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

Tez Yöneticisi
Dr. Öğr. Üyesi Banu TÜTÜNCÜLER

YÜKSEK DERECELİ GLİOMLARDA İNVAZYON BELİRTEÇLERİNİN EKSPRESYONUNUN VE KLİNİK ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Yener AKTÜRK

EDİRNE- 2022

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimine başladığım ilk günden bu yana hiçbir konuda desteğini esirgemeyen, değerli tez hocam Dr. Öğr. Üyesi Banu TÜTÜNCÜLER'e, eğitimimin her aşamasında hayat tecrübeleri ve bilgilerini aktaran kıymetli hocalarım Prof. Dr. Metin ORAKDÖĞEN'e, Prof. Dr. Cumhur KILINÇER'e, Doç. Dr. Osman ŞİMŞEK'e, Doç. Dr. Emre DELEN'e ve Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Tolgay AKINCI'ya,

Tezime verdikleri destek için Prof. Dr. Hakan GÜRKAN'a ve tüm Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi ekibine,

Asistanlığım boyunca birlikte çalıştığım kıymetli dostlarım Dr. Yusuf Mansur'a, Dr. İsa 'ya, Dr. Ahmet Hamit'e, Dr. Barış'a, Dr. Merve'ye ve Dr. Muhammed Burak'a; kliniğimiz ve ameliyathanemizdeki hemşire, sekreter ve personellerimize,

Beni Cumhuriyetin ilkeleri ile yetiştirmiş olan aileme, hayattaki yol arkadaşım, daima yanımda olan sevgili eşim Dr. Tuğba DURGUT AKTÜRK'e, teşekkür ederim.

Çalışmamız Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Proje birimince 2021/126 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir. Kendilerine ayrıca teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 2

- **TARİHÇE** 2
- **EPİDEMİYOLOJİ** 3
- **ETİYOLOJİ** 4
- **KLİNİK PREZENTASYON** 4
- **RADYOLOJİ** 5
- **TEDAVİ** 6
- **GLİOMA VE İNVAZYON** 7

GEREÇ VE YÖNTEMLER 12

BULGULAR 16

TARTIŞMA 28

SONUÇLAR 32

ÖZET 34

SUMMARY 36

KAYNAKLAR 38

EKLER

KISALTMALAR

BOS	**:** Beyin Omurilik Sıvısı
BT	**:** Bilgisayarlı Tomografi
CCN1/CYR61	**:** Hücresel İletim Ağı Faktörü 1
DDG	**:** Düşük Dereceli Gliom
DSÖ	**:** Dünya Sağlık Örgütü
GHTM	**:** Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi
KİBAS	**:** Kafa İçi Basınç Artış Sendromu
MRG	**:** Manyetik Rezonans Görüntüleme
PET-CT	**:** Pozitron Emisyon Tomografisi
PI3K/Akt	**:** Fosfoinositid-3-kinaz-protein kinaz- aktin yolağı
PLAU	**:** Ürokinaz plazminojen aktivatörü reseptörü
S1P1	**:** Sfingozin-1-fosfat-1
S1PR1	**:** Sfingozin-1-fosfat-1 reseptörü
S1PR3	**:** Sfingozin-1-fosfat-3 reseptörü
SPHK1	**:** Sfingozin kinaz-1
UPA	**:** Ürokinaz plazminojen aktivatörü
YDG	**:** Yüksek Dereceli Gliom

GİRİŞ VE AMAÇ

Gliomalar primer beyin tümörleri içerisinde en sık rastlanan histolojik tiptir. İçinde genetik mutasyonlar ve moleküler anormallikler barındıran yüksek dereceli glial (YDG) tümörlerde görülen erken nüks ve kısa sağkalım; tümörün invazyon ve neoanjiyogenez yolaklarında rol oynayan moleküllerde çeşitli mutasyonlar ve ekspresyon değişikliklerine bağlanmaktadır (1–3).

Moleküler ve genetik olarak heterojen bir grup olan bu tümörlerde değişik invazyon ve anjiyogenez yolakları ile ilgili birçok çalışma yapılmakla birlikte bu çalışmaların tamamına yakını hücre kültürlerinde ya da deneysel hayvan glioma modellerinde yapılmaktadır. Tümörlerin davranışlarında tümörün in vivo mikro çevresel yapısı da önemlidir (4–7). Dolayısıyla insan kaynaklı tümör rezeksiyon materyalleri kullanılarak yapılan çalışmaların tümör davranışı ile ilgili daha aydınlatıcı olacağını düşünmekteyiz.

Yüksek dereceli gliomalarda görülen invazyonun patofizyolojisini araştırmak amacıyla beyin tümörü nedeniyle ameliyat endikasyonu olan ve ameliyatı kabul eden hastaların patolojik inceleme için alınan tümör örneklerinde aynı invazyon yolağı üzerinde yer alan S1PR1, S1PR3, SPHK1, PLAU, CCN1 genlerinin RNA ekspresyonunu araştırılması planlandı. Kliniğimizde takip olan bu hastaların rutin takiplerinde görülen nüks/progresyon görülme oranı ve zamanını da takip ederek bu moleküllerdeki ekspresyon değişikliklerinin klinik önemini ortaya koymak amaçlandı.

Çalışmadaki temel hedefimiz S1PR1, S1PR3, SPHK1, PLAU, CCN1 genlerinin RNA ekspresyonlarının invazyon ile olumlu ya da olumsuz ilişkisini araştırmaktı.

Bu çalışmanın amacı gliomaların invazyon mekanizmasında yer aldığı düşünülen S1PR1, S1PR3, SPHK1, PLAU, CCN1 genlerinin ekspresyon miktarlarındaki artış veya azalışlarının invazyondaki öneminin ortaya konması ve glioma hastalarının yaşam süresine etkisinin araştırılmasıdır.

GENEL BİLGİLER

TARİHÇE

Beyin ile ilgili girişimlerin tarihi M.Ö.'ye kadar dayanmaktadır. Şamanların eski zamanlarda vücuttan kötü ruhu çıkarmak ve baş ağrısını gidermek amaçlı yaptığı trapenasyonlar bilinmektedir. İlk glioma kelimesi literatürde 1800'de Berns ve 1804' te Abernety tarafından yapılan otopsiler sonucunda raporlanmaktadır (8).

1848'de Virchow un mikroskopla birlikte "nöroglia" tanımı ilk histolojik tanım olarak kabul edilmektedir. Gliomalar ile ilgili ilk kabul gören histolojik çalışma 1926 yılında Percival Bailey ve Harvey Cushing tarafından yapıldı (8).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından beyin tümörlerinin histolojik kökenine dayanan ilk sınıflama 1979 yılında yapıldı (9). DSÖ 1993 yılında pleomorfik ksantoastrositom, merkezi nörositom, infantil desmoplastik astrositom/ganlioma ve disembriyoplastik nöroepitelyal tümör tanımlarını sınıflamaya dahil edildi (10). DSÖ 2000 yılında üçüncü ventrikülün kordoid gliomu, serebellar liponörositoma, atipik teratoid/rabdoid meningioma gibi farklı histolojik varyantları ekledi ayrıca klinik olarak farklı sağkalım ile sonuçlandığı bildirilen oligodendrogliomların 1p ve 19q belirteçleri, teratoid/rabdoid tümörlerin 22q/INI1 belirteçleri gibi genetik özellikler sınıflamaya dahil edildi (11). DSÖ 2007 yılında sınıflamaya anjiyosentrik glioma, papiller glionöronal tümör, dördüncü ventrikülün rozet oluşturan glionöronal tümörü, adenohipofizin pineal bölgesi pituisitoması ve iğsi hücreli onkositomayı ekledi, sınıflama içerisinde klinik sonuçlara etki ettiği gösterilen varyantların listedeki yerleri değiştirildi, 25 patalog 70 den fazla uluslararası uzmanın katkıları ile oluşturulan bu sınıflama beyin tümörlerinin standart sınıflaması olarak tavsiye edilmektedir (12). Yıllar içinde beyin tümörlerinin doğal seyri ve davranışlarında histolojik özelliklerinin yanında moleküler ve genetik değişikliklerinde rol

oynadığı görülmektedir. DSÖ 2016 yılında ilk defa sınıflamada histolojiye ek olarak moleküler parametreler kullanıldı. 2016 sınıflamasına IDH-wild tip, IDH-mutant tip, yaygın orta hat gliomu, H3 K27M-mutant tip, RELA füzyon pozitif ependimom, WNT ile aktive olan medulloblastom, SHH ile aktive olan çok katmanlı rozetlere sahip embriyonal tümör gibi yeni sınıflamalar dahil edildi. Bu sınıflama gliomaların prognostik özelliklerini dikkate almaktadır. Klinik ve prognostik önemi olmayan varyantlar ve sınıflar silindi. DSÖ tarafından 2016 sınıflaması, beyin tümörlü hastaların sağkalım sürelerinde artışa yola açabilecek, klinik veya biyolojik çalışmaları kolaylaştırmaktadır (13). DSÖ 2021 yılındaki beşinci baskısı yayınlayana kadar Dünya Sağlık Örgütü Merkezi Sinir Sistemi Tümör Taksonomisine Moleküler Pratik Yaklaşımlar Bilgilendirme Konsorsiyumu (WHO c-IMPACT-NOW) tarafından düzenli olarak güncellemeler yayınlandı. Güncellemelerde moleküler tipler ve alttipler üzerine yoğunlaşmaktadır. Kesin patolojik tanı için histolojik, moleküler ve genetik testlerin sayısının artması pratikte bazı zorlukları da beraberinde getirmektedir. DSÖ 2021 tanı kriterleri sonrası tüm tetkikleri yapabilen merkez sayısı az olduğundan ve küçük merkezlerde tüm tetkikler yapılamadığından DSÖ'ye gelen veri miktarı azaldı (14,15). DSÖ 2021 yılında, sınıflama kriterlerini yerine getimek için gerekli olan moleküler testlerin dünya genelinde her zaman mevcut olmaması nedeniyle sınıflamaya prognostik önem taşıyan moleküler belirteçler ve histolojiyi kombine edilerek "entegre tanı" terminolojisini ekledi (8,16–20). En sık görülen primer beyin tümörü olan gliomlarda, moleküler ve genetik bozuklukların prognoz ve sağkalımda önemi anlaşıldıkça, prognoz ve mortalitezi belirlemede etkili olduğu varsayılan neoangiogenez ve invazyon ile ilgili klinik, histopatolojik ve moleküler genetik çalışmalar artmaktadır.

EPİDEMİYOLOJİ

Gliomalar en sık görülen primer beyin tümörleridir. Yüksek dereceli gliomalar, tüm gliomaların %81'ini oluşturur. Glioma hastalarının prevelansı toplumda güncel görüntüleme ve sağlık hizmetlerine erişimin artışına paralel olarak artmaktadır. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı 2015 istatistiklerine göre Türkiye'de santral sinir sistemi kanserlerinin görülme insidansı erkeklerde yüz binde 5,3 kadınlarda ise yüz binde 4,1'dir (21). Mladenovsk ve arkadaşları tarafından yüksek dereceli gliomaların 5 yıllık sağkalım oranı yaklaşık %10 olarak belirtilmektedir(22)Mikro nöroşirurujikal tekniklerin gelişmesi navigasyon, nöromonitörizasyon gibi cerrahiyi destekleyici cihazların daha yaygın kullanılmasıyla beraber rezeksiyon miktarları artmaktadır. Son 60 yılda nöro anestezinin, sterilizasyonun, cerrahi tekniklerin ve araçların gelişmesi ile birlikte 1949 yılında %41,1 olan operasyona bağlı

mortalite günümüzde %2-3'lerin altında seyretmektedir (23,24).

2019 yılında Hart ve arkadaşlarının yapmış olduğu derlemede biyopsi yapılan hastalarda median sağkalım 85 gün, rezeksiyon yapılan hastalarda median sağ kalım 171 gün olarak bildirilmektedir (25). İncekara ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptıkları sistematik meta-analiz çalışmasında, subtotal rezeksiyon yapılan hasta grubunun median sağkalımının, gross total rezeksiyon yapılan hasta grubuna göre 6,4 ay daha kısa olduğunu bildirilmektedir (26). Yüksek dereceli glioma hastalarına multidisipliner yaklaşımlar sonucunda median sağkalım süresi 5,5 aydan günümüzde 9 aya kadar artmaktadır (21,27,28).

ETİYOLOJİ

Gliomanın etiyolojisini incelediğimizde; literatürde ispatlanmış faktörler bulunmamakla birlikte en çok glioma sıklığını arttırdığı kanıtlanan risk faktörü, yüksek dozda iyonize radyasyon maruziyetidir. Glioma sıklığının düşük bulunduğu grup ise atopik bünyeli kişiler olarak karşımıza çıkmaktadır (29,30). Atopi ve glioma arasındaki ters orantının neden-sonuç ilişkisi veya patofizyolojisi net olarak ortaya konamamaktadır (31).Gliomanın etiyolojisindeki en önemli faktörler olarak glioma mikro ortamı, hücrelerin kökeni ve yaşlanma ile birlikte biriken mutasyon yükü karşımıza çıkmaktadır (31,32).

Ayrıca literatürde; formaldehit, non-iyonize radyasyon ve cep telefonu kaynaklı elektromanyetik dalgalar ile ilgili çalışmalar mevcut olup, bu faktörlerin glioma sıklığını arttırdığı kanıtlanamamaktadır (30). Vinil klorür, pestisit, sigara, petrol rafine etme ve sentetik kauçuk üretimi gliomaların gelişimi ile ilgisi araştırılmakta ama net olarak ilişkilendirilememektedir (33).

Etiyolojisi halen sis perdesinin ardında durmaya devam etmektedir. Sis perdesinin aralanması için daha fazla bu konuda çalışmalara ihtiyaç vardır.

KLİNİK PREZENTASYON

Gliomaların en sık klinik prezentasyonu; baş ağrısı, progresif mental kognitif değişiklerdir. Nadir de olsa, tümör içine kanamaya bağlı KİBAS veya epileptik nöbet gibi akut prezentasyon olabilir. Yüksek dereceli glioma hastalarının büyük çoğunluğu birkaç aylık kısa klinik öykü ile başvururken düşük dereceli glioma hastaları 1-2 yıl gibi daha uzun bir klinik öykü tariflemektedir. Düşük dereceli gliomların en sık başvuru nedeni baş ağrısı ve nöbet iken; yüksek dereceli gliomların en sık başvuru nedeni, tümörün lokalizasyonuna bağlı nörolojik fonksiyon kayıpları ve kitle etkisine bağlı nörolojik semptomlardır. Baş ağrısının, tümör boyutundaki kademeli artıştan ve tümörün çevresinde oluşan ödemden kaynaklandığı

düşünülmektedir. Yüksek dereceli gliomaların en önemli klinik bulgusu ilerleyen nörolojik defisittir %68 (34,35). Kitle boyutunun artması KİBAS'a yol açabilirken, BOS dolaşım yollarında bası sonucu hidrosefali gelişebilir. Tümör kitle etkisi ile komşuluğu olan kraniyal sinirlere bası yapabilir ve bası yaptığı sinirde fonksiyon kaybına yol açabilir (36). Erişkin yaş grubunda epileptik nöbet ve karakter değiştirmiş inatçı baş ağrısı, radyolojik görüntüleme endikasyonudur.

RADYOLOJİ

Glioma tanısı için altın standart görüntüleme yöntemi kraniyal MRG'dir. Kraniyal MRG bize tümör derecesi, komşuluğu ve peritümöral ödem açısından bilgi verir (37).

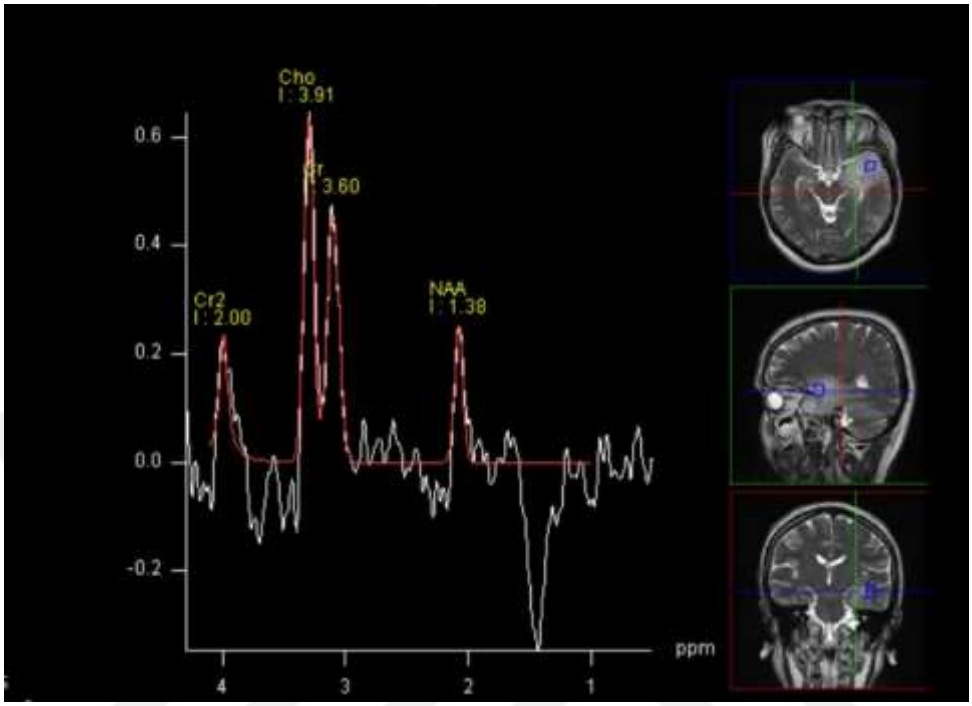
Düşük dereceli gliomalar (DDG) sıklıkla MRG'de T1 hipointens, T2 ve FLAIR'de hiperintens görülür. DDG'lerde perilezyoner ödem ayırt edilebilir. DDG'lerde nekroz, kanama veya kalsifikasyon görülmez (38). DDG'lerin genellikle MRG'de kontrast tutması beklenmez fakat gliomalar heterojen tümörler olduğundan, içerisinde yüksek dereceli odaklar (yaklaşık %40) görülebilir. Bu odakların bulunması kötü prognoz göstergesidir (37).

Yüksek dereceki gliomlar (YDG) sıklıkla MRG'de T1 hipointens, T2 hiperintens görülür. YDG'ler heterojen kitlesel görünümdedir. Tümörün merkezinde hemorajik odaklar, neovaskülerite, kistik nekrotik odaklar, görülebilir. YDG'lerde çepersel kontrastlanma ve içerisinde nekrotik kavite tipiktir, peritümöral ödem genelde belirgindir (Şekil 1) (39,40).



Şekil 1. Sol taraftaki görüntü T1 kontrastsız görüntüleme, sağ taraftaki görüntü T1 kontrastlı görüntüleme, beyaz ok T1 görüntülemede tümör sınırını işaret etmekte, siyah ok tümörün nekroze olan kısmını ifade etmekte

MR-spektroskopide; kreatin, kolin ve N-asetilaspartatın artışlarının birbirine oranları değerlendirilerek tümör derecesi saptanmaya çalışılır (Şekil 2) (41,42).



Şekil 2. MRG-spektroskopi görüntüsü kreatin, kolin, N-asetilaspartat pikleri görülmekte

PET/MRG gibi kombine yöntemler gliomaların düşük veya yüksek dereceli ayrımını yapmada, tümör metababolizması hakkında bilgi verdiği için faydalıdır (43).

Radyoterapi ve veya kemoterapi görmüş hastalarda nüks, progresyon, radyasyon nekrozu ayrımında MR-perfüzyon görüntülemesi kullanılmaktadır (44,45).

TEDAVİ

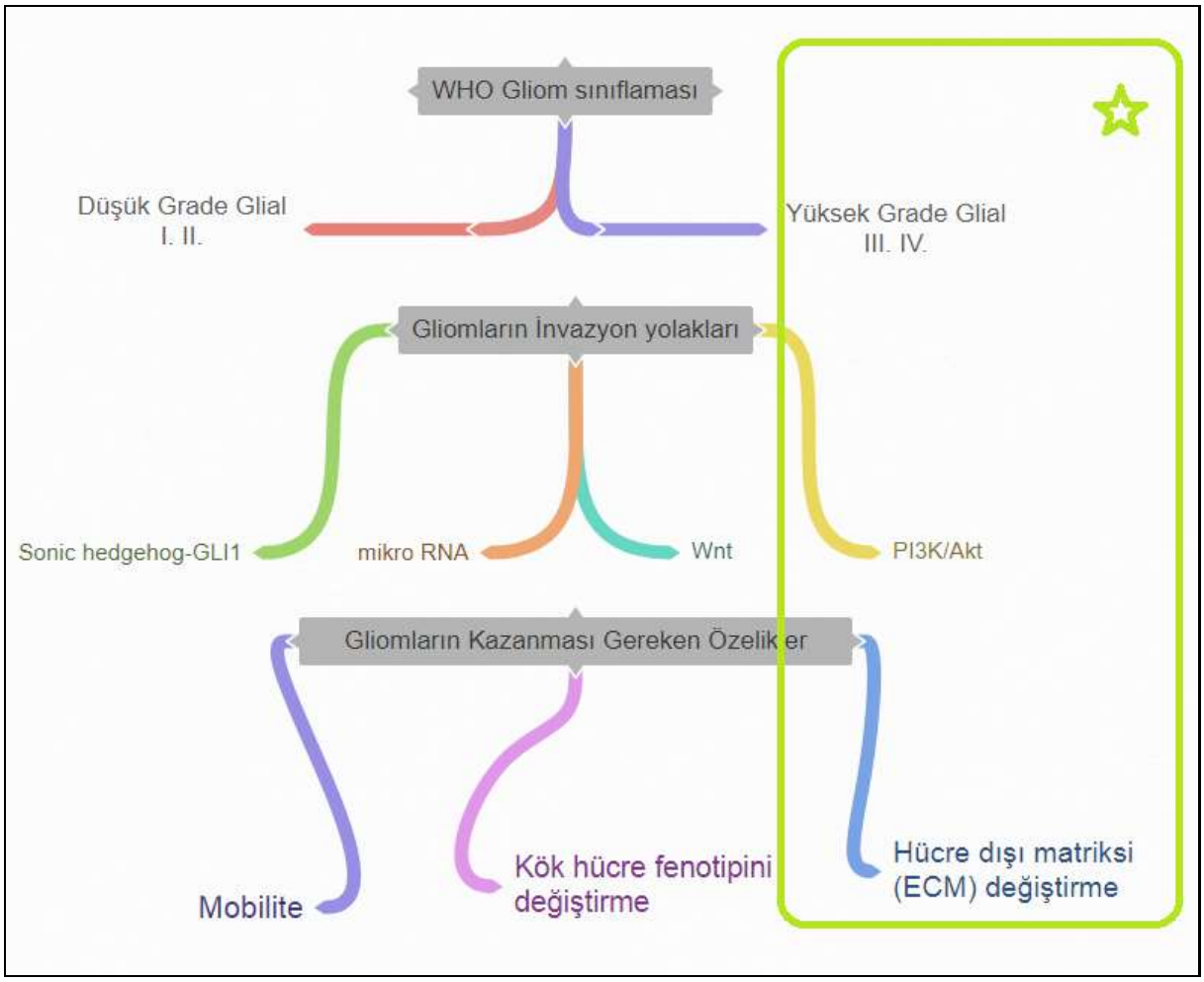
Gliomalar (düşük ya da yüksek evreli) diffüz infiltratif ve bilinen radyolojik görüntülemeler ile hücresel düzeyde net sınırları belirlenemeyen, radikal tedavisi yapılamayan bir hastalıktır (22,24). Günümüzde kabul gören tedavi yaklaşımı gross total cerrahi ardından radyoterapi ile beraber kemoterapidir. YDG'ler en iyi tedaviye rağmen, tekrarlayan nüksler ile seyreden mortal bir hastalıktır. Radikal cerrahi sonrasında bile MR da kontrastlanmayan alanlarda glioma hücresine rastlanmaktadır. Gliomların günümüzde küratif tedavisi bulunmamaktadır. Hastalığın seyri; hastanın Karnofsky skoru, yaş, efor kapasitesi, ek hastalıklar ve tümörün mitoz sayısı, invazyon yeteneği, çeşitli mutasyonları ihtiva edip etmemesi, radyasyon tedavisine cevabı gibi çok faktöre bağlıdır. Kombine tedavi rejimi ve

nörolojik fonksiyonu koruma gereksinimi, karşılaşılan sorunları da arttırmaktadır. Nörolojik fonksiyonları korumak için rezeksiyon miktarının azalması nüks zamanını ve sağkalımı kısaltmaktadır. Mevcut tedavilerin yüz güldürücü olmaması bilim insanlarını patofizyolojiyi ve agresif seyri anlamaya yönelik çalışmalara itmektedir. Yüksek dereceli gliomaların invazyon ve anjiyogenez paternlerinin anlaşılması ve muhtemel yeni tedavisi seçeneklerinin geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (22,26,46).

GLİOMA VE İNVAZYON

Yüksek dereceli gliomalar düşük dereceli glial tümörler ile karşılaştırıldığında büyüme hızları arasında yaklaşık 10 kat fark olduğu gösterilmekteddir (47). Tümörlerde büyüme modelleri incelendiğinde klasik görüş olan 2 kat artma modeli, YDG' de geçerli olmayıp, YDG' lerin logaritmik hücresel çoğalması ve göç etmesi bu modellemeyi geçersiz kılmaktadır. YDG' lerin çoğalmasında ve göç etmesindeki belirleyici özellik invazyon kapasitesinin yüksek olup, invazyon, nüksleri ve hasta yaşam süresini doğrudan etkileyen bir faktör olmaktadır (48).

Gliomanın invazyonunda etkili olduğu düşünülen başlıca 3 yolak mevcuttur. Bu yolaklar sonic hedgehog-GLI1, Wingless/Int1 (Wnt), Fosfoinositid-3-kinaz-protein kinaz B (PBK veya AKT)(PI3K/Akt) yolaklarıdır (47). İnvazyonda etkisi araştırılan mikro-RNA'lar: miR-218, miR101-152, miR-491, miR-125b. PI3K/Akt yolağı hücre metabolizmasında, büyümesinde, çoğalmasında ve hayatta kalmasında rol oynar. PI3K/Akt yolağının aktivasyonu PI3K tarafından kontrol edilir. Sfingozin kinaz-1 (SPHK1)'in hücre içindeki invazyon kaskatındaki görevi olan sfingozinden sfingozin-1-fosfat (S1P1) yapımındaki fonksiyonu meme kanseri, kolorektal kanser, cilt skuamöz hücreli karsinomunda, pankreas kanserinde ve gliomada rol alabileceği düşünülmektedir (49–53). Gliomalar invazyon yolaklarını kullanarak iki şekilde invazyon yapabilir; perivasküler boşlukları kullanarak hematojen yolla veya beyin parankimi ve beyaz cevherdeki nöronların arasındaki boşluğu kullanarak komşuluk yoluyla. Gliomaların bu iki yolu kullanmak için kazanması gereken özellikleri şunlardır; mobilite, hücre dışı matriksi (ECM) değiştirme, kök hücre fenotipini değiştirme (Şekil 2)(47).



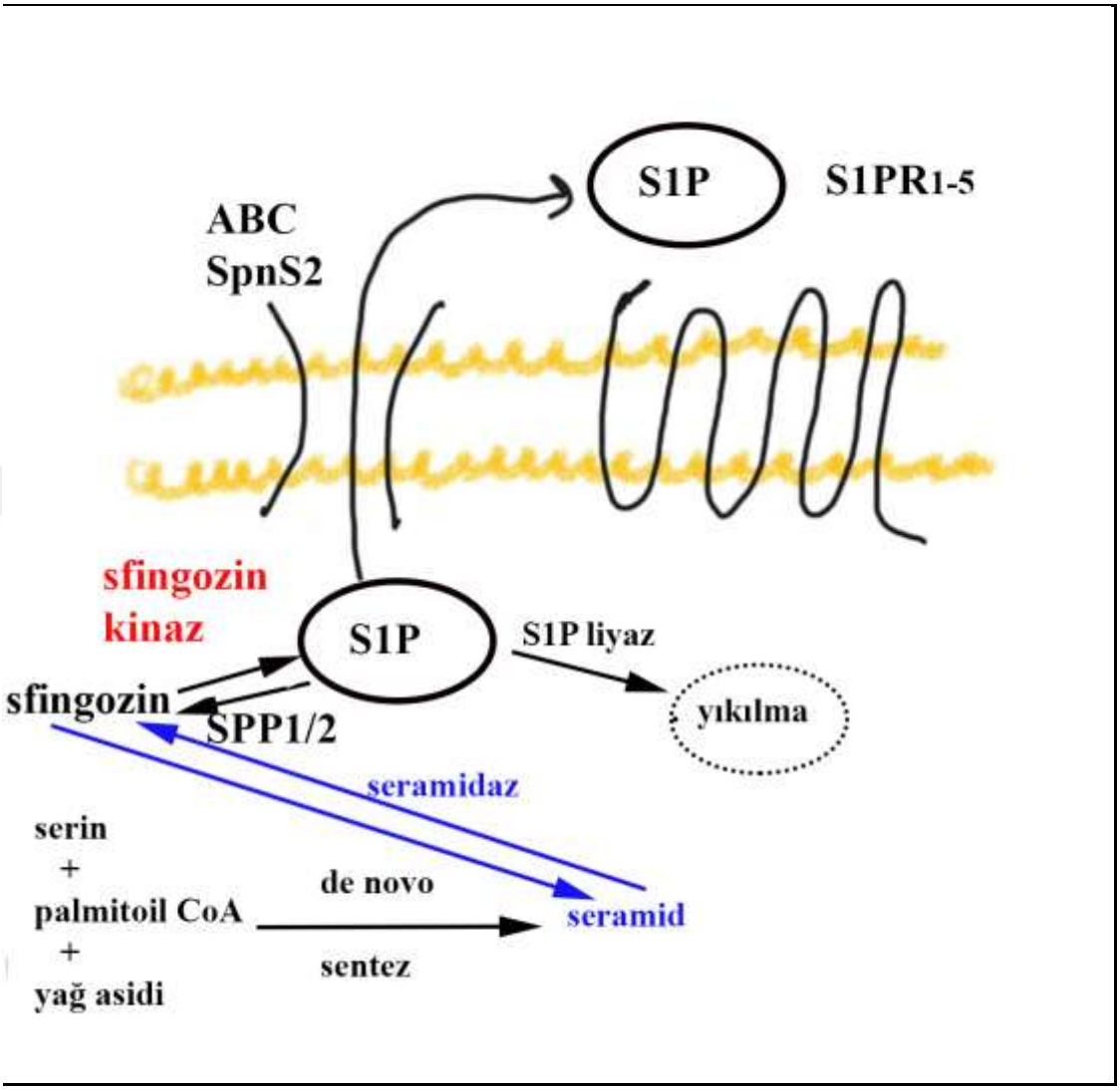
Şekil 3. Glioma sınıflaması, invazyon yolakları ve bu yolakları kullanırken kazanması gereken özellikler (47)

PI3K/Akt yolağında ekstra selüler matriksi değiştirmek suretiyle invazyonda görev aldığı düşünülen moleküller şunlardır; S1PR1, S1PR3, SPHK1, PLAU, CCN1. Bu moleküller ile ilgili şimdiye kadar yapılmış çalışmalarda edinilen bilgiler şu şekilde özetlenmektedir:

Sfingozin-1-Fosfat (S1P)

Sfingozin-1-fosfat (S1P) 5 üyeden oluşan bir (S1P 1-5) G proteini aracılığıyla sinyal veren, mitozu ve migrasyonu düzenleyen biyoaktif bir lipittir. Beyinde S1P 1,2 ve 3 eksprese olmaktadır. S1P1'in ve S1P3'ün hastanın sağkalım süreleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. S1P2'nin hasta sağkalımı ile ilişkisi gösterilememiştir. İmmünblot ve inhibisyon deneyleri S1P1 ve S1P3 biyoaktif lipitlerinin PI3K yolağına dahil olduğu düşündürmektedir. S1P1 ve S1P3 ün ekspresyonunu azalmasının hücre proliferasyonunu arttırarak glioma malignitesine katkı sağladığı ve sağkalımı azalttığı düşünülmektedir (4,7,54,55). *S1P3'* ün de YDG' lerde

invazyona katkıda bulunduğunu bildiren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (4,56,57).



Şekil 4. S1P üretimi ve sfingozin kinazın görev aldığı aşama (7)

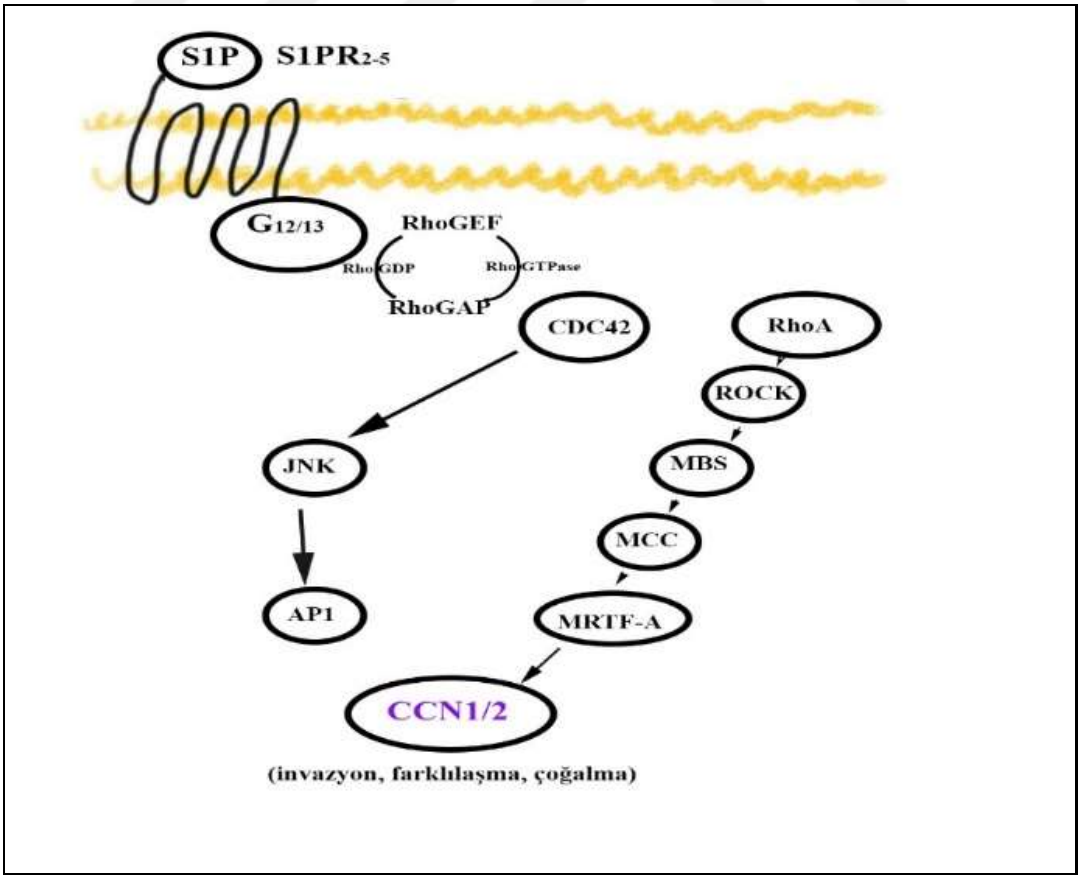
Sfingozin Kinaz (SPHK)

Sfingozin kinaz (SPHK), S1P fosforilasyonunda rol oynayan enzimdir (Şekil 3). Ekspresyonunun engellenmesi hücrenin G1 fazını geçememesine neden olmakta ve hücreyi apoptoza zorlamaktadır. Gliomaların %80 inin anormal yüksek hızda G1 fazından S fazına ilerlediği bilinmektedir (46). SPHK1'in hücre içindeki invazyon kaskatındaki görevi olan sfingozinden S1P yapımının; meme kanseri, kolorektal kanser, cilt skuamöz hücreli karsinomunda, pankreas kanserinde ve gliomada rol oynayıp oynamadığı araştırılmaktadır. Glioma hücrelerinde SPHK1, pro-apoptotik görev üstelenen Bim in ekspresyonunu azaltarak hücrenin apoptozunu engellemektedir, bu etkisi farmakolojik çalışmalarda da ispatlandığı üzere PI3K'ya bağlı olarak yapmaktadır. (58–61). SPHK miktarı S1P ve UPAR ekspresyon miktarını

etkileyerek invazyon sürecine etki ettiği bildirilmektedir (5). Yüksek SPHK ekspresyonu, YDG' lerde kısa yaşam süreleri ile ilişkili olarak saptanmaktadır (7).

Hücresel İletim Ağı Faktörü 1 (CCN1/CYR61)

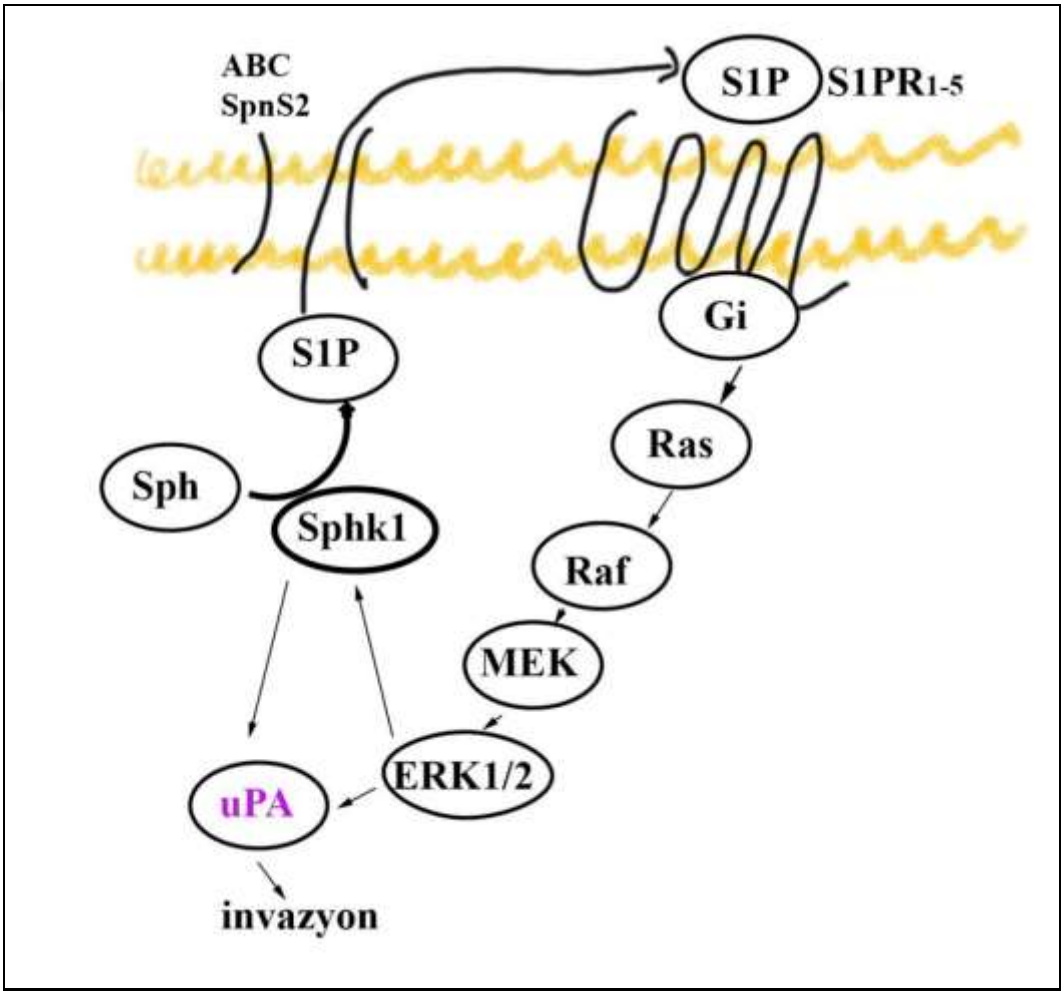
Hücresel iletim ağı faktörü (CCN1), hücre dışı matriks proteinidir, hücresel integrinleri ve hücre dışı matriksi bağlamak için bir bağlantı görevi görmektedir. Hücresel adhezyon, migrasyon, anjiyogenez ve invazyonda rol oynadığı gösterilmektedir (5). CCN1'in sentezinde rol alan moleküller; Hücre bölünmesi kontrol proteini 42'nin homoloğu (CDC42), Ras homolog gen ailesi üye A (RhoA), miyozin bağlama alt birimini (MBS), miyozin hafif zincirinin (MLC), miyokardin ile ilişkili transkripsiyon faktörü A (MRTF-A), RhoA kinazı (ROCK), aktivatör protein 1 (AP1) (Şekil 5)'te özetlenmektedir. CCN1 ekspresyonu yüksek hastaların sağkalım sürelerinin kısa olduğunu bildiren çalışmalar vardır. CCN1'in hücre çoğalması ve hücre göçü fonksiyonlarında rol oynayarak sağ kalımı azalttığı ileri sürülmektedir. CCN1 ekspresyonunu azaltmak için farmakolojik ajanlar ve onkolitik viral tedavi denemeleri yapılmaktadır (5,62–65).



Şekil 5. CCN1 geninin hücre içinde sentez aşamaları (7)

Ürokinaz plazminojen aktivatörü (UPA)

Ürokinaz plazminojen aktivatörü (UPA) aktin hücre iskeleti oluşumuna ve matrijel oluşumuna katılarak hücre dış yüzey proteolitik aktivitesinin düzenlenmesinde rol aldığı bildirilmektedir (6). Hücre-hücre dışı matrix etkileşiminde ve hücre içi sinyal iletişimde rol almaktadır. UPAR yolağının blokajının proteolitik aktiviteyi azaltarak invazyon ve migrasyonu etkilediği bildirilmektedir. Gliomaların daha yüksek invazivlik ve kısa sağkalımı yüksek UPAR ekspresyonu ile ilişkilendirilmektedir (66–68). Glioma hücrelerinde guanin nükleotid bağlayıcı protein (Gi) aracılı S1PR aktivasyonu ve sinyal yolları (Şekil 6)'da özetlendi.



Şekil 6. Hücre içi uPa sentezi (7)

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Çalışmamız, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı'nda Etik kurul onayı (Ek-1) alındıktan sonra, yüksek dereceli gliomalarda invazyon belirteçlerinin ekspresyonunun ve klinik öneminin araştırılması için gerçekleştirildi.

Araştırmamızda Mart 2020 ile Nisan 2022 tarihleri arasında 25 aylık sürede Trakya üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine başvuran yüksek dereceli glioma nedeni ile opere olan 29 hastanın doku örnekleri kullanıldı. Çalışmaya katılan hastalar 5 ile 30 ay arasında takip edildi.

Çalışmaya, 18 yaş üzeri, radyolojik olarak yüksek dereceli glioma ön tanısı ile operasyon önerilen ve cerrahi tedaviyi kabul eden hastalardan, patoloji sonucu yüksek dereceli glioma olarak teyit edilen hastalar dahil edildi. Bu hastalardan geçirilmiş beyin ameliyatı veya tümör nedeni ile başka bir operasyon geçirmiş olan hastalar ile çalışmaya katılmak istemediğini beyan eden hastalar çalışma dışı bırakıldı.

Çalışmaya katılan hastaların demografik ve radyolojik verileri kayıt altına alındı. Toplam 29 hastanın cerrahi sırasında alınan dokularından frozen sonucu YDG olarak teyit edilen tümör dokuları Trakya Üniversitesi Tıbbı Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Tanı Merkezine (GHTM) ulaştırıldı ve muhafaza edildi. GHTM'ye ulaştırılan dokulardan patolojik inceleme sonrasında sonucu YDG gelen dokular çalışma grubu olarak kabul edildi. Ameliyat sırasında çıkarılmış olan patolojik olarak normal raporlanmış perilezyoner dokular kontrol grubu olarak kabul edildi.

Hastaların operasyon öncesi ve sonrası tümör hacimleri; T1 kontrastlı manyetik rezonans görüntülemelerinde aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (V= hacim, l= en büyük uzunluk, w= en büyük genişlik, h= tümör gözüken kesit sayısı x çekim aralığı) (π sayısı 3 olarak kabul edildi) (69).

$$V=\frac{\pi}{6} * (l) * (w) * (h) \text{ (69)}$$

Operasyonda %80 ve üzeri tümör çıkarılan hastalar gross total rezeksiyon grubu, %50 ile %80 arasında tümör çıkarılan hastalar subtotal rezeksiyon grubu, %50 den az tümör çıkarılan hastalar biyopsi grubu olarak kabul edildi.

Çalışmaya dahil edilen hastaların 5-30 aylık takiplerinde, ölen hastaların (n=22); %75 inin (n=17) ilk 9 aylık süre içinde ölmesi nedeniyle, ilk 9 ay içerisinde aylık ölüm oranının %6,4 olması; 9 aydan sonraki aylık ölüm oranının %1,9 olması nedeniyle sağkalımın eşik değeri 9 ay olarak belirlendi.

Tümör ve kontrol gruplarının S1PR1, S1PR3, SPHK1, PLAU, CCN1 genlerinin ekspresyon değerleri; 9 aydan kısa ve uzun yaşayan hastalarda, nüks saptanan veya saptanmayan hastalarda, IDH mutasyonu olan veya olmayan hastalarda nasıl değiştiği istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Ayrıca bu genlerin ekspresyon miktarı ile Ki67% oranı arasında istatistiksel bir ilişki olup olmadığına bakıldı.

Tümöral invazyonun klinik göstergeleri nüks ve sağkalım süresi olarak kabul edildi.

Kliniğimizde YDG nedeniyle opere olan hastaların rutin takip protokolü: preop MRG görüntülemesi, post op ilk 48 saatte yapılan kontrol MRG görüntülemesi yapılmakta. Taburculuk sonrası ise 3, 6, ve 12. ay MRG tetkiki ile nüks takip edilmektedir. Operasyon sonrasındaki MRG görüntüleri kullanılarak; nüks ve sağkalım süreleri ile invazyonu ilişkilendirdik. İnvazyon, rekürrens ve sağkalım süreleri üzerinden değerlendirildi. Doku örneklerinden RNA izolasyonu aşamaları şu şekildedir:

DOKULARDAN RNA İZOLASYONU VE REAL TİME PCR YÖNTEMİ

Total RNA İzolasyonu

Doku örnekleri ameliyathanede RNA later solüsyonuna konuldu ve RNA later solüsyonu Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi (GHTM)'ne sayısal olarak kodlanmış şekilde ulaştırıldı. S1PR1, S1PR3, SPHK1, PLAU, CCN1 genlerinin ifade düzeyleri (ekspresyon) Real-Time PCR yöntemi ile araştırıldı. RNA izolasyonu kullanılacak olan kitin protokolüne uygun olarak yapıldı.

RNA İzolasyonunun Aşamaları

- 2 ml'lik örneğin üzerine 10 ml EL Buffer eklendi. Buz üzerinde, 10 dk beklendi, 2 defa alt-üst edilerek karıştırıldı.

- 400 x g, 4ºC'de 10 dk santrifüj edildi, üstte kalan kısım atıldı, pelet tutuldu.
- Pelletin üzerine 4 ml EL buffer eklendi. Pellet çözüldü.
- 400 x g, 4ºC'de 10 dk santrifüj edildi, üstte kalan kısım atıldı, pelet tutuldu.
- Pelletin üzerine 600 ul RLT buffer β-markaptoetanol karışımı eklendi. Bu karışımın oranı 1 ml RLT buffer'a 10 ul β-markaptoetanol olacak şekilde oluşturuldu. Şırınga yardımıyla pellet ile karışımın homojenize olması sağlandı. Böylece ilk aşama tamamlandı ve oluşan homojen lizat -80ºC'de ilerde çalışılmak üzere saklandı.

RNA Örneklerin Çalışma İçin Hazırlanması Aşamaları

- Lizat -80ºC'den çıkarıldı ve QIAshredder kolona tek seferde yüklendi. 12000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve kolon atıldı, altta kalan lizat tutuldu.
- Toplama tüpünde kalan lizatın üzerine 600 ul %70 'lik etanol eklendi ve pipetle karıştırıldı.
- QIAamp kolona yüklenerek 10000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Kolon tutuldu, toplama tüpü atıldı ve yeni bir toplama tüpüne kolon alındı.
- Kolonun üzerine 700 RWI Buffer eklendi, 10000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Kolon tutuldu, toplama tüpü atıldı ve yeni bir toplama tüpüne kolon alındı.
- Kolonun üzerine 500 ul RPE Buffer eklendi, 10000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Kolon tutuldu, toplama tüpü atıldı ve yeni bir toplama tüpüne kolon alındı.
- Kolonun üzerine tekrar 500 ul RPE Buffer eklendi, 11000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Kolon tutuldu, toplama tüpü atıldı ve yeni bir toplama tüpüne kolon alındı.
- Kolon boş bir şekilde 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolon tutuldu, toplama tüpü atıldı ve kolon 1.5 ml'lik bir tüpe aktarıldı.
- Kolona 40 ul RNase free su, kolonun tam ortasına gelecek şekilde konuldu ve 10000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj bittikten sonra, kolon atıldı, 1.5 ml'lik tüpte RNA elde edilmiş olundu. Bu aşamadan sonra, RNA 24 saat içinde cDNA'e çevrildi.

RNA'nın cDNA'ya Çevrilmesi

RNA stabil bir molekül olmadığından dolayı reverse transkriptaz reaksiyonu ile cDNA'ya çevrildikten sonra çalışıldı. Bu reaksiyona geçilmeden önce, izole edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflık değerleri ölçüldü. Bu ölçüm, NanoDrop cihazında, RNA modülü kullanılarak yapıldı [Nanodrop 2000C, Thermo Scientific, Amerika Birleşik Devletleri]. 260/280 oranı 2'den büyük ve RNA konsantrasyonu 10 ul/ng 'ın altında olduğunda RNA izolasyonu tekrar aynı örnek kullanılarak tekrarlandı. Bu aşamadan sonra, RNA'nın cDNA'ya

çevrilmesi işlemi yapıldı, bunun için RT² HT First Strand Kit kullanıldı. Bu işlemde ilk olarak 8 ul RNA ile 6 ul GE2 buffer 200 ul'lik PCR tüpüne koyuldu, karıştırıldı ve SensoQuest Thermocycler cihazında 37ºC 'de 5 dakika tutuldu. İşlem bittikten sonra karışımın üzerine, 6 ul BC4 transkriptaz buffer eklendi ve tekrardan karıştırıldı SensoQuest Thermocycler cihazında 42ºC 'de 15 dakika ve ardından 95ºC 'de 5 dakika beklendi. Ardından, 91 ul RNase free su koyuldu elde edilen cDNA'lar -20ºC 'de saklandı. Çevrilmeyen RNA'lar ise -80ºC 'de saklanmaya devam edildi.

Real-Time PCR çalışmaları sonunda Ct değeri elde edildi. Ct değeri cihaz tarafından floresan sinyal miktarının saptanabilmesi için gereken minimum değerin (eşik değerini) geçtiği döngü sayısına verilen isimdir. Ct değeri ekspresyon miktarını göstermektedir. İstatistik analiz yapabilmek için Ct değerlerinin kantitatif bir değer olan 2^(-ΔΔCt) değerlerine çevrilmesi gerekmektedir. Bu işlem şu şekilde yapılmaktadır.

ΔΔCt değerlerinin saptanabilmesi için gerekli adımlar;

1. Üçlü tekrar şeklinde çalışılacak örnekleri ortalama Ct (Cycle treshold) değeri alındı.
2. Ortalama Ct ΔCt değerlerinin hesaplaması için çalışılan genlerin Ct değerlerinden, Housekeeping genin Ct değeri çıkartıldı ve ΔCt değeri saptandı:

   ΔCt =Gen Ct-Housekeeping Gen Ct
3. ΔCt değerleri çalışılan kontrol grupları dahil tüm örnekler için hesaplandı.
4. ΔCt değerleri saptandıktan sonra ΔΔCt hesaplandı. Çalışılan genlerin ΔCt değerlerinden, kontrol gruplarının ortalama ΔCt değerlerini çıkarıldı ve ΔΔCt değerleri elde edildi.

   ΔΔCt = Çalışılan genlerin ΔCt değerleri – Kontrol gruplarını ortalama ΔCt değerleri

   Çalışmamızda 2^(-ΔΔCt) değerleri ekspresyon miktarı olarak adlandırıldı.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Sürekli değişkenlerin dağılımını değerlendirmek için Shapiro – Wilk testi kullanıldı. Sürekli değişkenler için tanımlayıcı istatistikler, normal dağılım gösterip göstermemelerine göre ortalama ± standart sapma veya medyan (çeyrekler arası aralık) olarak ifade edildi. Sürekli değişkenler için ek olarak istatistiksel sapmaya yol açabilecek 10 kat ve üzeri aşırı saçılmış değerler dışlanarak normalizasyon uygulandı. Uygunluğa göre T testi, Mann Whitney – U, tek yönlü ANOVA ve Kruskal Wallis testleri yapıldı.

Proje kapsamında elde edilen veriler The jamovi project (2021) jamovi (Version 2.2) (ücretsiz ve açık kaynak) programı ile yapıldı, $p \leq 0{,}05$ olarak kullanıldı.

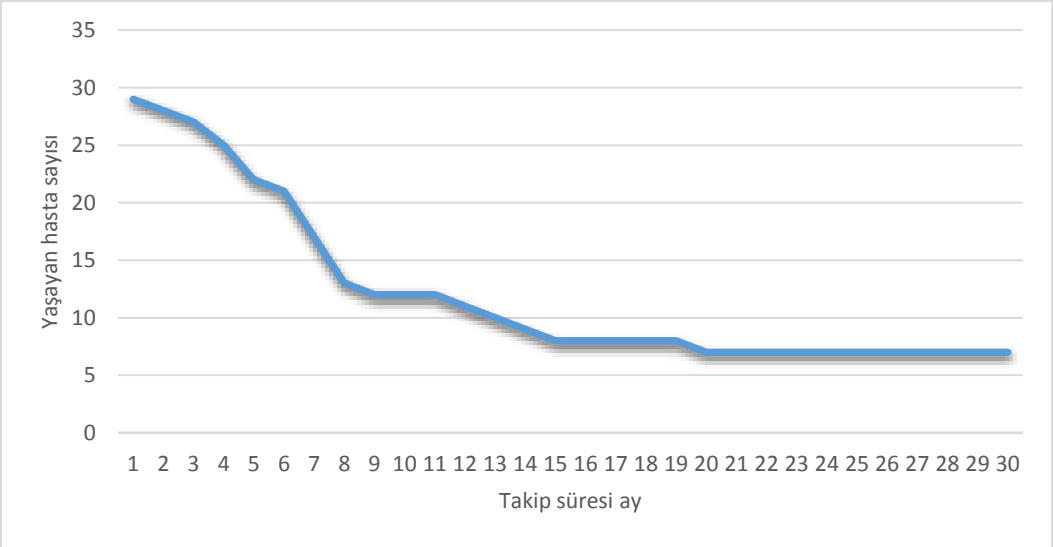
BULGULAR

Çalışmamıza 8'i kadın (%27,5); 21'i ise erkek (%72,4) toplam 29 hasta dahil edildi. Çalışmaya katılan hastaların yaş ortalaması 57,72 yıl idi (kadınların yaş ortalaması 56,12; erkeklerin yaş ortalaması 58,28 yıl).

Tablo 1. Hasta özellikleri

Sağkalım	**Yaşayan (n) (%)**	**Ölenler(n) (%)**	**Sağkalım süresi(ay)**
Kadın	4 (%50)	4 (%50)	6,7±4,03
Erkek	3 (%14)	18 (%86)	7,23 ±6,84

Çalışmaya katılan hastaların %24'ü (n=7) halen sağ; %75'i ise (n=22) çalışma süresi içerisinde vefat etti. Ölenlerin ortalama sağkalım süresi 7,67± 6,75 ay idi. Kadınların %50'si (n=4) halen yaşamakta, ölen kadınların (n=4) ortalama sağkalım süresi 6,7±4,03 ay idi. Erkeklerin %14'ü (n=3) halen yaşamakta, ölen erkeklerin (n=18) sağkalım süresi ortalaması 7,23 ±6,84 ay idi (Tablo 1). Kadın ve erkek cinsiyetleri arasında ölenlerin ortalama sağkalım süreleri açısından anlamlı fark görülmedi (p=0,434).



Şekil 7. Yaşayan hasta sayısının aylık takibi

Çalışmaya dahil edilen 29 hastanın 5-30 aylık takiplerinde aylara göre yaşayan hasta sayısı (Şekil 7)'de gösterildi. Ölen hastaların (n=22); %75 inin (n=17) ilk 9 aylık süre içinde ölmesi, ilk 9 ay içerisinde aylık ölüm oranının %6,4 ve 9 aydan sonraki aylık ölüm oranının %1,9'a olması nedeniyle sağkalımın eşik değeri 9 ay olarak belirlendi.

Çalışmaya katılan hastaların tümör lokalizasyonu olarak en sık temporal lob (%31) görülürken; farklı tümör lokalizasyonları arasında ortalama sağkalım süreleri açısından anlamlı fark görülmedi (p=0,468). Tümör lokalizasyonları ile ortalama tümör boyutu arasında anlamlı fark görülmedi (p=0,226).

Yirmi dokuz hastanın 14 tanesine gross total; 10 tanesine subtotal; 5 tanesine biyopsi düzeyinde rezeksiyon yapıldı. Gross total rezeke edilen hastalarda operasyon öncesi ortalama tümör hacmi 48,97±39,2 cm^3, operasyon sonrası ortalama tümör hacmi 2,14±1,67 cm^3 olarak hesaplandı. Gross total rezeksiyon grubundaki 14 hastadan 6 tanesinde nüks saptandı, nüks saptanan hastaların tamamı kaybedildi. Gross total grubunda nüks saptanan hastaların operasyon ile nüks arasındaki süre 6,25±1,51 ay idi. Nüks saptanan hastaların sağkalım süresi ortalama 6,67±5,31 ay olarak saptandı. Gross total rezeksiyon grubunda 8 hastada nüks izlenmedi. 4 hasta halen yaşamakta, 4 hasta tümör dışı nedenlerle kaybedildi. Ölmüş olan hastaların sağkalım süresi ortalaması 10,51±8,32 ay olarak saptandı.

Subtotal rezeksiyon grubu 10 hastadan oluşmaktaydı. Subtotal rezeke edilen hastalarda operasyon öncesi ortalama tümör hacmi 33,2±20,9 cm^3, operasyon sonrası ortalama tümör hacmi 19,9±12,6 cm^3 olarak hesaplandı. Subtotal rezeksiyon yapılan 9 hastada nüks saptandı, 1 hastada nüks saptanmadı. Subtotal grubundaki nüks saptanan hastaların operasyon ile nüks

arasındaki süresi 4,81±2,74 ay idi. 3 hasta halen yaşamakta, 7 hasta kaybedildi. Ölmüş olan hastaların sağkalım süreleri ortalaması 8,78±4,64 ay idi.

Biyopsi düzeyi rezeksiyon grubu 5 hastadan oluşmakta idi, operasyon öncesi ortalama tümör hacmi 26±8,44 cm3 iken operasyon sonrasında ortalama tümör hacmi 21±6,72 cm^3 olarak bulundu. Biyopsi düzeyinde rezeksiyon grubunda bulunan 5 hastanın tamamı kaybedildi. Biyopsi grubundaki hastaların operasyon ile progresyon arasında geçen süre 2,08±1,44 ay idi. Biyopsi grubundaki hastaların ortalama sağkalım süresi 5,55±2,30 ay idi. Eksizyon türlerine göre bulgularımızı (Tablo 2)'te özetledik.

Gross total eksizyon, subtotal eksizyon ve biyopsi grupları nüks olup olmaması açısından karşılaştırıldığında; Gross total cerrahi grubu ile subtotal ve biyopsi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu gördük (p=0,003). Subtotal grubu ve biyopsi grubu nüks olup olmaması açısından karşılaştırıldığında aralarında anlamlı fark olmadığı görüldü.

Tablo 2. Eksizyon türlerine göre verilerimizin tablosu

	(n)	**PreV**	**PosV**	**Nüks süresi (ay)**
Gross total eksizyon	**14**	**PreV=48,97±39,2 cm^3**	**PosV=2,14±1,67 cm^3**	
Nüks var	6			6,25±1,51 ay
Ölü	6	Sağkalım 6,67±5,31 ay		
Nüks yok	8			
Sağ	4			
Ölü	4	Sağkalım 10,51±8,32 ay		
Subtotal eksizyon	**10**	**PreV=33,2±20,9 cm3**	**PosV=19,9±12,6 cm3**	
Nüks var	9			4,81±2,74 ay
Sağ	2			
Ölü	7	Sağkalım 8,78±4,64 ay		
Nüks yok	1			
Sağ	1			
Biyopsi düzeyi eksizyon	**5**	**PreV=26±8,44 cm3**	**PreV=21±6,72 cm3**	**Progresyon süresi (ay)**
Ölü	5	Sağkalım Ort. 5,55±2,30 ay		2,08±1,44 ay

(PreV= operasyon öncesi tümör hacmi, PosV= operasyon sonrası tümör hacmi)

Çalışmaya alınan hastaların patolojik tanıları şu şekildedir: %93'ü (n=26) glioblastoma derece 4, %6'sı (n=3) derece 3 astrositom. Hastaların %93'ünde (n=27) IDH Wild tip, %6'sında (n=2) IDH Mutant tip, %17'sinde (n=5) IDH-1 pozitifliği olduğu görüldü. Ki67% değerinin medyan değeri (27,2±16,1) idi (Tablo 3).

Tablo 3. Patolojik veriler

Patolojik veriler	n	Yaşayan (n)/ ölen (n)	Ölenlerin sağkalım süresi (ay)
Derece			
Derece 3	3		
Derece 4	26		
Molekül			
IDH Wild	27	7 / 20	7,9±4,71
IDH Mutant	2	- / 2	5,35±3,42
IDH-1	5	- / 5	8,32±7,11
Ki67%	27,2±16,1		

IDH Wild tip saptanan 27 hastanın; 7'si halen yaşamakta, ölen 20 kişinin ortalama sağkalım süresi 7,9±4,71 ay olarak görüldü. IDH Mutant tip saptanan 2 hastanın da ölmüş olduğu görüldü ortalama sağkalım süresi 5,35±3,42 olarak görüldü.

IDH subtipleri 9 ay ve daha kısa yaşayanlar ile 9 aydan uzun yaşayanlar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı fark görülmedi (p=0,498). IDH subtipleri nüks olup olmaması açısından karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark görülmedi (p=0,366).

Ki67% değerleri 9 ay ve daha kısa yaşayanlar ile 9 aydan uzun yaşayanlar açısından karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark görülmedi (p=0,023). Ki67% değerleri nüks olup olmaması açısından karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark izlendi (p=0,488).

S1PR1, S1PR3, SPHK1, CCN1, PLAU genlerinin real time pcr 2^-ΔΔCt verilerinin istatistiksel değerleri aşağıdaki gibidir:

S1PR1 geninin çalışma grubundaki 28 hastanın 2^-ΔΔCt değeri; ortalama değeri (2,20) ortanca değeri (0,196) standart sapması (4,69) olarak bulundu. S1PR1 geninin kontrol grubundaki 25 hastanın 2^-ΔΔCt değeri; ortalama değeri (0,908) ortanca değeri (0,390) standart sapması (0,984) olarak bulundu.

S1PR3 geninin çalışma grubundaki 21 hastanın 2^-ΔΔCt değeri; ortalama değeri (4,95) ortanca değeri (3,60) standart sapması (5,40) olarak bulundu. S1PR3 geninin kontrol grubundaki 20 hastanın 2^-ΔΔCt değeri; ortalama değeri (1,687) ortanca değeri (1,311) standart sapması (1,551) olarak bulundu.

SPHK1 geninin çalışma grubundaki 27 hastanın 2^-ΔΔCt değeri; ortalama değeri (1,91) ortanca değeri (0,88) standart sapması (4,29) olarak bulundu. SPHK1 geninin kontrol grubundaki 24 hastanın 2^-ΔΔCt değeri; ortalama değeri (1,23) ortanca değeri (0,57) standart sapması (2,11) olarak bulundu.

CCN1 geninin çalışma grubundaki 28 hastanın 2^-ΔΔCt değeri; ortalama değeri (2,28) ortanca değeri (0,57) standart sapması (4,367) olarak bulundu. CCN1 geninin kontrol

grubundaki 24 hastanın 2^-ΔΔCt değeri; ortalama değeri (1,679) ortanca değeri (0,481) standart sapması (3,95) olarak bulundu.

PLAU geninin çalışma grubundaki 20 hastanın 2^-ΔΔCt değeri; ortalama değeri (3,57) ortanca değeri (2,52) standart sapması (3,56) olarak bulundu. PLAU geninin kontrol grubundaki 25 hastanın 2^-ΔΔCt değeri; ortalama değeri (1,679) ortanca değeri (0,551) standart sapması (3,001) olarak bulundu.

S1P1, S1PR3, SPHK1, CCN1, PLAU genlerinin çalışma ve kontrol gruplarında eksprese olduğu görüldü. Bu genlerin istatistiksel değerleri (Tablo 4)'da özetlendi. S1P1, S1PR3, SPHK1, CCN1, PLAU genlerinin çalışma ve kontrol grubundaki ekspresyon miktarları karşılaştırıldığında; S1PR3 geninde istatistiksel anlamlı fark görüldü (p=0,021) (Tablo 5). S1PR3'ün kontrol grubunda çalışma grubuna göre daha az eksprese olduğu görüldü.

Tablo 4. S1PR1, S1PR3, SPHK1, CCN1, PLAU genlerinin real time pcr 2^-ΔΔCt verilerinin istatistiksel tanımı

	n	Ortalama	Ortanca	Standart sapma
S1PR1 Çalışma grubu	28	2,207	0,196	4,699
S1PR1 Kontrol grubu	25	0,908	0,390	0,984
S1PR3 Çalışma grubu	21	4,965	3,605	5,408
S1PR3 Kontrol grubu	20	1,687	1,311	1,551
SPHK1 Çalışma grubu	27	1,915	0,887	4,293
SPHK1 Kontrol grubu	24	1,232	0,577	2,114
CCN1 Çalışma grubu	28	2,282	0,573	4,367
CCN1 Kontrol grubu	24	1,679	0,481	3,955
PLAU Çalışma grubu	20	3,570	2,522	3,568
PLAU Kontrol grubu	25	1,679	0,551	3,001

Tablo 5. S1P1, S1PR3, SPHK1, CCN1, PLAU genlerinin çalışma ve kontrol grubundaki ekspresyon miktarlarının karşılaştırılması

Paired Samples T-Test				
			Statistic	**p**
S1PR1-Ç	S1PR1-K	Wilcoxon W	28.0	0.244
S1PR3-Ç	**S1PR3-K**	**Wilcoxon W**	**78.0**	**0.021**
SPHK1-Ç	SPHK1-K	Wilcoxon W	38.0	0.635
CCN1-Ç	CCN1-K	Wilcoxon W	47.0	0.946
PLAU-Ç	PLAU-K	Wilcoxon W	63.0	0.244

Çalışma grubunun RNA gen sonuçları tablosu (Tablo 6).

Tablo 6. Çalışma grubu 2^-ΔΔCt verileri

Örnek no	Çalışma S1PR1	Çalışma SPHK1	Çalışma S1PR3	Çalışma CCN1	Çalışma PLAU
Ç1	552,5649	7940,422	25709,25	0,020193	1336474
Ç2	0,380245	0,382889	3,605002	0,178006	0,550953
Ç3	0,161544	0,976032	4,18434	0,309927	10,05611
Ç4	12,77277	3,193194	272,4788	15,03236	6101,719
Ç5	0,130761	0,51943	2,034959	0,521233	6,475538
Ç6	0,129408	0,936272	1,176907	0,926588	4,40762
Ç7	0,050942	1,013959	1,723092	1,574616	9,513657
Ç8	0,013322	0,539614	0,433769	3,000078	1,172835
Ç9	0,202361	1,29684	4,40762	0,046231	0,041378
Ç10	0,342696	0,873573	5,856343	3,784231	4,823231
Ç11	0,245705	0,534033	4,515858	0,64842	3,41054
Ç12	20,04263	0*	666,287	2628,456	809,0023
Ç13	0,30566	22,08508	64,22219	12,95108	302,3341
Ç14	0,5	5,445256	31,12496	0,673617	81,00842
Ç15	2,056228	0,240444	2,378414	0,17739	0,429283
Ç16	7,835362	0*	907,0259	0*	256
Ç17	0,17254	0,887279	2,732081	1,641483	5,426417
Ç18	0,121582	0,919179	19,7667	0,307786	38,31932
Ç19	1,808759	0,285436	18,63574	1,693491	12,16783
Ç20	0*	0*	349,7063	0,70466	50886,66
Ç21	8,544523	0,002678	7332,045	0*	1739209
Ç22	0,078836	1,82134	2,703822	0,447513	0,849685
Ç23	0,094405	1,741101	2,114036	2,034959	2,648178
Ç24	0,271684	1,419123	12,38052	0,413225	2,394957
Ç25	0,03901	0,64842	0,942785	0,714497	0,747425
Ç26	0,61132	7,594737	4,301978	0,624165	3,363586
Ç27	0,117848	1,918528	5,37029	0,358489	1,872544
Ç28	4,958831	97,34264	69,79249	15,08455	43,86505
Ç29	0,104748	1,274561	0,015679	0,476319	0,724471
Ç30	0,189465	0,600818	4,976047	0,221442	0,316439

*veriler 2 kez çalışıldı, ekspresyon saptanmadı.

Kontrol grubunun RNA gen sonuçları tablosu (Tablo 7).

Tablo 7. Kontrol grubu 2^-ΔΔCt verileri

Örnek no	Kontrol S1PR1	Kontrol SPHK1	Kontrol S1PR3	Kontrol CCN1	Kontrol PLAU
K1	48644,87	57,48047	51776,15	9607,864	3050,859
K2	0,283221	1,053361	1,630145	0,273573	0,200963
K3	0,389582	0,734584	0,82932	0,510506	0,192776
K4	0,136787	354395,3	711,6381	78,79324	916007,6
K5	0,895025	0,469761	4,084049	0,316439	1,394744
K6	0,333325	1,591073	2,958775	0,680657	0,99654
K7	1,148698	0,562529	1,42405	1,079228	0,550953
K8	0,130308	0,392292	0,510506	0,147624	0,149685
K9	0,920188	0,174948	0,397768	0,929805	13,50105
K10	0,737135	0,167822	0,474671	1,109569	0,091505
K11	0,250868	0,25	0,5	0,329877	0,126219
K12	0,003799	0*	0,053475	0,022561	0,061002
K13	1,993081	0*	85,03589	0*	0*
K14	0,388234	1,113422	6,126232	0,659754	1,30586
K15	69,55103	0*	6165,491	5556,651	11706,32
K16	1,85961	0*	77,70847	19,22618	0*
K17	0*	517,3511	0*	86,22295	0*
K18	2,136131	58,08123	586,0988	4,515858	3,160165
K19	4,40762	0*	109,8964	5,115942	3,850378
K20	1,618884	10,23188	62,24992	0,144586	6,430808
K21	139993,5	269513,9	18116,29	84695,64	28526,2
K22	1,287882	1,128964	1,448942	2,049114	5,314743
K23	1,301342	0,590496	0,942785	0,174948	0,209497
K24	2410,305	0,190122	1,197479	0,22688	0,232451
K25	1,310393	0,411796	0,671286	0,744839	0,136313
K26	0,115023	1,443929	1,808759	1,046085	1,79005
K27	0,326465	3,434262	2,938337	0,438303	0,750019
K28	0,315344	2,353813	3,530812	0,450625	1,172835
K29	1,068065	2,242332	2,436821	0,00586	0,995947
K30	0,229251	1,489677	3,863745	0,418994	0,747946

*veriler 2 kez çalışıldı, ekspresyon saptanmadı.

S1P1, S1PR3, SPHK1, CCN1, PLAU genlerinin çalışma ve kontrol gruplarının ekspresyonlarının korelasyonlarına bakıldığında bulunan anlamlı sonuçlar aşağıdaki gibidir:

Çalışma grubunda S1PR1 ve S1PR3 genlerinin ekspresyon oranları arasında istatistiksel anlamlı yüksek oranda pozitif korelasyon saptandı (p=0,007 spearman rho=0,579).

Kontrol grubunda S1PR3 ve SPHK1 genlerinin ekspresyon oranları arasında istatistiksel anlamlı yüksek oranda pozitif korelasyon saptandı (p=<0,001 spearman rho=0,882).

Kontrol grubunda S1PR3 ve PLAU genlerinin ekspresyon oranları arasında istatistiksel anlamlı yüksek oranda pozitif korelasyon saptandı (p=0,002 spearman rho=0,653).

Çalışma grubunda CCN1 ve PLAU genlerinin ekspresyon oranları arasında istatistiksel anlamlı yüksek oranda pozitif korelasyon saptandı (p=0,008 spearman rho=0,586).

Kontrol grubunda SPHK1 ve PLAU genlerinin ekspresyon oranları arasında istatistiksel anlamlı yüksek oranda pozitif korelasyon saptandı (p=0,005 spearman rho=0,566).

Korelasyonların dağılımları (Tablo 8)'da gösterildi.

Tablo 8. S1P1, S1PR3, SPHK1, CCN1, PLAU genlerinin çalışma ve kontrol gruplarının ekspresyonlarının korelasyonu

Correlation Matrix

		S1PR1-Ç	S1PR1-K	S1PR3-Ç	S1PR3-K	SPHK1-Ç	SPHK1-K	CCN1-Ç	CCN1-K	PLAU-Ç	PLAU-K
S1PR1-Ç	Spearman's rho	—									
	p-value	—									
S1PR1-K	Spearman's rho	-0.002	—								
	p-value	0.993	—								
S1PR3-Ç	Spearman's rho	**0.579** **	0.011	—							
	p-value	**0.007**	0.968	—							
S1PR3-K	Spearman's rho	0.295	0.095	0.304	—						
	p-value	0.207	0.699	0.271	—						
SPHK1-Ç	Spearman's rho	-0.213	0.073	0.034	-0.225	—					
	p-value	0.287	0.734	0.886	0.354	—					
SPHK1-K	Spearman's rho	-0.036	-0.237	0.342	**0.882** ***	-0.398	—				
	p-value	0.868	0.288	0.180	**< .001**	0.060	—				
CCN1-Ç	Spearman's rho	-0.121	0.198	-0.253	-0.098	0.331	-0.213	—			
	p-value	0.547	0.351	0.267	0.689	0.099	0.330	—			
CCN1-K	Spearman's rho	0.090	0.350	-0.029	0.044	0.001	-0.155	0.331	—		
	p-value	0.676	0.102	0.913	0.860	0.996	0.480	0.123	—		
PLAU-Ç	Spearman's rho	0.014	-0.075	0.132	0.314	-0.041	0.410	**0.586** **	0.068	—	
	p-value	0.957	0.767	0.577	0.273	0.866	0.115	**0.008**	0.805	—	
PLAU-K	Spearman's rho	-0.154	0.245	0.265	**0.653** **	-0.143	**0.566** **	-0.155	0.287	0.331	—
	p-value	0.462	0.249	0.286	**0.002**	0.505	**0.005**	0.470	0.173	0.194	—

Note. * p < .05, ** p < .01, *** p < .001

IDH mutasyonu olan ve olmayan hastalarda; S1P1, S1PR3, SPHK1, CCN1, PLAU genlerinin ekpresyonlarında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı (Tablo 9).

Tablo 9. IDH mutasyonu olan ve olmayan hastalarda; S1P1, S1PR3, SPHK1, CCN1, PLAU genlerinin ekpresyonlar

Independent Samples T-Test			
		Statistic	**p**
S1PR1-Ç	Mann-Whitney U	18.00	0.529
S1PR1-K	Mann-Whitney U	13.00	0.373
S1PR3-Ç	Mann-Whitney U	2.00	0.286
S1PR3-K	Mann-Whitney U	7.00	0.800
SPHK1-Ç	Mann-Whitney U	14.00	0.331
SPHK1-K	Mann-Whitney U	14.00	0.431
CCN1-Ç	Mann-Whitney U	11.00	0.196
CCN1-K	Mann-Whitney U	11.00	0.304
PLAU-Ç	Mann-Whitney U	5.00	0.600
PLAU-K	Mann-Whitney U	8.00	0.146

Group Descriptives						
	Group	**N**	**Mean**	**Median**	**SD**	**SE**
S1PR1-Ç	IDH-wild	26	2.363	0.196	4.846	0.950
	IDH-mutant	2	0.1723	0.1723	0.189	0.1333
S1PR1-K	IDH-wild	23	0.883	0.388	0.995	0.207
	IDH-mutant	2	1.1913	1.1913	1.134	0.8017
S1PR3-Ç	IDH-wild	20	5.166	3.895	5.467	1.223
	IDH-mutant	1	0.9428	0.9428	NaN	NaN
S1PR3-K	IDH-wild	19	1.732	1.424	1.580	0.363
	IDH-mutant	1	0.8293	0.8293	NaN	NaN
SPHK1-Ç	IDH-wild	25	1.159	0.887	1.533	0.307
	IDH-mutant	2	11.3667	11.3667	15.158	10.7183
SPHK1-K	IDH-wild	22	1.310	0.577	2.192	0.467
	IDH-mutant	2	0.3673	0.3673	0.519	0.3673
CCN1-Ç	IDH-wild	26	1.932	0.499	3.977	0.780
	IDH-mutant	2	6.8328	6.8328	8.653	6.1183
CCN1-K	IDH-wild	22	1.809	0.555	4.112	0.877
	IDH-mutant	2	0.2553	0.2553	0.361	0.2553
PLAU-Ç	IDH-wild	19	3.718	2.648	3.602	0.826
	IDH-mutant	1	0.7474	0.7474	NaN	NaN
PLAU-K	IDH-wild	23	1.816	0.748	3.095	0.645
	IDH-mutant	2	0.0964	0.0964	0.136	0.0964

Ki67% değerleri ile; S1P1, S1PR3, SPHK1, CCN1, PLAU genlerinin ekpresyonları arasında korelasyona bakıldığında; Kontrol grubunda CCN1 gen ekspresyonu ortalamaları ile Ki67% değeri arasında istatistiksel anlamlı yüksek oranda pozitif korelasyon saptandı (p=007 spearman rho=0,561).

9 ay ve daha kısa yaşayan hastalar ile 9 aydan uzun yaşayan hastalarda; S1P1, S1PR3, SPHK1, CCN1, PLAU genlerinin ekpresyonlarına bakıldığında; kontrol grubundaki S1PR1 ve CCN1'de istatistiksel anlamlı fark görüldü (p değerleri sırasıyla, p=0,048, p=0,009) (Tablo 11). S1PR1 ve CCN1 genlerinin 9 ay ve daha kısa yaşayan hastalarda daha az eksprese olduğu görüldü.

Tablo 10. 9 ay ve daha kısa yaşayan ile 9 aydan uzun yaşayan hastalarda; S1P1, S1PR3, SPHK1, CCN1, PLAU genlerinin ekpresyonları

Independent Samples T-Test			
		Statistic	**p**
S1PR1-Ç	Mann-Whitney U	84.0	0.599
S1PR1-K	Mann-Whitney U	39.0	0.048
S1PR3-Ç	Mann-Whitney U	42.0	0.387
S1PR3-K	Mann-Whitney U	41.0	0.757
SPHK1-Ç	Mann-Whitney U	75.0	0.479
SPHK1-K	Mann-Whitney U	51.0	0.277
CCN1-Ç	Mann-Whitney U	87.0	0.693
CCN1-K	Mann-Whitney U	26.0	0.009
PLAU-Ç	Mann-Whitney U	46.0	0.796
PLAU-K	Mann-Whitney U	45.0	0.101

Group Descriptives						
	Group	**N**	**Mean**	**Median**	**SD**	**SE**
S1PR1-Ç	sağkalım ≤ 9ay	16	2.826	0.231	5.401	1.3502
	sağkalım >9 ay	12	1.380	0.187	3.621	1.045
S1PR1-K	sağkalım ≤ 9ay	15	0.579	0.326	0.609	0.1572
	sağkalım >9 ay	10	1.401	1.295	1.246	0.394
S1PR3-Ç	sağkalım ≤ 9ay	11	4.851	2.114	6.031	1.8183
	sağkalım >9 ay	10	5.089	4.243	4.955	1.567
S1PR3-K	sağkalım ≤ 9ay	13	1.594	1.197	1.372	0.3806
	sağkalım >9 ay	7	1.861	1.449	1.950	0.737
SPHK1-Ç	sağkalım ≤ 9ay	15	2.152	0.874	5.539	1.4303
	sağkalım >9 ay	12	1.619	0.932	2.081	0.601
SPHK1-K	sağkalım ≤ 9ay	14	1.689	0.649	2.675	0.7149
	sağkalım >9 ay	10	0.592	0.501	0.553	0.175
CCN1-Ç	sağkalım ≤ 9ay	16	2.451	0.499	4.636	1.1589
	sağkalım >9 ay	12	2.057	0.636	4.173	1.205
CCN1-K	sağkalım ≤ 9ay	14	0.398	0.374	0.360	0.0961
	sağkalım >9 ay	10	3.474	0.988	5.800	1.834
PLAU-Ç	sağkalım ≤ 9ay	10	3.248	2.522	3.050	0.9646
	sağkalım >9 ay	10	3.891	2.618	4.164	1.317
PLAU-K	sağkalım ≤ 9ay	15	0.833	0.232	1.601	0.4133
	sağkalım >9 ay	10	2.947	1.548	4.130	1.306

Nüks olan ve olmayan hastalarda; S1P1, S1PR3, SPHK1, CCN1, PLAU genlerinin ekpresyonlarına bakıldığında; kontrol grubunda PLAU gen ekspresyon ortalamalarında istatistiksel anlamlı fark görüldü (p=0,044) (Tablo 12). Kontrol grubundaki PLAU geninin nüks olan hastalarda daha az eksprese olduğu görüldü.

Tablo 11. Nüks olan ve olmayan hastalarda; S1P1, S1PR3, SPHK1, CCN1, PLAU genlerinin ekpresyonları

Independent Samples T-Test			
		Statistic	**p**
S1PR1-Ç	Mann-Whitney U	44.0	0.070
S1PR1-K	Mann-Whitney U	49.0	0.288
S1PR3-Ç	Mann-Whitney U	45.0	0.799
S1PR3-K	Mann-Whitney U	30.0	0.353
SPHK1-Ç	Mann-Whitney U	58.0	0.352
SPHK1-K	Mann-Whitney U	45.0	0.372
CCN1-Ç	Mann-Whitney U	64.0	0.430
CCN1-K	Mann-Whitney U	35.0	0.081
PLAU-Ç	Mann-Whitney U	43.0	0.877
PLAU-K	**Mann-Whitney U**	**33.0**	**0.044**

Group Descriptives						
	Group	**N**	**Mean**	**Median**	**SD**	**SE**
S1PR1-Ç	nüks yok	8	0.327	0.139	0.605	0.214
	nüks var	20	2.958	0.289	5.400	1.207
S1PR1-K	nüks yok	8	1.415	1.218	1.389	0.491
	nüks var	17	0.669	0.333	0.647	0.157
S1PR3-Ç	nüks yok	7	4.859	2.732	6.353	2.401
	nüks var	14	5.017	3.895	5.134	1.372
S1PR3-K	nüks yok	6	1.013	1.183	0.678	0.277
	nüks var	14	1.976	1.414	1.744	0.466
SPHK1-Ç	nüks yok	8	0.743	0.570	0.577	0.204
	nüks var	19	2.408	0.936	5.062	1.161
SPHK1-K	nüks yok	7	0.557	0.563	0.560	0.212
	nüks var	17	1.509	0.735	2.455	0.595
CCN1-Ç	nüks yok	8	1.104	0.677	0.941	0.333
	nüks var	20	2.753	0.467	5.095	1.139
CCN1-K	nüks yok	8	1.867	1.063	1.929	0.682
	nüks var	16	1.585	0.429	4.713	1.178
PLAU-Ç	nüks yok	7	3.438	1.173	4.264	1.612
	nüks var	13	3.640	2.648	3.324	0.922
PLAU-K	nüks yok	8	3.555	2.475	4.437	1.569
	nüks var	17	0.796	0.201	1.520	0.369

TARTIŞMA

Yüksek dereceli gliomalar güncel tedavilere rağmen erken nüks ve kısa sağkalım süresi olan bir hastalıktır. YDG'lerde kısa sağkalım ile ilgili en önemli faktörlerden biri invazyondur. İnvazyon ile ilgili moleküler çalışma sayısı son yıllarda artmaktadır. Gliomanın invazyonunda etkili olduğu düşünülen başlıca 3 yolak mevcuttur. Bu yolaklar sonic hedgehog-GLI1, Wnt, PI3K/Akt yolaklarıdır. Biz çalışmamızda PI3K/Akt yolağını inceledik.

Çalışmamızda PI3K/Akt yolağında yer alan S1PR1, S1PR3, SPHK1, PLAU, CCN1 genlerinin ekspresyon miktarlarını in vivo koşullarda real-time pcr yöntemi ile inceledik. Canlı insan tümör rezeksiyon materyalleri (çalışma grubu) ve perilezyoner lokalizasyonda histolojik olarak normal tanımına uyan beyin dokusunda (kontrol grubu) bu genlerin tamamının eksprese olduğunu gördük. Yoshida ve arkadaşları 2010 yılında yapmış oldukları çalışmada, normal beyin dokusunda S1P1-2-3-5 in eksprese olduğunu ama S1P4 ün eksprese olmadığını bildirdiler. (4). Guan ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmada, glioma hücrelerinde SPHK1'in eksprese olduğunu bildirdiler (61). Li ve arkadaşaları 2021 yılında yaptıkları çalışmada glioma hücrelerinde PLAU'nun ekprese olduğunu bildirdiler (70). Haseley ve arkadaşları 2012 yıında yaptıkları çalışmada CCN1'in glioma hücrelerinde eksprese olduğunu bildirdiler (71). Literatürde yer alan bu çalışmalar PI3K/Akt yolağında yer alan bu genlerin ekspresyonlarının insan beyninde eksprese olduğunu ve gliomlarda ekspresyonlarının değiştiğini göstermektedir. Biz çalışmamızda aynı yolakta yer aldıkları tekil çalışmalarla gösterilmiş bu genlerin, hem canlı insan beyin dokusu ve gliomunda eksprese olup olmadıklarını teyid etmek hem de bu genlerin gliom patogenezinde birlikte rol oynayıp oynamadıklarını araştırmayı hedefledik.

S1PR1, S1PR3, SPHK1, PLAU, CCN1 genlerinin çalışma ve kontrol gruplarında her

zaman eksprese olduğunu gördük. Çalışma ve kontrol grubundaki ekspresyon miktarlarını karşılaştırdığımızda; Çalışma grubunda, S1PR3 geninin ekspresyonun kontrol grubuna göre arttığını gördük (p=0,021). Benzer şekilde, Young ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmada, glioma hücrelerinde S1P1, S1P2 ve S1P3'ün yüksek ekspresyonunun gliomanın proliferasyonunu arttırdığını bildirdiler (57).

Çalışmamızda, S1PR1, S1PR3, SPHK1, CCN1 VE PLAU genlerinin gliomlarda ekspresyonlarında kendi içlerinde korelasyon olup olmadığına baktığımızda çalışma ve kontrol gruplarında görülen istatistiksel olarak anlamlı korelasyonlar şu şekildedir:

Çalışma grubunda S1PR1 ve S1PR3 genlerinin ekspresyon oranları arasında istatistiksel anlamlı yüksek oranda pozitif korelasyon (p=0,007 spearman rho=0,579); CCN1 ve PLAU genlerinin ekspresyon oranları arasında istatistiksel anlamlı yüksek oranda pozitif korelasyon (p=0,008 spearman rho=0,586) görüldü.

Kontrol grubunda ise; S1PR3 ve SPHK1 genlerinin ekspresyon oranları arasında istatistiksel anlamlı yüksek oranda pozitif korelasyon (p=<0,001 spearman rho=0,882); S1PR3 ve PLAU genlerinin ekspresyon oranları arasında istatistiksel anlamlı yüksek oranda pozitif korelasyon (p=0,002 spearman rho=0,653); SPHK1 ve PLAU genlerinin ekspresyon oranları arasında istatistiksel anlamlı yüksek oranda pozitif korelasyon (p=0,005 spearman rho=0,566) görüldü. Bu korelasyonlar bize bu genlerin gliom patogenezinde birlikte rol oynayabileceklerini düşündürmektedir. Yaptığımız literatür araştırmasında bu genler arasında korelasyon olup olmadığı hiç çalışılmamakla birlikte bu genlerin aynı yolakta yeralan başka genler ile gösterilmiş korelasyonları bulunmaktadır. Yoshida ve arkadaşları 2010 yılında yapmış oldukları çalışmada S1P1-2-3-5' in beyinde eksprese olduğunu ve birbirleri ile korelasyon gösterdiğini belirtmektedir (4). Hait ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmada SPHK1'in apoptoz düzenleme görevinde S1P subtipleri ile ilişkisini araştırdığında aralarında korelasyon gördüklerini belirttiler (72). Li ve arkadaşları 2021 yılında yaptıkları çalışmada PLAU'nun yüksek ekspresyonunun tümörün derecesi, IDH mutasyonu durumu ve 1p19q durumu ile korele olduğunu bildirdiler (70). Uneda ve arkadaşları 2021 yılında yaptıkları çalışmada, CCN1'in ekspresyonunun glioblastoma hücreleri ile korelasyon gösterdiğini ama glioblastoma kök hücresine benzeyen hücreler ile korele olmadığını bildirdiler (73).

Çalışmamızda IDH mutasyonu olan ve olmayan hastalarda; S1P1, S1PR3, SPHK1, CCN1, PLAU genlerinin ekpresyonlarında anlamlı fark görmedik. Çalışılan IDH mutant gliom sayısının iki olması nedeniyle istatistiksel olarak bir yorum yapmamız da mümkün olmamıştır. Dowdy ve arkadaşları 2020 yılında yapmış oldukları deneysel çalışmada, IDH mutasyonun engellenmesinin S1P ekpresyonunu arttırdığını belirttiler (74). Li ve arkadaşları 2021 yılında

yaptıkları çalışmada PLAU'nun yüksek ekspresyonunun tümörün derecesi, IDH mutasyonu durumu ve 1p19q durumu ile ilişkili olduğunu bildirdiler (70). Yaptığımız literatür taramasında IDH mutasyon durumu ile SPHK1 ve CCN1 arasında karşılaştırmaya rastlanılmadı.

Çalışmamızda Ki67% değerleri ile; S1P1, S1PR3, SPHK1, CCN1, PLAU genlerinin ekpresyonları arasında korelasyona baktığımızda, kontrol grubunda CCN1 gen ekspresyonu ortalamaları ile Ki67% değeri arasında istatistiksel anlamlı yüksek oranda pozitif korelasyon görüldü. Yaptığımız literatür taramasında Ki67% değeri ile S1P1, S1PR3, SPHK1, CCN1, PLAU genlerinin ekpresyonları arasındaki korelasyon ile ilgili yayın bulamadık.

Çalışmamızda 9 ay ve daha kısa yaşayan ile 9 aydan uzun yaşayan hastaların; S1P1, S1PR3, SPHK1, CCN1, PLAU genlerinin ekpresyonlarına bakıldığında; Kontrol grubundaki S1PR1 geninin, 9 ay ve daha kısa yaşayanlarda daha az eksprese olduğu görüldü. Kontrol grubundaki CCN1 geninin, 9 ay ve daha kısa yaşayanlarda daha az eksprese olduğu görüldü. Young ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmada gliomalarda S1P1 ve S1P3'ün CCN1 ekspresyonunu arttırdığını dolayısıyla hücre invazyonunu arttırarak sağkalımı kısalttığını belirttiler (57). Haseley ve arkadaşları 2012 yılında yaptıkları çalışmada, CCN1 ekspresyonunun yüksek olmasını kısa sağ kalım ile ilişkilendirmektediler (71). 9 aydan kısa yaşayan hastalarda CCN1ekspresyonu düşük bulmamız taradığımız literatür sonuçları ile uyuşmamaktadır.

Çalışmamızda nüks olan ve olmayan hastalarda; S1P1, S1PR3, SPHK1, CCN1, PLAU genlerinin ekpresyonlarına baktığımızda; kontrol grubundaki PLAU geninin nüks olan hastalarda daha az eksprese olduğu görüldü. Li ve arkadaşları 2021 yılında yaptıkları çalışmada, PLAU'nun yüksek ekspresyonunu nükslerle ve kısa sağkalım ile ilişkilendirmektedirler (70).

Bizim çalışmamıza dahil edilen hasta ve kontrol grubunun örnek sayısının az olması bir dezavantaj olmakla birlikte çalışmaya dahil edilen her kontrol spesmeninin aynı tümör hastalarından alınmış olması, çalışma ve kontrol grupları arasındaki varyasyonları azaltmaktadır. Çalışmamızda istatistiksel anlamlı sonuçların çoğunluğunu kontrol grubunda görmemiz ilginç bir bulgudur. Yüksek dereceli glioma hastalarında, çalışma grubu tümörün nekroze alanlar içeren merkez kısımlarından oluşmakta iken perilezyoner kısım mikroskopik olarak ve histolojik olarak normal beyin dokusundan oluşmakta idi. Yaygın genetik anormalliklerin eşlik ettiği bir hastalık olan gliomalarda, perilezyoner dokular ile tümör merkezindeki dokular genetik olarak benzer ekspesyon değişikliklerini farklı derecelerde göstermiş olabilir.

Çalışmamızda aynı yolak üzerinde yer alan genlerin taze tümör ve perilezyoner normal beyin dokularındaki ekspresyon miktarlarında meydana gelen anlamlı değişiklikleri ve genler

arasındaki anlamlı korelasyonları göstermenin; bu yolak ile ilgili yapılabilecek daha geniş kapsamlı çalışmalar için bir temel olduğunu düşünüyoruz. Çalıştığımız gen ekspresyonlarının protein ekspresyonu karşılıklarının olup olmadığını görmek anlamlı olurdu. Mevcut çalışmamızın bütçesi nedeniyle çalışmamıza Western Blot çalışması ekleyemedik. Anlamlı ekspresyon değişikliklerinin protein ekspresyonu düzeyinde de gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak üzere bir devam çalışması planlamamızın anlamlı olduğunu düşünüyoruz.

Sonuç olarak, PI3K/Akt yolağının yüksek dereceli gliom patogenezinde aktif bir yolak olduğunu düşünüyoruz. Çalıştığımız genlerin bu yolağın işleyişinde önemli rol oynayan genler olabileceğine inanıyoruz. Daha büyük örnek grupları ve protein ekspresyonu desteği ile yapılacak daha büyük ölçekli çalışmalar, bu genlerin, glioma invazyonunun modifiye edilmesi için kullanılabilecek hedefler olup olamayacağı veya prognostik önem taşıyıp taşımadıkları konusunda bizi yönlendirecektir.

SONUÇLAR

Gliomaların invazyon mekanizmasında yer aldığı düşünülen S1PR1, S1PR3, SPHK1, PLAU, CCN1 genlerinin ekspresyon miktarlarındaki değişikliklerin nüks ve sağkalım ile ilişkisinin ortaya konması ve glioma hastalarının yaşam süresine etkisini gözlemlemek için yaptığımız çalışmanın sonuçları şunlardır:

1. S1P1, S1PR3, SPHK1, CCN1, PLAU genlerinin canlı insan tümör rezeksiyon materyalleri (çalışma grubu) ve perilezyoner lokalizasyonda histolojik olarak normal tanımına uyan beyin dokusunda (kontrol grubu) eksprese olduğu görüldü.
2. S1P1, S1PR3, SPHK1, CCN1, PLAU genlerinin çalışma ve kontrol grubundaki ekspresyon miktarları karşılaştırıldığında; S1PR3 geninde istatistiksel anlamlı fark görüldü (p=0,021). Çalışma grubunda, S1PR3 geninin ekspresyonun kontrol grubuna göre arttığı görüldü.
3. S1PR1, S1PR3, SPHK1, CCN1 VE PLAU genlerinin ekspresyon miktarları çalışma ve kontrol grupları kendi içlerinde incelendiğinde bazı gen ekspresyonlarının birbirleri ile korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir; istatistiksel anlamlı sonuçlar şunlardır:
   i. Çalışma grubunda S1PR1 ve S1PR3 genlerinin ekspresyon oranları arasında istatistiksel anlamlı yüksek oranda pozitif korelasyon görüldü (p=0,007 spearman rho=0,579).
   ii. Kontrol grubunda S1PR3 ve SPHK1 genlerinin ekspresyon oranları arasında istatistiksel anlamlı yüksek oranda pozitif korelasyon görüldü (p=<0,001 spearman rho=0,882).
   iii. Kontrol grubunda S1PR3 ve PLAU genlerinin ekspresyon oranları arasında istatistiksel anlamlı yüksek oranda pozitif korelasyon görüldü (p=0,002 spearman rho=0,653).

iv. Çalışma grubunda CCN1 ve PLAU genlerinin ekspresyon oranları arasında istatistiksel anlamlı yüksek oranda pozitif korelasyon görüldü (p=0,008 spearman rho=0,586).

v. Kontrol grubunda SPHK1 ve PLAU genlerinin ekspresyon oranları arasında istatistiksel anlamlı yüksek oranda pozitif korelasyon görüldü (p=0,005 spearman rho=0,566).

Bu korelasyonlar bizlere çalıştığımız genlerin tümör patogenezinde birlikte rol oynadıklarını düşündürdü.

4. IDH mutasyonu olan ve olmayan hastalarda; S1P1, S1PR3, SPHK1, CCN1, PLAU genlerinin ekpresyonlarında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı.
5. Ki67% değerleri ile; S1P1, S1PR3, SPHK1, CCN1, PLAU genlerinin ekpresyonları arasında korelasyona bakıldığında; Kontrol grubunda CCN1 gen ekspresyonu ortalamaları ile Ki67% değeri arasında istatistiksel anlamlı yüksek oranda pozitif korelasyon görüldü (p=007 spearman rho=0,561).
6. 9 ay ve daha kısa yaşayan ile 9 aydan uzun yaşayan hastalarda; S1P1, S1PR3, SPHK1, CCN1, PLAU genlerinin ekpresyonlarına bakıldığında; kontrol grubundaki S1PR1 ve CCN1'de istatistiksel anlamlı fark saptandı (p değerleri sırasıyla, p=0,048, p=0,009). Kontrol grubundaki S1PR1 geninin, 9 ay ve daha kısa yaşayanlarda daha az eksprese olduğu görüldü. Kontrol grubundaki CCN1 geninin, 9 ay ve daha kısa yaşayanlarda daha az eksprese olduğu görüldü.
7. Nüks olan ve olmayan hastalarda; S1P1, S1PR3, SPHK1, CCN1, PLAU genlerinin ekpresyonlarına bakıldığında; kontrol grubunda PLAU gen ekspresyon ortalamalarında istatistiksel anlamlı fark saptandı. Kontrol grubundaki PLAU geninin nüks olan hastalarda daha az eksprese olduğu görüldü.

Bu sonuçlar, S1P1, S1PR3, SPHK1, CCN1, PLAU genlerinin ekspresyonunun insan gliomalarında nüks ve sağkalım süreleri ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

ÖZET

Gliomalar primer beyin tümörleri içerisinde en sık rastlanan histolojik tiptir. Erken dönemde tekrarlayan nüksler ile invaziv seyreden bu tümörlerin ortalama sağkalım süresi 1-2 yıldır (2). İçinde genetik mutasyonlar ve moleküler anormallikler barındıran YDG'lerde görülen erken nüks ve kısa sağkalım tümörün invazyon ve neoanjiyogenez yolaklarında rol oynayan moleküllerde çeşitli mutasyonlar ve ekspresyon değişikliklerine bağlanmaktadır (3). Moleküler ve genetik olarak heterojen bir grup olan bu tümörlerde değişik invazyon ve anjiyogenez yolakları ile ilgili birçok çalışma yapılmakla birlikte bu çalışmaların tamamına yakını hücre kültürlerinde ya da deneysel hayvan glioma modellerinde yapılmıştır. Tümörlerin davranışlarında tümörün in vivo mikro çevresel yapısı önemlidir. Dolayısıyla insan kaynaklı tümör rezeksiyon materyalleri kullanılarak yapılan çalışmaların tümör davranışı ile ilgili daha aydınlatıcı olacağını düşünmekteyiz.

Yaptğımız çalışmada 29 hastadan elde edilen insan beyin tümör materyalleri ve perilezyoner normal beyin dokusu kullanıldı. PI3K/Akt yolağında rol oynadığı kabul edilen S1P1, S1PR3, SPHK1, CCN1, PLAU genlerinin ekspresyonları incelendi. Çalışmamıza dahil edilen genlerin hepsinde ekspresyon görüldü. Çalışma grubunda S1PR3'ün kontrol grubuna göre ekspresyonunun arttığı görüldü. Çalışma grubunda; S1PR1- S1PR3 ve CCN1- PLAU genleri arasında istatistiksel anlamlı yüksek oranda pozitif korelasyon görüldü. Kontrol grubunda; S1PR3- SPHK1, S1PR3- PLAU ve SPHK1- PLAU genleri arasında istatistiksel anlamlı yüksek oranda pozitif korelasyon görüldü. Ki67% değeri ile kontrol grubu CCN1 ekspresyonu arasında istatistiksel anlamlı yüksek oranda pozitif korelasyon görüldü. Kontrol grubunda, 9 ay ve daha kısa yaşayan hastalarda; S1PR1 ve CCN1 ekspresyonun azalmış olduğu görüldü. Kontrol grubundaki PLAU geninin nüks olan hastalarda daha az eksprese olduğu

görüldü. Sonuç olarak, S1P1, S1PR3, SPHK1, CCN1, PLAU genlerinin ekspresyonunun insan gliomalarında nüks ve sağkalım süreleri ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Glioma, Sfingozin-1-fosfat, Neoplazm invazivitesi, Sfingozin kinaz, Ürokinaz plazminojen aktivatörü

INVESTIGATION OF THE EXPRESSION OF INVASION MARKERS AND CLINICAL SIGNIFICANCE OF INVASION MARKERS IN HIGH-GRADE GLIOMAS

SUMMARY

Gliomas are histologically the most common type among primary brain tumors. The average patient survival time of these tumors are 1-2 years. These tumors have an invasive course, with recurrences in the early period. (2). Early relaps and short survival seen in HGGs, which contain genetic mutations and molecular abnormalities, are attributed to various mutations and expression changes in molecules that play a role in the invasion and neoangiogenesis pathways of the tumor (3). Although many studies have been conducted on different invasion and angiogenesis pathways of these tumors, which are a molecularly and genetically heterogeneous group, almost all of these studies have been conducted in cell cultures or on experimental animal glioma models. The in vivo microenvironmental structure of the tumor is important for the behavior of tumors. Therefore, we think that studies using human-derived tumor resection materials will be more enlightening about tumor behavior.

In our study, human brain tumor materials and perilesional normal brain tissue obtained from 29 patients were used. We examined the expressions of S1P1, S1PR3, SPHK1, CCN1, PLAU genes, which are considered to play a role in the PI3K/Akt pathway. Expression of all of these genes were observed in our study. It was observed that the expression of S1PR3 has increased in the study group compared to the control group. There was a statistically significant high positive correlation between expression of S1PR1- S1PR3 and CCN1- PLAU genes in the study group. Also, there was a statistically significant high positive correlation between the expression of S1PR3- SPHK1, S1PR3- PLAU and SPHK1- PLAU genes. Furthermore, there was a statistically significant high positive correlation between CCN1 expression and Ki67%

value in the control group. As for patients, the patients who lived less than 9 months; S1PR1 and CCN1 expression were decreased. In the control group it was observed that the PLAU gene expression in the control group was less in patients with relapse. These results suggest that S1P1, S1PR3, SPHK1, CCN1, PLAU genes may be associated with invasion, relapses, and survival.

Keywords: Glioma, Sphingosine-1-Phosphate, Neoplasm Invasiveness, Sphingosine kinase, Urokinase plasminogen activator

KAYNAKLAR

1. Ceylan S. Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Hastanesi Medikal Onkoloji Ve Radyasyon Onkolojisi Bölümlerine 2008-2017 Tarihleri Arasında Başvuran Düşük Dereceli Glial Tümör Tanılı Hastaların Klinopatolojik Özellikleri Ve Tedavi Sonuçları: Tıp Fakültesi.

2. Kathryn Maree Field, Mark Andrew Rosenthal, Merve Yilmaz, et al. Comparison between poor and long- term survivors with glioblastoma: Review of an Australian dataset. Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology 2014;10:153–161.

3. Zübeyde Erbayraktar, Serhat Erbayraktar, Erdoğan Pekcan Erkan. Glioblastoma için hedefe yönelik tedavi: Mevcut stratejilerin ve yeni hedeflerin değerlendirilmesi. Sinir Sistemi Cerrahisi Dergisi 2015;5:59–68.

4. Yoshida Y, Nakada M, Sugimoto N, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor type 1 regulates glioma cell proliferation and correlates with patient survival. Int J Cancer 2010;126:2341–2352.

5. Young N, Pearl DK, van Brocklyn JR. Sphingosine-1-phosphate regulates glioblastoma cell invasiveness through the urokinase plasminogen activator system and CCN1/Cyr61. Mol Cancer Res 2009;7:23–32.

6. Bryan L, Paugh BS, Kapitonov D, et al. Sphingosine-1-phosphate and interleukin-1 independently regulate plasminogen activator inhibitor-1 and urokinase-type plasminogen activator receptor expression in glioblastoma cells: implications for invasiveness. Mol Cancer Res 2008;6:1469–1477.

7. Mahajan-Thakur S, Bien-Möller S, Marx S, et al. Sphingosine 1-phosphate (S1P) signaling in glioblastoma multiforme-A systematic review. Int J Mol Sci 2017;18.

8. Stoyanov GS, Dzhenkov DL. On the Concepts and History of Glioblastoma Multiforme - Morphology, Genetics and Epigenetics. Folia Med (Plovdiv) 2018;60:48–66.

9. Nakazato Y. Revised WHO classification of brain tumours. Brain Nerve 2008;60:59–77.

10. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. The new WHO classification of brain tumours. Brain Pathol 1993;3:255–268.

11. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, et al. The WHO classification of tumors of the nervous system. J Neuropathol Exp Neurol 2002;61:215-25; discussion 226-9.

12. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta Neuropathol 2007;114:97–109.

13. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathol 2016;131:803–820.

14. Horbinski C, Berger T, Packer RJ, et al. Clinical implications of the 2021 edition of the WHO classification of central nervous system tumours. Nat Rev Neurol 2022;18:515–529.

15. Figarella-Branger D, Appay R, Metais A, et al. La classification de l'OMS 2021 des tumeurs du système nerveux central. Ann Pathol 2021.

16. Bai J, Varghese J, Jain R. Adult Glioma WHO Classification Update, Genomics, and Imaging: What the Radiologists Need to Know. Top Magn Reson Imaging 2020;29:71–82.

17. Perez A, Huse JT. The Evolving Classification of Diffuse Gliomas: World Health Organization Updates for 2021. Curr Neurol Neurosci Rep 2021;21:67.

18. Bracegirdle B. J. J. Lister and the establishment of histology. Med Hist 1977;21:187–191.

19. Martin-Villalba A, Okuducu AF, Deimling A von. The evolution of our understanding on glioma. Brain Pathol 2008;18:455–463.

20. Komori T. Grading of adult diffuse gliomas according to the 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System. Lab Invest 2022;102:126–133.

21. 2015 Türkiye Kanser istatistikleri. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, 2018.

22. Mladenovsk M, Valkov I, Ovcharov M, et al. High Grade Glioma Surgery - Clinical Aspects and Prognosis. Folia Med (Plovdiv) 2021;63:35–41.

23. Salcman M. Historical development of surgery for glial tumors. J Neurooncol 1999;42:195–204.

24. Sawaya R. Fifty years of neurosurgery argue in favor of glioma resection. Clin Neurosurg 2001;48:10–19.

25. Hart MG, Grant GR, Solyom EF, et al. Biopsy versus resection for high-grade glioma. Cochrane Database Syst Rev 2019;6:CD002034.

26. Incekara F, Koene S, Vincent AJPE, et al. Association Between Supratotal Glioblastoma Resection and Patient Survival: A Systematic Review and Meta-Analysis. World Neurosurg 2019;127:617-624.e2.

27. Ho VKY, Reijneveld JC, Enting RH, et al. Changing incidence and improved survival of gliomas. Eur J Cancer 2014;50:2309–2318.

28. D'Amico RS, Englander ZK, Canoll P, et al. Extent of Resection in Glioma-A Review of the Cutting Edge. World Neurosurg 2017;103:538–549.

29. Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, et al. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. Neuro Oncol 2014;16:896–913.

30. Ostrom QT, Gittleman H, Stetson L, et al. Epidemiology of gliomas. Cancer Treat Res 2015;163:1–14.

31. Linos E, Raine T, Alonso A, et al. Atopy and risk of brain tumors: a meta-analysis. J Natl Cancer Inst 2007;99:1544–1550.

32. Cahill D, Turcan S. Origin of Gliomas. Semin Neurol 2018;38:5–10.

33. Hanif F, Muzaffar K, Perveen K, et al. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. Asian Pac J Cancer Prev 2017;18:3–9.

34. Baehring JM, Piepmeier JM. Brain Tumors: CRC Press; 2016.

35. Piepmeier JM. Cerebral gliomas: how tumor biology affects management. Clin Neurosurg 2001;48:3–9.

36. Jellinger K, editor. Therapy of Malignant Brain Tumors. Vienna: Springer Vienna; 1986.

37. Narayan PM, Olson JJM. Management of Anaplastic Astrocytoma; Aralık 1, 2001 - Sayı 23 - sayfa 1-6.

38. Kondziolka D, Lunsford LD, Martinez AJ. Unreliability of contemporary neurodiagnostic imaging in evaluating suspected adult supratentorial (low-grade) astrocytoma. J Neurosurg 1993;79:533–536.

39. Sitter B, Sjøbakk TE, Larsson HBW, et al. Klinisk MR-spektroskopi av hjernen. Tidsskr Nor Laegeforen 2019;139.

40. Chamberlain MC, Murovic JA, Levin VA. Absence of contrast enhancement on CT brain scans of patients with supratentorial malignant gliomas. Neurology 1988;38:1371–1374.

41. Zhang L, Yang L-Q, Wen L, et al. Noninvasively Evaluating the Grading of Glioma by Multiparametric Magnetic Resonance Imaging. Acad Radiol 2021;28:e137-e146.

42. van Dijken BRJ, van Laar PJ, Holtman GA, et al. Diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging techniques for treatment response evaluation in patients with high-grade glioma, a systematic review and meta-analysis. Eur Radiol 2017;27:4129–4144.

43. Almansory KO, Fraioli F. Combined PET/MRI in brain glioma imaging. Br J Hosp Med (Lond) 2019;80:380–386.

44. Villanueva-Meyer JE, Mabray MC, Cha S. Current Clinical Brain Tumor Imaging. Neurosurgery 2017;81:397–415.

45. Toyama H, Takeshita G, Takeuchi A, et al. Cerebral hemodynamics in patients with chronic obstructive carotid disease by rCBF, rCBV, and rCBV/rCBF ratio using SPECT. J Nucl Med 1990;31:55–60.

46. Collins VP. Gliomas. Cancer Surv 1998;32:37–51.

47. Paw I, Carpenter RC, Watabe K, et al. Mechanisms regulating glioma invasion. Cancer Lett 2015;362:1–7.

48. Swanson KR, Bridge C, Murray JD, et al. Virtual and real brain tumors: using mathematical modeling to quantify glioma growth and invasion. J Neurol Sci 2003;216:1–10.

49. Nagahashi M, Yamada A, Katsuta E, et al. Targeting the SphK1/S1P/S1PR1 Axis That Links Obesity, Chronic Inflammation, and Breast Cancer Metastasis. Cancer Res 2018;78:1713–1725.

50. Qin Z, Tong H, Li T, et al. SPHK1 contributes to cisplatin resistance in bladder cancer cells via the NONO/STAT3 axis. Int J Mol Med 2021;48.

51. Shida D, Takabe K, Kapitonov D, et al. Targeting SphK1 as a new strategy against cancer. Curr Drug Targets 2008;9:662–673.

52. Yu M, Zhang K, Wang S, et al. Increased SPHK1 and HAS2 Expressions Correlate to Poor Prognosis in Pancreatic Cancer. Biomed Res Int 2021;2021:8861766.

53. Jiang S, Hill K, Patel D, et al. Direct medical costs of treatment in newly-diagnosed high-grade glioma among commercially insured US patients. J Med Econ 2017;20:1237–1243.

54. Elkins MF, Earhart CF. Nucleotide sequence and regulation of the Escherichia coli gene for ferrienterobactin transport protein FepB. J Bacteriol 1989;171:5443–5451.

55. Van Brocklyn et al. - 2005 - Sphingosine Kinase-1 Expression Correlates With Poor Survival of Patients With Glioblastoma Multiforme Role.

56. Young, Van Brocklyn - 2007 - Roles of sphingosine-1-phosphate (S1P) receptors in malignant behavior of glioma cells. Differential effect.

57. Young N, van Brocklyn JR. Roles of sphingosine-1-phosphate (S1P) receptors in malignant behavior of glioma cells. Differential effects of S1P2 on cell migration and invasiveness. Exp Cell Res 2007;313:1615–1627.

58. Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt Pathway. Cold Spring Harb Perspect Biol 2012;4.

59. Wu J-N, Lin L, Luo S-B, et al. SphK1- driven autophagy potentiates focal adhesion paxillin- mediated metastasis in colorectal cancer. Cancer Med 2021;10:6010–6021.

60. Khan FI, Lai D, Anwer R, et al. Identifying novel sphingosine kinase 1 inhibitors as therapeutics against breast cancer. J Enzyme Inhib Med Chem;35:172–186.

61. Guan H, Song L, Cai J, et al. Sphingosine Kinase 1 Regulates the Akt/FOXO3a/Bim Pathway and Contributes to Apoptosis Resistance in Glioma Cells. PLoS One 2011;6.

62. Jacobsen K, Russell L, Kaur B, et al. Effects of CCN1 and Macrophage Content on Glioma Virotherapy: A Mathematical Model. Bull Math Biol 2015;77:984–1012.

63. Monie DD, Correia C, Zhang C, et al. Modular network mechanism of CCN1-associated resistance to HSV-1-derived oncolytic immunovirotherapies for glioblastomas. Sci Rep 2021;11:11198.

64. Ishida J, Kurozumi K, Ichikawa T, et al. Evaluation of extracellular matrix protein CCN1 as a prognostic factor for glioblastoma. Brain Tumor Pathol 2015;32:245–252.

65. Sin WC, Bechberger JF, Rushlow WJ, et al. Dose-dependent differential upregulation of CCN1/Cyr61 and CCN3/NOV by the gap junction protein Connexin43 in glioma cells. J Cell Biochem 2008;103:1772–1782.

66. Malla RR, Gopinath S, Gondi CS, et al. Retraction Note to: uPAR and cathepsin B downregulation induces apoptosis by targeting calcineurin A to BAD via Bcl-2 in glioma. J Neurooncol 2021;152:417.

67. Hirata K, Tamaki N. uPAR as a Glioma Imaging Target. J Nucl Med 2016;57:169–170.

68. Veeravalli KK, Rao JS. MMP-9 and uPAR regulated glioma cell migration. Cell Adh Migr 2012;6:509–512.

69. Feldman, J. P. and Goldwasser, R., "A mathematical model for tumor volume evaluation using two-dimensions", Journal of Applied Quantitative Methods, 4 (4): 455–462 (2009).

70. Li J, Fan H, Zhou X, et al. Prognostic Significance and Gene Co-Expression Network of PLAU and PLAUR in Gliomas. Front Oncol 2021;11:602321.

71. Haseley A, Boone S, Wojton J, et al. Extracellular matrix protein CCN1 limits oncolytic efficacy in glioma. Cancer Res 2012;72:1353–1362.

72. Hait NC, Oskeritzian CA, Paugh SW, et al. Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. Biochim Biophys Acta 2006;1758:2016–2026.

73. Uneda A, Kurozumi K, Fujimura A, et al. Differentiated glioblastoma cells accelerate tumor progression by shaping the tumor microenvironment via CCN1-mediated macrophage infiltration. Acta Neuropathol Commun 2021;9:29.

74. Dowdy T, Zhang L, Celiku O, et al. Sphingolipid Pathway as a Source of Vulnerability in IDH1mut Glioma. Cancers (Basel) 2020;12.

EKLER

Ek 1

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU/ ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-BAEK 2020/162	
	PROTOKOL ADI	Yüksek Dereceli Gliomlarda İnvazyon Belirteçlerinin Ekspresyonunun ve Klinik Öneminin Araştırılması	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Dr. Öğr. Üyesi Banu TÜTÜNCÜLER	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası
KARAR BİLGİLERİ	**Karar No: 09/12**	**Tarih: 22.05.2020**	
	Fakültemiz Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Banu TÜTÜNCÜLER'in sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Araş. Gör. Dr. Yener AKTÜRK'ün tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş; araştırmaya ilişkin giderlerin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmediği koşullarda ve veri toplanacak yerlerden gerekli izinler alındıktan sonra gerçekleştirilmesinde etik bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ			
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-BAEK Yönergesi		

ÜYELER

Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E H	E H	
Doç. Dr. Rugül KÖSE ÇINAR Başkan Yardımcısı	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağ. ve Has. A.D.	K	E H	E H	
Dr. Öğr.Üyesi Ruhan Deniz TOPUZ Üye	Tıbbi Farmakoloji.	T.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D	K	E H	E H	
Doç. Dr. F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. BiyoistatistikA.D.	K	E H	E H	
Doç. Dr. Hakan GÜRKAN Üye	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Hasan ÜMİT Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E H	E H	
Dr. Öğr. Üyesi Oktay KAYA Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Galip EKUKLU Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	E	E H	E H	
Dr. Öğr. Üyesi Fatma Gülsüm ÖNAL Üye	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E H	E H	
Öğr. Gör. Dr. Sinan ATEŞ Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Sevtap HEKİMOĞLU ŞAHİN Üye	Anestezi ve Reanimasyon	T.Ü.T.F. Anestezi ve Reanimasyon A.D.	K	E H	E H	
Prof. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E H	E H	
Avukat Emine NURLU Üye		T.Ü. Rektörlüğü	K	E H	E H	
Emekli Öğretmen Sinan SEÇKİN Üye		Serbest Üye	E	E H	E H	

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Ahmet TEZEL
Dekan a.
Dekan Yrd