



**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
RADYASYON ONKOLOJİSİ ANABİLİM DALI**

**GLİOBLASTOMALI OLGULARDA
O6-METİL GUANİN DNA-METİL TRANSFERAZ
PROMOTER METİLASYONUNUN TEDAVİ CEVABINA
ETKİSİ VE PROGNOSTİK ÖNEMİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. DİCLE ASLAN

KAYSERİ 2011



**T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
RADYASYON ONKOLOJİSİ ANABİLİMDALI**

**GLİOBLASTOMALI OLGULARDA
O6-METİL GUANİN DNA-METİL TRANSFERAZ
PROMOTER METİLASYONUNUN TEDAVİ CEVABINA
ETKİSİ VE PROGNOSTİK ÖNEMİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. DİCLE ASLAN

**Tez Yürütücüsü
Doç. Dr. OĞUZ GALİP YILDIZ**

KAYSERİ 2011

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada ve uzmanlık eğitimim süresince bana emeği geçen başta tez danışmanım Doç.Dr. Oğuz Galip YILDIZ'a, Radyasyon Onkoljisi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç.Dr. Serdar SOYUER'e, Prof.Dr. Bünyamin KAPLAN'a, Yard. Doç. Dr. Okan ORHAN'a, Yard. Doç. Dr. Celalettin EROĞLU'na, Fiz. Uz. Dr. Kadir YARAY'a, Genetik Ana Bilim Dalı'ndan Prof. Dr. Munis DÜNDAR'a, Patoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Özlem CANÖZ'e, tez çalışmalarındaki özverili çalışmalarından dolayı Tıbbi Biyolog Hilal AKALIN ve Öğr. Gör. Yagut AKBEROVA'ya, istatistik hesaplamalarında yardımcı olan Biyoistatistik Uzmanı Ferhan ELMALI'ya, Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı Sekreteri Yasemin AKYÜREK, asistanı Dr. Aynur LALE, Anabilim Dalı ve tüm mesai arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca her zaman, her konuda destek ve yardımlarını esirgemeyen sevgili annem, babam ve kardeşlerime teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>SayfaNo</u>
TEŞEKKÜR	i
KISALTMALAR	v
TABLO LİSTESİ.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÖZET	xi
SUMMARY.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Santral Sinir Sistemi Tümörleri	3
2.2. Glioblastoma.....	5
2.2.1. Etiyoloji ve Epidemiyoloji.....	5
2.2.2. Biyolojik Özellikler ve Moleküler Biyoloji	5
2.2.2.1. Major Yolaklar	6
2.2.3. Patoloji	7
2.2.3.1. Makroskopi.....	7
2.2.3.2. Histopatoloji	7
2.2.4. Gradlandırma.....	8
2.2.5. Klinik Tablo	8
2.2.6. Tanı Metodları	9
2.2.7. Prognostik Faktörler	10
2.2.7.1. Klinik Prognostik Faktörler.....	10
2.2.7.2. Moleküler Prognostik Faktörler	11
2.2.8. TEDAVİ	12
2.2.8.1. Cerrahi.....	12
2.2.8.2. Radyoterapi	13
2.2.8.2.1. İki Boyutlu (Konvansiyonel) External Radyoterapi	13
2.2.8.2.2. Radyoterapide Hedef Volümler.....	13
2.2.8.2.3. Üç Boyutlu Konformal Radyoterapi	14

2.2.8.2.4. Yoğunluk Ayarlı Radyoterapi (IMRT).....	16
2.2.8.2.5. Simülasyon ve Planlama	17
2.2.8.3. Glioblastomada Sistemik Tedavi	18
2.2.8.3.1. Steroid	18
2.2.8.3.2. Temozolamide.....	18
2.2.8.3.2.1. O6-Metil Guanin DNA-Metil Transferaz (MGMT)	20
2.2.8.3.2.2. Alkilleyici Ajanlara Dirençte MGMT'nin Rolü.....	21
2.2.8.3.2.3. MGMT Ölçümü	23
2.2.8.3.2.4. Temozolamide'in Farmokokinetik Özellikleri.....	23
2.2.8.3.3. Diğer Kemoterapotik Ajanlar.....	24
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. GEREÇLER	25
3.1.1. Demirbaş Malzemeler	25
3.1.2. Sarf Malzemeleri	26
3.2. YÖNTEM.....	26
3.2.1 Hasta Gruplarının Belirlenmesi	26
3.2.2 Preparat Hazırlanması.....	27
3.2.2.1. Doku Kesiti Alınması (Mikrotom Cihazı)	27
3.2.2.2. Genomik DNA İzolasyonu Prosedür.....	27
3.2.2.3. Genomik DNA'ya Bisülfite Uygulanması Prosedür.....	28
3.2.2.4. Bisülfitletmiş DNA'nın Temizlenmesi	29
3.2.2.5. PCR	30
3.2.2.6.PCR Ürünlerinin Streptavidin Sepharose Yüksek Performans Boncuklarıyla Immobilizasyonu	30
3.2.2.7.Pyromark Q24'deki Örneklerin Pyrosekans Analizine Hazır Hale Getirilmesi	30
3.2.2.8. Pyromark Q24 Sistemin Çalıştırılması.....	31
3.2.2.9. Sonuçların Analizi.....	32
3.2.3. İstatistiksel Yöntem	36

4.BULGULAR	37
4.1. GENEL BULGULAR	37
4.1.1 Genel Sağkalım Sonuçları ve Prognostik Faktörler	39
4.2. MGMT Promoter Metilasyonu Görülen Olgulara Göre Bulgular	40
4.2.1. Sağkalım Bulguları	42
4.2.2 Prognostik Faktörler	45
4.3. MGMT Promoter Metilasyonu Görülmeyen Olgulara Göre Bulgular	46
4.3.1. Sağkalım Bulguları	48
4.3.2. Prognostik Faktörler	50
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	53
6. KAYNAKÇA	59
TEZ ONAY SAYFASI	72

KISALTMALAR

AGT	: O6-alkil guanin alkil transferaz
AIC	: 5-aminoimidozal 4-karboksamid
AIDS	: Acquired Immune Deficiency Syndrom (Edinilmiş bağışıklık eksikliği sendromu)
AKT	: Protein kinaz B
ark.	: Arkadaşları
BCNU	: 1,3-bis-kloroetil-1-nitrozüre
BSC	: Best Supportive Care(En iyi destek tedavi)
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
BTSG	: Brain Tumor Study Group (Beyin Tümörü Çalışma Grubu)
CD4	: Cluster of differentiation 4 (Diferansiyasyon Kümesi 4)
CDK4	: Siklin-bağımlı Kinaz
CDKN2A	: Siklin-bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A
cGy	: Santi-Gray (Işınlanan maddenin 1 gramında 100 erg'lik enerji absorpsiyonu oluşturan radyasyon miktarıdır.)
CpG	: Sitozin-fosfat-Guanin
CTV	: Klinik Hedef Volüm
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ECOG	: The Eastern Cooperative Oncology Group
EGFR	: Epidermal Growth Factor Receptor
EORTC	: European Organisation for Research and Treatment of Cancer
FAK	: Focal Adhesion Kinase
FDG	: Fluorodeoxyglukoz

FFPE	: Formalin-fixed, Paraffin-embedded (Formalinle fixe parafine gömülü)
G2	: Bölünmeye hazırlık evresi
GFAP	: Glial Fibrillary Acidic Protein
GS	: Genel Sağkalım
GTV	: Gros Tümör Volüm
Gy	: Gray (Işınlanan maddenin 1 kilogramında 1 Joule’lük enerji absorpsiyonu oluşturan radyasyon miktarıdır.)
HPLC	: High-performance Liquid Chromatography (Yüksek Performans Likit Kromatografisi)
HS	: Hastalıksız Sağkalım
IHC	: Immunohistochemistry (İmmünohistokimya)
IMRT	: Intensity-modulated Radiation Therapy (Yoğunluk Ayarlı Radyoterapi)
KPS	: Karnofsky Performance Status (Karnofsky Performans Durumu)
KT	: Kemoterapi
LOH	: Loss of Heterozygosity
m	: Metile
M	: Mitoz Fazı
MDM2	: Murine double minute oncogene
MGMT	: O6-metilguanin DNA metiltransferaz
MMAC1	: Mutated in multiple advanced cancers
MMR	: Mis-match Repair
MRG	: Magnetik Rezonans Görüntüleme
MRS	: Magnetik Rezonans Spektroskopi
MSH6	: MutS homolog 6

MSP	: Metilasyona Spesifik Polimeraz Chain Reaksiyonu
MTIC	: Monomethyl Triazeno Imidazole Carboxamide
N	: Nitrojen
NCIC	: National Cancer Institute of Canada
O₆	: Oksijen
OR	: Odds Ratio (Göreceli Olasılıklar Oranı)
OS	: Overall Survival (Genel Sağkalım)
p16	: Siklin-bağımlı kinaz inhibitörü 2A
p53	: Protein 53
PADPRP	: Poli adenzin difosfat riboz polimeraz
PCR	: Polimeraz Chain Reaksiyonu
PCV	: Prokarbazin, lomustin (CCNU), vinkristin
PDGF	: Platelet Derived Growth Factor
PET	: Pozitron Emisyon Tomografisi
PFS	: Progresyon-free Survival (Hastalıksız Sağkalım)
PTEN	: Phosphatase and tensin homolog
PTV	: Planlanan Hedef Volüm
Q-RT-PCR	: Quantitative real-time polymerase chain reaction (Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Chain Reaksiyonu)
RNA	: Ribonükleik asit
RPA	: Recursive Partitioning Analysis (Rekursif Bölümleme Analizi)
RT	: Radyoterapi
RTOG	: Radiation Therapy Oncology Group
SPECT	: Single-photon Emission Computed Tomography
SQ-PCR	: Semi-quantitative Polimeraz Chain Reaksiyonu
SSS	: Santral Sinir Sistemi

TP53	: Tumor protein 53
TMZ	: Temozolomide
um	: Unmetile
USB	: Universal Serial Bus
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
WBRT	: Whole Brain Radiation Therapy (Tüm Beyin Radyoterapisi)

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: WHO santral sinir sistemi tümörleri histolojik sınıflandırması	4
Tablo 2: Rekursif bölümlleme Analizi (RPA) Prognostik İndeksleri	11
Tablo 3: Olguların genel özellikleri	38
Tablo 4: Olguların sağkalım tablosu	39
Tablo 5: Genel prognostik faktörler tablosu	39
Tablo 6: MGMT Promoter Metilasyonu Görülen Olgulara Göre Genel Bulgular ...	39
Tablo 7: MGMT Metilasyonu Görülen Olgularda GS ve HS	45
Tablo 8: MGMT Metilasyonu Görülen Olgularda Prognostik Faktörler	45
Tablo 9: MGMT Promoter Metilasyonu Görülmeyen Olgulara Göre Genel Bulgular	47
Tablo 10: MGMT Metilasyonu Görülmeyen Olgularda GS ve HS	50
Tablo 11: MGMT Metilasyonu Görülmeyen Olgularda Prognostik Faktörler	50

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Temozolomide Etki Mekanizması	19
Şekil 2. MGMT' nin aktif kısmındaki sistein rezidüsüne alkil grubunun transferi...	22
Şekil 3. MGMT metilasyonu pozitif olgu	33
Şekil 4. MGMT metilasyonu pozitif olgu	34
Şekil 5. MGMT metilasyonu negatif olgu	35
Şekil 6. MGMT Metilasyonu Görülen (mMGMT) ve RT+TMZ ve yalnız RT alan Olgularda GS Eğrisi	43
Şekil 7. MGMT Metilasyonu Görülen (mMGMT) ve RT+TMZ ve yalnız RT alan Olgularda HS Eğrisi	44
Şekil 8. MGMT Metilasyonu Görülmeyen (umMGMT) ve RT+TMZ ve yalnız RT alan Olgularda GS Eğrisi	49
Şekil 9. MGMT Metilasyonu Görülmeyen (umMGMT) ve RT+TMZ ve yalnız RT alan Olgularda HS Eğrisi	49
Şekil 10. Bizim çalışmamıza göre mMGMT+RT+TMZ, mMGMT+RT, umMGMT+RT+TMZ ve umMGMT+RT uygulanan olguların GS eğrisi.....	51
Şekil 11. Bizim çalışmamıza göre mMGMT+RT+TMZ, mMGMT+RT, umMGMT+RT+TMZ ve umMGMT+RT uygulanan olguların HS eğrisi .	52
Şekil 12. Hegi ve ark. çalışmasına göre mMGMT+RT+TMZ, mMGMT+RT, umMGMT+RT+TMZ ve umMGMT+RT uygulanan olguların GS eğrisi ...	54
Şekil 13. Hegi ve ark. çalışmasına göre mMGMT+RT+TMZ, mMGMT+RT, umMGMT+RT+TMZ ve umMGMT+RT uygulanan olguların HS eğrisi ...	55

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada; postoperatif radyoterapi (RT) ile eşzamanlı ve ardından adjuvan Temozolamide (TMZ) tedavisi alan ve yalnız RT alan glioblastoma (GBM) olgularında O6-metil guanin DNA-metil transferaz (MGMT) promoter metilasyonunun tedavi cevabına etkisini ve prognostik önemi araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: 2000-2010 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Kemal Dedeman Onkoloji Hastanesi' nde GBM tanısı alıp RT+TMZ ve yalnız RT alan 100 olgunun parafinle bloklanmış doku örneğinden genomik DNA izole edilip bisülfite ile muamele edilerek kontrol DNA'larla karşılaştırıldı. Metilasyona spesifik olan/olmayan primerlerle hedef bölgenin amplifikasyonu için PCR yapıldı. Örnekler PCR'dan sonra *pyrosequencing* dizi analizine yüklendi. Metile-unmetile ayrımı için dizi analizi yapıldı. MGMT promoterdeki CpG 1, 2, 3, 4 adalarının metilasyonu incelendi. Metile ve unmetile olgular gruplandırılıp MGMT promoter metilasyonunun prognostik önemi ile genel sağkalım (GS) ve hastalıksız sağkalıma (HS)'a katkısı tek değişkenli ve çok değişkenli istatistiksel analizlerle incelendi.

Bulgular: Elli beş olgu (% 55) RT+TMZ, 45 olgu (% 45) yalnız RT aldı. 67 olgu (% 67) 60 yaş altı iken, 33 olgu (% 33) 60 yaş ve üstündeydi. 52 olguda (% 52)

MGMT metile (mMGMT) , 48 olguda (% 48) unmetileydi (umMGMT). mMGMT grupta ortalanca GS, HS sırasıyla 10,5 ay (2-67) ve 6 ay (2-57) idi.

mMGMT grupta RT+TMZ alan 23 (% 44,2), yalnız RT alan 29 (% 55,8) olgu vardı. Kaplan-Meier analizi (Log Rank) ile RT+TMZ ve yalnız RT alan grup arasında GS ve HS karşılaştırıldı. RT+TMZ alan grupta ortalanca GS 27 ± 5.14 ay iken yalnız RT alan grupta 9 ± 1.14 ay bulundu ve istatistiksel olarak anlamlılık saptandı ($p < 0,001$). Ortanca HS, RT+TMZ alan grupta 13 ± 4.59 ay iken yalnız RT alan grupta $6 \pm 0,41$ ay idi ve anlamlı olarak bulundu ($p < 0,001$). Cox regresyon analizi ile yaşın metile grupta etkisi incelenerek 60 yaş üstünde 60 yaş altına göre riskin ölüm 1.985 kat arttığı bulundu ($p = 0.04$).

umMGMT grupta ortalanca GS, HS sırasıyla 9,5 ay (2-27) ve 5 ay (2-13) idi. Unmetile grupta RT+TMZ alan 32 (% 66,7) ve yalnız RT alan 16 (% 33,3) olgu vardı. RT+TMZ alan grupta ortalanca GS 10 ± 1.32 iken yalnız yalnız RT alan grupta 7 ± 3 bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p = 0.813$). Ortanca HS RT+TMZ alan grupta 6 ± 1.08 iken yalnız RT alan grupta 6 ± 0.72 idi ve anlamlı olarak değerlendirilmedi ($p = 0.715$). Cox regresyon analizinde 60 yaş üstünde 60 yaş altına göre ölüm riskinin 2.232 kat arttığı bulundu ($p = 0.01$).

Sonuç: Literatürde MGMT promoter metilasyonu olan GBM’li olgularda RT’ye TMZ ilavesiyle genel sağkalıma katkı sağlanırken, unmetile olgularda bu katkı gösterilemediğinden TMZ kullanılması umMGMT grubunda tartışmalı olarak kalmıştır. Bizim çalışmamıza ait 100 olguluk retrospektif serimizde de MGMT promoter metilasyonu olanlarda RT’ye TMZ eklenmesinin GS ve HS’ı anlamlı şekilde uzattığı ancak MGMT metilasyonu olmayan olgularda TMZ’in GS ve HS’a anlamlı katkı sağlamadığı gösterildi. MGMT promoter metilasyonunun olup olmamasının tedavi cevabını tahmin etmede güçlü prediktif bir faktör olabileceği sonucu çıkarıldı. Bu haliyle umMGMT grubunda RT’ye TMZ eklenmesi tartışılması gereken bir konudur.

Anahtar Kelimeler: Glioblastoma, O6-metil guanin DNA-metil transferaz, Radyoterapi, Temozolamide

SUMMARY

Purpose: In this study; the effect of O6-methyl guanine DNA-methyl transferase (MGMT) promoter methylation on treatment response and prognostic value was investigated on glioblastoma (GBM) cases, treated by postoperative radiotherapy (RT) with concomitant and adjuvant temozolomide (TMZ) and RT alone.

Materials and Methods: Genomic DNA isolated from paraffin embedded tissue samples of 100 GBM cases, treated by RT+TMZ and RT alone between 2000-2010 years, at Erciyes University Medical Faculty Kemal Dedeman Oncology Hospital. Genomic DNA incubated with bisulfite and compared with control DNA. PCR was applied for amplification of target region with methylation specific or not specific primers and samples were loaded from PCR to *pyrosequencing* chain analysis. Analysis was done for methylated-unmethylated MGMT distinction. CpG 1, 2, 3, 4 islands methylation on MGMT promoter was demonstrated. Methylated and unmethylated cases were grouped and then the prognostic value of MGMT promoter methylation and contribution to overall survival (OS) and progression free survival (PFS) was demonstrated with univariate-multivariate analysis.

Results: Fifty-five (%55) cases were applied RT+TMZ and 45 (%45) cases was administered RT alone. Sixty-seven (%67) cases were under 60 years and 33 (%33) cases were 60 years of age and over. The presence of MGMT methylation was demonstrated in 52 (%52) cases and the rest of 48 (%48) cases weren't.

Median OS and PFS for group with methylated MGMT were 10,5 months (2-67) and 6 months (2-57), respectively. In this group, 23 (%44,2) cases were applied RT+TMZ and 29 (%55,8) cases were applied RT alone. OS and PFS were compared between RT+TMZ and RT alone group with Kaplan-Meier (Log Rank) Analysis.

Median OS for RT+TMZ and RT group was 27 ± 5.14 months and 9 ± 1.14 months, respectively and a statistically significant difference was demonstrated ($p < 0.001$). Median PFS for RT+TMZ and RT group was 13 ± 4.59 months and 6 ± 0.41 months, respectively and a statistically significant difference was detected, too ($p < 0.001$). Also, the importance of age was demonstrated with Cox regression analysis and the patients who 60 years of age and over had death risk 1,985 times more according to under 60 years ($p = 0.04$).

Median OS and PFS for group with unmethylated MGMT were 9,5 months (2-27) and 5 months (2-13), respectively. In this group, 32 (%66,7) cases were administered RT+TMZ and 16 (%33,3) of them was applied RT alone. Median OS for RT+TMZ and RT group was 10 ± 1.32 months and 7 ± 3 months, respectively and a statistically significant difference wasn't demonstrated ($p = 0.813$). Median PFS for RT+TMZ and RT alone group was 6 ± 1.08 months and 6 ± 0.72 months, respectively and a statistically significant difference wasn't demonstrated, either ($p = 0.715$). Also, the importance of age was demonstrated and the patients who were 60 years-old and over had death risk 2,232 times more according to under 60 years. group ($p = 0.01$)

Conclusion: As the addition of TMZ to RT, for GBM cases with methylated MGMT promoter, provides contribution to OS, the contribution for cases with unmethylated MGMT promoter, is controversial, because of not been shown in literature. In our retrospective trial on 100 cases was indicated that the addition of TMZ to RT improved OS and PFS for cases with methylated MGMT promoter but didn't improve OS and PFS for cases with unmethylated MGMT promoter. As a result of this trial, MGMT promoter methylation status is thought to be a strong predictive factor to estimate the treatment response. In this state, the addition of TMZ to RT for cases with unmethylated MGMT promoter is controversial.

Key Word: Glioblastoma, O6-methyl guanine DNA-methyl transferase, Radiotherapy, Temozolomide.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Primer santral sinir sistemi tümörleri tüm yeni tanı almış kanser olgularının % 1.4' ünü oluşturur. Amerika' da yılda yaklaşık 18.000 kişide primer santral sinir sistemi tümörü tespit edilmekte ve bunların % 60' ı glioma tanısı almaktadır. Glioblastoma, WHO grade IV, en sık görülen ve en agresif seyreden primer beyin tümörüdür (1-11). Kötü diferansiye astrositlerden oluşan glioblastoma erişkinlerde daha sık görülür ve genelde serebral hemisferleri tutar. Daha çok de novo olarak ortaya çıkar ancak az bir kısmı düşük gradeli astrositom (WHO grade II) ya da anaplastik astrositomdan (WHO grade III) transformasyon ile sekonder olarak ortaya çıkar (1,8,9,10). Glioblastomada standart tedavi geniş sınırlı cerrahi rezeksiyon ve postoperatif radyoterapi ile eş zamanlı ve idame temozolomide (TMZ) (TEMODAL®) tedavisidir (1-13).

Tedaviye temozolomide eklenmesinin genel ve hastalıksız sağkalımı arttırdığı gösterilmiştir, buna rağmen olguların % 70' inde bir yıl içinde progresyon görülür (14). Olgularda temozolomide yanıt heterojendir (15). Temozolamide DNA'daki onarımı sağlayan alkil gruplarına bağlanıp DNA hasarına yol açarak apoptozu indükler (16). TMZ'in O6-metil guanine bağlandığı mekanizma tüm metilasyon olaylarının sadece % 5-10'nu oluşturur ancak oldukça sitotoksik bir olaydır (17,18). O6 metil guanin metil transferaz (MGMT) ise guaninin O6 pozisyonunda alkilasyon ve metilasyonu hızlıca geri çeviren hücresel DNA onarım proteinidir, böylece TMZ gibi alkillayıcı ajanların sitotoksik etkilerini nötröler eder (19).

Tümör hücrelerinde MGMT aktivitesinin yüksekliği alkillayıcı ajanlara direnç ile ilişkilidir (20). Buna karşın tümör hücrelerinde promoter metilasyonu

sonucu MGMT geninin epigenetik sessizliği düşük MGMT ekspresyonu ile sonuçlanır (21, 22). MGMT glioblastomalı olgularda potansiyel prognostik marker olarak değerdendirilmektedir ayrıca TMZ yanıtında prediktif değeri olduğu saptanmıştır (23), ancak klinik uygulamada henüz standart hale gelmemiştir.

Bu alışmada Erciyes Üniversitesi Tıp Fakóltesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalında 2000-2010 tarihleri arasında glioblastoma tanısı almış yalnız radyoterapi ve radyoterapi ile eşzamanlı ve ardından idame temozolomide alan olgularda MGMT metilasyon durumu incelendi. MGMT metilasyonunun sağkalım ile hastalıksız sağkalıma etkisi ve prognostik önemi değerdendirildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Santral Sinir Sistemi Tümörleri

Santral sinir sistemi (SSS) beyin, spinal kord ve onları koruyan yapıları kapsarken hem primer hem de metastatik tümörlerden etkilenir (3). Primer santral sinir sistemi tümörlerinin nedeni bilinmemektedir. Ancak mesleki veya çevresel atıklar (organik çözücüler, sentetik kauçuk, formaldehit, polivinil klorid, pestisid, herbisid, ionize radyasyon ve elektromanyetik alan), hayat tarzı ve beslenme (cep telefonu, nitrat ve N-nitroso bileşikler, kolesterol, yüksek sosyal sınıf, saç spreyleri ve sigara), medikal sebepler (toxoplasma gibi viral ve parazitik enfeksiyonlar, AIDS, immünsupresyon, kafa travması) etyolojik faktörler içinde sayılabilir (24). Bazı SSS tümörlerinin ise nörofibromatozis Tip 1, nörofibromatozis Tip 2 ve Li-Fraumeni Sendromu ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (25). Bununla birlikte bazı yayınlarda A, C ve E vitamini, astım, alerjik bünye ve sık grip olmanın SSS tümörlerine karşı koruyucu olabileceği söylenmiştir (1).

SSS tümörleri Amerikada tüm kanserlerin % 1.4' ünü ve kansere bağlı ölümlerin % 2.2' sini oluşturur (26).

SSS tümörlerini orjin aldığı embriyonik dokuya göre gruplayan WHO histolojik sınıflaması aşağıda verilmiştir (Tablo 1)(26). SSS tümörlerinin % 82' sini astrositom, anaplastik astrositom ve glioblastoma oluştururken; % 14' ünü

medullablastom, oligodendrogliom, ependimom ve pilositik astrositom ve miks oligoastrositom oluşturur (27,28).

Tablo 1. WHO Santral Sinir Sistemi Tumorleri Histolojik Sınıflandırması

1. Astrositik tumorler
a. Diffüz astrositoma 1. Fibriler astrositoma 2. Protoplazmik astrositoma 3. Gemiositik astrositoma b. Anaplastik astrositoma c. Glioblastoma 1. Dev hücreli glioblastoma 2. Gliosarkom d. Pilositik astrositoma e. Pleomorfik ksantroastrositom f. Subependimal dev hücreli astrositom
2. Oligodendroglial tumorler
a. Oligodendrogliom b. Anaplastik oligodendrogliom
3. Mixed gliomalar
a. Oligoastrositom b. Anaplastik oligoastrositom
4. Ependimal tumorler
a. Ependimoma a. Sellüler b. Papiller c. Clear cell d. Tanisitik b. Anaplastik ependimoma c. Miksopapiller ependimoma d. Subependimoma
5. Koroid plexus tumorleri
a. Koroid pleksus papillomu b. Koroid pleksus karsinomu
6. Nöronal ve mixt nöroglial tumorler
a. Gangliositom b. Serebellumun displastik gangliositomu c. Desmoplastik infantil astrositomu d. Disembriyoblastik nöroepitelyal tumor e. Gangliogliom f. Anaplastik gangliogliom g. Santral nörositom h. Serebellar liponörositom i. Filum terminalenin paragangliomu

7. Nöroblastik tümörler
a. Olfaktor nöroblastom (estesionöroblastom) b. Olfaktor nöroepitelyom c. Adrenal gland ve sempatik sinir sistemi nöroblastomu
8. Pineal parenkimal tümörler
a. Pineasitom b. Pineablastom c. Orta derecede differansiyasyon gösteren pineal parenkimal tümör
9. Embriyonal tümörler
a. Medullaepitelyom b. Ependimoblastom c. Medullablastom 1. Desmoblastik medullablastom 2. Large cell medulloblastom 3. Medullomyoblastom 4. Melanositik medulloblastom d. Supratentoryel primitif nöroektodermal tümörler 1. Nöroblastom 2. Ganglionöroblastom e. Atipik teratoid/rabdoid tümör
10. Orijini belirsiz glial tümörler
1. Astroblastom 2. Gliamatozis serebri 3. Ventrikül koroid gliomu

2.2. Glioblastoma

2.2.1. Etyoloji ve Epidemiyoloji

Yüksek dereceli gliomalar tüm malign beyin tümörlerinin % 77'sini oluşturur (29). Glioblastoma ise tüm malign beyin tümörlerinin % 82'ni oluşturur. Erkeklerde kadınlardan daha sıktır ve 65-75 yaş arası insidans daha yüksek olup ortanca sağkalım artan yaşla azalır (29). Etyolojide çevresel faktörlerin rolü tartışmalı olmakla birlikte nörofibromatozis Tip 1 ve Li-Fraumeni Sendromu gibi genetik faktörler glioblastoma oluşumunda etkili olabilir (30-32).

2.2.2. Biyolojik Özellikler ve Moleküler Biyoloji

Yüksek gradlı gliomalar sinyal transdüksiyon yolları, hücre büyüme kontrolü, hücre döngüsü, apoptoz ve diferansiyasyonu değiştiren çeşitli gen ekspresyon değişiklikleri gösterir. Anormal büyüme faktörü reseptör ekspresyonu ve hücre siklusunda kontrol kaybı en sık görülen değişikliklerdir. Aktif hale gelen

mutasyonlar veya Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) ve onların reseptörlerinin amplifikasyonu da gözlenmektedir.

Tümör gelişimi ve progresyonuna katkıda bulunan diğer büyüme-uyaran değişikliği Focal Adhesion Kinase (FAK) overekspresyonu ve bu değişiklik sinyal yolları ile bağlantılıdır. FAK overekspresyonu astrositom ile glioblastomalarda olur ve bu overekspresyonun hem *invivo* hem de *invitro* hücre proliferasyonuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca malign hücre migrasyonu ve tümör angiogenezisinde de önemli olabilir (33-35).

Siklin-bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A (CDKN2A) (p16) ve Retinoblastoma 1 (RB1) gen mutasyonunda sıklıkla (36,37). Bu tümör supresör genler, CDKN2A- Siklin-bağımlı Kinaz (CDK4) / cyclin D1-RB1 hücre siklus düzenleyici yollarında anahtar role sahiptir. Phosphatase and tensin homolog (PTEN) (MMAC1) ve Protein 53 (p53) gibi diğer tümör supresör genler ile Murine double minute oncogene (MDM2) ve hücre siklus regülasyonunda önemli genler de genelde mutasyona uğrarlar (38,39).

Yüksek gradlı gliomalarda genelde Protein kinaz B (AKT) fosforilasyonun baskılanmasını destekleyerek hücre büyümesiyle sonuçlanan PTEN delesyonu görülür (40). PTEN kaybı olan astrositlerde hızlanmış proliferasyonun temelini bu olduğu düşünülür (41). Yapılan çalışmalarda, astrositlerin diferansiyasyonunda anahtar role sahip büyüme faktörlerinin en çok etkilenen faktörler olduğu ve astrositlerin diferansiyasyon yolları ile glioma transformasyonu arasındaki bağlantıda rol oynadığı gösterildi (42).

2.2.2.1. Major Yollar

Yüksek gradlı gliomaların moleküler özelliklerinin incelenmesi ile astrositik hücreden glioblastomaya progresyonda ayırt edici yollar göstermiştir (1).

De novo glioblastomalar yaşlı hastalarda daha sıklıkla ve sürekli olmayan EGFR ve MDM2 overekspresyonu, mutasyonu veya PTEN, RB1 veya CDKN2A kaybı içerir. CDKN2A delesyonu EGFR amplifikasyonu olan tümörlerde gözlenir ve yüksek proliferasyon oranlarıyla bağlantılıdır (43). p16/CDKN2A delesyonu ve EGFR amplifikasyonu yaşlı hastalarda görülen daha kötü prognozunda yatan

sebeptir (44). PTEN inaktivasyonu en sık de novo glioblastoma yolağında görülür (45).

İkinci yolda başlangıçta düşük gradlı astrositom olarak başlayan yapılardan daha yüksek gradlı tümöral yapılar meydana gelir. Bu hastalar daha gençtir ve tümörleri malign progresyona götüren ardarda genetik değişimler gösterirler. Tümör protein 53 (TP53) mutasyonu ve PDGFR ile ligandlarının overekspresyonu bu yolda anahtar basamağı oluşturur (1).

Bu moleküler değişiklikler yolları etkilese de, spesifik genetik özelliklerin prognostik önemi kesin belirlenmemiştir (1). Ancak glial tümörlerde EGFR geninin artmış ekspresyon ve amplifikasyonu iyi belirlenmiştir (46). Tüm çalışmalarda onaylanmasa da anormal EGFR amplifikasyon/ overekspresyonun veya genin kendi içinde değişikliklerin anaplastik astrositom ve glioblastomada kötü prognoza işaret ettiğine dair kanıtlar vardır (47-51).

2.2.3. Patoloji

2.2.3.1. Makroskopi

Glioblastomalar makroskopik incelemede çevre normal dokudan iyi sınırla ayrılmasına rağmen, mikroskopik olarak kitleden uzakta normal doku içine infiltrasyon gösterir. Yüksek derecede invaziv tümör olduklarından çevre normal beyin dokusunda ödem ve ekspansiyona yol açarlar. Kesit yüzeylerinde sıklıkla hemoraji, kist formasyonları ve nekroz alanları görülür (1,52). Corpus callosumu yakın alandan köken alan tümörler orta hattı geçip karşı serebral hemisferi de infiltre edebilir bu durumda kelebek paterni şeklinde isimlendirilir (1,2). Bu sebeplerden tümörün geniş sınırlarla rezeksiyonu genellikle iyi prognozla ilişkiliyken dar sınırla rezeksiyon normal beyin dokusuna diffüz ve geniş infiltrasyondan dolayı küratif değildir. Tümör doğrudan ventriküler sistem ve subaraknoid aralığa yayılabilir. Hastaların bir kısmında ise geç evrelerde spinal ya da spinal subaraknoid metastaz gelişebilir. Lenfatiklerin olmayışı bu yolla yayılımı ortadan kaldırır. Hematojen metastaz ise oldukça nadirdir (1).

2.2.3.2. Histopatoloji

Astrositler küçük yuvarlak çekirdek ve glial fibriler asidik proteinden (GFAP) oluşan çok sayıda filamente sahiptir. Yüksek gradlı tümörler normal astrosite

benzeyen diffüz hücre infiltrasyonu gösterir. Tümör kesitleri genelde yoğun ve uzun sitoplazmik içerik ve genişlemiş hücre ihtiva eden reaktif astrositler veya gemistosislerden oluşur. Malignensi tanısını destekleyen spesifik bulgular ise artmış sellülarite, nükleer ve sitoplazmik pleomorfizm, mitoz, küçük damar ve endotelyal hücre proliferasyonu ve nekrozdur (53).

2.2.4. Gradlandırma

Derecelendirme, prognostik belirleyici olması nedeniyle önemlidir. WHO klasifikasyon sistemi St. Anne-Mayo sistemi ile uyumlu kriterleri kullanır. Buda malign özelliklerin sayılarının skorlanması temel alır (54).

St. Anne-Mayo;

- Mitotik aktivite
- Sellüler pleomorfizm
- Vasküler endotelyal proliferasyon ve
- Nekroz özelliklerine bakar

Glioblastomda dört malign özellik bir aradadır ve grade IV olarak adlandırılır (54).

2.2.5. Klinik Tablo

İntrakranial basınç artışı semptomları (baş ağrısı, kusma, bilinç bozuklukları, 3 ve 6. sinir tutulumlarına bağlı olarak diplopi, fasial paralizi v.s.) sık görülür. Yerleşim bölgesine bağlı olarak nörolojik defisitler meydana gelir. Epileptik bulguların ortaya çıkması frontal ve temporal yerleşimli tümörlerde siktir. Klasik olarak; baş ağrısı, epileptik nöbet ve hemiparezi triadı olguların yarısından fazlasında mevcuttur. Beyin parankimi ağrıya duyarlı değildir. Baş ağrısı, meninkslerdeki kan damarlarıyla ilişkili olan, ağrıya duyarlı sinir uçlarının irritasyonu ve lokal gerilimi sonucu gelişebileceği gibi, tümörün baskıya neden olabilecek geniş hacime ulaşması sonucu, intrakranial basıncın artışı ile ilişkili olarak da ortaya çıkabilir. Sıklıkla bölgesel olma özelliği taşır ve genellikle tümörün yerleşimi hakkında bilgi verir. Bulantı-kusma sıklıkla orta hat ve posterior fossa tümörleri ile ilişkilidir. Mental değişiklikler frontal ve temporal lob tümörlü hastalarda çok sık görülen bir bulgudur.

Epileptik nöbetler ise nöral dokudaki irritasyonu gösterir ve sıklıkla da grand mal ve fokal tip nöbetler görülür (2,55).

2.2.6. Tanı Metodları

Beyin tümörlü hastaların ilk muayenesi, ayrıntılı bir hikaye almayı ve fizik muayeneyi kapsamalıdır. Son 20 yıldır, Magnetik Rezonans Görüntüleme (MRG) ve Bilgisayarlı Tomografi (BT), intrakraniyal ve spinal lezyonların tanısında standart kullanılan tekniklerdir. BT; beyinin anatomik tanımlamasını yapar ve kontrastın yoğunlaştığı hacimle ilişkili olarak, bir bölgede gelişen tümöral yapıyı gösterir. BT tümörün lokalizasyonu, yayılımı, gradı, tek veya çok odaklı olması, tek yada çift taraflı yerleşimi ile birlikte; ödem, nekroz ve kalsifikasyon gibi ayrıntıları hakkında da bilgi verir. MRG ise; normal anatomik yapıyı ve beyin parankimindeki değişiklikleri daha detaylı gösterir. Günümüzde BT ve MRG ile tümör büyüklüğü ölçüldüğünden, tedaviye cevabı ölçmekte öncelikle kullanılan teknikler olarak kabul edilmişlerdir. MRG’de glioblastomalar heterojen kitleler şeklinde görünürler. Heterojen görünüm nekroz ve/veya kist oluşumuna bağlıdır. T1A görüntülerde genellikle santral yerleşimli hipointens alan mevcuttur. Bu hipointens alanı çevreleyen kalın, düzensiz duvar ve solid nodüller parankime göre izointens veya hafif hipointens sinyal paternine sahiptir. T2A incelemelerde değişik sinyalli heterojen hiperintens görünüm vardır. Tümörü çevreleyen çevresel ödem alanı T2A görüntülemelerde belirgindir. İntravenöz gadolinyum sonrası yapılan incelemelerde opaklaşma saptanır (2,25).

Pozitron emisyon tomografi (PET) ise malign büyüme nedeniyle gelişen nekroza bağlı olarak, metabolizma hızı farklı alanların doku değişkenliğini saptamaya yardımcı olan bir tanı yöntemidir (2,56). Single photon emisyon tomography (SPECT) ve PET, tümör metabolizmasını anlamak ve radyasyon nekrozundan, neoplaziyi ayırt etmekte kullanılmaktadır. Malign hücrelerin normal dokudan daha fazla glukoz kullandığı belirlenince, 18F-florodeoksiglukoz (FDG) kullanılarak, PET çalışmaları genişletilmiştir. FDG-PET’ in tanı ve tümör yönetiminde kullanılması, malignensinin derecesini, biyopsi alanının lokalizasyonunu, tedavi sonrası tümör nüksünün tespitini ve tümör nüksünü radyasyon nekrozundan ayırt edilebilmesini mümkün hale getirmiştir. Manyetik rezonans spektroskopisi (MRS) ise glioma metabolizması çalışmalarında yeni bir

görüntüleme tekniğidir. MRS vasıtasıyla fosfor 31 ve hidrojen ölçümleri yapılarak, enerji metabolizması haritası çıkarılabilir ve hücre zarının lipid metabolizması ile diğer hücre unsurları tanımlanabilir. Fosfolipid hücre zarı içeriğinde bulunan kolin seviyesinin, kronik radyasyon nekrozunda azaldığı tespit edilmiş olup kolin seviyesinin ölçümü ile, tedaviye cevap değerlendirmesi yapılabilir.

Cerrahi sonrası değişikliklerin de radyolojik tetkiklerde, kontrast maddeyi tutma gibi bir özelliği vardır. Bundan dolayı, postoperatif değişiklikler ile rezidüel tümörü ayırtetmek zordur. Yapılan çalışmalarda, postoperatif değişikliklerin, en erken üçüncü günden itibaren kontrast maddeyi tutmaya başladığı ve tutulumun 45 gün kadar süreceği saptanmıştır. Bu nedenle tedavi sonrası tümör boyutunu tespit etmek için postop ilk 24 saat (en geç üç gün içinde) veya 45 gün sonra MRG yapmak gerekir (57).

2.2.7. Prognostik Faktörler

2.2.7.1. Klinik Prognostik Faktörler

Glioblastomalı hastalarda sağkalım oldukça kötü olup ortalama 1 yıldır. Curran ve ark. RTOG verilerini kullanarak 1974-1989 arası tanı alan 1578 olguyu derledi. Bu çalışmada rekursif bölümlleme analizini (RPA) kullanarak 6 prognostik grup oluşturup hastaları bu gruplara ayırdılar. Bu gruplarda medyan sağkalım 4.6 ay ile 58.6 ay arasında değişmekteydi. Önemli prognostik faktörlerin yaş, histoloji, mental durum, Karnofsky performans durumu (KPS), cerrahiden önceki semptom süresi, rezeksiyon genişliği, nörolojik durum ve RT dozu olduğu saptandı. Çalışmaya göre yaşı 50' nin üzerinde olması, histolojinin glioblastoma olması, KPS' nin 90' ın altında olması, semptomların başlangıcı ile tanı konulması arasındaki sürenin 3 aydan kısa olması, total rezeksiyon yapılamaması ve 54.4 Gy' den daha düşük doz uygulanması kötü prognostik faktörler olarak değerlendirildi (Tablo 2) (58). Ayrıca bazı çalışmalarda oligodendrogliyal komponentin varlığının sağkalımı ortalama 5 yıla kadar uzatabileceği ve 60 yaş üstünün kötü prognostik faktör olduğu saptandı (59,60).

Tablo 2. Rekursif Partisyon Analizi (RPA) Prognostik İndeksleri

Sınıf 1	Yaş<50, anaplastik astrositoma, normal mental durum
Sınıf 2	Yaş>50, Karnofsky Performans Skoru (KPS) 70-100, anaplastik astrositoma, semptom süresi >3 ay
Sınıf 3	Yaş<50, anaplastik astrositoma ve anormal mental durum ya da Yaş<50, Glioblastoma ve KPS 90-100
Sınıf 4	Yaş<50, Glioblastoma, KPS<90 ya da Yaş≥50, KPS 70-100, anaplastik astrositoma, semptom süresi < 3 ay ya da Yaş>50, Glioblastoma, cerrahi rezeksiyon, ve iyi nörolojik fonksiyon
Sınıf 5	Yaş≥50, KPS 70-100, Glioblastoma, cerrahi rezeksiyon ve işi engelleyen nörolojik bozukluk veya biyopsi ve takiben en az 54.4 Gy radyoterapi
Sınıf 6	Yaş≥50, KPS<70, anormal mental durum ya da Yaş≥50, KPS 70-100, Glioblastoma, sadece biyopsi, <54.4 Gy radyoterapi

2.2.7.2. Moleküler Prognostik Faktörler

Moleküler prognostik faktörlerin belirlenebilmesi için pek çok çalışma yapılmıştır. O6-metil guanin metil transferaz (MGMT) temozolomide (TMZ) alan hastalarda özel öneme sahiptir. MGMT promoter metilasyonu BCNU ve TMZ gibi alkilleyici ajanlara duyarlılık ile bağlantılıdır. Eğer metilasyon yoksa, MGMT TMZ'e bağlı DNA hasarını hızlıca onarır. MGMT promoter metilasyonu iyi prognoz göstergesidir (61).

Ayrıca 1p/19q heterozigotisme kaybı (LOH) oligodendrogial fenotip ile birlikte, KT ve RT'ye iyi cevap ve daha iyi sağkalımla ilişkilirken, 10q' da heterozigotisme kaybı (LOH) kötü prognozu işaret eder. LOH tüm glioblastomalı olguların % 60-90'ında mevcuttur (62).

P53 mutasyonu da iyi prognoz göstergesidir. Olguların % 25-40'ında olup genç olgular ve sekonder glioblastomada daha sık görülür (63-65).

EGFR mutasyonu veya overekspresyonu sıklıkla 10. kromozom kaybı nadiren de p53 mutasyonu ile birliktelik gösterir. De novo glioblastomalarda görülür. EGFRVIII; kinaz inhibitörleri, immunotoksinler ve peptid aşılarında hedefdir (46-49).

MDM2 amplifikasyon veya overekspresyonu olguların % 10-15' inde görülür ve kötü prognostik faktördür (64). PTEN (MMAC) mutasyonu da olguların % 30' unda görülür ve kötü prognozla ilişkilidir (45, 49). Her-2/neu overekspresyonu da kötü prognoz göstergesidir (2).

2.2.8. TEDAVİ

Uzun yıllar glioblastomada standart tedavi cerrahi rezeksiyonu takiben adjuvan radyoterapi idi. Ardından nitrozüreler tedaviye eklendi. Son 10 yıl içinde RTOG glioblastomada RT ile etkin alternatif ajanı bulmak için pek çok faz iki çalışma yürüttü. Değişik fraksiyonlar, farklı dozlar veya teknikler ile (stereotaktik radyocerrahi, brakiterapi) ve radyasyon duyarlaştırıcılarla ilgili çalışmalar da yapıldı. Bununla birlikte hiçbirinde sağkalıma anlamlı bir katkı elde edilemedi ve standart tedavi olarak kabul görmedi (4). Son çalışmalar cerrahinin ardından uygulanan radyoterapi ve radyoterapi ile birlikte temozolamide kullanımının standart tedavi olduğu gösterdi. Halen GBM tedavisinde hedefe yönelik ajanlar araştırılmaktadır (3).

2.2.8.1. Cerrahi

Cerrahi glioblastomada standart tedavinin en temel ayağını oluşturur. Cerrahinin amacı tanı için biyopsi, definitif yaklaşım için rezeksiyon, kitle etkisine bağlı semptomların azaltılması için palyatif yaklaşım ve kafa içi basınç veya hidrosefaliye bağlı semptomları rahatlatmak için şant yapmaktır (4, 57). Glioblastomada cerrahinin ana hedefi minimal risk ile maximal tümör sitoredüksiyonu yapmaktır (2,4).

Glioblastomada total rezeksiyonun, subtotal rezeksiyon ve biyopsiye göre sağkalım ve hastalıksız sağkalıma katkısının daha fazla olduğu gösterilmiştir. MRG değerlendirmesine göre tümörün %97' sinden fazlasının rezeksiyonu daha uzun sağkalım ile ilişkilidir (66).

Hasta kraniotomi için risk taşıyorsa, lezyon büyük ve yüzeysel ise, lezyonun lokalizasyonu nedeni ile total rezeksiyon yapılamıyorsa ve daha önce tanı koyulup

görüntüleme yöntemleriyle tesbit edilemeyen tümör progresyonu mevcut ise biyopsi histopatolojik tanıyı koymak ve tedaviyi yönlendirmek bakımından önem taşır (67).

Lezyon derin lokalizasyonlu, kritik alanlarda lokalize, birden çok ise veya lezyon asemptomatik ve hasta yaşlı aynı zamanda genel durumu kraniyotomiye elverişsiz ise doku tanısı amacıyla stereotaktik biyopsi açık biyopsiye alternatif olarak uygulanabilir (67).

Kuzey Amerika’ da 1997-2001 arasında 52 klinikte 413 glioblastomalı hasta rezeksiyon ve biyopsisinin sağ kalıma etkisini değerlendirmek için karşılaştırıldı. Çok değişkenli analizlerde rezeksiyonun sağkalım süresini anlamlı şekilde uzattığı saptandı. 60 yaş üstü KPS skoru 70’in altında olan ve multifokal tümörü olan hastalar çalışmadan çıkarıldıktan sonra da rezeksiyonun yine sağ kalımı uzattığı gösterildi (68).

2.2.8.2. Radyoterapi

2.2.8.2.1. İki Boyutlu (Konvansiyonel) External Radyoterapi

Glioblastomanın tedavisinde radyoterapi yaklaşık 60 yıldır kullanılmaktadır. Radyoterapinin en iyi destekleyici tedaviye (Best Supportive Care=BSC) karşı sağkalım avantajını gösteren ilk randomize çalışma Beyin Tümörü Çalışma Grubu (BTSG) tarafından 1976’de yapıldı . Çalışmadaki olguların % 90’ı GBM tanısı almıştı. Bu çalışmada sadece RT alanlarda ortalama sağkalım 37,5 hafta iken klasik bakım yapılan ve BCNU alan hastalarda ortalama sağkalım sırasıyla 17 ve 25 hafta idi. Bu sonuçların alınmasıyla ve BTSG tarafından postoperatif radyoterapinin sağkalım avantajının gösterilmesiyle GBM de postoperatif RT standart hale geldi. BCNU ve RT uygulanmasında ise sağkalım 40,5 hafta olarak bulundu (69).

2.2.8.2.2. Radyoterapide Hedef Volümler

Erken klinik çalışmalarda glioblastomalı hastalarda RT’ nin rolü araştırılırken olgulara tüm kranial içeriği alacak şekilde tüm beyin radyoterapisi (Whole Brain Radiation Therapy=WBRT) ile 50-60 Gy dozda RT uygulandı. Bu tedavi geniş paralel karşılıklı alanlar ile uygulandı (69). Tüm beyin radyoterapisini parsiyel beyin radyoterapisiyle karşılaştıran geniş randomize çalışma olmamasına rağmen 1989’da bir intergrup çalışması tüm beyin radyoterapisi ile parsiyel beyin radyoterapisini

karşılaştırdı. Bu çalışmada, daha küçük RT volümlerinde sağkalım farkı gözlenmedi (70).

Randomize 50 olguluk küçük bir çalışmada ise parsiyel beyin radyoterapisi ve tüm beyin radyoterapisi karşılaştırılınca eşit sağkalım, benzer nüks paternleri ve parsiyel beyin RT'sinde daha iyi KPS skorları saptandı (71).

Parsiyel beyin radyoterapisi uygulanan glioblastomalı olgularda nüks en çok primer tümör yatağı ve yakın çevresinde görülür (53). Yapılan çalışmalarda, parsiyel beyin radyoterapisi uygulanan hastalarda nükslerin % 90' ının ilk tümör alanının 2 cm çevresinde olduğu gösterildi (71,72,73).

Glioblastomalı olgularda MRG kullanılarak tedavi planlaması yapılırken T2 veya FLAIR görüntülerde ödem olarak görülen bölge mikroskopik tümör yayılımı için riskli alandır. Bu volüme 45-50 Gy doz uygulanırken, MRG'de T1 ağırlıklı görüntülerde gros tümör olarak değerlendirilen alana 60 Gy RT uygulanır. Bu uygulamadaki tek problem MRG' deki T2 görüntülerinin mikroskopik tümör infiltrasyonu için spesifik olmamasıdır. MR spektroskopinin, tümör sınırını belirlemede daha spesifik olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Multivoksel tekniği kullanılarak kolin ve N-asetil aspartatdan alınan sinyal değerlerinin cerrahi sonucu elde edilen histopatolojiyle korele olduğu belirtilmiştir. Tümörü gliosis, ödem, nekroz ve normal dokudan ayırt etmede spesifitesi %86, sensivitesi %90'dır (53).

İlk olarak 1979'da yapılan 2 çalışmada 50 Gy civarı dozların yeterli olabileceği iddia edildi (63, 64). BTSG tarafından daha çok sayıda vakayla 3 randomize çalışma yapıldı (BTSG 66-01, BTSG 69-01, BTSG 72-01). 45 Gy' den 60 Gy'e doğru doz arttırıldıkça sağkalımda da dozla orantılı artış gözlemlendi (64).

1983' de sonuçlanan ECOG/RTOG çalışmasında vakalar 4 kola randomize edildi. Bu çalışmada; 60 Gy tüm beyine RT uygulanan gruba 3 deneysel grup karşılaştırıldı. Birinci gruba 10 Gy ek doz parsiyel beyin RT'si şeklinde uygulandı (Toplam 70 Gy). İkinci gruba 60 Gy dozda RT' ye BCNU, üçüncü gruba ise lomustine, CCNU ve dakarbazine kemoterapisi uygulandı. 10 Gy ek doz uygulanan grupta, yalnız 60 Gy tüm beyine radyoterapi uygulanan gruba göre sağkalımda artış görülmedi (65). 20 yıldır yapılan çalışmalarda 60-70 Gy arası dozun güvenli

olduğunu bildirilse de randomize çalışmalarda 60 Gy üstü dozun faydası gösterilemedi (53,63-65).

Standart fraksiyone radyoterapide, tedavi günde bir kez haftada 5 gün (hafta sonları hariç) ve fraksiyon dozu 1,8-2 Gy olacak şekilde uygulanır (53).

RTOG' nin prospektif, randomize faz I-II çalışması olan 83-02 doz eskalasyon (yükseltme=arttırma) çalışmasında olgulara günde 2 fraksiyon her fraksiyonda 1.2 Gy doz olacak şekilde hiperfraksiyone (günde birden fazla radyoterapi uygulaması) radyoterapi BCNU ile eşzamanlı olarak uygulandı. Hiperfraksiyone rejimlerde 64.8, 72.8, 81.6 Gy her fraksiyonda 1.2 Gy doz olacak şekilde 2 kez uygulanırken akselere hiperfraksiyone rejimlerde 48 ve 54.4 Gy, her fraksiyonda 1.6 Gy doz olacak şekilde 2 kez uygulandı. RTOG 90-06, faz III çalışmasında ise gruplardan ilkinde 60 Gy doz 30 fraksiyonda uygulanırken, diğer gruba 72 Gy doz günde 2 fraksiyon ve her fraksiyonda 1.2 Gy olacak şekilde uygulandı. Ancak çalışmaların hiçbirinde sağkalım artışı saptanamadı (53, 74).

2.2.8.2.3. Üç Boyutlu Konformal Radyoterapi

Bilgisayar teknolojisindeki gelişmelerin ardından radyasyonun tümöre ve normal dokuya 3 boyutlu dağılımı hesaplanabilir ve normal dokunun aldığı doz sınırlanabilir hale geldi. Postoperatif radyoterapi sonrası relaps 60 Gy doz uygulanmasına rağmen çoğunlukla lokal olarak tümör yatağında olmaktadır. Bu nedenle tercih edilen üç boyutlu planlama ile tümör yatağına verilen dozun artırılması mümkün hale gelmektedir(53).

Ancak konformal tedaviye geçildikten sonra ilk zamanlarda doz eskalasyonunun yararı pek çok çalışmaya konu oldu. Teknoloji geliştikçe ek doz verilmesi mümkün hale geldi. Ancak bu durumun sağkalımı artırmadığı gözlemlendi. Lee ve ark. nın yaptığı doz eskalasyon çalışmasında 70 Gy'den 90 Gy'ye kadar doz artırıldı. 90 Gy' de toksisite görülmemekle birlikte dozun artırılması ile genel sağkalım avantajı gösterilemedi. Takip görüntülemelerinde, 90 Gy uygulanan olguların dahi %91' inde nüksler eski tümör alanı veya tedavi alanı içinde bulundu (75).

2.2.8.2.4. Yoğunluk Ayarlı Radyoterapi (IMRT)

Klasik lineer akseleratörün modifikasyonu ve bir bilgisayar programı ile gross tümör alanı ve potansiyel mikroskopik yayılım alanına simultane olarak farklı dozların uygulanması mümkündür (53).

Bir çalışmada radyasyona sensitif dokular korunurken gross tümöre 80 Gy uygulanabilmiştir. Bu faz I çalışmada doz eskalasyonuna devam edilmektedir. Ancak lokal tümör progresyonu halen sorun olmaya devam etmektedir ve malign gliomada uygulanılması tartışmalıdır (76).

IMRT, doz dağılımını daha iyi optimize etmeye izin veren bir yöntemdir. Teorik olarak IMRT' den fayda sağlanacak iki durum mevcuttur. Bunlardan birincisi; SSS' nde pek çok kritik organ bulunması nedeni ile, IMRT ile bu yapılara uygulanan doz azaltılarak daha uygun doz dağılımı sağlanabilir. İkincisi, SSS tümörlerinde lokal rekürrense sıklıkla rastlanır ve en önemli problemdir. IMRT heterojen volümler içindeki farklı hücre popülasyonlarına farklı dozların optimizasyonuna izin vermektedir ve bu sayede hedef volume uygulanan dozu arttırmak IMRT ile mümkün olabilmektedir. Eğer tümör biyolojisi WHO grade I menenjiom gibi homojen hücre popülasyonu gösteriyorsa, IMRT düzensiz şekilli lezyonlarda homojen doz arttırılmasını ve normal dokularda dozun düşürülmesini sağlar. Buna karşın, WHO grade IV gliomalar heterojen hücre popülasyonundan oluşur ve CTV ile karşılaştırılınca GTV' ye her fraksiyonda uygulanan doz artımı ile yapılan doz eskalasyonu daha kabul edilebilir. Genel olarak, IMRT' de en önemli avantaj düzensiz şekilli tümörleri daha konformal bir şekilde tedavi edebilmektir (2, 3).

IMRT ile normal dokuları daha iyi korumak mümkündür. Beyin tümörleri için doz sınırlaması olan yapılar optik kiazma, optik sinirler, gözler, beyin sapı, iç kulak, area postrema, tutulmamış beyin, optik korteks ve temporal loblardır. Doz sınırlaması olan yapıların tümör tarafından tutulmamış olması durumunda bu yapılara belirgin bir doz uygulanmasına ihtiyaç yoksa ve konvansiyonel tedavi planı bu yapılara kabul edilemez doz uygulanmasına sebep oluyorsa, mutlaka IMRT uygulanmalıdır. Ancak bu karar hastanın beklenen hayat süresi değerlendirilerek verilmelidir, çünkü pek çok geç yan etki tedavi bitiminden sonraki 6 aydan önce ortaya çıkmaz (3).

2.2.8.2.5. Simülasyon ve Planlama

Gross tümör volümü (GTV) ve planlanan hedef volüm (PTV) belirlemede MR ile füzyon yapılan, BT temel alınarak tedavinin planlaması tavsiye edilir. Kişiyeye özel immobilizasyon aletleri planlama ve tedavi sırasında kullanılmalıdır. Tedavi planlanmasında kullanılacak BT, tedavi pozisyonu ile aynı olacak şekilde ayarlanmalıdır. Baş pozisyonu tümörün yerine göre değişir. Kesitler 1.25 mm' den daha kalın olmamalı ve başın üstünden omuzlara kadar görüntüleme yapılmalıdır. Daha kalın kesitler optik sinir, kiazma, kohlea gibi yapıların yeterli görüntülenmesini engeller. İleri zamanlarda MR spektroskopi-perfüzyon veya PET ile RT planlaması yapılabilecektir. Ancak şu an deneysel aşamadadır (4, 53).

GTV hem GTV1 hem de GTV2'yi kapsamalıdır. GTV1 kontrast tutan lezyon, cerrahi rezeksiyon kavitesi ve ödem alanını içermelidir. PTV1 oluşturmak içinse bu volüme 2 cm marj verilir. GTV2 ise kontrast tutan lezyondur (ödem alanı hariç). PTV2 ise GTV2+2,5 cm'dir. Mikroskopik tümör yayılımını engelleyen doğal bariyerlerin olduğu bölgelerde sınırlar modifiye edilebilir (serebellum, karşı hemisfer, ventriküller, tentorium cerebri). PTV1'e 46 Gy doz 23 fraksiyonda uygulanır, ardından PTV2'ye 14 Gy doz 7 fraksiyonda uygulanır.

En çok uygulanan protokole göre alanların preoperatif görüntülemeye göre planlanması önerilir. Postoperatif görüntülemeye göre planlama yapılmasını öngören bir görüş te vardır. Glioma hücreleri beyin parankimi boyunca taşınıp tümör alanına yakın çevre dokuyu infiltre ettiği için MRG' da T2 görüntüsündeki değişikliğe marj verilerek tedavi alanına dahil edilmesi önerilir. Göz, optik sinir, kiazma, hipotalamus, beyin sapı, kohlea ve spinal kord gibi kritik yapılar alan dışına çıkarılmalıdır. Bu yapılar tolerans dozunu geçmemelidir. Tedavi alanları, tedavi volümünde homojeniteyi sağlamak ve tutulmamış beyinin o bölgesini alan dışına çıkarmak için çok alanlı olmalıdır. Bu da 3D konformal (Üç boyutlu tedavi planlama yöntemi) veya IMRT tekniği ile olabilir. Eğer tümör orta hattı geçmişse ilk PTV için paralel alanlar kullanılabilir. Karşılaştırmalı dozimetrik analizler IMRT'de kritik yapıları sakınmak için önerilir (3,5).

2.2.8.3. Glioblastomada Sistemik Tedavi

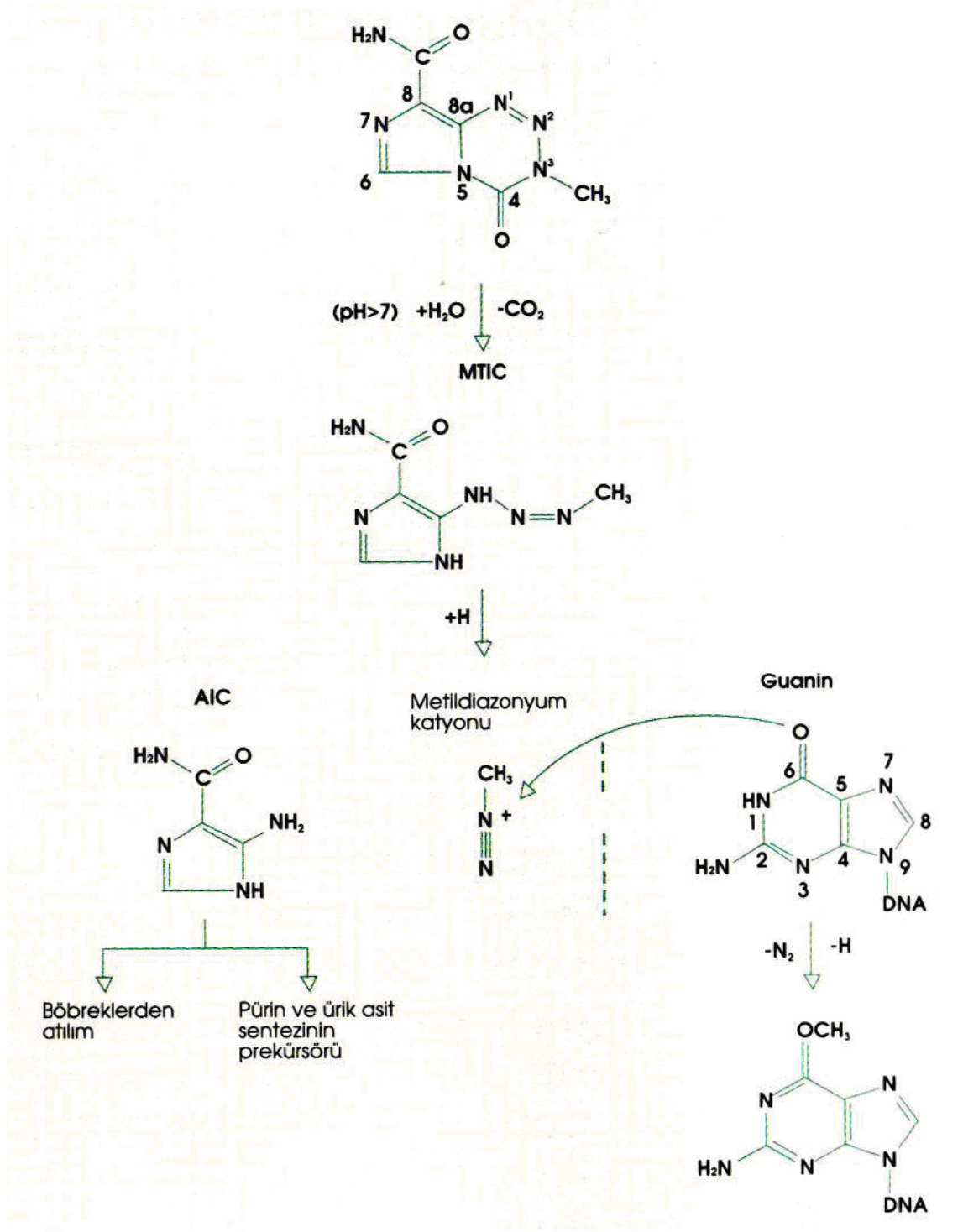
2.2.8.3.1. Steroid

Kortikosteroidler glioblastomada ilk sistemik tedavidir. Steroidlerin tedavideki en önemli rolü –radyoterapinin de katkı sağladığı- serebral ödeme bağlı semptomları azaltmaktır. Randomize çalışmalarda yüksek doz steroidlerin sağkalımı uzatmadığı saptanmış olduğundan RT uygulanırken semptomları ortadan kaldıran en düşük doz tercih edilmelidir. Kronik steroid kullanımı dispepsi, oral ve özofageal kandidiazis, myopati ve immünosupresyon gibi önemli toksisitelere yol açar. Klineberg ve arkadaşlarının bir çalışmasında oral steroid ve RT alan hastaların % 25’inde CD4 sayısı 200’ün altına düşmüştür (Sağlıklı insanda $CD4=450-1600/mm^3$). Bu da hastalarda pnömosistis karini pnömonisi gibi fırsatçı enfeksiyonlara yatkınlığı arttırır (4,53).

2.2.8.3.2. Temozolamide (TMZ)

TMZ 1980’ lerde İngiltere’ de Stevens ve arkadaşları tarafından geliştirilen bir nitroimidazol türevidir. Bir prodrug olan TMZ ikinci kuşak tek fonksiyonlu alkilleyici bir ajandır. Yanyana bağlı üç nitrojen atomu içeren bir tetrazinon halkasıyla birleşen imidazol halkasıdır. Dakarbazin ile ilişkilidir, aynı zamanda anti-tümör ilaç olan mitozolomidin 3-metil türevidir.

TMZ oral alkilleyici ajan olarak çalışır. Nötrol pH’da spontan hidrolize uğrayarak aktif formu monometil triazenoimidazole karboksamide’e (MTIC) dönüşür (77, 78). Etkisini, sitotoksik metilleyici ajan MTIC’e dönüştükten sonra gösterir. MTIC ise hemen inaktif metabolit olan 5-aminoimidozal, 4-karboksamid (AIC)’ e ve ileri derecede reaktif metil diazonium iyonuna parçalanır. Metil diazonium aktif metilleyici bir ajandır. Spontan hidroliz kanda ve dokularda pH 7’ de (fizyolojik pH) gerçekleşir. MTIC’ nin mükemmel bir biyoyararlanımı vardır ve kan-beyin bariyerini kolayca geçer (Şekil 1) (77,79).



Şekil 1. Temozolomide Etki Mekanizması

İnvivo ve invitro preklinik çalışmalarda, TMZ ‘in çeşitli tümör tiplerine etkinliği gösterilmiştir. Malign beyin tümörleri ve malign melanomada klinik etkinliği saptanmıştır. Preklinik çalışmalarda temozolomidin hücre siklusunun radyosensitif fazı olan G2/M fazını bloke ettiği ve glioblastoma hücre dizisinde radyoterapiyle eşzamanlı uygulandığı takdirde hücre gelişimini doza-bağımlı inhibe ettiği görüldü (80,81).

Konkomitan radyoterapi ve TMZ ile ilgili ilk çalışma 1997’ de Stupp ve ark tarafından yapılan 64 olguluk faz II çalışmasında 60 Gy/30 fr. doz ve radyoterapi ile eşzamanlı 75 mg/m²/gün TMZ uygulandı. Radyoterapi bitiminden sonra 6 siklus, 28 günde bir, 5 gün süreyle 150-200 mg/m²/gün TMZ uygulandı. Bu çalışmanın sonucunda medyan sağkalım 16 ay ve 24 aylık sağkalım % 31 olarak bulundu ve sağkalımı uzattığı saptandı (82). TMZ ‘in 75 mg/m²/gün dozunda günlük uygulanmasının amacı DNA onarım enzimi olan MGMT’ nin depleksyonunu sağlamak ve anti-tümör aktiviteyi artırarak sağkalımı uzatmaktı (77).

EORTC 26981/22981/NCIC’ nin 573 olguluk çalışmasında da radyoterapi ile eşzamanlı temozolomide uygulanan grupta sadece radyoterapi grubuna göre sağkalım avantajı sağlandı (14).

TMZ DNA’daki onarımını sağlayan alkil gruplarına bağlanıp DNA hasarına yol açar böylece apoptozu indükler. TMZ DNA’yı pek çok bölgesinden modifiye eden bir metilasyon ajanıdır. Özellikle tüm metilasyon olaylarının yaklaşık %90’dan sorumlu olan N7- metilguanin ve N3-metiladenini modifiye eder. Bu yapılar temel eksizyon onarım yolağıyla onarılır ve düşük sitotoksik potansiyele sahiptir (16).

TMZ’in O6-metil guanine bağlandığı mekanizma tüm metilasyon olaylarının sadece %5-10’nu oluşturur. Eğer hücre bölünmesinden önce metil grubu kaldırılamazsa, bu yapılar DNA yanlış-eşleşme onarım (MMR) yolağını tetiklemektedir ki bu oldukça sitotoksik bir olaydır (17).

2.2.8.3.2.1. O6-Metil Guanin DNA-Metil Transferaz (MGMT)

O6 metil guanin metil transferaz (MGMT) guanin O6 pozisyonunda alkilasyon ve metilasyonu hızlıca geri çeviren hücresel DNA onarım proteini olup (19), bu yolla TMZ gibi alkilleyici ajanların sitotoksik etkilerini nötröle eder.

Alkilleyici ajanların sitotoksik etkilerine karşı MGMT aktivitesinin koruyucu etkisi insan hücre serisi xenograft modeller ve MGMT transgenik farelerde gösterilmiştir (20, 83, 84).

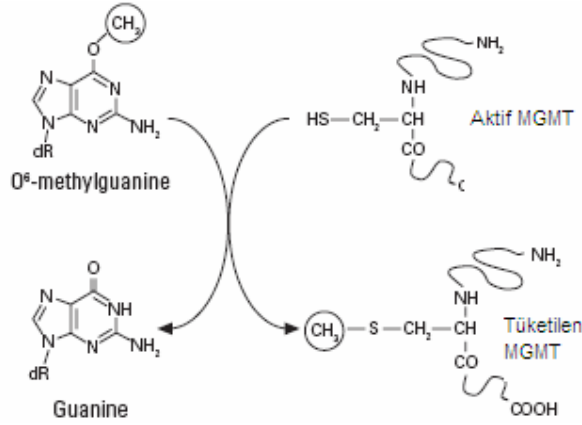
Tümör hücrelerinde MGMT aktivitesinin yüksekliği alkilleyici ajanlara direnç ile ilişkilidir (20). Buna karşın tümör hücrelerinde promoter metilasyonu sonucu MGMT geninin epigenetik sessizliği düşük MGMT ekspresyonu ile sonuçlanır (21,22). MGMT promoter metilasyonu çeşitli tümör tiplerinde görülür (23,85). Pek çok olguda MGMT geninin sessizliği gen promoter bölgesindeki sitozin-guanin dinükleotidlerdeki (CpG adaları) sitozin nükleotidlerinin metilasyonu ile ilişkilidir. 10. kromozomda lokalize MGMT' nin CpG 1, CpG 2, CpG 3 ve CpG 4, özellikle CpG 4, adalarının metilasyon durumunun, sağkalımla ilgili tahmine olanak sağladığı görüldü (86).

2.2.8.3.2.2. Alkilleyici Ajanlara Dirençte MGMT'nin Rolü

MGMT tüm normal insan dokularından sentezlenir (88). Bir DNA onarım proteini olan MGMT ile bilgilerimizin pekçoğu alkilleyici ajanlara maruziyetten sonra gözlediklerimizden oluşur (87).

MGMT aracılı onarım mekanizması tektir ve diğer DNA onarım yollarından farklıdır. MGMT onarım kompleksinin bir parçası değildir ve yalnız hareket eder. Guanin O6 pozisyonundaki metil grubunu özel olarak ayırır, böylece DNA ipliğinde kırığa neden olmadan nükleotidi doğal şekline göre onarır ve intihar enzimi olarak adlandırılır (87).

MGMT' nin aktif kısmındaki sistein rezidüsüne alkil grubunun transferi sonucu, enzim geri-dönüşümsüz olarak inaktive olur; bu nedenle enzim aktivitesini sürdürebilmek için yeni protein sentezine ihtiyaç duyar. İşlem doygun hale gelirse, DNA'daki fazla O6-metil guanin MGMT'yi tüketir (Şekil 2) (87).



Şekil 2. MGMT' nin aktif kısmındaki sistein rezidüsüne alkil grubunun transferi

Guaninin O6 pozisyonu alkilleyici ajanların genelde hedefi olmamasına rağmen, sonuçta oluşan promutajenik lezyonlar sitotoksikite ve apoptoz için önemli tetikleyicidirler. Eğer onarılmadan bırakılırsa bu modifiye guanin DNA replikasyonu sırasında sitozinle eşleşmesi gerekirken Mis-match repair (MMR) yolağını aktive eden timinle eşleşebilir. MMR ana iplikçikteki O6-metil guanini bırakıp sadece yeni sentezlenen iplikçiğe odaklanır ve düzeltir. MMR yolağı bu yanlış eşleşmeyi tamir etmeye uğraşırken yeni sentez sikluslarına girer ve tamire çalışır. Bu da DNA'nın çift zincir kırıklarına neden olur, dolayısıyla apoptotik yolları aktive eder ve hücre ölümüne neden olur (84). Alkilleyici ajanlar apoptotik yollara geçilmeden önce hücre siklusunun radyoaktif fazı olan G2 / M evresine geçişi durdurur. Bu nedenle hücre topluluğu ne kadar genişse alkilleyici ajanların anti-tümör etkinliği o kadar fazladır (80).

MMR yolağının esas rolüyle ilgili çalışmalar gösterdi ki MGMT ve MMR yolağındaki hücre kaybı metilasyon ajanlarına 100 kat daha dirençli olmayı sağlar. Ayrıca temozolamide ile glioblastoma tedavisi MMR'ye bağı MSH6 proteinin ekspresyon kaybı veya mutasyonu sonucu MMR inaktivasyonu için seçiliyor gibi görülmektedir (84).

Sonuçta temozolamide en iyi yanıt düşük MGMT seviyesi olan ve sağlam MMR yolağı olan hücrelerde görülür ve MGMT ilaç direncinin biyokimyasal modülasyonu için ideal bir potansiyel hedeftir (53,84).

TMZ 'e karşı dirençte diğer direnç mekanizması ise nükleotid eksizyonu ile onarım yoludur. Poli adenozin difosfat riboz polimeraz (PADPRP) yolunun aktivasyonunda ise temozolamide indüksiyonuyla oluşan N7-metil guanin ve N3-metil adenin ürünleri, eksizyonda onarım proteini olan PADPRP yokluğunda, DNA iplikçik oluşumunun sonlanmasına neden olur. TMZ PADPRP yolunu aktive eder aynı zamanda PADPRP inhibitörleri de TMZ 'din sitotoksitesini potansiyalize eder. Ancak halen N7-metil guanin ve O3-metil adeninin oluşturduğu lezyonların (son ürün) sitotoksitede ki rolü tam olarak bilinmemektedir (17,23).

Sonuç olarak TMZ 'e dirençten 3 temel DNA onarım mekanizması sorumludur. En önemli direnç mekanizması intrasellüler MGMT düzeyindeki artıştır. MGMT yoksunluğu olan hücrelerde ise MMR yolağının da yoksunluğu direnç oluşumunda önem kazanır. PADPRP yolunun aktivasyonu ise diğer iki mekanizmada kadar önemli olmamakla birlikte dirençte az da olsa rol oynar (17, 23, 53, 84)

2.2.8.3.2.3. MGMT Ölçümü

MGMT promoter metilasyonu değişik metodlarla ölçülebilir. Bunlar kalitatif metil-spesifik PCR (MSP), semi kantitatif metil-spesifik PCR (SQ-PCR) ve pyrosequencingdir (84,86). RNA' dan MGMT ekspresyonu ise kalitatif gerçek zamanlı PCR (Q-RT-PCR), protein seviyesi (kandaki MGMT) immünohistokimya (IHC) ve enzim aktivitesi yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile ölçülebilir (84). MSP ve pyrosequencing gende metilasyon durumunu gösterir. CpG adasındaki metilasyonu yüksek sensivite ve spesifiteyle gösterir. Küçük miktarda DNA yeterlidir ve parafinlenen bloklardan çalışılabilir (22, 23, 61, 84). Ancak fixasyon bozulmalara neden olabileceğinden MSP' de en iyi sonuç kriyo ile saklanan dokulardan sağlanır. Yeni çalışmalarda pyrosequencing yönteminin formalinle fixe parafinli dokulardan çalışmaya olanak sağladığı ve klasik jel bazlı MSP den daha iyi bir seçenek olduğu belirtildi (86).

2.2.8.3.2.4. Temozolamide'in Farmokokinetik Özellikleri

Kan beyin bariyerini kolayca geçer ve plazmada gözlenenin %40'ı merkezi sinir sistemine ulaşır. Biyoyararlanımı ise %100'e yakındır. Lipofilik bir ajan olup yarılanma ömrü 1,8 saattir ($t_{1/2} = 1,8$ saat). Oral uygulamadan 0,5-1,5 saat sonra maximum plazma konsantrasyonuna ulaşır ($t_{max}:0,5-1,5$ saat). Oral uygulamadan sonra dozun %5-10'u 24 saat içinde değişmeden idrarla atılırken, geri kalan 5-

aminoimidozal-4-karboksamid ve tayin edilemeyen polar metabolitler şeklinde atılır (23).

2.2.8.3.3. Diğer Kemoterapotik Ajanlar

Glioblastoma tedavisinde BCNU (1,3-bis-kloroetil-1-nitrozüre) 1960larda yaygın olarak kullanılmıştır ancak günümüzde standart tedavi içinde yer almaz. Karmustin ve nitrozüre ile kombine rejimlerde eskiden sıkça kullanılmıştır. Karmustine karşı belirgin bir üstünlük sağlamasa da PCV (prokarbazin, lomustin, vinkristin) de sıklıkla uygulanmıştır. Ancak TMZ uygulanmaya başladığından beri bu ajanlar yerini TMZ 'e bırakmıştır (14,89).

3. GEREÇLER VE YÖNTEM

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı, Genetik Anabilim Dalı ve Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiş olup aşağıdaki gereçler kullanıldı.

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Demirbaş Malzemeler

1. Pyromark Q 24 Cihazı (QIAGEN)
2. Santrifüj Cihazı Mikro 22 (Hettich Zentrifugen)
3. Termal Cycle PCR Cihazı CG1-96 (Corbett)
4. Soğutmalı Santrifüj Cihazı (Sigma)
5. Vorteks Cihazı (Heidolph)
6. Isıtıcı Blok TH21 (HLC Biotech)
7. Mikropipet (Gilson Eppendorf)
8. T-Shaker (Eurolone)
9. Distile Su Cihazı (Diret-Q.UV Millipore)
10. Mikrotom (Leica RM 2155)

3.1.2. Sarf Malzemeleri

1. DNA FFPE Tissue Kit (QIAamp)
2. PCR Control DNA Set (EpiTect)
3. Bisulfite Kit (EpiTect)
4. Gold Q24 Reagents (PyroMark)
5. Binding Buffer (PyroMark)
6. Denaturation Solusyonu (PyroMark)
7. Wash Buffer (PyroMark)
8. Annealing Buffer (PyroMark)
9. Q24 Plate (PyroMark)
10. PCR Kit (PyroMark)
11. Q24 CpG MGMT Kit (PyroMark)

3.2. YÖNTEM

Bu çalışmada, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda Radyoterapi ile eşzamanlı TMZ ve ardından adjuvan TMZ alan veya yalnız radyoterapi alan glioblastoma tanılı 100 olgu ele alındı.

3.2.1 Hasta Gruplarının Belirlenmesi

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı, Genetik Anabilim Dalı ve Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. 2000-2010 tarihleri arasında Patoloji Anabilim Dalı'nda glioblastoma tanısı almış ve Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda tedavisini tamamlamış 100 olgu çalışmaya dâhil edilmiştir.

Çalışmaya dâhil olan olgulara yalnız radyoterapi veya RT ile eşzamanlı ve sonrasında adjuvan TMZ tedavisi uygulandı.

RT volümü için ameliyat öncesi MRG'de T2-ağırlıklı kesitlerdeki peritümöral ödeme 1,5-2 cm marj verilerek klinik hedef volüm (CTV) belirlendi. Planlanan hedef volüm (PTV) için de klinik hedef volüme 5 mm 'lik güvenlik marjı verildi. Simülasyon ve tedavi sırasında termoplastik sabitleyici baş maskesi kullanıldı.

Total doz 60 Gy olacak şekilde 30 fraksiyonda 5 gün/hafta, 2 Gy/gün dozunda planlandı. TMZ uygulanan olgulara, radyoterapi ile eşzamanlı ve RT'den 1 saat önce 75mg/m²/gün dozunda TMZ uygulandıktan sonra radyoterapinin bitiminden 4 hafta sonra başlayacak şekilde 6 kür ilave TMZ uygulandı (150-200 mg/m²/gün, 28 günde bir, 1. günden itibaren 5 gün süreyle).

Hastaların parafin bloklanmış tümör doku örnekleri patoloji Anabilim Dalı arşivinden sağlandı.

3.2.2 Preparat Hazırlanması

3.2.2.1. Doku Kesiti Alınması (Mikrotom Cihazı)

Mikrotom cihazı blok tutucu yuvasına parafin blok kesitleri yerleştirildi. Dokunun ön yüzü bir miktar traşlanarak ana dokuya ulaşıldı. Dört mikron kalınlığında 5 kesit alınıp 2 ml'lik ependorf tüplerine yerleştirildi. Bu işlem Erciyes Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalında gerçekleştirilip geri kalan işlemler Genetik Anabilim Dalında yapıldı.

3.2.2.2. Genomik DNA İzolasyonu

Parafinli doku kesitlerinden Genomik DNA elde edilmesi için OIAamp DNA FFPE tissue kiti ve bu kite ait prosedür kullanılmıştır. DNA izolasyonu kritik bir prosedür olup aşağıda kısaca özetlenmiştir.

Prosedür:

1. Kesitlerin alındığı ependorf tüpüne 1 ml xylene eklenir ve 10 sn vortekslendi.
2. Oda sıcaklığında 2 dk 14000 rpm'de ependorf tüp santrifüj edildi.
3. Santrifüj sonrası pelet (çökeltinin) üstünde yüzen kısım (süpernatant) pipetle uzaklaştırıldı. Ancak pelete dokunulmadı.
4. Pelet üzerine 1ml saf (% 96-100) ethanol eklenir, yeniden vortekslendi.
5. Oda ısısında karışım 14000 rpm'de 1dk santrifüj edildi. Tekrar süpernatant atıldı.
6. Pelet oda ısısında (15 °-25° C) 10 dk inkübasyona bırakıldı.
7. Pelet üzerine 180 µl ATL buffer, 20 µl proteinaz-K eklenir ve vortekslendi.

8. 56°C de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
9. Ardından 90°C de 1saat daha inkübasyona bırakıldı. Süpernatantdan kurtulmak için yeniden 14 000 rpm de 1dk santrifüj edildi.
10. Pelet üzerine 200 µl buffer AL eklenip vortekslendi. Ardından 200 µl saf ethanol eklenip yeniden vortekslendi.
11. Tüm lizat dikkatlice QIAmp MinElute kolona transfer edilip kapağı kapatıldı ve 6000 x g (8000 rpm) de 1 dk santrifüj edildi. Ardından kolon temiz bir 2 ml'lik toplama tüpüne alındı. Bu aşamada Genomik DNA kolona tutunduğundan diğer hücre lizatları kolondan süzülerek toplama tüpünde birikti ve süzüntüyü içeren toplama tüpü değiştirildi.
12. QIAmp MinElute kolonu dikkatle açıp 500 µl Buffer AW1 eklendi. 8000 rpm de 1dk santrifüj edildi. Amaç kolona tutunan DNA nın daha temiz olması olduğu için yıkama işlemleri yapıldı. Her işlemde membrandan lizatın tamamen süzülmesine dikkat edildi. Her santrifüj sonrası toplama tüpü değiştirildi.
13. Kolona 500 µl buffer AW 2 eklendi. 14000 rpm'de 3dk santrifüj edilerek membranın tamamen kuruması sağlandı.
14. Bu işlemin ardından kolonda tutulu DNA üzerine 20-100 µl buffer ATL eklendi.
15. QIAamp MinElute column tüpün kapağı kapatıldı. Oda sıcaklığında 1 dk inkübasyona bırakıldı ve son kez 14000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Artık DNA kolondan süzülerek toplama tüpünde birikmişti.

3.2.2.3. Genomik DNA'ya Bisülfite Uygulanması

Genomik DNA'nın Bisülfite muamele edilmesi için QIAGEN'in Epiect-Bisulfite kiti kullanıldı.

Prosedür:

1. Kit içinden çıkan Lyofilize bisülfite tüplerine, 800 µl RNAase-sız su (steril su) ilave edilerek çözünmesi sağlandı. Karışımın tam çözülmesi için 5 dk boyunca vortekslendi.

2. Her olgunun DNA sının Bisülfite reaksiyonları 200 µl 'lik PCR tüplerine DNA 15µl, Bisülfite mix 85µl, DNA protect buffer 35µl, RNase-sız su 5µl oranlarında konularak hazırlandı.
3. PCR tüpleri kapatılıp bisülfite reaksiyonu karıştırıldı (mix). DNA' daki metillenmemiş sitozin'in bisülfite edilmesi için termal cycle (döngü) kullanıldı. Termal döngü programı yapıldı.
4. Ardından PCR tüpleri termal döngüye inkübasyon için yerleştirildi.

3.2.2.4. Bisülfite edilmiş DNA'nın Temizlenmesi

1. Bisülfite etme işlemi tamamlandıktan sonra PCR tüpleri kısa bir süre santrifüj edildi ve temiz 1,5 ml'lik mikro santrifüj tüplerine alındı.
2. 310 µl yeni hazırlanmış içinde 10 µg/ml taşıyıcı RNA, örneğe konuldu, vortekslendi ve maksimum hızda çok kısa santrifüj edildi.
3. 250 µl ethanol koyuldu. 15 s vortekslendi, kısa süre santrifüj edildi.
4. EpiTect kolonlara alınan örneklerde aynı işlemler 2. kez yapıldı ve 1 dk daha maximum hızda kolonlar santrifüj edildi.
5. Çökeltinin üstündeki kısım döküldü ve kolonlar biriktirme tüplerine yerleştirildi.
6. 500 µl Buffer BW her kolona ilave edildi ve maximum hızda 1 dk santrifüj edilip süpernatant döküldü.
7. 500 µl Buffer BD eklenip 15 dk oda sıcaklığında inkübasyon uygulandı. (15° C-25° C)
8. 1 dk boyunca maximum hızda yeniden santrifüj edilen örnek, 2 kez daha Buffer BW eklenip her defasında süpernatantta arındırıldı.
9. Kolonlardan 2 ml'lik biriktirme tüpüne alınan örnekler 1 dk boyunca kalıntı sıvıdan arındırmak için maximum hızda santrifüj edildi.
10. Kolonlar kapakları açık olacak şekilde 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı ve ısıtıcı blokta 56°C'de 5 dk inkübasyona bırakıldı.

11. Kolonlar 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alındı. 20 µl Buffer EB her membranın merkezine dağıtıldı. 15.000 x q (12,000 rpm) de 1 dk santrifüj sonucu purifiye DNA elde edildi.

3.2.2.5. PCR

Bu protokol MGMT Pyro kit kullanılarak bisülfittenmiş DNA'nın PCR amplifikasyonudur.

1. Reaksiyon karışımı hazırlanır ve 20 µl her PCR tüpüne eklendi. DNA'dan 5 µl PCR tüpüne eklendi.
2. Termal çevirici çalıştırıldı ve amplifikasyon tamamlandı.

3.2.2.6. PCR Ürünlerinin Streptavidin Sepharose Yüksek Performans Boncuklarıyla Immobilizasyonu

Bu protokol DNA'nın PyroMark Q24'te analizi yapabilir hale gelmesi için streptavidin sepharose boncuklarıyla immobilizasyonunu sağlamaktır. Bu amaçla;

1. Streptavidin Sepharose boncukları içeren şişe homojen bir solusyon haline gelene kadar çalkalandı.
2. DNA immobilizasyonu için master karışım hazırlandı.
3. 24 kuyucuk içeren PCR platedeki her kuyucuğa 70 µl master mix eklendi.
4. Her kuyucuğa 10 µl biotinlenmiş PCR ürünü eklendi.
5. PCR plate sıkıca kapatıldı.
6. Oda sıcaklığında 5-10 dk 1400 rpm'de çalkalandı.

3.2.2.7. Pyromark Q24'deki Örneklerin Pyrosekans Analizine Hazır Hale Getirilmesi

Bu protokol tek iplikçikli DNA'yı hazırlamak içindir. Pyrosekans analizi için ana DNA'larla sekans primerleri bir araya getirilir.

1. Yeteri kadar sekans primerini, Seq Primer MGMT, Pyromark Annealing Buffer içinde dilue edildi.
2. 25 µl dilue sekans primeri pyromark Q24 platedeki her kuyucuğa eklendi.
3. PCR plate pyromark Q24 plate Worktable üstüne yerleştirildi.

4. Vakum anahtarı açıldı, çalıştırıldı.
5. Vakumun filtre problemleri PCR plateye yerleştirildi ve filtre problemler hareketsiz DNA örneklerindeki boncukları yakaladı. Problemler 15 sn (Saniye) plate'in içinde tutuldu ve dikkatle kaldırıldı.
6. Vakum 40 ml %70 etanole alındı ve problemler 5 sn bekletildi.
7. 40 ml denaturasyon solüsyonuna alınan vakum ve problemler 5 sn bekletildi.
8. Vakum 50 ml'lik Wash Buffer'a alındı ve problemler 10 sn bekletildi.
9. Vakum 90 ° dik açıyla 5 sn bekletildi, böylece sıvı süzüldü.
10. Vakum saf suya alındı ve problemler 10 sn bekletildi.
11. Vakum 90 ° açıyla tutuldu ve sıvılardan arınması sağlanıp kapatıldı.
12. Pyromark Q24 plate 2 dk boyunca 80 °C'de ısıtıldı ardından oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı.

3.2.2.8. Pyromark Q24 Sistemin Çalıştırılması

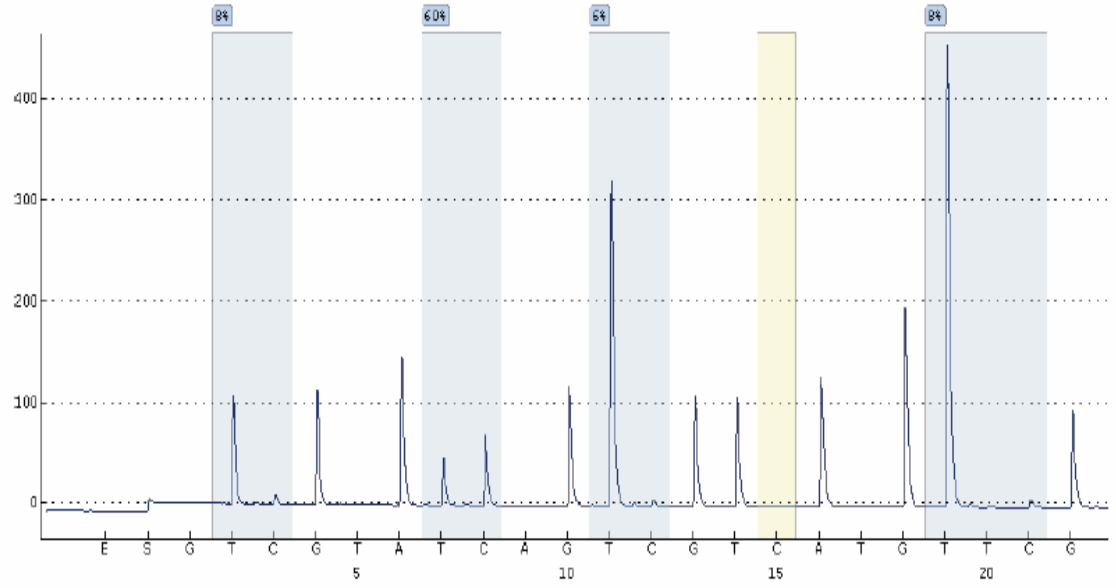
Bu protokol Pyromark gold Q24 ayıracın Pyromark Q24 Sistemine yüklenip sonuçları almamıza yardımcı olur.

1. Her bir dondurulmuş enzim ve substrat karışımı 620 µl suda eritildi.
2. Şişe yavaşça çalkalandı ama vortexlenmedi.
3. Ayıraçlar ve Pyromark Q24 kartuşların ortam ısısına gelmesi beklendi.
4. Pyromark Q24 kartuşuna uygun volumde nükleotid, enzim ve substrat karışımı yüklendi.
5. Dolu ayıraç kartuşu Pyromark Q24 kartuşuna yerleştirildi ve kartuş önü-ndeki çizgi belirginleşince kapak kapatıldı.
6. Plate ısıtıcı bloğun üstüne, plate tutan yapıya yerleştirildi.
7. USB stiği cihazın USB çıkışına takıldı (Çalıştırma dosyası taşır).
8. Ana menüden "Run" ve "ok" butonuna basıldı ve dosya cihaza aktarıldı.

3.2.2.9. Sonuçların Analizi

Sonuçların değerlendirilmesinde her dokuz hasta için bir kontrol DNA rneği kullanıldı. Kontrol DNA rneği için sağlıklı donör kanı kullanıldı. Olguların CpG1,CpG2,CpG3 ve CpG4 adalarının metilasyon durumu incelendi. CpG adalarının birinde % 10'un üzerinde timin piki olması metilasyon pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 3, Şekil 4 ve Şekil 5).

Well: A1
 Assay: MGMT
 Sample ID: 17
 Note:
 Analysis version: 2.0.6

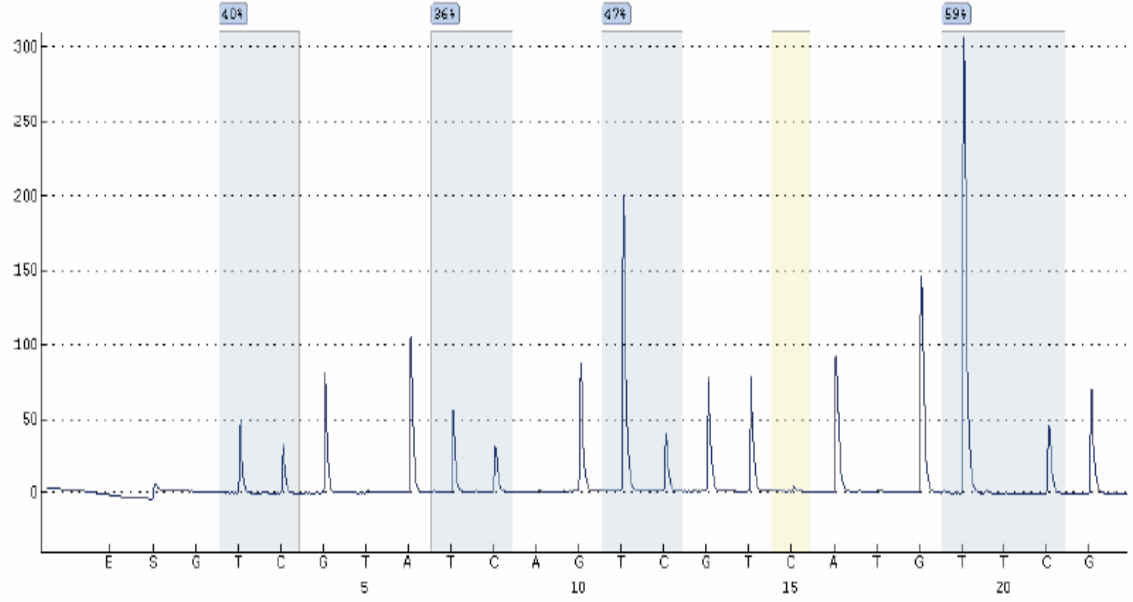


Sequence to analyze:
 YGAYGTTYG TAGGTTT YGT

Position	1	2	3	4
Quality	Passed	Passed	Passed	Passed
Meth (%)	8	60	6	8

Şekil 3. MGMT metilasyonu pozitif olgu (CpG 2 adasında % 60 pozitiflik saptandı)

Well: A5
Assay: MGMT
Sample ID: 121
Note:
Analysis version: 2.0.6

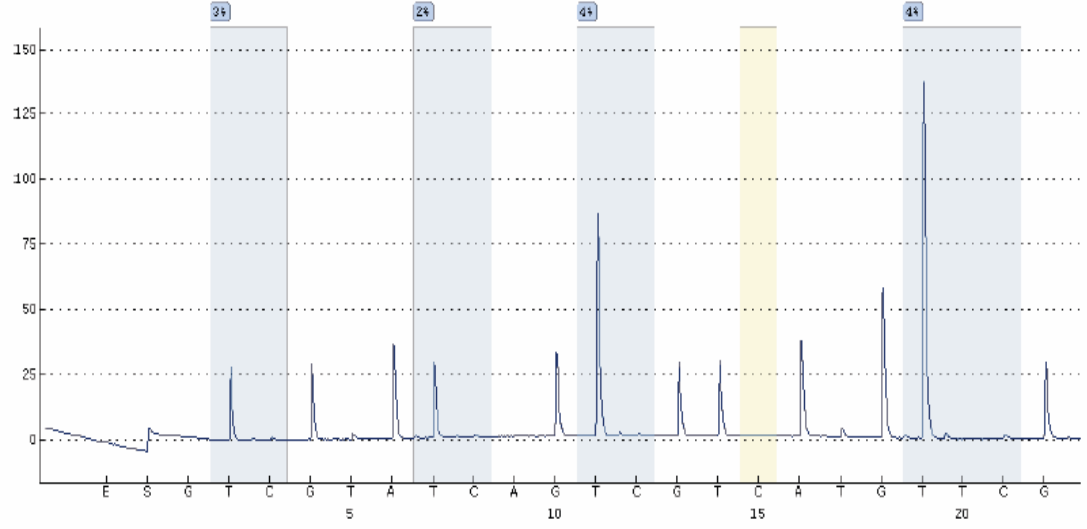


Sequence to analyze:
YGA YGT T YGT AGG TTT T YGT

Position	1	2	3	4
Quality	Passed	Passed	Passed	Passed
Meth (%)	40	36	47	59

Şekil 4. MGMT metilasyonu pozitif olgu (CpG 1 adasında % 40, CpG 2 adasında % 36, CpG 3 adasında % 47 ve CpG 4 adasında % 59 pozitiflik saptandı.)

Well: B6
Assay: MGMT
Sample ID: 97
Note: tekrar
Analysis version: 2.0.6



Sequence to analyze:
YGA³YGT²YGTAGGTTT⁴YGT

Position	1	2	3	4
Quality	Passed	Passed	Passed	Passed
Meth (%)	3	2	4	4

Şekil 5. MGMT metilasyonu negatif olgu (CpG 1 adasında % 3, CpG 2 adasında % 2, CpG 3 adasında % 4 ve CpG 4 adasında % 4 metilasyon saptandı ve olgu MGMT metilasyonu negatif olarak değerlendirildi.)

3.2.4. İstatistiksel Yöntem

Veriler SPSS 15.0 for Windows (Statistical Package for the Social Sciences) istatistik paket programında değerlendirildi. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediğine One-Sample Kolmogorov-Smirnov testi ile bakıldı. İki nitel değişkenin karşılaştırılmasında Ki-kare testi kullanıldı. Grup içinde genel sağkalımlar ve progresyona kadar geçen süreler Kaplan Meier Testi (log-rank) ile karşılaştırıldı. Cox regresyon analizi ise genel ve progresyonsuz sağkalımlar için bağımsız değişkenlerin belirlenmesi için yapıldı. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ değeri olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. GENEL BULGULAR

Toplam 100 olgunun 65 (% 65)' i erkek, 35 (% 35)' i kadın idi. Olguların 67 (% 67)' si 60 yaş altında iken, 33 (% 33) olgu 60 yaş ve üzeri idi. Tümör yerleşimi 17 (% 17) olguda frontal lob, 25 (% 25) olguda parietal lob, 17 (% 17) olguda temporal lob, 3 (% 3) olguda oksipital lob, 2 (% 2) olguda bazal ganglia, 2 (% 2) beyin sapı, 5 (% 5) olguda serebellum ve 29 (% 29)' unda multilobar idi. Olguların 96 (% 96)' sında kitle tek iken, 4 (% 4)' ünde multipl kitle mevcuttu. Tüm olguların 79 (% 79)' una total rezeksiyon, 17 (% 17)' sine subtotal rezeksiyon ve 4 (% 4)' üne biyopsi yapıldı.

Olguların 55 (% 55)' ine radyoterapi ve TMZ uygulanırken, 45 (% 45)' ine sadece radyoterapi uygulandı.

Olguların 82 (% 82)' sinde nüks görüldü. Nüks yeri 31 (% 31) olguda radyoterapi alanı içinde, 37 (% 37) olguda radyoterapi alanı dışındaydı ve 14 (% 14) olguda hem alan içinde hem de alan dışındaydı. Nüks sonrası ikinci seri tedavide; 21 (% 21) olguya sadece temozolamide, 2 (% 2) olguya sadece radyoterapi, 4 (% 4) olguya hem radyoterapi hem temozolomide uygulanırken, 73 (% 73) olguda herhangi bir tedavi uygulanmadı (Tablo 3).

Olguların medyan yaş 53 (18-73) olarak bulundu. Olgulara ait DNA örnekleri incelendiğinde MGMT promoter metilasyonu görülen olgu sayısı 52 (% 52) iken, metilasyon görülmeyen 48 (% 48) olgu mevcuttu.

Tablo 3 : Olguların genel özellikleri

ÖZELLİKLER	n (%)
Hasta sayısı	100 (% 100)
Cinsiyet Erkek Kadın	65 (% 65) 35 (% 35)
Yaş < 60 ≥ 60	67 (% 67) 33 (% 33)
MGMT Metilasyonu Görülen Görülmeyen	52 (% 52) 48 (% 48)
Tümör yerleşimi Frontal lob Parietal lob Temporal lob Oksipital lob Bazal ganglion Beyin sapı Serebellum Multilobar	17 (% 17) 25 (% 25) 17 (% 17) 3 (% 3) 2 (% 2) 2 (% 2) 5 (% 5) 29 (% 29)
Tümör sayısı Tek Multipl	96 (% 96) 4 (% 4)
Cerrahi Total rezeksiyon Subtotal rezeksiyon Biyopsi	79 (% 79) 17 (% 17) 4 (% 4)
Tedavi Radyoterapi ± Temozolomide Radyoterapi	55 (% 55) 45 (% 45)
Nüks yeri Alan içi Alan dışı Alan içi + alan dışı	31 (% 31) 37 (% 37) 14 (% 14)
İkinci seri tedavi Temozolomide Radyoterapi Radyoterapi + temozolomide Uygulanmadı	21 (% 21) 2 (% 2) 4 (% 4) 73 (% 73)

4.1.1. Genel Sağkalım Sonuçları ve Prognostik Faktörler

Tüm olgularda medyan genel sağkalım (GS) 10 ayken, hastalıksız sağkalım (HS) 6 ay olarak bulundu (Tablo 4). Cox Regresyon Testi ile sağkalımı etkileyen MGMT metilasyonu, yaş, tedavi ve cinsiyetin prognostik önemi araştırıldı.

MGMT metilasyonu olmasının HS ve GS yönünden iyi prognostik özellik olduğu saptandı (OR:1,69, %95 GA: 1,06-2,69, $p = 0.02$). Tedaviye temozolomide eklenmesinin de prognostik önemi olduğu saptandı (OR:2,06, % 95 GA: 1,29-3,29, $p = 0.002$). Glioblastomalı olguların GS ve HS sağkalımda 60 yaşın altında olmasının 60 yaş ve üzeri olmasına göre iyi prognostik özellik olduğu gösterildi (OR: 2,39, % 95 GA: 1,48-3,85, $p < 0.001$). Cinsiyetin ise prognozda etkili olmadığı görüldü (OR: 1,05, % 95 GA: 0,67-1,64, $p = 0.8$) (Tablo 5).

Tablo 4: Olguların sağkalım tablosu

SAĞKALIMLAR	MEDYAN (ay)
Genel sağkalım	10
Hastalıksız sağkalım	6

Tablo 5: Genel prognostik faktörler tablosu

ÖZELLİKLER	OR	% 95 GÜVEN ARALIĞI	p
MGMT metilasyonu görülmesi	1,69	1,06-2,69	0.02
Radyoterapi Temozolomide ilavesi	2,06	1,29-3,29	0.002
Yaş (< 60)	2,39	1,48-3,85	0.0001
Cinsiyet	1,05	0,67-1,64	0.8

4.2. MGMT Promoter Metilasyonu Görülen Olgulara Göre Bulgular

MGMT metilasyonu görülen 52 (% 52) olgunun, 23 (% 44.2)' üne radyoterapi ve TMZ, 29 (% 55.8) olguya sadece radyoterapi uygulandı.

Olguların medyan yaşı 51 (19-69) iken, 38 (% 73.1) olgu 60 yaş altı ve 14 (% 26.9) olgu 60 yaş ve üzeriydi. Bu olguların 36 (% 69.2)' sı erkek, 16 (% 30.8)' sı kadındı.

Tümör yerleşimi 11 (% 21.2) olguda frontal lob, 13 (% 25) olguda parietal lob, 8 (% 15.4) olguda temporal lob, 1 (% 1.9) olguda oksipital lob, 1 (% 1.9) olguda bazal ganglia, 1 (% 1.9) beyin sapı, 1 (% 1.9) olguda serebellum ve 16 (% 30.8)' sinda multilobar idi. Olguların 49 (% 94.2)' unda kitle tek iken, 3 (% 5.8)' ünde multipl kitle mevcuttu. Tüm olguların 41 (% 79)' ine total rezeksiyon, 7 (% 13.5)' sine subtotal rezeksiyon ve 4 (% 7.7)' üne biyopsi yapıldı.

Nüks yeri 11 (% 21.2) olguda radyoterapi alanı içinde, 21 (% 40.4) olguda radyoterapi alanı dışında ve 9 (% 17.3) olgu hem alan içinde hem de dışındaydı. Nüks sonrası ikinci seri tedavide; 15 (% 28.8) olguya sadece temozolamide, 1 (% 1.9) olguya sadece radyoterapi, 1 (% 1.9) olguya hem radyoterapi hem temozolomide uygulanırken, 35 (% 67.3) olguda herhangi bir tedavi uygulanmadı (Tablo 6).

Tablo 6: MGMT Promoter Metilasyonu Görülen Olgulara Göre Genel Bulgular

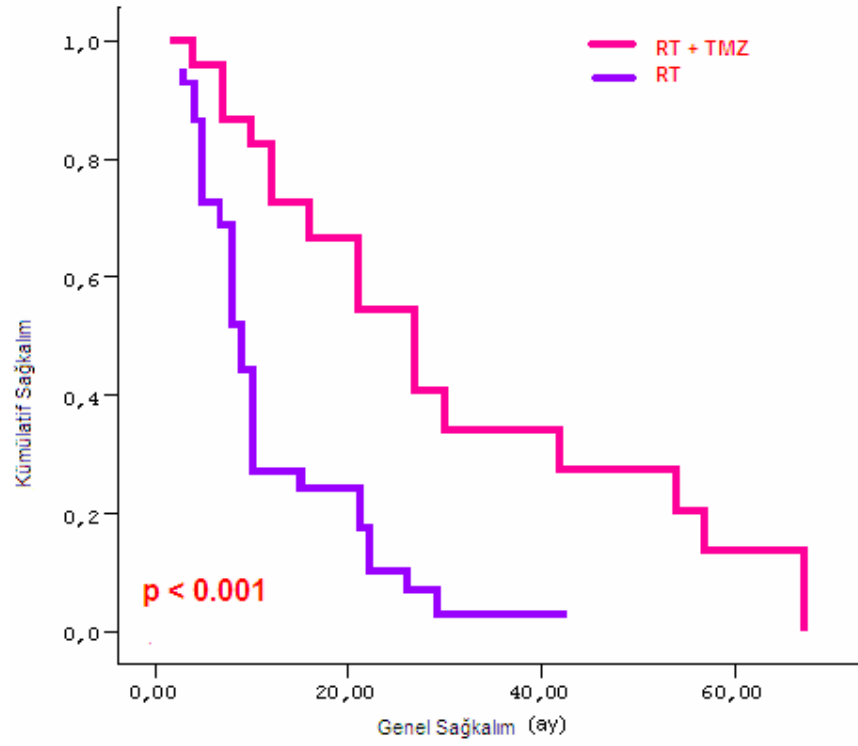
ÖZELLİKLER	n (%)
Hasta sayısı	52 (% 100)
Cinsiyet Erkek Kadın	36 (% 69.2) 16 (% 30.8)
Yaş < 60 ≥ 60	38 (% 73.1) 14 (% 26.9)
Tümör yerleşimi Frontal lob Parietal lob Temporal lob Oksipital lob Bazal ganglion Beyin sapı Serebellum Multilobar	11 (% 21.2) 13 (% 25) 8 (% 15.4) 1 (% 1.9) 1 (% 1.9) 1 (% 1.9) 1 (% 1.9) 16 (% 30.8)
Tümör sayısı Tek Multipl	49 (% 94.2) 3 (% 5.8)
Cerrahi Total rezeksiyon Subtotal rezeksiyon Biyopsi	41 (% 78.8) 7 (% 13.5) 4 (% 7.7)
Tedavi Radyoterapi ± Temozolomide Radyoterapi	23 (% 44.2) 29 (% 55.8)
Nüks yeri Alan içi Alan dışı Alan içi + alan dışı	11 (% 21.2) 21 (% 40.4) 9 (% 17.3)
İkinci seri tedavi Temozolomide Radyoterapi Radyoterapi + temozolomide Uygulanmadı	15 (% 28.8) 1 (% 1.9) 1 (% 1.9) 24 (% 67.3)

4.2.1. Sağkalım Bulguları

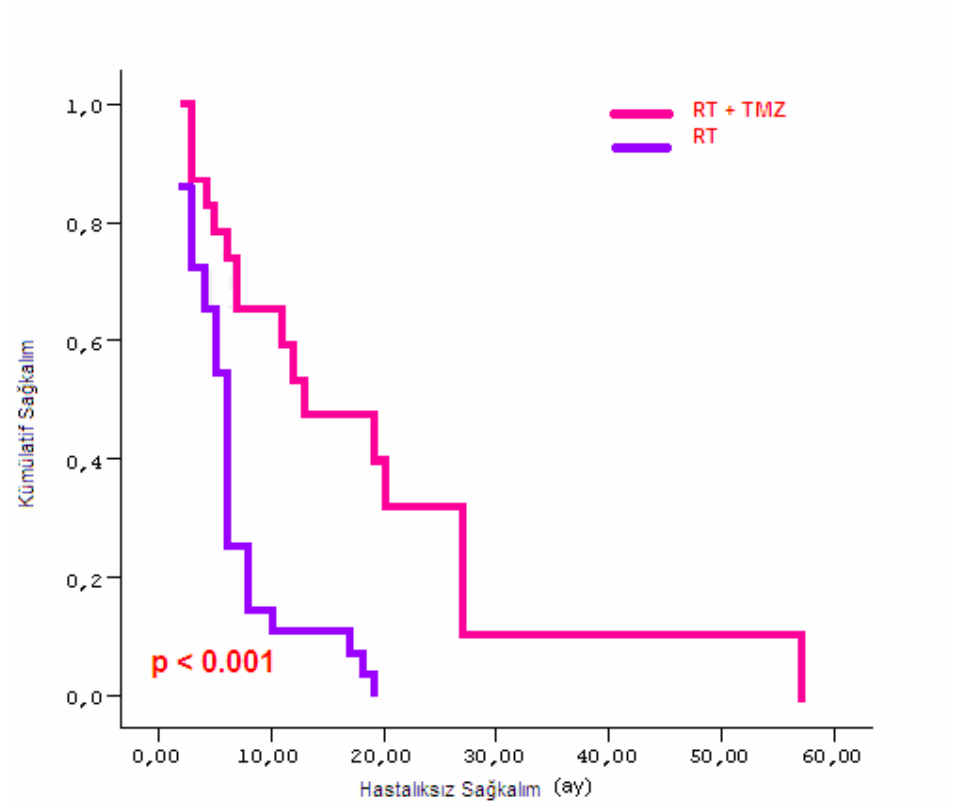
MGMT promoter metilasyonu olan 52 olguda ortalama genel sağkalım 10 ay ve progresyonsuz sağkalım 6 ay olarak bulundu.

Metilasyon görülen olgulardan radyoterapi ile TMZ uygulanan ve sadece radyoterapi uygulanan grupların genel sağkalım ve hastalıksız sağkalım değerlendirilmesi Kaplan-Meier Metodu ile yapıldı. Radyoterapi ile TMZ uygulanan ve sadece radyoterapi uygulanan grupta ortalama genel sağkalım 27 (% 95 GA: 16.91-37.08) aya karşın 9 (% 95 GA: 6.75-11.25) ay olarak bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0.001$).

Radyoterapi ile TMZ uygulanan ve sadece radyoterapi alan grupta ortalama hastalıksız sağkalım 13 (% 95 GA: 3.99-22.07) aya karşın 6 (% 95 GA: 5.19-6.81) ay olarak bulundu ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($p < 0.001$) (Tablo 7).



Şekil 6. MGMT Metilasyonu Görülen (mMGMT); RT+TMZ ve Yalnız RT alan Olgularda GS Eğrisi



Şekil 7. MGMT Metilasyonu Görülen (mMGMT); RT+TMZ ve Yalnız RT alan Olgularda HS Eğrisi

Tablo 7: MGMT Metilasyonu Görülen Olgularda GS ve HS

TEDAVİ	GS	% 95 GA	p	HS	% 95 GA	p
RT + TMZ	27	16.91-37.08	< 0.001	13	3.99-22.07	< 0.001
RT	9	6.75-11.25		6	5.19-6.81	

Ayrıca MGMT metilasyonu görülen ve radyoterapi ile TMZ uygulanan grupta 1 yıllık, 2 yıllık ve 3 yıllık genel sağkalım oranları sırasıyla % 82, % 54 ve % 34 iken sadece radyoterapi uygulanan grupta genel sağkalım oranları sırasıyla % 24, % 10 ve % 3 olarak bulundu.

4.2.2 Prognostik Faktörler

Prognostik faktörler değerlendirilirken Cox Regresyon Testi kullanıldı. MGMT metilasyonu görülen olgularda GS ve HS’da radyoterapiye eklenen TMZ ‘in prognostik önemi olduğu saptandı (OR:3.40, %95 GA: 1,66-6,98, p = 0.001). Bu olguların sağkalım analizinde 60 yaşın altında olmanın 60 yaş ve üzerinde olmaya göre iyi prognostik özellik olduğu gösterildi (OR: 1,97, % 95 GA: 0,99-3,92, p = 0.05). Cinsiyetin ise prognozda etkili olmadığı görüldü (OR: 0,78, % 95 GA: 0,40-1,52, p = 0.4) (Tablo 8).

Tablo 8: MGMT Metilasyonu Görülen Olgularda Prognostik Faktörler

ÖZELLİKLER	OR	% 95 GÜVEN ARALIĞI	p
Radyoterapiye Temozolomide ilavesi	3.40	1,66-6,98	0.001
Yaş (< 60)	1,97	0,99-3,92	0.05
Cinsiyet	0,78	0,40-1,52	0.4

4.3. MGMT Promoter Metilasyonu Görülmeyen Olgulara Göre Bulgular

MGMT metilasyonu görülmeyen 48 (% 48) olgunun, 32 (% 66.7)' sine radyoterapi ve TMZ, 16 (% 33.3) olguya sadece radyoterapi uygulandı.

Olguların medyan yaş 56 (19-73) iken, 29 (% 60.4) olgu 60 yaş altı ve 19 (% 39.6) olgu 60 yaş ve üzeriydi. Bu olguların 29 (% 60.4)' u erkek, 19 (% 39.6)' u kadındı.

Tümör yerleşimi 6 (% 12.5) olguda frontal lob, 12 (% 25) olguda parietal lob, 9 (% 18.8) olguda temporal lob, 2 (% 4.2) olguda oksipital lob, 1 (% 2.1) olguda bazal ganglia, 1 (% 2.1) beyin sapı, 4 (% 8.3) olguda serebellum ve 13 (% 27.1)' ünde multilobar idi. Olguların 47 (% 97.9)' sinda kitle tek iken, 1 (% 2.1)' inde multipl kitle mevcuttu. Tüm olguların 38 (% 79.2)' ine total rezeksiyon ve 10 (%20.8)' una subtotal rezeksiyon yapıldı.

Nüks yeri 20 (% 41.7) olguda radyoterapi alanı içinde, 16 (% 33.3) olguda radyoterapi alanı dışında ve 5 (% 10.4) olgu hem alan içinde hem de dışındaydı. Nüks sonrası ikinci seri tedavide; 6 (% 12.5) olguya sadece TMZ, 1 (% 2.1) olguya sadece radyoterapi, 3 (% 6.3) olguya hem radyoterapi hem TMZ uygulanırken, 38 (% 79.2) olguda herhangi biri uygulanmadı (Tablo 9).

Tablo 9: MGMT Promoter Metilasyonu Görülmeyen Olgulara Göre Genel Bulgular

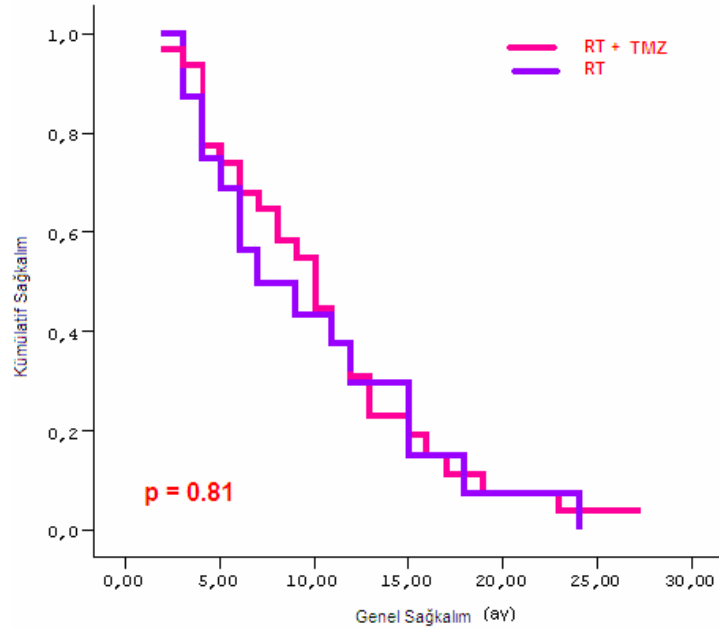
ÖZELLİKLER	n (%)
Hasta sayısı	48 (% 100)
Cinsiyet Erkek Kadın	29 (% 60.4) 19 (% 39.6)
Yaş < 60 ≥ 60	29 (% 60.4) 19 (% 39.6)
Tümör yerleşimi Frontal lob Parietal lob Temporal lob Oksipital lob Bazal ganglion Beyin sapı Serebellum Multilobar	6 (% 12.5) 12 (% 25) 9 (% 18.8) 2 (% 4.2) 1 (% 2.1) 1 (% 2.1) 4 (% 8.3) 13 (% 27.1)
Tümör sayısı Tek Multipl	47 (% 97.9) 1 (% 2.1)
Cerrahi Total rezeksiyon Subtotal rezeksiyon	38 (% 79.2) 10 (% 20.8)
Tedavi Radyoterapi ± Temozolomide Radyoterapi	32 (% 66.7) 16 (% 33.3)
Nüks yeri Alan içi Alan dışı Alan içi + alan dışı	20 (% 41.7) 16 (% 33.3) 5 (% 10.4)
İkinci seri tedavi Temozolomide Radyoterapi Radyoterapi + temozolomide Uygulanmadı	6 (% 12.5) 1 (% 2.1) 3 (% 6.3) 38 (% 79.2)

4.3.1. Sağkalım Bulguları

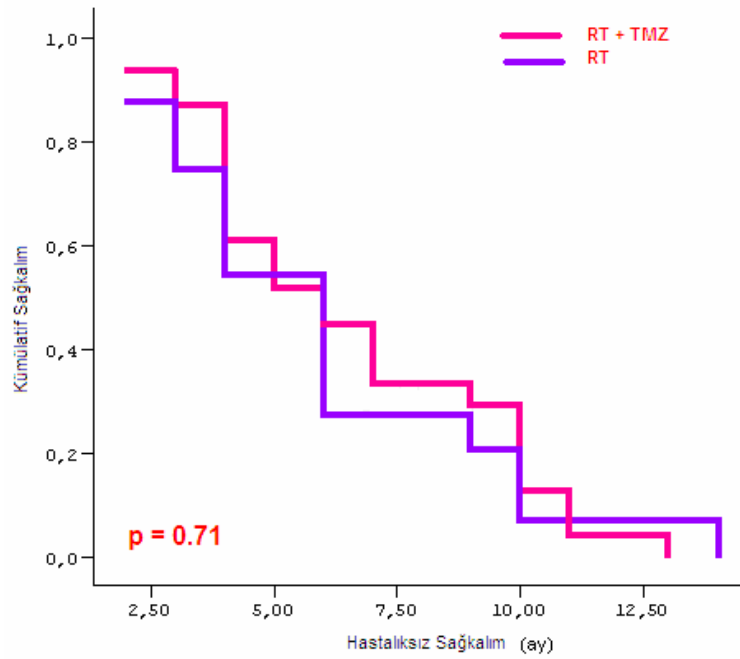
MGMT promoter metilasyonu görülmeyen 48 olguda medyan genel sağkalım 9.5 ay ve progresyonsuz sağkalım 5.5 ay olarak bulundu.

Metilasyon görülmeyen olgulardan radyoterapi ile temozolomide uygulanan ve sadece radyoterapi uygulanan grupların genel sağkalım ve hastalıksız sağkalım değerlendirilmesi Kaplan-Meier Metodu ile yapıldı. Radyoterapi ile TMZ uygulanan ve sadece radyoterapi uygulanan grupta ortalama genel sağkalım 10 (% 95 GA: 7.40-12.59) aya karşın 7 (% 95 GA: 1.12-12.88) ay olarak bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p = 0.81$).

Radyoterapi ile TMZ uygulanan ve sadece radyoterapi alan grupta ortalama hastalıksız sağkalım 6 (% 95 GA: 3.86-8.13) aya karşın 6 (% 95 GA: 4.57-7.42) ay olarak bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p = 0.71$) (Tablo 10).



Şekil 8. MGMT Metilasyonu Görülmeyen (umMGMT); RT+TMZ ve Yalnız RT alan Olgularda GS Eğrisi



Şekil 9. MGMT Metilasyonu Görülmeyen (umMGMT); RT+TMZ ve Yalnız RT alan Olgularda HS Eğrisi

Tablo 10: MGMT Metilasyonu Görülmeyen Olgularda GS ve HS

TEDAVİ	GS	% 95 GA	p	HS	% 95 GA	p
RT + TMZ	10	7.40-12.59	0.81	6	3.86-8.13	0.71
RT	7	1.12-12.88		6	4.57-7.42	

Ayrıca MGMT metilasyonu görülmeyen ve radyoterapi ile temozolomide uygulanan grupta 1 yıllık ve 2 yıllık sağkalım oranları sırasıyla % 38 ve % 3 iken sadece radyoterapi uygulanan grupta sağkalım oranları sırasıyla % 30 ve % 0 olarak bulundu.

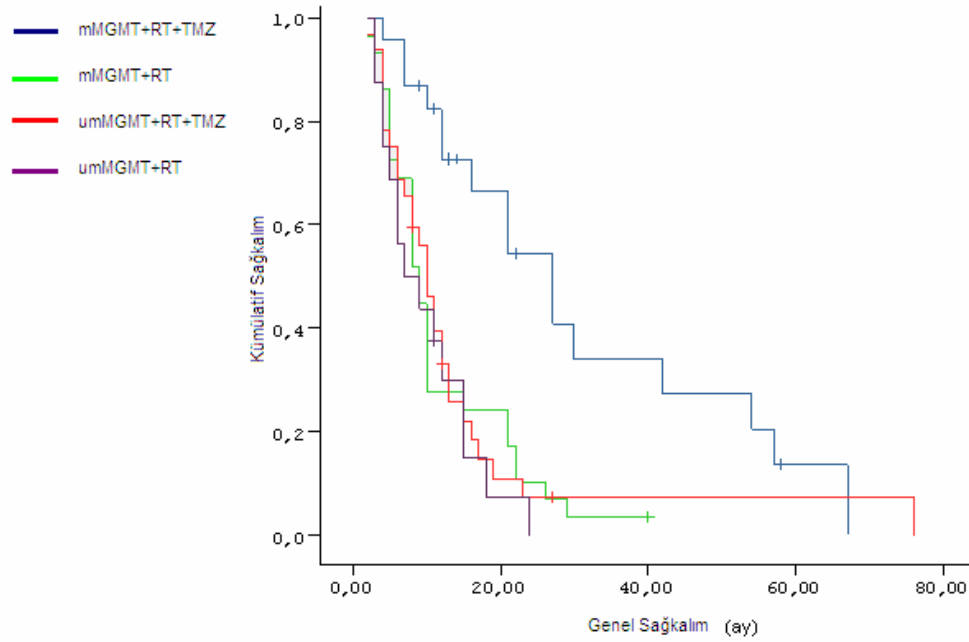
4.2.2 Prognostik Faktörler

Prognostik faktörler değerlendirilirken Cox Regresyon Testi kullanıldı. MGMT metilasyonu görülmeyen olgularda GS ve HS’da radyoterapiye eklenen temozolomidin prognostik önemi olmadığı saptandı (OR:1,16, %95 GA: 0,57-2,34, p = 0.6). Bu olguların sağkalımında 60 yaşın altının 60 yaş ve üzerine göre iyi prognostik özellik olduğu gösterildi (OR: 2,33, % 95 GA: 1,17-4,66, p = 0.01). Cinsiyetin ise prognozda etkili olmadığı görüldü (OR: 0,92, % 95 GA: 0,47-1,80, p = 0.8) (Tablo 11).

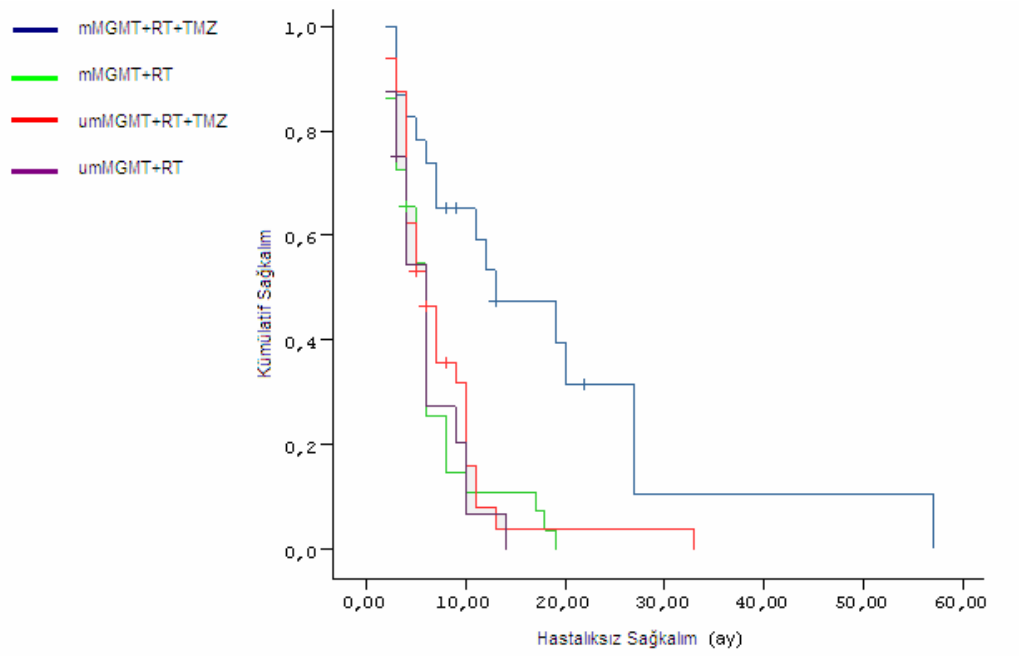
Tablo 11: MGMT Metilasyonu Görülmeyen Olgularda Prognostik Faktörler

ÖZELLİKLER	OR	% 95 GÜVEN ARALIĞI	p
Radyoterapi Temozolomide ilavesi	1,16	0,57-2,34	0.6
Yaş (< 60)	2,33	1,17-4,66	0.01
Cinsiyet	0,92	0,47-1,80	0.8

Ayrıca metile MGMT+RT+TMZ, metile MGMT+RT, unmetile MGMT+RT+TMZ ve unmetile MGMT+RT uygulanan gruplar genel sağkalım ve hastalıksız sağkalım açısından karşılaştırıldığında metile MGMT+RT+TMZ uygulanan grupla diğer gruplar arasında istatistiksel fark saptanırken (GS’ da $p<0.001$ ve HS’ da $p<0.001$) diğer grupların birbirlerine üstünlüğü istatistiksel olarak saptanmadı (Şekil 10 ve Şekil 11)



Şekil 10. Bizim çalışmamıza göre mMGMT+RT+TMZ, mMGMT+RT, umMGMT+RT+TMZ ve umMGMT+RT uygulanan olguların GS eğrisi



Şekil 11. Bizim çalışmamıza göre mMGMT+RT+TMZ, mMGMT+RT, umMGMT+RT+TMZ ve umMGMT+RT uygulanan olguların HS eğrisi

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

GBM, en sık görülen ve en agresif seyreden primer beyin tümörüdür (5). Standart tedavi yaklaşımı, mümkün olan en geniş rezeksiyon ve radyoterapi ile eşzamanlı TMZ ve ardından adjuvan TMZ tedavisidir (12,13,14). TMZ genel ve hastalıksız sağkalımı arttırmaya rağmen, yine de hastaların % 70' inde bir yıl içinde nüks gelişmektedir (14).

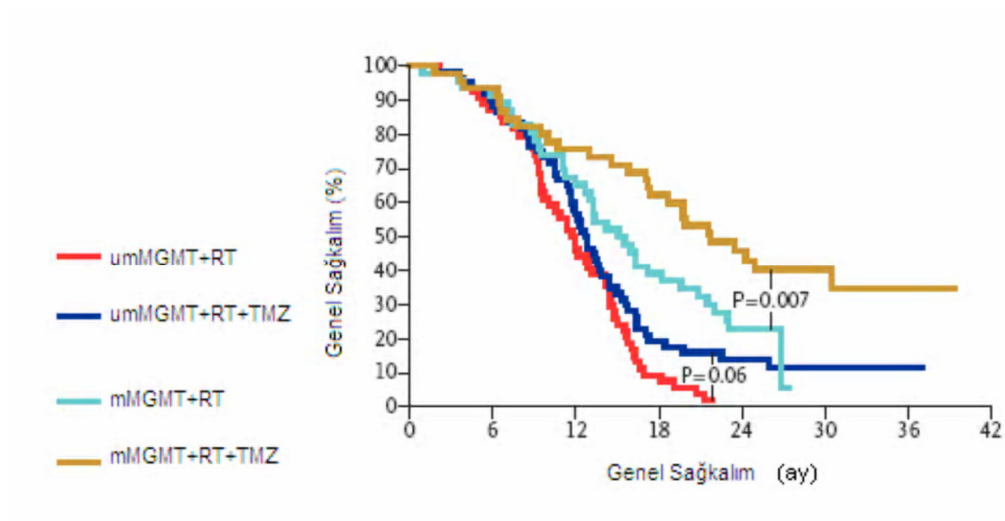
TMZ alkilleyici bir ajan olup, DNA' yı guaninin O6 pozisyonunda alkiler. Normal hücreler MGMT geni tarafından kodlanan DNA onarım proteini AGT ile TMZ' e bağlı hücre ölümünü durdurabilir. Tümör hücrelerinden bu genin ekspresyonu alkilleyici ajanlara direnç ile ilişkiliyken, DNA onarım proteini olan AGT' nin yokluğu TMZ' e duyarlılık ile ilişkilidir (18). Pek çok olguda MGMT geninin sessizliği gen promoter bölgesindeki sitozin – guanin dinükleotidlerde bulunan sitozin nükleotidlerinin metilasyonu ile ilişkili olduğu saptandı. Yeni tanı alan GBM' li olgularda MGMT metilasyon durumunun TMZ' e yanıtta güçlü bir prediktif marker olduğu gösterildi (23).

MGMT promoter metilasyonu ve temozolomide yanıt ile ilgili ilk çalışma Hegi ve ark. tarafından yapıldı. Tümör biyopsisi yapılmış radyoterapi ile eşzamanlı ve adjuvan TMZ uygulanan 38 yeni tanı almış GBM' li olgu faz II çalışmaya dahil edildi. Olguların 26 (% 68)' inde metilasyon saptanırken, 12 (% 32) metilasyon saptanmadı. Tek değişkenli analizlerde metile promoter varlığı uzun genel sağkalım ile ilişkili bulundu ($p = 0.0051$, Log Rank testi). 18 aylık sağkalım MGMT metilasyonu olan olgularda % 62 iken, metilasyon olmayan olgularda % 8' di ($p =$

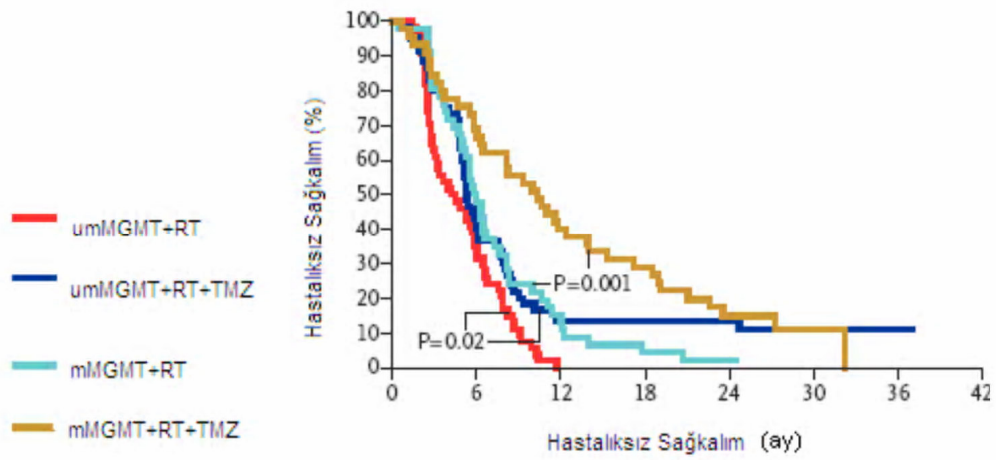
0.002). Çok değişkenli analizlerde ise yaşı ve cinsiyetin MGMT metilasyon varlığında prognozu etkilemediği saptandı (sırasıyla $p = 0.3$ ve $p = 0.2$) (61).

Hegi ve ark. tarafından yapılan 85 merkezin dahil olduğu ve EORTC/NCIC 26981 – 22981 çalışması kapsamında 206 olgunun analizinde ise olguların % 45'inde MGMT metilasyonu görüldü. MGMT metilasyonunun tedaviye bakılmaksızın bağımsız iyi prognostik faktör olduğu saptandı ($p < 0.001$). MGMT promoter metilasyonu görülen olguların değerlendirilmesinde radyoterapi ile TMZ uygulanan grupta medyan genel sağkalımın sadece radyoterapi uygulanan gruba göre anlamlı şekilde uzadığı saptandı (21.7 aya karşı 15.3 ay, $p = 0.007$). MGMT promoter metilasyonu olmayan olgularda ise radyoterapi ile TMZ uygulanan grup ve sadece radyoterapi alan grup arasında medyan genel sağkalım açısından istatistiksel olarak fark saptanmadı (12.7 aya karşı 11.8 ay, $p = 0.06$) (Şekil 10). Ayrıca MGMT promoter metilasyonu görülen olgular değerlendirildiğinde radyoterapi ile TMZ uygulanan grupta medyan hastalıksız sağkalımın sadece radyoterapi uygulanan gruba göre anlamlı şekilde uzadığı saptandı (10.3 aya karşı 5.9 ay, $p = 0.001$). MGMT promoter metilasyonu olmayan olgularda ise radyoterapi ile eşzamanlı TMZ uygulanan grup ve sadece radyoterapi alan grup arasında medyan progresyonsuz sağkalım açısından istatistiksel fark saptandı (5.3 aya karşı 4.4 ay, $p = 0.02$) (Şekil 11). 206 olguluk bu çalışmada prognostik faktörlerin değerlendirilmesi için Cox Regresyon testi kullanılarak çok değişkenli analizler yapıldı. MGMT promoter metilasyonu bağımsız prognostik faktör olarak değerlendirilirken ($p < 0.001$), yaşı ve tedaviye TMZ eklenmesi prognostik faktör olarak değerlendirilmedi (23, 89, 90).

Ancak 573 yeni tanı alan GBM' li olgunun dahil edildiği ve MGMT promoter metilasyonu bakılmayan EORTC/NCIC 26981 – 22981 çalışmasında radyoterapiye TMZ eklenmesinin, yaşı (< 60), geniş tümör rezeksiyonunun sağkalımı uzatan iyi prognostik faktörler olduğu saptandı (89).



Şekil 12. Hegi ve ark.nın çalışmasına göre mMGMT+RT+TMZ, mMGMT+RT, umMGMT+RT+TMZ ve umMGMT+RT uygulanan olguların GS eğrisi



Şekil 13. Hegi ve ark. nin çalışmasına göre mMGMT+RT+TMZ, mMGMT+RT, umMGMT+RT+TMZ ve umMGMT+RT uygulanan olguların HS eğrisi

Bu çalışmada literatürle uyumlu olarak MGMT promoter metilasyonu görülen olgular değerlendirildiğinde radyoterapi ile eşzamanlı TMZ uygulanan grupta medyan genel sağkalım ve progresyonsuz sağkalımın sadece radyoterapi uygulanan gruba göre anlamlı şekilde uzadığı saptandı (Genel sağkalımda 27 aya karşı 9 ay, $p < 0.001$; hastalıksız sağkalımda ise 13 aya karşı 6 ay, $p < 0.001$). Ayrıca MGMT promoter metilasyonu olmayan olgularda ise radyoterapi ile TMZ uygulanan grup ve sadece radyoterapi alan grup arasında medyan genel sağkalım ve hastalıksız sağkalım açısından istatistiksel fark saptanmadı (Genel sağkalımda 10 aya karşı 7 ay, $p = 0.8$; hastalıksız sağkalımda ise 6 aya karşı 6 ay, $p = 0.7$). Bizim çalışmamızda tüm olgular değerlendirildiğinde MGMT promoter metilasyonu, yaş (< 60) ve tedaviye TMZ eklenmesi bağımsız iyi prognostik faktörler olarak belirlenirken cinsiyet prognostik faktör olarak saptanmadı.

Dunn ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise 109 olgunun metilasyon durumu incelendi. Olguların tamamına radyoterapi ile eşzamanlı ve ardından adjuvan TMZ tedavisi uygulandı. MGMT metilasyonu olguların 58 (% 53.2)' inde mevcuttu. Bu çalışmada MGMT metilasyonunun genel sağkalım ve hastalıksız sağkalımı uzatan bağımsız prognostik faktör olduğu saptandı. Ayrıca cerrahi rezeksiyon genişliğinin iyi prognostik özellik olduğu ancak yaşın prognozu etkilemediği gösterildi (91).

Bu çalışmada MGMT metilasyonu görülen olgularda MGMT promoter metilasyonu, yaş (< 60) ve tedaviye TMZ eklenmesi bağımsız iyi prognostik faktörler olarak saptanırken cinsiyet prognostik faktör olarak saptanmadı.

MGMT metilasyonu görülmeyen olgularda sadece yaş (< 60) bağımsız iyi prognostik faktör olarak bulunurken, tedaviye TMZ eklenmesi, cinsiyet ve cerrahi rezeksiyon genişliği prognostik faktör olarak gösterilmedi. Cerrahi rezeksiyon genişliğinin öneminin gösterilemesinin nedeninin hastaların % 79.2' sine total rezeksiyon uygulanmış olmasından kaynaklanabileceği düşünüldü.

Cao ve ark. tarafından yapılan çok merkezli 83 olguluk çalışmada ise olguların % 36' sında MGMT metilasyonu mevcuttu. Olguların tamamına radyoterapi ile eşzamanlı ve ardından adjuvan TMZ tedavisi uygulandı. Çok değişkenli analizlerde cerrahi rezeksiyonun genişliği ($p = 0.001$) ve MGMT promoter

metilasyonu kombinasyonunun uzamış sağkalımla ilişkili olduğu saptandı (medyan sağkalım, 20.6 ay; $p = 0.006$) (92).

Tang ve ark. nın yaptığı 79 olguluk çalışmada MGMT promoter metilasyonunun genel sağkalım ve hastalıksız sağkalıma etkisi gösterilemedi (sırayla $p = 0.56$, $p = 0.6$) (93).

Esteller ve ark. nın retrospektif çalışmasında, tüm beyine radyoterapi ile birlikte değişik alkilleyici ajanlar alan 47 olgunun MGMT promoter metilasyonu incelendi. MGMT promoter metilasyonu varlığında klinik sonuçların daha iyi olduğu saptandı (94).

Paz ve ark. nın retrospektif çalışmasında ise 92 olguda MGMT promoter metilasyonu incelendi. Olgulara radyoterapi ile birlikte TMZ, prokarbazin veya BCNU uygulandı. MGMT promoter metilasyonu görülen olgularda artmış klinik cevap saptandı (95).

Shah ve ark. nın ise yaptıkları çok merkezli çalışmada 70 glioblastomalı olgu incelendi. MGMT promoter metilasyon analizinde yöntemlerin karşılaştırıldığı çalışmada olguların tamamına radyoterapi ile eşzamanlı ve ardından adjuvan TMZ tedavisi uygulandı. Bu çalışmada MGMT promoter metilasyonu ile progresyonsuz sağkalım arasında güçlü bir ilişki bulundu. Tüm olgular arasında metilasyon görülen grup için progresyonsuz sağkalım 540 gün iken metilasyon görülmeyen grup için 210 gün idi ($p < 0.0001$). Çok değişkenli analizlerde de yaşın (< 60) iyi prognostik faktör olduğu görüldü ($p = 0.05$) (85).

Karayan ve ark. tarafından yapılan çok merkezli 81 olguluk çalışmada MGMT metilasyon durumu 5 yöntemle incelendi ve yöntemlerin birbirine karşı üstünlüğü incelendi. 81 olgunun 55 (%67.9)' inde MGMT metilasyonu saptandı. Tek değişkenli analizlerde yaşın (< 61) iyi prognostik faktör olduğu saptandı ($p = 0.02$). Promoter metilasyonu çalışan tüm yöntemlerde MGMT metilasyon varlığında genel sağkalımda uzama görüldü. Ancak *pyrosequencing* yöntemi ile MGMT promoter metilasyonu görülen olgularda uzamış genel sağkalım ve progresyonsuz sağkalım ile metilasyon arasında güçlü bir bağ saptandı. Çok değişkenli analizlerde de yaşın (< 61) ve MGMT metilasyonunun (özellikle CpG4' te) genel sağkalımı uzattığı saptandı (sırasıyla $p = 0.03$ ve $p < 0.001$). Bu çalışmada asıl incelenen konu ise çalışılan yöntemdi. Kalitatif metil-spesifik PCR (MSP), semi kantitatif metil-spesifik PCR

(SQ-MSP) ve pyrosequencing yöntemleriyle MGMT promoter metilasyonuna bakılırken, immünohistokimya (IHC) ve kantitatif real-time PCR (Q-RT-PCR) ile MGMT ekspresyonu incelendi. IHC ve Q-RT-PCR ile MGMT ekspresyon durumu incelendi ve genel sağkalım ile MGMT arasında ilişki görülmedi. MGMT metilasyon durumu MSP, SQ-MSP ve pyrosequencing ile incelendiğinde ise metilasyon durumu ile genel sağkalım arasında net bir ilişki saptandı. Bu çalışmada SQ-MSP ve *pyrosequencing* yöntemlerinin daha önce Hegi ve ark. ile Esteller ve ark. nın çalışmalarında kullandığı klasik jel bazlı MSP' den daha güvenilir olduğu saptandı (86).

Dunn ve ark. tarafından yapılan çalışmada da formalinle fikse edilmiş parafine gömülü doku örneklerinde pyrosequencing yönteminin en iyi seçenek olduğu belirtildi. Bizim çalışmamızda da formalinle fikse parafine gömülü doku örnekleri mevcuttu ve pyrosequencing yöntemi kullanıldı (91).

Sonuç olarak; MGMT promoter metilasyonu glioblastomada radyoterapi ile eşzamanlı ve ardından uygulanan adjuvan TMZ tedavisine yanıtı hatta sadece radyoterapiye yanıtı etkileyen önemli bir biyomarkerdir. Ancak daha farklı tedavi yöntemleri uygulanana kadar standart tedavi radyoterapi ile eşzamanlı ve ardından adjuvan TMZ tedavisidir. Metilasyon görülmeyen olgularda TMZ tedavisine direnci azaltmak için moleküler yollara ait çalışmalar hedeflenmelidir. Klinik sonucu iyileştirmek için alternatif tedavi rejimleri uygulamaları ve tedavi yanıtı belirlenmesi için de prospektif geniş olgu sayısı olan çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKÇA

1. Shaw EG, Debinski W, Robbins ME. Central Nervous System Tumors, In. Gunderson LL, Tepper JE, eds Clinical Radiation Oncology, 2' nd edition. Philadelphia; Elsevier Churchill Livingstone, 2007; 457-493
2. Siker ML, Donahue BR, Vogelbaum MA, Tome WA, Gilbert ML, Mehta MP. Primer Intracranial Neoplasms, In. Halperin EC, Perez CA, Brady LW, eds Principles and Practice of Radiation Oncology, 5' th edition. Philadelphia; Wolters-Lippincott, 717-751; 2008
3. Stieber VW, McMullen KP, Munley MT, Shaw E. Central Nervous System Tumors, In. Levitt SH, Purdy JA, Perez CA, Vijayakumar S, eds Technical Basis of Radiation Therapy, 4' th edition. Berlin; Springer, 425-453; 2006
4. Donahue BR. Adult Gliomas, In. Lu JJ, Brady LW, eds Radiation Oncology An-Evidence Based Approach, 1' th edition. Berlin; Springer, 483-501; 2008
5. Woo SY. Central Nervous System, In. Cox JD, Ang KK, eds Radiation Oncology, 9' th edition. Philadelphia; Mosby Elsevier, 835-875; 2010
6. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E : CA Cancer J Clin. 2010 Sep-Oct;60(5):277-300; 2010

7. Shaw EG, Seiferheld W, Scott C, et al: Ethnic Differences in Survival of Glioblastoma (GBM): A Secondary Analysis of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) Recursive Partitioning Analysis (RPA) Database. *Neurooncology* 5:296; 2003
8. Winger MJ, Macdonald DR, Cairncross JG. Supratentorial anaplastic gliomas in adults. The prognostic importance of extent of resection and prior low-grade glioma. *J Neurosurg.* 71(4):487-93; 1989
9. Black PM. Brain tumor. Part 2. *N Engl J Med.* 324(22):1555-64; 1991
10. Black PM. Brain tumors. Part 1. *N Engl J Med.* 324(21):1471-6; May 23 1991
11. Eoli M, Menghi F, Bruzzone MG, et al. Methylation of O6-methylguanine DNA methyltransferase and loss of heterozygosity on 19q and/or 17p are overlapping features of secondary glioblastomas with prolonged survival. *Clin Cancer Res.* 13:2606–2613; 2007
12. Sanai N, Berger MS (2009) Operative techniques for gliomas and the value of extent of resection. *Neurotherapeutics* 6: 478–486.
13. Walker MD, Green SB, Byar DP, Alexander E, Batzdorf U, et al. (1980) Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *The New England Journal of Medicine* 303: 1323–1329.
14. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, et al. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England Journal of Medicine* 352: 987–996.
15. Weiler M, Hartmann C, Wiewrodt D, Herrlinger U, Gorlia T, et al. (2009) Chemoradiotherapy of newly diagnosed glioblastoma with intensified temozolomide. *International Journal of Radiation Oncology, biology, physics* 77: 670–676.

16. Trivedi RN, Almeida KH, Fornsglio JL, et al: The role of base excision repair in the sensitivity and resistance to temozolomide-mediated cell death. *Cancer Res* 65:6394-6400; 2005
17. Liu L, Taverna P, Whitacre CM, et al: Pharmacologic disruption of base excision repair sensitizes mismatch repair-deficient and -proficient colon cancer cells to methylating agents. *Clin Cancer Res* 5:2908-2917; 1999
18. Belanich M, Pastor M, Randall T, Guerra D, Kibitel J, et al. (1996) Retrospective study of the correlation between the DNA repair protein alkyltransferase and survival of brain tumor patients treated with carmustine. *Cancer Research* 56: 783–788.
19. Pegg AE, Dolan ME, Moschel RC: Structure, function, and inhibition of O6 alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 51: 167-223; 1995
20. Baer JC, Freeman AA, Newlands ES, et al: Depletion of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase correlates with potentiation of temozolomide and CCNU toxicity in human tumour cells. *Br J Cancer* 67:1299-1302; 1993
21. Qian XC, Brent TP: Methylation hot spots in the 5' flanking region denote silencing of the O6- methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Cancer Res* 57:3672-3677; 1997
22. Watts GS, Pieper RO, Costello JF, et al: Methylation of discrete regions of the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) CpG island is associated with heterochromatinization of the MGMT transcription start site and silencing of the gene. *Mol Cell Biol* 17:5612-5619;1997
23. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, de Tribolet N, et al. (2005) MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *The New England Journal of Medicine* 352: 997–1003.

24. Bohnen NI, Radhakrishnan K, O' Neill BP, Kurland LT: Descriptive and analytic epidemiology of brain tumors. In Black PM, Loeffler JS eds: Cancer of Nervous System. Oxford, Blackwell Scientific Publications,1997.
25. Kleihues P, Cavanee WK: Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. Lyon, France, International Agency for Research on Cancer,1998.
26. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW: Histological Typing of Tumours of Central Nervous System. 2 nd ed. Berlin, Springer, 1993.
27. Polednak AP, Flannery JT: Brain, other central nervous system and eye cancer. Cancer 75: 330-337; 1995.
28. Scheithauer BW, Okazaki H: Atlas of Neuropathology. New York, JB Lippincott, 1988.
29. CBTRUS: Central Brain Tumor Registry of the United States Statistical Report: Primary Brain Tumors in the United States
30. Thomas TL, Stewart PA, Stemhagen A, Correa P, Norman SA, Bleecker ML, Hoover RN: Risk of astrocytic brain tumors associated with occupational chemical exposures. A case-referent study. Scand J Work Environ Health. 13(5):417-23; 1987.
31. Wrench M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. Neuro-oncol 4:278–299; 2002.
32. Jensen, S., Paderanga, D. C., Chen, P., Olson, K., Edwards, M., Iavorone, A., Israel, M. A. and Shannon, K. (1995), Molecular analysis at the NF1 locus in astrocytic brain tumors. Cancer, 76: 674–677;1995.
33. Dongyan Wang, J. Robert Grammer, Charles S. Cobbs, p125 focal adhesion kinase promotes malignant astrocytoma cell proliferation in vivo Journal of Cell Science 113, 4221-4230; 2000.

34. Zagzag D, Friedlander DR, Margolis B, Grumet M, Semenza GL, Zhong H, Simons JW, Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. Molecular events implicated in brain tumor angiogenesis and invasion. *Pediatr Neurosurg.* 33:49-55; 2000
35. Haskell H, Natarajan M, Hecker TP, Ding Q, Stewart J Jr, Grammer JR, Gladson CL. Focal adhesion kinase is expressed in the angiogenic blood vessels of malignant astrocytic tumors in vivo and promotes capillary tube formation of brain microvascular endothelial cells. *Clin Cancer Res.* 9(6):2157-65; 2003.
36. T Moulton, G Samara, WY Chung, L Yuan, R Desai, M Sisti, J Bruce and B Tycko MTS1/p16/CDKN2 lesions in primary glioblastoma multiforme. *American Journal of Pathology*, Vol 146, 613-619; 1995.
37. Ueki K, Ono Y, Henson JW, Efird JT, von Deimling A, Louis DN . CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res.* 1;56 (1):150-3; 1996.
38. Fulci G, Labuhn M, Maier D, et al. p53 gene mutation and ink4a-arf deletion appear to be two mutually exclusive events in human glioblastoma. *Oncogene* 19: 3816–22; 2000
39. Henson JW, Schnitker BL, Correa KM, von Deimling A, Fassbender F, Xu HJ, Benedict WF, Yandell DW, Louis DN. The retinoblastoma gene is involved in malignant progression of astrocytomas. *Ann Neurol.* 36(5):714-21; 1994
40. Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell.* 2;95(1):29-39; 1998.
41. Fraser MM, Zhu X, Kwon CH, Uhlmann EJ, Gutmann DH, Baker SJ. Pten loss causes hypertrophy and increased proliferation of astrocytes in vivo. *Cancer Res.* 1;64 (21):7773-9; 2004.

42. Dai C, Holland EC. Astrocyte differentiation states and glioma formation. *Cancer J.* 9(2):72-81; 2003.
43. Ono Y, Tamiya T, Ichikawa T, Kunishio K, Matsumoto K, Furuta T, Ohmoto T, Ueki K, Louis DN. Malignant astrocytomas with homozygous CDKN2/p16 gene deletions have higher Ki-67 proliferation indices. *J Neuropathol Exp Neurol.* 55(10):1026-31; 1996.
44. Hayashi Y, Ueki K, Waha A, Wiestler OD, Louis DN, von Deimling A. Association of EGFR gene amplification and CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion in glioblastoma multiforme. *Brain Pathol.* 7(3):871-5; 1997.
45. 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.* 57(7):684-9.
46. Libermann TA, Nusbaum HR, Razon N, Kris R, Lax I, Soreq H, Whittle N, Waterfield MD, Ullrich A, Schlessinger J. Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature.* 313(5998):144-7; 1985.
47. Zhu A, Shaeffer J, Leslie S, Kolm P, El-Mahdi AM. Epidermal growth factor receptor: an independent predictor of survival in astrocytic tumors given definitive irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 34(4):809-15; 1996.
48. 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.* 4(10):2383-90; 1998.

49. 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.* 93(16):1246-56; 2001.
50. Newcomb EW, Cohen H, Lee SR, Bhalla SK, Bloom J, Hayes RL, Miller DC. Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or Bcl-2 genes. *Brain Pathol.* 8(4):655-67; 1998.
51. Waha A, Baumann A, Wolf HK, Fimmers R, Neumann J, Kindermann D, Astrahantseff K, Blümcke I, von Deimling A, Schlegel U. Lack of prognostic relevance of alterations in the epidermal growth factor receptor-transforming growth factor-alpha pathway in human astrocytic gliomas. *J Neurosurg.* 85(4):634-41; 1996.
52. Oh D, Prayson RA. Evaluation of epithelial and keratin markers in glioblastoma multiforme. An immunohistochemical study. *Arch Pathol Lab Med.* 123:917-920; 1999.
53. Fiveash JB, Nordal RS, Markert JM, Ahmed RS, Nabors LB. High Grade Gliomas, In. Gunderson LL, Tepper JE, eds *Clinical Radiation Oncology*, 2nd edition. Philadelphia; Elsevier Churchill Livingstone, 457-493; 2007
54. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.* 61(3):215-25; 2002.
55. Levin A, Leibel SA, Gutin PH, Neoplasms of the Central Nervous. De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA *Cancer Principles and Practice of Oncology*. 5th ED., Philadelphia: J.B Lippincot-Raven Publishers, 1997:2022-2083.

56. Brat DJ, Scheithauer BW, Medina-Flores R, Rosenblum MK, Burger PC. Infiltrative astrocytomas with granular cell features (granular cell astrocytomas). A study of histopathologic features, grading, and outcome. *Am J Surg Pathol.* 26:750–757; 2002
57. Weingart J, Brem H. Brain Tumors and Cancers of the Central Nervous System. Neiderhuber JE. Current Therapy. First ED., Decker: Mosby- Year Book Inc, 1993: 538-546.
58. Curran WJ Jr, Scott CB, Horton J, Nelson JS, Weinstein AS, Fischbach AJ, Chang CH, Rotman M, Asbell SO, Krisch RE, et al. Recursive partitioning analysis of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group malignant glioma trials. *J Natl Cancer Inst.* 85(9):704-10; 1993.
59. Donahue B, Scott CB, Nelson JS, Rotman M, Murray KJ, Nelson DF, Banker FL, Earle JD, Fischbach JA, Asbell SO, Gaspar LE, Markoe AM, Curran W. Influence of an oligodendroglial component on the survival of patients with anaplastic astrocytomas: a report of Radiation Therapy Oncology Group 83-02. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 38(5):911-4; 1997.
60. Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402, Cairncross G, Berkey B, Shaw E, Jenkins R, Scheithauer B, Brachman D, Buckner J, Fink K, Souhami L, Laperriere N, Mehta M, Curran W. Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *J Clin Oncol.* 24(18):2707-14; 2006.
61. Hegi ME, Diserens AC, Godard S, Dietrich PY, Regli L, Ostermann S, Otten P, Van Melle G, de Tribolet N, Stupp R. Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res.* 10(6):1871-4. 2004.

62. Bello MJ, Vaquero J, de Campos JM, Kusak ME, Sarasa JL, Saez-Castresana J, Pestana A, Rey JA. Molecular analysis of chromosome 1 abnormalities in human gliomas reveals frequent loss of 1p in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer*. 57(2):172-5; 1994.
63. Watanabe K, Sato K, Biernat W, et al. Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin Cancer Res*. Apr 3(4):523-30; 1997
64. Korkolopoulou P, Christodoulou P, Kouzelis K, Hadjiyannakis M, Priftis A, Stamoulis G, et al. MDM2 and p53 expression in gliomas: a multivariate survival analysis including proliferation markers and epidermal growth factor receptor. *Br J Cancer*. 75(9):1269-78; 1997
65. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*. Dec 7 , 342(6250):705-8; 1989.
66. Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E, Hess K, Michael C, Miller D, Sawaya R. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg*. (2):190-8; 2001.
67. American Cancer Society, Cancer Facts and figures 2002 Surveillance Research, Atlanta, 2002.
68. Laws ER, Parney IF, Huang W, Anderson F, Morris AM, Asher A, Lillehei KO, Bernstein M, Brem H, Sloan A, Berger MS, Chang S; Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project. *J Neurosurg*. 99(3):467-73; 2003
69. Walker MD, Alexander E Jr, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS Jr, Mealey J Jr, Norrell HA, Owens G, Ransohoff J, Wilson CB, Gehan EA, Strike TA. Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg*. 49(3):333-343; 1978

70. Shapiro WR, Green SB, Burger PC, Mahaley MS Jr, Selker RG, VanGilder JC, Robertson JT, Ransohoff J, Mealey J Jr, Strike TA Randomized trial of three chemotherapy regimens and two radiotherapy regimens and two radiotherapy regimens in postoperative treatment of malignant glioma. Brain Tumor Cooperative Group Trial 8001. J Neurosurg. 71(1):1-9; 1989
71. Sharma RR, Singh DP, Pathak A, Khandelwal N, Sehgal CM, Kapoor R, Ghoshal S, Patel FD, Sharma SC. Local control of high-grade gliomas with limited volume irradiation versus whole brain irradiation. Neurol India. 51(4):512-7; 2003
72. Hochberg FH, Pruitt A. Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma. Neurology.;30(9):907-11; 1980
73. Wallner KE, Galicich JH, Krol G, Arbit E, Malkin MG Patterns of failure following treatment for glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 16(6):1405-9; 1989
74. Werner-Wasik M, Scott CB, Nelson DF, Gaspar LE, Murray KJ, Fischbach JA, Nelson JS, Weinstein AS, Curran WJ Jr. Final report of a phase I/II trial of hyperfractionated and accelerated hyperfractionated radiation therapy with carmustine for adults with supratentorial malignant gliomas. Radiation Therapy Oncology Group Study 83-02. Cancer. 15;77(8):1535-43; 1996
75. Lee SW, Fraass BA, Marsh LH, Herbolt K, Gebarski SS, Martel MK, Radany EH, Lichter AS, Sandler HM. Patterns of failure following high-dose 3-D conformal radiotherapy for high-grade astrocytomas: a quantitative dosimetric study. Int J Radiat Oncol Biol Phys.43(1):79-88; 1999
76. Steiber VW, Tatter SB. A Phase I dose escalating study of intensity modulated radiation therapy (IMRT) for the treatment of glioblastoma multiforme (GBM). International Journal of Radiation Oncology * Biology * Physics Volume 60, Issue 1, Supplement , S261; 2004
77. Mirimanoff RO. The evolution of chemoradiation for glioblastoma: a modern success story. Curr Oncol Rep.8 (1):50-3; 2006

- 78.** Stevens MFG, Hickman JA, Stone R, et al. Antitumor imidazotetrazines. 1. Synthesis and chemistry of 8-carbamoyl-3-(2-chloroethyl)imidazo(5,1-d)-1,2,3,5- tetrazin-4(3H)-one, a novel broad-spectrum antitumor agent. *J Med Chem*, 27,196-201; 1984
- 79.** Stevens MF, Hickman JA, Langdon SP, et al. Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of 8-carbamoyl-3-methyl-imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin- 4(3H)-one (CCRG 81045; M & B 39831), a novel drug with potential as an alternative to dacarbazine. *Cancer Res*, 47, 5846-52; 1987
- 80.** Van Rijn J, Heimans JJ, van den Berg J, et al. Survival of human glioma cells treated with various combination of temozolomide and X-rays. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 47 (3) 779-84; 2000
- 81.** Wedge SR, Porteous JK, Glaser MG, Marcus K, Newlands ES. In vitro evaluation of temozolomide combined with X-irradiation. *Anticancer Drugs*. 8(1):92-7; 1997
- 82.** Stupp R, Dietrich PY, Ostermann Kraljevic S, Pica A, Maillard I, Maeder P, Meuli R, Janzer R, Pizzolato G, Miralbell R, Porchet F, Regli L, de Tribolet N, Mirimanoff RO, Leyvraz S. Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide. *J Clin Oncol*. 1;20(5):1375-82; 2002
- 83.** Dumenco LL, Allay E, Norton K, Gerson SL. The prevention of thymic lymphomas in transgenic mice by human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Science*. 8;259(5092):219-22; 1993
- 84.** Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, Mehta MP, Gilbert MR. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol*.;26(25):4189-99; 2008

85. Shah N, Lin B, Sibenaller Z, Ryken T, Lee H, Yoon JG, Rostad S, Foltz G. Comprehensive analysis of MGMT promoter methylation: correlation with MGMT expression and clinical response in GBM. *PLoS One*. 7;6,e16146; 2011
86. Karayan-Tapon L, Quillien V, Guilhot J, Wager M, Fromont G, Saikali S, Etcheverry A, Hamlat A, Loussouarn D, Campion L, Campone M, Vallette FM, Gratas-Rabbia-Ré C. Prognostic value of O6-methylguanine-DNA methyltransferase status in glioblastoma patients, assessed by five different methods. *J Neurooncol*. 2010; 97(3):311-22; 2009
87. Gerson SL. Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer. *J Clin Oncol*. 1;20(9):2388-99; 2002
88. Gerson SL, Trey JE, Miller K, Berger NA. Comparison of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity based on cellular DNA content in human, rat and mouse tissues. *Carcinogenesis*. 7(5):745-9; 1986
89. Stupp R, Hegi EM, Mason WP, van den Bent JM, Taphoorn MJB, Janzer CR, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 10: 459-466; 2009
90. Gorlia T, van den Bent MJ, Hegi ME, Mirimanoff RO, Weller M, Cairncross JG, Eisenhauer E, Belanger K, Brandes AA, Allgeier A, Lacombe D, Stupp R. Nomograms for predicting survival of patients with newly diagnosed glioblastoma: prognostic factor analysis of EORTC and NCIC trial 26981-22981/CE.3. *Lancet Oncol*. 2008;9(1):29-38;2007
91. Dunn J, Baborie A, Alam F, Joyce K, Moxham M, Sibson R, Crooks D, Husband D, Shenoy A, Brodbelt A, Wong H, Liloglou T, Haylock B, Walker C. Extent of MGMT promoter methylation correlates with outcome in glioblastomas given temozolomide and radiotherapy. *Br J Cancer*. 2009 Jul 7;101(1):124-31; 2009

- 92.** Cao VT, Jung TY, Jung S, Jin SG, Moon KS, Kim IY, Kang SS, Park CS, Lee KH, Chae HJ. The correlation and prognostic significance of MGMT promoter methylation and MGMT protein in glioblastomas. *Neurosurgery*. 65(5):866-75; 875; 2009
- 93.** Tang K, Jin Q, Yan W, Zhang W, You G, Liu Y, Jiang T. Clinical correlation of MGMT protein expression and promoter methylation in Chinese glioblastoma patients. *Med Oncol.*; 2011.
- 94.** Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med*. 9;343(19):1350-4; 2000
- 95.** Paz MF, Yaya-Tur R, Rojas-Marcos I, Reynes G, Pollan M, Aguirre-Cruz L, García-Lopez JL, Piquer J, Safont MJ, Balaña C, Sanchez-Cespedes M, García-Villanueva M, Arribas L, Esteller M. CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas. *Clin Cancer Res*.1;10(15):4933-8; 2004

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dicle Aslan' a ait "Glioblastomalı Olgularda o6-metil guanin DNA metil transferaz promoter metilasyonunun Tedavi Cevabına Etkisi ve Prognostik Önemi" adlı çalışma, jürimiz tarafından Radyasyon Onkolojisi Ana bilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: .../.../2011

İmza

Başkan:

Prof. Dr. Bayram Kıpçık

Üye:

Doç. Dr. Sendar Seymer

Üye:

Prof. Dr. Cüneyt Çelikkaya

Üye:

Prof. Dr. İ. Suat Ökten

Üye:

Doç. Dr. Güneş Gökçe Yıldız

İmza

İmza

İmza

İmza

İmza