünde yaşam süresine sahip olgular arasında frontal lob yerleşimi istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiş, frontal lob yerleşimli olguların olmayanlara göre 18 aydan daha

fazla sağkalım süresine sahip olduğu saptanmıştır ($p=0,018$). Buna karşın, tümör yerleşimi ile operasyon şekli arasında benzer bir ilişki mevcut değildir.

Ki-67 proliferasyon indeksi açısından düşük ve yüksek ekspresyon seviyeleri için %20 eşik değer olarak kabul edilip olguların 24'ünde (%46,2) düşük, 28'inde (%53,8) ise yüksek proliferasyon indeksi saptanmış, ancak indeksi %20'nin altında olanlarla olmayanlar arasında sağkalım süresi açısından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Bu durum, Ki-67'nin prognostik değerine ilişkin çelişkiler barındıran literatürün bir kısmıyla uyumludur.

Nöronal belirleyicilerden NFP ve sinaptofizinin 3+ olması ve/veya Neu-N'in GFAP (+) aşıkâr tümör hücrelerinde pozitif olması kriter olarak alındığında, olguların 23'ünde (%44,2) nöronal diferansiasyon olduğu saptanmış, ancak nöronal diferansiasyon ile sağkalım süresi arasında, literatürde bu konudaki az sayıdaki yayının bir kısmında olduğu gibi, anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Buna karşın, NFP, sinaptofizin ve Neu-N arasında ekspresyon açısından korelasyon bulunması, %32,7 ile en sık ifade edilen NFP başta olmak üzere her üç belirleyicinin de nöronal diferansiasyonu ortaya koymakta güvenilir olduğu düşüncesini doğrulamıştır.

Çalışmamızda 7 olgu (%13,5) düşük seviyede, 10 olgu (%19,2) orta seviyede, 25 olgu ise yüksek seviyede EGFR aşırı ekspresyon gösterirken, 13 (%25) olguda EGFR gen amplifikasyonu saptanmıştır. Serimizde literatürle uyumlu olarak immunhistokimyasal yöntemle EGFR ekspresyonu ile CISH yöntemiyle saptanan EGFR gen amplifikasyon seviyesi arasında korelasyon saptanmıştır ($p=0,001$). EGFR gen amplifikasyonu gösteren olguların tümünde yüksek ekspresyon seviyesi saptanırken, aşırı ekspresyon gösteren toplam 42 olgunun yalnızca 13'ünde (%31,0) amplifikasyon gözlenmiştir. Bu, EGFR durumunu (status) ortaya koymada CISH yönteminin immunhistokimyaya göre daha güvenilir olduğunu ortaya koyan bir gözlem olup literatürle uyumludur.

Yapılan bazı çalışmalarda yaşlı GB hastalarında EGFR aşırı ekspresyonu ve amplifikasyon oranının daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bizim

çalışmamızda ise, diğer bazı yayınlara paralel olarak, 50 yaş altı ve üstü hastalarda EGFR aşırı ekspresyon seviyesi ve gen amplifikasyonu açısından anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Ancak, 18 ayın altında ve üstünde sağkalım süresine sahip olgular arasında EGFR gen amplifikasyonu istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermiş, 18 aydan daha fazla sağkalım süresine sahip olan olgularda EGFR gen amplifikasyonu daha yüksek bulunmuştur ($p=0,018$). Bu bulgu bazı yayınlarda desteklenirken, bazılarında ise tersi sonuçlar bildirilmiştir. Literatürdeki farklılıkların nedenlerinin seçilen hastaların tedavilerinin standart olmayışı, çalışılan astrositik gliomların sayısında ve derecesinde büyük farklılıklar olması, farklı tipte EGFR antikorlarının uygulanmış olması ve operasyon şekillerindeki farklılıklar olabileceği düşünülmüştür.

İlginç bir bulgu olarak, frontal lob yerleşimli olgularla frontal lob dışı yerleşimli olgular arasında EGFR gen amplifikasyonu istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiş, frontal lob yerleşimli olgularda EGFR gen amplifikasyonu daha yüksek bulunmuştur ($p=0,006$). Bu bulgu, çalışmanın bir başka bulgusu olan frontal lob yerleşimli olguların daha uzun sağkalım süresine sahip olması ile örtüşmekte olup daha geniş serilerle araştırılmaya gereksinim göstermektedir.

Literatürde GB'da nöronal diferansiyasyon ve EGFR gen amplifikasyonu arasındaki ilişkiyi gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada nöronal belirleyicilerden Neu-N ekspresyonu ile EGFR gen amplifikasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmış ($p=0,012$) olmasına karşın, sağkalım süresiyle bir ilintisi kurulamayan bu bulgu da yeni ve daha geniş serilerin ele alındığı çalışmalarla doğrulanmalıdır.

Bu çalışmada temel olarak GB'larda prognozla ilişkili olabilecek iki faktör (EGFR gen amplifikasyonu ve nöronal diferansiyasyon) ele alınmış; EGFR gen amplifikasyonu olan hastalarda sağkalım süresinin daha uzun olduğu ve bulguların nöronal diferansiyasyon ile EGFR gen amplifikasyonu arasında açıklanmaya gereksinim duyan bir ilişki olduğu yönünde yorumlanabileceği düşüncesine ulaşılmıştır. Bu tümörlerde EGFR gen amplifikasyonu ve

nöronal diferansiyasyon varlığı ile ilgili literatürün oldukça çelişkili olması nedeniyle daha geniş serilerle daha çok araştırma yapılması gerekmektedir. Bu çalışmalara ışık tutması açısından EGFR gen amplifikasyonunu ortaya koyacak yöntemlerin patoloji laboratuvarlarında rutin olarak uygulanmasının ve hem EGFR amplifikasyonunun hem de güvenilir belirleyicilerle ortaya konacak olan nöronal diferansiyasyonun raporlarda belirtilmesinin gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.

ÖZET

AMAÇ: Bu çalışmada primer glioblastomlarda (GB) nöronal diferansiyasyonun ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) aşırı ekspresyonunun/gen amplifikasyonunun ortaya konması ve bu parametrelerin birbirleriyle, yaş ve cinsiyetle, tümör yerleşimiyle, operasyon şekliyle, Ki-67 proliferasyon indeksiyle, tedavi modaliteleriyle ve sağkalım süresiyle olası ilişkilerini araştırmak amaçlanmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEM: Elli iki primer GB olgusu nöronal diferansiyasyonun varlığını araştırmak amacıyla nörofilament proteini (NFP) ve sinaptofizin ile immunhistokimya (İHK) yöntemiyle boyanarak boyanma oranı ve şiddeti açısından skorlandırılmıştır. Bir diğer nöronal belirleyici olan nöronal nükleer antijen (Neu-N), aşıkâr tümöral hücrelerinde GFAP'la birlikte dual İHK yöntemiyle değerlendirilmiştir. Yine İHK yöntemiyle EGFR aşırı ekspresyonu ve Ki-67 proliferasyon indeksi saptanmış, ayrıca, dual EGFR-silver in situ hibridization (SISH)/ kromozom 7-chromogen in situ hibridization (CISH) yöntemiyle EGFR gen amplifikasyonu araştırılmıştır.

BULGULAR: Yaşla sağkalım süresi arasında negatif korelasyon saptanırken ($p=0.001$), NFP-sinaptofizin ($p=0.000$) ; NFP-Neu-N ($p=0.002$); sinaptofizin-Neu-N ($p=0.015$) ekspresyonları arasında ve Neu-N ekspresyonu-EGFR amplifikasyonu ($p=0.012$); EGFR aşırı ekspresyonu-EGFR amplifikasyonu ($p=0.001$) ile EGFR amplifikasyonu-frontal lob yerleşimi ($p=0.006$) arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Ayrıca EGFR gen amplifikasyonu olan ve tümörü frontal lob yerleşimli hastalarda 18 aydan fazla sağkalım şansı daha fazla bulunmuştur (sırasıyla $p=0.018$ ve $p=0.018$). Nöronal diferansiyasyonla sağkalım arasında olduğu gibi, diğer parametrelerin de birbiriyle ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

SONUÇLAR: Bulgular EGFR gen amplifikasyonunun daha uzun sağkalımla ilgili olabileceğini gösterirken, nöronal diferansiasyon ve sağkalım arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Neu-N ekspresyonu ile EGFR amplifikasyonu arasında ortaya konulan pozitif korelasyon ise sağkalım istatistiklerine yansımamış ve daha geniş serilerle yeni çalışmalar yapma gereğine işaret etmiştir.

ABSTRACT

Neuronal differentiation, EGFR over-expression and EGFR gene amplification in glioblastomas and the relationship of these parameters between each other and prognosis

AIM: The aim of this study is to state both neuronal differentiation and epidermal growth factor receptor (EGFR) over expression/amplification in primary glioblastomas (GB) and find out any relationship between these parameters, as well as with age and sex, tumor localization, method of operation, Ki-67 status, treatment modalities and survival.

MATERIALS AND METHODS: Fifty-two primary glioblastoma cases were evaluated for neuronal differentiation by using neurofilament protein (NFP) and synaptophysin. Immunoreactivity was assessed by scoring the intensity of staining and ratio of the stained cells. Immunoreactivity for another neuronal marker, neuronal nuclear antigen (Neu-N) was reviewed in obviously tumoral cells together with glial fibrillary acidic protein (GFAP), by dual immunohistochemistry (IHC) method. Again with IHC, EGFR over-expression and Ki-67 status were stated. EGFR gene amplification was explored by dual EGFR- silver in situ hybridization (SISH)/ chromosome 7- chromogen in situ hybridization method.

RESULTS: Negative correlation was found between age and survival ($p=0.001$), while expressions of NFP-synaptophysin ($p=0.000$); NFP-Neu-N ($p=0.002$); synaptophysin-Neu-N ($p=0.015$); Neu-N expression-EGFR amplification ($p=0.012$); EGFR over-expression-EGFR amplification ($p=0.001$) and EGFR amplification-frontal lobe localization ($p=0.006$) were positively correlated. Patients who received radiotherapy, chemotherapy and temozolamide together, were found to have a longer life-time than others

received radiotherapy alone ($p=0.006$). Also, the probability to have a life-time more than 18 months were found significantly higher in patients showing EGFR amplification and suffering a frontal lobe tumor $p=0.018$, $p=0.018$, respectively). No statistically significant relationship was found between either neuronal differentiation and survival or other parameters assessed.

CONCLUSIONS: The results of the study highlight that long-term survival in primary GB may be related with EGFR amplification but not with neuronal differentiation. The stated correlation between Neu-N expression and EGFR amplification was not reflected to survival statistics and remains to be an issue for new and larger series.

KAYNAKLAR

1. Louis DN, Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K. (Eds.): Who Classification of Tumours of the Central Nervous System. IARC: Lyon 2007.
2. Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. J Neuropathol Exp Neurol. 2005 Jun;64(6):479-89.
3. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lütolf UM, Kleihues P. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. Cancer Res. 2004 Oct 1;64(19):6892-9.
4. Fujisawa H, Kurrer M, Reis RM, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Acquisition of the glioblastoma phenotype during astrocytoma progression is associated with loss of heterozygosity on 10q25-qter. Am J Pathol. 1999 Aug;155(2):387-94.
5. Perry A, Aldape KD, George DH, Burger PC. Small cell astrocytoma: an aggressive variant that is clinicopathologically and genetically distinct from anaplastic oligodendroglioma. Cancer. 2004 Nov 15;101(10):2318-26.
6. Moskowitz SI, Jin T, Prayson RA. Role of MIB1 in predicting survival in patients with glioblastomas. J Neurooncol. 2006 Jan;76(2):193-200.

7. Von Deimling A, von Ammon K, Schoenfeld D, Wiestler OD, Seizinger BR, Louis DN. Subsets of glioblastoma multiforme defined by molecular genetic analysis. *Brain Pathol.* 1993 Jan;3(1):19-26.
8. Fuller GN, Bigner SH. Amplified cellular oncogenes in neoplasms of the human central nervous system. *Mutat Res.* 1992 May;276(3):299-306.
9. Biernat W, Huang H, Yokoo H, Kleihues P, Ohgaki H. Predominant expression of mutant EGFR (EGFRvIII) is rare in primary glioblastomas. *Brain Pathol.* 2004 Apr;14(2):131-6.
10. Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol.* 1996 Jul;6(3):217-23.
11. Shinojima N, Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, Kochi M, Nakamura H, Makino K, Saya H, Hirano H, Kuratsu J, Oka K, Ishimaru Y, Ushio Y. Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res.* 2003 Oct 15;63(20):6962-70.
12. Viana-Pereira M, Lopes JM, Little S, Milanezi F, Basto D, Pardal F, Jones C, Reis RM. Analysis of EGFR overexpression, EGFR gene amplification and the EGFRvIII mutation in Portuguese high-grade gliomas. *Anticancer Res.* 2008 Mar-Apr;28(2A):913-20.
13. Coulibaly B, Nanni I, Quilichini B, Gaudart J, Metellus P, Fina F, Boucard C, Chinot O, Ouafik L, Figarella-Branger D. Epidermal growth factor receptor in glioblastomas: correlation between gene copy number and protein expression. *Hum Pathol.* 2010 Jun;41(6):815-23. Epub 2010 Mar 29.
14. Smith JS, Tachibana I, Passe SM, Huntley BK, Borell TJ, Iturria N, O'Fallon JR, Schaefer PL, Scheithauer BW, James CD, Buckner JC, Jenkins RB. PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Aug 15;93(16):1246-56.

15. Marquez A, Wu R, Zhao J, Tao J, Shi Z. Evaluation of epidermal growth factor receptor (EGFR) by chromogenic in situ hybridization (CISH) and immunohistochemistry (IHC) in archival gliomas using bright-field microscopy. *Diagn Mol Pathol*. 2004 Mar;13(1):1-8.
16. Miyanaga T, Hirato J, Nakazato Y. Amplification of the epidermal growth factor receptor gene in glioblastoma: an analysis of the relationship between genotype and phenotype by CISH method. *Neuropathology*. 2008 Apr;28(2):116-26.
17. Fischer I, de la Cruz C, Rivera AL, Aldape K. Utility of chromogenic in situ hybridization (CISH) for detection of EGFR amplification in glioblastoma: comparison with fluorescence in situ hybridization (FISH). *Diagn Mol Pathol*. 2008 Dec;17(4):227-30.
18. Miller CR, Perry A. Glioblastoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2007 Mar;131(3):397-406.
19. Heimberger AB, Hlatky R, Suki D, Yang D, Weinberg J, Gilbert M, Sawaya R, Aldape K. Prognostic effect of epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma multiforme patients. *Clin Cancer Res*. 2005 Feb 15;11(4):1462-6.
20. Heimberger AB, Suki D, Yang D, Shi W, Aldape K. The natural history of EGFR and EGFRvIII in glioblastoma patients. *J Transl Med*. 2005 Oct 19;3:38.
21. Jungbluth AA, Stockert E, Huang HJ, Collins VP, Coplan K, Iversen K, Kolb D, Johns TJ, Scott AM, Gullick WJ, Ritter G, Cohen L, Scanlan MJ, Cavenee WK, Old LJ. A monoclonal antibody recognizing human cancers with amplification/overexpression of the human epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jan 21;100(2):639-44.
22. Tohma Y, Gratas C, Biernat W, Peraud A, Fukuda M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1998 Jul;57(7):684-9.

23. Srividya MR, Thota B, Shailaja BC, Arivazhagan A, Thennarasu K, Chandramouli BA, Hegde AS, Santosh V. Homozygous 10q23/PTEN deletion and its impact on outcome in glioblastoma: a prospective translational study on a uniformly treated cohort of adult patients. *Neuropathology*. 2011 Aug;31(4):376-83.
24. Fuller GN, Hess KR, Rhee CH, Yung WK, Sawaya RA, Bruner JM, Zhang W. Molecular classification of human diffuse gliomas by multidimensional scaling analysis of gene expression profiles parallels morphology-based classification, correlates with survival, and reveals clinically-relevant novel glioma subsets. *Brain Pathol*. 2002 Jan;12(1):108-16.
25. Godard S, Getz G, Delorenzi M, Farmer P, Kobayashi H, Desbaillets I, Nozaki M, Diserens AC, Hamou MF, Dietrich PY, Regli L, Janzer RC, Bucher P, Stupp R, de Tribolet N, Domany E, Hegi ME. Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes. *Cancer Res*. 2003 Oct 15;63(20):6613-25.
26. Rich JN, Hans C, Jones B, Iversen ES, McLendon RE, Rasheed BK, Dobra A, Dressman HK, Bigner DD, Nevins JR, West M. Gene expression profiling and genetic markers in glioblastoma survival. *Cancer Res*. 2005 May 15;65(10):4051-8.
27. Mischel PS, Shai R, Shi T, Horvath S, Lu KV, Choe G, Seligson D, Kremen TJ, Palotie A, Liao LM, Cloughesy TF, Nelson SF. Identification of molecular subtypes of glioblastoma by gene expression profiling. *Oncogene*. 2003 Apr 17;22(15):2361-73.
28. Tso CL, Freije WA, Day A, Chen Z, Merriman B, Perlina A, Lee Y, Dia EQ, Yoshimoto K, Mischel PS, Liao LM, Cloughesy TF, Nelson SF. Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups. *Cancer Res*. 2006 Jan 1;66(1):159-67.

29. Korshunov A, Sycheva R, Gorelyshev S, Golanov A. Clinical utility of fluorescence in situ hybridization (FISH) in nonbrainstem glioblastomas of childhood. *Mod Pathol.* 2005 Sep;18(9):1258-63.
30. Huttner AJ, Kieran MW, Yao X, Cruz L, Ladner J, Quayle K, Goumnerova LC, Irons MB, Ullrich NJ. Clinicopathologic study of glioblastoma in children with neurofibromatosis type 1. *Pediatr Blood Cancer.* 2010 Jul 1;54(7):890-6.
31. Sung T, Miller DC, Hayes RL, Alonso M, Yee H, Newcomb EW. Preferential inactivation of the p53 tumor suppressor pathway and lack of EGFR amplification distinguish de novo high grade pediatric astrocytomas from de novo adult astrocytomas. *Brain Pathol.* 2000 Apr;10(2):249-59.
32. Simmons ML, Lamborn KR, Takahashi M, Chen P, Israel MA, Berger MS, Godfrey T, Nigro J, Prados M, Chang S, Barker FG 2nd, Aldape K. Analysis of complex relationships between age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients. *Cancer Res.* 2001 Feb 1;61(3):1122-8.
33. Korshunov A, Sycheva R, Golanov A. The prognostic relevance of molecular alterations in glioblastomas for patients age < 50 years. *Cancer.* 2005 Aug 15;104(4):825-32.
34. Homma T, Fukushima T, Vaccarella S, Yonekawa Y, Di Patre PL, Franceschi S, Ohgaki H. Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006 Sep;65(9):846-54.
35. Krex D, Klink B, Hartmann C, von Deimling A, Pietsch T, Simon M, Sabel M, Steinbach JP, Heese O, Reifenberger G, Weller M, Schackert G; German Glioma Network. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain.* 2007 Oct;130.
36. Schmidt MC, Antweiler S, Urban N, Mueller W, Kuklik A, Meyer-Puttlitz B, Wiestler OD, Louis DN, Fimmers R, von Deimling A. Impact of genotype and morphology on the prognosis of glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002 Apr;61(4):321-8.

37. Das P, Puri T, Jha P, Pathak P, Joshi N, Suri V, Sharma MC, Sharma BS, Mahapatra AK, Suri A, Sarkar C. A clinicopathological and molecular analysis of glioblastoma multiforme with long-term survival. *J Clin Neurosci*. 2011 Jan;18(1):66-70.
38. Besson A, Yong VW. Mitogenic signaling and the relationship to cell cycle regulation in astrocytomas. *J Neurooncol*. 2001 Feb;51(3):245-64.
39. Hill C, Hunter SB, Brat DJ. Genetic markers in glioblastoma: prognostic significance and future therapeutic implications. *Adv Anat Pathol*. 2003 Jul;10(4):212-7. Review
40. Katoh M, Aida T, Sugimoto S, Suwamura Y, Abe H, Isu T, Kaneko S, Mitsumori K, Kojima H, Nakamura N, et al. Immunohistochemical analysis of giant cell glioblastoma. *Pathol Int*. 1995 Apr;45(4):275-82.
41. Peraud A, Watanabe K, Plate KH, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. p53 mutations versus EGF receptor expression in giant cell glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997.
42. Martinez-Diaz H, Kleinschmidt-DeMasters BK, Powell SZ, Yachnis AT. Giant cell glioblastoma and pleomorphic xanthoastrocytoma show different immunohistochemical profiles for neuronal antigens and p53 but share reactivity for class III beta-tubulin. *Arch Pathol Lab Med*. 2003 Sep;127(9):1187-91.
43. Peraud A, Watanabe K, Schwechheimer K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Genetic profile of the giant cell glioblastoma. *Lab Invest*. 1999 Feb;79(2):123-9.
44. Reis RM, Könu-Lebleblicioglu D, Lopes JM, Kleihues P, Ohgaki H. Genetic profile of gliosarcomas. *Am J Pathol*. 2000 Feb;156(2):425-32.
45. Donev K, Scheithauer BW, Rodriguez FJ, Jenkins S. Expression of diagnostic neuronal markers and outcome in glioblastoma. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2010 Aug;36(5):411-21.
46. Varlet P, Soni D, Miquel C, Roux FX, Meder JF, Chneiweiss H, Daumas-Duport C. New variants of malignant glioneuronal tumors: a

- clinicopathological study of 40 cases. *Neurosurgery*. 2004 Dec;55(6):1377-91: discussion 1391-2 .
47. Shibahara J, Fukayama M. Secondary glioblastoma with advanced neuronal immunophenotype. *Virchows Arch*. 2005 Sep;447(3):665-8.
 48. Wharton SB, Lammie GA, Collie DA, Whittle IR. The significance of intratumoural neurones and neuronal differentiation in diffuse gliomas: a case series. *Acta Neuropathol*. 2000 Dec;100(6):695-700.
 49. Wharton SB, Chan KK, Whittle IR. Microtubule-associated protein 2 (MAP-2) is expressed in low and high grade diffuse astrocytomas. *J Clin Neurosci*. 2002 Mar;9(2):165-9.
 50. Huncharek M, Kupelnick B. Epidermal growth factor receptor gene amplification as a prognostic marker in glioblastoma multiforme: results of a meta-analysis. *Oncol Res*. 2000;12(2):107-12.
 51. Houillier C, Lejeune J, Benouaich-Amiel A, Laigle-Donadey F, Criniere E, Mokhtari K, Thillet J, Delattre JY, Hoang-Xuan K, Sanson M. Prognostic impact of molecular markers in a series of 220 primary glioblastomas. *Cancer*. 2006 May 15;106(10):2218-23.
 52. Järvelä S, Helin H, Haapasalo J, Järvelä T, Junttila TT, Elenius K, Tanner M, Haapasalo H, Isola J. Amplification of the epidermal growth factor receptor in astrocytic tumours by chromogenic in situ hybridization: association with clinicopathological features and patient survival. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2006 Aug;32(4):441-50. Erratum in: *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2006 Oct;32(5):568.
 53. Ruano Y, Ribalta T, de Lope AR, Campos-Martín Y, Fiaño C, Pérez-Magán E, Hernández-Moneo JL, Mollejo M, Meléndez B. Worse outcome in primary glioblastoma multiforme with concurrent epidermal growth factor receptor and p53 alteration. *Am J Clin Pathol*. 2009 Feb;131(2):257-63.
 54. Layfield LJ, Willmore C, Tripp S, Jones C, Jensen RL. Epidermal growth factor receptor gene amplification and protein expression in glioblastoma multiforme: prognostic significance and relationship to

- other prognostic factors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2006 Mar;14(1):91-6.
55. Lopez-Gines C, Gil-Benso R, Ferrer-Luna R, Benito R, Serna E, Gonzalez-Darder J, Quilis V, Monleon D, Celda B, Cerdá-Nicolas M. New pattern of EGFR amplification in glioblastoma and the relationship of gene copy number with gene expression profile. *Mod Pathol*. 2010 Jun;23(6):856-65.
 56. Korshunov A, Golanov A, Sycheva R. Immunohistochemical markers for prognosis of cerebral glioblastomas. *J Neurooncol*. 2002 Jul;58(3):217-36.
 57. Jaros E, Perry RH, Adam L, Kelly PJ, Crawford PJ, Kalbag RM, Mendelow AD, Sengupta RP, Pearson AD. Prognostic implications of p53 protein, epidermal growth factor receptor, and Ki-67 labelling in brain tumours. *Br J Cancer*. 1992 Aug;66(2):373-85.
 58. Reavey-Cantwell JF, Haroun RI, Zahurak M, Clatterbuck RE, Parker RJ, Mehta R, Fruehauf JP, Brem H. The prognostic value of tumor markers in patients with glioblastoma multiforme: analysis of 32 patients and review of the literature. *J Neurooncol*. 2001 Dec;55(3):195-204.
 59. Powell SZ, Yachnis AT, Rorke LB, Rojiani AM, Eskin TA. Divergent differentiation in pleomorphic xanthoastrocytoma. Evidence for a neuronal element and possible relationship to ganglion cell tumors. *Am J Surg Pathol*. 1996 Jan;20(1):80-5.
 60. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. 2003 Sep 15;63(18):5821-8.
 61. Wolańczyk M, Hulaś-Bigoszewska K, Witusik-Perkowska M, Papierz W, Jaskólski D, Liberski PP, Rieske P. Imperfect oligodendrocytic and neuronal differentiation of glioblastoma cells. *Folia Neuropathol*. 2010;48(1):27-34.
 62. Rieske P, Golanska E, Zakrzewska M, Piaskowski S, Hulaś-Bigoszewska K, Wolańczyk M, Szybka M, Witusik-Perkowska M,

- Jaskolski DJ, Zakrzewski K, Biernat W, Krynska B, Liberski PP. Arrested neural and advanced mesenchymal differentiation of glioblastoma cells-comparative study with neural progenitors. *BMC Cancer*. 2009 Feb 14;9:54.
63. Shiras A, Bhosale A, Shepal V, Shukla R, Baburao VS, Prabhakara K, Shastry P. A unique model system for tumor progression in GBM comprising two developed human neuro-epithelial cell lines with differential transforming potential and coexpressing neuronal and glial markers. *Neoplasia*. 2003 Nov-Dec;5(6):520-32.
64. Rodriguez FJ, Scheithauer BW, Port JD. Unusual malignant glioneuronal tumors of the cerebrum of adults: a clinicopathologic study of three cases. *Acta Neuropathol*. 2006 Dec;112(6):727-37.
65. Tihan T, Gültekin H, Çomunoğlu N. Glioneuronal neoplasms with malignant histological features: a study of 36 cases. *Turkish Journal of pathology* 2010, 26:55-67.
66. Gessi M, Marani C, Geddes J, Arcella A, Cenacchi G, Giangaspero F. Ependymoma with neuropil-like islands: a case report with diagnostic and histogenetic implications. *Acta Neuropathol*. 2005 Feb;109(2):231-4.
67. Ebato M, Tsunoda A, Maruki C, Ikeya F, Okada M. Distinctive pleomorphic xanthoastrocytoma-like tumor with exclusive abortive or aberrant neuronal differentiation and repeated recurrence--case report. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2002 Sep;42(9):399-405.
68. Teo JG, Gultekin SH, Bilsky M, Gutin P, Rosenblum MK. A distinctive glioneuronal tumor of the adult cerebrum with neuropil-like (including "rosetted") islands: report of 4 cases. *Am J Surg Pathol*. 1999 May;23(5):502-10. 69.
69. Jeibmann A, Hasselblatt M, Pfister S, Sträter R, Brentrup A, Holling M, Niederstadt T, Paulus W, Frühwald MC. From glioblastoma to gangliocytoma: an unforeseen but welcome shift in biological behavior. *J Neurosurg Pediatr*. 2009 Nov;4(5):475-8.

70. Barbashina V, Salazar P, Ladanyi M, Rosenblum MK, Edgar MA. Glioneuronal tumor with neuropil-like islands (GTNI): a report of 8 cases with chromosome 1p/19q deletion analysis. *Am J Surg Pathol*. 2007 Aug;31(8):1196-202.
71. Vajtai I, Reinert MM. Malignant glioneuronal tumor of the adult cerebrum with neuropil-like islands involving "proliferating nodules": confirmatory report of an unusual variant. *Acta Neuropathol*. 2007 Jun;113(6):711-3.
72. Jin L, Lloyd RV. In situ hybridization: methods and applications. *J Clin Lab Anal*. 1997;11(1):2-9.
73. Qian X, Lloyd RV. Recent developments in signal amplification methods for in situ hybridization. *Diagn Mol Pathol*. 2003 Mar;12(1):1-13.
74. Special techniques in surgical pathology. In Rosai J, editor. *Rosai and Akerman's surgical pathology*. 10th ed. Mosby Elsevier; 2011:69-70.
75. Gaiser T, Waha A, Moessler F, Bruckner T, Pietsch T, von Deimling A. Comparison of automated silver enhanced in situ hybridization and fluorescence in situ hybridization for evaluation of epidermal growth factor receptor status in human glioblastomas. *Mod Pathol*. 2009 Sep;22(9):1263-71.
76. Simone G, Mangia A, Malfettone A, Rubini V, Siciliano M, Di Benedetto A, Terrenato I, Novelli F, Mottolese M. Chromogenic in situ hybridization to detect EGFR gene copy number in cell blocks from fine-needle aspirates of non small cell lung carcinomas and lung metastases from colo-rectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010 Sep 15;29:125.
77. Hoff K, Jørgensen JT, Müller S, Røngaard E, Rasmussen O, Schønau A. Visualization of FISH Probes by dual-color chromogenic in situ hybridization. *Am J Clin Pathol*. 2010 Feb;133(2):205-11.
78. Sholl LM, John Iafrate A, Chou YP, Wu MT, Goan YG, Su L, Huang YT, Christiani DC, Chirieac LR. Validation of chromogenic in situ

- hybridization for detection of EGFR copy number amplification in nonsmall cell lung carcinoma. *Mod Pathol*. 2007 Oct;20(10):1028-35.
79. Dietel M, Ellis IO, Höfler H, Kreipe H, Moch H, Dankof A, Kölbl K, Kristiansen G. Comparison of automated silver enhanced in situ hybridisation (SISH) and fluorescence ISH (FISH) for the validation of HER2 gene status in breast carcinoma according to the guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists. *Virchows Arch*. 2007 Jul;451(1):19-25.
 80. Nitta H, Hauss-Wegrzyniak B, Lehrkamp M, Murillo AE, Gaire F, Farrell M, Walk E, Penault-Llorca F, Kurosumi M, Dietel M, Wang L, Loftus M, Pettay J, Tubbs RR, Grogan TM. Development of automated brightfield double in situ hybridization (BDISH) application for HER2 gene and chromosome 17 centromere (CEN 17) for breast carcinomas and an assay performance comparison to manual dual color HER2 fluorescence in situ hybridization (FISH). *Diagn Pathol*. 2008 Oct 22;3:41.
 81. Edgar MA, Rosenblum MK. Mixed glioneuronal tumors: recently described entities. *Arch Pathol Lab Med*. 2007 Feb;131(2):228-33.
 82. Thumma SR, Fairbanks RK, Lamoreaux WT, Mackay AR, Demakas JJ, Cooke BS, Elaimy AL, Hanson PW, Lee CM. Effect of pretreatment clinical factors on overall survival in glioblastoma multiforme: a Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) population analysis. *World J Surg Oncol*. 2012 May 3;10(1):75.
 83. Deb P, Sharma MC, Mahapatra AK, Agarwal D, Sarkar C. Glioblastoma multiforme with long term survival. *Neurol India*. 2005 Sep;53(3):329-32.
 84. Tait MJ, Petrik V, Loosemore A, Bell BA, Papadopoulos MC. Survival of patients with glioblastoma multiforme has not improved between 1993 and 2004: analysis of 625 cases. *Br J Neurosurg*. 2007 Oct;21(5):496-500.
 85. Scott JN, Rewcastle NB, Brasher PM, Fulton D, MacKinnon JA, Hamilton M, Cairncross JG, Forsyth P. Which glioblastoma multiforme

- patient will become a long-term survivor? A population-based study. *Ann Neurol.* 1999 Aug;46(2):183-8.
86. Filippini G, Falcone C, Boiardi A, Broggi G, Bruzzone MG, Caldiroli D, Farina R, Farinotti M, Fariselli L, Finocchiaro G, Giombini S, Pollo B, Savoiardo M, Solero CL, Valsecchi MG; Brain Cancer Register of the Fondazione IRCCS (Istituto Ricovero e Cura a Carattere Scientifico) Istituto Neurologico Carlo Besta. Prognostic factors for survival in 676 consecutive patients with newly diagnosed primary glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2008 Feb;10(1):79-87.
 87. Allahdini F, Amirjamshidi A, Reza-Zarei M, Abdollahi M. Evaluating the prognostic factors effective on the outcome of patients with glioblastoma multiformis: does maximal resection of the tumor lengthen the median survival? *World Neurosurg.* 2010 Feb;73(2):128-34.
 88. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):987-96.
 89. Erpolat OP, Akmansu M, Goksel F, Bora H, Yaman E, Büyükberber S. Outcome of newly diagnosed glioblastoma patients treated by radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide: a long-term analysis. *Tumori.* 2009 Mar-Apr;95(2):191-7.
 90. Darefsky AS, King JT Jr, Dubrow R. Adult glioblastoma multiforme survival in the temozolomide era: a population-based analysis of Surveillance, Epidemiology, and End Results registries. *Cancer.* 2012 Apr 15;118(8):2163-72.

91. Stewart LA. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet*. 2002 Mar 23;359(9311):1011-8.
92. Etienne MC, Formento JL, Lebrun-Frenay C, Gioanni J, Chatel M, Paquis P, Bernard C, Courdi A, Bensadoun RJ, Pignol JP, Francoual M, Grellier P, Frenay M, Milano G. Epidermal growth factor receptor and labeling index are independent prognostic factors in glial tumor outcome. *Clin Cancer Res*. 1998 Oct;4(10):2383-90.
93. Hoshino T, Ahn D, Prados MD, Lamborn K, Wilson CB. Prognostic significance of the proliferative potential of intracranial gliomas measured by bromodeoxyuridine labeling. *Int J Cancer*. 1993 Feb 20;53(4):550-5.
94. Torp SH, Helseth E, Dalen A, Unsgaard G. Relationships between Ki-67 labelling index, amplification of the epidermal growth factor receptor gene, and prognosis in human glioblastomas. *Acta Neurochir (Wien)*. 1992;117(3-4):182-6. 95.
95. Franke FE, Schachenmayr W, Osborn M, Altmannsberger M. Unexpected immunoreactivities of intermediate filament antibodies in human brain and brain tumors. *Am J Pathol*. 1991 Jul;139(1):67-79.
96. Wharton SB, Chan KK, Hamilton FA, Anderson JR. Expression of neuronal markers in oligodendrogliomas: an immunohistochemical study. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1998 Aug;24(4):302-8.