



T.C
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

PRİMER GLİOBLASTOMA TÜMÖRLERİNDE LONG NON CODING RNA
MALAT1'İN PROGNOSTİK ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Ömer Gökay ARGADAL

UZMANLIK TEZİ

BURSA-2019



T.C
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**PRİMER GLİOBLASTOMA TÜMÖRLERİNDE LONG NON CODING RNA
MALAT1'İN PROGNOSTİK ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Ömer Gökay ARGADAL

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Hasan KOCAELİ

BURSA-2019

İÇİNDEKİLER

Özet.....	iii-iv
İngilizce Özet.....	v-vi
Giriş	1-2
1.1. Glioblastoma Tarihçesi.....	3-4
1.2. Glioblastoma Epidemiyolojisi.....	5-7
1.3. Glioblastoma Yerleşim Yeri.....	7-8
1.4. Glioblastoma Klinik Özellikleri.....	8-9
1.5. Glioblastoma Radyolojik Özellikleri.....	9-11
1.6. Glioblastoma Patolojik Özellikleri.....	12-13
1.7. Glioblastoma Tedavisi.....	14-15
1.8. Noncoding RNA'lar ve MALAT – 1 Geni.....	15-16
Gereç ve Yöntem.....	17-22
2.1. Hastalar.....	17-18
2.2. DNA İzolasyonu.....	18-19
2.3. <i>IDH1</i> / 2 mutasyon analizi.....	19-20
2.4. RNA izolasyonu, qRT-PCR analizleri ve LncRNA MALAT1 ekspresyonu.....	20-21
2.5. İstatistiksel analiz.....	22

Bulgular.....	23-29
3.1. Hasta Özellikleri.....	23
3.2. Primer Glioblastoma'da IDH1 / 2 Mutasyonlarının Prevalansı.....	24-25
3.3. MALAT1'in Primer GB'deki Ekspresyon Profilleri.....	26
3.4. MALAT1'in <i>IDH</i> Wild Tip Primer GB'deki Ekspresyon Profilleri.....	27-29
Tartışma ve Sonuç.....	30-31
Kaynaklar.....	32-41
Teşekkür.....	42
Özgeçmiş.....	43

ÖZET

11. kromozomda bulunan kodlama yapmayan uzun RNA (long-noncoding RNA (lncRNA) MALAT1 (Metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1) geni, çeşitli moleküler sinyal yollarının modülasyonunda yer aldığı, hücre göçü ve invazyonu, bağışıklık, anjiyogenez ve tümörjenitede etkili olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda tümör yerleşimi, tümör büyüklüğü, farklılaşması ve kanser evresi gibi klinikopatolojik özelliklerle de ilişkilidir. Ayrıca, artan kanıtlar MALAT1'in tümör dokularında veya vücut sıvılarında anormal ekspresyonunun, tümör tanısı ve prognozu için bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Onkogen olarak işlev gören MALAT1'in, glioma dokularında aşırı ekspresyonunun, tümörün derecesi ve büyüklüğü ile pozitif ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, MALAT1'in özellikle homojen primer Glioblastoma (GB) hastalarının prognozundaki önemi belirsizdir. MALAT1'in anormal ekspresyonu için mevcut kanıtlara dayanarak, MALAT1'in düzensizliğinin primer GB patogenezinde kritik bir rol oynayabileceğini varsaydık. MALAT1 gibi lncRNA'ların GB'deki genetik mekanizmalarla birlikte değerlendirilmesindeki eksiklik, bu alandaki mevcut bilgiyi sınırlamaktadır. Bu nedenle, bu tez çalışmasında, *IDH*-wild tipte primer GB topluluğunda MALAT1 ekspresyon profillerini analiz etmeyi amaçladık.

Çalışmamızda MALAT1 ekspresyonunun anlamlı derecede yukarı doğru regüle olduğunu ve *IDH* wild tipi primer GB'lerde kısa genel sağkalım ile ilişkili olduğunu gösterdik. Ayrıca, MALAT1 ekspresyonunun yüksek seviyesinin bu kohortta daha genç yaş ve sol hemisferde GB lokalizasyonu ile ilişkili olduğunu bulduk. Özellikle, MALAT1 ekspresyonu, insüler lobda diğerlerine kıyasla anlamlı ölçüde artmıştı.

Sonuç olarak, primer GB'de patogenezi mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Ek olarak, şu anda GB'nin bu alt grubu için iyileştirici bir tedavi mevcut değildir. Bu nedenle, bu hastalık için yeni moleküler biyobelirteçleri veya terapötik hedefleri belirlemek önemlidir. MALAT1 ekspresyonunun çeşitli kanserlerde hayatta kalmak için bağımsız bir prognostik parametre olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda, çok değişkenli cox regresyon analizine göre, yüksek MALAT1 ekspresyon seviyesi *IDH* mutasyonları olmayan primer GB hastaları için bağımsız bir zayıf prognostik faktördür. Bu nedenle, MALAT1 primer GB hastalarında potansiyel bir prognostik belirteç ve terapötik hedef olabilir.

Anahtar kelimeler: MALAT1, Glioblastoma, gen, *IDH*, RNA, DNA, long noncoding, onkogen

SUMMARY

Investigation of The Prognostic Importance of Long Non Coding RNA MALAT1 in Primary Glioblastoma Tumors

The lncRNA (Long-noncoding RNA) MALAT1 (Metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1) gene which is located on the chromosome 11 and it is known to be involved in the modulation of various molecular signaling pathways, influencing cell migration, cell invasion, immunity, angiogenesis and tumorigenicity. It is also associated with pathological features such as tumor location, size, differentiation, and cancer staging. In addition, increased evidences illustrate that abnormal expression of MALAT1 in tumor tissues or body fluids can be used as a biomarker for tumor diagnosis and prognosis.

Overexpression of MALAT1 (which acts as an oncogene) in the glioma have been reported to be positively correlated with the degree and size of the tumor. However, the importance of MALAT1 especially in homogeneous primary Glioblastoma (GB) patients, prognosis remains uncertain. Based on available evidence for abnormal expression of MALAT 1, we have assumed that the irregularity of MALAT 1 may play a critical role in the pathogenesis of primary GB. The current lack of information in this field, is due to the hard task of evaluating the genetics mechanism of LncRNAs (MALAT1) in GB. Therefore, in this thesis we aimed to analyze MALAT1 expression profiles in the IDH-wild type primary GB population.

We demonstrate that MALAT1 expression was significantly upregulated and associated with short overall survival in *IDH* wild type primary GBs. In our study high levels of MALAT1 expression were associated

with a young age group, with the GB being localized in the left hemisphere, more precisely in the insular lobe when compared with others cohorts.

As a result, the mechanism of pathogenesis in primary GB is not yet fully understood and no treatment is available. Therefore, it is important to identify new molecular biomarkers and therapeutic targets for this devastating disease. In our study, based on multivariate COX regression analysis, high MALAT1 expression level were proven to be an independent poor prognostic factor for primary GB patients without IDH mutations. Also the release of MALAT1 plays as an independent prognostic parameter for survival within multiple cancers, including primary GB, where it will serve as a prognostic marker and therapeutic target.

Keywords: MALAT1, Glioblastoma, gene, IDH, RNA, DNA, long noncoding, oncogen

GİRİŞ

Glioblastoma (GB); erişkinlerde sık görülen, agresif bir primer beyin tümörüdür (1). Histopatolojik özelliklerin tanımlanmasında belirgin nükleer atipi ve mitotik aktivite yanında mikrovasküler endotelial proliferasyon ve nekrotik aktivite yer almakta olup, evre olarak Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) beyin tümörleri sınıflandırmasında seviyesi en yüksek puan olan evre 4'tür (2). En sık görülen merkezi sinir sistemi tümörü olan meningiomlardan sonra 2. sırada GB (%30.7) gelmektedir. Tüm malign primer merkezi sinir sistemi tümörlerinin % 19.3'ünü GB oluşturmaktadır (3).

GB'ler, de novo mutasyon sonucu oluşan primer GB'ler ve düşük dereceli veya anaplastik astrositomlardan oluşan sekonder GB'ler olarak iki alt gruba ayrılmaktadırlar (4). Bu GB alt tipleri, farklı genetik yollardan gelişerek, farklı yaşlarda hastaları etkilerler ve prognozda ve tedaviye yanıtta farklılıklar gösterirler. Primer GB'ler yaşlı hastalarda görülür ve tipik olarak EGFR aşırı ekspresyonu, PTEN (MMAC1) mutasyonları, CDKN2A (p16) delesyonları ve daha az sıklıkta MDM2 amplifikasyonu gösterirler. Sekonder GB'ler ise daha genç hastalarda gelişir ve genellikle tespit edilebilir en erken değişiklik olarak TP53 mutasyonları içermektedirler (5). Primer ve sekonder GB'lerde bir takım farklı genetik değişiklikler tespit edilmiştir, ancak bu tümörlerin ayırt edilmesi için en sık kullanılan değişiklikler izositrat dehidrojenazdaki (IDH) mutasyonlardır (6). Birçok çalışma IDH mutasyonlarının sekonder GB'de (>% 80) primer GB'lere kıyasla (<% 5) daha sık meydana geldiğini göstermiştir ve bu daha iyi bir prognozla da ilişkilendirilmiştir (7). IDH1 mutasyonu, sekonder GB'nin prognozu için kesin bir tanısal moleküler belirteçtir; bununla birlikte, primer GB ve IDH mutasyonlarının birlikteliğinin prognoz üzerindeki etkisi belirsizliğini korumaktadır. Günümüzde, epigenetik düzenlemeler IDH mutasyonları ile birlikte olduğunda, GB'li hastalarda prognozun düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (8). Bu epigenetik mekanizmalardan birisi de, kodlayıcı olmayan (noncoding) RNAlar olarak tanımlanan 200'den büyük nükleotit

sayılarına sahip uzun kodlayıcı olmayan (long noncoding) RNA'ları (LncRNA'lar) içerir (9). LncRNA'lar, birçok hücrel mekanizma sürecinde, transkripsiyon ve translasyonda, epigenetik mekanizmalarda ve kanser hücrelerinin diğer fizyolojik aktivitelerinde düzenleyici bir rol oynamaktadır. LncRNA'ların ekspresyon seviyelerinin düzensizliği, beyin tümörleri de dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde tümör büyümesi, hücre proliferasyonu, hücre göçü ve metastaz gibi birçok hücrel sürece etki etmektedir (8). LncRNA'ların farklı olan ekspresyon paternleri, beyin tümörlerinde tanısal ve prognostik biyobelirteçler ve farmasötik hedefler olarak görev yapabileceği düşünülmektedir (10). Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde 11q13 kromozomunda yer alan metastaza bağlı akciğer adenokarsinom transkripsiyon 1 (MALAT1) keşfedilmiş ve bu LncRNA'nın solid tümör metastazına teşvik ettiği bulunmuştur (8). MALAT1; tümör hücrelerinin saldırganlığı ile ilgili genlerin düzenlenmesiyle ilişkilidir (9). Onkogen olarak işlev gören MALAT 1, kısmen tümör hücrelerinin invaziv özelliklerini indüklemektedir (10). Glioma dokularında MALAT1 aşırı ekspresyonunun, tümörün derecesi ve büyüklüğü ile pozitif ilişkili olduğu bildirilmiştir (9). Son çalışmalar, MALAT1'in, gliomalar dahil olmak üzere, çeşitli tümör hücrelerinde en belirgin şekilde düzenlenmiş LncRNA'lardan biri olduğunu bildirmiştir (11-13). Bununla birlikte, MALAT1'in özellikle homojen primer GB hastalarının prognozundaki önemi belirsizdir. MALAT1'in anormal ekspresyonu için mevcut kanıtlara dayanarak, MALAT1'in düzensizliğinin primer GB patogenezinde kritik bir rol oynayabileceğini varsaydık. MALAT1 gibi LncRNA'ların GB'deki genetik mekanizmalarla birlikte değerlendirilmesindeki eksiklik, bu alandaki mevcut bilgiyi sınırlamaktadır. Bu nedenle, bu tez çalışmasında, IDH-wild tipte primer GB topluluğunda MALAT1 ekspresyon profillerini analiz etmeyi amaçladık.

1. Genel Bilgiler

1.1. Glioblastoma Tarihçesi

Tarihte ilk primer beyin tümörleri ifadesi İngiliz otopsi raporlarında kullanılmıştır ve 1800'de Berns ve 1804'te Abernety tarafından merkezi sinir sisteminde tümör oluşumları tanımlanmıştır. İlk kapsamlı histomorfolojik açıklama 1865'de Rudolf Virchow tarafından yapılmış, glial orjinli tümörler olarak isimlendirilmiştir. Virchow, tümörlerin histolojik özelliklerini, normal beyin dokusuyla karşılaştırarak, iki gruba ayırmıştır. Bu grupları da, düşük dereceli gliomalar (MSS tümörlerinin 2016 WHO sınıflandırmasına göre I. ve II. derece) ve yüksek dereceli gliomalar (MSS tümörlerinin 2016 WHO sınıflandırmasına göre III. ve IV. derece) olarak adlandırmıştır (12,14). 1914 yılında Mallory, bu tümörler için spongioblastoma multiform terimini kullanılmıştır (16). 1926 yılında Percival Bailey ve Harvey Cushing bu terimi glioblastoma multiforme olarak değiştirerek, mevcut 2016 WHO sınıflandırmasının dayandığı modern glioma sınıflandırmasının temelini oluşturmuşlardır. Daha ayrıntılı tanımlama ise daha sonra Zülch, Russell ve Rubinstein tarafından yapılmıştır (17-19). Alman nöropatolog Hans-Joachim Scherer 1930'larda, gliomların morfolojik özelliklerini tanımlamıştır. Araştırmalarına dayanarak, GB ve astrositomun aynı öncü hücreyi paylaştığı ve bazı astrositomların zaman içinde GB'ye ilerleyebileceği sonucuna varmıştır. Bir ifadesinde "Biyolojik ve klinik açıdan astrositomlardan gelişen sekonder glioblastomları primer glioblastomdan ayırt etmek gerekir. Bunlar muhtemelen uzun klinik süre ile uyumlu glioblastomlardır" diyerek GB'leri klinik ve histopatolojik bulgulara göre iki alt gruba ayıran ilk kişi olmuştur (20,21).

20. yüzyılın ikinci yarısında, yeni morfolojik ve morfolojik olmayan tanı yöntemlerinin kullanılmasına rağmen, serebral gliomalar alanındaki araştırmalar yavaşlamıştır. Multiforme terimi de kaldırılarak ve bu en habis primer beyin tümörü GB olarak adlandırılmaya başlanmıştır (14). Bu dönemdeki en büyük yeniliklerse, GFAP, S100, Vimentin ve sürekli pozitif

reaksiyon veren ve genellikle GB ve MSS metastatik lezyonlarının ayırıcı tanısında yardımcı olan immünohistokimyasal (IHC) işaretleyicilerin tanımlanmasıdır. Primer GB ve sekonder GB'lardaki bazı spesifik mutasyonlar da bu süreçte tanımlanmıştır (22-24).

Günümüzde, GB'nin başlaması, ilerlemesi ve hatta tekrarı için en yaygın olarak kabul edilen hipotez, glijenik kanser kök hücrelerinde gelişen mutasyon birikimi kavramını içermekte ve bu alanda araştırmalar sürmektedir (25). En güncel olarak da, 2016 WHO (Dünya Sağlık Örgütü) Merkezi Sinir Sistemi Tümörlerinin Sınıflandırılmasına göre; diffüz astrositik ve oligodendrogliyal tümörler kategorisinde, GB evre IV olarak sınıflanmaktadır (26).

1.2. Glioblastoma Epidemiyolojisi

GB'nin ortalama insidans hızı, Amerika Birleşik Devletleri verilerine göre 3.19 / 100.000 kişidir (27,28). GB insidansı ülkelere ve bölgelere göre de farklılık göstermektedir. Yunanistan'da 3.69 / 100.000 kişi iken, bu oran Güney Kore'de 0.59 / 100.000 kişi olarak görülmektedir. (Tablo 1.2.1). Ülke sınırları içerisinde bölgelere göre de farklı insidanslar mevcuttur. ABD'nin kuzeydoğu bölgelerinde insidans 3.9 / 100.000 kişi iken, güney bölgelerinde insidans 2.9 /100.000 kişi olarak bildirilmiştir. Kafkasyalılarda ise Afrikalılar ve Afro-Amerikalılara göre 2.0 kat yüksektir, Asya ve Kızılderililer de ise insidans düşüktür ve beyaz ırk siyah ırka göre 2 katı daha fazla etkilenmektedir (3,28,29,30,31,32).

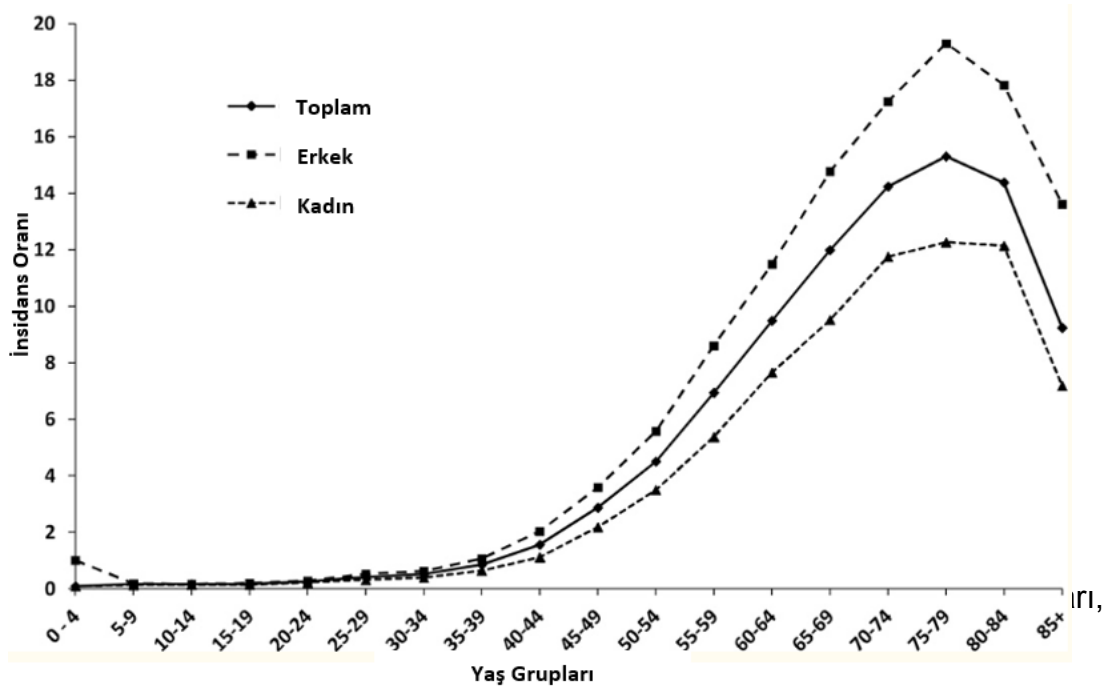
TABLO 1.2.1: GB hastalarının ülkelere göre insidansları

Ülke	Çalışma Yılı	İnsidans Hızı
Amerika Birleşik Devletleri	2006-2010	3.19
Avustralya	2000-2008	3.4
İngiltere	1999-2003	2.05
Kore	2005	0.59
Yunanistan	2005-2007	3.69
Ürdün	2012-2013	0.89

GB insidansında coğrafi asimetric dağılımların nedenleri henüz anlaşılammıştır. Bunun için GB etyolojisinde birçok genetik ve çevresel faktör araştırılmıştır ancak bunların çoğunluğu sporadiktir ve GB'lerin büyük bir kısmını oluşturan risk faktörü henüz tanımlanamamıştır (33,34).

GB insidansı erkeklerde 3.97 / 100.000 kişi iken, kadınlardan 2.53 / 100.000 kişidir, yani erkeklerde kadınlardan 1.57 kat daha sık görülmektedir. GB'un yerleşim yerine göre cinsiyet-insidans karşılaştırıldığında sadece serebellar bölge GB'ları kadınlarda daha siktir, supratentorial tüm lokalizasyonlardaki GB'ler ve omurlik yerleşimli GB'ler ise erkeklerde daha

sıktır (28,35,36). Primer, sekonder GB ayrı ayrı değerlendirildiğinde, primer GB'ler erkeklerde daha sık görülürken (oran 1 : 0.33), sekonder GB'ler kadınlarda daha sık görülmektedir (oran 0.65 : 1) (37). Teşhis yaşı da, primer GB'ler için (median tanı yaşı 64), sekonder GB'lerden (median tanı yaşı 40) daha yüksek olma eğilimindedir (38). GB insidansı yaşla birlikte artmakta ve 75 ile 84 yaşları arasında pik yapmaktadır ve 0-19 yaş arası çocuklarda çok nadir görülmektedir (Şekil 1.2.1) (39).



ŞEKİL 1.2.1: GB insidansının yaş gruplarına göre dağılımı görülmektedir.

Sağkalım süresi yaş ile ters orantılıdır. GB tanısı konan tüm hastaların % 5'i ancak 5 yıl yaşamaktadır ve bu ölçüm 65 yaş ve üzeri hastalarda % 2'ye düşmektedir (33).

Turcot sendromu, Li-Fraumeni sendromu, Nörofibromatozis, Tuberoskleroz gibi kalıtsal sendromlarda GB insidansı artmaktadır (5,40,41). Tinea kapitis için kafa derisinin düşük doz radyoterapisi ile 1950'lerde tedavi edilen 10.834 hastayı kapsayan populasyon bazlı bir çalışmada, gliomlar için

relatif risk artışı olduğu gösterilmiştir (42). Çocukluk çağında primer beyin tümörleri için yüksek dozda radyasyon uygulanan ve uzun süreli sağ kalanlar arasında gliomlar için risk artışı olduğu gösterilmiştir. Tanısal taramaların radyasyon dozu bir risk faktörü olarak yeterli değildir (43). Cep telefonu kullanımı gliomagenez açısından yoğun olarak çalışılmış, ancak kesin bir ilişki bildirilmemiştir (44). Beynin iyonlaştırıcı ışınlanması, GB gelişimi için bilinen en önemli risk faktörü olarak kabul edilmektedir (45). GB hastalarında, psoriasis, astım ve diğer alerjilere bağlı gen polimorfizmi araştırılmıştır. Astım, egzema, psoriasis gibi atopik hastalıklar ve alerji riskini artıran genotipler azalmış GB riski ile ilişkili bulunmuştur. Kısa süreli (10 yıldan az) anti-enflamatuvar ilaç kullanımı da GB'e karşı koruyucu bir etki ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (46,47).

1.3. Glioblastoma Yerleşim Yeri

GB'ler %95 oranında supratentoryal bölgede (frontal, temporal, parietal ve oksipital loblar) yerleşirler, serebellumda nadir görülürler ve omurilikte çok daha nadir görülürler (34,48,49). GB'nin optik sinir kaynaklı olabildiği de bildirilmiştir (50). Supratentoryal bölge GB'ları en sık frontal lobda yerleşirler, ardından temporal ve parietal loblarda yerleşmektedir (35). Serebellar GB'ler, nadiren yetişkinlerde görülür ve tüm GB'lerin % 0,4–3,4'ünü oluştururlar (46,51). GB'ler lokalizasyonuna göre farklı davranışta bulunmaktadır. Serebellar yerleşimli GB'ler, supratentoryal bölge GB'leriyle kıyaslandığında daha genç hastalarda (supratentorial GB'de medyan yaş 64, serebellar GB'de medyan yaş 50) ve siyah ırkta daha sık görülmektedir. Ayrıca tanı anında da boyutları supratentorial GB'lere göre daha küçüktür. Serebellar yerleşimli GB'lerde, diğer GB yerleşim yerleri ile karşılaştırıldığında daha kötü sağkalım öngörülmektedir (52). Ek olarak, supratentoryal GB'ler için kabul edilen tedavi protokolleri ve prognostik faktörler varken , serebellar GB'lerde bu faktörler iyi tanımlanmamıştır (53,54). Omurilik GB'leri, diğer lokalizasyonların aksine daha genç hastalarda görülmektedir, tanı yaş ortalaması 27'dir ve %41'i 18 yaşından küçükken tanı

almıştır. Spinal GB'lerin % 42.2'si torakal bölgede, ardından % 29.7 servikal bölgede ve %14 konüs düzeyinde bildirilmiştir (36). GB hücrelerinin leptomeningeal yayılması da nadirdir ve hastalığın geç evrelerinde ortaya çıkar, ancak daha genç hastalardan oluşan bir seride % 14'e varan sıklıkta görülmüştür (55,56). Leptomeningeal yayılımın genç yaş, erkek cinsiyeti, tümörde rezüdü kalması, çoklu rezeksiyonlar, tümörün ventriküler sisteme yakınlığı ve 1p36 delesyonu ilişkisi olduğu bildirilmiştir (57,58). GB'lerden kaynaklanan uzak organ metastazı da görülebilmektedir, bu organlar akciğer, plevra, lenf bezleri, kemik ve karaciğerdir, ancak bu durumlar nadirdir (59).

1.4. Glioblastoma Klinik Özellikleri

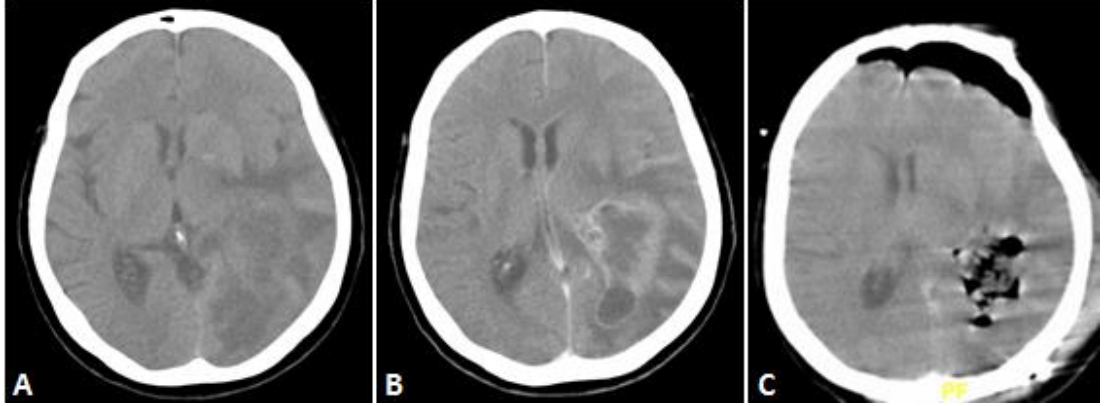
GB'ler, beyin parankimi invazyonu, beyin sıkışması, beyin omurilik sıvısı (BOS) tıkanması (hidrosefali), herniasyon dahil olmak üzere farklı şekillerde beyin anatomisinin ve sisteminin değişmesine yol açarak farklı mekanizmalarla nörolojik semptomlara neden olmaktadır (60). GB'lerde en sık görülen semptom baş ağrısıdır. Diğer belirtiler arasında nöbet geçirme, bilişsel mental değişiklikler, konuşma güçlüğü, bulantı ve kusma, nöromotor fonksiyon kayıpları, 3. ve 6. sinir tutulumları sayılabilir. GB'nin yerleşim yeri ve invazyon alanına göre farklı fokal bulgular da görülebilmektedir (61). GB'de baş ağrısı % 29,4 tek taraflı, % 49,0 bilateral olduğu bildirilmiştir ve tipik olarak donuk, acı veren veya atımlı olarak tanımlanmıştır. Bu hastaların yaklaşık yarısında baş ağrısı 4 saatten uzun sürmekte ve uzun sürenlere bulantı ve kusma daha sık eşlik etmektedir (62). GB'nin yer kaplayıcı etkisine bağlı intrakranial basınç artışı sonucu gelişen baş ağrısı genel olarak bilateral hissedilirken, lokal olarak meninkslerin irritasyonunu sonucu gelişen baş ağrısı ise tek taraflı olarak hissedilir ve tümörün yerleşim yeri ile ağrı yeri ilişkilidir (63). Nöbet ise en sık temporal ve frontal lob GB'lerinde görülmektedir (61). Bölgesel semptomlar da tümörün lokalizasyonu hakkında bilgi verir. Pariyatel lob tümörlerinde hemipleji, hemiparazi, agrafi, afazi, agnozi; temporal lob tümörlerinde amnezi, auralı nöbetler ve hallusinasyonlar; frontal lob tümörlerinde anosmi, kişilik değişiklikleri, olfaktor

duyu değişimleri, oksipital lob tümörlerinde ipsilateral homonim hemianopsi şeklinde görme alanı kayıpları görülebilir (63). Teşhis sırasında ortaya çıkan belirti ve semptomlar; hastalığın ilerlemesine bağlı olarak ve kullanılan ilaçlara göre zamanla iyileşebilir, daha kötüleşebilir veya zamanla sabitlenebilir (64).

1.5. Glioblastoma Radyolojik Özellikleri

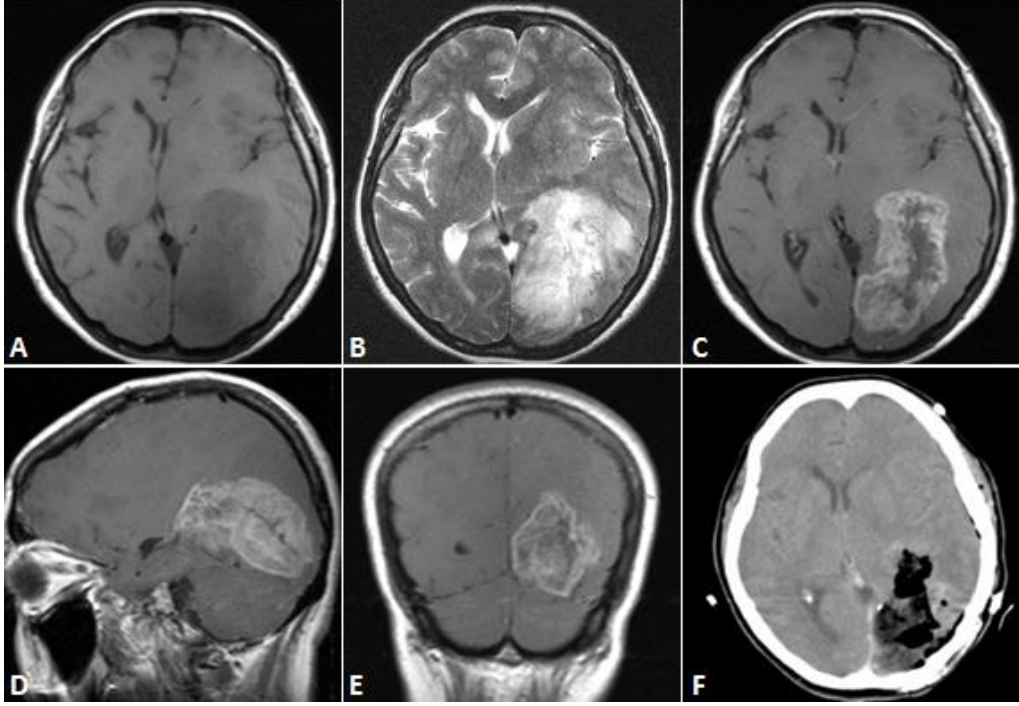
Nörogörüntüleme yöntemleri olarak Bilgisayarlı Tomografi (BT) ve MRG beyin ve omurilik lezyonların tanısında standart görüntüleme yöntemi olarak kullanılmaktadır. BT/MRG glial tümörler hakkında noninvazif olarak bilgi sağlar ve ayrıca tedavi süresinde ve takibinde önemli yer tutarlar. MRG ve BT gibi geleneksel görüntüleme teknikleri, morfolojik bilgiler ortaya koymakla birlikte, tümörün biyolojisi ve etkinliği hakkında daha spesifik bilgilerin değerlendirilmesi için sınırlı bilgi sağlarlar (65). Kontrastlı (BT), GB'nin tipik özelliklerini saptamada MRG'ye göre daha az hassastır. Bu amaçla kullanımı, örneğin kanama şüphesi olduğunda, kalp pili veya diğer metalik implantları olanlarda MRG'nin mümkün olmadığı durumlarda sınırlıdır (2).

GB'ler; BT'de izodens veya hipodens olarak görülebilir ayrıca içerisinde kalsifikasyon alanları içerebilir. Çoğunlukla tümör bölgesinin etrafında hipodens ödem görülür. Kontrast madde enjeksiyonunu sonrası kontrast tutan bölgeler, tümör dokusunu yansıtır (Şekil-1.4.1). Bu tutulum, neovaskülarite varlığı ile ilişkilidir, yani bu bölgelerde kan beyin bariyerinin bozulması sonucudur. Kanlanmanın zayıf olduğu tümör içi bölgeler ve nekroz alanları da hipodens olarak görülürler. Ayrıca BT, cerrahi rezeksiyon sonrası da kontrol nörogörüntüleme olarak kullanılabilir (66,67).



Şekil-1.4.1: 45 yaş kadın hasta sol oksipital GB BT görüntüleri. Preoperatif Kontrastsız BT Axial kesit (A). Preoperatif Kontrastlı BT Axial kesit (B). Postoperatif kontrol BT Axial kesit (C).

MRG normal beyin anatomisini ve intraparakimial patolojileri BT'ye daha detaylı göstermektedir. Heterojen görünüme sahip olan GB'lerde; T1 ağırlıklı görüntülerde tümörün santralindeki kistik veya nekroz alanlar hipointens, daha distaldeki düzensiz sınırlı solid nodüller tümör kısımları ise izointens veya hafif hipointens görünüme sahiptir. T2 ağırlıklı görüntülerde merkezi genellikle hipointens ve çevresinde heterojen yapıda hiperintens görünümler vardır. Tümörün çevresinde parankim dokusuna ait ödem de T2 ağırlıklı görüntülemelerde hiperintens görünümündedir. Kontrastlı imajlarda da yine kan beyin bariyerinin bozulmasına bağlı olarak, solid tümöral kısımlarda kontrast tutulumları görülecektir (67-70) (Şekil-1.4.2).



Şekil-1.4.2: 42 yaş kadın hasta sol oksipital Glioblastoma. T1 ağırlıklı MR sekansı (A). T2 ağırlıklı MR sekansı (B). Kontrastlı axial MR sekansı (C). Kontrastlı sagittal MR sekansı (D). Kontrastlı koronal MR sekansı (E). Postoperatif kontrol BT axial kesit (F).

Son yıllarda, GB'leri daha detaylı karakterize etmek için ileri MRG yöntemleri giderek daha fazla kullanılmaktadır. Bunlar, dinamik duyarlılık kontrast (DSC 'dynamic susceptibility contrast'), dinamik kontrast arttırımlı (DCE 'dynamic contrast enhancement'), difüzyon tensör görüntüleme (DTI 'diffusion tensor imaging') ve MR spektroskopisi (MRS 'MR spectroscopy') gibi daha yüksek dereceli teknikleri içermektedir (72). Ayrıca pozitron emisyon tomografi (PET); prensip olarak tümör hücrelerdeki normal dışı çoğalmaya bağlı olarak artan glukoz metabolizmasını saptanmaya yardımcı bir tanı yöntemidir. Tümör metabolizmasının derecesini ve hücrelerin çoğalma hızını belirlemede, bununla birlikte nüks bir tümörü radyasyon nekrozundan ayırt etmede Single Photon Emisyon Tomography (SPECT) ve

PET kullanılabilmektedir (71,72). GB'lerin metabolizmalarının belirlenmesinde Manyetik Rezonans Spektroskopisi (MRS) de kullanılabilen bir tetkiktir (73).

1.6. Glioblastoma Patolojik Özellikleri

GB tanı anında tipik olarak büyüktür ve bir beyin lobunun çoğunu kaplayabilir. Lezyonlar sıklıkla serebral hemisferlerin subkortikal beyaz maddesinde bulunur ve en sık frontal lobda görünerek, bu lobun sınırlarını aşarak temporal lob içine uzanabilirler. Tümör infiltrasyonu sıklıkla komşu kortekse ve korpus kallozumdan kontralateral hemisfere ilerlemiştir (74). GB tümör dokusu, çevre doku ile belirgin sınır ayrımı olmayan ve bölgesel heterojenliğe sahip olması ile karakterizedir. Mitotik çoğalma yolundaki sinyallerde artış, anjiyogeneziste artış ve apoptozise karşı direnç geliştiren bu hücreler; genellikle tümörün periferik kısmında bulunurlar, merkezi tümör alanı ise esas olarak toplam tümör kütlelerinin % 80'ini oluşturan nekrotik dokudan oluşmaktadır (74,75). GB tanısız özelliği, vasküler hiperplazi ve nekrozun tümör dokusunda bulunduğu alanların varlığıdır. GB'nin bir başka özelliği de, özellikle korpus kallosum gibi miyelinli beyin yapıları boyunca veya perivasküler boşluklarda, çevresindeki beyin dokusunu hızla istila etmesidir (2,76,77).

Beyin parankimine infiltre tümör hücreleri, radyolojik taramalarda kontrastla boyanan tümör sınırının dışındaki normal beyin dokusu içine de dağılırlar. Bu uydu kanser hücreleri, tedaviden sonra lokal tümör nüksünün kaynağı olduğu düşünülmektedir, çünkü beyine infiltre hücreler primer tümör dokusunun cerrahi rezeksiyonundan kurtulurlar. GB son derece infiltratif doğasına rağmen, ne subaraknoidal boşluk ne de damar lümenini istila etme eğilimindedir ve bu nedenle uzak metastazlar, MSS içinde ve dışında nadiren bulunurlar (74,78,79).

GB en sık, MSS içindeki öncül bir lezyonun varlığı olmadan, primer GB olarak görülür. Düşük dereceli astrositomlardan gelişen sekonder GB ise

vakalarının %5'ini oluşturur. Primer lezyonlar tipik olarak tanı sırasında ortalama yaşı 62 olan yaşlı hastaları etkilerken, aksine sekonder GB'lar yaş ortalaması 45 olan daha genç hastalarda görülür (4,80,81). Primer ve sekonder GB fenotipik olarak ayırt edilemez, fakat aralarında sitogenetik farklılık vardır. İki GB alt tipi, malign transformasyonlarının farklı genetik yollardan meydana geldiğini düşündüren farklı genetik anormallikler sergilerler. Yetişkinlerde primer GB, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) aşırı ekspresyonu ve mutasyonu, kromozom 10q'nun heterozigote kaybı (LOH), fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN) geninin mutasyonu ve p16 geninin delesyonu ile ilişkilidir. P53 genindeki mutasyonlar, 10q kromozomu heterozigote kaybı (LOH) ve tümör baskılayıcı RB'yi düzenleyen yoldaki anormallikler sıklıkla sekonder GB'de bulunurlar. Genel olarak, hem primer hem de sekonder GB'deki bu genetik değişiklikler, nihayetinde etkilenen hücrelerin kontrol edilemeyen büyümesine yol açan birçok mitojenik sinyal yolunun aşırı çoğalmasına neden olurlar (4,80,82,83).

GB'nin hücresel orijini devam eden bir araştırma konusudur. Geleneksel olarak, GB'nin olgun astrositlerden oluştuğuna ve progenitör hücre belirteçlerinin ekspresyonunun malign transformasyon sürecinde farklılaşmasının bir sonucu olduğuna inanılıyordu. Bununla birlikte, son araştırmalar tümörlerin nöral kök hücrelerin veya ilgili progenitör hücrelerin malign transformasyonundan kaynaklanabileceğini göstermektedir. Bu teoriye göre, kök hücre benzeri özelliklere sahip kanser hücreleri, geniş bir proliferatif potansiyel, kendini yenileme ve multipotensite gibi klasik kök hücre özelliklerini gösterirler. Ayrıca, izole edilmiş kanser kök hücreleri, immün yetmezlikli farelere implante edildiklerinde belirgin tümörjenik davranış sergilerler; bu fenotipi taklit eden tümörlerin ortaya çıkmasına neden olurlar. Bu nedenle kanser kök hücreleri, sınırsız büyüme potansiyelleri sayesinde GB büyümesinin itici gücü olabilirler. Biriken kanıtlar, kanser kök hücrelerinin; başlangıçta kanserojen etkisi olmayan nöral kök hücrelerden veya ilgili progenitör hücrelerin soyundan geldiğini göstermektedir (74,84,85).

1.7. Glioblastoma Tedavisi

Standart GB tedavisi, cerrahi, radyoterapi ve alkile edici kemoterapiden oluşmaktadır. Günümüzde GB hastalarının kemoterapi tedavisinde yaygın olarak temozolomid (TMZ) kullanılmaktadır. Ancak TMZ'nin etkinliği hastanın O6-metil guanine-DNA metil transferaz (MGMT) gen ifadesine göre farklılık göstermektedir (2).

Mekanizma olarak alkilleyici bir ajan olan TMZ, DNA'da guanin'in O6 pozisyonuna metil grubu ekleyerek hasar oluşturur, böylece sitotoksik etki gösterir. Bu hasarlar kanser hücrelerinin G2/M hücre siklusunda durdurulmasını sağlayarak apoptosize yol açarlar (86). Ancak hastaların TMZ kemoterapisine farklı yanıt verdikleri gösterilmiştir (54). DNA tamir mekanizmasında görevli olan MGMT; yapısında bulunan sistin grubu ile DNA'da O6-guanin'ine bağlanmış olan metil grubu arasındaki kovalent bir bağı katalize ederek ve TMZ tarafından eklenen metil grubunu DNA'dan uzaklaştırarak, hastanın TMZ ve benzeri alkali ajanlara karşı direnç göstermesine yol açmaktadır (87). Bazı GB hastalarının TMZ tedavisine hiç yanıt vermediği görülmüştür. Bunun nedeni, GB hücrelerinde MGMT enziminin fazla sentezlenmesi sonucu kanser hücrelerinde meydana gelen DNA hasarının hızla tamir edilerek, tümör hücresinin TMZ ile öldürülememesidir (88). Bu hastalarda GB tedavisinin daha etkili olabilmesi için MGMT enzimini inhibe etmek hedeflenmiştir ve bu amaçla MGMT inhibitörleri geliştirilmektedir (89). MGMT'nin metilasyon yoluyla transkripsiyonel olarak sessizleşmesi, hastanın TMZ tedavisine iyi cevap vermesinde belirleyici rol oynamasına rağmen MGMT geni metile olmayan bazı hastaların da TMZ tedavisine beklenildiği şekilde yanıt vermediğini bildiren çalışmalar mevcuttur ve bu direncin mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir (90). Bu nedenle MGMT metilasyonunun GB hastalarında TMZ direncine yol açan tek mekanizma olmadığı düşünülmektedir (91).

Her ne kadar cerrahi tedavi de dahil olmak üzere çeşitli tedavi seçenekleri mevcut olsa da, adjuvan kemo- ve radyo-terapi ile birlikte, hastalığın prognozu kötüdür ve hastalar genellikle tanıdan itibaren 14-15

aylık ortalama sağkalım gösterirler (4). GB'lerde erken tanı ve tedavi, hastanın sağkalım süresinin uzatılması için önem taşır. Tanıdan hemen sonra yapılan cerrahi rezeksiyonu takiben, eř zamanlı uygulanan adjuvant radyoterapi ve kemoterapi ile ortalama yaşam süresi en fazla 18-24 aya kadar uzatılabilmektedir (92). GB'ler tedavi modalitelerindeki gelişmelere rağmen, büyük ölçüde tedavi edilemez kalmaktadır (4). Bu malign hastalığın tedavisinde karşılaşılan zorluk hem tümörün kendi doğasındaki karmaşıklıktan, hem de ilaç direncine karşı sahip olduğu sayısız mekanizmaya dayanmaktadır (88).

1.8. Noncoding RNA'lar ve MALAT 1 Geni

Teknolojik ilerlemelerle birlikte, memeli genomunun transkripsiyonel manzarası detaylı olarak gösterilebilmektedir. İnsan genomun neredeyse % 80'i RNA'ya aktarılırken, % 2'den daha azı protein kodlayan mRNA'yı ifade eder (102). RNA'ların büyük bir kısmı, herhangi bir biyolojik fonksiyonu olmadığı düşünölen transkripsiyon güröltüsü olarak nitelendirilen kodlayıcı olmayan RNA'lardır (ncRNA'lar). Genom alanındaki yeni gelişmelerle bu RNA'ların karmaşık ve çeşitli işlevleri yavaş yavaş tanımlanmaktadır (95).

NcRNA'lar, uzunluklarına göre iki gruba ayrılabilir: küçük ncRNA'lar ve uzun ncRNA'lar. Son yıllarda, uzunluğu >200 nükleotid olan uzun ncRNA'ların hayati hücreSEL fonksiyonların düzenlenmesindeki karmaşık rollerinin olduğu gösterilmiştir (96). 'Metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1' (MALAT1); iyi karakterize edilmiş uzun kodlanmayan RNA'lara (lncRNA'lar) örnektir ve çeşitli moleküler mekanizmalar yoluyla farklı biyolojik fonksiyonlar sergilemektedir. Bu yaygın lncRNA'lar arasında MALAT1, son birkaç yılda çok dikkat çekmekte ve MALAT1 ile ilgili yapılan araştırmalarda dikkate değer bir ilerleme sağlanmaktadır (95,97,98).

11. kromozomda bulunan lncRNA MALAT1, erken evre küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) alışmasında Ji ve arkadaşları (99) tarafından

karakterize edilmiştir. MALAT1 erken evre KHDAK'de metastaz ve sağkalımı öngörmedeki klinik önemi nedeniyle bu isimle adlandırılmıştır. Sonraki çalışmalar, MALAT1'in normal dokularda yaygın şekilde eksprese edildiğini, diğer memeli türleri arasında da bulunduğunu ve potansiyel olarak önemli bir fonksiyona sahip olduğunu göstermiştir (100). Son araştırmalar MALAT1'in kanser gelişimine ve ilerlemesine büyük katkıda bulunduğunu göstermiştir. MALAT1; MAPK / ERK, PI3K / AKT, WNT / β -katenin ve NF-kB gibi çeşitli moleküler sinyal yollarının modülasyonunda yer aldığı, hücre göçü ve invazyonu, bağışıklık, anjiyogenez ve tümörjenitede etkili olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda tümör yerleşimi, tümör büyüklüğü, farklılaşması ve kanser evresi gibi klinikopatolojik özelliklerle de ilişkilidir. Ayrıca, artan kanıtlar MALAT1'in tümör dokularında veya vücut sıvılarında anormal eksprensyonunun, tümör tanısı ve prognozu için bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir (101 - 105).

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hastalar

Retrospektif olarak gerçekleştirilen mevcut tez çalışmasında, Ocak 2011 - Ocak 2016 tarihleri arasında Uludağ Üniversitesi Hastanesi Nöroşirürji Anabilim Dalı'nda cerrahi olarak tedavi edilen ve patoloji sonucu GB olarak sonuçlanan hastalar, Avicenna Hastane Bilgi İşletim Sistemi kullanılarak tarandı. Elde edilen 124 hastadan, sekonder GB tanısı alanlar, sadece stereotaktik biyopsi yapılanlar, ailesel genetik hastalıkları olanlar, eşlik eden malignitesi olanlar ve cerrahi rezeksiyondan sonraki ilk 30 gün içinde farklı nedenlerle ölenler çalışma dışı bırakıldı (Tablo 2.1.1). Hasta seçim kriterlerine uyan 75 olgu tez çalışmasına dahil edildi.

Tablo-2.1.1: Hasta seçim kriterleri (çalışma grubuna dahil edilme ve çalışma dışı bırakma)

Hastaların çalışmaya dahil edilme kriterleri:

Histopatoloji tanısının primer GB olması

Hastaların primer GB tanılı rezeksiyon materyallerinin olması

Hastaların çalışma dışı bırakılma kriterleri:

Histopatoloji tanısının sekonder GB olması

Ailesel vaka olması

Yandaş malignitesi bulunması

Hastaların neoadjuvan kemoterapi ya da radyoterapi almış olması

Primer GB tanılı rezeksiyon materyali olmayıp sadece biyopsi materyali olan hastalar

Cerrahi rezeksiyon sonrası ilk 30 gün içerisinde farklı sebeplerden dolayı ölen hastalar

Tümör doku örnekleri konvansiyonel tedaviden (radyasyon veya kemoterapi) önce cerrahi rezeksiyon ile elde edildi. Cerrahi işlemler mikroskop (Zeiss OPMI Pentero Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Germany) kullanılarak beyin cerrahları tarafından yapıldı. Rezeksiyon derecesi daha uzun hastaliksız sağ kalım ve hastaların genel sağ kalımı ile korele olduğu için cerrahinin amacı mümkün olduğunca maksimum rezeksiyonu sağlamaktı. 5-aminolevülonik asit (5-ALA), indosiyanın yeşili veya fluoresein

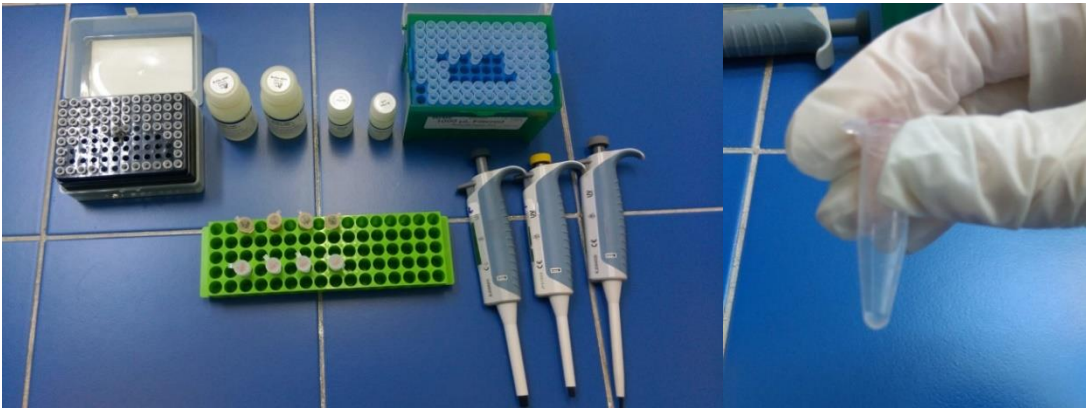
sodyum gibi rezeksiyon derecesini maksimuma çıkardığı bilinen intraoperatif floresans teknikleri hiçbir vakada rutin olarak kullanılmadı.

Tümör örnekleri Uludağ Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı'nda incelenerek onaylandı ve Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre sınıflandırıldı. Patoloji Anabilim Dalında parafinize edilmiş 75 adet rezeksiyon materyali kullanıldı. Projeye dahil edilen tüm hastaların FFPE (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded) doku blokları patolojik olarak kontrol edilerek uygun doku bloklarının çalışmaya alınması sağlandı.

Çalışılan tüm materyaller için Uludağ Üniversitesi Etik Kurulu tarafından 2017-13 / 98 karar numarası ile onay alındı.

2.2. DNA İzolasyonu

Patoloji arşivinden temin edilen 75 adet parafine gömülü her bir tümör materyali uzman patologlar tarafından değerlendirilerek, parafin üzerindeki tümör yerlerini tanımladı. Bu bölgelerden 0.5 cm² 'lik kesitler 1.5 ul'lik eppendorf tüplere aktarıldı. Bu dokularda ilk olarak, ksilen ve %95' lik alkol kullanılarak parafinden uzaklaştırma işlemi yapıldı. Takiben üretici firma protokolünü uygun olarak DNeasy FFPE Mini Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak sabit dokulardan her numuneden 4 µl hacminde DNA izole edildi (Resim-2.2.1).



RESİM 2.2.1: DNA izolasyon işlemi ve eppendorf tüp içerisinde izole edilmiş DNA görüntüsü.

İzole edilmiş DNA miktarı ve konsantrasyonu, bir Beckman Coulter DU-730 spektrofotometresi (Resim-2.2.2) kullanılarak ölçüldü. İzole edilmiş DNA'ların absorbans oranını 1,9 ile 2,1 arasında seçilerek sadece kaliteli DNA'lar çalışmaya dahil edildi.



RESİM 2.2.2: DNA dizi analizi yapılan Beckman Coulter DU-730 spektrofotometresi.

2.3. IDH1 / 2 mutasyon analizi

IDH1 ve *IDH2*'nin nokta mutasyon analizi için doku materyallerinden elde edilen genomik DNA'lardan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizi yapıldı.



RESİM 2.3.1: PCR analizi için reaksiyon hazırlama işlemi



RESİM 2.3.2: DNA dizi analizi yapılan Beckman Coulter Analiz Sistemi.

Elde edilen kaliteli PCR ürünlerinden PCR Clean-Up System ile pürifikasyon işlemi sonrasında, forward ve reverse primerler için DTCS quick start kiti ile ayrı ayrı sekans reaksiyonları gerçekleştirildi.

Sırasıyla 254 bp ve 345 bp uzunluğundaki IDH1 ve IDH2 katalitik alanını kapsayan fragmanları temsil eden R132H ve R172H genomik bölgeleri, aşağıdaki primerleri kullanarak ekson 4'ün doğrudan sekanslanmasıyla analiz edildi:

IDH1 ileri; 5'-TGAGAAGAGGGTTGAGGAGTT-3' ve *IDH1* geri; 5'-AACATGCAAATCACATTATTGCC-3'.

IDH2 ileri; 5'-CACGCTGAAGAAGATGTGGAA -3' ve *IDH2* geri; 5'-CAGAGACAAGAGGATGGCTA-3

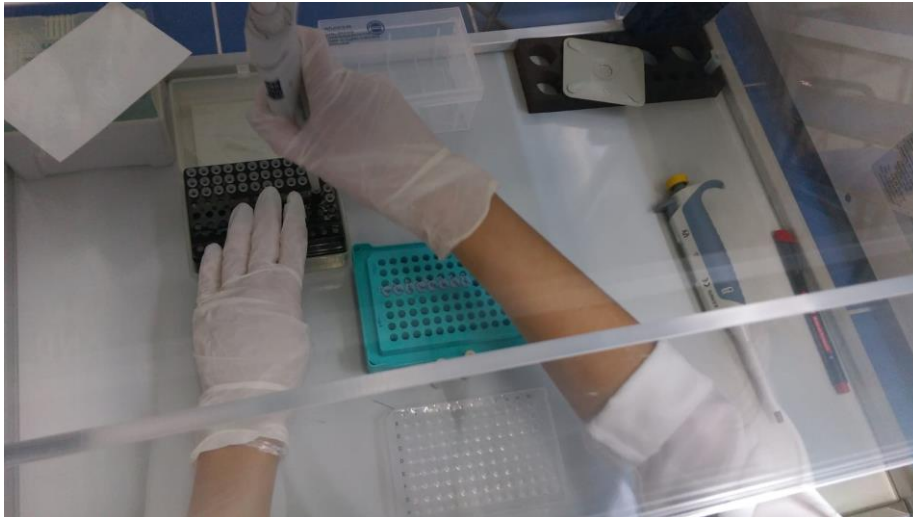
Standart PCR koşulları aşağıdaki gibidir:

95 ° C'de 2 dakika ve 94 ° C'de 12 saniye denatürasyon, ardından 40 devir amplifikasyon, 53 ° C'de 30 saniye sertleştirme ve 72 ° C'de 59 saniye uzatma ve ardından 7 dakika 72 ° C'de son bir uzatma periyodu.

Son olarak elde edilen nükleotid dizisi, genlerin ilgili bölümleri Ensembl'da (<http://www.ensembl.org/index.html>) yer alan normal dizisi ile karşılaştırılarak mutasyon varlığı araştırıldı.

2.4. RNA izolasyonu, qRT-PCR analizleri ve LncRNA MALAT1 ekspresyonu

Patoloji arşivinden temin edilen 75 adet parafine gömülü her bir tümör materyali uzman patologlar tarafından değerlendirilerek, parafin üzerindeki tümör yerlerini tanımladı. Bu bölgelerden 0.5 cm² 'lik kesitler 1.5 ul' lik eppendorf tüplere aktarıldı. Bu dokularda ilk olarak, ksilen ve %95' lik alkol kullanılarak parafinden uzaklaştırma işlemi yapıldı. Takiben üretici firma protokolünü uygun olarak RNAsy FFPE Mini Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen RNA'ların miktarları ve konsantrasyonu, bir Beckman Coulter DU-640 spektrofotometresi kullanılarak her numunenin 4 µl'sinde değerlendirildi. İdeal saflıkta kaliteli RNA'nın A260/A230 absorbans oranınının 1.8 – 2.2 olması beklendiği için çalışmada kullanılacak RNA'ların absorbans oranını 1.8 ile 2.2 arasında belirledik. (Resim-2.4.1)



RESİM 2.4.1: RT-PCR analizi işlemi (cDNA'ların 96 kuyulu plaklara yüklenmesi)

cDNA sentezi ProtoScript M-MuLV First cDNA Sentez Kiti kullanılarak yapıldı.

cDNA sentezi için standart PCR koşulları aşağıdaki gibidir:

10 dakika 25 ° C, 2 saat 37 ° C ve 5 dakika 85 ° C.

LncRNA'ların değerlendirmeleri ABI StepOnePlus™ real-time PCR kullanılarak yapıldı. MALAT1 (Hs00273907_s1) ekspresyon seviyeleri kontrol olarak kullanılan gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz geni (GAPDH) (Hs.544577) ile normalize edildi.

3.5. İstatistiksel analiz

Genetik varyantların patojenik önemi Endeble ve Clinvar programları kullanılarak belirlendi. Genetik alt tipleme, klinikopatolojik özellikler ve prognozlar SPSS 23 (IBM SPSS Inc., Armonk, NY) ile karşılaştırıldı. Çok değişkenli analiz için ki-kare testi ve Cox regresyon kullanıldı. Genetik değişikliklerin ve MALAT1 ekspresyonunun hayatta kalım üzerindeki etkileri MedCalc 12.4.0'da (Ostend, Belçika) Kaplan-Meier analiziyle saptandı.

BULGULAR

3.1. Hasta Özellikleri

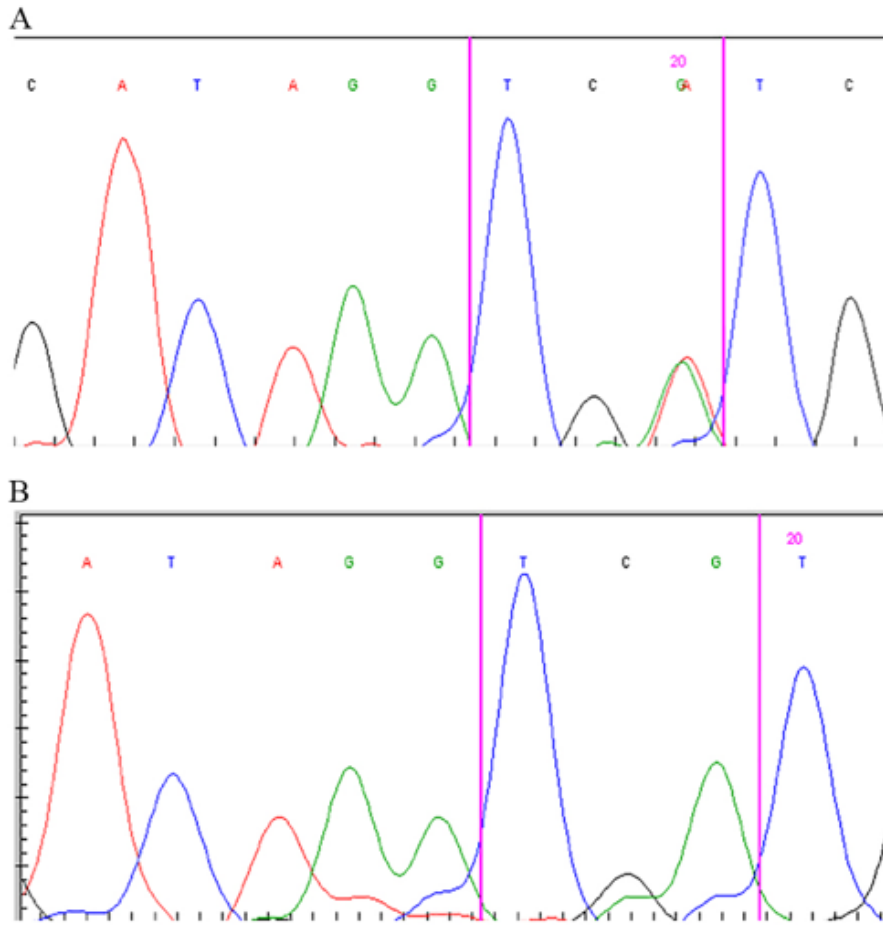
Mevcut tez çalışmasında değerlendirilen Primer GB'li toplam 75 hasta analiz edildi; 34'ü (% 45,3) kadın, 41'i (% 54,7) erkekti. Çalışmadaki GB'larda yaş 31 ile 76 arasında (median 56 yıl) değişmekteydi. Tümörlerin 36'sında (% 48.0) sağ beyinde ve 39'unda (% 52.0) sol beyinde lokalize idi. Tüm hastalar, infiltrate gliomaların derecelendirilmesinde WHO kriterlerine göre evre IV olarak sınıflandırıldı. Kontrastlı MRG ile saptanan gross total rezeksiyon oranı % 27 idi. Hastaların klinikopatolojik özellikleri Tablo 3.1.1'de özetlendi.

TABLO 3.1.1: Primer GB hastalarının klinikopatolojik özellikleri

Değişkenler	Toplam N(%) = 75 (100)
Cinsiyet	
Kadın	34 (45.3%)
Erkek	41 (54.7%)
Yaş	
<45	24 (32%)
45	51 (68%)
Hemisferik Yerleşim Yeri	
Sağ Hemisfer	36 (48%)
Sol Hemisfer	39 (52%)
Lobuler Yerleşim Yeri	
Frontal	23 (30.6%)
Parietal	20 (26.6%)
Temporal	14 (18.7%)
Oksipital	5 (6.7%)
İnsular	5 (6.7%)
Septal Transkallozal	8 (10.7%)

3.2. Primer GB'de IDH1 / 2 Mutasyonlarının Prevalansı

Seçilmiş 75 primer GB tümör örneği, *IDH1* ve *IDH2* mutasyonlarını tanımlamak için DNA sekanslaması ile değerlendirildi. 75 GB hastasının 5'inde (% 6.7) R132H mutasyonu gözlemlendi (Şekil 3.2.1a). Olgularımızda *IDH2* mutasyonu saptanmadı (Şekil 3.2.1b).



ŞEKİL 3.2.1. *IDH1* 4 eksen sekans görüntüsü. (A) *IDH1* (R132H) mutasyona uğramış sekans görüntüsü (B) *IDH1*-wild tipi sekans görüntüsü

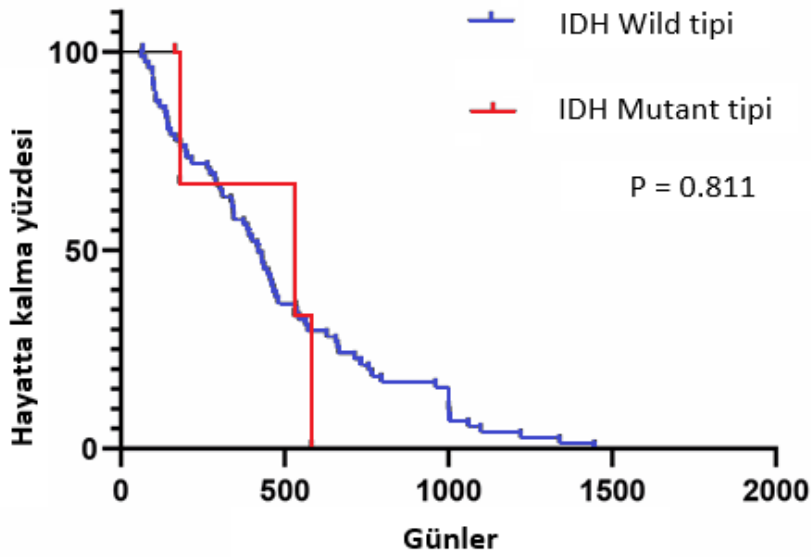
GB tümör gruplarında IDH mutasyonları ile yaş, cinsiyet veya lokalizasyon arasında anlamlı ilişki bulunmadı (Tablo 3.2).

TABLO 3.2. IDH1 mutasyon durumunun hastaların özellikleri üzerine etkisi

Değişkenler	IDH mutant n=5 (6.7%)	IDH wild n= 70 (93.3%)
Cinsiyet		
Kadın	2 (40%)	32 (45.7%)
Erkek	3 (60%)	38 (54.3%)
Yaş		
<45	3 (60%)	21 (30%)
>45	2 (40%)	49 (70%)
Hemisferik Yerleşim Yeri		
Sağ Hemisfer	3 (60%)	34 (48.5%)
Sol Hemisfer	2 (40%)	36 (51.5%)

Kategorik değişkenler sayı (%) olarak sunuldu ve Ki-kare testi ile analiz edildi.

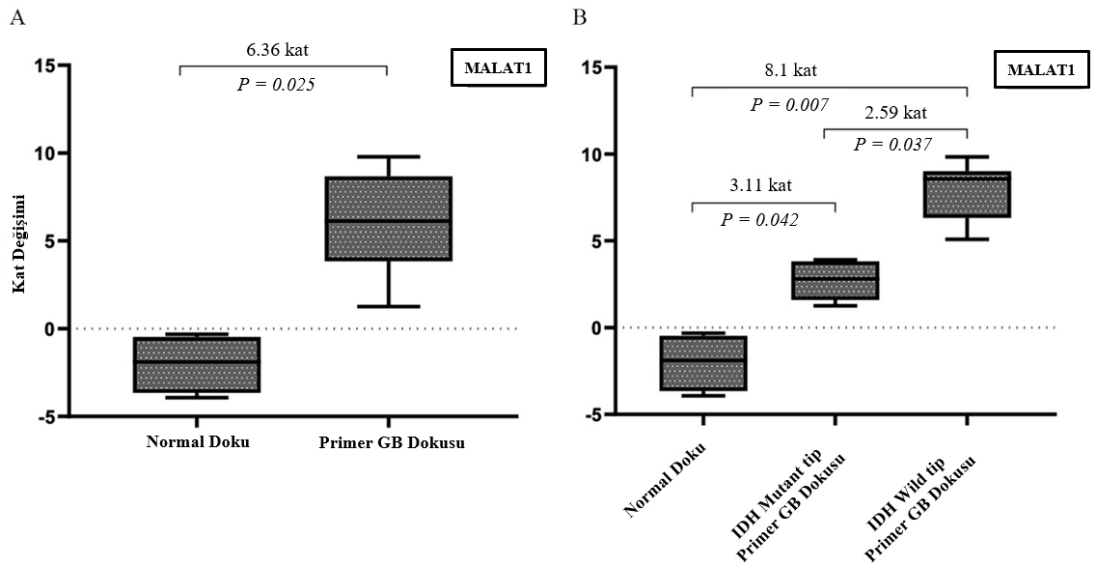
Ayrıca, Kaplan-Meier sağkalım analizine göre, IDH mutasyon durumunun genel sağkalım üzerinde bir etkisi olmamıştır (Şekil 3.2.1).



ŞEKİL 3.2.1: IDH1'in mutasyonunun Kaplan-Meier eğrileri,

3.3. MALAT1'in Primer GB'deki Ekspresyon Profilleri

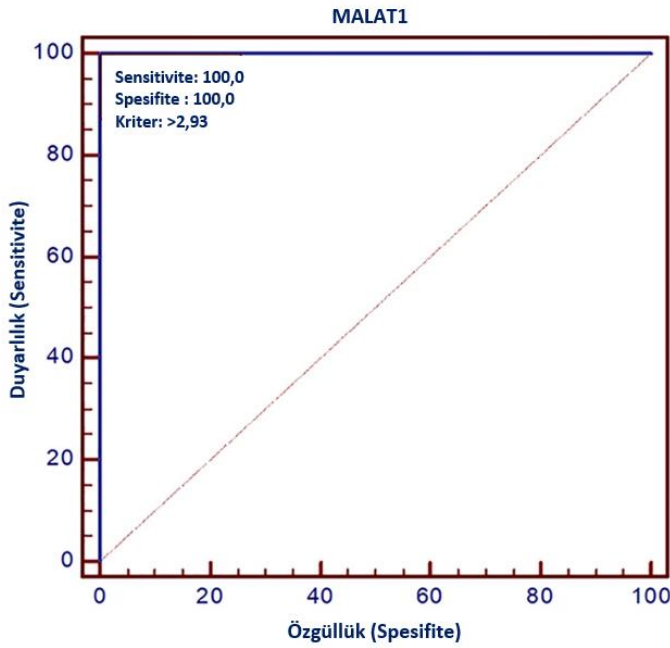
MALAT1'in tanı ve prognoz rolünü belirlemek için, bu RNA'nın ekspresyon durumu, gerçek zamanlı PCR kullanılarak; 5 *IDH* mutant tipi primer GB hastasında, 70 *IDH* wild tipi primer GB hastasında ve 5 normal beyin dokusunda analiz edildi. Şekil 3.3.1'te gösterildiği gibi, MALAT1'in ekspresyon profilleri normal GB dokularla karşılaştırıldığında primer GB tümörlerde 6.36 kat yüksek olmuştur (Şekil 4.3.1A; $P = 0.025$). Ayrıca, MALAT1'in ekspresyonu; *IDH* wild tip GB numunelerinde, mutant GB'dekinden anlamlı olarak daha yüksekti (Şekil 3.3.1B; 2.59 kat, $P = 0.037$).



Şekil 3.3.1: (A) Primer GB'de MALAT1'in ekspresyon profilleri. (B) MALAT1'in *IDH* wild tip ve *IDH* mutant tip primer GB'deki ekspresyon profilleri

3.4. MALAT1'in IDH Wild Tip Primer GB'deki Ekspresyon Profilleri

MALAT1'in ekspresyon profilleri, normal beyin dokularına kıyasla *IDH* wild tip GB tümörlerde 8.1 kat fazla olmuştur (Şekil 3.3.1, $P = 0.007$). Alıcı işletim karakteristiği (Receiver operating characteristic (ROC)) eğrileri analizine göre MALAT1 kat değişim değerlerinin kesim noktasına göre , 70 tümörün 39'unda (% 56) GB yukarı regüle edilmiş ve 31'inde (%44) aşağı regüle edilmiştir (Şekil 3.4.1, $r \geq 2.93$; $P < 0.001$).



Şekil 3.4.1. *IDH* wild tip primer GB'deki MALAT1'in cut-off değeri (Receiver operating characteristic (ROC) eğrileri analizine göre).

Klinikopatolojik özellikler ile MALAT1 ekspresyonunun düzensizliği arasındaki ilişkiyi belirlemek için hastalar, MALAT1 ekspresyonunun kat değişim değeri, ayırıcı olarak kullanılarak iki gruba bölündü. MALAT1 ekspresyonu ile cinsiyet arasında ilişki yoktu. Bununla birlikte, artan MALAT1 seviyesi azalmış yaş ve tümör lokalizasyonu ile ilişkiliydi (sırasıyla $P = 0.032$, $P = 0.025$);). MALAT1'in ekspresyon seviyesinin sol hemisfer GB tümörlerinde daha yüksek olduğu bulundu ($P = 0.025$). MALAT1 ekspresyonu, özellikle insular lobda, diğerlerine göre artmıştır ($P = 0.004$) (Tablo 3.4.1).

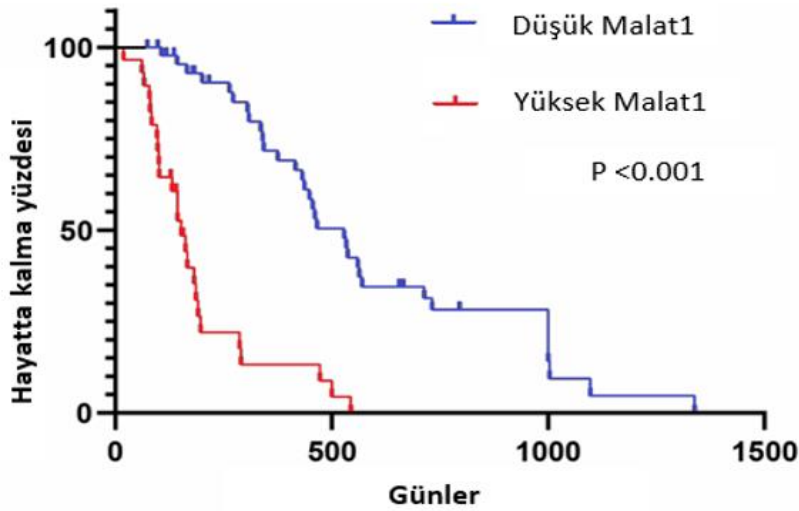
TABLO 3.4.1. MALAT1 ekspresyon düzeyleri ve hasta özellikleri

Değişkenler	Düşük MALAT1 n= 31 (44%)	Yüksek MALAT1 n= 39 (56%)	P değeri
Cinsiyet			> 0.05
Kadın	16 (51.6%)	15 (48.4%)	
Erkek	15 (38.5%)	24 (61.5%)	
Yaş			0.032
<45	6 (25%)	18 (75%)	
>45	25 (54.4%)	21 (45.6%)	
Hemisferik Yerleşim Yeri			0.025
Right Hemisphere	11 (33.3%)	22 (66.7%)	
Left Hemisphere	20 (54.1%)	17 (45.9%)	
Lobuler Yerleşim Yeri			0.0004
Frontal	10 (45.5%)	12 (54.5%)	
Parietal	8 (42.1%)	11 (57.9%)	
Temporal	6 (54.6%)	5 (45.4%)	
Oksipital	3 (60%)	2 (40%)	
İnsular	0 (0%)	5 (100%)	
Septal Transkallozal	4 (50%)	4 (50%)	

Kategorize edilmiş değişkenler sayı (yüzde%) olarak sunuldu ve Ki-kare testi ile analiz edildi.

* P değeri kalın yazılmış değerler p <0.05 olarak anlamlı

Bununla birlikte MALAT1 ekspresyonu ile genel hasta sağkalımı arasındaki ilişkiyi araştırmak için log-rank analizi ile Kaplan-Meier eğrileri uyguladık. MALAT1 ekspresyonu yüksek olan hastalar, MALAT1 ekspresyonu düşük olanlar ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha kısa sağkalım süreleri olduğunu tespit ettik (P <0.001, Şekil 4.4.2).



ŞEKİL 3.4.2: MALAT1'in mutasyon ekspresyonunun Kaplan-Meier eğrileri.

Ayrıca, yaş, tümör lokalizasyonu, IDH mutasyonu ve genel sağkalımın MALAT1 ekspresyon durumunu içeren çok değişkenli cox regresyon modeline göre, MALAT1 yukarı regülasyonunun, medyan takibi olan primer GB'lı hastalarda kötü prognozun önemli bir prediktörü olduğu bulundu (Tablo 4.4.2; P = 0.034).

TABLO 3.4.2: MALAT1 ekspresyon seviyelerinin prognoz üzerindeki etkisi

Değişkenler	Hazard Oranı	Alt	Üst
Yaş	1.394	0.537	1.834
Tümör Lokalizasyonu	1.021	0.582	1.736
MALAT1 yüksek/düşük	2.120	0.374	2.958
IDH mutasyon durumu	1.364	0.283	1.834

IDH-wild türü primer GB'de genel sağkalımın Cox Regresyon Analizi

Bu veriler MALAT1'in primer GB tümörlerde bir onkojen olarak hareket ettiğini gösterdi.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmanın temel amacı, primer GB'de MALAT1 ekspresyon seviyesinin prediktif rolünü belirlemektir. Ayrıca, *IDH*'nin gliomalarda önemli proteinleri olması nedeniyle, IDH mutasyon durumunu analiz ettik. Her ne kadar IDH mutasyonları primer GB'de nadir olsa da, bu mutasyonlar sekonder GB'de sıklıkla gözlenir. 2016 WHO kriterlerine göre, *IDH* mutasyonları primer ve sekonder GB'nin ayırt edilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Primer GB'de prognoz üzerindeki rolü hakkında çok az şey bilinmektedir (106). Bu nedenle primer GB tümör örneklerinde IDH1 ve IDH2 mutasyon durumunu analiz ettik. Çalışma grubumuzdaki hastaların % 6'sında IDH mutasyonu saptandı. IDH1 mutasyonları primer GB'nin % 5-12'sinde bildirilmiştir. Ayrıca, çalışmalar gliomalarda IDH mutasyonunun varlığının nispeten daha iyi prognoz ve genç yaşta ortaya çıkması ile ilişkili olduğunu göstermiştir (4,5,91,107). Yan ve ark. (108) Çinli 118 primer GB hastasında prognostik bir faktör olarak IDH1 mutasyonunun sınırlı olduğunu bildirmiştir. Bildiğimiz kadarıyla, Türk popülasyonunda GB'nin IDH mutasyon durumu hakkında sadece bir çalışma bildirilmiştir. Bu çalışmada IDH1 mutasyonlarının primer GB için prognostik belirleyici olduğu bulundu (109). Ancak, çalışmanın istatistiksel verilerinde çelişkiler vardır. Çalışmamızda tümör nüksü ve IDH mutasyon durumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (109). Ayrıca çalışmamızda herhangi bir klinik özellik ile IDH mutasyon durumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu.

MALAT1'in düzensizliği metastaz ve çeşitli kanser tiplerinde tedaviden sonra tümörün tekrar oluşma riski ile ilişkilidir (110). MALAT1'in çeşitli gliomlarda ekspresyonun arttığına dair kanıtlar vardır (13). Bununla birlikte, primer GB'de MALAT1'in prognoz üzerindeki ekspresyon profilleri bilinmemektedir. Bu çalışmada MALAT1'in primer GB'de yukarı regüle edildiğini bulduk. MALAT1'in GB cinsinden ekspresyon profili tartışmalıdır. Fawzy ve ark. (111) MALAT1 ekspresyonunun GB'li Mısırlı hastalarda aşağı

regüle edildiğini göstermiştir. Ek olarak, bu çalışma düşük MALAT1 ekspresyonunun nüks, düşük genel sağkalım (overall survival (OS) ve daha kısa hastalısız sağkalım (disease-free survival (DFS)) ile ilişkili olduğunu göstermiştir (111). Han ve ark. (112) MALAT1'in, MMP2'nin aşağı regülasyonu ve ERK/MAPK sinyallemesinin inaktivasyonu ile glioma hücrelerinde bir tümör baskılayıcı gen olarak hareket ettiğini bildirdi. Bununla birlikte, Chen ve ark. (110) MALAT1'in 192 primer GB dokusunda ve GB hücre hattında yukarı regüle olduğunu saptadı. Ayrıca, Chen ve ark. (110) MALAT1'in TMZ'ye dirençli hastalarda prognostik bir belirteç olarak kullanılabileceğini göstermiştir. LncRNA'nın ekspresyon profilleri, farklı etnik kökene sahip hastaların tümörlerinde farklı olabilir. Bu nedenle, bu çelişkili sonuç, MALAT1'in primer GB'deki fonksiyonel rolünü araştırmak için daha fazla hasta bazlı araştırmaya ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda MALAT1 ekspresyonunun anlamlı derecede yukarı doğru regüle olduğunu ve *IDH* wild tipi primer GB'lerde kısa genel sağkalım ile ilişkili olduğunu gösterdik. Ayrıca, MALAT1 ekspresyonunun yüksek seviyesinin bu kohortta daha genç yaş ve sol hemisferde GB lokalizasyonu ile ilişkili olduğunu bulduk. Özellikle, MALAT1 ekspresyonu, insüler lobda diğerlerine kıyasla anlamlı ölçüde artmıştı. Önceki çalışmalarda MALAT1 ekspresyonunun düzensizliğinin tümör lokalizasyonu ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, primer GB hastalarında MALAT1'in klinikopatolojik özellikler üzerindeki rolü hakkında çok az şey bilinmektedir.

Sonuç olarak, primer GB'de patogenez mekanizması tam olarak anlaşılmamıştır. Ek olarak, şu anda GB'nin bu alt grubu için iyileştirici bir tedavi mevcut değildir. Bu nedenle, bu hastalık için yeni moleküler biyobelirteçleri veya terapötik hedefleri belirlemek önemlidir. MALAT1 ekspresyonunun çeşitli kanserlerde hayatta kalmak için bağımsız bir prognostik parametre olduğu bildirilmiştir (12, 106).

Çalışmamızda, çok değişkenli cox regresyon analizine göre, yüksek MALAT1 ekspresyon seviyesi IDH mutasyonları olmayan primer GB hastaları için bağımsız bir zayıf prognostik belirteç adayı olduğu belirlendi. İleri analizleri gerekmekle birlikte çalışmamızın sonucunda, MALAT1'in primer GB tümörü için prognostik belirteç ve terapötik bir hedef olduğu öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

- (1) Velazquez ML, Kharboosh RA, Jeanneret S et al. Advances in Brain Tumor Surgery for Glioblastoma in Adults. *Brain Sci.* 2017;7(12):166.
- (2) Wirsching HG, Galanis E, Weller M. Glioblastoma. In: Aminoff MJ (eds). *Handbook of Clinical Neurology Volume 134.* 2016. 381-97.
- (3) Lee CH, Jung KW, Yoo H et al. Epidemiology of primary brain and central nervous system tumors in Korea. *J Korean Neurosurg Soc* 2010;48(2):145-52.
- (4) Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 2007;170:1445-53.
- (5) Kleihues P, Ohgaki H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol* 1999;1:44-51.
- (6) Parsons DW, Jones S, Zhang X et al. An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science* 2008;321(5897):180.
- (7) Chen JR, Yao Y, Xu HZ et al. Isocitrate Dehydrogenase (IDH)1/2 Mutations as Prognostic Markers in Patients With Glioblastomas. *Medicine (Baltimore)* 2016;95:e2583.
- (8) Toedt G, Barbus S, Wolter M et al. Molecular signatures classify astrocytic gliomas by IDH1 mutation status. *Int J Cancer* 2011;128:1095–103.
- (9) Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and Functions of Long Noncoding RNAs. *Cell* 2009;136:629–41.
- (10) Poller W, Tank J, Skurk C, Gast M. Cardiovascular RNA Interference Therapy: The Broadening Tool and Target Spectrum. *Circulation Res* 2013;113(5):588–602.
- (11) Cai T, Liu Y, Xiao J. Long noncoding RNA MALAT1 knockdown reverses chemoresistance to temozolomide via promoting microRNA-101 in glioblastoma. *Cancer Med* 2018;7(4):1404-15.
- (12) Li H, Yuan X, Yan D et al. Long Non-Coding RNA MALAT1 Decreases the Sensitivity of Resistant Glioblastoma Cell Lines to Temozolomide. *Cell Physiol Biochem* 2017;42(3):1192-201.
- (13) Tian X, Xu G. Clinical value of lncRNA MALAT1 as a prognostic marker in human cancer: systematic review and meta-analysis. *BMJ Open.* 2015;5:e008653.

- (14) Stoyanov GS, Dzhenkov DL. On the Concepts and History of Glioblastoma Multiforme - Morphology, Genetics and Epigenetics. *Folia Medica* 2018;60(1):48-66.
- (15) Inda MM, Bonavia R, Seoane J. Glioblastoma Multiforme: A Look Inside Its Heterogeneous Nature. *Cancers (Basel)* 2014;6(1):226–39.
- (16) Mallory FB (eds). *Principles of Pathologic Histology*. WB Saunders, Philadelphia, 1925.
- (17) Bailey P, Cushing H. Microchemical Color Reactions as an Aid to the Identification and Classification of Brain Tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1925;11(1):82-4.
- (18) Zülch KJ (eds). *Die Hirngeschwülste in biologischer und morphologischer Darstellung*, 3. Aufl. Leipzig: Joh. Ambr. Barth 1958.
- (19) Russell DS, Rubinstein LJ (eds). *Pathology of Tumours of the Nervous System*, 3rd ed. London: E. Arnold 1971.
- (20) Scherer HJ. A Critical Review: The Pathology of Cerebral Gliomas. *J Neurol Psychiatry* 1940;3(2):147-77.
- (21) Peiffer J, Kleihues P. Hans-Joachim Scherer (1906-1945), pioneer in glioma research. *Brain Pathol* 1999;9(2):241-5.
- (22) Stoyanov GS, Dzhenkov D, Ghenev P. Cytokeratin AE1/AE3 mimicry in glioblastoma. *Scripta Scientifica Medica* 2017;49(1):47-52.
- (23) Stoyanov GS, Dzhenkov D, Ghenev P. The great imitator - EMA positive glioblastoma multiforme. *Scripta Sci* 2017;49(1):21-5.
- (24) Combs SE, Rieken S, Wick W. et al. Prognostic significance of IDH-1 and MGMT in patients with glioblastoma: One step forward, and one step back? *Radiat Oncol* 2011;6(1):115.
- (25) Almeida SF, Lunardi BA, Schwartzmann G. et al. Glioma revisited: from neurogenesis and cancer stem cells to the epigenetic regulation of the niche. *J Oncol* 2012;2012:1-20.
- (26) Wesseling P, Capper D. WHO 2016 Classification of gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2018;44:139-50.
- (27) Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C. et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014;23(10):1985-96.
- (28) Ostrom QT, Gittleman H, Farah P. et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol* 2013;15:2ii–56.

- (29) Dobes M, Khurana VG, Shadbol TB et al. Increasing incidence of glioblastoma and meningioma, and decreasing incidence of Schwannoma (2000–2008); Findings of a multicentric Australian study. *Surg Neurol Int* 2011;2:176.
- (30) Arora RS, Altson RD, Eden TO et al. Age-incidence patterns of primary CNS tumors in children, adolescents and adults in England. *Neuro Oncol* 2009;11(4):403-13.
- (31) Gausia SK, Markou M, Voulgaris S et al. Descriptive epidemiology of cerebral gliomas in northwest Greece and study of potential predisposing factors, 2005–2007. *Neuroepidemiology* 2009;33(2):89-95.
- (32) Tamimi AF, Tamimi I, Abdelaziz M et al. Epidemiology of malignant and non-malignant primary brain tumors in Jordan. *Neuroepidemiology* 2015;45:100-8.
- (33) Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG et al. The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. *Neuro Oncol* 2014;16(7):896-913.
- (34) Jigisha PT, Dolecek AD, Craig H et al. Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014;23(10):1985-96.
- (35) Chakrabarti I, Cockburn M, Cozen W et al. A population-based description of glioblastoma multiforme in Los Angeles County, 1974-1999. *Cancer* 2005;104(12):2798-806.
- (36) Konar SK, Maiti TK, Bir SC et al. Predictive Factors Determining the Overall Outcome of Primary Spinal Glioblastoma Multiforme: An Integrative Survival Analysis. *World Neurosurg* 2016;86:341-8.
- (37) Sturm D, Bender S, Jones DT et al. Paediatric and adult glioblastoma: multiform (epi)genomic culprits emerge. *Nat Rev Cancer* 2014;14(2):92-107.
- (38) Taylor A, Karajannis MA, Harter DH. Glioblastoma multiforme: State of art and future therapeutics. *Surg Neurol Int* 2014;5:64.
- (39) Adriana O, Kenneth DA. Using the Molecular Classification of Glioblastoma to Inform Personalized Treatment. *J Pathol* 2014;232(2):165-77.
- (40) Hamilton SR, Liu B, Parsons RE et al. The molecular basis of Turcot’s syndrome. *N Engl J Med* 1995;332(13):839-47.
- (41) Krex D, Klink B, Hartmann C et al. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain* 2007;130(10):2596-606.

- (42) Sadetzki S, Chetrit A, Freedma L et al. Long-term follow-up for brain tumor development after childhood exposure to ionizing radiation for tinea capitis. *Radiat Res.* 2005;164(2):234.
- (43) Neglia JP, Robison LL, Stovall M et al. New primary neoplasms of the central nervous system in survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Natl Cancer Inst* 2006;98(21):1528-37.
- (44) Interphone Study Group. Brain tumour risk in relation to mobile telephone use: results of the interphone international case-control study. *Int J Epidemiol* 2010;39:675-94.
- (45) Xu C, Chen P et al. Association between the XRCC1 Arg194Trp Polymorphism and Glioma Risk: an Updated Meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15(17):7419-24.
- (46) Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD et al. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol* 2006;2(9):494-503.
- (47) Brenner AV, Butler MA, Wang SS et al. Single-nucleotide polymorphisms in selected cytokine genes and risk of adult glioma. *Carcinogenesis* 2007;28(12):2543-7.
- (48) Engelhard HH, Villano JL, Porter KR et al. Clinical presentation, histology, and treatment in 430 patients with primary tumors of the spinal cord, spinal meninges, or cauda equina. *J Neurosurg Spine* 2010;13:67-77.
- (49) Farina H, Kanza M, Kahkashan P et al. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pac J Cancer Prev* 2017;18(1):3-9.
- (50) Brar R, Prasz A, Brar M. Glioblastoma of the optic pathways: An Atypical case. *J Radiol Case Rep* 2009;3(9):22-8.
- (51) Roth JG, Elvidge AR. Glioblastoma multiforme: a clinical survey. *J Neurosurg* 1960;17:736-50.
- (52) Adams H, Chaichana KL, Avendano J et al. Adult Cerebellar Glioblastoma: Understanding Survival and Prognostic Factors Using A Population-Based Database from 1973-- 2009. *World Neurosurg* 2013;80(6):e237-43.
- (53) Mirimanoff RO, Gorlia T, Mason W et al. Radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: recursive partitioning analysis of the EORTC 26981/22981-NCIC CE3 phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 2006;24(16):2563-9.

- (54) Stupp R, Mason WP, Bent MJ et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352(10):987-96.
- (55) Herrlinger U, Förschler H, Küker W et al. Leptomeningeal metastasis: survival and prognostic factors in 155 patients. *J Neurol Sci* 2004;223(2):167-78.
- (56) Arita N, Taneda M, Hayakawa T. Leptomeningeal dissemination of malignant gliomas. Incidence, diagnosis and outcome. *Acta Neurochir Suppl* 1994;126:84-92.
- (57) Lindsay A, Holthouse D, Robbins P et al. Spinal leptomeningeal metastases following glioblastoma multiforme treated with radiotherapy. *J Clin Neurosci* 2002;9(6):725-8.
- (58) Korshunov A, Sycheva R, Golanov A et al. Gains at the 1p36 chromosomal region are associated with symptomatic leptomeningeal dissemination of supratentorial glioblastomas. *Am J Clin Pathol* 2007;27(4):585-90.
- (59) Schweitzer T, Vince GH, Herbold C et al. Extraneural metastases of primary brain tumors. *J Neurooncol* 2001;53(2):107-14.
- (60) Rosenberg JH, Werner H, Moulton MJ et al. Current Modalities and Mechanisms Underlying Cardioprotection by Ischemic Conditioning. *J Cardiovasc Transl Res* 2018;11(4):292-307.
- (61) Flanigan PM, Jahangiri A, Kuang R et al. Improved Survival with Decreased Wait Time to Surgery in Glioblastoma Patients Presenting with Seizure. *Neurosurg* 2017;81(5):824-33.
- (62) Schankin CJ, Ferrari U, Reinisch VM et al. Characteristics of brain tumour-associated headache. *Cephalalgia* 2007;27(8):904-11.
- (63) Dağıştan Y, Dağıştan E, Güney MS. Glioblastome multiforme begin with personality changes for no apparent reason: a case report. *Abant Med J.* 2012;1(1):23-5.
- (64) Molassiotis A, Wilson B, Brunton L et al. Symptom experience in patients with primary brain tumours: a longitudinal exploratory study. *Eur J Oncol Nurs.* 2010;14(5):410-6.
- (65) Fougère C, Suchorska B, Bartenstein P et al. Molecular imaging of gliomas with PET: Opportunities and limitations. *Neuro Oncol.* 2011;13(8):806–819.
- (66) Singh H, Maurya V, Gill SS. Computerised Tomography Features in Gliomas. *Med J Armed Forces India* 2002;58(3):221-5.

- (67) Kanoto M, Kirii K, Toyoguchi Y et al. Radiological imaging features of glioblastoma with oligodendroglioma component: a comparison with conventional glioblastoma. *Acta Radiol Open* 2016;5(11):2058460116675191.
- (68) Jia ZZ, Shi W, Shi JL et al. Comparison between perfusion computed tomography and dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging in assessing glioblastoma microvasculature. *Eur J Radiol* 2017;87:120-4.
- (69) Shukla G, Alexander GS, Bakas S. Advanced magnetic resonance imaging in glioblastoma: a review. *Chin Clin Oncol* 2017;6(4):40.
- (70) Kinon MD, Scoco A, Farinhas JM et al. Glioblastoma multiforme presenting with an open ring pattern of enhancement on MR imaging. *Surg Neurol Int* 2017;8:106.
- (71) Khangembam BC, Singhal A, Kumar R et al. Tc-99m Glucoheptonate Single Photon Emission Computed Tomography-Computed Tomography for Detection of Recurrent Glioma: A Prospective Comparison with N-13 Ammonia Positron Emission Tomography-Computed Tomography. *Indian J Nucl Med* 2019;34(2):107-17.
- (72) Hutton BF, Occhipinti M, Kuehne A et al. Development of clinical simultaneous SPECT/MRI. *Br J Radiol* 2018;91(1081):20160690.
- (73) Toussaint M, Pinel S, Auger SF et al. Proton MR Spectroscopy and Diffusion MR Imaging Monitoring to Predict Tumor Response to Interstitial Photodynamic Therapy for Glioblastoma. *Theranostics* 2017;7(2):436-51.
- (74) Louis DN, Perry A, Reifenberger G et al. The 2016 World Health Organization WHO classification of tumours of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 2016;131:803-20.
- (75) Friedmann-Morvinski D. Glioblastoma heterogeneity and cancer cell plasticity. *Crit Rev Oncog* 2014;19(5):327-36.
- (76) Tunthanathip T, Ratanalert S, Sae-Heng S et al. Butterfly Tumor of the Corpus Callosum: Clinical Characteristics, Diagnosis, and Survival Analysis. *J Neurosci Rural Pract* 2017;8(1):57-65.
- (77) Opoku-Darko M, Amuah JE, Kelly JJ. Surgical Resection of Anterior and Posterior Butterfly Glioblastoma. *World Neurosurg* 2018;110:e612-20.
- (78) Campos B, Olsen LR, Uruf T et al. A comprehensive profile of recurrent glioblastoma. *Oncogene*. 2016;35(45):5819-25.

- (79) Swinnen J, Gelin G, Fransis S et al. Glioblastoma with extracranial parotid, lymph node, and pulmonary metastases: a case report. *Radiol Case Rep* 2019;14(11):1334-47.
- (80) Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 2007;21(21):2683-710.
- (81) Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005;64(6):479-89.
- (82) Furuta M, Weil RJ, Vortmeyer AO et al. Protein patterns and proteins that identify subtypes of glioblastoma multiforme. *Oncogene* 2004;23(40):6806-14.
- (83) Benitez JA, Ma J, D'Antonio M et al. PTEN regulates glioblastoma oncogenesis through chromatin-associated complexes of DAXX and histone H3.3. *Nat Commun* 2017;8:15223.
- (84) Stiles CD, Rowitch DH. Glioma stem cells: a midterm exam. *Neuron* 2008;58(6):832-46.
- (85) Das S, Srikanth M, Kessler JA et al. Cancer stem cells and glioma. *Nat Rev Neurol* 2008;4(8):427-35.
- (86) Brennand J, Margiso GP. Reduction of the toxicity and mutagenicity of alkylating agents in mammalian cells harbouring the Escherichia coli alkyltransferase gene, *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:6292-6.
- (87) Denny BJ, Wheelhouse RT et al. NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry* 1994;33(31):9045-51.
- (88) Alagöz M. Cancer Stem Cell Resistance Against Temozolomide in Glioblastoma Multiforma Treatment. *Sakarya Tıp Dergisi* 2018;8(2):379-87.
- (89) Alonso MM, Gomez-Manzano C et al. Adenovirus-based strategies overcome temozolomide resistance by silencing the O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter. *Cancer Res* 2007;67(24):11499-504.
- (90) Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E et al. Inactivation of the DNA repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 2000;343:1350-4.
- (91) Ludwig K, Kornblum H. Molecular markers in glioma. *J Neurooncol* 2017;134:505-12.

- (92) Hanif F, Muzaffar K, Perveen K et al. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asya Pac J Kanser Prev* 2017;18(1):3-9.
- (93) Stupp R, Hegi MH 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* 2009;10(5):459-66.
- (94) Yoshimoto R, Mayeda A, Yoshida M et al. MALAT1 long non-coding RNA in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2016;1859(1):192-9.
- (95) Li ZX, Zhu QN, Zhang HB et al. MALAT1: a potential biomarker in cancer. *Cancer Manag Res* 2018;10:6757-68.
- (96) Gutschner T, Diederichs S. The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. *RNA Biol* 2012;9(6):703-19.
- (97) Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL et al. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature* 1991;349(6304):38-44.
- (98) Lee JT, Davidow LS, Warshawsky D. Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nat Genet* 1999;21(4):400-4.
- (99) Ji P, Diederichs S, Wang W et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene* 2003;22(39):8031-41.
- (100) Eißmann M, Gutschner T, Hämmerle M et al. Loss of the abundant nuclear non-coding RNA MALAT1 is compatible with life and development. *RNA Biol* 2012;9(8):1076-87.
- (101) Liu S, Yan G, Zhang J et al. Knockdown of Long Noncoding RNA (lncRNA) Metastasis-Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1 (MALAT1) Inhibits Proliferation, Migration, and Invasion and Promotes Apoptosis by Targeting miR-124 in Retinoblastoma. *Oncol Res* 2018;26(4):581-91.
- (102) Chen L, Feng P, Zhu X et al. Long non-coding RNA Malat1 promotes neurite outgrowth through activation of ERK/MAPK signalling pathway in N2a cells. *J Cell Mol Med* 2016;20(11):2102-10.
- (103) Dong Y, Liang G, Yuan B et al. MALAT1 promotes the proliferation and metastasis of osteosarcoma cells by activating the PI3K/Akt pathway. *Tumour Biol* 2015;36(3):1477-86.
- (104) Liang J, Liang L, Ouyang K et al. MALAT1 induces tongue cancer cells' EMT and inhibits apoptosis through Wnt/ β -catenin signaling pathway. *J Oral Pathol Med* 2017;46(2):98-105.

- (105) Zhao G, Su Z, Song D et al. The long noncoding RNA MALAT1 regulates the lipopolysaccharide-induced inflammatory response through its interaction with NF- κ B. *FEBS Lett* 2016;590(17):2884-95.
- (106) Kang MR, Kim MS, Oh JE et al. Mutational analysis of IDH1 codon 132 in glioblastomas and other common cancers. *Int J Cancer* 2009;125:353-5.
- (107) Ohka F, Natsume A, Motomura K et al. The global DNA methylation surrogate LINE-1 methylation is correlated with MGMT promoter methylation and is a better prognostic factor for glioma. *PLoS One* 2011;6(8):e23332.
- (108) Yan W, Zhang W, You G et al. Correlation of IDH1 mutation with clinicopathologic factors and prognosis in primary glioblastoma: a report of 118 patients from China. *PLoS One* 2012;7(1):e30339.
- (109) Kalkan R, Atli Eİ, Özdemir M et al. IDH1 mutations is prognostic marker for primary glioblastoma multiforme but MGMT hypermethylation is not prognostic for primary glioblastoma multiforme. *Gene* 2015;554(1):81-6.
- (110) Chen W, Xu XK, Li JL et al. MALAT1 is a prognostic factor in glioblastoma multiforme and induces chemoresistance to temozolomide through suppressing miR-203 and promoting thymidylate synthase expression. *Oncotarget* 2017;8(14):22783-99.
- (111) Fawzy MS, Toraih EA, Abdallah HY. Long noncoding RNA metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1): A molecular predictor of poor survival in glioblastoma multiforme in Egyptian patients. *Egyptian J Med Human Genet* 2017;18:231-9.
- (112) Han Y, Wu Z, Wu T et al. Tumor-suppressive function of Long noncoding RNA MALAT1 in glioma cells by downregulation of MMP2 and inactivation of ERK/MAPK signaling. *Cell Death Dis* 2016;7:e2123.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince daima ilgi ve desteklerini gördüğüm, yetişmemde emeği geçen hocalarım Prof. Dr. Selçuk Yılmazlar, Prof. Dr. Ahmet Bekar, Prof. Dr. Şeref Doğan, Prof. Dr. Hasan Kocaeli ve Doç. Dr. Özgür Taşkapılıoğlu'na, Uzm. Dr. Pınar Eser Ocak'a, tezimin hazırlanmasında desteğini ve yardımlarını esirgemeyen Tıbbı Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Berrin Tunca ve ekibine, ve bu zorlu süreçte beraber çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma, teknisyenlere, hemşirelere, personellere sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Beni bugünlere getiren annem, babam ve ne kadar şanslı olduğumu her zaman hissettiren tüm aileme, desteğini hiç esirgmeden varlığıyla bana güç veren, hayatıma anlam katan sevgili eşim Uzm. Dr. Elif Argadal'a ve asistanlık sürecimde ailemize katılarak bana motivasyon ve mutluluk veren oğlum Ege Tanay Argadal'a da teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında İstanbul Fatih’de doğdum. İlkokulu İstanbul Bahçeşehir Koleji’nde, ortaokulu da Yalova Özel Yücebilgili İ.Ö.O.’da okudum. Lise eğitimimi Bursa Nilüfer Fen Lisesi’nde tamamladım. Tıp eğitimime 2006 yılında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi’nde başlayıp 2013 yılında mezun oldum. 14 Temmuz 2014 tarihinden beri Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.