

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**PILOSİTİK ASTROSİTOMLARDA
DOKU MİKROARRAY YÖNTEMİ İLE
NÖRAL KÖK HÜCRE İMMUNOFENOTİPİK
KOMPOZİSYONUNUN VE
NÜKS YÖNÜNDEN RİSKLİ GRUPLARIN
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

AYÇA ERŞEN SARAÇOĞLU

İçindekiler

Tablo listesi.....	i
Şekil listesi.....	ii
Grafik listesi.....	iii
Kısaltmalar.....	iv
Teşekkür.....	v
Özet.....	1
Summary.....	3
Giriş ve amaç.....	5
Genel bilgiler.....	6
Gereç ve yöntem.....	19
Bulgular.....	27
Tartışma.....	49
Sonuç.....	63
Kaynaklar.....	64

Tablo listesi

1. WHO 2007 Merkezi Sinir Sistemi Tümörleri Sınıflaması'nda nöroepitelyal tümörler.....	6
2. Yaşa göre en sık görülen merkezi sinir sistemi tümörleri.....	8
3. Çalışmada kullanılan immunohistokimyasal antikorlar.....	22
4. Olguların klinik özellikleri.....	27
5. Sitoplazmik immunreaktivite sonuçları.....	33
6. Nükleer immunreaktivite sonuçları.....	33
7. Kök hücre belirleyicilerinin sitoplazmik ekspresyon sonuçları.....	33
8. . Kök hücre belirleyicilerinin nükleer ekspresyon sonuçları.....	33
9. Klinik özellikler ve Ki-67 boyanma indeksinin nüks ile ilişkisi.....	35
10. Farklı klinik özelliklerin ve Ki-67 boyanma indeksinin nüksüz sağkalım süreleri ile ilişkisi.....	40
11. İmmunohistokimyasal sonuçların nüks ile ilişkisi.....	41
12. . İmmunohistokimyasal nükleer pozitiflikler arasındaki korelasyon değerleri.....	42
13. İmmunohistokimyasal sitoplazmik pozitiflikler arasındaki korelasyon değerleri.....	42
14. İmmunohistokimyasal nükleer ve sitoplazmik pozitiflikler arasındaki korelasyon değerleri.....	42

Şekil listesi

1. Çocukluk çağı primer beyin tümörlerinin histolojik türlere göre dağılımı.....	8
2. Mikroarray kesitlerinin hazırlık süreci.....	21
3. Nükleer ekspresyonu karşılaştırmalı skorlamak için yardımcı şema.....	24
4. Doku mikroarray şablonu.....	24
5. Pleomorfik görünümdeki PA hücreleri.....	43
6. Bazı PA olgularımızda izlenen vasküler proliferasyon.....	43
7. Zayıf sitoplazmik GFAP pozitifliği.....	44
8. Yaygın nörofilamen pozitifliği.....	44
9. NeuN nükleer pozitifliği gösteren hücreler.....	45
10. Sitoplazmik sinaptofizin pozitifliği.....	45
11. EGFR ile şüpheli sitoplazmik pozitifliği bulunan Olgu 57.....	46
12. Sitoplazmik bcl-2 immunoreaktivitesi.....	46

Grafik listesi

1. Sinaptofizin boyanma yaygınlığı.....	29
2. Ki-67 Bİ.....	30
3. SOX-2 boyanma yaygınlığı.....	31
4. Olig-2 boyanma yaygınlığı.....	32
5. PA olgularında nüksüz sağkalım.....	35
6. Cinsiyete göre nüksüz sağkalım.....	36
7. Lokalizasyona göre nüksüz sağkalım.....	36
8. Lateralizasyona göre nüksüz sağkalım.....	37
9. Eksizyon genişliğine göre nüksüz sağkalım	37
10. Yaş kategorilerine göre nüksüz sağkalım.....	38
11. Ki-67 Bİ kategorilerine göre nüksüz sağkalım	38
12. Subtotal eksizyon uygulanan olgularda yaş kategorilerine göre nüksüz sağkalım.....	39
13. Subtotal eksizyon uygulanan olgularda Ki-67 Bİ kategorilerine göre nüksüz sağkalım	39

Kısaltmalar

PA: Pilositik astrositom

WHO: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

MSS: Merkezi sinir sistemi

CBTRUS: Central Brain Tumor Registry of the United States (ABD Beyin Tümörleri Merkezi Arşivi)

MRG: Magnetik rezonans görüntüleme

PXA: Pleomorfik ksantoastrositom

PMA: Pilomiksoid astrositom

NF1: Nörofibromatozis tip 1

CGH: Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon

H&E: Hematoksilen ve Eosin

Bİ: Boyanma indeksi

FISH: Floresan in situ hibridizasyon

MGNT : Malign glionöronal tümör

İHK: İmmunohistokimya

BBA: Büyük büyütme alanı

TEŞEKKÜR

Tez çalışmama destek ve yönlendirici öneriler sunan, derin birikim ve deneyiminden uzmanlık eğitimim süresince yararlandığım tez danışmanım Prof. Dr. Uğur Pabuçcuoğlu'na teşekkür ederim. Bu çalışma University of California, San Francisco (UCSF)'da yapılmıştır. Çalışmanın gerçekleşmesindeki her aşamada büyük katkı ve emeği olan Prof. Dr. Tarık Tihan'a ve emeği geçen UCSF Nöropatoloji Bölümü ve Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim. Prof. Dr. Tülay Canda ve Prof. Dr. M. Şerefettin Canda'ya tez çalışmama ve patoloji eğitimime katkılarından dolayı teşekkür ederim. Çalışmanın gerçekleşmesi için her türlü desteği sunan Prof. Dr. Erdener Özer'e ve yazım aşamasındaki değerli katkılarından dolayı Prof. Dr. Kutsal Yörükoğlu'na teşekkürlerimi sunarım. Kendilerine uzmanlık eğitimime olan katkılarından dolayı ayrıca teşekkür ederim. İstatistiksel değerlendirmedeki yardımları için Dokuz Eylül Üniversitesi Halk Sağlığı Anabilimdalı'ndan Dr. Hale Arık'a teşekkür ederim. Çalışmanın gerçekleştiği süre boyunca beni "Yurtdışı araştırma burs programı" ile destekleyen TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince anlayış, özen ve ilgiyle, bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan Prof. Dr. Aydanur Kargı, Prof. Dr. Meral Koyuncuoğlu, Prof. Dr. Sülen Sarıoğlu, Prof. Dr. Özgül Sağol, Doç. Dr. Banu Lebe, Doç. Dr. Sermin Özkal, Doç. Dr. Burçin Tuna, Doç. Dr. Çağnur Ulukuş, Uzm. Dr. Duygu Gürel, Uzm. Dr. Merih Güray ve Uzm. Dr. Mehtat Ünlü'ye çok teşekkür ederim. Enerjilerinden beslendiğim ve nöropatoloji alanındaki birikimlerinden yararlandığım Patoloji Dernekleri Federasyonu Nöropatoloji Çalışma Grubu üyelerine teşekkürlerimi sunarım. Yardımlaşma, dayanışma ve paylaşımın egemen olduğu bir ortamda zorlu çalışma koşullarının üstesinden birlikte geldiğimiz değerli araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim. Dokuz Eylül Üniversitesi Patoloji Anabilimdalı laboratuvar, sekreteryaya çalışanlarına ve hizmet personeline ayrıca teşekkür ederim. Son olarak uzmanlık eğitimim süresince ve tez çalışmam sırasında beni sabırla destekleyen, moral veren sevgili eşime teşekkürler...

ÖZET

Pilositik astrositomlarda doku mikroarray yöntemi ile nöral kök hücre immunofenotipik kompozisyonunun ve nüks yönünden riskli grupların araştırılması

Ayça ERŞEN SARAÇOĞLU

Dokuz Eylül Üniveristesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

ayca.ersen@deu.edu.tr

Amaç ve hipotez: Günümüzde birincil beyin tümörlerinin kök hücrelerden kaynaklandığı hipotezi güçlenmektedir. Çalışmamızda nöral kök hücre belirleyicilerinin pilositik astrositomlardaki ekspresyonunu ve sonuçların prognostik açıdan değerini araştırmak amaçlanmıştır. Kök hücre belirleyicilerinden CD133, CD34, p75NTR, Sox-2 antikorları pilositik astrositom olgularına immunohistokimyasal yöntemle uygulanmış, ekspresyonlar glial belirleyicilerin (olig-2, GFAP, vimentin) ve nöronal belirleyicilerin (Nörofilamen, NeuN, sinaptofizin) ekspresyonları ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Bu tümörlerde ayrıca EGFR, p53, bcl-2, Ki-67 gibi tümör ilişkili antijenler araştırılmıştır. Moleküler değişiklikler yanısıra olguların klinik özellikleri de tümörün biyolojik davranışını aydınlatmak için incelenmiştir.

Yöntem: 1990-2005 yılları arasında tanı alan 62 pilositik astrositom olgusundan doku mikroarray blok ve kesitleri hazırlanmıştır. Otopsi vakalarına ait fetal ve erişkin normal serebral korteks, serebellum dokuları kontrol amaçlı kullanılmıştır. Kesitlere immunohistokimyasal yöntemle CD133, CD34, p75NTR, bcl-2, EGFR, Nörofilamen, GFAP, vimentin, sinaptofizin, Sox-2, Olig-2, p53, Ki-67, NeuN antikorları uygulanmış, floresan in situ hibridizasyon yöntemi ile de 1p/19q delesyonu incelenmiştir.

Bulgular: Olguların yaş ortanca değeri 84 aydır (aralık 14-193 ay). Kız/erkek oranı eşittir. Olguların %68'i (n=42) arka çukur, %29'u (n=18) supratentoryal bölge, %3'ü (n=2) medulla spinalis yerleşimlidir. 32 olguya (%52) total, 30 olguya (%48) subtotal eksizyon uygulanmıştır. Olguların %15'inde (n=9) ortalama 12 ay içerisinde nüks saptanmıştır. Vimentin tüm olgularda, GFAP ise fokal boyanma gösteren dört olgu (%10) dışında yaygın eksprese edilmiştir. Sinaptofizin immunoreaktivitesi 40 olgunun 25'inde (%62), Nörofilamen 57 olgunun %21'inde (n=12), NeuN 50 olgunun %4'ünde (n=2) pozitifdir. EGFR ve p53

pozitifliği olguların hiçbirinde izlenmemiştir. Bcl-2 antikoru ile 39 olgunun %16'sında (n=6) ekspresyon saptanmıştır. Ki-67 41 olguda ortalama %2 (aralık %0-8) oranında pozitiftir. CD133 bir olgu dışında olguların hiçbirinde, CD34, p75NTR de hiçbir olguda pozitif saptanmamıştır. Sox-2, 48 olguda ortalama %45 (aralık %0-90) oranında, Olig-2 ise 50 olguda ortalama %35 (aralık %0-90) oranında pozitiftir.

İstatistiksel inceleme sonucunda nüks gelişimi cerrahi eksizyon derecesi ve yaş ile ters yönde, Ki-67 boyanma indeksi ile pozitif yönde ilişkili bulunmuştur. Yaşı 5'ten küçük olguların hem tüm olgular hem de sadece subtotal eksizyon uygulanan olgular arasında nüksüz sağkalım süreleri daha kısadır. Ki-67 boyanma indeksi %2'den yüksek olgularda nüksüz sağkalım süreleri daha kısadır. İmmunohistokimyasal belirleyiciler ile nüks gelişimi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır. Floresan in situ hibridizasyon yöntemi uygulanan 15 olguda 1p/19q delesyonu saptanmamıştır.

Sonuç: Piloitik astrositom olgularında glial belirleyiciler yanı sıra daha düşük oranlarda olsa da nöronal belirleyicilerin eksprese edilmesi tanısal yaklaşım için önemlidir. Özgül olmayan bir nöral kök hücre belirleyicisi Sox-2'nin pilositik astrositomlarda varlığı kök hücre hipotezini desteklemektedir. Olig-2'de izlenen immunoreaktivite sonuçları, GFAP ve vimentin sonuçları ile birlikte pilositik astrositomlardaki glial diferansiasyonu göstermekte, 1p/19q delesyonunun saptanmaması oligodendroglial diferansiasyon olasılığından uzaklaştırmaktadır. Subtotal eksizyon uygulanan, 5 yaş altında tanı alan ve Ki-67 boyanma indeksi %2'den yüksek olgular nüks yönünden riskli gruplardır. Bazı kök hücrelerde ve nadiren yüksek dereceli glial tümörlerinde izlenebilen CD133, p75NTR antijenleri pilositik astrositomlarda gözlenmemiştir. Yüksek dereceli glial tümörlerde görülen p53 mutasyonu, EGFR amplifikasyonu pilositik astrositomlarda nüks gelişimi ile ilişkili değildir. Çalışmada kullanılan doku mikroarray yöntemi geniş immunohistokimyasal panel ve in situ hibridizasyon incelemesini kolaylaştırmıştır.

Anahtar kelimeler: Piloitik astrositom, nöral kök hücre, nüks, doku mikroarray yöntemi

SUMMARY

Analysis of neural stem cell immunophenotypic composition with tissue microarray method and high-risk groups for recurrence in pilocytic astrocytomas

Dr. Ayça ERŞEN SARAÇOĞLU

Dokuz Eylul University, Faculty of Medicine, Pathology Department

ayca.ersen@deu.edu.tr

Aim and hypothesis: There is growing evidence for the role of stem cells in some primary central nervous system tumors. In order to determine the presence and the prognostic significance of stem cell markers in pilocytic astrocytoma, we have analyzed the expression of a set of antibodies including CD133, CD34, p75NTR, Sox-2, in a large series of pilocytic astrocytomas. In addition, we have analyzed the expression of glial (olig-2, GFAP, vimentin) and neuronal (neurofilament, synaptophysin, and NeuN)) markers to determine a relationship between the above groups of markers. We have also analyzed some of the tumor-associated antigens, such as EGFR, p53, bcl-2, and Ki-67 in this group of tumors. The results were then correlated with clinical findings in order to determine an association between the marker status of tumors and their clinical characteristics in order to determine biologically important factors.

Method: The tissue microarray blocks and slides were prepared from 62 pilocytic astrocytoma cases. Fetal and adult normal cerebral and cerebellar brain sections from autopsy cases were used as controls. All microarrays were stained with antibodies against CD133, CD34, p75NTR, bcl-2, EGFR, Neurofilament, GFAP, vimentin, synaptophysin, Sox-2, Olig-2, p53, Ki-67 and NeuN using standard immunohistochemical techniques. Fifteen random cases were also analyzed for 1p/19q deletion by fluorescent in situ hybridization.

Results: There were 62 patients with a median age of 84 months (range 14-193 months). Femal/male ratio was equal. The tumor localizations were as follows: posterior fossa, 68% (n=42); supratentorial, 29% (n=18); spinal cord, 3% (n=2). Gross total resection was performed in 32 cases (52%) and the remainder of the cases underwent subtotal resection. There were nine recurrences (15%) with a mean recurrence free period of 12 months. All cases strongly expressed vimentin and GFAP was diffusely positive in all but four cases in

which the staining was focal. There was synaptophysin positivity in 25, neurofilament positivity in 12 and NeuN positivity in two cases. No tumor was positive for EGFR, p53, p75NTR and CD34 protein. Bcl-2 was found positive in six cases (16%). The mean Ki-67 labeling index for all tumors was 2% (range 0-8%). CD133 was detected in only one case. The mean percentage of Sox-2 positive cells was 45% (range 0-90%) and Olig-2 positive cells was 35% (range 0-90%). There were no deletions on 1p/19q analysis by fluorescent in situ hybridization.

In univariate/bivariate analysis, recurrence negatively correlated with extent of surgical resection and age at initial diagnosis, positively correlated with Ki-67 labeling index. Patients younger than 5 years of age had shorter recurrence free period even among patients with subtotal resection. Tumors with a Ki-67 labeling index higher than 2% also had a shorter recurrence free period. There was no statistically significant correlation between the expression of immunohistochemical markers and recurrence free survival.

Conclusion: The positive staining with neuronal markers highlight the challenges often experienced in practical surgical pathology in the diagnosis of pilocytic astrocytomas. While we believe most such staining were either due to incorporated normal brain tissue, immunopositivity of neuronal markers in pilocytic astrocytomas requires further scrutiny. The presence of a non-specific stem cell marker; sox-2 in pilocytic astrocytoma also suggests that some tumor cells may have stem-cell like properties, or may have been derived from sox-2 positive stem cells. Olig-2 positivity along with GFAP and vimentin simply implies a strong glial differentiation, and absence of a so-called oligodendroglial differentiation, especially in tumors that resemble oligodendroglioma, is further supported by the absence of 1p/19q deletion. p53, EGFR, p75NTR, CD133 antigens don't seem to have a role in the biological behaviour of pilocytic astrocytomas. Subtotal or incomplete surgical resection still seems to be a major risk for recurrence, so are age less than 5 years at diagnosis and Ki67 labeling index greater than 2%. Other immunohistochemical markers tested in this study were not associated with recurrence-free or overall survival. Tissue microarray method provided benefits in this study; enabled the use of a large immunohistochemical panel and in situ hybridization, and can be recommended for similar studies.

Key words: Pilocytic astrocytoma, neural stem cell, recurrence, tissue microarray method

GİRİŞ VE AMAÇ

Çocukluk çağında en sık görülen beyin tümörlerinden olan pilositik astrositomlar prognozu difüz astrositomlara göre daha iyi tümörlerdir. Pilositik astrositomlar kimi zaman regrese olabilmekte, progresyon göstermeden yıllarca takip edilebilmekte, ancak kimi zaman da tedavi sonrası nüks etmekte, hatta nadiren de olsa malign transformasyon göstermektedir.

Primer beyin tümörleri kök hücrelere benzer biçimde proliferasyon, diferansiasyon, kendini yenileme özelliğine sahip hücrelerden oluşmaktadır. Pilositik astrositomların köken aldıkları hücrelerin nöral kök hücreler olabileceği hipoteziyle, bu çalışmada pilositik astrositom hücrelerinde nöral kök hücrelerde gözlenen antijenlerin ekspresyonunu araştırdık.

Pediyatrik birincil beyin tümörlerinden izole edilen progenitör hücrelerin, diferansiasyon koşulları sağlandıktan sonra nöron veya glia özgül antijenleri eksprese edebildikleri, bu tümörlerde aynı anda hem nöron hem de glia özgül antijenleri eksprese edebilen hücrelerin de oldukça fazla sayıda olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar da bazı tümörlerde izlenen hücre çeşitliliğinin sadece tümöre ev sahipliği yapan dokunun özelliklerinden değil tümörün köken aldığı hücrelerin farklı diferansiasyonlar gösterebilme kapasitesindeki kök hücre benzeri hücreler olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir. Biz de olgularımızdaki immunohistokimyasal değişkenlikleri saptamak için glial ve nöronal belirleyicilerle pilositik astrositomların immunofenotipik kompozisyonunu doku mikroarray yöntemini kullanarak inceledik. Yüksek dereceli tümörlerde izlenen moleküler değişikliklerin bizim olgularımızdaki varlığını ve nüks gelişiminde bu moleküler yolların rolünü araştırdık.

Pilositik astrositomların kökeni aydınlatılmadığı gibi, bu tümörler içinde biyolojik olarak daha agresif seyreden örneklerin neden daha agresif seyrettiği de açıklanamamış, nüks yönünden riskli gruplar tariflenememiştir. Bu çalışmada pilositik astrositom olgularında nüks olasılığını öngörebilmeyi, nüks riski ile ilişkili faktörleri bulmayı ve kök hücre belirleyicilerinin ekspresyon sonuçları ile tümör kökeni yönünden yeni bilgilere ulaşmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

1. Pilositik Astrositom

Pilositik astrositomlar (PA) çocukluk çağında ve genç erişkinlerde sık, daha ileri yaşlarda ise oldukça nadir görülen, iyi sınırlı, yavaş büyüyen birincil merkezi sinir sistemi (MSS) tümörleridir (1). Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO)'nün 2007 yılı MSS Tümörleri Sınıflaması'na göre PA Derece I tümördür(2). Bu sınıflamada Derece I, proliferasyon potansiyeli düşük olan, tek başına cerrahi rezeksiyon ile tedavisi mümkün tümörler için kullanılmıştır. WHO 2007 MSS Tümörleri Sınıflaması'nda astrositik tümörlerin derecelendirme sistemi Anne –Mayo sistemi(3) ile büyük oranda benzerlikler taşırken Derece I astrositik tümörler için durum farklıdır. WHO'ya göre Derece I astrositomlar sadece iyi sınırlı olduğu bilinen PA'lar için geçerli iken Anne-Mayo derecelendirme sistemi Derece I tümörler kapsamına oldukça nadir görülen atipisiz difüz astrositomları da almaktadır.

Tablo 1. WHO 2007 MSS Tümörleri Sınıflaması'nda nöroepitelyal tümörler

Nöroepitelyal tümörler	
<i>-Astrositik tümörler</i>	<i>-Oligodendroglial tümörler</i>
Pilositik astrositom	Oligodendrogliom
Pilomiksoid astrositom	Anaplastik oligodendrogliom
Subependimal dev hücreli astrositom	<i>-Oligoastrositik tümörler</i>
Pleomorfik ksantoastrositom	Oligoastrositom
Difüz astrositom	Anaplastik oligoastrositom
Fibriler astrositom	<i>-Ependimal tümörler</i>
Gemistositik astrositom	Subependimom
Protoplasmik astrositom	Miksopapiller ependimom
Anaplastik astrositom	Ependimom
Glioblastom	Selüler
Dev hücreli glioblastom	Papiller
Gliosarkom	Berrak hücreli
Gliomatozis serebri	Tanisitik
	Anaplastik ependimom

Tablo 1. devamı

Nöroepitelyal tümörler	
<i>-Koroid pleksus tümörleri</i>	<i>-Pineal bölge tümörleri</i>
Koroid pleksus papillomu	Pineositom
Atipik koroid pleksus papillomu	İntermedier diferansiyasyon gösteren pineal parenkimal tümör
Koroid pleksus karsinomu	Pineoblastom
<i>-Diğer nöroepitelyal tümörler</i>	Pineal bölgenin papiller tümörü
Astroblastom	<i>-Embriyonel tümörler</i>
Üçüncü ventrikülün kordoid gliomu	Medulloblastom
Anjiyosentrik gliom	Dezmoplastik/noduler medulloblastom
<i>-Nöronal ve mikst nöronal-glial tümörler</i>	Ekstansif nodülerite gösteren medulloblastom
Serebellumun displastik gangliositomu	medulloblastom
Dezmoplastik infantil astrositomu/gangliogliomu	Büyük hücreli medulloblastom
Disembriyoplastik nöroepitelyal tümör	Anaplastik medulloblastom
Gangliositom	Büyük hücreli medulloblastom
Gangliogliom	MSS primitif nöroektodermal tümörü
Anaplastik gangliogliom	MSS nöroblastomu
Santral nörositom	MSS ganglionöroblastomu
Ekstraventriküler nörositom	Medulloepitelyom
Serebellar liponörositom	Ependimoblastom
Papiller glionöronal tümör	Atipik teratoid / rabdoid tümör
Dördüncü ventrikülün rozet oluşturan glioneuronal tümörü	
Paragangliom	

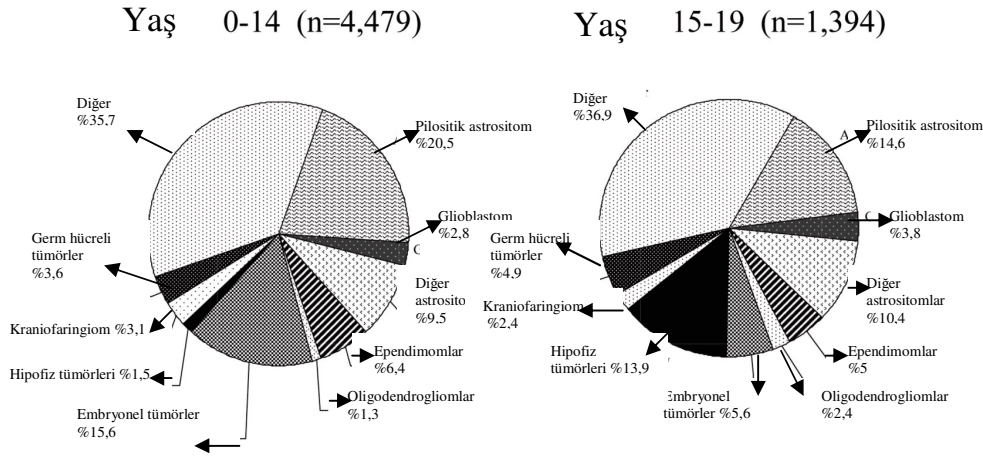
i. İnsidans

ABD Beyin Tümörleri Merkezi Arşivi'nin (Central Brain Tumor Registry of the United States, CBTRUS) 2000-2004 yılları arasındaki kayıtlarına göre hazırlanan 2007-2008 İstatistik Raporu'na göre çocukluk çağında lösemilerden sonraki ikinci en sık malignite primer beyin tümörleridir (1). Beyin tümörleri çocukluk çağının en sık solid tümör grubu olup, çocukluk çağında solid tümörlere bağlı ölümlerin en sık nedeni birincil beyin

tümörleridir. PA'lar bu istatistik raporunda önceki istatistik raporları ile devamlılığı sağlamak amacıyla malign beyin tümörleri arasında yer almıştır.

Birincil beyin tümör insidansı tüm yaş gruplarında 100.00 kişide 16.5, 0-19 yaş arasında ise 100.000 kişide 4.5'tir Kayıtlara göre 2000-2004 yılları arasında birincil MSS tümörü tanısı almış toplam 73.583 hastanın %36'sını glial tümörler ve %2.1'ini (1553 olgu) PA oluşturmaktadır. 1120 PA'lı hasta 20 yaşın altında olup, bunların 316'sı 0-4 yaş arasında, 324'ü 5-9 yaş arasında, 276'sı 10-14 yaş arasında, 204'ü 15-19 yaş arasındadır. Bu sonuçlara göre PA'nın 0-4 yaş arasında ikinci en sık birincil MSS tümörü, 5-19 yaş arasında ise en sık MSS tümörü olduğu saptanmıştır (Tablo 2). PA tanısı alan hastaların yaşlarının ortanca değeri 12 yıl olarak bulunmuştur(1).

Şekil 1. Çocukluk çağı primer beyin tümörlerinin histolojik türlere göre dağılımı(1)



Tablo 2. Yaşa göre en sık görülen MSS tümörleri(1)

Yaş (yıla göre)	En sık histolojik tür	İkinci en sık histolojik tür
0-4	Embriyonel/primitif/medulloblastom	Pilositik astrositom
5-9	Pilositik astrositom	Embriyonel/primitif/medulloblastom
10-14	Pilositik astrositom	Malign gliom
15-19	Pilositik astrositom	Hipofiz tümörleri

0-19 yaş arasında tanı almış 1120 PA olgusunun 576'sı kız, 544'ü erkektir. Kız ve erkeklerde PA görülme insidansları arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır(1). PA'lar nadir de olsa erişkinlerde görülebilir(4). Erişkinlerde görülen PA olgularının çoğunlukla erken yaşlarda ortaya çıkan, ancak uzun süre klinik bulguya yol açmamış tümörler olduğu düşünülmektedir(5).

ii. Tümörün anatomik yerleşimi

PA'lar tüm nöroaksiste yerleşim gösterebilirler. Çocukluk çağında daha sıklıkla infratentorial bölgede, bu bölgede de en sık serebellumda yerleşim gösterdikleri bilinmektedir. Yine çocukluk çağında supratentorial bölgede en sık hipotalamus/optik yolakta yerleşirler(6). Bunun dışında talamus, bazal ganglia, serebral hemisferler ve beyin sapında da yerleşim gösterebilirler(2).

Beyin sapı gliomları çocukluk çağı gliomlarının yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır. Beyin sapında ventral ponstan çok genellikle orta beyin ve medulla yerleşimlidirler (7). Medulla spinalis yerleşimli PA'lar seyrek ve genellikle daha ileri yaşlarda görülür(8). Ancak medulla spinalis tümörlerinde bu anatomik bölgede cerrahi girişimin yaratacağı olası riskler nedeniyle doku tanısı almamış tümör sayısı da oldukça fazladır. Bu tümörlerin bir bölümü radyolojik olarak PA'yı desteklese de bu sonuçlar PA'nın yerleşim bölgelerine göre verilen oranlara yansımamaktadır.

iii. Radyolojik bulgular

PA'lar radyolojik görüntülemelerde genellikle iyi sınırlı ve gadalinyum verilmesi sonrası görüntüleme tekniklerinde kontrast tutan tümörlerdir. T1 ağırlıklı magnetik rezonans görüntülemelerde(MRG) hipointens, T2 ağırlıklı MRG'de hiperintens görünürler. Kistik görünüm ile birlikte mural nodül varlığı sıktır(9). Mayo Clinic Rochester'da 1995 yılında yapılan bir çalışmada 56 PA olgusunun %64'ünde çevre parenkimin, hatta beyaz cevherin infiltrasyonu gözlenmiştir(10). Başka bir çalışmada ise MRG'de persistan meningeal gadalinyum tutulumunun PA'de görülebildiği, ancak bu bulgunun agresif davranış göstergesi olmadığı bildirilmiştir(11). Beyin sapı PA'larında ekzofitik komponent varlığı görülmektedir(2, 12).

iv. Makroskobik bulgular

Genellikle gri beyaz renkte, sınırları seçilebilen tümörlerdir. Tümör içinde veya çevresinde kist oluşumu sıktır. Uzun süreli lezyonlarda kalsifikasyon görülebilir (2).

v. Histopatolojik bulgular

PA'lar bipolar hücrelerin oluşturduğu, Rosenthal fibrillerden zengin kompakt alanlar ve multipolar hücrelerin oluşturduğu mikrokistler ile eozinofilik granüler cisimlerden zengin gevşek alanlar içeren bifazik görünüme sahiptir. Difüz astrositomlar için anaplastik özellikler sayılabilecek glomeruloid vasküler proliferasyon ve nekroz PA'lar için dereceyi yükseltmeyecek olası bulgulardır(13). Ancak yüksek dereceli difüz astrositomların bir özelliği olan endotelial proliferasyon bu tümörlerde gözlenmez(14). Regresyon bulguları olarak hyalinize damar yapıları, hemosiderin birikimi, kalsifikasyon, perivasküler lenfositler görülebilmektedir(15). Hiperkromatik ve pleomorfik nükleuslu hücreler de PA'da tümöral alanlarda izlenebilir. Seyrek mitoz görülebilir (2).

Kompakt alanlardaki uzun, saçsı uzantıları olan bipolar hücreler benign görünümündedir. Bu alanlarda sıklıkla rastlanan Rosenthal fibriller aslında astrositlerde intrasitoplazmik yerleşimli inklüzyonlardır. İlk olarak 1898 yılında Werner Rosenthal tarafından "ampul ya da dalgalı bir sosis şeklinde, bir ucu geniş diğer ucu dar, parlak oluşumlar" olarak tanımlanmıştır. PA ve gangliogliom gibi neoplastik dokularda görülebileceği gibi, kist ya da vasküler malformasyonları çevreleyen reaktif gliotik dokuda, Alexander Hastalığı gibi genetik bozukluklarda da görülebilmektedir(16). Mikrokistik alanlardaki hücreler ise "protoplazmik astrositler" olarak isimlendirilen, oval-yuvarlak şekilli, sitolojik olarak benign nükleuslu, kısa örümcek ağı benzeri uzantıları olan hücrelerdir. Bu alanlarda eozinofilik granüler cisimler ve hiyalen damlacıkları sıklıkla gözlenir(17, 18). Bunlar PAS pozitif intrasellüler birikimlerdir. PA dışında ganglion hücreli tümörler ve pleomorfik ksantoastrositomlarda (PXA) da görülebilirler(19). Tümör içerisinde oligodendrosit benzeri hücreler gözlenebilir(2).

Bifazik patern en sık serebellar tümörlerde gözlenir, ancak tüm lokalizasyonlar için her zaman gözlenemeyebilir. Bazen paternlerden yalnızca biri gözlenir. Kimi zaman ise özellikle leptomeningial tutulum olduğunda belirgin dezmoplastik reaksiyonun neden olduğu lobüler bir görünüm, bazen de tümöral hücrelerde çit benzeri dizilim ya da organoid yapılar görülebilir (2). Bu durumlarda tümörün sınıflandırılması konusunda güçlükler yaşanabilir.

Difüz gliomlara göre PA'lar oldukça iyi sınırlıdır, ancak çevre parenkime birkaç milimetreden santimetrelere kadar ilerlemiş olabilecekleri bilinmektedir. Bu durumlarda arada sıkışmış nöronal hücreler izlenebilir. Ancak bu nöronlar sitolojik olarak tamamen benign görünümündedir(2),(20). PA'larda tümör subaraknoid alana ya da perivasküler boşluklara uzanabilmekte, leptomeningial yayılım gözlenebilmektedir(21).

vi. Histolojik varyant, Pilomiksoid Astrositom(PMA):

İlk olarak 1999 yılında Tihan ve ark. tarafından morfolojik ve klinik özellikleri tanımlanan pilomiksoid astrositomlar 2007 WHO sınıflamasında pilositik astrositomların histolojik varyantı olarak kabul edilmiştir(22, 23). Bu tümörler tipik olarak hipotalamik/kiazmatik bölgede yerleşirler. Ancak talamus, serebellum, beyin sapı, temporal lob ve medulla spinaliste yerleşen PMA'lar bildirilmiştir (11). Histolojik olarak belirgin miksoid matriks ve monomorf, bipolar tümör hücrelerinin anjiosentrik yerleşimi ile karakterizedir. PMA özellikle yenidoğan ve erken çocukluk çağında görülmektedir. Lokal nüks ve beyin-omurilik yayılımı PA'lara göre daha sıktır. WHO çalışma grubu tarafından Derece II olarak değerlendirilmiştir(2).

vii. Klinik seyir

1969'da Matson DD, PA'nın çocukluk çağında görülen beyin tümörleri içinde en iyi prognozlu tümör olduğunu belirtmiştir ve günümüze dek PA'ların prognozlarına ilişkin pek çok çalışma yapılmış, pek çok makale yayınlanmış, PA'nın çok farklı şekillerde seyredebileceğini gösteren olgular bildirilmiştir(24). Yine de PA'nın bugün için de en iyi prognozlu çocukluk çağı beyin tümörü olduğu söylenebilir. CBTRUS raporuna göre PA'lar için 5 yıllık sağkalım hızı %92 olarak bildirilmiştir (1).

PA'lar zaman içinde regrese olabilmektedir(25). Nüks ise genellikle ilk 5 yılda görülmekle birlikte literatürde daha geç nüksler de bildirilmiştir(26). Leptomeningial yayılım ve çok nadir olsa da malign transformasyon gösteren olgular yayınlanmıştır(27, 21)-33). Ancak malign transformasyon gösteren olgular daha önce radyoterapi almış olgulardır ve radyasyonun bu malign değişiklikte rolü olabileceği düşünülmektedir (28).

viii. Tedavi

PA'lara uygulanan tedavi merkezlere göre ve tümörün yerleşimine göre farklılıklar göstermektedir. Olgulara sadece total/subtotal eksizyon, kemoterapi, radyoterapi ya da çeşitli kombinasyonlar uygulanabilmektedir(29-32).

ix. Sitogenetik özellikler

Bugüne dek yapılan çalışmalar PA'ya yol açabilecek genetik değişiklikleri anlamlı bir şekilde aydınlatamamıştır. Sitogenetik çalışmalarda PA'lardaki gen ekspresyon profillerinin infiltratif astrositomlardan tamamen farklı olduğu görülmüştür(33, 34). İnfiltratif gliomlarda sıklıkla görülen EGFR amplifikasyonu, p53 mutasyonu, PTEN kaybı gibi moleküler değişikliklere de PA'larda rastlanmamaktadır (2).

Bir bölümü optik sinirde olmak üzere bazı PA olguları nörofibromatozis tip 1(NF1) ile birlikte görülebilmektedir. NF1 olgularının %15'inde PA saptandığı, PA olgularının ise yaklaşık üçte birine NF1'in eşlik ettiği bilinmektedir. Bu olgularda NF1 gen kaybı ürününün Ras ve siklik adenosin monofosfat sinyal yollarını aktive ettiği saptanmıştır(35, 36). Sporadik pilositik astrositomlar ise çok daha sıktır ve sporadik olgularda NF1 mutasyonu ya da kaybı görülmemektedir(37, 38) .

Eli ve ark.(39) tarafından yapılan ve 2008 yılında yayımlanan bir çalışmada daha önce yapılan sitogenetik ve karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH) çalışmalardan farklı olarak daha küçük kromozomal kazanım ya da kayıpları belirleyebilecek duyarlılığı daha yüksek bir yöntem olan oligonükleotid array CGH ile 25 PA olgusu incelenmiştir. Olguların %68'inde 7q34 bölgesinde fokal kazanım olduğu görülmüştür. Bu bölge melanom, tiroid ve kolon karsinomlarında görülen "mitogen-activated protein kinase" yolağını aktive ederek tümör büyümesinin promosyonunda rol alan BRAF lokusunu içermektedir(40). Bu sonuçlar bu kaskaddaki pek çok kinazı inhibe edebilecek yeni ilaçların bulunmuş olması nedeniyle umut vericidir.

2. Nöral kök hücreler

Beyin tümörleri farklı nöral köken belirleyicilerini ifade eden çok çeşitli hücrelerden oluşmaktadır(41). Beyin tümörlerini sadece temel morfolojik ve fenotipik özellikleri ile

incelemek tümörlerin biyolojik davranışlarını sınırlı olarak aydınlatılmaktadır, çünkü benzer morfoloji ya da fenotipe sahip beyin tümörleri çok farklı klinik seyirler gösterebilmekte ve tedavilere çok farklı yanıtlar verebilmektedir. Pek çok beyin tümörünün sınıflandırmasında da güçlükler yaşanmaktadır. Bu nedenle beyin tümörlerini daha iyi anlamak için yapılan çalışmalarda son dönemlerde sıklıkla karşılaşılan hipotez beyin tümörlerinin kanser kök hücrelerinden köken alabileceği yönündedir(42). Kanser kök hücreleri normal kök hücreler gibi kendini yenileme, çoğalma ve bazı ortak hücre belirleyicilerini ifade etme özelliğine sahiptirler(43). Bazı çalışmalar kanser kök hücrelerinin, tümöral hücrelerdeki oranının çok az olmasına karşın tümör gelişiminde rol oynayan esas hücreler olabileceğini göstermiştir(44). Son çalışmalarda “side population stem cells” olarak adlandırılan bu hücrelerin normal dokuda %0,001-%5 arasında görülen, yüksek proliferasyon potansiyeline sahip olmakla birlikte nadiren bölünen, kendini yenileme özelliğine sahip hücreler olduğu belirtilmektedir(45). Yapılan çalışmalarda bu hücrelerde, diferansiye olmuş ve bölünme özelliği olmayan matür hücrelere oranla genomik değişikliklerin daha fazla birikebileceği görüşü ağırlık kazanmış ve kanser kök hücrelerinin de dokuya özgü normal kök hücrelerden gelişiyor olabileceği gösterilmiştir(42).

Erişkin MSS’de yüksek düzeyde özelleşmiş nöronal ve glial hücreler bulunmaktadır. Embryolojik gelişim sürecinde totipotent nöral krest kök hücreleri sırasıyla intermedier öncüllere, unipotent öncüllere, son olarak da diferansiye olmuş mezektoderm hücreleri, melanoblast, nöron ve glia hücrelerine doğru ilerler. Nöron ve gliaların nöral kök hücre diferansiyasyon aşamalarında son evreyi temsil ettikleri düşünülmektedir. Hücre hattı çalışmaları MSS’de nöronlar, astrositler ve oligodendrositler olmak üzere 3 ana hücre türünün geliştiği kök hücrelerin varlığını ortaya çıkarmıştır. Bazı kök hücreler hem nöronları hem oligodendrositleri, bazıları da hem nöronları hem de astrositleri ortaya çıkarabilmektedir. Multipotent nöral kök hücreler embryonel ve erişkin MSS’nin pek çok farklı bölgesinden izole edilmiştir. Nöropoetik kök hücre popülasyonunun yaşam boyunca varlığının gösterilmesi erişkin beyinde sürekli ortaya çıkan yeni nöronların varlığını da aydınlatmıştır(46).

Kök hücre biyolojisinde geline bu yeni aşamada MSS’de tümörigeneze dair pek çok yeni hipotez dikkati çekmektedir. Patologlar tarafından histopatolojik olarak incelenen ve çoğu zaman ayırıcı tanı sıkıntısı yaratan tümöral hücrelerin, diferansiye olmuş nöronlar, astrositler ya da oligodendrositlerin değil transforme olmuş öncül hücrelerin gelişimsel bir basamağının fenotipini yansıttığı olabileceği ve son olarak beyin tümörleri sınıflamasının bile

tümörün köken aldığı kök hücreye göre yapılabileceği düşünülmektedir(46). Bu yaklaşıma göre bipotansiyel bir öncülün oligoastrocitom gelişimine, hücre kökeni daha sınırlanmış bir progenitörün pür oligodendrogliom ya da astrocitom gelişimine yol açabileceği düşünülebilir. Gangliogliomlar hem nöronal, hem glial diferansiasyon özelliğine sahip çok daha erken dönemde ortaya çıkan öncül hücrelerden köken alıyor olabilir. Bazı gliomların multifokal oluşu gelişimin daha erken aşamalarındaki immatür glial progenitörlerin göç edebilme potansiyelleri ile açıklanabilir. Pediatrik astrocitomların ve yüksek dereceli glial tümörlerin nöral kök hücreden köken alabilme olasılığının primitif nöroektodermal tümörlerden (PNET) daha yüksek olduğu yönünde bulgular vardır(47). Tüm beyin tümörleri farklı transformasyonlara uğramış tek bir kök hücreden mi, yoksa glial tümörler diferansiasyonun daha ileri aşamalarındaki bir hücreden mi köken almaktadır? Daha gliojenik ama hala multipotent bir kök hücre? Çalışmalar astrocitomların normal nöral kök hücrelerin kaynağı olan lateral ventrikülün subventriküler bölgesi ve hipokampüsten ortaya çıktığını göstermektedir. Bu da kök hücre hipotezini güçlendirmektedir(48, 49).

İlk olarak meme kanserleri ve akut myeloid lösemilerde deneysel çalışmalarla gösterilen kök hücre kökeni son beş yılda beyin tümörlerinin deneysel hayvan modelleri ile araştırılması sonucu aydınlık kazanmaya başlamıştır(50). Bazı beyin tümörlerinden nöral öncüllerin izolasyonu başarılmıştır(51). İzole edilen hücrelerden oluşturulan kültürlerin deney hayvanlarına implantasyonu ile orijinal tümöre çok benzer morfolojide tümör oluşumu gözlenmiştir(51, 52). Hemati ve ark.(43) tarafından yapılan bir çalışmada farklı birincil beyin tümörü hücreleri izole edilmiş, hücre kültüründe bu hücrelerin tıpkı nöral kök hücreler gibi nörosferler oluşturduğu, ortama diferansiasyon koşulları eklenmediği durumda matür nöron ve glialarda bulunan antijenlerin görülmediği, ortama diferansiasyon koşulları eklendiğinde ise hücrelerin tıpkı orijinal tümör hücrelerindeki gibi antijen ekspresyonu gösterdiği, kök hücre belirleyicilerinin ekspresyonunun ise azalmış olsa da hala izlenebildiği gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada tümörden izole edilen hücrelerin oluşturduğu nörosferlerin, normal beyin dokusundan izole edilen hücrelerin oluşturduğu nörosferlerden uzun ömürlü olma ve aşırı çoğalma özellikleri ile farklılık gösterdiği izlenmiştir. Benzer sonuçlar Yuan ve ark.(53) tarafından yapılan çalışmada da saptanmıştır. Bu da tümörde bulunan kök hücre benzeri hücrelerin aslında transformasyon ile anormallikler kazanmış özelliklere sahip, tümör gelişimine neden olmuş kök hücreler olduğu savını güçlendirmektedir. Bu durum da tümörden izole edilen progenitör hücrelerin kanser kök hücresi olarak isimlendirilmesini sağlamıştır(43). Bu çalışmaların pek çok tümörün biyolojik davranışını, morfolojik yapısını

ve sitogenetik deęişikliklerini anlamak konusunda yol gösterici olabileceği öngörülmektedir(51).

Çalışmalar, kök hücrelerin tedaviye sağlayabilecekleri avantajları da araştırmaktadır. Onkogen yardımıyla immortalize olan öncül hücrelerin tümör içerisine transplantasyonu ile öncül ilaçların aktif forma dönüştürülmesi ve deneysel modellerde gliomlarda sağkalım sürelerinin uzatılması sağlanmıştır(46). Başka bir çalışmada ise transplante edilen kök hücreler tümöral bölgede belirgin bir tropizm göstererek tümör hücrelerinin “avlanması” sağlamıştır(54). Myelinden yoksun deneysel modellerde glial progenitör hücreler myelin yapımını sağlamış, klonlanmış embriyonel kök hücreler implante edildikleri dokuda dopaminerjik nöronlara dönüşerek terapötik yaklaşımlar için umut verici sonuçlara yol açmışlardır(55). Ancak bu sonuçların klinik uygulamalarda değerlendirilmesinin pek çok sınırı vardır. Yeniden programlama sırasında oluşabilecek hataların yol açabileceği gelişimsel defektler ve kök hücrelerin yeni tümöral oluşumlara yol açabilme riski bunların başında sayılabilir(46). Kök hücrelerin sinir sisteminde terapötik amaçlarla kullanılabilmesi için kök hücreleri inceleyen daha pek çok çalışmanın yapılması gerekmektedir.

Kök hücrelerle ilgili yapılan çok sayıda çalışma daha duyarlı ve özgül kök hücre belirleyicilerinin bulunabilmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Kök hücrelerin normal bir dokudaki ve tümör dokusundaki özelliklerini aydınlatabilecek belirleyici panellerinin çalışılması son derece önemlidir.

3. Kök hücre çalışmalarında kullanılan immunohistokimyasal belirleyiciler

i. GFAP

Astrositlerin hem normal hem patolojik durumlardaki en özgül antijenidir(56). Matür astrositlerdeki intermedier filamen proteindir. Ne var ki son çalışmalarda GFAP eksprese eden ancak daha sonra nöronal hücrelere diferansiye olabilen nöral kök hücrelerin varlığı gösterilmiştir (57).

ii. Vimentin

İntermedier filamen proteindir. Merkezi sinir sisteminde matür/ matürleşmekte olan astrositlerde bulunur(58).

iii. Sinaptofizin

Nöronların presinaptik veziküllerinde bulunan membran glikoproteinidir(59). Nöronal diferansiasyonda akson gelişimi ile birlikte eksprese edilmeye başlar(60).

iv. Nörofilamen

Tip IV intermedier filamendir. Akson iskeletini oluşturur. Nörona özgül bir protein olup matürleşmekte olan ve matür nöronlarda bulunur(61).

v. NeuN

Matür nöronlarda bulunan ve DNA'ya bağlanan, nörona özgül proteindir. Nöronal diferansiasyonun son aşamasında oluşur(62).

vi. P53

p53 tümör supresör geninin kodladığı, fizyolojik stres ve DNA hasarı sonrası gelişen sinyalleri ileterek hücre proliferasyonu ve apoptozu başlatan bir transkripsiyon faktörüdür. Mutasyonu tüm kanserlerin yaklaşık yarısının gelişiminde rol oynar. Anaplastik astrositomlarda mutasyonuna sıklıkla rastlanır(63).

vii. EGFR

Epidermal büyüme faktörüne bağlanan bir yüzey glikoproteinidir. Liganda bağlanması ile reseptör dimerizasyonu, tirozin otofosforilasyonu ve hücre proliferasyonu başlar. Proteini kodlayan genin amplifikasyonu, akciğer kanseri, de novo glioblastom gelişiminde rol oynamaktadır(64).

viii. Ki-67

Prolifere olan hücrelerin hücre siklusunda G1, S, G2 ve M fazlarında eksprese edilen bir nükleer antijendir(65).

ix. Bcl-2

Bax ve Bad hücre ölümü promotörleri ile etkileşimi veya homodimerizasyonu ile apoptozu suprese eder(66).

x. p75NTR

Fas tümör nekroz faktörü reseptör ailesinin bir üyesi olup, sinir sistemi gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Nöronlarda aksonal gelişimi artıran ya da engelleyen, nöronal hücre ölümünü başlatan veya azaltan, nöronal rejenerasyonu engelleyebilen, genellikle zıt yönde ikili role sahip bir proteindir. Gelişim sırasında Schwann hücre göçünde de rol oynar(67). Bazı medulloblastomlarda tümör hücrelerinde ekspresyonu gösterilmiştir(68). Gliom hücrelerinin gelişimi ve apoptozunda rol oynadığı, Jonston ve ark.(69) yaptığı bir çalışmada da gliom hücrelerinin invazyonunda rol aldığı gösterilmiştir.

xi. CD133

İlk bulunduğu hematopoetik kök hücre ve progenitor hücrelerin plazma membranında bulunan bir protein olduğu düşünülüyordu. Günümüzde hematopoetik olmayan kök hücrelerde de varlığı gösterilmiştir. Hücre kültürlerinde geliştirilen nöral kök hücrelerde izole edilmiştir(41, 45).

xii. CD34

Hematopoetik kök hücrelerin, progenitor hücrelerin, bazı mezenkimal hücrelerin yüzeyinde bulunan ve adezyon sağlayan bir glikoproteindir. CD34 pozitif hematopoetik kök hücrelerden nöronal, glial ve oligodendroglial diferansiyasyon gelişimini gösteren in vitro çalışmalar bulunmaktadır(70).

xiii. Sox-2

HMG Box transkripsiyon faktörüdür. Nöroglial kök hücrelerin gelişiminde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Santral sinir sistemi gelişiminin ilk dönemlerinde tüm

nöroepitelyumda, ilerleyen dönemlerde germinal matriksteki nöroglial kök hücrelerde eksprese edilir. Hücre proliferasyonunu sağlar(71).

xiv. Olig-2

Heliks-loop-heliks transkripsiyon faktörüdür. Oligodendrosite matürasyon gösteren nöral kök hücrelerde ve erişkinde oligodendroglial hücrelerde daha belirgin olmak üzere glial hücrelerde eksprese edilir(72).

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, 1990- 2005 yılları arasında PA tanısı alan ve tanıları uzman bir Nöropatolog (Prof. Dr. Tarık Tihan, California Üniversitesi, San Francisco, ABD) tarafından yeniden değerlendirilen 62 olgu materyali üzerinde yapıldı. Her bir hastanın tıbbi kayıtlarından tanı anındaki yaş, cinsiyet, tümörün yerleşimi ve lateralizasyonu, cerrahi eksizyonun genişliği, ilk nüksün tarihi, kemoterapi ya da radyoterapi uygulanıp uygulanmadığı, ölüm tarihi veya son klinik izlem tarihi belirlendi. Klinik bilgisi veya patoloji materyali yetersiz olan olgular çalışmadan çıkarıldı. Nüks radyolojik olarak yeni tanımlanan bir lezyonun varlığı, nüks tarihi ise yeni tanımlanan lezyonun radyolojik görüntüleme işleminin gerçekleştiği tarih olarak belirlendi.

1. Patoloji materyalleri ve doku mikroarrayleri (Şekil 2)

Etik kurullardan gerekli izinler alınarak çalışmada kullanılan dokuların tümü klinik amaçlarla kullanılması gerekmeyen dokulardır. Tüm patoloji örnekleri hem tanının doğrulanması, hem de immunohistokimyasal çalışma yapılması ve doku mikroarrayi hazırlanması için formalin tespitli, parafine gömülü dokulara ait uygun blokların seçilmesi için gözden geçirildi. Doku mikroarraylerinde kontrol dokusu olarak otopsi veya cerrahi materyallerden elde edilen ve herhangi bir patoloji saptanmayan fetal beyin (serebral korteks ve serebellum), erişkin beyin (serebral korteks ve serebellum), plasenta, fetal kalp, erişkin karaciğer, over, tonsil ve iskelet kasına ait dokular kullanıldı. Ayrıca immunohistokimyasal çalışmadaki her bir antikör için üretici firmalar tarafından önerilen dış kontrol dokuları kullanıldı.

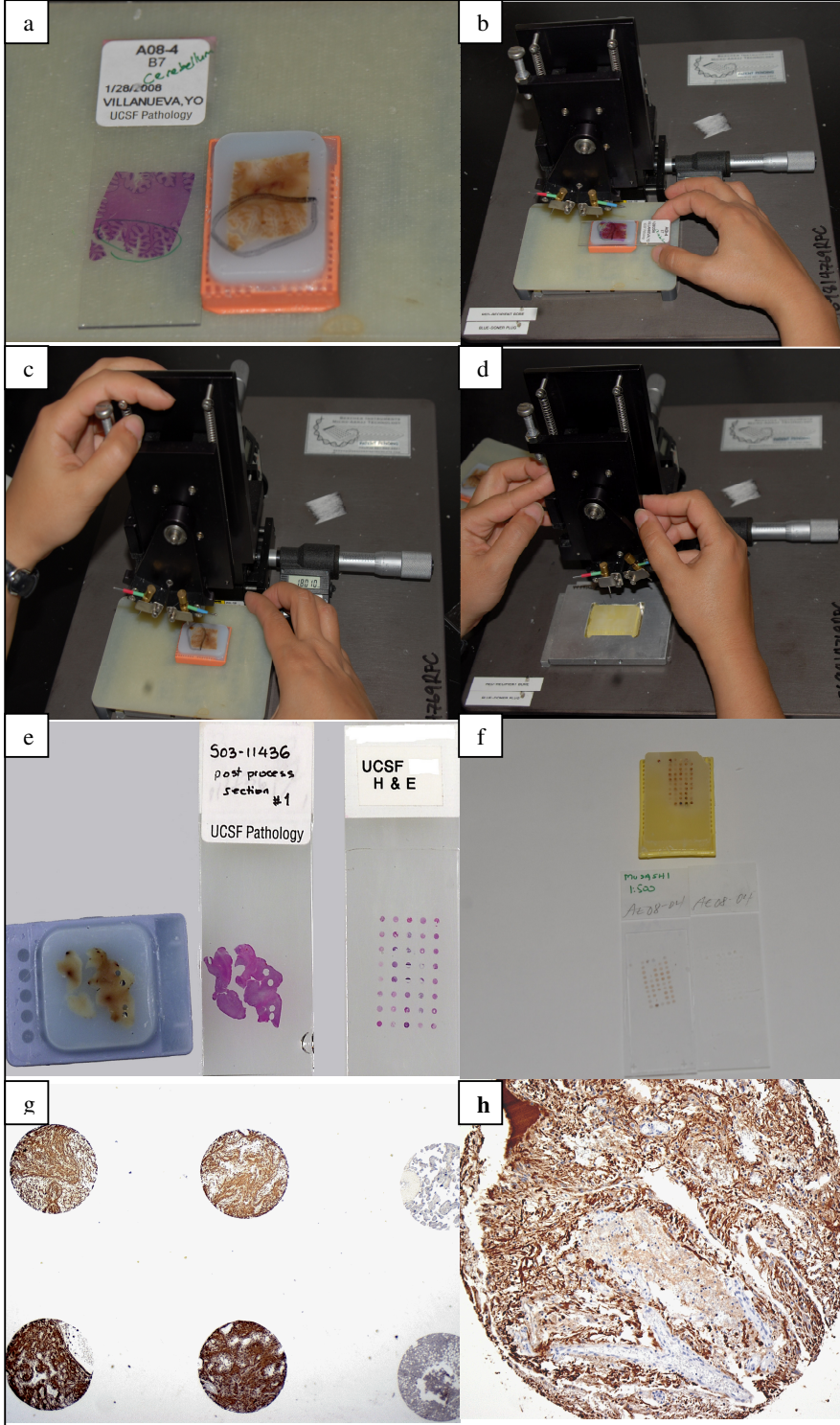
Tüm doku mikroarray blokları ve kesitler California Üniversitesi, San Francisco (UCSF) Cerrahi Nöropatoloji Laboratuvarı'nda hazırlandı. Doku mikroarray blokları 62 PA tanılı olgunun cerrahi materyalleri, 20 fetal otopsi ve 10 erişkin otopsisine ait beyin dokularından hazırlandı. Her bir PA olgusunun Hematoksilen ve Eosin (H&E) boyalı lamalarında tümörün genel morfolojisini temsil eden 1 mm²'lik en az iki alan işaretlendi. Parafin blokta, işaretlenmiş olan bu alanın karşılığında 1 mm²'lik iki doku 5x10 matriksine göre, mikroarray bloğuna 2 mm'lik aralıklarla doku arrayer (Beecher Instruments, Silver Spring, MD) kullanılarak yerleştirildi. Her bir PA doku mikroarray bloğuna bu yöntemle 20 doku örnek çifti (40 doku) ve 10 iç kontrol dokusu yerleştirildi. Erişkin beyin doku

mikroarray blokları için her biri 1 mm²'lik serebral korteksten üç doku, beyaz cevherden üç doku, serebellumdan iki doku 5x10 matriksine göre yerleştirildi. 10 farklı erişkin otopsisine ait dokular kullanıldı ve iki mikroarray bloğu hazırlandı. Fetal doku mikroarray blokları 20 hafta ve 40 hafta arasında değişen gestasyonel yaşlardaki 15 fetusa ait otopsi materyallerinden hazırlandı.

İmmunohistokimya ve in situ hibridizasyon çalışmaları için tüm doku mikroarray bloklarından Poly-L-Lysine ile kaplı lamlara 4 mikron kalınlığında seri kesitler hazırlandı.

2. İmmunohistokimyal yöntem

İmmunohistokimyasal (İHK) yöntemde kullanılan her bir antikorun optimizasyonu için uygun konsantrasyon ve koşullar (Tablo 3) belirlendi. İmmunohistokimyasal yöntem için, kesitler kuruduktan sonra bir gece boyunca 56⁰ C'deki etüvde bekletildi. Kesitler ksilende deparafinize edildikten sonra azalan konsantrasyonlarla alkolden geçirildi (%100, %70, %50, %30) ve distile suda yıkandı. Antijeni açığa çıkarmak için kesitler, pH'sı 6.0 olan sitrat tamponla dolu şalelere yerleştirilerek 5-25 dakika süreyle 50⁰ C'ye ayarlanmış Hobbs düdüklü tencerede (Guilford, CT) ısıtıldı. Süre tamamlandığında kesitler sitrat tamponu içerisinde 20 dakika süreyle soğumaya bırakıldı. Endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için lamlar önce %3'lük hidrojen peroksidaz solüsyonunda 10-30 dakika, daha sonra kazein solüsyonunda 10-20 dakika bekletildi. Endojen biotinden kaynaklanabilecek özgül olmayan boyanmayı engellemek için avidin-biotin blokaj sistemi(DAKO Corp, Carpinteria, CA) kullanıldı. Kesitlere her bir antikor için optimize edilmiş inkubasyon süreleri boyunca birincil antikorlar uygulandı. Daha sonra türe özgül ikincil antikor kitleri uygulandı ve 3,3'-diaminobenzin (73) ile renk oluşması sağlandı. Lamlar her bir basamak arasında en az 2 dakika süreyle DAKO yıkama tamponunda bekletildi. Son olarak kesitler zıt boyama için 1 dakika süreyle hematoksilen ile boyandı, dehidrate edildi, ksilen ile şeffaflandırıldı ve lamel ile kapatıldı.



Şekil 2. Mikroarray kesitlerinin hazırlık süreci

- a. Örneklenecek alanın H&E boyalı kesitte ve bu alanın bloktaki karşılığında işaretlenmesi
b-c. Verici bloktan doku örneğinin arrayer verici iğnesi ile alınması
d. Alıcı bloкта alıcı iğne yardımı ile doku için boşluk açılması, bu boşluğa verici iğnedeki dokunun yerleştirilmesi
e. Verici bloğun işlem sonrası görünümü, hazırlanan H&E boyalı array kesiti
f. Alıcı bloğun işlem sonrası görünümü, İHK boyalı ve boş array kesitleri
g-h. Array kesitlerinin mikroskopik görüntüleri

Tablo 3. Çalışmada kullanılan immunohistokimyasal antikorlar

Antijen	Antikor alttipi	Dilüsyon	Üretici firma
Sox-2	Tavşan poliklonal	1:5000	Santa Cruz Biotechnology
Olig-2	Tavşan poliklonal	1:500	Abcam
Neurofilament	Fare monoklonal	1: 20,000	SIGMA-ALDRICH
NeuN	Fare monoklonal	1: 2000	Chemicon
CD34	Fare monoklonal	1:100	DAKO
Bcl-2	Fare monoklonal	1:500	DAKO
P53	Tavşan poliklonal	1:200	Santa Cruz
EGFR	Fare monoklonal	1:200	DAKO
Sinaptofizin	Tavşan poliklonal	1:150	DAKO
Vimentin	Fare monoclonal	1:1200	Zymed
GFAP	Tavşan poliklonal	1:5000	DAKO
CD133	Tavşan poliklonal	1:2000	Abcam
p75NTR	Tavşan poliklonal	1:100	Abcam

3. İmmunohistokimyasal değerlendirme

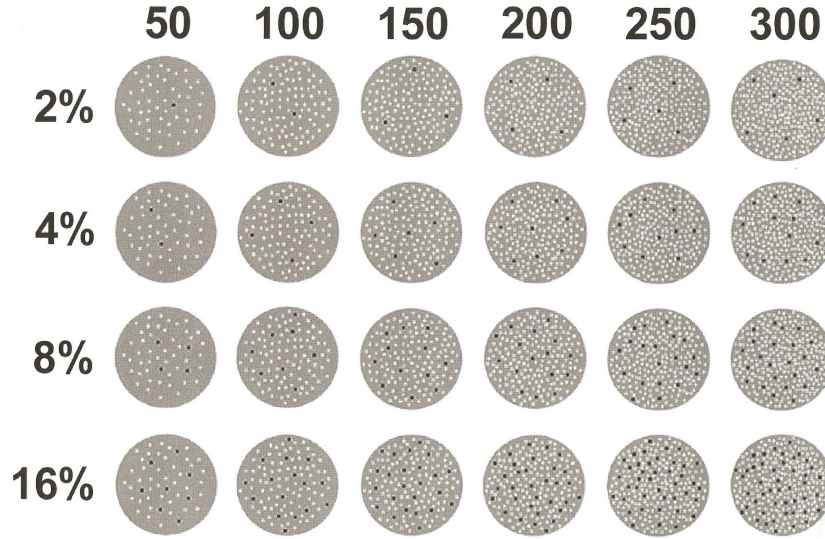
i. Sitoplazmik/membranöz ekspresyonun değerlendirilmesi

CD133, CD34, p75NTR, bcl-2, EGFR, nörofilaman, GFAP, Vimentin, sinaptofizin antikorları için beklenen sitoplazmik ve membranöz ekspresyonlar semi-kantitatif olarak skorlandı. Pozitif ve negatif kontrol için kullanılan dokulardaki boyanma paterni yardımıyla her bir antikor için boyanma gösteren tümör hücrelerinin boyanmayan tümör hücrelerine oranları belirlendi. Boyanma şiddetleri arasındaki farklılıklar göz önüne alınmadı, pozitif kontrol olarak kullanılan dokulardaki boyanmaya benzer nitelikteki tüm boyanmalar pozitif olarak kabul edildi. Bu değerlendirme sonrasında sonuçlar, dağılımı uygun biçimde yansıtacağı düşünülerek dört grupta sınıflandırıldı: 0-Negatif boyanma = Hiçbir tümör hücresinde boyanma izlenmemesi 1- Pozitif kontroldeki boyanmaya benzer nitelikteki boyanmanın tüm tümör hücrelerinin %25'inden azında görülmesi 2- Pozitif kontroldeki boyanmaya benzer nitelikteki boyanmanın tüm tümör hücrelerinin %25-50'sinde görülmesi 3- Pozitif kontroldeki boyanmaya benzer nitelikteki boyanmanın tüm tümör hücrelerinin %50-75'inde görülmesi 4- Pozitif kontroldeki boyanmaya benzer nitelikteki boyanmanın tüm tümör hücrelerinin %75'inden fazlasında görülmesi

ii. Nükleer ekspresyonun değerlendirilmesi

SOX-2, Olig-2, p53, Ki-67, NeuN antikorlarında beklenen nükleer ekspresyon 100 tümör hücresi sayılarak skorlandı. Skorlama en yüksek olasılık endeksine ulaşmak amacıyla boyanmanın en fazla olduğu alanlarda yapıldı. Skorlama sırasında manüel sayma yöntemi ile yeterli korelasyon gösteren bir yöntem olduğu yayınlanmış olan ve Şekil 3'de bir örneği görülen yardımcı şemalar kullanıldı(74). Şemalardaki örneklere göre, izlenen toplam hücre sayısı ve immunohistokimyasal olarak pozitif hücre sayısına dayalı oranlar array kesitleri ile karşılaştırılarak, en fazla benzerlik gösteren oranlar yaklaşık pozitif değerler olarak kabul edildi.

Şekil 3. Nükleer ekspresyonu karşılaştırmalı skorlamak için yardımcı şema



İmmünohistokimyasal sonuçlar doku mikroyazdırma blokları oluştururken hazırlanan ve bir örneği Şekil 3’de verilen şablonlara göre her bir PA olgusu için kaydedildi. Erişkin ve fetal beyin dokularına ait kesitlerdeki immünohistokimyasal boyanmalar negatif ve pozitif kontroller olarak kabul edildi ve ayrıca kaydedilmedi.

Şekil 4. Doku mikroyazdırma şablonu

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
		0.00	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	14.0	16.0	18.0	
1	8.0	kontrol	Olgu1-a	Olgu1-b	Olgu2-a	Olgu2-b	Olgu3-a	Olgu3-b	Olgu4-a	Olgu4-b	kontrol	8.0
		01,01	02,01	03,01	04,01	05,01	06,01	07,01	08,01	09,01	10,01	
2	6.0	kontrol	Olgu5-a	Olgu5-b	Olgu6-a	Olgu6-b	Olgu7-a	Olgu7-b	Olgu8-a	Olgu8-b	kontrol	6.0
		01,02	02,02	03,02	04,02	05,02	06,02	07,02	08,02	09,02	10,02	
3	4.0	kontrol	Olgu8-a	Olgu9-b	Olgu10-a	Olgu10-b	Olgu11-a	Olgu11-b	Olgu12-a	Olgu12-b	kontrol	4.0
		01,03	02,03	03,03	04,03	05,03	06,03	07,03	08,03	09,03	10,03	
4	2.0	kontrol	Olgu13-a	Olgu13-b	Olgu14-a	Olgu14-b	Olgu15-a	Olgu15-b	Olgu16-a	Olgu16-b	kontrol	2.0
		01,04	02,04	03,04	04,04	05,04	06,04	07,04	08,04	09,04	10,04	
5	0.00	kontrol	Olgu17-a	Olgu17-b	Olgu18-a	Olgu18-b	Olgu19-a	Olgu19-b	Olgu20-a	Olgu20-b	kontrol	0.00
		01,05	02,05	03,05	04,05	05,05	06,05	07,05	08,05	09,05	10,05	
		0.00	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	14.0	16.0	18.0	
		1	2	3	4	5	6	7	8	8	8	

CONTROL SLIDES	block #	tissue	block #	tissue
	01,01	A05-49B13 CORTEX	08,01	03-14917 FETAL BRAIN
	01,02	S05-7809A1 SPLEEN	08,02	S04-9485 FETAL KIDNEY
	01,03	S04-9401 SMOOTH MUS	08,03	A05-50B12 CEREBELLUM
	01,04	S05-7965A3 LIVER	08,04	S03-5302A1 THYMUS
	01,05	S02-12111 PLACENTA	08,05	TB03-1A1 WHITE MATTER

4. Floresan in situ hibridizasyon işlemleri (FISH)

1p/19q delesyonunun araştırılması için floresan in situ hibridizasyon yöntemi kullanıldı. Bu işlem için daha önce hazırlanmış olan mikroarray lamaları 56⁰ C'deki etüvde bir gece bekletildikten sonra ksilende deparafinize edildi, azalan konsantrasyonlarla alkolden geçirildi (%100, %70, %50, %30), distile suda yıkandı. Bu aşamadan sonra kullanılan tüm solüsyonlar aynı gün içerisinde hazırlanmış solüsyonlardı. Kesitler oda sıcaklığında 0.2 N HCL/DiH₂O solüsyonunda 20 dakika süreyle bekletildi. Musluk suyunda 5 dakika yıkanan kesitler pH'sı 6.0 olan sitrat tampon içerisinde 50⁰ C'ye ayarlanmış Hobbs düdüklü tenceresine yerleştirildi ve 15 dakika ısıtıldı. Süre tamamlandığında kesitler sitrat tamponu içerisinde 20 dakika süreyle soğumaya bırakıldı. Akar musluk suyunda 5 dakika yıkanan kesitler 5 dakika da distile su içerisinde bekletildi. Kesitler, sıcaklığı 37⁰ C olan pepsin tamponu içerisine 30 dakika süreyle bırakıldı. Akar musluk suyunda yıkanan kesitler pH'sı 7.0 olan oda sıcaklığındaki 2xSSC/DiH₂O içerisinde 5 dakika bekletildikten sonra kurumaya bırakıldı. Bundan sonraki tüm aşamalar solüsyon ve lamaların ışık almadığı ortamda gerçekleştirildi. Hazırlanan Probe/Denhyb solüsyonu (Vysis Dual DNA Probe set) lamalar üzerine damlatıldı. Hibridizasyon sırasında kapatma için plastik kaplayıcılar (Zymed CISH Slip) kullanıldı ve kabarcık kalmamasına özen gösterildi. Kesitler ayrışma aşaması için 90⁰C'de 13 dakika bekletildi ve dokuların kurummasını önlemek için yeterince nemlendirilmiş etüvde 37⁰C'de bir gece boyunca hibridizasyona bırakıldı. Ertesi gün lamaların üzerindeki plastik kaplayıcılar çıkarıldı ve zemin boyanmasını engellemek için lamalar önce oda sıcaklığında ve 5 dakika süreyle %50'lik formamid/1xSSC/H₂O solüsyonunda, sonra 5 dakika süreyle yeni hazırlanmış 2xSSC/DiH₂O solüsyonunda bekletildi. Lamalar daha sonra kurumaya bırakıldı. Lamalar üzerine zıt boyanma için 10 ml DAPI II LSI damlatıldı ve tekrar plastik kaplayıcılar ile kapatıldı. Aynı gün içerisinde kesitler çift-band geçiş filtresi bulunan floresan mikroskop ile 60X objektifinde immersiyon yağı kullanılarak değerlendirildi. Skorlama 100 hücrede 1p ve 19q sinyalleri incelenerek yapıldı.

5. İstatistiksel inceleme

Tüm istatistiksel incelemeler için SPSS istatistik programı (Scientific Package for Social Sciences, Version 15) kullanıldı.

i. Tanımlayıcı analizler

Sürekli klinik değişkenler ortanca ve ortalama (\pm S) değerlerine göre, kategorik değişkenler sayı ve yüzdeler ile tanımlandı.

ii. Tekli değişken analizi

Sağkalım ve nüksüz sağkalım Kaplan-Meier eğrisi ile gösterildi. Sağkalım için analizin son noktası ölen olgular için ölüm tarihi, yaşayan olgular için son izlem tarihi olarak belirlendi. Sağkalım süresi için bu tarihle operasyon tarihi arasındaki fark hesaplandı. Nüksüz sağkalım için analizin son noktası nüks gelişen olgularda nüks tarihi, nüks gelişmeyen olgularda son izlem tarihi olarak belirlendi. Nüksüz sağkalım süresi için bu tarihle operasyon tarihi arasındaki fark hesaplandı. Eğriler Log-rank testi kullanılarak karşılaştırıldı, istatistiksel anlamlılık değeri (p değeri) 0,05 olarak kabul edildi.

Nüks gelişen ve nüks gelişmeyen olguların, klinik özelliklerini ve immunohistokimyasal sonuçlarını karşılaştırmak için gerekli olan asgari 30 örnek sayısı sağlanamadığı için parametrik olmayan Mann-Whitney U testi tercih edildi. Mann-Whitney U analizinde nüks ile anlamlı ($p \leq 0,05$) ilişkisi saptanan parametreler sadece subtotal eksizyon uygulanan grupta Kaplan-Meier analizi ile tekrar değerlendirildi. Yaş ve Ki-67 boyanma indeksi (Bİ) değişkenleri hem sürekli, hem de kategorik değişkenler olarak analizlere dahil edildi.

iii. İkili değişken analizi

İmmunohistokimyasal ekspresyonlardan sürekli değişkenler Pearson korelasyon testi ile, sıralı değişkenler Kendal's tau testleri ile karşılaştırıldı. Bağlantı katsayısı (r veya tau değerleri) 0,26-0,50 arasında olanlar orta derecede ilişki, 0,51-0,75 arası kuvvetli ilişki, 0,76-1,00 arası çok kuvvetli ilişki olarak kabul edildi.

p53, CD34, CD133, p75NTR antijenlerinde hiç pozitiflik saptanmadığı, EGFR ile sadece 1 olguda pozitiflik saptandığı ve FISH incelemesi yapılan olgularda 1p ve 19q delesyonu izlenmediği için bu parametreler istatistiksel inceleme dışı bırakıldı.

BULGULAR

1. Olguların Özellikleri (Tablo 4)

Çalışma kapsamına alınan 62 olgunun tanı anındaki yaşlarının ortanca değeri 84 aydır. Tanı anındaki yaş en az 14 ay, en çok 193 ay olmak üzere ortanca değer kızlar için 84, erkekler için 85 aydır.

Tablo 4. Olguların klinik özellikleri

Özellik	n
Cinsiyet	
Kız %50	31
Erkek %50	31
Lokalizasyon	
Arka çukur %68	42
Supratentoryal bölge %29	18
Medulla spinalis %3	2
Lateralizasyon	
Sağ %35	21
Sol %34	22
Orta hat %29	18
Bilateral %2	1
Cerrahi eksizyon genişliği	
Total %52	32
Subtotal %48	30
Adjuvan tedavi	
RT %13	8
KT %10	6
RT & KT %3	2

Dokuz olguda (%15) en az bir kez ve ortalama 12 ay içerisinde nüks saptanmıştır. Bir olgunun nüks tarihi bilinmemektedir. Diğer sekiz olgunun tamamında ilk iki yıl içerisinde

nüks saptanmıştır (en erken 7 ay, en geç 18 ay). Olguların %8'i (n=5) ölmüştür. Ölen olgulardan ikisi eşlik eden başka hastalıklara bağlı olarak operasyon sonrası, biri operasyon sonrası hastanede yattığı sürede bilinmeyen bir nedenle, biri hastalık progresyonuna bağlı, biri kemoterapi aldığı sırada enfeksiyona bağlı olarak ölmüştür. Ölümlerin dördü ilk bir yıl içinde, biri ikinci yıl içinde gerçekleşmiştir. Ölen olguların tanı anındaki yaş ortanca değeri 42 aydır. Olguların %21'i (n=13) izlem dışı kalmıştır. Bu olguların ortalama izlem süresi 25 aydır. İzlemi bulunan ve yaşayan 44 olgunun ise ortalama takip süresi 63 aydır.

2. Histopatolojik bulgular

PA olgularına ait standart H&E boyalı preparatlarda değerlendirilen tümörlerin çoğunda bipolar hücrelerin oluşturduğu kompakt alanlar ile multipolar hücrelerin oluşturduğu, mikrokistler de içeren gevşek alanların neden olduğu bifazik patern görülmüştür. Çoğu tümörde kompakt alanlarda Rosenthal fibriller, yer yer hyalinizasyon gösteren damarsal yapılar, gevşek alanlarda serpiştirilmiş eozinofilik granüler cisimler izlenmiştir. Bazı tümörlerde pleomorfik ve hiperkromatik nükleuslu hücrelerin bulunması dikkati çekmiştir. (Şekil 5). Bazı tümörler ise kistik dejenerasyon göstermiştir. Az sayıda tümörde vasküler proliferasyon glomeruloid yapılar oluşturmuştur (Şekil 6). Çoğu tümörde mitoz rastlanmamış olup, az sayıda olguda 1-2 adet mitoz saptanmıştır.

3. İmmunohistokimyasal bulgular

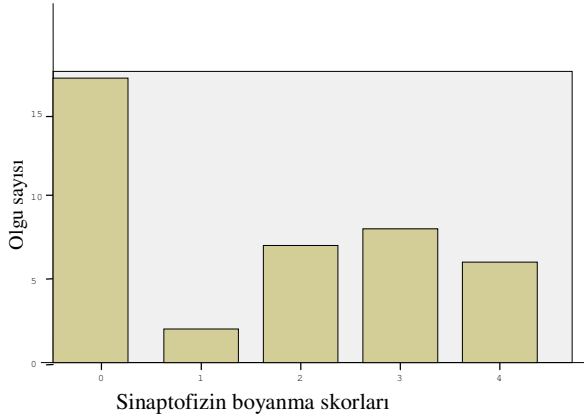
i. GFAP & vimentin sonuçları

GFAP antikoru uygulanan olgulardan 40'ı, vimentin antikoru uygulanan olgulardan ise 41'i optimal olarak değerlendirilmiştir. Tüm olgular vimentin ile sitoplazmik olarak yaygın pozitif immunoreaktivite göstermiştir. GFAP pozitifliği de yaygın ve kuvvetli olarak izlenmiştir. Ancak iki olguda GFAP ile fokal (<%25) ve zayıf pozitiflik gözlenmiştir (Şekil 7). Bu iki olguda vimentin pozitifliği %75'in üzerindedir.

ii. Sinaptofizin & Nörofilamen & NeuN sonuçları

Sinaptofizin antikoru uygulanan olgulardan 40'ı, nörofilaman antikoru uygulanan olgulardan 57'si, NeuN antikoru uygulanan olgulardan 50'si optimal olarak değerlendirilmiştir (Sinaptofizin ve nörofilaman antijenleri için sitoplazmik boyanma, NeuN için ise nükleer boyanma pozitif olarak kabul edildi). Çoğu olguda bu nöronal belirleyiciler negatiftir. Nörofilamen bir olguda (%2) %50-75 (Şekil 8), iki olguda (%3) %25-50, dokuz olguda (%16) ise %25'ten az pozitif, NeuN antijeni ise iki olguda (%4) fokal pozitif olarak izlenmiştir (Şekil 9). Sinaptofizin 25 olguda (%62), değişken oranlarda pozitif olarak saptanmıştır (Grafik 1, şekil 10).

Grafik 1. Sinaptofizin boyanma yaygınlığı



iii. EGFR & p53 sonuçları

P53 antikoru uygulanan olgulardan 41'i, EGFR antikoru uygulanan olgulardan ise 46'sı optimal olarak değerlendirilmiştir (Mutant P53 için nükleer, EGFR için ise sitoplazmik boyanma pozitif olarak kabul edildi). P53 pozitifliği olguların hiçbirinde saptanmamıştır, bir olgu EGFR yönünden kuşku boyanma göstermiştir (Şekil 11).

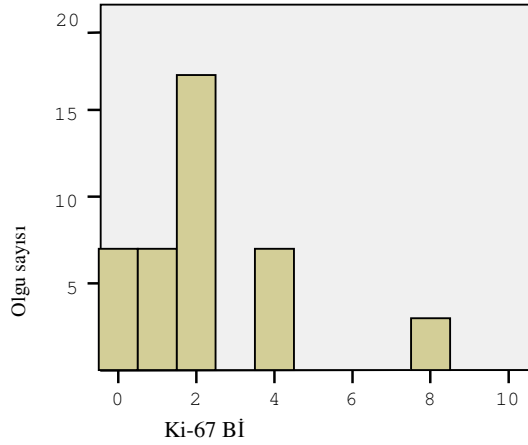
iv. Bcl-2 sonuçları

Bcl-2 antikorunu uygulanan olgulardan 39'u optimal olarak değerlendirilmiştir. Altı olguda (%16) bcl-2 ile sitoplazmik ekspresyon gösteren hücreler saptanmıştır (Şekil 12).

v. Ki-67 sonuçları

Ki-67 antikorunu uygulanan olgulardan 41'i optimal olarak değerlendirilmiştir. Ki-67 ile olumlu boyanan hücreler ortalama %2 oranındadır (aralık %0-8). Yedi olguda Ki-67 pozitif hücre saptanmamıştır (Grafik 2).

Grafik 2. Ki-67 Bİ



vi. CD34 sonuçları

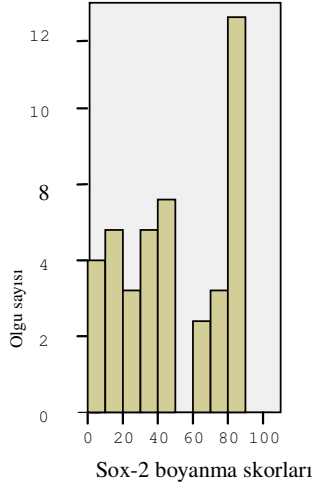
CD34 antikorunu uygulanan olgulardan 35'i optimal olarak değerlendirilmiştir. Sadece tümör içerisindeki damarsal yapılarda sitoplazmik ve membranöz immunoreaktivite gözlenmiştir.

vii. Sox-2 sonuçları

Sox-2 antikorunu uygulanan olgulardan 48'i optimal olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca dış kontrol amacıyla Sox-2 antikorunu uygulanan fetal beyin dokusunda özellikle germinal matriks alanlarında belirgin nükleer pozitiflik saptanmıştır (Şekil 13). Erişkin beyin hücrelerinde ise ekspresyon %1'in altındadır ya da hiç izlenmemiştir. PA olgularında Sox-2

antijeninin %0-90 aralığında değişen oranlarda, ortalama %45 oranında pozitif olduğu gözlenmiştir (Grafik 3, Şekil 14). İki olguda hiç boyanma olmamıştır.

Grafik 3. SOX-2 boyanma yaygınlığı



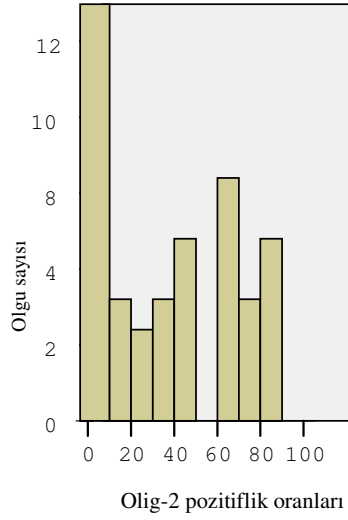
viii. CD133 sonuçları

CD133 antikorunu uygulanan olgulardan 52'si optimal olarak değerlendirilmiştir. Bir olgu dışında (Olgu 57) hiçbir olguda CD133 ekspresyonu saptanmamıştır (Şekil 15). Fetal beyin dokusunda daha sık ve erişkin dokuda da daha seyrek olmak üzere sitoplazmik pozitiflik gösteren hücreler gözlenmiştir.

ix. Olig-2 sonuçları

Olig-2 antikorunu uygulanan olgulardan 50'si optimal olarak değerlendirilmiştir. Sekiz olguda hiç boyanma olmazken, olguların büyük bir kısmında değişen oranlarda, ortalama %35 (\pm %30) nükleer pozitiflik saptanmıştır (Grafik 4, Şekil 16). Fetal ve erişkin beyin dokusunda özellikle glial hücrelerde Olig-2 pozitifliği izlenmiştir.

Grafik 4. Olig-2 boyanma yaygınlığı



x. p75NTR sonuçları

p75NTR antikorunu uygulanan olgulardan 28'i optimal olarak değerlendirilmiştir. Bu olgularda p75NTR ekspresyonu gösteren tümör hücresi saptanmamıştır. Erişkin beyin dokusunda da ekspresyon görülmemiştir. Fetal serebellar dokularda eksternal granüler tabakadaki hücrelerde sitoplazmik pozitiflik görülmüştür.

Sonuçları optimal değerlendirilen olgularda tüm immunohistokimyasal sonuçların, sitoplazmik pozitiflik gösteren antijenlerde skorlara göre dağılımı, nükleer pozitiflik gösteren antijenlerde ortalama değerleri Tablo 5, 6, 7 ve 8'de sunulmuştur.

Tablo 5. Sitoplazmik immunreaktivite sonuçları

Antijen	Olgu sayısı	Skor 0 n (%)	Skor 1 n (%)	Skor 2 n (%)	Skor 3 n (%)	Skor 4 n (%)
Nörofilamen	57	45 (%79)	9 (%16)	2 (%3)	1 (%2)	0
Bcl-2	39	33 (%84)	3 (%8)	3 (%8)	0	0
EGFR	46	46 (%100)	0	0	0	0
Sinaptofizin	40	15 (%38)	2 (%5)	9(%22)	8 (%20)	6 (%15)
Vimentin	41	0	0	0	9 (%22)	32 (%78)
GFAP	40	0	2 (%5)	2 (%5)	4 (%10)	32 (%80)

Tablo 6. Nükleer immunreaktivite sonuçları

Antijen	Ortalama Pozitiflik %'si	Aralık
p53	0 (n=41)	0
Neu-N	0,6 (n=50)	%0-20
Ki-67	2 (n=41)	%0-8

Tablo 7. Kök hücre belirleyicilerinin sitoplazmik ekspresyon sonuçları

Antijen	Olgu sayısı	Skor 0	Skor 1	Skor 2	Skor 3	Skor 4
CD133	52	51 (%98)	1 (%2)	0	0	0
P75NTR	28	28 (%100)	0	0	0	0
CD34	35	35 (%100)	0	0	0	0

Tablo 8. Kök hücre belirleyicilerinin nükleer ekspresyon sonuçları

Antijen	Ortalama Pozitiflik %'si	Aralık
SOX-2	45 (n=48)	%0-90
Olig-2	35 (n=50)	%0-90

5. Floresan in situ hibridasyon sonuçları

Rastgele seçilen bir array kesitindeki 15 olgu, floresan in situ hibridizasyon yöntemiyle 1p ve 19q delesyonları yönünden incelenmiştir. Hiçbir olguda 1p/19 q delesyonu görülmemiştir.

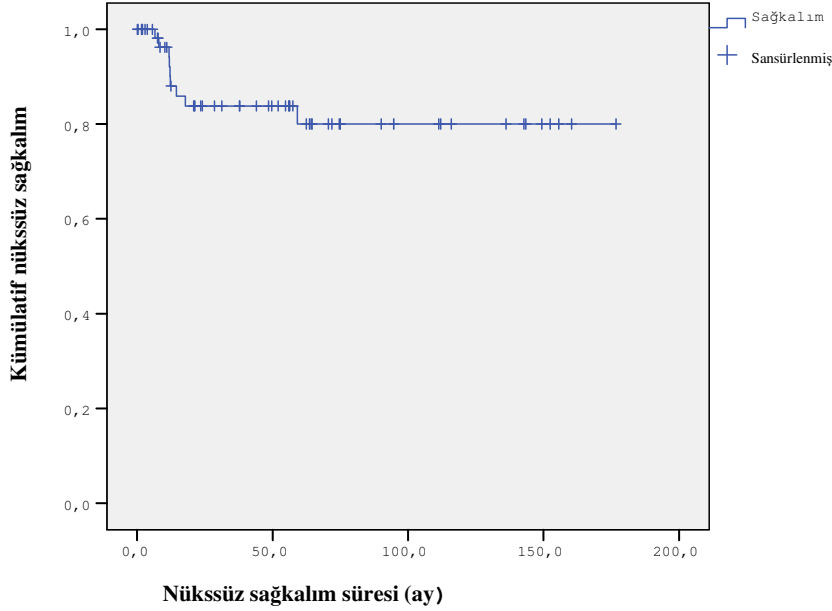
6. İstatistiksel analiz sonuçları

Nüks saptanan dokuz olgu da subtotal eksizyon uygulanmış olgulardır. Nüks gelişen olguların %44'ünde (n=4) tümör supratentoryal, %56'sında(n=5) arka çukur yerleşimlidir. Bilateral yerleşimli tek olguda nüks gelişmemiştir. Nüks gelişen olguların %44'ünde (n=4) tümör sağda, %44'ünde (n=4) orta hatta, %12'sinde(n=1) solda yerleşmiştir. Nüks gelişen olguların tanı anındaki yaş ortanca değeri 59 ay iken nüks gelişmeyen olguların tanı anındaki yaş ortanca değeri 92 aydır.

i. Tekli değişken analizleri

Olguların çalışmanın zaman aralığındaki ortalama sağkalım süresi 193 aydır. Olguların çalışmanın zaman aralığındaki ortalama nüksüz sağkalım süresi 146 ay, nüksüz sağkalım hızı %85,5'tir (Grafik 5).

Grafik 5. PA olgularında nüksüz sağkalım



Tanı anındaki yaş ortalaması, cinsiyet, cerrahi eksizyon genişliği, tümörün lokalizasyonu, lateralizasyonu ve Ki-67 Bİ değişkenlerinden; nüks ile cerrahi eksizyon genişliği ve tanı anındaki yaş ortalamasının ters yönlü, Ki-67 Bİ'nin ise pozitif yönlü ilişkisi olduğu saptanmıştır (Tablo 9).

Tablo 9. Klinik özellikler ve Ki-67 Bİ'nin nüks ile ilişkisi (Mann- Whitney U testi)

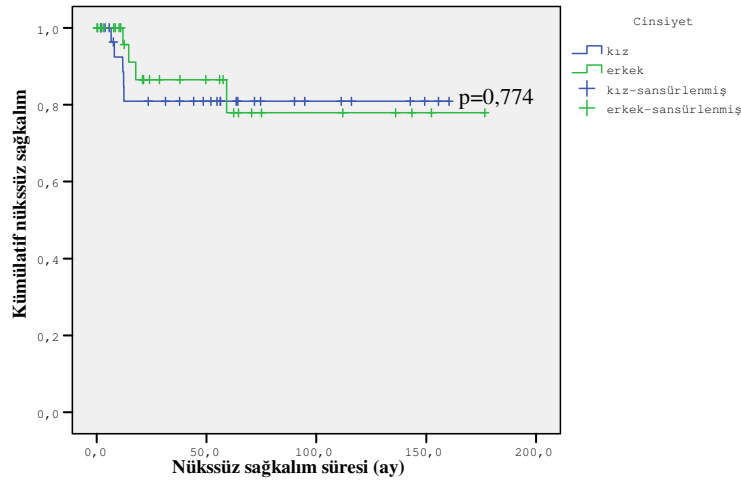
Özellik	p değerler
Tanı anındaki yaş ortalaması	0,032*
Cinsiyet	0,721
Cerrahi eksizyon genişliği	0,001*
Lokalizasyon	0,239
Lateralizasyon	0,153
Ki-67 Bİ	0,014*

*p≤0,05, istatistiksel olarak anlamlı ilişki

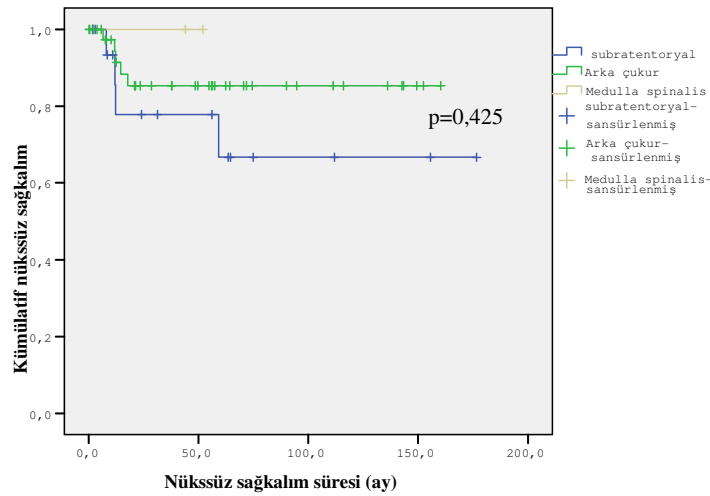
Farklı cinsiyet, lokalizasyon ve lateralizasyonların nüksüz sağkalım süreleri (Grafik 6-8) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış olup farklı cerrahi eksizyon

genişliklerinin nüksüz sağkalım süreleri (Grafik 9) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (Tablo 10). Ayrıca nüks ile istatistiksel olarak anlamlı ilişkisi saptanan tanı anındaki yaş ve Ki-67 Bİ değerleri kategorize edilmiş (yaş ≤ 60 ay, >60 ay; Ki-67 Bİ% ≤ 2 , >2) ve kategorilerin tüm eksizyon genişliklerinde ve ayrıca sadece subtotal eksizyon uygulanan olgulardaki nüksüz sağkalım süreleri (Grafik 10-13) arasındaki fark karşılaştırılmıştır (Tablo 10).

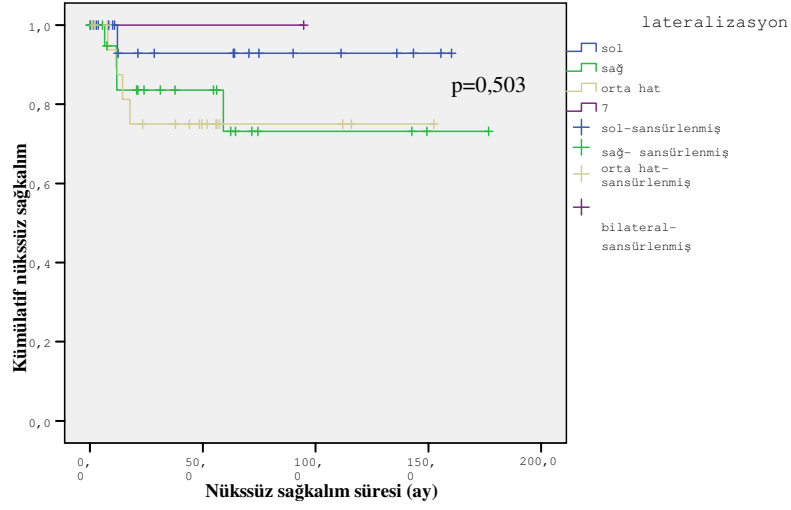
Grafik 6. Cinsiyete göre nüksüz sağkalım



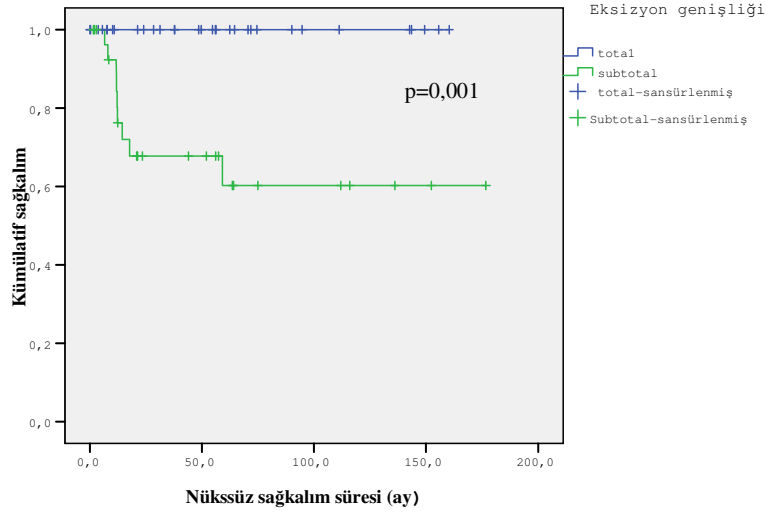
Grafik 7. Lokalizasyona göre nüksüz sağkalım



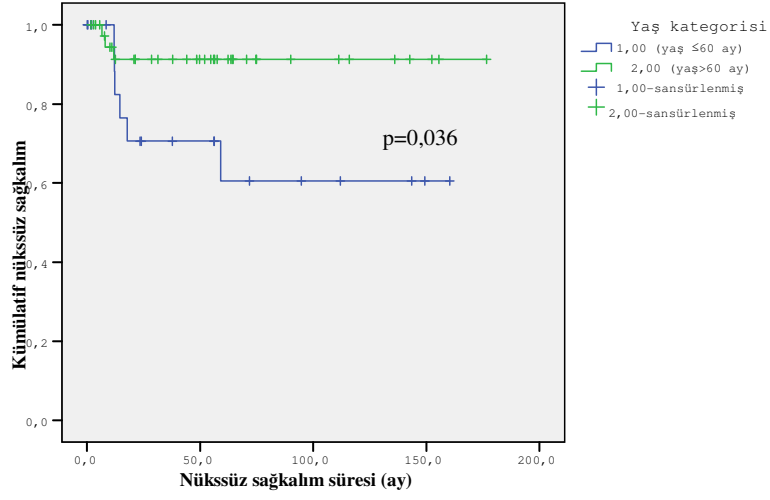
Grafik 8. Lateralizasyona göre nüksüz sağkalm



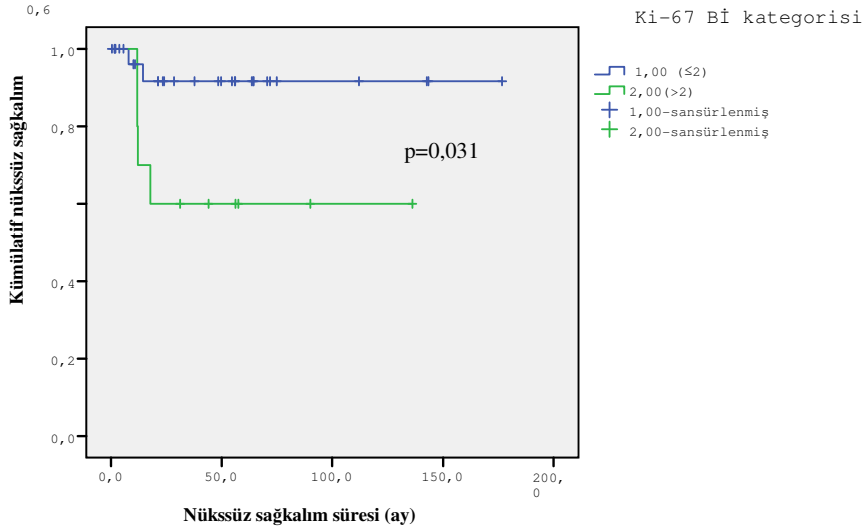
Grafik 9. Eksizyon genişliğine göre nüksüz sağkalm



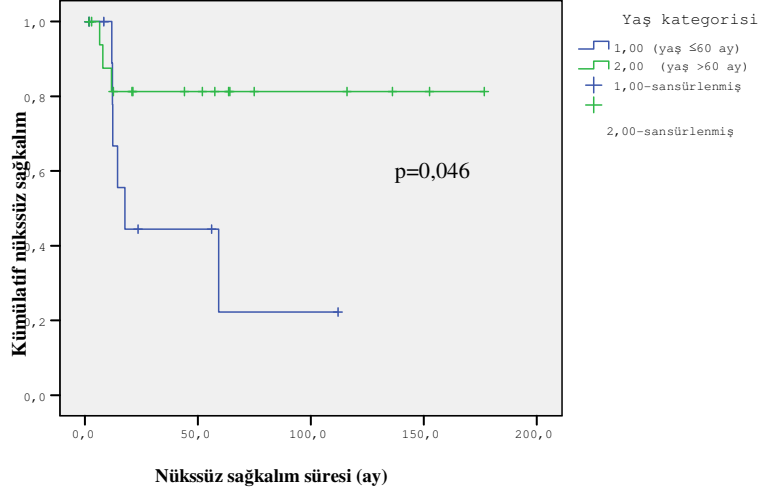
Grafik 10. Yaş kategorilerine göre nüksüz sağkalm



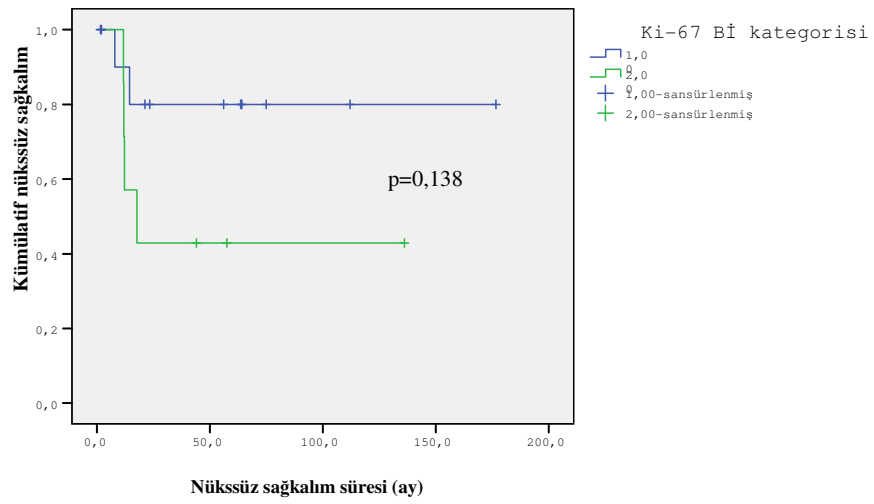
Grafik 11. Ki-67 Bİ kategorilerine göre nüksüz sağkalm



Grafik 12. Subtotal eksizyon uygulanan olgularda yaş kategorilerine göre nüksüz sağkalm



Grafik 13. Subtotal eksizyon uygulanan olgularda Ki-67 Bİ kategorilerine göre nüksüz sağkalm



Tablo 10. Farklı klinik özelliklerin ve Ki-67 Bİ'nin nüksüz sağkalım süreleri ile ilişkisi

Özellik	Nüks var n (%)	Nüks yok n (%)	p değerleri (Log-Rank testi)
Cinsiyet			0,774
Kız	5 (%16)	26 (%84)	
Erkek	4 (%13)	27 (%87)	
Lokalizasyon			0,425
Arka çukur	5 (%12)	37 (%88)	
Supratentoryal	4 (%22)	14 (%78)	
Medulla spinalis	0	2 (%100)	
Lateralizasyon			0,503
Sağ	4 (%18)	18 (%82)	
Sol	1 (%5)	20 (%95)	
Orta hat	4 (%22)	14 (%78)	
Bilateral	0	1 (%100)	
Yaş			0,036*
≤60 ay	6 (%27)	16 (%73)	
>60	3 (%8)	7 (%92)	
Ki 67 Bİ			0,031*
Ki 67 Bİ≤%2	2 (%7)	29 (%93)	
Ki 67 Bİ>%2	4 (%40)	6 (%60)	
Subtotal eksizyonlarda			
Yaş			0,046*
≤60 ay	6 (%50)	6 (%50)	
>60ay	3 (%17)	15(%83)	
Ki 67 Bİ			0,138
Ki 67 Bİ≤%2	2 (%15)	11 (%85)	
Ki 67 Bİ>%2	4 (%57)	3 (%43)	

* p≤0,05; istatistiksel olarak anlamlı ilişki

Farklı cinsiyetin, farklı tümör lokalizasyon ve lateralizasyonlarının nüksüz sağkalım süreleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. İki kategoride incelenen yaş gruplarının, hem tüm olgular içinde, hem de sadece subtotal eksizyon uygulanan olgularda nüksüz sağkalım süreleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ki 67 Bİ %2'ye eşit ve %2'den düşük olguların nüksüz sağkalım süreleri ile Ki 67 Bİ %2'den yüksek olguların nüksüz sağkalım süreleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Sadece subtotal eksizyon uygulanan olgularda ise Ki 67 Bİ kategorilerinin nüksüz sağkalım süreleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.

İmmünohistokimyasal ekspresyonların nüks ile ilişkisi saptanmamıştır (Tablo 11).

Tablo 11. İHK'sal sonuçların nüks ile ilişkisi (Mann-Whitney U testi)

İHK'sal belirleyici	p değerleri
GFAP	0,193
Vimentin	0,738
Sinaptofizin	0,073
Nörofilamen	0,865
Neu-N	0,564
Bcl-2	0,852
SOX-2	0,557
Olig-2	0,752

ii. İkili değişken analizleri

Olig-2 ve Ki-67 ekspresyonları arasında pozitif yönlü orta derecede korelasyon bulunmuştur (Tablo 12). GFAP ile vimentin arasında pozitif yönlü orta derecede korelasyon saptanmıştır. Vimentin ile sinaptofizin arasında pozitif yönlü güçlü korelasyon bulunmuştur Bcl-2 ile vimentin ve sinaptofizin arasında negatif yönlü orta derecede korelasyon saptanmıştır (Tablo 13).

Tablo 12. İHK'sal nükleer pozitiflikler arasındaki korelasyon değerleri (Pearson testi)

	Olig-2	SOX-2	Ki-67
Olig-2	-	0,204	0,332*
SOX-2	0,204	-	-0,01
Ki-67	0,332*	-0,01	-

*p=0,039, pozitif yönlü orta derecede korelasyon

Tablo 13. İHK'sal sitoplazmik pozitiflikler arasındaki korelasyon değerleri (Kendall's tau_b testi)

	GFAP	Vimentin	Sinaptofizin	Nörofilamen	Bcl-2
GFAP	-	0,313*	0,363**	0,248	0,074
Vimentin	0,313*	-	0,534***	0,269	-0,346
Sinaptofizin	0,363	0,534	-	0,231	-0,339
Nörofilamen	0,248	0,269	0,231	-	0,139
Bcl-2	0,074	-0,346*****	-0,339*****	0,139	-

*p=0,047, pozitif yönlü orta derecede korelasyon

**p=0,012, pozitif yönlü orta derecede korelasyon

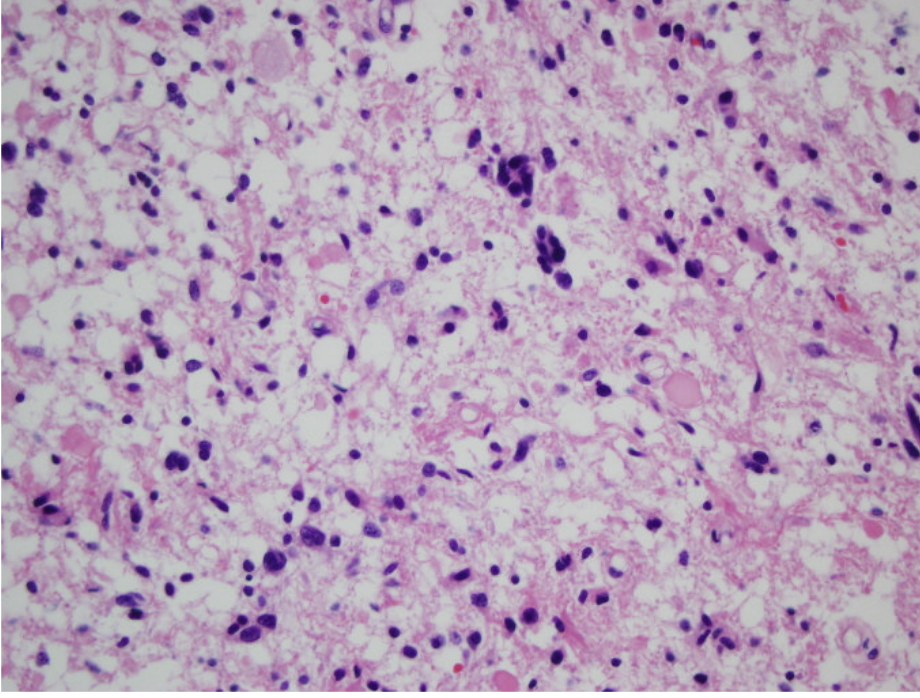
***p=0,000, pozitif yönlü güçlü korelasyon

****p=0,033, negatif yönlü orta derecede korelasyon

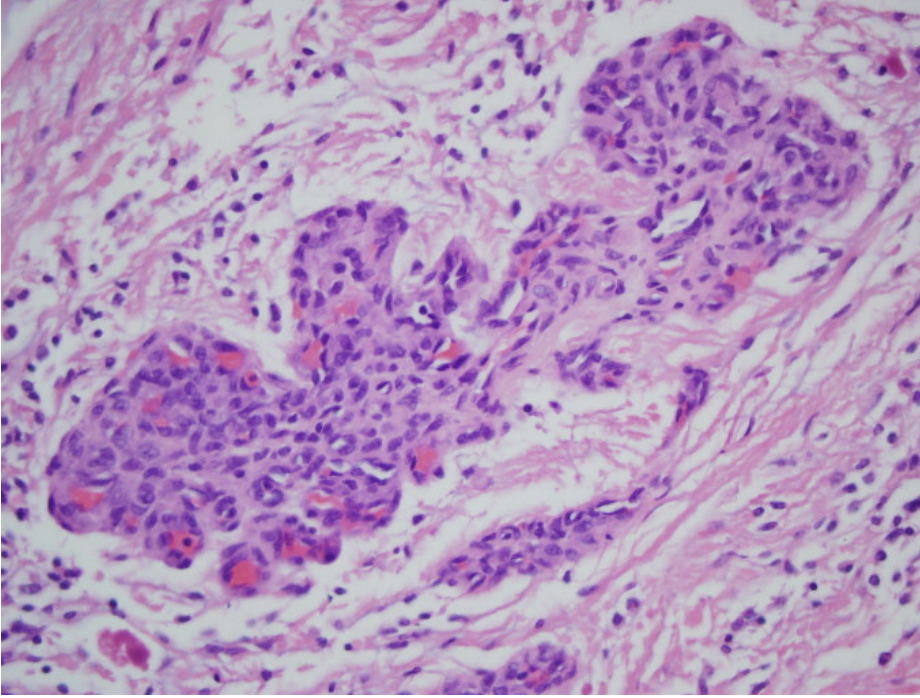
*****p=0,024, negatif yönlü orta derecede korelasyon

Tablo 14. İHK'sal nükleer ve sitoplazmik pozitiflikler arasındaki korelasyon değerleri (Kendall's tau_b testi)

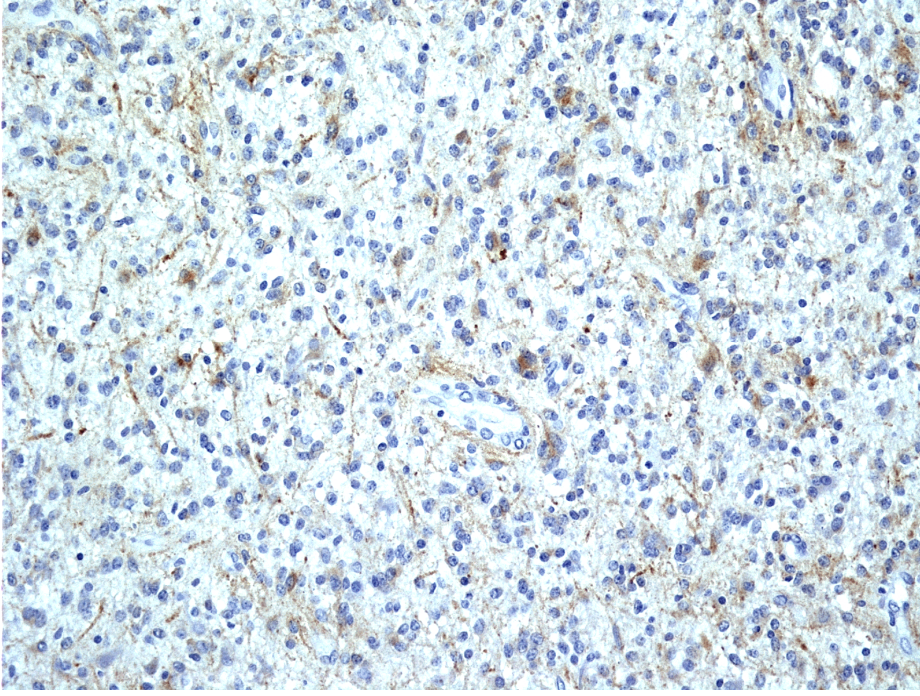
	GFAP	Vimentin	Sinaptofizin	Nörofilamen	Bcl-2
Olig-2	-0,114	-0,100	0,107	0,203	0,138
SOX-2	0,196	0,213	0,317	0,190	0,130
Ki-67	0,229	0,182	0,240	-0,076	0,147



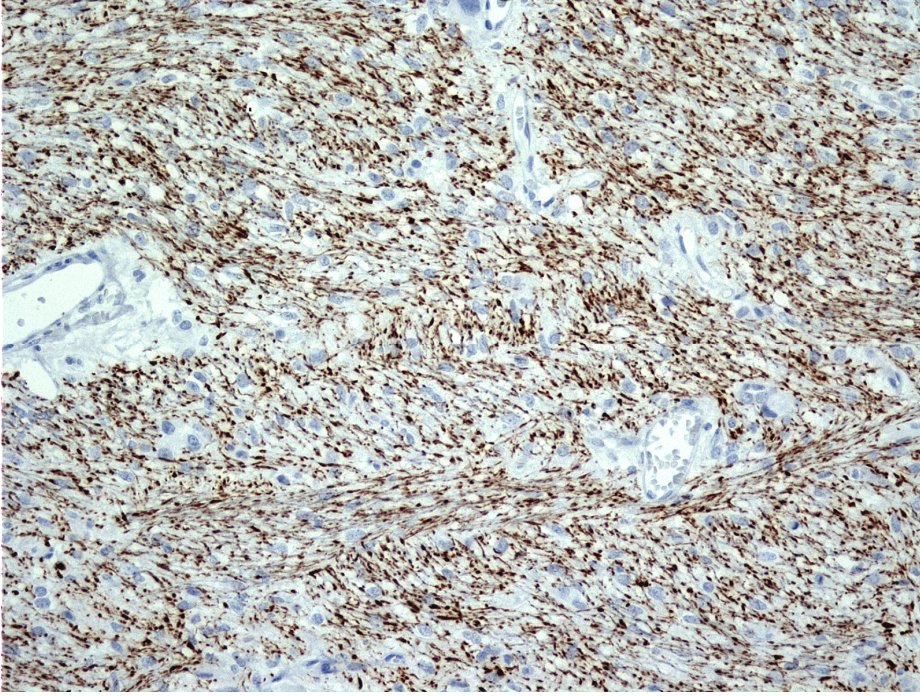
Şekil 5. Pleomorfik görünümdeki PA hücreleri



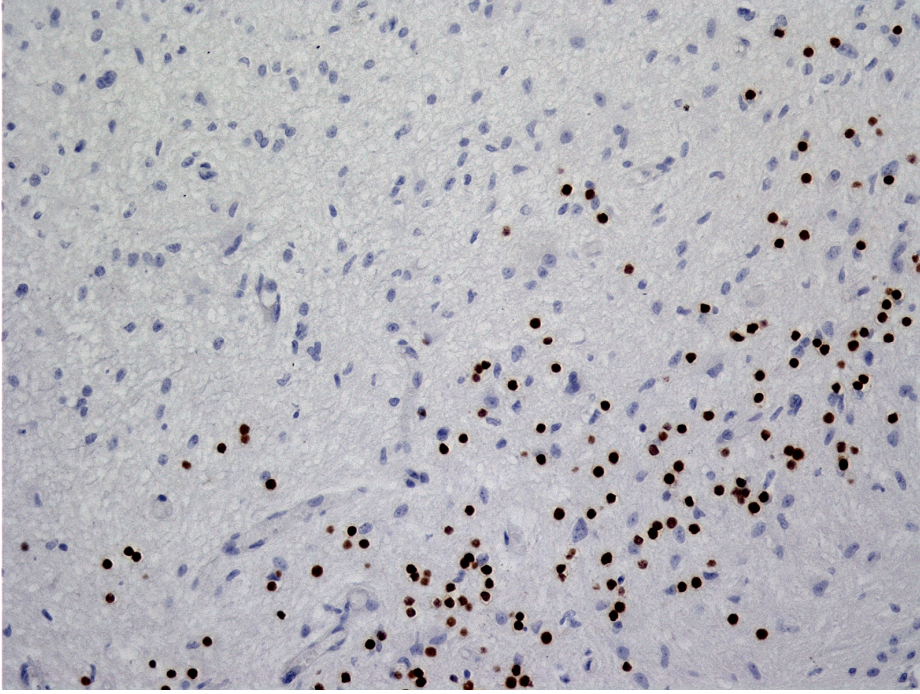
Şekil 6. Bazı PA olgularımızda izlenen vasküler proliferasyon



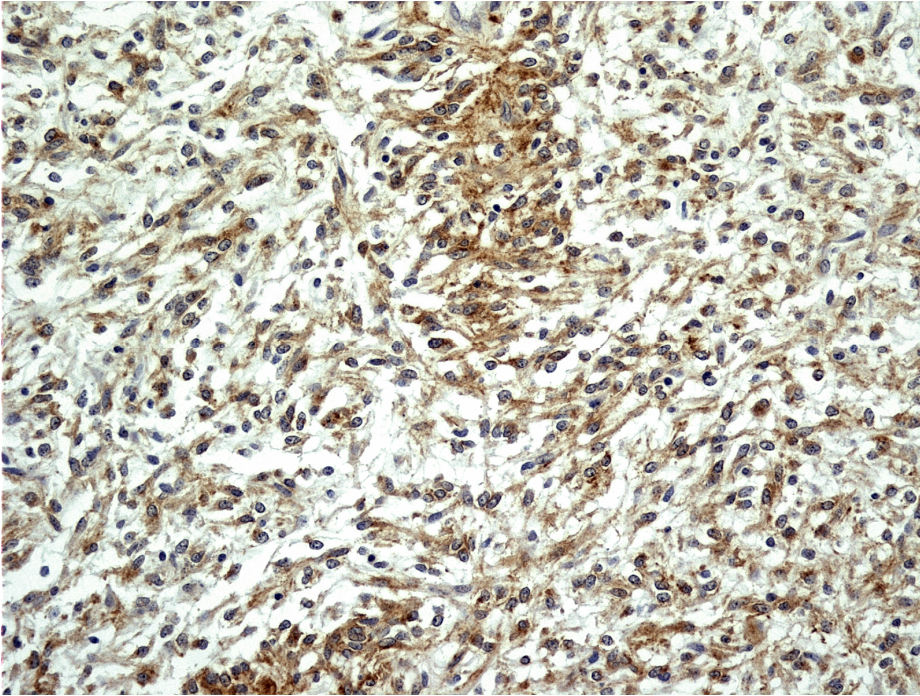
Şekil 7. Zayıf sitoplazmik GFAP pozitifliği



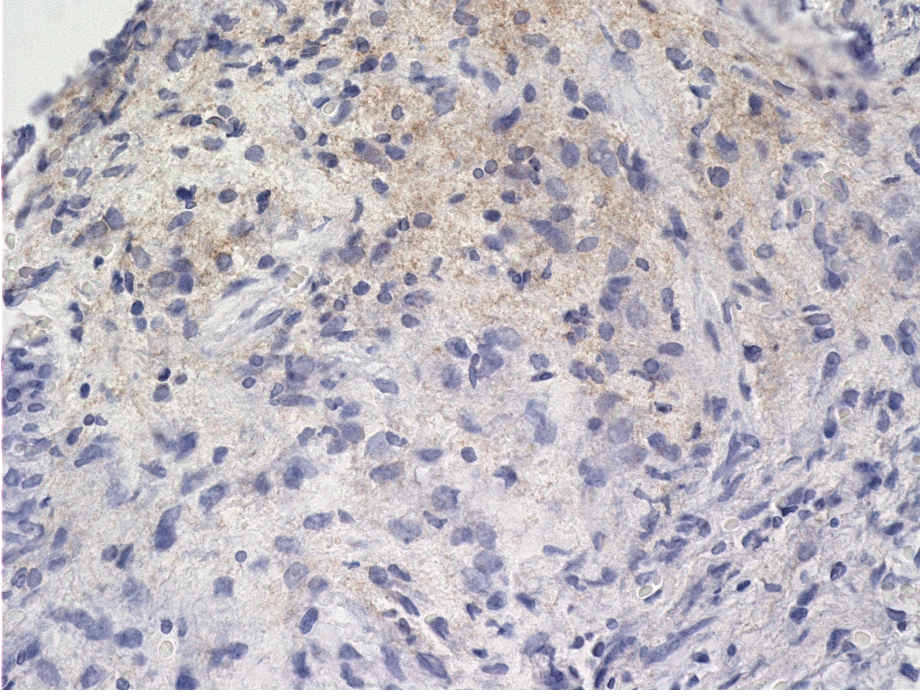
Şekil 8. Nöropil görünümünde nörofilamen pozitifliği



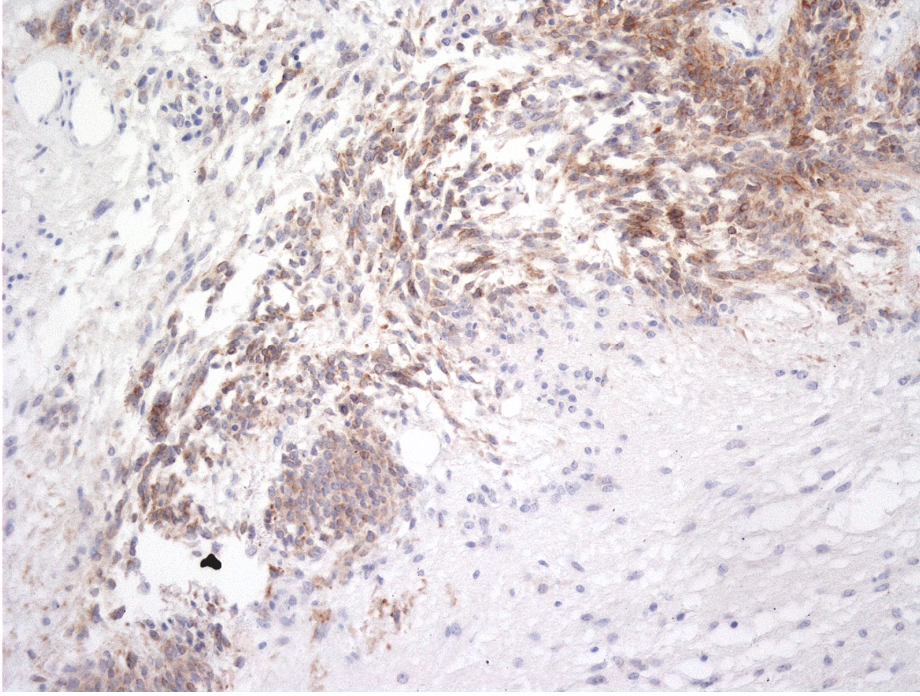
Şekil 9. NeuN nükleer pozitifliği gösteren hücreler



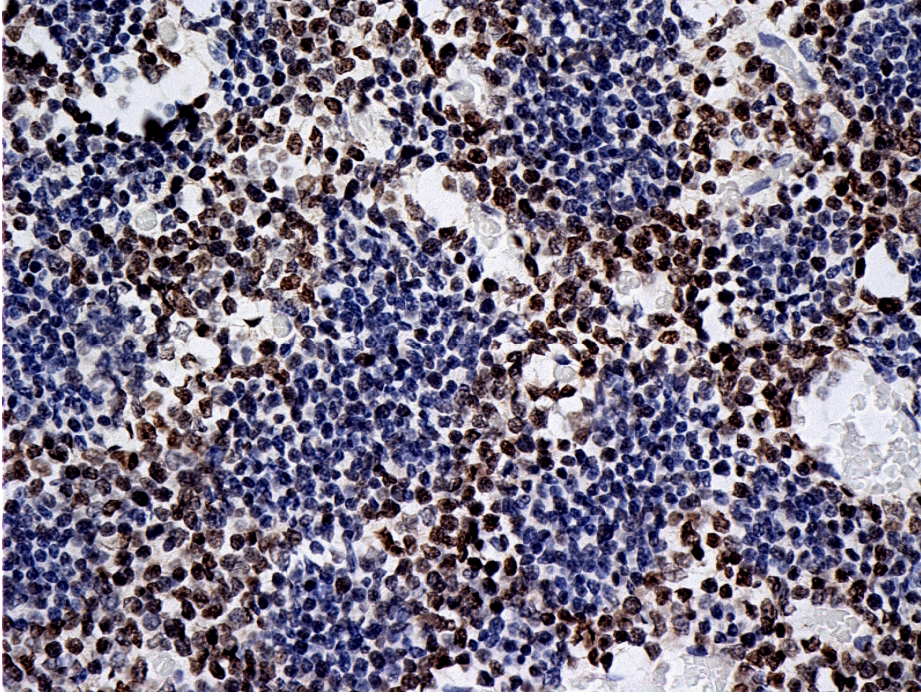
Şekil 10. Sitoplazmik sinaptofizin pozitifliği



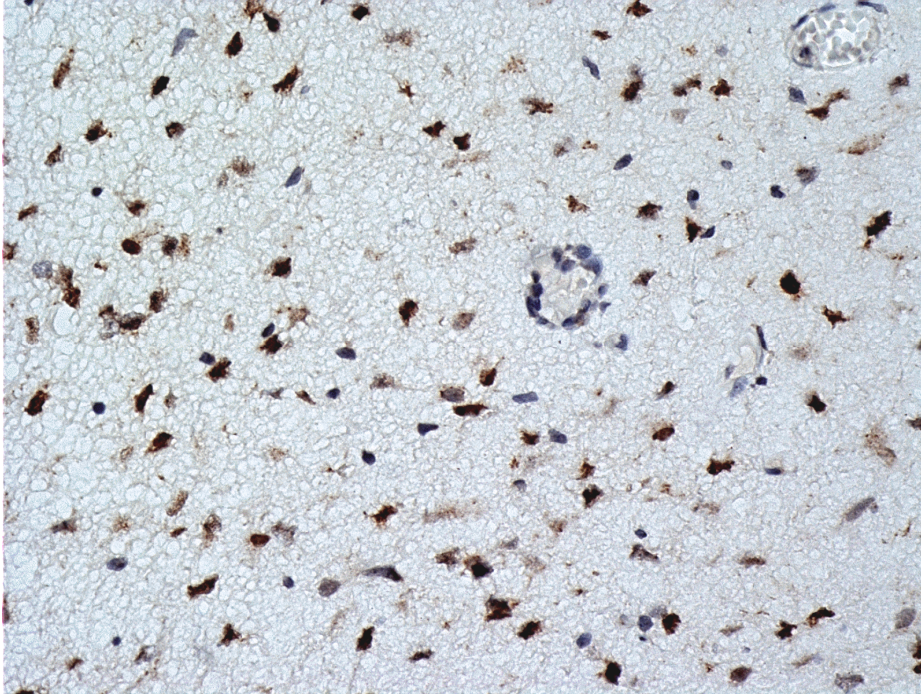
Şekil 11. EGFR ile şüpheli sitoplazmik pozitifliği bulunan Olgu 57



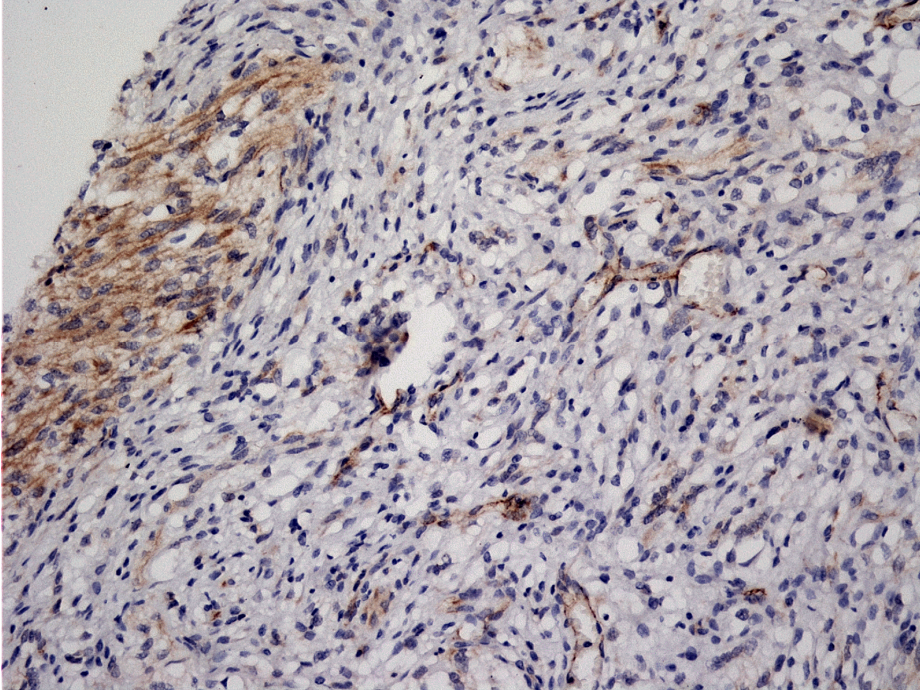
Şekil 12. Sitoplazmik Bcl-2 immunoreaktivitesi



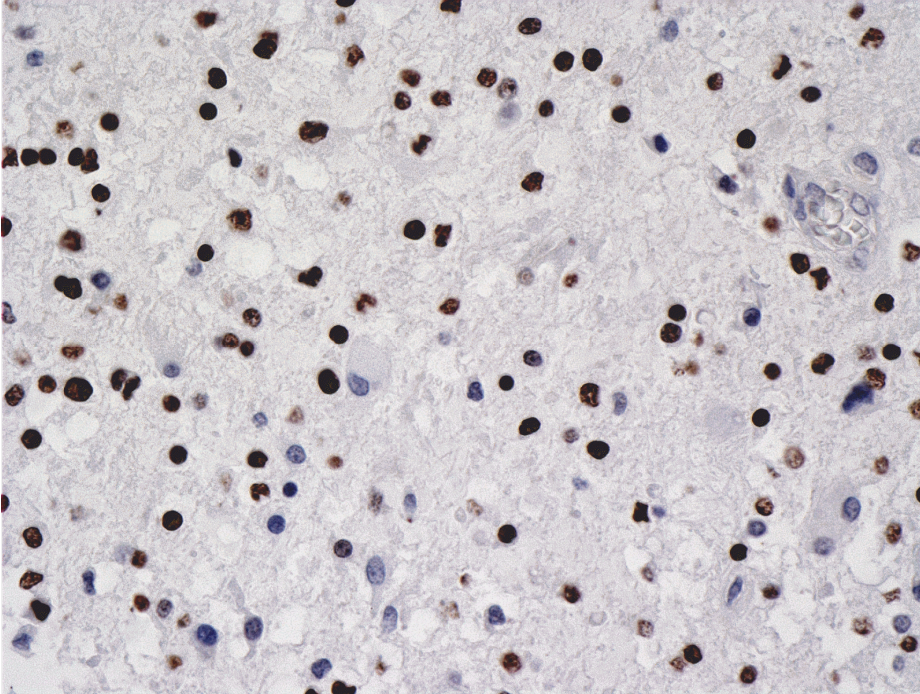
Şekil 13. Fetal dokuda germinal matrikste nükleer Sox-2 ekspresyonu



Şekil 14. Tümöral hücrelerde nükleer Sox-2 ekspresyonu



Şekil 15. Olgu 57’de fokal sitoplazmik CD133 ekspresyonu



Şekil 16. Tümöral hücrelerde nükleer Olig-2 ekspresyonu

TARTIŞMA

1. Olguların demografik ve klinik özellikleri

PA'da tanı anındaki yaşın prognozla ilişkisini araştıran çalışmalarda bu değişkenin prognozla ilişkisi bulunmamıştır(7, 24, 75, 76). Çocukluk çağında görülen ve tüm düşük dereceli gliomları kapsayan çalışmalarda ise tanı anında yaşı daha küçük olguların nüksüz sağkalım sürelerinin daha kısa olduğu belirtilmiştir. Bizim serimizde tanı anında yaşı daha küçük olan olgularda nüks oranının daha yüksek, nüksüz sağkalım sürelerinin ise daha kısa olduğu saptanmıştır. Olgular yaş değerlerine göre iki grupta incelendiğinde (yaş 60 aydan küçük, 60 aydan büyük) grupların hem tüm olgular dahil edildiğinde hem de sadece subtotal eksizyon uygulanan olgular incelendiğinde nüksüz sağkalım süreleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Serimizdeki ölümlerden sadece biri PA progresyonuna bağlıdır ve bu olguda tanı anındaki yaş 22 aydır. Çalışmamızın sonuçlarına göre ilk 5 yıl içinde PA tanısı alan olgular nüks açısından riskli bir gruptur ve yakın klinik izlemleri gerekmektedir.

Serimizdeki tüm olgular çocukluk çağındadır. Ancak PA nadir de olsa genç erişkinlerde görülebilmektedir. Erişkinlerde supratentorial yerleşimli 20 PA olgusunda yapılan bir çalışmada 10 yıllık izlem sonucu, sağkalım hızı %95 olarak bildirilmiştir(77).

Literatüre göre kız ve erkeklerde PA görülme insidansı arasında fark yoktur. Çalışmamız bunu destekler niteliktedir; kız ve erkek olguların sayıları eşittir (n=31). Cinsiyet ve nüks arasında ilişki ya da nüksüz sağkalım süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

1994 yılında yayınlanan bir seride 90 PA olgusundan 11'inde multisentrik yayılım geliştiği, bu olgulardan 10'unun hipotalamik yerleşimli olduğu bildirilmiştir(75). Başka kimi çalışmalarda da serebellar yerleşimli PA'larda optik kiazm/ hipotalamus yerleşimli tümörlere oranla genel sağkalım ve nüksüz sağkalım sürelerinin daha uzun olduğu, süreler arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunduğu belirtilmiştir(78, 24, 76). Serimizdeki olguların lokalizasyona göre nüksüz sağkalım süreleri arasında fark olmasına karşın aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu sonuç takip sürelerinin kısa olmasına ya da seride yeterli sayıda hipotalamik olgunun bulunmamasına bağlı olabilir. Lokalizasyona göre nüksüz sağkalım sürelerinin farklı olması cerrahi eksizyonun genişliği ile ilişkili olabilir. Optik kiazm/hipotalamus yerleşimli tümörlerin total eksizyonu güçtür. Çalışmamızdaki 18

supratentoryal yerleşimli olgumuzdan da sadece beşine (%36) total eksizyon uygulanabilmiştir. Serebellum yerleşimli olgulara ise diğer tüm lokalizasyonlara göre total eksizyon daha kolay uygulanabilmektedir. Diğer önemli bir nokta, prognozunun daha kötü olduğu bilinen PMA'nın hipotalamik ve kiazmatik bölgede yerleştiği ve bu lokalizasyondaki tümörlerde bu varyantın mutlaka akılda tutulması gerektiğidir.

Minehan ve ark.'ın(8) bir çalışmasında 1962- 2005 yılları arasında Mayo Clinic'teki 136 medulla spinalis yerleşimli astrositom olgusundan 69'unun PA olduğu bildirilmiştir. Çalışmanın sonucunda spinal PA'lar için sağkalım ortanca değeri 39.9 yıl olarak bulunmuş ve PA olgularının infiltratif astrositomlardan daha uzun süre yaşadıkları bildirilmiştir. Bizim iki medulla spinalis yerleşimli PA olgumuzda dört yıllık klinik izlemde nüks izlenmemiştir.

Serimizde tümörün lateralizasyonu ile prognoz arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır. 60 PA ve 20 PMA olgusu ile yapılan bir çalışmada tümör lokalizasyonu, cerrahi eksizyonun genişliği, görüntüleme yöntemlerinde çevre dokunun invazyonu ve histolojik alt türün prognozda önemli değişkenler olduğu gösterilmiştir(24). Bu çalışmada çoklu değer analizlerinde kistik yapıdaki tümör olgularının da daha iyi bir prognoza sahip olduğu saptanmıştır. Ne var ki çalışmanın yazarları histolojik varyantla ilişkili sonuçlar dışında, bunların temelde tümörün eksizyon genişliği ile ilişkili değişkenler olduğunu ve aslında tümörün eksizyonunu kolaylaştıran ya da zorlaştıran durumlara yol açmaları nedeniyle prognozda etkili olabileceklerini ifade etmişlerdir.

Bizim serimizde de subtotal eksizyon, nüks gelişim ile ilişkili bulunmuştur. Subtotal eksizyon uygulanan olgular ile total eksizyon uygulanan olguların nüksüz sağkalım süreleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. Bu sonuç eksizyon genişliğinin PA'ların prognozunda etkili bir değişken olduğunu savunan diğer yayınlar ile de uyumludur(76). Tedavinin mümkün olan lokalizasyonlarda total eksizyon olarak planlanması son derece önemli gözükmektedir.

2. Histopatolojik bulgular

Çocukluk Çağı Beyin Tümörleri Konsorsiyumu'nun (The Childhood Brain Tumor Consortium) yaptığı bir çalışmada nöropatologlar arası tanısal uyumun kraniofaringiomlar ve medulloblastomlardan sonra en fazla olduğu histolojik türün PA olduğu saptanmıştır(79). Çalışmamızda histopatolojik bulgular birer değişken olarak yer almamıştır. Olguların bazılarında tipik bifazik patern, bazılarında mikrokistik patern hakimiyeti, bazılarında ise

kompakt patern hakimiyeti gözlenmiştir. Olguların hiçbirinde nekroz görülmemiştir. Ancak PA'da enfarkt benzeri nekroz alanlarının görülmesi olasıdır(2). Bazı olgularda glomeruloid paternde ve reaktif özellikte damarsal proliferasyonlar gözlenmiştir. Kimi olgularda izlediğimiz nükleer pleomorfizmin, nükleuslarda para dizisi görünümünün tıpkı damarsal hyalinizasyon ve bazı alanlardaki mikrokalsifikasyon gibi dejeneratif bir değişiklik olduğu düşünülmektedir. Sayılan bu bulgular (nekroz, nükleer atipi, mikrovasküler proliferasyon) radyoterapi görmüş PA'larda daha sık görülmektedir. Bu bulguların izlendiği olguların önce "atipik PA" olarak değerlendirilmesi önerilmiş, ancak yapılan geniş serili bir çalışmada bu olguların klinik seyrinde bir farklılık gözlenmemiştir(13). PA'ların %30'unda 50 büyük büyütme alanında (BBA) 1-2 mitoz görülebilmektedir. Ancak 1 BBA'da birden çok mitozun, endotelyal proliferasyon ve/veya palizatlaşan nekroz ile birlikte görülmesi durumunda tanı "malign PA" olmalıdır. Bu durum genellikle radyoterapi sonrası malign transformasyon gelişen az sayıdaki PA olgusunda bildirilmiştir (2,13).

Bir histolojik varyant olarak kabul edilen ve prognozu daha kötü olan PMA olguları çalışmamıza dahil edilmemiştir.

3. Doku mikroarray yöntemi

Doku mikroarrayi, 1998 yılında Kononen ve ark(80) tarafından tanımlandıktan sonra in situ hibridizasyon ve immunohistokimyasal yöntemlerle yapılan çalışmalara büyük katkılar sağlamıştır. Doku mikroarray yöntemi ile azami örnek bir bloğa yerleştirilebilme, orijinal verici bloktaki dokuya ise asgari hasar verilmektedir. Bir bloğa 400'e kadar doku örneği yerleştirilebilme, bu bloktan 200'e kadar kesit hazırlanabilmektedir. Verici blokların, bir daha çıkarılmamak üzere arşive konmasıyla blok kayıplarının önüne geçilebilmektedir. İmmunohistokimya veya in situ hibridizasyon işlemleri sırasında tüm dokular aynı sürelerde, aynı sıcaklıkta ve konsantrasyonlardaki solüsyonlara maruz kaldığı için işlem kalitesinin standardizasyonu da sağlanmaktadır. Standart kesitlerde bir tek lam için kullanılacak antikör ya da prob miktarı tek lamdaki onlarca hatta yüzlerce doku için kullanılabilir. Değerlendirme sırasında sadece inceleme yapılmak istenen alan array bloğuna yerleştirildiği için zaman kaybı olmaksızın ilgili alan değerlendirilebilme, birbiri ardı sıra değerlendirilen olgularla değerlendirme sırasındaki standardizasyon da artmaktadır. Homojen özelliklere sahip tümörler için iki dokunun, daha heterojen özelliklere sahip tümörler için ise en az üç dokunun alıcı bloğa yerleştirilmesi önerilmektedir(81, 82).

Doku array yöntemi, çalışmamızda çok sayıda antikoru, standart koşullarda değerlendirme imkanı sağladı. Ancak array yönteminin neden olduğu bazı zorluklarla da karşılaştık. Verici blokların standart olmaması nedeniyle yerleştirilen doku yükseklikleri değişken oldu, bu durum da array kesitlerinde bazı olgulara ait dokuların bulunmamasına yol açtı. Bazı antikolar için gerekli olan antijen açığa çıkarma işlemi sırasında 1 mm'lik dokulardan dökülenler, ve bu nedenle incelenemeyenler oldu. Doku array bloğunun hazırlanması, kesitlerin alınması, İHK'sal değerlendirmenin yapılması beceri, dikkat ve yoğun emek isteyen süreçler oldu. Bu dezavantajlara karşın doku mikroarray yöntemi hem maliyet, hem de standardizasyon yönünden çalışmamıza çok önemli faydalar sağlamıştır.

4. Tümöral hücrelerinin immunofenotipik kompozisyonu

i. GFAP ve vimentin

GFAP'ın matür glial hücrelerde eksprese edildiği bilinmektedir. Çalışmamızda 40 olgunun 36'sı (%90) %50'nin üzerinde GFAP eksprese ederken iki (%5) olgu %25-50 arasında, iki (%5) olgu ise %25'in altında GFAP pozitif hücreye sahiptir. GFAP ekspresyonunun tümörün derecesi arttıkça azalabileceği yönünde yayınlar vardır(56). Daha önceki çalışmalarda GFAP ekspresyonunun PA'larda mikrokistik alanlar ve oligodendrogliom benzeri alanlarda daha az olabildiği gösterilmiştir(83). Çalışmamızda GFAP ve vimentin arasında beklendiği gibi pozitif yönlü korelasyon vardır. Ancak bizim çalışmamızda beklenenden daha az GFAP ekspresyonu gösteren bu iki olguda vimentin ekspresyon yaygınlığı ise %75'in üzerindedir. Vimentinin glial diferansiasyonda GFAP'tan önce eksprese edilmeye başladığı bilinmektedir (56).

ii. Nörofilamen

Nörofilamen antijeni 57 olgunun yaklaşık %21'inde (n=12) değişen oranlarda pozitif bulunmuştur. Bu sonucun infiltrasyon bulgusu olduğu düşünülürse, literatürde PA'ların parenkimi infiltre edebildikleri, hatta PA'ların difüz varyantının olduğuna dair tartışmalar vardır(2, 20). Çalışmamızda Nörofilamen pozitifliğinin nüks gelişimi ile istatistiksel olarak anlamlı ilişkisi bulunmamıştır. Öte yandan olgularımızdan birinde Nörofilamen pozitifliği infiltrasyon göstergesi olmayı aşacak düzeyde yaygın olarak gözlenmiştir (Şekil 8). Bodey ve

ark(84) tarafından yapılan bir çalışmada beş PA olgusundan ikisinde Nörofilamen pozitif tümör hücreleri saptanmıştır. PA'larda nörofilamen varlığını gösteren literatürdeki tek çalışma budur. Nörofilamen ile ilgili bir başka önemli çalışma ise Varlet ve ark.(85) tarafından kendilerinin "malign glionöronal tümörler (MGNT)" ismini verdikleri olgular üzerine yapılmıştır. Bu çalışmada Nörofilamen ve GFAP'ı birlikte eksprese eden tümöral hücrelerin varlığı gösterilmiştir.

Nörofilamen pozitifliği saptanan olgularımızdan yaygın pozitiflik gösteren olgu da dahil olmak üzere 10'unda değerlendirilen GFAP ekspresyonu %75'in üzerindedir. Nörofilamen pozitifliği Varlet ve ark.(85) tarafından yapılan çalışmada MGNT olup piloid özellikler gösteren bir olguda da saptanmıştır. Bu durumun PA'larda agresif davranışla ilişkili olabileceği iddia edilmiştir. Bizim çalışmamızdaki Nörofilamen pozitif olguların izlem süresi ortanca değeri 48 aydır ve ancak bu olguların daha uzun süreli izlemleri bu iddiaları aydınlığa kavuşturabilecektir. Diğer yandan Nörofilamen pozitifliği derecesi biyolojik bir özellikten çok mikrodizin için seçilen dokunun özelliğine bağlı olabilir. Nörofilemen proteini immunohistokimyasının gerçekten biyolojik bir anlam ifade edip etmediğinin saptanabilmesi için tümör bloklarının tamamında bu incelemenin yapılması gereklidir. Sonuç olarak, nörofilamen pozitifliği özellikle PA'larda tümör periferinde izlenebilen ve bu tümörlerin daima iyi sınırlı olmayabileceklerini gösteren bir bulgudur.

iii. NeuN

NeuN nöronal diferansiasyonun son aşamasında eksprese edilir(62). Nöronal olmayan hiçbir hücrede eksprese edilmeyen özgüllüğü yüksek bir antijendir. Preusser ve ark(59) tarafından yapılan bir çalışmada 100 PA'da NeuN pozitifliği hiçbir olguda saptanmamıştır. Bizim çalışmamızda ise sadece iki olguda NeuN pozitif hücreler saptanmıştır. NeuN pozitif hücreler çevredeki hücrelerden daha küçük nükleusa sahip hücrelerdir. NeuN serebellar granül gibi küçük internöronlarda eksprese edilebilmektedir(62). NeuN pozitifliği saptanan olgularımızdan biri serebellar yerleşimlidir ve olasılıkla Neu-N pozitifliği saptanan hücreler tümör dokusu içinde yer alan internal granuler tabaka hücreleridir.

iv. Sinaptofizin

PXA'nın glial bir tümör olduğu kabul edilse de bazı çalışmalarda sinaptofizin eksprese eden tümöral hücreler gösterilmiştir(86). Nöronal diferansiyasyon gösteren bu hücrelerin kökeni açıklanamamıştır. Bizim çalışmamızda da sinaptofizinin 40 olgunun yaklaşık %62'sinde değişen oranlarda saptanan pozitiflik birkaç nedene bağlı olabilir. Tipik olarak daha önce yapılan çalışmaların çoğunluğunda PA'larda sinaptofizin pozitifliği görülmemiştir. Bazı olgularımızda izlenen yaygın sinaptofizin pozitifliği ile orantılı yaygın bir nöronal diferansiyasyon olabileceği yönünde değerlendirme yapmak gerçekçi değildir. Yapılan bir çalışmada gliaların nöronlarda sinaps oluşumunda önemli bir fonksiyonu olduğu saptanmıştır(87). Glial tümör hücreleri, arada sıkışmış nöronal hücrelerde veya az sayıdaki nöronal-glial diferansiyasyonu aynı anda göstermiş kök hücre benzeri tümör hücresinde sinaptogeneze neden olmuş ve sinaptofizin ekspresyonu bu nedenle bazı olgularda yaygın izleniyor olabilir. İstatistiksel incelemelerde saptadığımız sinaptofizin ile vimentin arasında pozitif yönlü güçlü korelasyon, sinaptofizin ile GFAP arasında pozitif yönlü orta derecede korelasyon da bu hipotezi destekliyor görünmektedir. Sinaptofizin pozitifliğinin bir diğer açıklaması da teknik yönden olabilir. Birçok tümörde immunohistokimya ile saptanan sinaptofizin pozitifliğinin diğer nöronal başkalaşım indikatörleri ile bağdaşmadığı saptanmıştır. Katsetos ve ark.'nın çalışmalarında nöronal sınıf antijenlerinin bazılarının astrositik tümörlerde saptandığı, ancak bu pozitifliğin nörona özgül olarak yorumlanmaması gerektiği bildirilmiştir(88).

v. EGFR, p53 ve Bcl-2

EGFR pozitifliği primer glioblastomlarda %70'e varan oranlarda izlenebilmektedir(64). Bazı düşük dereceli astrositomlar, anaplastik astrositomlar ve sekonder glioblastomlarda ise p53 pozitifliği yüksek oranlarda gözlenmektedir. Mutant p53'ü taşıyan gliom hücrelerinin klonal ekspansiyonu ile düşük dereceli astrositomdan anaplastik astrositoma va glioblastoma malign transformasyon geliştiği düşünülmektedir. Bazı yayınlar ise p53 mutasyonu saptanan düşük dereceli glial tümörlerde malign fenotipe dönüşümden daha sık olarak rekürrens gelişiminin saptandığını belirtmektedir. Nozaki ve ark.'nın(89) yaptığı bir çalışmada farklı derecelerdeki glial tümörlerde p53 mutasyonu araştırılmış ve 16 PA olgusundan hiçbirinde p53 mutasyonu gösterilememiştir. Bir başka çalışmada sadece iki

olguda İHK'sal olarak fokal p53 pozitifliği gözlenmiş, olgulardan birinde ise p53 mutasyonu gösterilmiştir(90). Lang ve ark.(91) ise yedi PA olgusundan beşinde İHK'sal olarak p53 pozitifliği izlenmiş ancak hiçbirinde mutasyon saptanmamıştır. Tihan ve ark'nın(92) 11 PA olgusu ile yaptıkları bir çalışmada İHK'sal olarak p53 pozitifliği hiçbir olguda saptanmamıştır. Bu konudaki diğer yayınlar da pilositik astrositomlarının patogenezinde p53 mutasyonunun rolü olmadığını göstermektedir. Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak İHK'sal yöntemle p53 pozitifliği hiçbir olguda saptanmamıştır. Bir olguda (Olgu 57) oldukça zayıf EGFR reaktivitesi olabilecek kuşkuyla boyanma gözlenmiştir. Bu olgu sonuçlarda negatif olarak rapor edilmiştir.

Glial tümörlerde apoptoz oranları üzerine yapılan çalışmalar çok farklı sonuçlar bildirmiştir. Bazı çalışmalar PA'larda apoptoz oranının yüksek dereceli glial tümörlerle karşılaştırıldığında daha yüksek olduğunu, bazı çalışmalar tam tersini, bazı çalışmalar ise apoptoz oranı ile tümör tip ya da derecesinin ilişkili olmadığını belirtmiştir(90). Glial tümörlerde apoptoz genellikle p53 mutasyonu sonucu engellenmektedir. İHK'sal olarak P53 pozitifliği olan gliom olgularının yarısına yakınında p53 mutasyonu saptanamamaktadır. Bu p53'ün aşırı ekspresyonudur. Bu tümörlerde p53 aşırı ekspresyonunun bcl-2 ile apoptozu engelleyerek tümör oluşumunu sağladığı düşünülmektedir(66). Normal nöronal ve glial hücreler bcl-2 ekspresyon etmezler. Ancak neoplastik astrositlerin yanı sıra reaktif astrositlerde de ekspresyon edildiği unutulmamalıdır. Derece II, III ve IV glial tümörlerle yapılan bir çalışmada 28 olgudan 14'ünde İHK'sal olarak p53 pozitifliği saptanmış ancak sadece 7'sinde p53 mutasyonu gösterilmiştir. P53 mutasyonu olmayan yedi olguda da bcl-2 pozitifliği izlenmiştir. Aynı çalışmada immunohistokimyasal olarak p53 pozitifliği saptanmayan olgularda da bcl-2 ekspresyonu izlenmiştir (66). Bu sonuç p53 mutasyonu olmayan gliomlarda tümörün apoptozu bcl-2 yoluyla inhibe ettiğini düşündürmüştür. Çalışmamızda 39 olgudan altısında (%15) bcl-2 pozitifliği izlenmiştir. bcl-2 pozitifliği ile sinaptofizin ve vimentin pozitifliği arasında negatif yönlü zayıf orta derecede korelasyon saptanmıştır. Ancak bu sonuç bcl-2 yollu apoptoz konusunda herhangi bir fikir vermemektedir. PA'ların anti-apoptotik ve proliferatif durumunu araştırmak için yaptığımız korelasyon incelemelerinde ise Bcl-2 ve Ki-67 arasında korelasyon gösterilememiştir.

vi. Ki-67 Bİ

PA'lar düşük proliferasyon aktivitesine sahip tümörlerdir. PA'lardaki proliferatif aktivitenin değerlendirildiği en geniş çalışma Giannini ve ark.(93) tarafından 131 PA olgusu ile yapılan bir çalışmadır. Bu çalışmada 131 olgudan 42'sinde 10 BBA'da en az bir, en çok dört mitoz izlenmiştir. Ki-67 Bİ ortalama %1,1 (aralık 0-3,9) olarak bulunmuştur. Bu çalışmada Ki 67 Bİ ile sağkalım arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ne var ki Ki-67 Bİ ile nüks gelişimi ve nüksüz sağkalım süresi ilişkisi bu yayında belirtilmemiştir. Tomlinson ve ark.(13) 107 serebellar PA olgusu ile yaptıkları bir çalışmada ise olgulardan dördünde malign transformasyon geliştiğini ve bu olgularda DNA akım sitometrisi ile S faz fraksiyonunun diğer PA'lardan anlamlı oranda yüksek olduğunu göstermişlerdir. Proliferasyon indeksleri ile ilgili yapılan diğer çalışmalarda olgu sayıları 45'i geçmemektedir ve Ki 67 Bİ ortalama %0,30 ±0,32 (90); %1,83 ± 2.1 (92); %0,6(aralık 0-3,5) (65, 94), %0,8 ±0,8 (49) olarak bildirilmiştir. Bu çalışmaların hiçbirinde Ki-67 Bİ ile prognoz arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gösterilememiştir. Bu konuda yapılan son çalışma 2003 yılında yayınlanmıştır ve bu çalışmada proliferasyon indeksi ve nüks gelişimi arasında pozitif yönlü ilişki gösterilmiş, Ki-67 Bİ %2'den fazla olan olgulardaki nüksüz sağkalım sürelerinin daha kısa olduğu bildirilmiştir(76). Çalışmamızda Ki-67 Bİ ortalaması %2,7; ortanca değeri %2'dir. Ki-67 Bİ ile nüks gelişimi arasında pozitif yönlü ilişki saptanmıştır. Nüks gelişen olguların Ki-67 Bİ ortalaması %4'tür. Olgular, Ki-67 Bİ %2'ye eşit ve %2'den az olgular ve Ki-67 Bİ %2'den fazla olgular olmak üzere iki gruba ayrılmış ve bu iki grup arasındaki nüksüz sağkalım süreleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ancak bu kategorilerin sadece subtotal eksizyon uygulanan olgulardaki sağkalım eğrileri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Mitotik aktivite PA'lar dışındaki tümörlerde dereceleyle anlamlı ilişkiye sahip önemli bir değişkendir. Tek bir mitoz saptanması, diğer tüm özellikleri ile derece II olan bir glial tümörü derece III olarak tanımlamayı gerektirmektedir. PA'larda ise nadir mitozlar tanı ile çelişmez. Bununla birlikte çalışmamızın sonuçları Ki-67 Bİ %2'nin üzerindeki olguların, nüks açısından riskli grup olabilecekleri için klinik olarak yakın izleminin gerektiğini göstermektedir.

vii. CD34

CD34 pozitif hematopetik kök hücrelerden nöronal, glial ve oligodendroglial diferansiyasyon gelişimi gösterilmiş olduğu için çalışmamızda CD34 eksprese eden kök hücrelerin PA'lardaki varlığı araştırılmıştır. Ancak CD34 ile sadece damarsal yapılarda immunoreaktivite gözlenmiştir.

viii. CD133

Fetal karaciğer, umbilikal kord ve kemik iliğinden izole edilen CD133 pozitif hücrelerin in vitro çalışmalarda astrositlere, nöronlara ve oligodendrositlere diferansiye olabildikleri gösterilmiştir(95). CD133 MSS tümörlerinden en çok glioblastomlarda saptanmıştır. CD133 pozitif hücrelerin apoptoza ve bu sayede kemoterapiye, radyoterapiye dirençli olduğu iddia edilmektedir. İlk cerrahi materyalde CD133 negatif glioblastom hücrelerinin nüks sonrası materyallerinde CD133 pozitifliği dikkati çekmiştir. Bir çalışmada CD133 negatif glioblastom hücreleri farelere implante edilmiş ve anjiogenezin artmasıyla CD133 pozitifliği gözlenmiştir(96). Bir başka çalışma da CD133 ekspresyonunun primer glioblastomlarda sekonder glioblastomlara göre daha fazla olduğunu göstermiştir(97). Glial tümörlerle yapılan bir çalışmada konfokal mikroskop ile CD133 pozitif hücrelerin bir kısmının aynı zamanda GFAP eksprese ettiği, ancak hiçbirinin Ki-67 eksprese etmediği gözlenmiştir(48). Bu durum CD133 pozitif hücrelerin aktif hücre siklus fazında olmadığını göstermektedir. Farklı derecelerdeki glial tümörler ile yapılan bir başka çalışmada iki PA olgusundan birinde %15 oranında CD133 pozitifliği bildirilmiştir(98). Bu yayın literatürde PA'larda CD133 immunoreaktivitesini değerlendirmiş, bulabildiğimiz tek yayındır. Bizim serimizde CD133 pozitif olan sadece bir olgu saptanmıştır (Şekil 15). Bu olguda EGFR'ın da kuşkulu pozitifliğinden ilgili bölümde bahsedilmiştir¹.

¹ Farklı İHK'sal fenotipteki Olgu 57: Bu olguda diğer tüm olgulardan farklı olarak CD133 ekspresyonu gözlenmiştir. Aynı olguda Sox-2 %20 oranında eksprese edilmiş, Olig-2 ve Ki-67 ekspresyonu ise gözlenmemiştir. Olguda EGFR ile zayıf fokal bir boyanma olmuştur. Bu olgunun klinik izleminde nüks görülmemiştir. Olgu sağ ve sağlıklıdır. Bu ekspresyon paterni ile tek bir olgu üzerinden yorum yapmak spekülatif olabilir. Ancak yüksek dereceli glial tümörlerde izlenen CD133 ekspresyonunun nüksüz seyir gösteren bu olguda eksprese edilmesi, diğer kök hücre belirleyicilerinin ise bu ekspresyona eşlik etmemesi ve proliferatif aktivitenin gözlenmemesi dikkati çekmiştir.

ix. p75NTR

p75NTR nörogenezde proliferatif/apoptotik, ikili role sahiptir. Son çalışmalarda primitif nöroektodermal tümörler olan ve nöroepitelyal kök hücrelerden kaynaklandığı hipotezleri yaygınlaşan medulloblastomlarda ekspresyonu bildirilmiştir(68). p75NTR fonksiyonunu, medulloblastomların gelişiminde de önemli rolü olan nörotropinlere bağlanarak gerçekleştirmektedir. Barnes ve ark tarafından yapılmış ve henüz yayınlanmamış bir çalışmada p75NTR'ın fetal serebellar dokuda eksternal granüler tabakada ve az sayıda purkinje hücresinde eksprese edildiği, erişkin normal dokularda ekspresyonunun izlenmediği gösterilmiştir(99). Bizim çalışmamızda da dış kontrol olarak kullanılan fetal serebellar doku arraylerinde eksternal granüler tabakada olumlu boyanma gözlenmiş, erişkin doku arraylerinde ise boyanma olmamıştır. Medulloblastomlarla yapılan çalışmalarda bazı medulloblastom hücrelerinin p75NTR eksprese etmesiyle bu tümörlerin köken alabilecekleri kök hücreler üzerine yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. İki PA olgusunu da içeren bir başka çalışmada ise düşük dereceli glial tümörlerde nörotropik büyüme faktörünün ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir(100). Bu sonuç medulloblastom ve nöroblastom gibi malign biyolojik davranışa sahip tümörlerdeki sonuçlardan farklıdır. Glial tümörlerle yapılan bir çalışmada ise gliomlardaki invaziv tümör hücreleri izole edilmiş ve bu hücrelerin invaziv olmayan tümör hücrelerinden farklı olarak p75NTR eksprese ettikleri gözlenmiştir(69).

Neurotropik faktörler ve p75NTR gibi nörotropik faktörlerle ilişkili kök hücre belirleyicileri daha agresif tümör karakterini yansıtır olabilir. PA'larda p75NTR ekspresyonunu ve nüks gelişen olgularda bu molekülü eksprese eden kök hücre benzeri hücrelerin varlığını araştırmak için uyguladığımız p75NTR İHK'sı ile optimal kontrolün sağlandığı 28 olguda da boyanma olmamıştır.

x. Sox-2

Literatürde Sox-2 ile yapılan çalışmalarda Sox-2'nin tüm MSS'de düşük oranlarda saptanabileceği, ancak gelişmekte olan MSS'de germinal matrikste ekspresyon yaygınlığının fazla olduğu belirtilmiştir(101). Kontrol arraylerdeki sonuçlarımız literatürle uyumludur. Çalışmamızdaki fetal dokularda ekspresyon özellikle germinal matrikste oldukça yaygın izlenmiştir. Erişkin dokuda ise ekspresyon yaklaşık %1 oranında ya da negatiftir.

Bir çalışmada Sox-2 eksprese eden hücreler in vitro nörosfer oluşturmuş ve bu nörosferlerde hem nöronal, hem astrositik, hem de oligodendroglial diferansiyasyon gözlenmiştir. Sox-2 eksprese eden hücrelerle oluşturulan nörosferlerde diferansiyasyon geliştikçe Sox-2 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir(102). İn vivo çalışmalarda da tek hücre düzeyinde Sox-2'nin indiferansiye hücrelerde eksprese edildiği görülmüştür(103). Sox-2 pozitif hücrelerin in vivo multipotensi ve kendini yenileme özelliği yönünden yapılan bu özgün çalışmada da Sox-2 pozitif hücrelerin hem nöronal hem de glial diferansiyasyon gösterebildikleri gözlenmiştir. Bu sonuçlar Sox-2'nin nöronal diferansiyasyonu engellediği ve sadece glial hücrelere gelişimde etkili olduğu yönündeki literatür bilgilerinin yeniden sorgulanmasına neden olmuştur(102).

Sox-2 ile yapılan bir klinik çalışmada farklı histolojik türlerde birincil MSS tümörlerinden tüm glial tümörlerde ekspresyon gözlenmiş ancak ekspresyonun yaygınlık düzeyleri bu çalışmada belirtilmemiştir. Nöroepitelyal olmayan hiçbir tümörde ekspresyon gözlenmemiştir. Nöronal tümörlerde veya mikst nöroglial tümörlerin nöronal komponentinde ekspresyon gözlenmemiştir. Bu sonuç hem nöronal hem de glial diferansiyasyon gösterebildiği kanıtlanmış Sox-2 eksprese eden hücreler yönünden ilginçtir. Özellikle nöroglial tümörlerde nöronal komponentin Sox-2 eksprese etmemesi Sox-2 eksprese eden kök hücre benzeri hücrelerin sadece glial neoplazi gelişiminde rol oynadığını gösteriyor olabilir. Aynı çalışmada kortikal displazili dokuz olgudan sekizinde Sox-2 ekspresyonu gözlenmiştir(71). Bu sonuç da Sox-2 pozitif hücrelerin neoplazi dışı durumlarda da artabildiğini göstermektedir. Farklı derecelerdeki glial tümörler ile yapılan bir başka çalışmada Sox-2 ekspresyonunun glioblastomlarda daha yüksek olduğu gösterilmiştir(48).

Sox-2'nin PA'lardaki ekspresyonu ve sonuçların nüks gelişimi ile ilişkisini araştırmak üzere uyguladığımız İHK ile 48 olguda ortalama %45 (aralık %0-90) ekspresyon saptadık. Ekspresyon yaygınlığının nüksle ilişkisini araştırdık. Ancak boyanma yaygınlığı ve nüks gelişimi, subtotal ya da total eksizyon uygulanan olgularda nüksüz sağkalım süreleri üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptamadık. Çalışmamızdan önce Sox-2'nin glial tümörlerdeki ekspresyonu üzerine yapılan çalışmalarda sonuçlar Sox-2'nin yüksek dereceli glial tümörlerde daha yüksek oranda eksprese edildiği yönünde yorumlanmıştır(48). Ancak bizim çalışmamız sadece PA olgularında bile Sox-2'nin çok farklı oranlarda eksprese edilebildiğini, bu durumun nüks gelişimi ile ilişkisi olmadığını göstermektedir. Sox-2'nin PA'larda bu denli yüksek oranlarda eksprese ediliyor olması PA'ların prognozu ile ilişkili olmayabilir, ancak sonuçlar genel olarak glial tümörlerin, özel olarak da PA'ların gelişiminde

Sox-2 eksprese eden hücrelerin anlamlı bir rolü olabileceğinin göstergesi de olabilir mi? Ekspresyonun düşük olduğu olgulara bakıldığında iki olguda hiç ekspresyon olmamış üç olguda ise %10'un altında ekspresyon izlenmiştir. Bu olguların hiçbirinde nüks gelişmemiştir. Sox-2'nin diferansiye olmuş hücrelerde eksprese edilmediği düşünüldüğünde daha iyi prognozlu bu olgulardaki tümörlerin kök hücre özelliği göstermeyen daha matür hücreler içerdiği düşünülebilir mi? Sox-2 sonuçlarını diğer tüm İHK'sal bulgular ile korele ettiğimizde ne kök hücre belirleyicileri ne de matür hücre belirleyicileri ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptamadık. Bu sorulara daha ileri yorumlar geliştirebilmek için bu hipotezlerin hem daha geniş serilerle hem de deneysel modellerde yapılacak çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

xi. Olig-2

Olig-2, fare ve insan fetal dokularında ventral nöral progenitör hücrelerde saptanmıştır. Progenitör alanların dışında ise göç etmekte olan diferansiasyonunu tamamlamamış oligodendrosit öncüllerinde saptanmıştır. Nöronlara diferansiye olabilen progenitör hücrelerde de saptanmasına karşın diferansiye olmuş nöronlarda bulunmamaktadır. Ligon ve ark.(72) tarafından yapılan bir çalışmada GFAP pozitif matür astrositlerde de eksprese edilmediği bildirilmiştir. Bu çalışmada dört PA'yı da kapsayan 98 glial tümör olgusundan üç ependimom olgusu dışında tüm olgularda ekspresyon gözlenmiştir. Tüm glial tümörlerin yanı sıra nöronal ve primitif nöroektodermal tümörlerden bazılarında olig-2 ekspresyonu gözlenmiştir. Nöroektodermal olmayan hiçbir tümörde ekspresyon gösterilememiştir.

İkibinli yılların başında Olig-2 klinik çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır. 2001 yılında Marie ve ark(104) Olig-2'nin oligodendrogliomlar için özgül bir belirleyici olabileceğini iddia etmiş ancak histopatolojik olarak tanı zorlukları yaratan oligodendrogliomların tanısında yardımcı bir yöntem olacağı müjdesini taşıyan bu haber kısa sürede yerini hayal kırıklığına bırakmıştır.

PA'lar ve difüz astrositomlar arasında yapılan bir çalışmada Olig-2'nin PA'da belirgin olarak daha yüksek oranlarda boyandığı, özellikle GFAP negatif hücrelerde eksprese edildiği, bu hücrelerin Ki67 ile de olumlu boyandığı gösterilmiştir(83). Bir başka çalışmada ependimomlar ve PA'lar karşılaştırıldığında PA'larda daha yaygın ekspresyon gözlenmiştir(105).

Figarella-Bragner ve ark(106) tarafından yapılan bir çalışmada oligodendrosit öncülleri tarafından özgül olarak eksprese edilen PEN5 molekülünün 10 PA olgusunda da eksprese edildiği gösterilmiştir. Bu sonuç da PA'ların ve oligodendrogliomların aynı glial progenitör hücrelerden köken alabileceğini düşündürmüştür. Oligodendrosit tip 2 astrosit (O-2A) progenitör hücreleri, oligodendrositlere ve tip 2 astrositlere diferansiye olabilmektedir. PA'ları oluşturan bipolar hücrelerin tip 2 astrositlerin öncüllerinden köken almış olabileceği hipotezleri vardır(101).

En son çalışmalardan birinde 64 PA olgusunda oligodendrogliyal diferansiasyon belirleyicileri araştırılmıştır. Bu çalışmada matür oligodendrogliyal hücrelerde bulunan, ancak oligodendrogliomlarda eksprese edilmeyen myelin bazik protein (MBP), PA olgularının %25'inde pozitif bulunmuştur(101). Bu sonucun oligodendrosit öncülünden köken alan PA tümörlerinin zaman zaman ileri oligodendrogliyal diferansiasyon gösterdiğinin bir bulgusu olabileceği düşünülmüştür. 64 PA olgusundan 48'inde ekspresyon izlenmiş ve ekspresyonunun oligodendrogliom benzeri alanlarda daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada Olig-2 ekspresyonu ile Ki-67 indeksi arasında herhangi bir korelasyon bulunmamıştır.

Bizim çalışmamızda 50 olguda değerlendirilen Olig-2 antijeni ortalama %35,24 (aralık %0-90) ekspresyon göstermiştir. Sekiz olguda hiç ekspresyon olmazken altı olgu da %10'dan az ekspresyon göstermiştir. Olig-2'nin olguların %16'sında eksprese edilmemesi, Olig-2'nin PA'larda tanısal amaçlı olarak kullanımını sınırlandıracak bir sonuçtur. Olig-2 ekspresyon oranlarının nüks gelişimi ile istatistiksel olarak anlamlı ilişkisi bulunamamıştır. Olig-2 pozitif hücrelerin diğer kök hücre belirleyicileri ve matür hücre belirleyicileri ile arasında korelasyon saptanmamıştır. Özellikle GFAP pozitifliğinin Olig-2 ekspresyonu ile negatif yönlü bir ilişkiye sahip olmadığı anlaşılmaktadır. Bu konudaki diğer çalışmalarda Olig-2 pozitif hücrelerin GFAP eksprese etmedikleri iddia edilmiştir(101). Çalışmamızda olgulara çift immunohistokimya uygulaması yapılmamış, ya da konfokal mikroskopla iki antijenin ekspresyonu tek hücre düzeyinde karşılaştırılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızın sonuçları bu iddiayı tamamen çürütmek için yetersizdir. Ne var ki bu konuda yapılmış çalışma sayısı oldukça azdır ve Olig-2 pozitif hücrelerin GFAP eksprese edip etmediklerini, dolayısıyla da hangi aşamaya kadar diferansiasyon gerçekleştirdiklerini aydınlatabilmek için daha pek çok çalışma yapılması gerekmektedir.

Çalışmamızda Olig-2 ekspresyonu ile Ki-67 arasında anlamlı ilişki olduğu saptanmıştır. Bu sonuç yakın zamanda yayınlanan Takei ve ark.'ın yaptığı çalışmadaki(101)

Ki-67 ve Olig-2 ekspresyonu arasında korelasyon olmadığı iddiası ile çelişmektedir. Tanaka ve ark 'ın(83) 37 olgu ile yaptıkları çalışmanın sonuçları ile ise uyumludur. Olig-2 pozitif hücrelerin yüksek proliferatif aktiviteye sahip hücreler olma olasılıkları vardır.

5. Kromozom 1p/19q delesyonu

PA'ların oligodendrogliom-benzeri alanlara sahip olması ve oligodendroglial progenitör belirleyicileri eksprese etmesi, oligodendrogliomlarla başka benzer özellikleri taşıyıp taşımadıkları yönünden incelemeye değerdir. Kromozom 1p/19q delesyonu günümüzde oligodendrogliomların %70'e yakınında gözlenen ve cerrahi patolojide tanısal amaçlı olarak da değerlendirilmesi önerilen bir kromozal değişikliktir(107, 108). Olgularımızdan 15'inde floresan in situ hibridizasyon yöntemiyle yapılan incelemede kromozom 1p ve 19q'da delesyon izlenmemiştir.

6. PA'nın kök hücre kökeni

Bir kök hücre belirleyicisi olan Sox-2 bazı PA'larda değişken oranlarda eksprese edilmektedir. Çalışmamızda Sox-2 ekspresyonunun nüks ile ilişkisi saptanmamıştır, ancak özgül olmayan bir kök hücre belirleyicisi Sox-2'nin tümöral alanlarda izlenmesi PA gelişiminde kök hücrelerin rolü olabileceği hipotezimizi desteklemektedir. Bazı yüksek dereceli glial tümörlerde izlenen kök hücre belirleyicisi CD133 ekspresyonunun serimizdeki bir olgu dışında izlenmemiş olması ve bazı medulloblastomlarda gösterilen kök hücre belirleyicisi p75NTR ekspresyonunun antikoru uyguladığımız PA olgularında saptanmamış olması da bu sonuçlara eklendiğinde, PA'da görülen kök hücre benzeri hücrelerin biyolojik davranışı kötü klinik seyir yönünde etkilemediği düşünülebilir.

İmmunofenotipik olarak değişken kompozisyonlara sahip olgularımız, PA'ların köken aldıkları hücrelerin baskın olarak glial, daha az oranlarda diferansiasyonunu henüz tamamlamamış hücreleri de içeren kök hücre benzeri hücreler olabileceğini düşündürmüştür.

SONUÇ

1. Özgül olmayan bir kök hücre belirleyicisi Sox-2'nin PA'larda değişken oranlarda eksprese edilmesi PA'da kök hücre benzeri hücrelerin varlığını gösteriyor olabilir.
2. Olig-2 antijeninin PA'da yüksek oranlarda eksprese edilmesi PA'nın glial diferansiasyonu olan hücrelerden oluştuğunu göstermektedir. Oligodendroglionlarda sıklıkla görülen 1p/19q delesyonunun PA'da saptanmamış olması ise oligodendrogliom benzeri alanlara da sahip olabilen PA'ların tümörigenezde oligodendroglionlar ile ortak bir yolağa sahip olmadığını düşündürmüştür.
3. Yüksek dereceli glial tümörlerde izlenen kök hücre belirleyicisi CD133 bir olgu dışında, bazı medulloblastomlarda gösterilen kök hücre belirleyicisi p75NTR ekspresyonu ise antikor uygulanan hiçbir olguda saptanmamıştır.
4. PA'nın matür ve öncül hücre belirleyicileri yönünden değişken bir immunofenotipik kompozisyona sahip olduğu gösterilmiş ve PA kökeninin; baskın olarak glial, daha az oranlarda diferansiasyonunu henüz tamamlamamış hücreleri de içeren kök hücre benzeri hücreler olabileceği düşünülmüştür.
5. PA'ya özgül bir İHK'sal belirleyici yoktur. PA tanısı klinik ve radyolojik bulgular ışığında histopatolojik bulgulara dayanılarak konulmalıdır.
6. PA'da nüks görülme olasılığını en çok etkileyen değişken cerrahi eksizyon genişliğidir. PA'nın tedavisinde total eksizyon büyük önem taşımaktadır. Tanı anındaki yaşı 5 ve daha küçük olan olgular nüks gelişimi yönünden risk taşımaktadırlar. Ki-67 Bİ %2'nin üzerindeki olgularda nüks gelişme olasılığı yüksektir, bu olguların yakın klinik izlemi gerekmektedir.
7. Yüksek dereceli glial tümörlerde izlenen EGFR amplifikasyonu, p53 mutasyonu gibi moleküler değişiklikler PA'da görülmemiştir. PA'da nüks gelişiminde bu yolların rolünün olmadığı düşünülebilir.
8. Doku mikroarray yöntemi geniş immunohistokimyasal panel ve in situ hibridizasyon incelemesi kullanılan çalışmalar için standardizasyonu artıran ve maliyeti düşüren bir yöntemdir.

KAYNAKLAR

1. Central Brain Tumor Registry of United States. Primary Brain Tumors in the United States Statistical Report 2007.
2. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler O, Cavenee WK. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. 2007, Lyon: IARC,
3. Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P. Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer*, 1988;62 (10): 2152-65.
4. Burkhardt K, Heuberger F, Delavelle J. Pilocytic astrocytoma in the elderly. *Clin Neuropathol*, 2007;26 (6): 306-10.
5. Bell D, Chitnavis BP, Al-Sarraj S, Connor S ve ark. Pilocytic astrocytoma of the adult--clinical features, radiological features and management. *Br J Neurosurg*, 2004;18 (6): 613-6.
6. Afra D, Muller W, Slowik F, Firsching R. Supratentorial lobar pilocytic astrocytomas: report of 45 operated cases, including 9 recurrences. *Acta Neurochir (Wien)*, 1986;81 (3-4): 90-3.
7. Fisher PG, Breiter SN, Carson BS, Wharam MD ve ark. A clinicopathologic reappraisal of brain stem tumor classification. Identification of pilocystic astrocytoma and fibrillary astrocytoma as distinct entities. *Cancer*, 2000;89 (7): 1569-76.
8. Minehan KJ, Shaw EG, Scheithauer BW, Davis DL ve ark. Spinal cord astrocytoma: pathological and treatment considerations. *J Neurosurg*, 1995;83 (4): 590-5.
9. Bannykh S. Images in neuro-oncology. Pilocytic astrocytoma. *J Neurooncol*, 2004;67 (3): 335.
10. Coakley KJ, Huston J, 3rd, Scheithauer BW, Forbes G ve ark. Pilocytic astrocytomas: well-demarcated magnetic resonance appearance despite frequent infiltration histologically. *Mayo Clin Proc*, 1995;70 (8): 747-51.
11. Hurwitz MD, Burger PC, Goldthwaite PT, Tihan T ve ark. Prognostic implications for gadolinium enhancement of the meninges in low-grade astrocytomas of childhood. *Pediatr Neurosurg*, 2001;34 (2): 88-93.
12. Khatib ZA, Heideman RL, Kovnar EH, Langston JA ve ark. Predominance of pilocytic histology in dorsally exophytic brain stem tumors. *Pediatr Neurosurg*, 1994;20 (1): 2-10.

13. Tomlinson FH, Scheithauer BW, Hayostek CJ, Parisi JE ve ark. The significance of atypia and histologic malignancy in pilocytic astrocytoma of the cerebellum: a clinicopathologic and flow cytometric study. *J Child Neurol*, 1994;9 (3): 301-10.
14. Brat DJ, Burger PC. Cerebral pilocytic astrocytoma: distinction from infiltrating fibrillary astrocytomas. *Pathology Case Reviews*, 1998;3: 290-295.
15. Malik A, Deb P, Sharma MC, Sarkar C. Neuropathological spectrum of pilocytic astrocytoma: an Indian series of 120 cases. *Pathol Oncol Res*, 2006;12 (3): 164-71.
16. Wippold FJ, 2nd, A P, J L. Neuropathology for the Neuroradiologist: Rosenthal Fibers. *Am J Neuroradiol*, 2006;27: 958-61.
17. Kim SH, Kim TS. Squash smear findings of eosinophilic granular bodies in pilocytic astrocytoma. *Acta Cytol*, 2005;49 (1): 112-4.
18. Murayama S, Bouldin TW, Suzuki K. Immunocytochemical and ultrastructural studies of eosinophilic granular bodies in astrocytic tumors. *Acta Neuropathol*, 1992;83: 408-414.
19. Hirose T, Giannini C, Scheithauer BW. Ultrastructural features of pleomorphic xanthoastrocytoma: a comparative study with glioblastoma multiforme. *Ultrastruct Pathol*, 2001;25 (6): 469-78.
20. Hayostek CJ, Shaw EG, Scheithauer B, O'Fallon JR ve ark. Astrocytomas of the cerebellum. A comparative clinicopathologic study of pilocytic and diffuse astrocytomas. *Cancer*, 1993;72 (3): 856-69.
21. Braun-Fischer A, Romeike BF, Eymann R, Glas B ve ark. Pilocytic astrocytoma with subarachnoid dissemination. *Radiologe*, 1997;37 (11): 899-904.
22. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK ve ark. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, 2007;114 (2): 97-109.
23. Tihan T, Fisher PG, Kepner JL, Godfraind C ve ark. Pediatric astrocytomas with monomorphous pilomyxoid features and a less favorable outcome. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1999;58 (10): 1061-8.
24. Fernandez C, Figarella-Branger D, Girard N, Bouvier-Labit C ve ark. Pilocytic astrocytomas in children: prognostic factors--a retrospective study of 80 cases. *Neurosurgery*, 2003;53 (3): 544-53; discussion 554-5.

25. Gunny RS, Hayward RD, Phipps KP, Harding BN ve ark. Spontaneous regression of residual low-grade cerebellar pilocytic astrocytomas in children. *Pediatr Radiol*, 2005;35 (11): 1086-91.
26. Boch AL, Cacciola F, Mokhtari K, Kujas M ve ark. Benign recurrence of a cerebellar pilocytic astrocytoma 45 years after gross total resection. *Acta Neurochir*, 2000;142 (3): 341-6.
27. Bohner G, Masuhr F, Distl R, Katchanov J ve ark. Pilocytic astrocytoma presenting as primary diffuse leptomeningeal gliomatosis: report of a unique case and review of the literature. *Acta Neuropathol*, 2005;110 (3): 306-11.
28. Jager B, Schuhmann MU, Schober R, Kortmann RD ve ark. Induction of gliosarcoma and atypical meningioma 13 years after radiotherapy of residual pilocytic astrocytoma in childhood. *Pediatr Neurosurg*, 2008;44 (2): 153-8.
29. Brown MT, Friedman HS, Oakes WJ, Boyko OB ve ark. Chemotherapy for pilocytic astrocytomas. *Cancer*, 1993;71 (10): 3165-72.
30. Dirven CM, Mooij JJ, Molenaar WM. Cerebellar pilocytic astrocytoma: a treatment protocol based upon analysis of 73 cases and a review of the literature. *Childs Nerv Syst*, 1997;13 (1): 17-23.
31. Hadjipanayis CG, Kondziolka D, Gardner P, Niranjan A ve ark. Stereotactic radiosurgery for pilocytic astrocytomas when multimodal therapy is necessary. *J Neurosurg*, 2002;97 (1): 56-64.
32. Kayama T, Tominaga T, Yoshimoto T. Management of pilocytic astrocytoma. *Neurosurg Rev*, 1996;19 (4): 217-20.
33. Rorive S, Maris C, Debeir O, Sandras F ve ark. Exploring the distinctive biological characteristics of pilocytic and low-grade diffuse astrocytomas using microarray gene expression profiles. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2006;65: 794-807.
34. Colin C, Baeza N, Bartoli C, Fina F ve ark. Identification of genes differentially expressed in glioblastoma versus pilocytic astrocytoma using suppression subtractive hybridization. *Oncogene*, 2006;25: 2818-26.
35. Houshmandi SS , Gutmann DH. All in the family: Using inherited cancer syndromes to understand de-regulated cell-signaling in brain tumors. *J Cell Biochem*, 2007;102: 811-19.
36. Kaleb HY. The genetic and molecular pathogenesis of NF1 and NF2. *Semin Pediatr Neurol*, 2006;13: 21-26.

37. Wimmer K, Eckart M, Meyer-Puttlitz B, Fonatsch C ve ark. Mutational expression analysis of the NF1 gene argues against a role as tumor suppressor in sporadic pilocytic astrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2002;61: 896-902.
38. Bing F, Kremer S, Lamalle L, Chabardes S ve ark. [Value of perfusion MRI in the study of pilocytic astrocytoma and hemangioblastoma: Preliminary findings.]. *J Neuroradiol*, 2008;
39. Bar EE, Lin A, Tihan T, Burger PC ve ark. Frequent gains at chromosome 7q34 involving BRAF in pilocytic astrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2008;67 (9): 878-87.
40. Jones DT, Kocialkowski S, Liu L, Pearson DM ve ark. Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer Res*, 2008;68 (21): 8673-7.
41. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE ve ark. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 2003;63 (18): 5821-8.
42. Wang Y, Bai Y, Li X, Hu Q ve ark. Fetal human neural progenitors can be the target for tumor transformation. *NeuroReport*, 2004;15 (12): 1907-12.
43. Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M ve ark. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003;100 (25): 15178-83.
44. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 2001;414 (6859): 105-11.
45. Dell'Albani P. Stem cell markers in gliomas. *Neurochem Res*, 2008;33 (12): 2407-15.
46. Wernig M, Brüstle O. Fifty ways to make a neuron: *Shifts in stem cell hierarchy and their implications for neuropathology and CNS repair. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2002;61 (2): 101-10.
47. Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M ve ark. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003;100 (25): 15178-83.
48. Ma YH, Mentlein R, Knerlich F, Kruse ML ve ark. Expression of stem cell markers in human astrocytomas of different WHO grades. *J Neurooncol*, 2008;86 (1): 31-45.
49. Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Tramontin AD. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci*, 2001;2 (4): 287-93.

50. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, 1997;3 (7): 730-7.
51. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B ve ark. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res*, 2004;64 (19): 7011-21.
52. Tunicci P, Bissola L, Lualdi E, Pollo B ve ark. Genetic alterations and in vivo tumorigenicity of neurospheres derived from an adult glioblastoma. *Mol Cancer*, 2004;3: 25.
53. Yuan X, Curtin J, Xiong Y, Liu G ve ark. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene*, 2004;23 (58): 9392-400.
54. Aboody KS, Brown A, Rainov NG, Bower KA ve ark. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000;97 (23): 12846-51.
55. Munsie MJ, Michalska AE, O'Brien CM, Trounson AO ve ark. Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei. *Curr Biol*, 2000;10 (16): 989-92.
56. Rutka JT, Murakami M, Dirks PB, Hubbard SL ve ark. Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review. *J Neurosurg*, 1997;87 (3): 420-30.
57. Rieske P, Azizi SA, Augelli B, Gaughan J ve ark. A population of human brain parenchymal cells express markers of glial, neuronal and early neural cells and differentiate into cells of neuronal and glial lineages. *Eur J Neurosci*, 2007;25 (1): 31-7.
58. Schiffer D, Giordana MT, Mauro A, Migheli A ve ark. Immunohistochemical demonstration of vimentin in human cerebral tumors. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1986;70 (3-4): 209-19.
59. Preusser M, Laggner U, Haberler C, Heinzl H ve ark. Comparative analysis of NeuN immunoreactivity in primary brain tumours: conclusions for rational use in diagnostic histopathology. *Histopathology*, 2006;48 (4): 438-44.
60. Miller DC, Koslow M, Budzilovich GN, Burstein DE. Synaptophysin: a sensitive and specific marker for ganglion cells in central nervous system neoplasms. *Hum Pathol*, 1990;21 (3): 271-6.

61. Gould VE, Rorke LB, Jansson DS, Molenaar WM ve ark. Primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system express neuroendocrine markers and may express all classes of intermediate filaments. *Hum Pathol*, 1990;21 (3): 245-52.
62. Wolf HK, Buslei R, Schmidt-Kastner R, Schmidt-Kastner PK ve ark. NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J Histochem Cytochem*, 1996;44 (10): 1167-71.
63. Nozaki M, Tada M, Kobayashi H, Zhang CL ve ark. Roles of the functional loss of p53 and other genes in astrocytoma tumorigenesis and progression. *Neuro Oncol*, 1999;1 (2): 124-37.
64. Kleihues P, Ohgaki H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-oncol*, 1999;1 (1): 44-51.
65. Machen SK, Prayson RA. Cyclin D1 and MIB-1 immunohistochemistry in pilocytic astrocytomas: a study of 48 cases. *Hum Pathol*, 1998;29 (12): 1511-6.
66. Alderson LM, Castleberg RL, Harsh GRt, Louis DN ve ark. Human gliomas with wild-type p53 express bcl-2. *Cancer Res*, 1995;55 (5): 999-1001.
67. DeFreitas MF, McQuillen PS, Shatz CJ. A novel p75NTR signaling pathway promotes survival, not death, of immunopurified neocortical subplate neurons. *J Neurosci*, 2001;21 (14): 5121-9.
68. Buhren J, Christoph AH, Buslei R, Albrecht S ve ark. Expression of the neurotrophin receptor p75NTR in medulloblastomas is correlated with distinct histological and clinical features: evidence for a medulloblastoma subtype derived from the external granule cell layer. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2000;59 (3): 229-40.
69. Johnston ALM, Lun X, Rahn JJ, Liacini A ve ark. The p75 Neurotrophin Receptor Is a Central regulator of glioma invasion. *PLoS Biology*, 2007;5 (8): 1723-37.
70. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C ve ark. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Experimental Neurology*, 2000;164 (2): 247-256.
71. Hoon J, ;P. S-H, Seung-Ki K, Paek SH ve ark. Sox-2 expression in brain tumors: A reflection of the neuroglial differentiation pathway. *Am J Surg Pathol*, 2008;32 (1): 103-12.
72. Ligon KL, Alberta JA, Kho AT, Weiss J ve ark. The oligodendroglial lineage marker OLIG2 is universally expressed in diffuse gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004;63 (5): 499-509.

73. Golanska E, Hulas-Bigoszewska K, Wojcik I, Rieske P ve ark. CYP46: a risk factor for Alzheimer's disease or a coincidence? *Neurosci Lett*, 2005;383 (1-2): 105-8.
74. Bagri A, Burger PC, Bollen A, Tihan T. Assesment of alternative methods for estimating the MIB-1 labeling index. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004;63 (5): 538.
75. Mamelak AN, Prados MD, Obana WG, Cogen PH ve ark. Treatment options and prognosis for multicentric juvenile pilocytic astrocytoma. *J Neurosurg*, 1994;81 (1): 24-30.
76. Bowers DC, Gargan L, Kapur P, Reisch JS ve ark. Study of the MIB-1 labeling index as a predictor of tumor progression in pilocytic astrocytomas in children and adolescents. *J Clin Oncol*, 2003;21 (15): 2968-73.
77. Brown PD, Buckner JC, O'Fallon JR, Iturria NL ve ark. Adult patients with supratentorial pilocytic astrocytomas: a prospective multicenter clinical trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004;58 (4): 1153-60.
78. Pencalet P, Maixner W, Sainte-Rose C, Lellouch-Tubiana A ve ark. Benign cerebellar astrocytomas in children. *J Neurosurg*, 1999;90 (2): 265-73.
79. Gilles FH, Brown WD, Leviton A, Tavare CJ ve ark. Limitations of the World Health Organization classification of childhood supratentorial astrocytic tumors. *Children Brain Tumor Consortium. Cancer*, 2000;88 (6): 1477-83.
80. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M ve ark. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 1998;4 (7): 844-7.
81. Milanes-Yearsley M, Hammond ME, Pajak TF, Cooper JS ve ark. Tissue micro-array: a cost and time-effective method for correlative studies by regional and national cancer study groups. *Mod Pathol*, 2002;15 (12): 1366-73.
82. Rubin MA, Dunn R, Strawderman M, Pienta KJ. Tissue microarray sampling strategy for prostate cancer biomarker analysis. *Am J Surg Pathol*, 2002;26 (3): 312-9.
83. Tanaka Y, Sasaki A, Ishiuchi S, Nakazato Y. Diversity of glial cell components in pilocytic astrocytoma. *Neuropathology*, 2008;28 (4): 399-407.
84. Bodey B, Cosgrove MM, Gonzalez-Gomez I, Siegel SE ve ark. Co-expression of four intermediate filament subclasses in childhood glial neoplasms. *Mod Pathol*, 1991;4: 742-49.
85. Varlet P, Soni D, Miquel C, Roux FX ve ark. New variants of malignant glioneuronal tumors: a clinicopathological study of 40 cases. *Neurosurgery*, 2004;55 (6): 1377-91: discussion 1391-2.

86. Giannini C, Scheithauer BW, Lopes MB, Hirose T ve ark. Immunophenotype of pleomorphic xanthoastrocytoma. *Am J Surg Pathol*, 2002;26 (4): 479-85.
87. Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA. Control of synapse number by glia. *Science*, 2001;291 (5504): 657-661.
88. Katsetos CD, Del Valle L, Geddes JF, Assimakopoulou M ve ark. Aberrant localization of the neuronal class III beta-tubulin in astrocytomas. *Arch Pathol Lab Med*, 2001;125 (5): 613-24.
89. Nozaki M, Tada M, Matsumoto R, Sawamura Y ve ark. Rare occurrence of inactivating p53 gene mutations in primary non- astrocytic tumors of the central nervous system: reappraisal by yeast functional assay. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1998;95 (3): 291-6.
90. Nakamizo A, Inamura T, Ikezaki K, Yoshimoto K ve ark. Enhanced apoptosis in pilocytic astrocytoma: a comparative study of apoptosis and proliferation in astrocytic tumors. *J Neurooncol*, 2002;57 (2): 105-14.
91. Lang FF, Miller DC, Pisharody S, Koslow M ve ark. High frequency of p53 protein accumulation without p53 gene mutation in human juvenile pilocytic, low grade and anaplastic astrocytomas. *Oncogene*, 1994;9 (3): 949-54.
92. Tihan T, Davis R, Elowitz E, DiCostanzo D ve ark. Practical value of Ki-67 and p53 labeling indexes in stereotactic biopsies of diffuse and pilocytic astrocytomas. *Arch Pathol Lab Med*, 2000;124 (1): 108-13.
93. Giannini C, Scheithauer BW, Burger PC, Christensen MR ve ark. Cellular proliferation in pilocytic and diffuse astrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1999;58 (1): 46-53.
94. Kordek R, Biernat W, Alwasiak J, Liberski PP. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 immunopositivity in human astrocytic tumours. *Acta Neurochirurgica*, 1996;138 (5): 509-512.
95. Handgretinger R, Gordon PR, Leimig T, Chen XH ve ark. Biology and plasticity of CD133(+) hematopoietic stem cells. *Hematopoietic Stem Cells 2002: Genetics and Function*, 2003;996: 141-151.
96. Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A ve ark. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Research*, 2007;67 (9): 4010-4015.

97. Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A ve ark. CD133+ and CD133- Cancer stem cells in glioblastoma. *Neuro-Oncology*, 2006;8 (4): 317-317.
98. Rebetz J, Tian D, Persson A, Widegren B ve ark. Glial progenitor-like phenotype in low-grade glioma and enhanced CD133-expression and neuronal lineage differentiation potential in high-grade glioma. *PLoS ONE*, 2008;3 (4): e1936.
99. Barnes M, Eberhart C, Collins R, Tihan T. Expression of p75NTR in fetal brain and medulloblastomas: Evidence of a precursor cell marker and its persistence in neoplasia, 2008.
100. Chiaretti A, Aloe L, Antonelli A, Ruggiero A ve ark. Neurotrophic factor expression in childhood low-grade astrocytomas and ependymomas. *Childs Nervous System*, 2004;20 (6): 412-419.
101. Takei H, Yogeswaren ST, Wong KK, Mehta V ve ark. Expression of oligodendroglial differentiation markers in pilocytic astrocytomas identifies two clinical subsets and shows a significant correlation with proliferation index and progression free survival. *J Neurooncol*, 2008;86 (2): 183-90.
102. Brazel CY, Limke TL, Osborne JK, Miura T ve ark. Sox2 expression defines a heterogeneous population of neurosphere-forming cells in the adult murine brain. *Aging Cell*, 2005;4 (4): 197-207.
103. Suh H, Consiglio A, Ray J, Sawai T ve ark. In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2(+) neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*, 2007;1 (5): 515-528.
104. Marie Y, Sanson M, Mokhtari K, Leuraud P ve ark. OLIG2 as a specific marker of oligodendroglial tumour cells. *Lancet*, 2001;358 (9278): 298-300.
105. Ishizawa K, Komori T, Shimada S, Hirose T. Olig2 and CD99 are useful negative markers for the diagnosis of brain tumors. *Clinical Neuropathology*, 2008;27 (3): 118-128.
106. Figarella-Branger D, Daniel L, Andre P, Guia S ve ark. The PEN5 epitope identifies an oligodendrocyte precursor cell population and pilocytic astrocytomas. *Am J Pathol*, 1999;155 (4): 1261-9.
107. Fuller CE, Perry A. Fluorescence in situ hybridization (FISH) in diagnostic and investigative neuropathology. *Brain Pathol*, 2002;12 (1): 67-86.
108. Tihan T, Erşen A. Pathology of malignant gliomas: Challenges of everyday practice and the WHO 2007 *Türk Patoloji Dergisi*, 2008;24 (3): 194-212.