



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Başkan: Prof. Dr. Aşım Büge ÖZ

Danışman: Prof. Dr. Aşım Büge ÖZ

**DİFÜZ GLİAL TÜMÖRLERDE HAARLEM ENTEGRE
TANI SİSTEMİNİN UYGULANABİLİRLİĞİ VE
PDGFR- α AMPLİFİKASYONUNUN NÜKS VE
PROGNOZ BELİRTECİ OLARAK YERİ**

(UZMANLIK TEZİ)

Dr. Neslihan KAYA

İstanbul – 2017

ÖNSÖZ

Uzman doktor olma yolunda eğitimimde büyük katkıları olan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, başta anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Ayşim Büge Öz olmak üzere tüm hocalarıma teşekkür ediyorum.

Çalışmanın her aşamasında beni destekleyen, bana güzel fikirler veren, hem çalışma disiplini hem de insani duruşu nedeniyle kendime idol olarak belirlediğim değerli danışman hocam Prof. Dr. Ayşim Büge Öz'e saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Sorularıyla zaman zaman bunalttığım, yine de benimle her bilgisini paylaşan uzman doktorlarımızdan başta Şebnem abla olmak üzere Nuray, Ahu, Tülin (yeni doçent), Hale ve Burcu'ya çok teşekkür ediyorum.

Asistanlık eğitimine dört gün arayla başladığım, ilk günden son güne kadar canı gönülden yanımda olan, desteğini benden esirgemeyen, aklımın karıştığı her anda yanımda olan, bana en iyi yolu gösteren can yoldaşım Deniz'e sonsuz teşekkür ediyorum. İyi ki varsın eşkıdemim.

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım diğer asistan arkadaşlarımdan Özden'e, Reha'ya, Cansu Türker'e, Cansu Yol'a, Özce'ye, Penbegül'e, Zehra'ya, Selçuk'a teşekkür ediyorum.

Şu an uzman olarak hayatlarına farklı şehir ve hatta ülkelerde devam eden mükemmel insanlar Atay, Ceyda, Emre, Bilge, Songül, Ertuğrul, Zeynep ve Emel iyi ki varsınız, teşekkür ederim.

Tecrübeleriyle bana en doğru yolu gösteren personel ve teknisyen arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

Aynı şehirde yanımda olamasalar da güzel destekleri için aileme ve özellikle ikizim Ege'ye sonsuz teşekkürler, iyi ki varsınız.

Son teşekkürüm sevgili eşim Tolga'ya,

İyi ki varsın, iyi ki yanımdasın.

Dr. Neslihan Kaya

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
KISALTMALAR.....	V
TABLO LİSTESİ	VI
ŞEKİL LİSTESİ	VII
RESİM LİSTESİ	VIII
GRAFİK LİSTESİ	IX
ÖZET	X
ABSTRACT	XII
1.GİRİŞ.....	1
2.AMAÇ	3
3. GENEL BİLGİLER	4
3.1.SANTRAL SİNİR SİSTEMİ TÜMÖRLERİNİN (SSST) TARİHİ GELİŞİM SÜRECİ. 4	
3.2.GLİAL TÜMÖRLERDE PATOLOGLAR ARASI UYUMSUZLUK	5
3.3.GLİAL TÜMÖRLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ VE DSÖ SSST 2016 SINIFLAMASI	6
3.4. 2016 DSÖ SSST SINIFLAMASINDA HİSTOLOJİK DERECELENDİRMENİN ROLÜ	10
3.5. OLİGODENDROGLİAL TÜMÖRLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ	11
3.6.ASTROSİTİK TÜMÖRLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ.....	12
3.7.İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEMENİN TANIDAKİ YERİ.....	13
3.8. MOLEKÜLER GENETİK DEĞİŞİKLİKLER	14
3.9.GLİOMLARDA ÖNE ÇIKAN GENETİK ÖZELLİKLER.....	16
3.9.1.1p ve 19q kaybı.....	16
3.9.2.TERT (telomerase reverse transcriptase-telomerez ters transkriptaz) Mutasyonu ..	20
3.9.3. TP53 Mutasyonu (p53 Proteini -artmış p53 protein ekspresyonu)	20
3.9.4.İzositrat Dehidrogenaz (IDH) Gen Mutasyonu.....	23
3.9.5.ATRX mutasyonu	27
3.9.6.PDGFR (Trombosit türevi büyüme faktörü reseptörü) Amplifikasyonu.....	29
3.9.7.EGFR Amplifikasyonu	32
3.9.8.BRAF Mutasyonu	32
3.9.9.PTEN Delesyonu	33
3.10.PRATİK PATOLOJİK YAKLAŞIM	33

3.11.GLİAL TÜMÖRLERDE PROGNOZ VE SAĞKALIM.....	34
3.12.FLORESAN İN SİTU HİBRİDİZASYON (FISH).....	36
3.13.PCR YÖNTEMİ	38
3.14.İMMÜNOHİSTOKİMYA YÖNTEMİ	40
4.MATERYAL VE METOD.....	41
4.1.OLGULARIN SEÇİMİ, VERİ TOPLANMASI VE ÇALIŞMANIN DİZAYNI	41
4.2.PCR TEMELLİ DİREK SEKANSLAMA YÖNTEMİ İLE IDH1 VE IDH2 GENİ EKZON 4 MUTASYON ANALİZİ.....	42
4.2.1.DNA Ekstraksiyonu	42
4.2.2.PCR Reaksiyonu	43
4.2.3.Agaroz Jelin Hazırlanması	45
4.2.4.Agaroz Jel Elektroforez İşlemi	45
4.2.5.PCR Ürünlerinin Pürifikasyonu	46
4.2.6.Sekans Analizi	47
4.3.FISH UYGULAMASI VE ANALİZİ (PDGFRA/CEP4)	49
4.4. FISH İLE 1P VE 19Q DEĞERLENDİRİLMESİ.....	53
4.5.İMMÜNOHİSTOKİMYA UYGULAMALARI	54
4.5.1.Histopatolojik değerlendirme.....	54
4.5.2.IDH1, P53, Ki-67 ve ATRX İmmünespresyonlarının Değerlendirilmesi	54
4.6.İSTATİSTİKSEL ANALİZ YÖNTEMLERİ.....	55
5.BULGULAR	57
5.1.VAKALARIN KLİNİK VE HİSTOPATOLOJİK ÖZELLİKLERİ	57
5.2.HİSTOPATOLOJİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ.....	63
5.3.HİSTOPATOLOJİK TANILARA GÖRE VAKALARDAKİ GENETİK DEĞİŞİKLİKLER	69
5.3.1.Histopatolojik olarak OD ve AOD tanısı verilmiş olgular	69
5.3.2.Histopatolojik olarak A ve AA tanısı verilmiş olgular	71
5.3.3.Histopatolojik olarak OA ve AOA tanısı verilmiş olgular	72
5.4.GENETİK DEĞİŞİKLİKLER VE BİRBİRLERİYLE İLİŞKİLERİ.....	73
5.4.1.IDH1 ekspresyonu ve IDH mutasyonu	73
5.4.2.ATRX mutasyonu	74
5.4.3.1p ve 19q kaybı.....	75
5.4.4.p53 protein ekspresyonu	77
5.5.OLGULARIN HİSTOPATOLOJİK DERESESİ İLE GENETİK DEĞİŞİKLİKLER VE Ki-67 İLİŞKİSİ.....	77
5.6.FISH YÖNTEMİYLE UYGULANAN PDGFR- α /CEP4 SONUÇLARI	78

5.7.ENTEĞRE TANILARA GÖRE KLİNİK VERİLER	80
5.8.KLİNİK, İMMÜNOHİSTOKİMYA VE FISH SONUÇLARINA GÖRE PROGNOZ VE SAĞKALIM.....	83
5.9.FISH İLE 1P/19Q KAYIP DEĞERLENDİRMESİNDE ÇALIŞMAYA ÖZGÜ EŞİK DEĞER YÖNTEMİ	89
6.TARTIŞMA	90
7.SONUÇLAR	102
8.CONCLUSION.....	105
9.KAYNAKLAR.....	108



KISALTMALAR

AOA: Anaplastik oligoastroitom

AOD: Anaplastik oligodendrogliom

ATRX: X'e bağlı alfa talasemi ve mental gerilik (alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked)

CEP: Sentromerik numaralandırma probu

DAPI: 4'-6-diamidino-2-fenilindol

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

FISH: Floresans in situ hibridizasyon

GBM: Glioblastom

IDH: İnsan sitozolik NADPH bağımlı izositrat dehidrogenaz

NOS: Tanımlanmamış (not otherwise specified)

OA: Oligoastroitom

OD: Oligodendrogliom

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu (polimerase chain reaction)

PDFGRA: Trombosit türevi büyüme faktörü reseptörü alfa (platelet derived growth factor receptor alpha)

SSS: Santral sinir sistemi

SSST: Santral sinir sistemi tümörleri

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: DSÖ 2007 ve DSÖ 2016 gliyal tümör sınıflamaları.....	7
Tablo 2: Moleküler değişikliklerin prognoz ile ilişkisi.....	35
Tablo 3: Herbir Hedefin Primer Sekansları.....	43
Tablo 4: PCR Reaksiyon Karışımı.....	44
Tablo 5: PCR Koşulları.....	44
Tablo 6: Forward ve reverse okuma için Big Dye reaksiyon karışımı.....	47
Tablo 7: Sekans Analizi İçin PCR Koşulları.....	48
Tablo 8: Olguların klinik ve moleküler özellikleri.....	62
Tablo 9: Çalışmada incelenen genetik değişikliklerin birbirleriyle korelasyonu.....	74
Tablo 10: Entegre tanıya göre immünohistokimyasal ve FISH sonuçları, birbirleriyle olan ilişkileri ve yüzde olarak karşılıkları.....	77
Tablo 11: Entegre tanılara göre sayı, cinsiyet ve yaş dağılımları.....	80

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Gliom oluşum sürecinde ilk aşamada meydana gelen IDH1 değişikliği ve devamında gelişen genetik değişiklikler	15
Şekil 2: IDH'nın hücre içindeki rolü ve tümör oluşumundaki etkisi	23
Şekil 3: Glial tümör oluşumunda PDGFR- α 'nın sinyal yolları	31
Şekil 4: QIAamp DNA FFPE Tissue Protokolü (FFPE: Formalin-Fixed Paraffin-Embedded)	43
Şekil 5: IDH1 ve IDH2 geni ekzon 4 için PCR Ürünlerinin örnek Jel Görüntüsü.....	46
Şekil 6: PCR Ürünlerinin Pürifikasyon Basamakları	47
Şekil 7: Vakaların histopatolojik tanıdan (ilk tanı) entegre tanıya (yeni tanı) değişimlerinin sayısal karşılıkları.....	64

RESİM LİSTESİ

Resim 1: Sanger sekans dizi analizi yöntemiyle saptanan IDH1 ve IDH2 mutasyonlarına ait örnekler.....	49
Resim 2: PDGFR- α /CEP4 FISH çalışmasında görülen sinyallerin fotoğrafları	52
Resim 3: Histopatolojik tanılardan örneklere ait mikroskopik fotoğraflar	61
Resim 4: İmmünohistokimyasal olarak uygulanan genetik değişikliklerin mikroskopik fotoğrafları.....	69
Resim 5: 1p/19q FISH çalışmalarına ait mikroskopik fotoğraflar	76
Resim 6: FISH PDGFR- α /CEP4 çalışması sonucu PDGFR- α amplifikasyon negatif, polizomi negatif saptanan OD tanılı vakaya ait fotoğraf.....	81
Resim 7: FISH PDGFR- α /CEP4 çalışması sonucu düşük seviye polizomi ve yüksek seviye polizomi saptanan AA vakalarına ait fotoğraflar	82

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1: Salt histopatolojik tanıya göre vakaların sayı ve oranları	63
Grafik 2: Entegre (Histopatolojik+Moleküler) tanıya göre vakaların sayı ve oranları	64
Grafik 3: Histopatolojik ve entegre tanı olarak OD tanısı verilmiş vakalarda spesifik moleküler değişikliklerin görülme yüzdeleri.....	70
Grafik 4: Histopatolojik ve entegre tanıyla AOD tanısı verilmiş vakalarda spesifik moleküler değişikliklerin görülme yüzdeleri.....	70
Grafik 5: Histopatolojik ve entegre tanıyla A tanısı verilmiş vakalarda spesifik moleküler değişikliklerin görülme yüzdeleri.....	71
Grafik 6: Histopatolojik ve entegre tanıyla AA tanısı verilmiş vakalarda spesifik moleküler değişikliklerin görülme yüzdeleri.....	72
Grafik 7: Vakaların CEP4 sonuçlarına göre oranları.....	79
Grafik 8: Entegre tanılarına göre sağkalım süreleri.....	84
Grafik 9: Derece ile sağkalım arasındaki ilişki	85
Grafik 10: IDH1 ekspresyonu saptanan ve IDH1 ekspresyonu saptanmayan vakalarda sağkalım	86
Grafik 11: IDH1 ve IDH2 mutasyonu saptanan ve mutasyon saptanmayan vakalarda sağkalım	87
Grafik 12: 1p/19q kaybı olan ve 1p/19 kaybı olmayan vakalarda sağkalım	88

ÖZET

DİFÜZ GLİAL TÜMÖRLERDE HAARLEM ENTEGRE TANI SİSTEMİNİN UYGULANABİLİRLİĞİ VE PDGFR- α AMPLİFİKASYONUNUN NÜKS VE PROGNOZ BELİRTECİ OLARAK YERİ

Amac: Glial tümörlerde genetik incelemeler önemli yer tutmaktadır. Genetik değişikliklerin ışığında tanıya ulaşmak ve prognoz hakkında bilgi verebilmek, hastanın fayda görebileceği tedavi planlarını seçmek için çok önemlidir.

Çalışmamızda 2016 Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) öncesi oligodendrogliom, astrositom ve oligoastrocitom tanısı almış olguların tanımlanan histogenetik özellikleri ile tekrar değerlendirilerek yeni DSÖ sınıflamasına göre kategorize etmek amaçlanmıştır. Ayrıca bu genetik özelliklerin morfoloji ile ne derece uyumlu olduğu, tanısal değeri ve prognostik olup olmadığı da değerlendirilmek istenmiştir.

Materyal ve metod: Çalışmaya alınan histopatolojik olarak derece II ve derece III oligodendrogliom (OD), astrositom (A) ve oligoastrocitom (OA) tanılı 60 vakada güncel sınıflamanın önerdiği moleküler değişikliklerin durumu değerlendirilmiştir. İmmünohistokimyasal olarak IDH1 (R132H), ATRX, p53 ve Ki-67 antikorları uygulanmıştır. IDH1 ekspresyonu saptanmayan ve kontrol amaçlı bazı pozitif vakalara Sanger sekans DNA dizi analizi uygulanmıştır. Sanger sekans analizi ile de mutasyon saptanmayan 2 vakaya Yeni nesil sekanslama yapılmıştır. Floresans in situ hibridizasyon (FISH) yöntemiyle 1p/19q durumu ve PDGFR- α /CEP4 amplifikasyonu değerlendirilmiştir. Mevcut moleküler değişikliklerin diagnostik, prognostik ve prediktif değerleri araştırıldı. Bulguların istatistiksel analizinde, gereksinime göre seçilen testler için SPSS 21.0 istatistik paket programı kullanıldı.

Bulgular: Değerlendirilen 60 olgudan histopatolojik olarak 19'u oligodendrogliom (OD) (%31.6), 10'u anaplastik oligodendrogliom (AOD) (%16.6), 19'u oligoastrocitom (OA) (%31.6), 8'i anaplastik oligoastrocitom (AOA) (%13.3), 2'si astrositom (A) (%3), 2'si anaplastik astrositom (AA) (%3) tanılıydı. Uygulanan moleküler çalışmalar sonucu vakaların 28'inde (%46.6) tanı tamamen değiştirildi. OD/AOD tanılı vakaların 2'sinde (%6.8) ve OA/AOA tanılı vakaların 26'sında (%96.2) tanı tamamen değişti ve vakalar yeniden sınıflandırıldı. A/AA tanılı vakalarda (4 vaka) tanılarda değişiklik yapılmadı. 60 vaka içerisinde sadece 1 vaka AOA tanısında bırakıldı.

IDH1 ekspresyonu saptanamayan vakalarda Sanger sekans analizi ile IDH1 veya IDH2 mutasyonu saptandı. İmmünohistokimyasal olarak uygulanan IDH1 (R132H) primer antikorunun sanıldığı kadar spesifik olmadığı sonucuna varıldı. IDH mutasyonu saptanamayan sadece 3 vaka mevcuttu.

1p/19q kaybı oligodendroglial histopatolojik tanıli vakalarda, ATRX mutasyonu ve p53 ekspresyonu astrositik histopatolojik tanıli vakalarda saptandı.

PDGFR- α /CEP4 amplifikasyonu vakaların hiçbirinde saptanmadı. Vakaların 13'ünde polizomi saptandı. Bu vakalar astrositik tümörler ve yüksek dereceli astrositomlardı.

IDH mutasyonu ve 1p/19q kaybının daha uzun sağkalımla ilişkisi saptandı.

Sonuc: 2014 Haarlem ve 2016 DSÖ Santral Sinir Sistemi (SSST) sınıflaması ile önerilen genetik değişiklikler yardımıyla ara derecedeki (derece II ve derece III) glial tümörlerin daha doğru sınıflanabileceği anlaşıldı. Genetik değişikliklerin diagnostik katkılarının yanısıra prognostik ve prediktif etkileri de saptanmaktadır.

Anahtar kelimeler: Derece II-III glial tümör, DSÖ 2016 SSST sınıflaması, genetik değişiklikler

ABSTRACT

Objectives: Genetic studies have an important role in glial tumors. It is very important to get diagnosis in the light of genetic changes and to give information about the prognosis in order to choose the treatment plans that the patient can benefit.

We aimed to categorize the cases according to the new WHO classification by reconsidering the histologic features of oligodendrogliomas, astrocytomas and oligoastrocytomas. It is also intended to evaluate how well these genetic features are compatible with morphology, diagnostic value, and whether they are prognostic.

Materials and methods: The status of molecular changes proposed by current classifications in 60 cases diagnosed with histologically grade II and grade III oligodendroglioma, astrocytoma and oligoastrocytoma were evaluated. Immunohistochemically, IDH1 (R132H), ATRX, p53 and Ki-67 antibodies were applied. Some positive cases of Sanger sequence DNA analysis with no IDH1 expression and for control purposes were performed. A new generation sequencing was used to generate of 2 cases with no mutation with Sanger sequence analysis. The 1p / 19q status and PDGFR- α / CEP4 amplification were evaluated by FISH. Diagnostic, prognostic and predictive values of the present molecular changes were investigated. In the statistical analysis of the findings, the SPSS 21.0 statistical package program was used for the tests selected according to the requirements.

Results: Histopathologically, there were 19 OD (31.6%), 10 AOD (16.6%), 19 OA (31.6%), 8 AOA (13.3%), 2 (3%), 2 of them were AA (3%). In the molecular studies performed 28 (46.6%) of the end-cases were diagnosed completely. 2 of the cases with OD / AOD (6.8%) and 26 of cases with OA / AOA (96.2%) changed completely and the cases were reclassified. There were no changes in the diagnoses in A / AA cases (4 cases). Only 1 case was left in the same diagnosis AOA in 60 cases.

IDH1 or IDH2 mutation was detected by Sanger sequence analysis in cases where IDH1 expression could not be detected. It was concluded that the immunohistochemically applied IDH1 (R132H) primer antibody is not as specific as expected. There were only 3 cases with no IDH mutation.

At 1p / 19q loss oligodendroglial histopathologically diagnosed cases, ATRX mutation and p53 expression were detected in astrocytic histopathologically diagnosed cases.

PDGFR- α / CEP4 amplification was not detected in any of the cases. Polisomia was detected in 13 of the cases. These cases were astrocytic tumors and high grade astrocytomas.

The association of IDH mutation and 1p / 19q loss with longer survival was detected.

Conclusion: With the help of genetic changes suggested by 2014 Haarlem and 2016 WHST SSST classification, it was understood that intermediate grade (grade II and grade III) glial tumors could be classified more accurately. In addition to the diagnostic contributions of genetic alterations, prognostic and predictive effects are also identified.

Key words: Grade II-III glial tumor, WHO 2016 central nervous system classification, genetic changes



1.GİRİŞ

Glial tümörler en sık görülen primer beyin tümörleridir. Merkezi sinir sisteminin difüz glial tümörleri Dünya Sağlık Örgütü'nce (DSÖ) histolojik görünümüne göre astrositom, oligodendrogliom ve mikst oligoastrositom olarak sınıflandırılmaktadır (1). DSÖ tarafından 2016'da genetik temellere dayanan yeni bir sınıflama yayınlanmıştır. Genetik değişikliklerden 1p/19q ve IDH durumuna göre sınıflama; difüz astrositom (A)- IDH mutant, difüz astrositom-IDH mutant olmayan, difüz astrositom-NOS, anaplastik astrositom (AA)-IDH mutant, anaplastik astrositom- IDH mutant olmayan, anaplastik astrositom-NOS, oligodendrogliom (OD)-IDH mutant ve 1p/19q kayıplı, oligodendrogliom-NOS, anaplastik oligodendrogliom (AOD)-IDH mutant ve 1p/19q kayıplı, anaplastik oligodendrogliom-NOS, oligoastrositom (OA), anaplastik oligoastrositom (AOA) şeklindedir.

OD'ler glial tümörlerin %5-6'sını, tüm beyin tümörlerinin %2.5'ini oluşturmaktadır. DSÖ sınıflamasına göre oligodendrogliom, anaplastik oligodendrogliom, oligoastrositom, anaplastik oligoastrositom gruplarına ayrılmıştır (2). Tanınmasındaki güçlükler göz önünde bulundurularak, glial tümörlerin yaklaşık %30'unda oligodendrogliom komponentinin bulunabileceği belirtilmektedir (1).

Ağırlıklı olarak histomorfolojik özelliklere göre yapılan bu sınıflandırmanın yanı sıra moleküler sitogenetik incelemelerle de bu tümörlerin tanısına ve prognozuna tahminine katkı sağlayacak sonuçlara ulaşılmıştır. Tümör hücrelerindeki 1. kromozom kısa koluna (1p) ve 19. kromozom uzun koluna (19q) yönelik çalışmalar, bu tümörlerde oligodendrogliom fenotipinin 1p kaybı ile ilişkili olduğunu ve 1p'nin allelik kayıplarının kemoterapiye olumlu yanıt için güçlü bir prediktif bulgu olduğunu göstermektedir (3). 1p ve 19q'nun kombine kaybının, klasik oligodendrogliom morfolojisi ve daha iyi prognoz ile yakın ilişki gösterdiği saptanmıştır. Çoğu merkezde rutin olarak uygulanmaya başlanmış ve 2016 DSÖ sınıflandırmasında tanı kriterleri arasında yerini almıştır (3).

Glial tümörlerde IDH1 geninde (insan sitozolik NADPH bağımlı izositrat dehidrogenaz 1) 132. kodon nokta mutasyonları görülebilmektedir. En sık görülen mutasyonu R132H'dir ve bu mutasyonun ürünü IDH1 proteini immünohistokimyasal olarak gösterilebilmektedir. Bu immünohistokimyasal belirteç; DSÖ derece II ve III glial tümörler ile sekonder glioblastomlarda (GBM) yüksek oranda pozitif reaksiyon vermekte olup tanı algoritmasında da yer almaktadır (4). Daha nadir görülen diğer IDH mutasyonu IDH2 olup henüz immünohistokimya için ticari primer antikoru bulunmayan, DNA dizi analizi ile gösterilebilen bir diğer IDH izoformudur. En sık görülen mutasyonu R172W'dur (5).

Astrositomlar glial tümörlerin %10-11'ini oluşturmakta olup derece II difüz astrositom, derece III anaplastik astrositom ve derece IV glioblastom (GBM) olarak isimlendirilmektedir. GBM primer malign beyin tümörlerinin %45-50'sini oluşturmakta olup yetişkinlerde en sık görülen malign beyin tümörüdür (6). Yeni sınıflandırmayla derece II-III astrositik tümörleri OD'den ayıran genetik değişikliklerin p53 ve ATRX mutasyonlarının olduğu bilinmektedir (6). p53 mutasyonu astrositomların tüm derecelerinde %30-50 civarlarında saptanmıştır (7). Alfa-talasemi mental retardasyon sendrom X geni (ATRX) kromozom Xq21.1'de yerleşimli olup H3.3-ATRX-DAXX kromatin yeniden düzenleyici yolağına ait bir proteini kodlamaktadır (8). ATRX mutasyonu 2016 DSÖ sınıflamasındaki tanısal olan moleküler değişiklikler arasında olmamakla beraber, gliomların ayırıcı tanısında kullanılan faydalı bir belirteçtir. Sıklıkla IDH mutasyonu ile beraber bulunması ve 1p/19q kaybı ile birbirlerini dışlamaları tanı için çok yardımcıdır. Ancak prognozu belirlemede diğer moleküler belirteçlerden bağımsız bir rolü olup olmadığı henüz net değildir (9).

Özellikle astrositik yüksek dereceli glial tümörlerin (derece III-IV) patogenezinde rol aldığı düşünülen trombositin türemiş büyüme faktörü reseptörü (platelet derived growth factor receptor - PDGFR) aşırı aktivitesi klinik uygulamalara yön verebilmesiyle dikkat çeken bir diğer inceleme alanıdır. PDGFR yolağında aşırı aktivite saptanmasının henüz glial tümörlerde genel kabul görmüş bir prediktif değeri bulunmasa da, bu genetik değişiklik tanısal ve prognostik açıdan büyük önem taşımaktadır (10).

Oligoastrositik tümörler; 2016 DSÖ sınıflandırmasında çok tartışmalı olarak bırakılmıştır. Birçok araştırmacı var olmadıklarını düşünmektedir. DSÖ 2016 sınıflamasını yazan araştırmacılar bir bölümü sınıflamadan henüz çıkarılmamasını desteklediğinden sınıflamada bırakılmıştır. Ancak çok küçük bir grubu temsil etmektedir. Tüm beyin tümörlerinin %0.9'unu, primer beyin tümörlerinin ise %3.3'ünü oluşturmaktadırlar. Oligodendroglial ve astrositik genetik değişikliklerin bir arada görüldüğü vakalarda tanı oligoastrositom olmaktadır (6).

2.AMAÇ

Gliyal tümörlerde genetik incelemeler önemli yer tutmaktadır. Genetik değişikliklerin ışığında tanıya ulaşmak ve prognoz hakkında bilgi verebilmek, hastanın fayda görebileceği tedavi planlarını seçmek için çok önemlidir.

Çalışmamızda patoloğlar arası tanı uyumsuzlukları yaşanan ara derece (DSÖ derece II-III) difüz infiltratif gliyal tümörlerde, ayırıcı tanıda kullanılabilecek, tanıyı netleştirmeye yardımcı olabileceği düşünülen, rutin uygulamalar ve tanı kriterleri arasında yerini almış olan 1p/19q kombine kaybı ve IDH1 ekspresyon durumları üzerinde durulmuştur. Bunların yanı sıra genellikle 1p/19q kaybı veya IDH1 mutasyonu ile birlikte gözlenmeyen, tersine daha çok yüksek dereceli, astrositik tümörlerde kullanım alanı bulan PDGFR- α amplifikasyonu, ATRX mutasyonu ve p53 ekspresyonu da ayırıcı tanıya katkılarını araştırmak amacıyla çalışmamıza dâhil edilmiştir.

Çalışmamızda 2016 DSÖ öncesi oligodendrogliom, astrositom ve oligoastroitom tanısı almış olguların tanımlanan histogenetik özellikleri ile tekrar değerlendirilerek yeni DSÖ sınıflamasına göre kategorize etmek amaçlanmıştır. Ayrıca bu genetik özelliklerin morfoloji ile ne derece uyumlu olduğu, tanısız değeri ve prognostik olup olmadığı da değerlendirilmek istenmiştir.

Floresans in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi ile 1p/19q kaybı ve PDGFR- α amplifikasyonu gösterilebilmektedir. Çalışmamızda oligodendrogliomlarda FISH yöntemi ile 1p ve 19q kayıpları, yüksek dereceli astrositomlarda PDGFR- α amplifikasyonu, immünohistokimyasal yöntemle IDH1 mutasyon varlığı ve DNA dizi analizi yöntemi ile IDH1 ve IDH2 mutasyon varlığı, immünohistokimyasal yöntem ile ATRX mutasyonu ve p53 ekspresyon varlığı, bunların birbirleriyle ilişkileri ve prognostik olup olmadıkları, diğer parametrelerle ilişkileri incelenmiştir.

3. GENEL BİLGİLER

3.1.SANTRAL SİNİR SİSTEMİ TÜMÖRLERİNİN (SSST) TARİHİ GELİŞİM SÜRECİ

Beyin tümörleri ilk olarak 1829'da Cruveilhier tarafından makroskopik olarak tanımlanmış 1836'da ise Bressler tarafından makroskopik olarak sınıflandırılmıştır. Ancak beyin tümörleri sınıflamasının temelini Virchow atmıştır. 1860'da beynin hücreler arası matriksi olarak nörogliaı tariflemiştir. Yine Virchow tarafından tümörlerin makroskopik ve mikroskopik özellikleri arasında bağlantı kurulması sağlanmış ve "gliom" tarifi de ilk kez yapılmıştır (11).

1926 yılında Bailey ve Cushing ilk kez gliomların sınıflamasını yapmıştır (12). Bu sınıflama 14 tümör tipini içermekte olup sınıflama karmaşıklığı dolayısı ile geniş kabul görmemiştir. Kernohan yirminci yüzyılın ortasında (1949 yılında) yeni ve basit bir sınıflama geliştirmiştir (13). Bu sınıflamaya göre 5 glial tümör kategorisi mevcuttur. Bunlar, astrositom, ependimom, nöroastrositom, medulloblastom ve oligodendrogliomdur. Kernohan bu sınıflama ile birlikte, glial tümörlerdeki 4'lü histolojik derecelendirme sistemini de geliştirmiştir. Derecelendirme anaplazi ve hücrelerin diferansiasyonuna göre yapılmıştır. Ancak 1., 2. derece tümörlerle 3., 4. derece tümörler arasında anlamlı bir biyolojik davranış farkı saptanamaması nedeniyle Ringertz 1950'de 3 dereceli bir derecelendirme sistemi ortaya atmıştır (14). Doumas ve Dupont 1980'lerde şimdi St Anne-Mayo diye bilinen hücre morfolojik özelliklerine dayanan 4 basamaklı bir derece sistemini ileri sürmüştür (15).

İlk olarak 1993'te ise Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflaması yayınlanmış ve beyin tümörleri benignden maligne "derece 1-4" olarak sınıflanmıştır (16). DSÖ Santral Sinir Sistemi Tümörleri (SSST) sınıflaması, tıpkı diğer sistem tümörlerinde olduğu gibi uluslararası standartlarda belirli aralıklarla güncellenen ve tüm dünyada genel olarak kabul gören bir sınıflamadır (17).

1993 DSÖ SSST sınıflaması histopatolojik özellikler yanı sıra tümörlü hastalarda beklenen yaşam süresi verilerine de dayandırılarak derecelendirme sistemini ortaya atmıştır. DSÖ Sınıflamaları 2000 ve 2007 yıllarında güncellenmiştir.

2007 DSÖ SSST sınıflaması ilk olarak beyin tümörlerindeki genetik heterojeniteyi ortaya koyan, pek çok araştırmacının sonuçlarının da en azından bilgi düzeyinde dahil edildiği bir sınıflamadır. Ancak gelişmiş ülkeler dahil birçok ülkenin laboratuvar imkanlarında genetik

özellikleri kanıtlayacak alt yapı olmadığından tümörlerin moleküler- genetik temelleri içeren sınıflama yapma zorunluluğu getirilememiştir (1).

2014 yılına kadarki süreçte sınıflamada en önemli sorun, glial tümör tanılarında gözlemciler arası uyumsuzluk yaşanması ve hatta gözlemcinin aynı tümörü iki kez değerlendirdiğinde farklı yorumlamasıydı (18). Ayrıca son yıllarda OD ve A'nın tamamen farklı tümörler olduğu, sanıldığı gibi aksine birlikte çok çok nadir geliştiğini gösteren çok değerli araştırmalar da yayınlanmıştır (19,20). Bu nedenle 2014 yılında Uluslararası Nöropatoloji Birliği (ISN) Hollanda'nın Haarlem şehrinde bir toplantı düzenlemiştir. Toplantıda DSÖ SSST sınıflamasında ara derecedeki difuz glial tümörler olan astrositomlar, oligodendrogliomlar , oligoastrositomlar çok detaylı olarak tartışılmıştır. Bu tümörlerin histolojik özellikleri yanı sıra moleküler bilgilerin sınıflamaya entegre edilmesinin gerekliliği vurgulanmıştır. Difuz glial tümörlerin genetik özelliklerini ortaya koyan bağımsız farklı araştırmalarda oligoastrositomun var olmadığı kesinlik kazanmıştır (19,21). Bu yeni moleküler verilerin histopatolojik tanıya katkısı yanı sıra prognostik ve prediktif değerlerinin olduğu, böylece sınıflandırma ve derecelendirmeye büyük kolaylık sağlayacağı görüşü kesinleşmiştir. SSST Haarlem entegre sınıflaması önerisinde tümörlerin histolojik sınıflandırma ve derecelendirme sonrasında moleküler çalışmalar yapılması ve moleküler bulgularla birlikte bir entegre tanı verilmesi gerektiği kararı verilmiştir (21).

2016 yılında SSST sınıflaması Haarlem entegre sınıflama kararlarına dayanılarak yenilenmiştir. Haarlem'de vurgulandığı gibi genetik değişikliklerin tanı ve tedavi sürecinde saptanması gerektiği öne sürülmüştür. Böylece klinik olarak da araştırmaların ve epidemiyolojik çalışmaların daha kolay yapılabileceği anlaşılmıştır (22).

3.2.GLİAL TÜMÖRLERDE PATOLOGLAR ARASI UYUMSUZLUK

Histopatolojik tanının ön planda olduğu dönemlerde nöropatologlar arasında tanıda çok büyük bir uyumsuzluk mevcuttu. Yanlış tanı verilme oranları yüksekti ve bunun sonucunda yetersiz ya da agresif tedaviler verilmişti. Hastanın klinik gidişatını değerlendirmek ve tedaviye yanıtı öngörebilmek de çok zordu (23).

Tanı uyumsuzluklarının güzel bir örneği olan "CATNON" çalışmasında 500 beyin tümürlü hastada nöropatologlar arası tanı uyumsuzluğu oranı %42.8 olarak saptanmıştır. Bunların da %8.8'inde ciddi tanı farklılıkları olmuştur. Aldape ve ark. 457 vakalık San

Francisco Yetişkin Gliom Çalışmasında uyumsuz tanı oranı %23 olarak bulunmuştur. Bu vakaların %16'sında hastanın tedavisi ve prognozu etkilenmiştir. Bu çalışmada uyumsuz tanı oranları şehir hastanelerinde %26, üniversite hastanelerinde %12 olarak saptanmıştır. Şehir hastanelerinde nöropatolog olmayışı uyumsuz tanı oranının daha yüksek oluşunu açıklamıştır (18).

Coons ve arkadaşlarının yaptığı prospektif çalışmada 4 patoloğ tarafından 244 vaka ele alınmıştır. İlk bakışta 4 patoloğun aynı tanıyı verme oranları %52 iken , 4 patoloğun da tüm vakaları değerlendirmeleri sonucu bu oran %69'a yükselmiştir (24).

3.3.GLİAL TÜMÖRLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ VE DSÖ SSST 2016 SINIFLAMASI

Gliyal tümörler santral sinir sistemi tümörlerinin büyük ve heterojen bir grubunu oluşturmaktadır. Normal gliyal dokuda astrositler, oligodendrositler ve ependim hücreleri bulunduğundan, bu hücrelerden köken alan tümörler astrositomlar, oligodendrogliomlar ve ependimomlar şeklinde adlandırılmaktadırlar.

Tümörler biyolojik davranışlarına göre histolojik olarak derecelendirilmektedir. DSÖ SSST sınıflamasında dördü derecelendirme sistemi kullanılmaktadır. Derece I tümörler; genellikle çevre dokuları iterek büyüyen (=ekspansif); proliferasyon potansiyelleri düşük, cerrahi eksizyon ile iyileşme olasılıkları bulunan ve başka bir tedavi gerektirmeyen tümörlerdir. Derece II tümörler genellikle difüz olup proliferasyonları düşük düzeyde olmasına rağmen eksizyon sonrası nüks edebilen; derece III tümörler nükleer atipi ve belirgin mitoz gibi histolojik malignite özellikleri içeren, çoğu zaman kemoterapi veya radyoterapi gerektiren tümörlerdir. Derece IV tümörler ise morfolojik olarak malign karakterde, mitozu belirgin, nekroz içeren, eksizyon öncesi ve sonrasında hızlı ilerleme gösteren tümörler olarak tarif edilmektedir (1).

DSÖ 2016 SSST sınıflamasına kadar gliyal tümör sınıflaması histopatolojik temellere dayanmaktaydı. DSÖ 2007 SSST sınıflaması her ne kadar tümörlerin moleküler özelliklerinden bahsetmekte ise de, moleküler değişiklikler tanı kriteri olarak kullanılmamakta idi (Tablo 1) (1).

DSÖ 2007 GLİAL TÜMÖR SINIFLAMASI	DSÖ 2016 GLİAL TÜMÖR SINIFLAMASI
ASTROSİTİK TÜMÖRLER	DİFÜZ ASTROSİTİK VE OLİGODENDROGLİAL TÜMÖRLER
Pilositik astrositom	Difüz astrositom, IDH mutant
Pleomorfik ksantoastrositom	Difüz astrositom, IDH mutant olmayan tip
Difüz astrositom	Difüz astrositom, NOS
Anaplastik astrositom	Anaplastik astrositom, IDH mutant
Glioblastom	Anaplastik astrositom, IDH mutant olmayan tip
Gliomatozis cerebri	Anaplastik astrositom, NOS
	Glioblastom, IDH mutant olmayan tip
OLİGODENDROGLİAL TÜMÖRLER	Glioblastom, IDH mutant
Oligodendrogliom	Glioblastom, NOS
Anaplastik oligodendrogliom	Difüz midline gliom, H3 K27M-mutant
Oligoastrositom	Oligodendrogliom, IDH mutant ve 1p/19q kayıplı (kodelesyonlu)
Anaplastik oligoastrositom	Oligodendrogliom, NOS
	Anaplastik oligodendrogliom, IDH mutant ve 1p/19q kayıplı
	Anaplastik oligodendrogliom, NOS
	Oligoastrositom, NOS
	Anaplastik oligoastrositom, NOS
	DİĞER ASTROSİTİK TÜMÖRLER
	Pilositik astrositom
	Subependimal dev hücreli astrositom
	Pleomorfik ksantoastrositom
	Anaplastik pleomorfik ksantoastrositom

Tablo 1: DSÖ 2007 ve DSÖ 2016 glial tümör sınıflamaları

Moleküler patoloji alanındaki gelişmeler, gerek tanıda, gerek prognoz ve tedaviye yanıtın belirlenmesinde kullanılabilecek birçok moleküler teste imkan sağlamaktadır. Difüz gliomlarda yaygın olarak bulunan moleküler değişiklikler farklı kombinasyonlarda bir araya getirilerek, morfolojinin ötesine geçen birçok alternatif sınıflama sistemi önerilmiştir (9).

Glial tümörlerde yeni sınıflamayla terminoloji de değişmiştir. Entegre sınıflamaya göre histopatolojik isimden sonra genetik özellikler belirtilmiştir. Difüz astrositom, IDH mutant gibi. Eğer tümörde IDH mutasyonu yoksa mutant olmayan terimini kullanmak gerekmektedir. Difüz astrositom, IDH mutant olmayan gibi (23). Ancak hala bazı merkezlerde genetik parametrelere bakılabilecek teknik imkanlar olmadığı için 2016 sınıflamasında “NOS (tanımlanmamış)” olarak adlandırılan bir grup tümöre yer verilmiştir. Gliomda genetik değişiklikler olan moleküler parametrelere bakılmadığında ya da tanıtıcı bir genetik değişiklik saptanamadığında “NOS” tanısı verilmektedir (23). “NOS” spesifik bir tanı verememek anlamına gelmektedir (23).

Yeni DSÖ sınıflamasındaki değişikliklerin önemli bir kısmı difüz glial tümörlerin tanısını ve raporlandırılmasını içermektedir. Erişkinlerdeki en yaygın difüz glial tümör olan glioblastomun tanı kriterlerinde fazla bir değişiklik olmamış, moleküler sınıflandırma yapılmış ve yeni kategoriler eklenmiştir (Epiteloid Glioblastom ve Difüz orta hat gliomu). Düşük dereceli gliomlar (derece II ve III) “oligodendrogliom, IDH-mutant, 1p/19q kayıplı”, “anaplastik oligodendrogliom, IDH-mutant, 1p/19q kayıplı”, “difüz astrositom, IDH-mutant” ve “anaplastik astrositom, IDH-mutant” olarak kesin tanı kriterleri ile tanımlanmış gruplara ayrılmaktadır. IDH mutasyonu göstermeyen (IDH1 ve IDH2 gen sıralamasını takiben) difüz gliomlar, morfolojik özelliklerinden bağımsız olarak, “difüz astrositom, IDH mutant olmayan” ve “anaplastik astrositom, IDH mutant olmayan” şeklindeki geçici antiteler olarak tanımlanmaktadır. Bu tanıların geçerlilikleri gelecek sınıflamalarda tekrar değerlendirilecektir. Antite tanımlayıcı moleküler özelliklerin test edilmediği veya test sonuçlarının belirsiz olduğu vakalar bu dar gruplara dahil edilmemeli ve “tanımlanmamış” (“not otherwise specified”, NOS), olarak sınıflanmalıdır. Her ne kadar yeni sınıflama sisteminin temelinde morfoloji yer almaya devam etmekte ise de, histoloji ile moleküler özellikleri arasında uyumsuzluk olan vakalar moleküler özelliklerine göre sınıflanmaktadır (23).

Bir difüz gliom morfolojik olarak astrositom ile uyumlu olsa bile, IDH mutasyonu ve 1p/19 kaybı varlığında “oligodendrogliom, IDH-mutant, 1p/19q kayıplı” olarak sınıflanmalı ve bu tanıya göre derecelendirilmelidir. Benzer şekilde, bir difüz gliom morfolojik olarak oligodendrogliom ile uyumlu olsa bile, sadece IDH mutasyonu taşıyor ve 1p/19q kaybı bulundurmuyor ise “astrositom, IDH-mutant” olarak sınıflanmalı ve bu tanıya göre derecelendirilmelidir. Bu tümörler sıklıkla ATRX (X’e bağlı alfa talasemi ve mental gerilik, “alpha-thalassemia mental retardation”) ve/veya TP53 gen mutasyonları taşımakta,

immünohistokimyasal boyalarla ATRX kaybı ve/veya p53 ekspresyonu artışı göstermektedirler.

IDH mutasyonunun varlığı tek başına oligodendrogliom ve astrositom arasında ayırım yapmaya yeterli olmamakla beraber, DSÖ her difüz gliom vakasında 1p/19q bakılmasını şart koşmamaktadır. Bu nedenle, astrositom tanısını destekleyici diğer moleküler bulguların (ATRX ve/veya TP53 mutasyonu) olmadığı vakalarda 1p/19q kaybının test edilmesi özellikle önem taşımaktadır.

Önceki sınıflama sisteminin en çok tartışılan grupları olan oligoastrostitom ve anaplastik oligoastrostitom vakalarının büyük kısmı moleküler özelliklerine göre yukarıda geçen dört ana gruptan birine dahil edilebilmektedir. Bu tümörler arasında IDH mutasyonu ve 1p/19q kaybı taşıyanlar, astrositik komponentinin varlığından bağımsız olarak, IDH-mutant 1p/19q kayıplı oligodendrogliom ve anaplastik oligodendrogliom olarak sınıflanmaktadır. Benzer şekilde, IDH mutasyonu olup, 1p/19q kaybı bulunmayanlar, oligodendrositik komponentinin varlığından bağımsız olarak, IDH-mutant difüz ve anaplastik astrositom olarak sınıflanmaktadır. IDH mutasyonu göstermeyen tümörler, IDH1 ve IDH2 gen sıralamasını takiben bir diğer geçici antite olan “difüz gliom, IDH mutant olmayan” olarak sınıflanmaktadır. Bu yaklaşım ile “oligoastrostitom, tanımlanmamış” ve “anaplastik oligoastrostitom, tanımlanmamış” tanıları tipik moleküler değişikliklerin görülmediği ender vakalarla sınırlı kalmaktadır.

DSÖ 2016 SSST sınıflamasıyla nöropatologlar arasındaki subjektif tanı farklılığı ortadan kalkmış ve daha spesifik bir tanı verme olasılığı artmıştır. Özellikle oligoastrostitom tanısı bazı merkezlerde çokça verilen bir tanıyken yeni sınıflamayla oligoastrostitom tanısı azalmıştır (23). Genotipik ve fenotipik bulguların birlikte değerlendirilmesiyle bu tanıdan uzaklaşmış ve oligodendrogliom veya astrositom tanısına gidilmiştir. Hala oligoastrostitom tanısı var olmakla birlikte artık çok nadir saptanmaktadır (6).

Yeni sınıflamayla hem fenotipik hem de genotipik özelliklere bakılması gerekiyorsa yeni bir soru ortaya çıkmaktadır. Histolojiyi dikkate almadan sadece genotipik bulgulara dayanarak glial tümör sınıflaması yapılabilir mi? Şu anki bilgilerle bu mümkün değildir. Tümördeki spesifik genetik değişiklikleri saptayabilmek için öncelikle histolojik sınıflandırmayı doğru yapmak gerekmektedir. DSÖ sınıflamasına göre de derecelendirme hala histolojik kriterlere göre yapılmaktadır. Diğer bir neden de genotipik olarak tam karşılığını bulmayan tümörler hala mevcuttur (6).

3.4. 2016 DSÖ SSST SINIFLAMASINDA HİSTOLOJİK DERECELENDİRMEİNİN ROLÜ

Santral sinir sistemi (SSS) tümörlerinin derecelendirmesi diğer solid organ tümörlerinin derecelendirmesinden farklı olarak, tüm SSS tümörlerine bir bütün olarak uygulanan ve her bir tümörden beklenen klinik sonucu da işaret eden bir sistemle yapılmaktadır. Son DSÖ sınıflaması birçok yenilik içermekle beraber gliomların derecelendirmesindeki geleneksel yaklaşımı korumakta, her özgün tanı antitesi kendine ait bir DSÖ derecesine karşılık gelmektedir. GBM tanısına astrositik morfoloji gösteren bir tümörde mikrovasküler proliferasyon ve/veya nekroz saptanması ile ulaşılmaktadır (6). IDH mutant olan ve olmayan düşük dereceli astrositomların derecelendirmesi anlamlı miktarda mitoz saptanmasına dayanmaktadır. Bu tanım muğlaklığını korumakta ve gerekli mitoz sayısı için net bir mitoz eşiği verilmemektedir. Ancak yeterli büyüklükteki bir kesitte tek bir mitoz bulunması anaplastik astrositom tanısı için yeterli görülmemekte, en az 2 yada daha fazla mitoz gereklidir denilmektedir. En önemlisi, önceki sınıflama sisteminden alınan bu kriterin yeni entegre sınıflama sisteminde de geçerli olduğunu gösteren bir çalışma mevcut değildir. Tam tersine, bir çalışmaya göre derece II Difüz Astrositom-IDH mutant ile derece III Anaplastik Astrositom-IDH mutant arasında sağ kalım açısından bir fark gözlenmemiştir (25).

Son sınıflamaya göre anaplastik astrositom-IDH mutant olmayan, DSÖ SSST 2016'ya göre derece III olarak kabul edilmesine karşın, daha önceki birkaç araştırma bu tümörün klinik seyrinin glioblastoma benzer olduğunu göstermiştir (26).

Tüm bu nedenlerle IDH mutant olmayan derece II ve III Astrositomlar geçici antiteler olarak kabul edilmekte ve gelecek sınıflamalarda daha doğru ve tutarlı tanı ve derecelendirme hedeflenmektedir. Oligodendrogial morfoloji gösteren, IDH mutant ve 1p/19q kayıplı gliomlar mitozda belirgin artış ve/veya mikrovasküler proliferasyon varlığında anaplastik olarak derecelendirilmektedir (6).

DSÖ mitoz eşiği için kesin bir sayı vermezken, genel olarak kabul gören sayı yüksek büyütmede ardışık 10 alanda 6 ve üzerinde mitoz izlenmesidir. Nekroz varlığı derece IV GBM'lerde görülmekte olup derece II ve III glial tümörlerde olmayışı önemli bir derecelendirme belirteçidir. Astrositomlarda olduğu gibi, hali hazırda mevcut derecelendirme sisteminin, entegre DSÖ sınıflamasını takiben uygulandığında klinik sonuçların belirlenmesinde faydalı olduğunu gösteren herhangi bir çalışma mevcut değildir. Aksine, bir çalışmada IDH-mutant 1p/19q kayıplı oligodendrogliomların derece II ve III olarak ayrılmasının prognostik bir ayırım sağlamadığı gösterilmiştir (27).

Dereceyi belirlemede en sık kullanılan Ki67 antikoru ile boyanma oranı da derece ile doğru orantılıdır; derece II'de %1-6, derece III'te ise %5-20 üzeri bir oran beklenmektedir (2).

3.5. OLİGODENDROGLİAL TÜMÖRLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ

İlk olarak 1926 yılında tanımlanmış olan OD, tüm beyin tümörlerinin yaklaşık %1,7'sini, tüm glial tümörlerin ise %5,9'unu oluşturmaktadır (12). İnsidansı son yıllarda artış göstermiştir. OD tipik olarak genç-orta yaşlı erişkinlerde görülmektedir. En sık 35-45 yaşlar arasında izlenmektedir. Çocuklarda çok nadir olup tüm beyin tümörleri içinde %0,8 oranında görülmektedir. Diğer difüz gliomlarda olduğu gibi hafif bir erkek predominansı izlenmektedir (1.3:1). En çok lokalize olduğu yer frontal lobtur (6).

OD'ler histopatolojik olarak üniform yuvarlak nükleuslu, parafin kesitlerde perinükleer halolu, monomorfik hücrelerden oluşan, orta derecede hücreliliğe sahip difüz infiltratif glial tümörler olarak tarif edilmektedir. Dallanan kapillerlerden oluşan belirgin damar ağı, mikrokalsifikasyon ve mukoid kistik dejenerasyon da ek özellikleri arasındadır. OD'de "klasik morfoloji" tanımı; tümör hücrelerinin monoton, yuvarlak çekirdekli olduğu; ince, dallanan vasküler çatıya sahip; mikrokalsifikasyonların izlenebildiği durumlar için kullanılmaktadır (3). Güncel sınıflamaya OD'ler; OD IDH mutant, 1p/19q kayıplı, OD NOS, AOD-IDH mutant, 1p/19q kayıplı ve AOD-NOS olarak incelenmektedir (6).

OD'lerde tanıtıcı genetik değişiklikler IDH mutasyonu ve 1p/19q kaybıdır. Oligodendrogliyal histoloji ve 1p/19q kaybı arasındaki ilişki ilk olarak 1994 ve 1995 yıllarında yayınlanmıştır (28). Sonrasında 2008 ve 2009 yıllarında IDH mutasyonu ile ilişki de gösterilmiştir (29). IDH mutasyonu taşımayan OD'ler IDH mutant olmayan OD, 1p/19q kaybı olmayan OD'ler de 1p/19q intakt OD olarak tanımlanmaktadır (6).

OD NOS tanısı çok küçük bir grup oligodendrogliomu içermektedir. Tümörde oligodendrogliyal histoloji, IDH mutasyon varlığı olmasına rağmen 1p/19q kaybı başarılı bir şekilde test edilemediyse ya da moleküler çalışma imkanı olmadıysa tanı OD NOS olmaktadır (6).

Histopatolojik olarak AOD düşünülen vakada eğer tanıtıcı genetik sonuçlar yoksa altta yatan GBM olasılığı akılda tutulmalıdır. Histolojik olarak benzer özellikler gösteren Piloitik Astrositom, Disembriyoplastik Nöroepitelyal Tümör ve Berrak Hücreli Ependimom da ayırıcı tanı için alınmalıdır (23). Oligodendrogliyal tümörlerin astrositomlara görece daha spesifik bir histolojik görünümü olduğu için 1990'ların sonlarına doğru oligodendrogliyal tümör tanısı giderek yükselmiştir. Ancak 1p/19q kaybının tanıdaki yeri gösterildikten sonra hem

oligodendroglial tümör tanısı doğru verilmiş hem de kaybın terapötik etkisi gösterilmiştir (28).

3.6.ASTROSİTİK TÜMÖRLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Astrositomlar normal beyin dokusuna göre artmış hücresel aktivite gösteren ve hafif, orta veya ağır derecede nükleer pleomorfizm gösteren tümörlerdir. Astrositik tümörlerde derecelendirme; DSÖ tanımlamasına göre yalnızca histolojik atipi içeren tümörler derece II Difüz Astrositom, buna ek olarak anaplazi ve mitotik aktivite gösteren tümörler derece III Anaplastik Astrositom, bunlarla birlikte mikrovasküler proliferasyon ve nekroz izlenen tümörler ise derece IV Glioblastom olarak tanımlanmıştır (6).

Astrositik tümörlerin, oligodendroglial tümörler gibi en çok lokalize oldukları yer frontal lobtur. Tüm astrositik beyin tümörlerinin %11-15'ini difüz astrositom oluşturmaktadır (30). Erkeklerde daha sık görülmekte olup erkek kadın oranı 1.3:1'dir (31). Derece II Difüz astrositomlar derece III Anaplastik astrositomlara göre daha genç yaşta görülmektedir ve yaşam süreleri daha uzundur (25).

AA'lar tüm astrositik tümörlerin yaklaşık %10'unu oluşturmakta olup ortalama yaş 38'dir. Erkek kadın oranı 1.6:1'dir (32).

GBM'ler intrakranial neoplazilerin % 15'ini , primer malign beyin tümörlerinin % 45-50'sini oluşturmaktadır. Yetişkinlerde en sık görülen malign beyin tümörüdür. Hastalar genelde 55-85 yaş aralığındadır ve erkek kadın oranı 1.6:1'dir (6).

Astrositomlar histopatolojik olarak ince ve kalın çok sayıda hücre uzantıları olan rasgele dağılmış hücrelerden oluşur. Hücreler normal fibriler astrositlerden daha büyük, düzensiz-angüler, kaba ve hiperkromatik çekirdekli hücrelerdir. Güçlü GFAP immunoreaktivitesi gösterirler. Kan damarlarında endotel belirginliği görülmez ya da minimal olur.

Güncel sınıflama ile Astrositomlar; A-IDH mutant, A-IDH mutant olmayan, A-NOS, AA-IDH mutant, AA-IDH mutant olmayan ve AA-NOS olarak incelenmiştir (6).

Fenotipik olarak astrositomlarda tipik olarak beklenen genetik değişiklikler IDH mutasyonu, p53 mutasyonu ve ATRX mutasyonudur. IDH mutasyonu taşımayan astrositomlar IDH mutant olmayan astrositom olarak tanımlanmaktadır (6).

Morfolojik olarak oligodendrogliom benzeri alanlar içeren glial tümörle karşı karşıya kalınırsa 1p/19q kaybının olmayışı astrositom tanısını desteklemektedir (6).

Gliomlar içinde tekrarlama ve malignleşme eğilimi en çok olan grup astrositik tümörlerdir. Malign astrositik tümörler, özellikle GBM, en öldürücü intrakranial tümörlerdir.

Cerrahi rezeksiyon, radyoterapi ve kemoterapiye rağmen çoğu astrositik tümör hızlıca büyür , derecesi yükselir ve hastanın ölümüyle sonuçlanır (33). Prognoz, tanı anındaki yaşa, klinik duruma, tümörün rezeksiyon genişliğine, histolojik tipine, tümör derecesine ve IDH mutasyonu gibi bazı moleküler belirteçlere bağlıdır (34).

A ve AA'ların büyük bir bölümü doğal seyirlerine bırakılacak olur ise Glioblastoma kadar progrese olabilirler.

3.7.İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEMENİN TANIDAKİ YERİ

Glial tümörlerin tanısında, bulguların iki farklı tümör sınıfı arasında net bir yere oturtulamadığı bazı "gri bölge"ler bulunmaktadır. Bazı öznel kriterler patoloğlar arasında farklı yorumlanabilmektedir. Anaplaziyi işaret eden ve dereceyi yükselten artmış hücresellik, nükleer atipi, pleomorfizm ve mitotik aktivite bu kriterler arasındadır (6).

Bugüne kadar gliomların tanı ve derecelendirmesindeki altın standart histopatolojik özellikler olarak kabul edilmiştir (hücresellik, artmış mitoz, vasküler endotelial proliferasyon ve nekroz). Bununla beraber gliomların histolojik sınıflaması gözlemciler arasında belirgin farklılıklar içerebilmektedir. Ayrıca, birçok tümör klinikte çok farklı davranışlar sergileyebilmektedir. Daha iyi bir öngörü ve uygun bir tedavi planlaması için daha ileri ve objektif bir sınıflamaya duyulan ihtiyaçla, gliomlardaki genetik değişiklikleri ortaya koyan bilgiler son yıllarda hızla artmıştır (6,23). Bu çalışmalar sayesinde gliomlardaki epigenetik, genetik ve moleküler değişiklikler hakkında daha çok bilgiye sahip hale gelinmiştir. Böylece hedefe yönelik tedavi araştırmalarının ilerlemesi de sağlanmıştır (35).

Yapılan çalışmalarda nöropatoloğlar arasında glial tümör değerlendirmesinde tanı uyumsuzluklarının olduğu görülmüştür (2). Bu durum göz önüne alındığında, tanıyı netleştirebilmek adına histomorfolojinin yanı sıra yardımcı tanı yöntemlerine de ihtiyaç duyulmuştur. Yaygın bir şekilde kullanılan immünohistokimya ile giderek yaygınlaşmakta olan ve pek çok gelişmiş merkezde rutin kullanılan in situ hibridizasyon bu yardımcı yöntemlerin başında gelmektedir. Genetik değişiklikleri göstermede immünohistokimya uygulamaları tanıya gitmede yardımcı, uygun fiyatlı, sağlam ve yaygın kullanılan bir yöntemdir (36) .

İmmünohistokimyasal olarak uygulanan Olig2 antikorunun başlangıçta oligodendroglial hücreler ve tümörlere spesifik olduğu düşünülmüş, tanıya ulaşmada faydalı olabileceği saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda Olig2 antikorunun oligodendroglial seriye özgün olmadığı,

astroitik tümörlerde de pozitif reaksiyon verdiği gözlenmiştir (37). Günümüzde Olig2, iyi bir glial hücre işaretçisi olarak kullanım yeri bulmuştur (37).

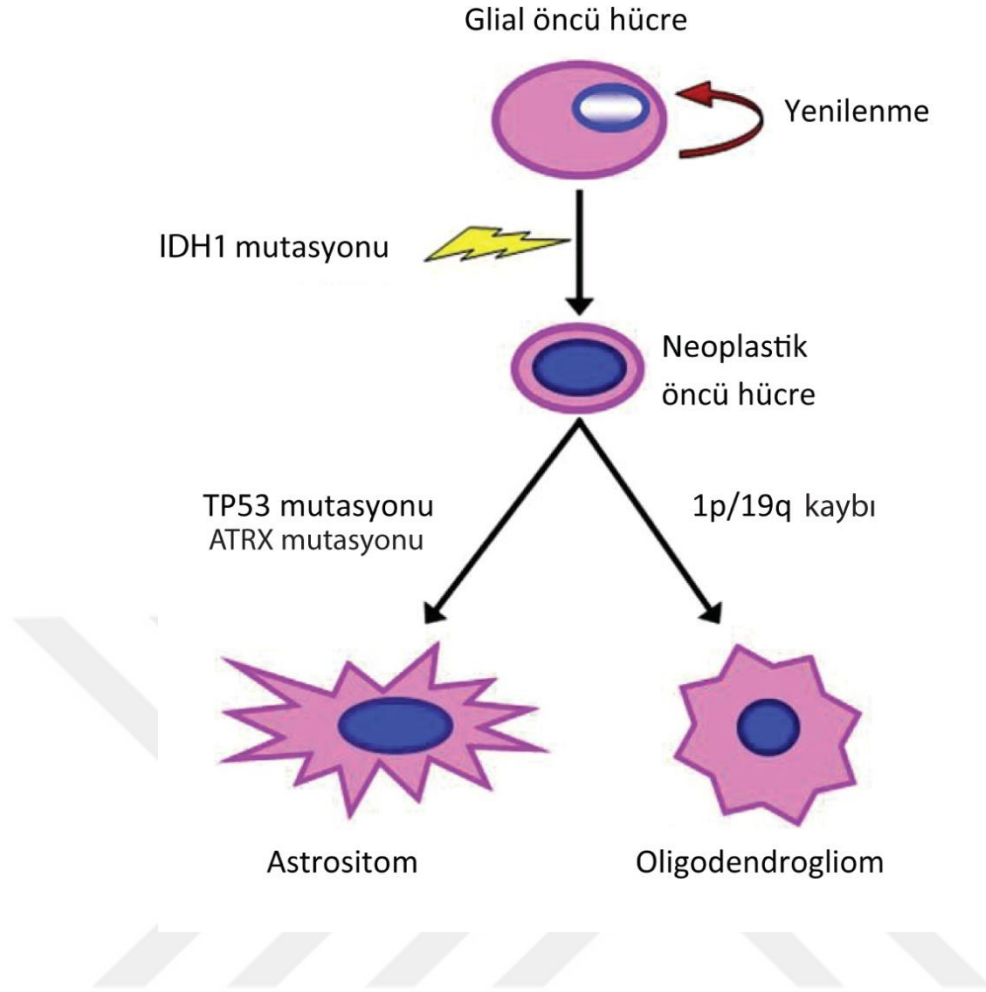
Oligodendroglial tümörlerin ayırıcı tanısında yeri olan başlıca immünohistokimyasal belirteçler S-100 proteini, nörofilament, p53 proteini, olig2 ve sox2 (sex determining region Y-box 2)'dir. Sox2 bir transkripsiyon faktörüdür, farklılaşmış hücreleri yeniden programlama yeteneğine sahiptir. Özellikle GBM ve derece III gliomlar olmak üzere çeşitli kanserlerde aşırı eksprese edilmektedir (38).

Klasik OD hücrelerinin GFAP (-) olması astrositomdan ayırmada faydalı olabilmektedir, ancak rutinde astrositomla ayırmada kullanılamamaktadır. OD'de tümör hücreleri S-100 proteini ile de genellikle pozitif reaksiyon vermektedir. Nörofilament tümör hücrelerinin arasında kalmış aksonal uzantıları boyayarak infiltratif paterni belirgin kılmaktadır (2).

Son sınıflama ile vurgulanan, kombine immünohistokimyasal IDH1/2, ATRX, p53 ve Ki-67 indeksi derece II ve III gliomların tanısında ve prognozunu belirlemede en kullanışlı immünohistokimyasal moleküler yöntemlerdir (36).

3.8. MOLEKÜLER GENETİK DEĞİŞİKLİKLER

Gliomların büyük olasılıkla glial kök hücreden köken aldığı düşünülmektedir. Son dönemde gliom gelişim sürecinde çeşitli moleküler mekanizmaların ve sinyal yollarının da etkili olduğu gösterilmiştir. Bilinen tedavi yöntemlerinin, benzer histomorfolojik özelliğe sahip olsa bile, bazı hastalarda iyi sonuçlar verirken bazılarında etkili olmaması da gliom hücrelerinin fonksiyonel heterojeniteye sahip olduğunun bir kanıtıdır. En fazla sayıda genetik çeşitlilik ise yüksek dereceli gliomlarda saptanmaktadır. Ancak gliomların hücrel orijini henüz net olarak bilinmemektedir. Edinilen bilgiler ışığında patogeneze sorumlu hücrelerin astrositler, nöronal kök hücreler, bipotansiyel prekürsör hücreler ve oligodendroglial prekürsör hücreler olabileceği varsayılmaktadır (39). Glial hücrelerin gliom hücreleriyle histomorfolojik olarak benzerlik göstermeleri ve bu benzerliğin immünohistokimya boyalarıyla desteklenmiş olması, gliomagenezde ortaya atılan ilk teoridir. İlerleyen yıllarda glial kök hücrelerin ve progenitör hücrelerin keşfedilmesiyle birlikte araştırmalar bu yönde yoğunlaşmıştır (39).



Şekil 1: Gliom oluşum sürecinde ilk aşamada meydana gelen IDH1 değişikliği ve devamında gelişen genetik değişiklikler (Atay Uludokumacı'nın tezinden izniyle alınmıştır)

Gliomlarda şu ana kadar tanımlanan en temel mutasyonlar TP53 mutasyonunun çeşitli kombinasyonları, ATRX mutasyonu, EGFR amplifikasyonu, IDH1 ve IDH2 mutasyonu, 1p/19q kaybı, PTEN delesyonu, BRAF mutasyonu sayılmaktadır (Şekil 1) (6).

Derece II ve III astrositik, oligodendroglial ve oligoastroitik gliomlar ve sekonder GBM'lerde sıklıkla IDH1 ve IDH2 genlerinde mutasyon izlenmektedir. Bu veriye dayanarak bu tümörlerin ortak ancak henüz tanımlanmamış bir progenitör hücreden kaynaklanabileceği söylenebilmektedir (5).

Astrositomlar için IDH, p53 ve ATRX mutasyonunun, oligodendrogliomlar için ise IDH mutasyonu, 1p ve 19q kaybının spesifik olduğu vurgulanmıştır (6,23). 1p/19q kaybı gliomagenezde IDH'dan sonra ilk olarak tanımlanan moleküler değişiklik olmuştur. Bu aşamadan sonra gelişen, daha sonra ayrıntılı olarak bahsedilecek olan bir takım genetik değişiklikler ile tümörlerde progresyon meydana gelmektedir. Bu genetik değişiklikler,

tümörlere hücre siklus kontrol kaybı, klonal genişleme, invazyon ve anjiogenez yetenekleri kazandırarak malign progresyon gelişimini sağlamaktadır. Difüz gliomlar öncelikle düşük dereceli maligniteler olarak gelişmekte ve genetik değişiklikler sayesinde neredeyse tamamı yüksek dereceli (anaplastik) maligniteye progresyon göstermektedir (6).

3.9.GLIOMLARDA ÖNE ÇIKAN GENETİK ÖZELLİKLER

Gliomlarda genetik özelliklerin tanısal, prognostik ve prediktif anlamları üzerine yapılan araştırmalarda pratik uygulamalarda da yer bulan önemli sonuçlara ulaşılmıştır. Çalışmamızda konu edilen kromozom kayıpları ve gen mutasyonlarının saptanmasının, tanı doğruluğunu artırabileceği ve hastaların daha etkili tedavi almasının önünü açabileceği bildirilmektedir (40).

3.9.1.1p ve 19q kaybı

1. kromozomun kısa kolu (1p) ve 19.kromozomun uzun kolu (19q)'unda bulunan, bir kısmı net olarak tanımlanmış, ancak büyük bir kısmı henüz tam olarak tanımlanamamış olan bazı tümör baskılayıcı genlerde kayıp (LOH-heterozigosite kaybı), glial tümörlerde genetik yolakta, özellikle de oligodendrogliomlarda tümorogenezden sorumlu en önemli genetik değişiklik olarak bilinmektedir. Vakaların büyük bir kısmında 1p ve 19q'da LOH'unun birlikte bulunduğu izlenmiş, bu durum bu bölgelerdeki tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonunun oligodendrogliom onkogenezinde temel rol oynadığını düşündürmüştür (41).

Oligodendrogliomda sık görülen 1p ve 19q heterozigosite kaybı bu kromozom kollarının henüz bilinmeyen, bu tümörlerin gelişiminde önemli rol oynayan bir tümör süpresör geni taşıdığını bize göstermektedir (41).

1p ve 19q'nun heterozigositik kaybı telomerik, interstisyel, sentromerik veya tüm kromozom kolunda olabilmektedir. Bu farklı paternlerin tümör tipleriyle, diğer moleküler belirteçlerle bağlantısı ve hasta prognozuna etkisi belli değildir. 1p kolundaki kayıpla 19q kolundaki kayıp %90 birbiriyle ilişkili bulunmuştur (17).

Glial tümörlerde 19q kaybını inceleyen çalışmalar 1991'de Ransom, 1992'de von Deimling tarafından yayınlanmıştır. Bu çalışmalarını 1994'te Reifenberger'in 19q'nun yanı sıra 1p delesyonunu da gündeme getiren çalışması izlemiştir (28). Zaman içinde rutin uygulamalarda da kendine yer bulan bu genetik değişiklikler DSÖ SSST 2016 sınıflamasında tümörlerin histomorfolojik özellikleri ile birlikte tanı kriterleri arasında yer almıştır (3).

OD'lerde 19q'nun allellik kaybı yaklaşık %50-80 olguda gözlenmektedir. 19q kayıp insidansı, düşük ya da yüksek dereceli OD'ler arasında farklı değildir. Bu durum 19q kaybının OD'lerde erken genetik değişiklik olduğunu düşündürmektedir. Olguların çoğunda 19q' daki LOH' un parsiyel olduğu bilinmektedir (42). Astrositomlarda ise 19q LOH yalnızca yüksek dereceli tümörlerde gözlenmektedir (43).

1p LOH OD olgularının %40-90'ında saptanmaktadır ve genellikle parsiyel kayıp şeklindedir (44,45). Kromozom 1p kaybının oligodendroglial fenotipe özgü bir değişiklik olduğu ve hem düşük dereceli hem de anaplastik oligodendroglionlarda tek başına iyi prognostik ve prediktif bir belirteç olduğu 1994 yılından beri yapılan çok sayıda çalışma ile kanıtlanmıştır (46).

Sonraki yıllarda kromozom 1p kaybı ile kromozom 19q kaybının birlikte değerlendirilmesinin oligodendroglionlarda daha kuvvetli bir prognostik belirteç olduğu anlaşılmıştır (17).

OD'ler dışında diğer glial tümörlerde 1p kolunda parsiyel kayıp daha sık GBM'lerde, 19q kolunda parsiyel kayıp daha çok AA'larda görülmektedir. 1p kolunda parsiyel kayıp kötü prognozla ilişkili, 1p kolunun tümünde kayıp ise OD'de iyi prognozla ilişkili bulunmuştur (17).

Yapılan başka çalışmalarda glial tümörlerde 1p kaybı görülme oranı %56-%76; 19q kaybı görülme oranı %56-%87.5 olarak verilmekte; yalnızca 1p kaybı %0-%3.8; yalnızca 19q kaybı %0, %4.7 ve %19 oranlarında bildirilmektedir (28). 19q kaybı oranlarının 1p kaybına göre yüksek oluşu nedeniyle 19q kaybının 1p kaybı öncesinde olduğu düşünülmektedir (45).

Moleküler sitogenetik çalışmalarda kromozom 1p ve 19q'daki kombine kaybın, OD (%80) ve AOD'de (%60), diğer primer beyin tümörlerinden anlamlı olarak daha sık oranda görüldüğü ve oligodendroglion patogenezinde erken bir genetik değişiklik olduğu belirtilmektedir (1,28).

Kromozom 1p/19q kombine kaybı ile klasik oligodendroglial histolojik özellikler (perinükleer halo, tavuk kümes teli şeklinde vasküler patern) arasında kuvvetli bir korelasyon vardır ancak tümör histomorfolojisi tek başına 1p/19q durumunu öngörememektedir (40).

2016 DSÖ sınıflamasına göre erişkin tipi OD ve AOD tanısı için test edilmesi ve kombine kaybın saptanması mutlaka gerekmektedir (6).

Oligodendroglial tümörlerde 1p/19q kaybıyla ilişkisi gösterilmiş iki tümör süpresör gende inaktive mutasyonlar tanımlanmıştır. *Drosophila capicua* (CIC) ve farupstream binding protein 1 (FUBP1) homologu isimleriyle bilinen genlerdeki mutasyonlar OD'lerde sırasıyla % 53 ve % 15 oranında görülmektedir (47).

CIC, 19q kolu üzerinde bulunur ve FUBP1 1p kol üzerinde bulunmaktadır. 1p/19q kaybının CIC ve FUBP1'i etkisiz hale getiren bir mekanizması olduğu düşünülmektedir (48).

1p/19q kaybı oligodendroglial tümörleri gösteren bir genetik belirteç olmasına karşın geçmişte astrositik gliomlarda da saptanmıştır (17).

1p/19q kayıplı tümörler, ikincil glioblastom ve düşük dereceli astrositomlarda sıklıkla görülen TP53 ve ATRX mutasyonlarını ve primer glioblastomlarda yaygın olan epidermal büyüme faktörü reseptörü ('Epidermal Growth Factor Receptor'- EGFR) amplifikasyonunu taşımazlar. Böylece astrositik tümörlerden ayırımı kolayca yapılabilmektedir (9,49).

1p ve 19q kaybı immünohistokimya ile saptanamamaktadır (36). 1p ve 19q kromozom kollarındaki eş zamanlı kayıp aralarında sitogenetik analiz, tek nükleotid polimorfizmi analizi, dizin karşılaştırmalı genomik hibridizasyon ('array comparative genomic hybridization', aCGH), polimeraz zincir reaksiyonuna dayanan ('polimeraz zincir reaksiyonu'-PCR) heterozigozite kaybı ('Loss of heterozygosity'- LOH) ve floresans in situ hibridizasyon (FISH) yöntemlerinin de bulunduğu birçok yöntem ile tespit edilebilmekte, tercih edilen yöntem çoğunlukla laboratuvarın alt yapısına dayalı olarak seçilmektedir. Sıklıkla FISH ve PCR (mikrosatellit heterozigozite kaybı) yöntemleri kullanılmaktadır. Bu iki yöntem arasındaki uyum OD'lerde %81 olarak bildirilmiştir (50).

Sadece iki boyanmamış kesite ihtiyaç duyulması ve 60 ile 100 tümöral hücrenin yeterli olması sayesinde FISH oldukça küçük biyopsi materyallerine bile başarı ile uygulanabilmektedir. 1p ve 19q kromozom kollarının subtelomerik bölgelerini (1p36/1q25 ve 19p13/19q13) tanıyan ve piyasalarda yaygınca bulunan çift renkli işaretleyiciler ile yapılmaktadır. Genel olarak 1p ve 19q kollarının tamamının kaybını belirlemede duyarlı bir test olmasına rağmen, geniş kısmi kayıplarda yalancı-pozitif sonuçlar verebilmektedir (50). Çünkü günümüzde kullanılan çift renkli probler sentromerden uzak bölgeyi incelemektedir. Özellikle 1p kromozom kolu çok uzun yapıya sahip olduğu için tamamını incelemek FISH yöntemi ile mümkün olmamaktadır.

Değerlendirmede bir başka problem de eşik değer sorunudur. Çalışmalarda verilen eşik değerlere göre sinyal sayımında 1p/19q'da %75-80'ten fazla kayıp varsa veya kayıp hücrelerin %30'undan fazlasında hücrede görüldüyse kayıp mevcut denilmektedir (50).

FISH, yanlış pozitif sonuç riskine sahip olsa da 1p/19q kaybını saptamak için, çoğu laboratuvar da rutin test olarak kullanılabilirdiği için, en başarılı yöntemdir. Yanlış pozitif sonuç verme olasılığı günlük deneyimde çok sık karşılaşılan bir durum değildir, ancak yüksek dereceli gliomlarda yanlış pozitiflikler görülebilmektedir (50).

Kullanımı daha zor olan yöntemlerden, heterozigosite kaybı analizi, karşılaştırma amaçlı referans normal doku gerektirmesi dezavantajına sahip olmakla beraber, 1p ve 19q kromozom kollarının tamamının değerlendirilmesine imkan tanımakta, kaybın gerçekten tüm kolu etkileyip etkilemediğini gösterebilmektedir. Kullanımı daha az yaygın ve FFPE (Formaline fixed parafine embedded-formolle fikse parafine gömülü doku) doku örneklerinde standardizasyonu daha zor olan karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH) (comparative genomic hybridization) yöntemi ise tüm kromozomların eş zamanlı değerlendirilmesine imkan tanımaktadır. Bir tümörde, 1p/19q sonuçları ile diğer moleküler değişiklikler arasında uyumsuzluk olduğunda (örneğin 1p/19q kaybı olan bir tümörde eş zamanlı ATRX mutasyonu veya EGFR amplifikasyonu saptanması gibi), 1p/19q sonuçlarının daha özgün alternatif bir yöntem ile kontrol edilmesini düşünmek gerekmektedir.

Kromozom 1p/19q kombine kaybının AOD'li hastalarda kemoterapiye yanıtta prediktif ve daha uzun sağkalımda etkili bir pozitif prognostik faktör olduğu ilk defa 1998'de Cairncross ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır (44). Daha sonra yapılan çalışmalar ile, kromozom 1p/19q kombine kaybının kemoterapiye yanıt, sağkalım ve nüks göz önüne alındığında iyi prognozla ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (51). Bu çalışmalardan ikisi prospektif, randomize faz III çalışmalardır ve bu çalışmaların sonucunda 1p/19q kaybının DSÖ derece III gliomlu hastalarda güçlü bir prognostik belirteç olduğu belirtilmektedir. Aynı zamanda, bu çalışmalarda 1p/19q kaybının prognostik gücünün adjuvan tedavi tipinden (radyoterapi, kemoterapi, kombine radyo-kemoterapi) bağımsız olduğu saptanmıştır (40).

Derece II gliomları içeren çalışmalarda 1p/19q kaybı gösteren vakaların erken kemoterapi/radyoterapi tedavisine daha iyi sonuç verdiği, ancak bu moleküler değişikliğin sağ kalım üzerinde tedaviden bağımsız bir etkisinin olmadığı yayınlanmıştır (52).

Farklı olarak van den Bent ve ark. çalışmasında ise derece III AOD ile ilerleme gösteren derece II A'ların dahil olduğu geniş çaplı klinik çalışmalar, 1p/19q kayıplı tümörlerin adjuvan tedaviye daha iyi yanıt verdiklerini ve bu hastalarda genel ve hastaliksız sağ kalımda iyileşme olduğunu belirtmektedir (53).

Tümörün OA ya da OD olarak tanı alması 1p/19q kaybının prognostik ve prediktif değerini değiştirmemektedir (20). Astrositik tümörlerde ise vaka sayısındaki azlık nedeniyle prognostik ve prediktif değerinin varlığı belirsizdir (54).

1p/19q kaybı olan hastaların yaklaşık %87'sinde ölüm riski düşükken, kayıp olmayan hastalarda her sene artan yaşla birlikte ölüm riski yükselmektedir (55).

Sağkalım değerlendirilecek olursa 1p/19q kaybı olan tümörlerde yaklaşık 7 yıllık yaşam saptanmışken 1p/19q kaybı olmayan tümörlerde sağkalım süresi 2.8 yıl bulunmuştur (55).

3.9.2.TERT (telomerase reverse transcriptase-telomeraz ters transkriptaz) Mutasyonu

Telomeraz, RNA'ya bağılı, TERT (katalitik altbirim) ve TERC (Telomer genişletme için bir kalıp görevi gören telomeraz RNA bileşen) alt birimlerinden oluşan polimerazdır.

TERT, telomerazın katalitik alt birimini kodlayan enzimdir. C228T ve C250T olmak üzere TERT yükseltici iki nokta mutasyonu tanımlanmıştır (56). Bu mutasyonlar diğer SSS dışı tümörlerde de yaygın görülmekte olup C228T (~% 80), C250T'den (~% 20) çok daha yaygındır (57).

Diffüz glioma kategorisinde, TERT'in promoter mutasyonları, IDH mutasyonları ve 1p/19q kaybı varlığına ilave olarak prognostik fayda sağlamaktadır. OD tanısında spesifik olan 1p/19q kaybı ile TERT mutasyonu arasında sıkı bir ilişki bulunmaktadır (56).

Primer GBM'lerin %70-80'inde, OD'lerin %70'inde ve daha az sıklıkta derece II ve III Astroitomlarda saptanmaktadır. Astrositik seride sık görülmeyen ve ATRX mutasyonu ile birbirini dışlayıcı genetik değişiklikler olduğu bilinmektedir (57).

Sanger sekans dizi analizi yöntemiyle yada diğer PCR yöntemleri önerilmektedir (56).

3.9.3. TP53 Mutasyonu (p53 Proteini -artmış p53 protein ekspresyonu)

p53 proteini transkripsiyon faktörü işlevine sahip 393 amino asitten oluşan bir proteindir. 17. kromozomun kısa kolu üzerinde yaklaşık 20 kb'lık bir alana yayılmış 11 ekzondan oluşan bir gen tarafından kodlanmaktadır. p53 proteini DNA tamiri, hücre döngüsünün kontrolü, genomik kararlılığın sağlanması, kromozom ayrılmasının düzenlenmesi, gen ifadesinin düzenlenmesi, yaşlanma ve programlı hücre ölümü gibi birçok hücrel olayda rol almaktadır. p53, bu işlevlerini ya transkripsiyon faktörü olarak ilgili genlerin transkripsiyonlarını düzenleyerek ya da diğer proteinler ile veya doğrudan DNA ile fiziksel olarak etkileşerek gerçekleştirmektedir (58).

p53 proteini normal hücrelerde düşük düzeyde, pek çok transformasyona uğramış hücrede ise yüksek oranda eksprese edilmektedir. P53 proteinin malignite gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir (59).

p53, hücre döngüsünün G0/G1 evresinde rol alan birçok siklin bağımlı kinazın işlevini engelleyen p21 protein ekspresyonu, p21WAF2/Cip1 geninin transkripsiyonunu uyararak

düzenlemekte ve böylece p21 proteini aracılığı ile hücre döngüsünü G1 aşamasında durdurmaktadır (58) .

p53 proteini ilk olarak 1979 yılında tümör gelişimi lehine işlev gösteren bir protein olarak tanımlanmıştır (58). 1989 yılına kadar kabul görmüş olan bu durum, daha önce tanımlanmış olan p53 proteininin normal olmayan, yani mutant p53 olduğunun anlaşılmasıyla son bulmuştur. p53 proteininin tümör baskılayıcı rolünün ortaya konulması sonrasında, p53 proteinini kodlayan gen TP53 (Tumor protein 53) olarak isimlendirilmiştir (58). p53 proteininin tümör baskılanmasındaki rolünün anlaşılması sonrasındaki süreçte gerçekleştirilen çok sayıdaki çalışma, p53 proteinin hücrel işlevlerinin aydınlatılmasında da önemli rol oynamıştır. Bu çalışmalar, p53 proteinin hücre döngüsünün kontrol edilmesi, gen ifadesinin düzenlenmesi, yaşlanma ve programlı hücre ölümü gibi birçok hücrel olayda rol aldığını göstermiştir (58).

Mitoz bölünme için gerekli proteinleri kodlayan c-MYC ve c-FOS gibi genlerin transkripsiyonlarını düzenleyen E2F transkripsiyon faktörü ile fiziksel olarak etkileşerek hücre döngüsünün G2 evresinde durdurulmasında da rol almaktadır (58,60). DNA tamiri ve DNA sentez mekanizmasında rol alan PCNA (proliferating cells nuclear antigen: proliferen olan hücrelerin nükleer antijeni), GADD45 (growth arrest and DNA damage inducible 45: büyüme arresti) ve DNA hasarı ile indüklenebilir proteinlerini ve programlı hücre ölümünde rol alan PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis= p53 ile düzenlenen apoptoz modülatörü), Noxa (Latince “hasar”), Bax (Bcl-2 associated X protein: Bcl-2-ile ilişkili X proteini) ve Fas (apoptosis stimulating fragment: apoptoz uyarıcı fragman) gibi proteinlerin transkripsiyonlarını da düzenlemektedir. TBP (TATA binding protein: TATA bağlayıcı protein)’e bağlanarak özendirici bölgesinde TATA dizisi bulduran Bcl-2 gibi birçok genin transkripsiyonunun düzenlenmesinde rol almaktadır (58).

P53 geni normalde inaktiftir. Hücre stres altındayken veya DNA hasarı olduğu durumlarda aktive olmaktadır (61). DNA hasarı söz konusu olduğunda TP53 tümör baskılayıcı gen ürünü olan P53 aktive edilmekte ve bu da hücre siklus inhibisyonu, apoptozis, DNA tamiri ve yaşlanmayı içeren antiproliferatif bir etkiye neden olmaktadır (61). DNA hasarının ardından P53 aktive olmakta ve p21Waf1/Cip1 gibi transkripsiyon genlerini indüklemektedir (62). Mdm2, “Murine Double-Minute” onkoproteini P53’ün potansiyel inhibitörüdür. Mdm2, P53’ün transkripsiyonel aktivasyon domainine bağlanmakta, hedef genlerin düzenlenmesini sağlamakta ve antiproliferatif etkiyi bloke etmektedir. Diğer yandan P53, Mdm2’nin ekspresyonunu aktive etmekte ve böylece geri-bildirim mekanizmasıyla otopregülasyonu gerçekleştirmektedir (62).

p53 proteini, DNA'da p53 bağlanma bölgesine bağlandığında büyüme ve/veya invazyonu inhibe eden aşağı akım genlerinin ekspresyonunu aktifler ve tümör supresyonunda rol oynar. TP53 gen mutasyonu sonucunda ortaya çıkan mutant p53 proteini, DNA bağlanma bölgesine bağlanamaz ve böylelikle tümör supresör aktivitesi ortadan kalkar. TP53 genindeki en sık görülen mutasyon missens mutasyonlardır (63). Bu gendeki mutasyonların kolon, meme, akciğer, karaciğer ve beyin gibi insan malignitelerinde sık görülen genetik değişiklik olduğu kanıtlanmıştır (63).

TP53 mutasyonu insan gliomlarının gelişiminde ve malign transformasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Gliomajenezde, özellikle astrositom ve sekonder glioblastom oluşumunda karşılaştığımız erken değişikliktir (63).

IDH-mutant ancak 1p/19q kaybı göstermeyen derece II ve III gliomların %88 ile %94'ünde p53 yolağını etkileyen mutasyonlar bulunmaktadır (9,49).

TP53 mutasyonu astrositomların tüm derecelerinde %30-50 civarlarında saptanmıştır (7). Astrositik tümörlerle karşılaştırıldığında, oligodendrogliyal tümörlerde p53 mutasyonu çok nadir görülmektedir (59).

Oligodendrogliomda genel olarak p53 proteini nükleer pozitifliği görülmemektedir. Bu bulgu, tümörde p53 gen mutasyonunun nadir görülmesine işaret etmektedir. Yapılmış çalışmalarda, p53 mutasyonu ve p53 immünpozitifliği ile kromozom 1p/19q kaybı izlenen oligodendrogliom vakaları arasında negatif korelasyon bulunmuştur (17,64).

P53 mutasyonu ATRX mutasyonu gibi derece II ve III astrositomlarda IDH1/2 mutasyonu ile birlikte sıkça görülmekte ve 1p/19q kaybı ile birbirini dışlayıcı olduğu için moleküler belirteç olarak tercih edilmektedirler (36).

P53 mutasyonunu saptamada immünohistokimyasal yöntem orta derecede sensitif, ancak oldukça spesifik bir yöntemdir. İmmünohistokimyasal olarak p53 immünreaktif olarak değerlendirebilmek için %10 ve daha fazla hücrede güçlü, nükleer boyanma görülmesi gerekmektedir (36). Eşik değerinin tümör hücrelerinin %10'u olarak belirlendiği çalışmalarda p53 immünohistokimya yönteminin duyarlılığının %77,4 ile %91,8 ve özgünlüğünün %78,6 ile %92,5 olduğu bildirilmiştir (65).

Hücre çekirdeğinde anormal miktarda p53 birikimine neden olan mutasyonlar sıklıkla yanlış anlamlı ('missense') mutasyonlardır. Tüm TP53 mutasyonlarının %30'unu oluşturan anlamsız ('nonsense') mutasyonlar protein birikimine neden olmazlar. p53 yolağındaki diğer proteinlerdeki değişikliklerin de çekirdekteki p53 depolanmasına katkısı olabileceği gibi, yaygın p53 boyanması gösteren her olgunun tümör olmadığı da akılda tutulmalıdır (66). Sonuç olarak p53 immünpozitifliği TP53 mutasyonu için sensitif veya spesifik değildir (65).

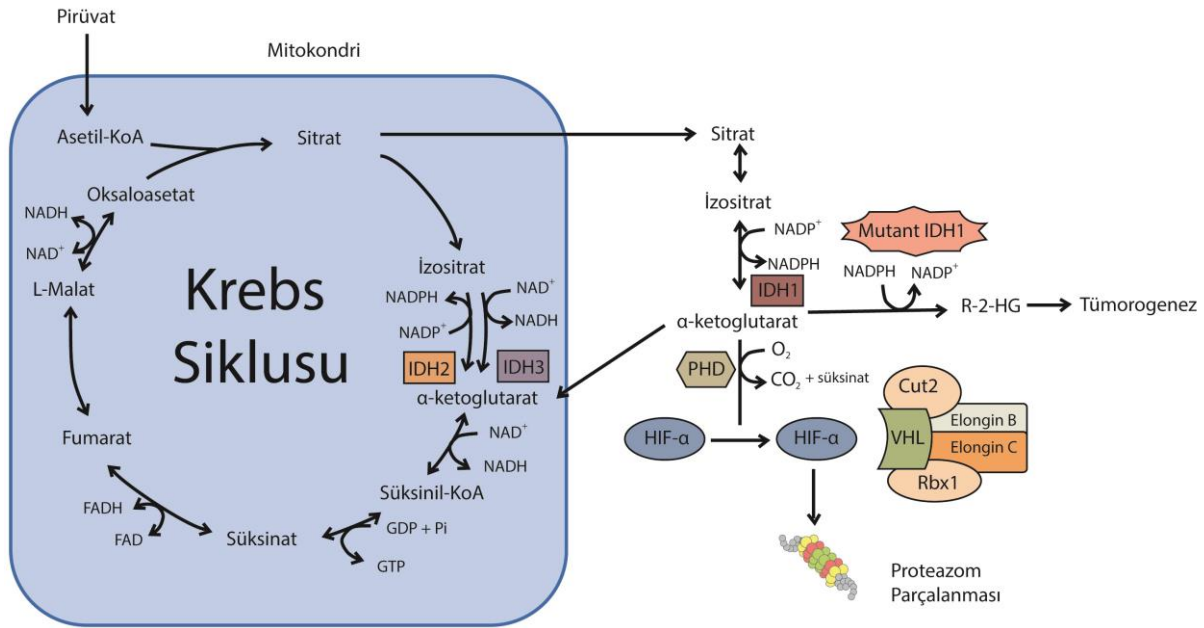
IDH mutasyonu, ATRX mutasyonu ve 1p/19q kaybından farklı olarak tanı koydurucu ve prognostik özelliği çok sınırlıdır (7).

TP53 mutasyonunun daha genç yaşla ve daha kısa yaşam süresiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak TP53 mutasyonlarının prognoz üzerindeki etkisi tartışmalıdır. Bazı çalışmalara göre TP53 mutasyonları olumsuz klinik sonuçlarla ilişkilendirilmekte ise de, morfolojik özelliklerin dahil edildiği çok değişkenli analizlerde bağımsız bir etki oluşturmadığı gösterilmiştir (65). Diğer çalışmalar IDH-mutant ve TP53-mutant tümörlerin klinik sonuçlarını IDH-mutant ve 1p/19q kayıplı tümörlere göre olumsuz bulmuşlardır. Ancak bu sonuçların TP53 mutasyonunun olumsuz etkisi mi yoksa 1p/19q kaybının olumlu etkisi mi olduğu tartışmalıdır (67).

3.9.4. İzositrat Dehidrogenaz (IDH) Gen Mutasyonu

İzositrat dehidrogenaz, peroksizomlarda ve difüz olarak sitoplazmada lokalize, izositratın alfa keto glutarata oksidatif dekarboksilasyonunu katalize eden ve böylelikle NADP⁺'den NADPH oluşturan, üç izoforma sahip bir enzimdir. İlk iki izoform (IDH1 ve IDH2) NADP⁺ bağımlıdır. IDH1 sitozolik, IDH2 ise mitokondrial bir enzimdir. Üçüncü izoform, IDH3 ise NAD⁺ bağımlı mitokondrial bir enzimdir. Kromozom 2q33.3'de lokalize izositrat dehidrogenaz-1 (IDH1) geni insanlarda sitozolik NADP⁺ bağımlı izositrat dehidrogenaz enzimini kodlayan gendir (Şekil 3) (68).



Şekil 2: IDH'nın hücre içindeki rolü ve tümör oluşumundaki etkisi

IDH, izositratı alfa ketoglutarata dönüştürerek, NADPH'nin indirgenmesini sağlar. Bu ürün önemli bir hücre içi anti oksidan olan indirgenmiş glutatyonun yeniden üretilmesinde kullanılır. İndirgenmiş glutatyonun artmasıyla apoptoza ve oksidatif hasara karşı korunma sağlanır. Bu durum; oksidatif hasar yoluyla etki eden kemo-radyoterapiye direnç anlamına da gelmektedir. IDH'de mutasyon varsa bu reaksiyonlar sekteye uğrar ve hücre oksidatif hasara açık hale gelir. Bunun sonucunda genetik instabilitenin yanı sıra, tümör hücrelerinde kanser tedavilerine duyarlılık da gözlenmektedir (69).

Parsons ve ark. ilk olarak 22 glioblastom vakasında IDH mutasyonuna dikkat çekmiştir. 2008'de GBM'lerin %12'sinde IDH mutasyonu saptandığı belirtilmiş ve IDH mutasyonunun glial tümörogenezdeki rolüne vurgu yapılmıştır (70). Takip eden dönemde 6 merkezden 1010 glial tümör üzerine yapılan geniş bir çalışmada Reifenberger ve ark. tarafından IDH mutasyonunun glial tümörogenezde yer aldığı kesinleştirilmiştir. Bu çalışmalarda IDH mutasyonunun düşük dereceli ve anaplastik oligodendroglial, astrositik ve mikst oligodendroglial tümörlerin büyük çoğunluğunda bulunduğu ortaya konulmuştur (71).

IDH mutasyonunun 1p/19q kaybından ya da TP53 mutasyonundan önce ortaya çıktığının kanıtları göz önüne alındığında, IDH mutasyonlarının glial öncü hücrelerde bir erken onkojenik faktör olduğu, IDH mutasyonunu oligodendroglionlarda sırasıyla 19q ve 1p delesyonlarının takip ettiği düşünülmektedir. Glial tümörogenezde, glial öncü hücrede meydana gelen bir somatik IDH mutasyonu sonrasında; 1p/19q kaybı olması halinde oligodendroglion yönünde, tümör baskılayıcı işleve sahip TP53'te mutasyon olması halinde ise astrositom yönünde diferansiyasyon olduğu kabul edilmektedir (4).

Glial tümörlerde IDH1 mutasyonlarının yaklaşık %90'ını arginin yerine histidinin geldiği R132H mutasyonu oluşturmakla birlikte, 132G, 132C, 132S gibi mutasyonlar da çok daha az oranda görülebilmektedir (72). IDH1'de görülen farklı mutasyon tipleri arasında sağkalım açısından fark görülmediği bildirilmektedir (72). IDH mutasyonlarının yaklaşık %3'den azı ise mitokondrial izoform olan IDH2'de (R172 alanında) görülmektedir (73). IDH2 mutasyonunun daha çok oligodendroglial histoloji ile ilişkili olduğu da belirtilmektedir (74). IDH1 mutasyonu ve IDH2 mutasyonu birbirini dışlayıcıdır (73).

Xu ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, prolin hidroksilazın, IDH1 gen mutasyonu sonucu ortaya çıkan 2 hidroksiglutarat ile kompetitif olarak inhibe edilen alfa-ketoglutarat bağımlı ve yapısal olarak alfa-ketoglutarata benzeyen dioksijenazlardan sadece bir tanesi olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda bu çalışmada alfa-ketoglutarat bağımlı

dioksijenazların inhibisyonunun histonlarda ve DNA metilasyonunda “genom wide” değişime sebep olduğu, bunun da tümör oluşumunda etkili olduğu sonucuna varılmıştır (49).

IDH1-R132H ile ilişkili birkaç hipotez öne sürülmüştür. Mutasyona uğramış IDH1 hem fonksiyon kaybı hem de fonksiyon kazanımına sebep olabilmektedir. Fonksiyon kaybı söz konusu olduğunda izositratın oksidatif dekarboksilasyonu sonucunda azalma olur. Böylece alfa-ketoglutarat ve NADPH düzeyleri düşmektedir. Fonksiyon kazanımı olduğunda ise alfa-ketoglutaratın 2-hidroksiglutarata NADPH bağımlı redüksiyonu meydana gelmekte, 2 hidroksiglutarat düzeyleri yükselmektedir. Bu bilgiye göre IDH mutasyonunun bir onkogen, 2 hidroksiglutaratın da onkometabolit olduğuna söylenebilmektedir (73). Normalde bu metabolit hücrelerde çok düşük oranda mevcuttur (35).

Difüz gliomlarda sitozolik NADP +/- bağımlı izositrat dehidrogenaz (IDH1) enzimini kodlayan gende meydana gelen çok sayıdaki spontan mutasyonun varlığı ortaya konulmuştur (70). Mitokondriyal NADP +/- bağımlı izositrat dehidrogenaz (IDH2) enzimini kodlayan genin mutasyonu ise daha az oranda görülmektedir (73).

IDH mutasyonuna bağılı gliom oluşumunda rol aldığı düşünülen mekanizmalar arasında artan oksidatif stresin mutajenik etkisi ile, HIF1a (Hipoksi ile indüklenebilir faktör, alfa)’nın stabilizasyonu sonucu artan anjiogenez ile histon ve DNA hipermetilasyonuna neden olan epigenetik değişimdir (75).

Gliomlarda görülen CpG bölgelerinin metillenmesi fenotipi (‘glioma-CpG island methylator phenotype’-G-CIMP) ile IDH mutasyonları arasında sıkı bir korelasyon bulunmaktadır ve bu fenotip DNA ve histon demetilazlarını inhibe eden 2-hidroksiglutaratın birikmesine bağılı olduğuna düşünülmektedir (75).

IDH1/2 mutasyonu en çok derece II-III gliomlarda ve sekonder GBM’de saptanmıştır (76). Primer GBM’de ise yok denecek kadar az sıklıkta görülmektedir ve düşük dereceli diğer gliomlarda izlenmemektedir. Bu sayede difüz gliomların pilositik astrositom, pleomorfik ksantostrositom ve diğer düşük dereceli glial tümörlerden ayırıcı tanısında kullanılmaktadır (73).

IDH mutasyonları, çoğunlukla primer GBM’lerde gözlenen 10. kromozom kaybı ve EGFR amplifikasyonu ile ters yönde ilişkilendirilmiştir. Bu durum morfolojik benzerliklerine rağmen primer ve sekonder GBM’lerin farklı kökenden tümörler olduğuna düşüncesini desteklemektedir (76).

IDH mutasyonu olan gliomlar IDH mutant olmayan gliomlara göre daha genç yaşlarda görülmektedir (77). Çocuklardaki gliomlarda çok nadir olmakla birlikte 14 yaş ve daha büyük adölesanlardaki gliomlarda sıkça görülmektedir (73).

IDH1 mutasyonu oranları ilk yayınlarda OD'de %42.9-%100, AOD'de %46-%100, OA'da %49-%100, AOA'da %63-%100, primer GBM'de %1.8-%19.4; sekonder GBM'de %15.4-%84.6 olarak verilmektedir (33).

IDH mutasyonları glial tümörler dışında kartilajinöz tümörler ve AML gibi diğer neoplazilerde de görülmektedir. Ancak IDH1 mutasyonu olan gliomlu hastalarda iyi prognostik bir belirteçken, AML'li hastalarda prognostik etkisi söz konusu değildir (75).

Bugün patoloji laboratuvarlarında glial tümörlerde IDH mutasyonu araştırması olarak en çok kullanılan yöntem, en sık nokta mutasyonunu, oldukça duyarlı olarak saptayan IDH1 R132H primer antikoru ile yapılan immünohistokimyasal incelemedir. IDH mutasyonunu saptamada Sanger metodu, altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak mutasyonun tespiti için en az %20 oranında mutant alel gerekmede, bu da DNA analizi için kullanılacak kesitlerdeki hücrelerin %40'ından fazlasının tümör olmasını gerektirmektedir. Tümör içeriğinin düşük olduğu örneklerde yalancı negatif sonuçlar alınabilmektedir. Alternatif sıralama metodu olarak kullanılan "pyrosequencing" potansiyel olarak daha duyarlı bir yöntem olarak nitelendirilmiştir (71).

Kullanılan yöntem patoloji laboratuvarının imkanlarına ve alt yapısına göre değişiklik göstermektedir ve immünohistokimya yöntemleri genel olarak en yaygın uygulama olmaya devam etmektedir. Tekrar önemle belirtmelidir ki, immünohistokimya yöntemi ile tüm mutasyonlar değerlendirilemediğinden, bir tümörün "IDH-mutant olmayan" şeklinde sınıflanabilmesi için IDH1 R132H immünohistokimya boyanması negatifse takiben IDH1 geninin 132. dizininin ve IDH2 geninin 172. Dizininin gen sıralaması yöntemlerinden biri ile değerlendirilmesi gerekmektedir. DSÖ 2016 SSST sınıflamasına göre, gen sıralamasının yapılamadığı vakalara "difüz gliom, NOS" şeklinde tanı konulmalıdır (1).

DNA dizi yöntemlerinin ve immünohistokimyanın karşılaştırıldığı bir çalışmada immünohistokimyanın duyarlılığı %94, özgüllüğü %100 olarak bildirilmiş ve immünohistokimyanın geçerli bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır (73).

IDH mutasyonunun difüz gliomlarda histolojik dereceden bağımsız olarak kuvvetli bir prognostik etken olduğu gösterilmiştir (72). Daha uzun sağkalım, daha iyi prognoz ile ilişkili olduğu, bağımsız ve kuvvetli bir prognostik faktör olduğu, ancak tedavi yanıtını tahmin edici bir yönü bulunmadığı bildirilmektedir (72).

IDH mutasyonunun diğer genetik değişikliklerle ilişkisine bakıldığında TP53 mutasyonu (%94) ve ATRX inaktivasyonu (%86) ile güçlü bir ilişkisi olduğu saptanmıştır (6).

IDH mutant olmayan derece II ve III gliomlarda ise daha az oranda p53 mutasyonu (%15-25) görülmektedir ve çoğunlukla 1p/19q kaybı bulunmamaktadır (78).

IDH mutant olmayan tümörlerle mitotik indeks yakından ilişkiliyken, IDH mutant tümörlerle mitotik indeks ilişkisi saptanmamıştır (22).

Ki-67 proliferatif indeksi ile, dereceden bağımsız olarak, IDH1 mutasyonu arasında güçlü bir korelasyon vardır. Bununla birlikte IDH1 mutasyon durumu ne olursa olsun Ki67<30 olan hastalar Ki-67>30 olan hastalara göre daha uzun yaşamaktadırlar (77).

3.9.5.ATRX mutasyonu

Alfa-talasemi mental retardasyon sendrom X geni (ATRX) X kromozomunda q21.1'de yerleşimlidir. H3.3-ATR-X-DAXX kromatin yeniden düzenleyici yolağına ait bir proteini kodlar. ATRX genindeki mutasyonlar çeşitli gelişimsel anomalilere sebep olur. Bunlar; mental retardasyon, fasial dismorfizm, ürogenital anomaliler ve alfa talasemidir (8).

Tüm ökaryotik kromozomların 3' ucunda bulunan ve tekrarlayan nükleotid dizilerinden oluşan telomerler, her mitoz bölünme ile biraz kısalarak hücre ömrünün belirlenmesinde rol oynar. Telomeraz kendi RNA molekülünü taşıyan, bu RNA'yı kalıp olarak kullanıp telomere yeni nükleotidler ekleyen bir ters transkriptaz enzimidir. Tümör hücreleri sınırsız büyüme amacı ile telomer uzunluklarını koruyan mekanizmalar geliştirmektedirler. Bu mekanizmalardan biri telomeraz enziminin devamlı işlevselliğine dayanırken, diğeri telomerazdan bağımsız alternatif telomer uzaması ('alternative lengthening of telomeres'-ALT) şeklindedir. ALT yolağını kullanan kanserin bir çoğunda ATRX veya DAXX (death-domain associated protein) genlerinde mutasyonlar izlenmektedir. Mutasyonlar genin tamamına yayılmış durumdadır ve çoğunlukla aminoasit sentezinin erken sonlanmasına neden olan çerçeve kayması veya anlamsız (nonsense) nokta mutasyonları şeklinde, daha ender olarak da yanlış anlamlı (missense) nokta mutasyonları şeklindedir (79).

ATRX, perisentrik heterokromatin ve telomerdeki H3.3 histon varyantı birleştirilmesinin yanı sıra çeşitli transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgeleri için de gereklidir. ATRX ve DAXX (death-domain associated protein) histon protein H3.3 ile etkileşen bir kompleks oluştururlar. Bu kompleks, kromatini ve telomeri birleştirir. Bu birleşme gerçekleşmediğinde genom stabilizasyonunu yitirir ve DNA metilasyonu bozuklukları, mitozda anormal kromozom kümelenmesi, mayozda kromozom ayrışma anomalileri ve telomer disfonksiyonu gibi pek çok anomali meydana gelir (80).

ATRX mutasyonu ilk olarak α -talasemi mental retardasyon X sendromunda saptanmışsa da, daha sonra bir dizi neoplazmda bu mutasyonun varlığı gösterilmiştir. Bunlar pankreatik nöroendokrin tümör, nöroblastom, myelodisplastik sendrom ve SSS tümörleridir (81-83).

ATRX mutasyonu glial tümörlerde de saptanmış ve gliomagenizde rolü olduğu belirlenmiştir. İlk defa 2011 yılında erişkin ve pediatrik GBM'lerde ve astrositik tümörlerde ATRX mutasyonu tespit edilmiş ve bu mutasyonun genomik instabiliteden sorumlu olduğu düşünülen telomerazın alternatif uzatılması (alternative lengthening of telomeres (ALT)) ile anlamlı bir ilişkisi olduğu gösterilmiştir (79).

ATRX mutasyonu, protein inaktivasyonu ve ekspresyon kaybıyla sonuçlandığı için immünohistokimyasal olarak negatif görülmektedir. Dolayısıyla Astrositik seri tümörlerde ATRX mutasyonu var ise çevre nonneoplastik damarda, nöronal, glial ve mikrogial hücrelerde de pozitif olarak ekspresyon görülmektedir. Böylece immünohistokimyasal çalışmalarda internal kontrol olarak kullanılmaktadır (6). ATRX proteini fizyolojik olarak mutant olmadığında ise hücre nükleusunda eksprese olmaktadır.

ATRX mutasyonlarının tespitinde de Sanger dizileme yöntemi altın standart olarak kabul edilmekle beraber, mutasyonların genin tüm eksonlarına yayılmış olarak bulunması bu yöntemin rutin patoloji laboratuvarlarında kullanımını zorlaştırmaktadır. Telomere özgün FISH yöntemi ile test edilebilen ALT fenotipi ile pankreatik nöroendokrin tümörlerdeki ATRX ve DAXX mutasyonları ve gliomlardaki ATRX mutasyonu arasında mükemmel yakın korelasyon görülmektedir. Benzer şekilde, ALT fenotipi ile immünohistokimyasal boyamada ATRX kaybı arasında mükemmel yakın korelasyon görülmektedir (84). Uyuşmazlık izlenen vakaların çoğunda yanlış anlamlı mutasyonlar sonucu fonksiyon göstermeyen anormal bir ATRX proteini sentezlenmekte, ancak immünohistokimya boyama yöntemleri proteininin varlığını gösterdiği için yanlış negatif sonuç alınabilmektedir. Bu durumda FISH ile ALT çalışması yapılabilmektedir. Bunun dışında, gen sıralaması yöntemi ile tespit edilebilen mutasyon göstermeyen ancak immünohistokimya yöntemi ile protein kaybı gösteren vakalarda, ATRX ekspresyonunu düzenleyen diğer genetik ve epigenetik mekanizmalar olduğu düşünülmektedir. Bu vakalarda mutasyon olmamasına rağmen ALT fenotipi de izlenmektedir (84). Bu nedenle, bu son grubun "yanlış pozitif" sonuç olarak yorumlanması yerine, ATRX immünohistokimya boyasının ALT fenotipinin belirlenmesinde ATRX gen sıralamasından daha duyarlı olduğunu kabul etmek de yanlış olmayacaktır.

İmmünohistokimyasal nükleer ATRX ekspresyon kaybı oranları, oligoastroitom tanısını da içeren önceki çalışmalarda, AA'larda %80.8, AOA'larda %68.4, A'larda %56, primer GBM'lerde %26.3, AOD'lerde %37.5, OD'lerde %20 ve OA'larda % 0 olarak verilmektedir (36).

ATRX mutasyonunun güncel yaklaşımda astrositik tümörlere özgü olduğu söylenebilir (79). İmmünohistokimyasal olarak uygulanan ATRX ile OD hücrelerinde nükleer pozitifliğin

devam etmesi, ekspresyon kaybının olmaması astrositomdan ayırıcı önemli bir genetik değişikliktir (6).

Astrositik tümörlerde ATRX kaybı Tp53 mutasyonundan daha sık görülmektedir. Haarlem konsensusunda da fikir birliğine varıldığı gibi genetik değişiklikleri saptarken ATRX, p53'e tercih edilmektedir (85).

ATRX mutasyonu 2016 DSÖ SSST sınıflamasındaki tanısal olan moleküler değişiklikler arasında olmamakla beraber, gliomların ayırıcı tanısında kullanılan faydalı bir belirteçtir. Sıklıkla IDH mutasyonu ile beraber bulunması ve 1p/19q kaybı ile birbirlerini dışlamaları nedeni ile tanıya çok yardımcıdır. Ancak prognozu belirlemede diğer moleküler belirteçlerden bağımsız bir rolü olup olmadığı henüz net değildir (9) (49). Derece II ve III, IDH-mutant olan, 1p/19q kaybı olmayan difüz gliomlar (=Astrositom) arasında, ATRX değişikliğinin varlığı olumlu prognostik sonuçlarla ilişkilendirilmiştir (86). ATRX ekspresyon kaybı olan tümörlerin daha iyi prognoza sahip olduğunu gösteren çalışmalarda ortalama yaşam 31-55 ay bulunmuştur (87).

Bu sonuçların gelecekteki çalışmalar ile doğrulanması durumunda IDH-mutant düşük dereceli gliomları, IDH-mutant/ 1p19q kaybı olan, IDH-mutant/ATRX-mutant ve sadece IDH-mutant olarak üçe ayırmak mümkün olabilecektir. ATRX mutasyonunun prognostik değerinin her tümör tipi için farklı olduğu bilinmektedir. Pankreatik nöroendokrin tümörlerde ATRX ekspresyon kaybı daha agresif fenotipken gliomlarda ATRX ekspresyon varlığı iyi prognozla ilişkilendirilmiştir (79).

3.9.6.PDGFR (Trombosit türevi büyüme faktörü reseptörü)

Amplifikasyonu

PDGF bağ dokusu ve glia için major mitojendir. A ve B zincirlerinin kombinasyonundan oluşur. Bu ligandlar tirozin kinaz reseptör ailesinden olan PDGFR- α PDGFR- β reseptörleri tarafından tanınır (88). PDGFR- α , PDGF-A, PDGF-B, PDGF-AB ve PDGF-C formlarını bağlarken, PDGFR- β , PDGF-B formunu daha yüksek, AB formunu daha düşük afinitede bağlar (89).

PDGFR- α geni, kromozom 4q12 üzerinde lokalizedir. PDGFR- α geni reseptör tirozin kinazlar (RTK'ler) adı verilen protein ailesinin üyesi olan PDGFR- α yapımını sağlar. Reseptör tirozin kinazlar, sinyal iletimi yoluyla hücrenin yüzeyinden hücrelere çoğalma, metastaz yapma, apoptozdan kaçış sinyalleri gönderir. PDGFR- α proteini, hücre yüzeyindeki reseptöre bağlandığında PDGFR- α proteinini aktive eder, sonuçta belirli pozisyonlara bir

oksijen ve fosfor atomu kümesi (fosfat grubu) ekleyerek hücre içindeki diğer proteinleri aktive eder (fosforilasyon adı verilen bir süreç). Bu süreç, çoklu sinyal yollarında bir dizi proteinin aktivasyonuna neden olur (Şekil 3) (89).

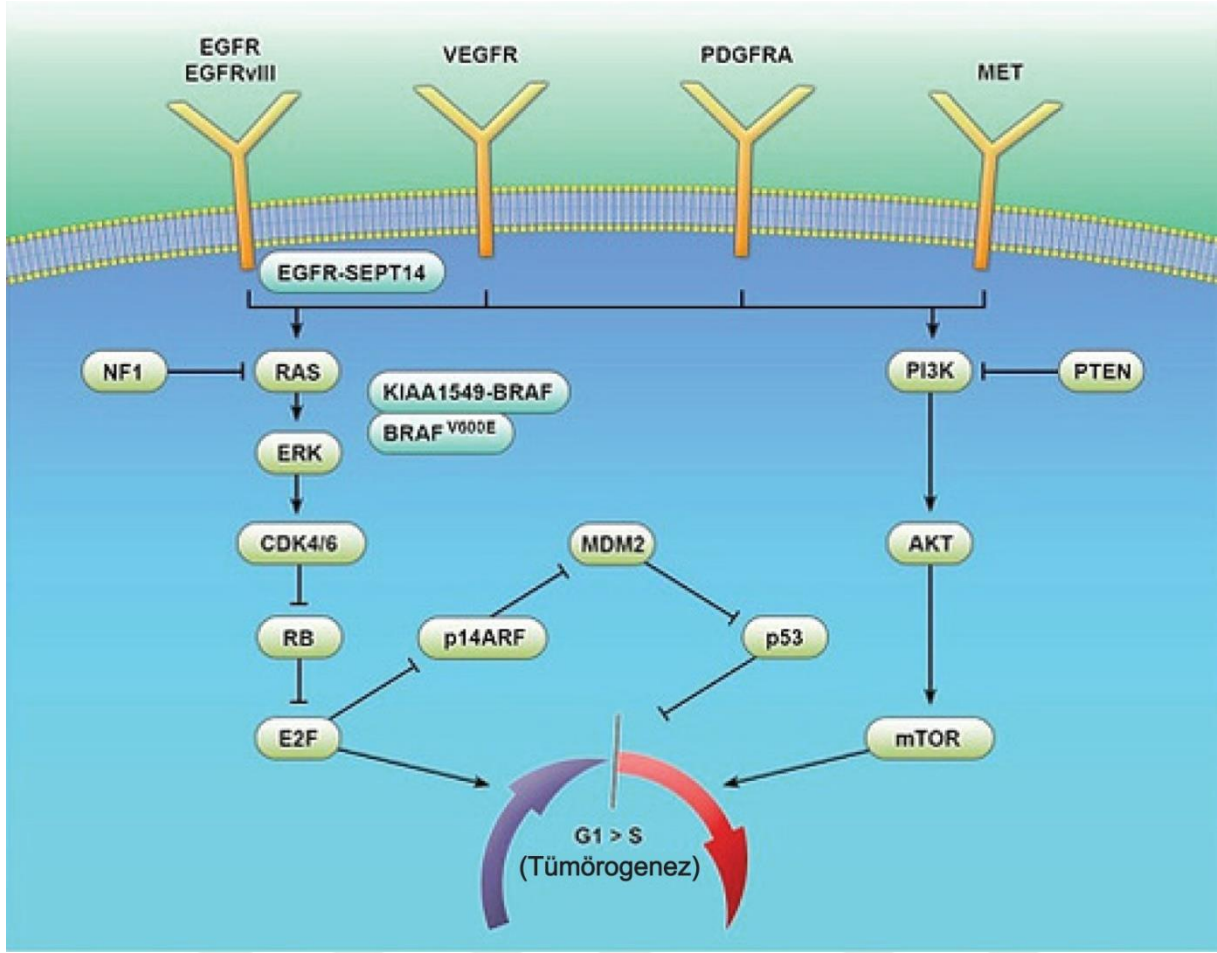
PDGFR- α proteini tarafından uyarılan sinyal yolları, hücre çoğalması, bölünmesi ve hücre sağkalımı gibi birçok önemli hücresel işlemi kontrol eder. PDGF sinyali gonadlar, akciğer, barsak, deri, santral sinir sistemi, iskelet, damar, kardiyak ve kranial nöral krest gelişimi için önemlidir (90). PDGFR- α nöral krest migrasyonu ve patogenezinde rol almaktadır. Buna rağmen PDGFR- β 'nin rolü ve birbirleri arasındaki ilişki tam olarak belli değildir (90).

PDGF dışında da PDGFR- α 'yı aktive eden moleküller de mevcuttur. PDGF olmayan proteinler, kendi reseptörlerine bağlanırlar ve PDGFR- α monomerlerinin kinaz aktivitesini baskı altına alan hücre içi olayları tetiklerler. PDGFR- α 'yı dolaylı olarak aktive eden hücre içi olaylar arasında, PDGFR- α 'yı fosforile eden Src ailesinin kinazlarını aktive eden reaktif oksijen türlerinin yükselmesi bulunmaktadır. Aktivasyon modu, PDGFR- α 'nın aktif kalma süresini belirler. PDGFR- α 'nın kalıcı aktivasyonu (yarılanma ömrü 120 dakikanın üstünde), PDGFR- α monomerler aktive edildiğinde oluşur (91).

PDGFR- α genindeki nokta mutasyonları, ligand bağlanmadan harekete geçirilen bir PDGFR- α proteinine neden olabilir. Sonuç olarak, sinyal yolları sürekli olarak açılır (yapısal olarak aktive edilir) ve bu da hücrelerin çoğalmasını ve uzun süre hayatta kalmasını sağlar. PDGFR- α gen mutasyonları sonucu oluşan hastalıklar arasında en başta Gastrointestinal stromal tümör (GİST) gelmektedir (92). GİST'li hastalarda, kinaz aktivitesini aktive eden PDGFR- α 'da mutasyonlar vardır. Bu gibi hastalar PDGFR'ler de dahil olmak üzere çeşitli tirozin kinazların kinaz aktivitesini bloke eden inhibitörlerden yararlanmaktadır. Dolayısıyla, PDGFR- α 'nın yapısal aktivasyonu ile sonuçlanan mutasyonlar, hastalardaki tümörlerin gelişiminde rol oynar. PDGFR- α 'yı aktive etmenin diğer yolları (aşırı ekspresyon veya PDGF'lerle birlikte ekspresyon), glioblastom ve sarkomu içeren diğer tümör türleri ile ilişkilidir (93). PDGFR- α ilişkili bir diğer hastalık kronik eozinofilik lösemidir (94).

2010 yılında Ozawa ve ark. yaptığı çalışmada tüm PDGFR- α amplifikasyonları glioblastomlarda saptanmıştır (95).

PDGFR- α sinyal yolunun gliom gelişimi ve progresyonunda önemli bir yürütücü olduğu bilinmektedir (96).



Şekil 3: Glial tümör oluşumunda PDGFR- α ' nın sinyal yolları

PDGFR- α 'nın aşırı ekspresyonu, yüksek dereceli astrositomlarda daha sık olmakla birlikte düşük dereceli astrositomlarda da bulunmaktadır. PDGFR- α 'nın amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonu, sekonder GBM oluşum yolu için tipiktir ve p53 mutasyonu gibi ilk görülen değişikliktir. OD ve OA'larda beklenen bir genetik değişiklik değildir (88).

Yetişkin yüksek dereceli astrositomlarda PDGFR- α amplifikasyonu reseptör tirozin kinaz ailesi üyelerinden EGFR'den sonra görülen 2. en sık genetik değişikliktir (96). PDGFR- α amplifikasyonu pediatrik gliomlarda %29,3, yetişkin gliomlarda %20,9 oranında saptanmaktadır (96).

PDGFR- α ekspresyonu gliom hücreleri için spesifik değildir, az da olsa nonneoplastik gliotik dokuda da ekspresyon görülmektedir (96).

PDGFR- α gen bölgesindeki değişiklikleri saptamak için kullanılan yöntemlerin başında FISH ve DNA dizi analizi yöntemleri gelmektedir. FISH, PDGFR- α kopya sayısını belirlemek için en basit ve en sensitif yöntemdir (96). FISH ile AA'ların %20,9'unda

PDGFR- α amplifikasyonu saptanmış olup, %9,5'inde yüksek seviye amplifikasyon, %11,4'ünde düşük seviyede amplifikasyon izlenmiştir (96).

PDGFR- α amplifikasyonu denovo GBM'lerde astrositomlardan daha sık görülmektedir. GBM'lerin %22,5'inde amplifikasyon varken, bunların da %10,6'sı yüksek seviye, %11,9'u düşük seviye amplifikasyon şeklindedir (96). Yine aynı çalışmada PDGFR- α amplifikasyonu ile IDH1 (R132H) ekspresyonu birlikte değerlendirilmiş ve IDH1 eksprese eden denovo GBM'lerin %50'sinde PDGFR- α amplifikasyonu saptanmıştır. AA'larda bu oran oldukça düşük görülmüş ve sadece %18,3'ünde PDGFR- α amplifikasyonu saptanmıştır (96).

PDGFR- α amplifikasyonunun prognostik etkisi tam olarak belli değildir (10). İlk tanı anında amplifikasyon saptanmasının kötü sağkalımla ilişkili olduğunu söyleyen çalışmalar mevcut olup AA tanılı hastalarda tanıdan sonraki ortalama yaşam süresi 3 yıl olarak verilmiştir (89). Pediatrik yüksek dereceli astrositik tümörlerde amplifikasyon prognostik değilken yetişkinlerde genellikle GBM'lerde tanımlanan PDGFR- α amplifikasyonu ve IDH1 mutasyon birlikteliği bağımsız prognostik faktörlerdir. IDH1 mutant denovo GBM'lerde PDGFR- α amplifikasyonu kötü yaşam süresiyle ilişkilidir (96).

3.9.7. EGFR Amplifikasyonu

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), transmembran tirozin kinaz reseptörlerinin ErbB ailesinin bir üyesidir. Bu ailenin üyeleri ErbB1 (EGFR ya da HER1), ErbB2 (Neu ya da HER2), ErbB3 (HER3) ve ErbB4'tür (HER4). EGFR'nin uyarılması sonucu Ras ve PI3K yolları aracılığıyla hücrenin çoğalması sağlanır. EGFR'nin aşırı etkinliği özellikle malign glial tümörlerde tümöral gelişmeden sorumludur. EGFR amplifikasyonu glial tümörlerde ağırlıklı olarak yüksek dereceli olanlarda saptanmaktadır. GBM'lerin %36-40'ında EGFR amplifikasyonu gözlenmektedir (97).

EGFR ekspresyon durumunu tespit etmede immünohistokimyasal yöntem ve FISH yöntemi en sık olarak kullanılan yöntemlerdir. DNA dizi analizi de kullanılabilecek bir diğer yöntemdir (98).

3.9.8. BRAF Mutasyonu

BRAF mitojen aktive protein kinaz (MAPK) yolağını kullanan bir serin/treonin kinazdır. Gliom dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde protoonkogen olarak işlev görmektedir (99). Başka bir genin füzyonu veya mutasyonu ile aktive olabilmektedir. En sık görülen mutasyonel varyant BRAF-V600E olup, pleomorfik ksantoastrositomların %50-60'ında,

pilositik astrositomların yaklaşık %10'unda, gangliogliomların %20-75'inde ve anaplastik gangliogliomların %50'sinde görülmektedir (100). Erişkin yüksek dereceli astrositomlar ve diğer difüz gliomlarda çok nadir görülmektedir (%2-5) (99).

BRAF geni, 7. kromozomun uzun kolu (7q34) üzerinde yer alır ve 18 ekzondan oluşur. Mutasyonlar, sıklıkla ekzon 15 içerisinde yer alan kodon 600 bölgesinde (V600A, V600D, V600E ve V600KRM) ve 11. ekzonda gözlenir. Sıklıkla DNA dizi analizi yöntemiyle tespit edilmektedir. Ayrıca son yıllarda bu nokta mutasyonuna spesifik geliştirilmiş VE1 primer antikoru ile immünohistokimyasal yöntemin de yararlı olduğu belirtilmektedir (100).

3.9.9.PTEN Delesyonu

Fosfataz ve tensin homologu (PTEN), insanlarda PTEN geni tarafından kodlanan bir proteindir. PTEN geni 10q23 bölgesinde lokalizedir. PTEN geninin mutasyonları, birçok kanser gelişiminde rol oynamaktadır. Bu gen, yüksek frekanslı çok sayıda kanserde mutasyona uğramış bir tümör baskılayıcı olarak tanımlanmıştır. PTEN tarafından kodlanan protein, fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfat 3-fosfatazdır. Hücrelerdeki fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfatın hücre içindeki düzeylerini olumsuz şekilde düzenler ve Akt / PKB sinyal yolunu negatif olarak düzenleyerek bir tümör baskılayıcı olarak işlev görür (101).

Glial tümörlerde *PTEN* ile ilgili olarak delesyon ve mutasyon incelemeleri ile *PTEN* alanını da içeren 10q heterozigosite kaybı incelemeleri yapılmaktadır. Oligodendrogial tümörlerde nadir olarak görülebilen 10q heterozigosite kaybının, kötü prognoz ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (102).

PTEN delesyonu daha çok GBM'lerde, özellikle de primer GBM'lerde görülmektedir. Yayınlarda PTEN delesyonunun klasik GBM'lerde %60-%100, OD'de %4.5-%12; AOD'de %10-58; OA'da %0-%3; AOA'da %0-%13 oranında görüldüğü bildirilmektedir (103).

PCR veya FISH yöntemiyle PTEN delesyonu saptanan çalışmalar mevcuttur (103,104).

3.10.PRATİK PATOLOJİK YAKLAŞIM

Yeni DSÖ sınıflamasındaki birçok tanıya ulaşmak için moleküler değişikliklerin değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu moleküler belirteçlerden hangilerinin yapılacağı ve nasıl bir sıra ile uygulanacağı her patoloji laboratuvarının altyapısına bağlı olarak belirlenmesini laboratuvarın kendisine bırakmıştır. Genel olarak, morfolojik açıdan oligodendrogliom ile uyumlu bir difüz gliomun tanısında IDH mutasyonunun ve 1p/19q kaybının gösterilmesi

gerekmektedir. IDH1 R132H mutasyonunu gösteren immünohistokimya negatif ise, tanının doğrulanması için IDH1 ve IDH2 genlerinin araştırılması gerekmektedir. Morfolojik olarak astrositom ile uyumlu vakalarda ise IDH mutasyonu önce immünohistokimya sonra gerekirse gen sıralaması ile değerlendirilmelidir. Yine astrositomlarda immünohistokimya değerlendirmesinde ATRX kaybı ve/veya p53 artışı tanıyı desteklemede kullanılabilir. Morfolojik olarak astrositom ile oligodendrogliom ayırımı yapılamayan tümörlerde IDH saptanması gerekli iken, immünohistokimyasal ATRX ve FISH ile 1p/19 kaybının test edilmesi tanıda önem taşımaktadır. IDH mutasyonu taşımadığı negatif IDH1 R132H immünohistokimya sonucunu takiben gen sıralaması ile teyit edilmiş bir difüz gliom, erken tanı almış veya yetersiz örneklendirilmiş bir GBM olabileceğinden, seçilmiş vakalarda primer GBM'ye ait moleküler değişikliklerin (TERT mutasyonları, EGFR amplifikasyonu, PTEN kaybı ve/veya 9q kaybı gibi) araştırılması imkan dahilinde ise tanı için yararlı olacaktır.

Özellikle genç erişkinlerde, IDH mutasyonu taşımayan difüz gliomlar “pediatrik tip gliomlar” olabileceğinden, seçilmiş vakalarda H3K27M mutasyonu ve BRAF füzyonu gibi moleküler testlerin yapılması uygundur.

3.11.GLİAL TÜMÖRLERDE PROGNOZ VE SAĞKALIM

Glial tümörlerde klinik ya da patolojik pek çok faktör prognostik ya da prediktif değere sahiptir. Tümörün derecesi prognostik faktörlerden biridir. DSÖ derecelendirme sistemi ile sağkalım ve tedaviye cevap öngörülelebilmektedir. Derece II tümörlerde sağkalım genellikle 5 yıldan fazlayken, derece III tümörlerde 2-3 yıl, derece IV tümörlerde ise 1 yıldan az olmaktadır (6).

Glial tümörlerde diğer prognostik faktörler klinik bilgiler (hastanın yaşı, performansı, tümörün lokalizasyonu), radyolojik özellikler, cerrahi rezeksiyon genişliği, proliferasyon indeks değeri ve genetik değişikliklerdir. Özellikle genetik değişiklikler gün geçtikçe daha önemli hale gelmeye başlamıştır. Difüz gliomlarda sık görülen genetik değişikliklerin prognostik derecelerinin özeti Tablo 2’de özetlenmiştir. Her tümör için bu parametrelerin tümünün birlikte değerlendirilmesiyle prognoz hakkında daha doğru bilgi edinilmektedir (6).

DSÖ Derece II-III difüz gliom		
IDH 1/2 mutant		IDH 1/2 mutant olmayan tip
1p/19q kayıplı	1p/19q kayıpsız	
	ATRX mutasyonu	PDGFR-α amplifikasyonu
	TP53 mutasyonu	
Moleküler oligodendrogliom	Moleküler astrositom	Moleküler yüksek dereceli astrositom-GBM
En iyi prognoz	Ara prognoz	En kötü prognoz

Tablo 2: Moleküler değişikliklerin prognoz ile ilişkisi

Son dönemde yapılan çalışmalarda hastanın yaşının sağkalım üzerinde çok kuvvetli bir etkisi olduğu saptanmıştır. 18-30, 30-40, 40-50 ve 50 üstü yaşlarındaki 4 grup hasta incelendiğinde en kötü prognozlu, sağkalım süresi en kısa olan grup 50 yaş üstü grup olarak bulunmuştur. Ancak gelişen moleküler inceleme yöntemleriyle, IDH mutasyonu saptanan hastaların yaşının sağkalıma daha az etkili olduğu görülmüştür (25).

Genetik özelliklerden bağımsız olarak glial tümörlerin prognostik sıralaması yapılacak olursa en iyi prognozlu oligodendrogliom, sonra oligoastrositom ve en kötü prognozlu da astrositomdur. Oligodendrogliomlarda ortalama yaşam süresi 11,6 yıl, astrositik tümörlerde de 5.6 yıl olarak bildirilmektedir (105).

Oligodendrogliomlar, astrositom ve oligoastrositom grubu tümörlere göre daha iyi klinik gidişli ve kemosensitif tümörlerdir (105). Kolayca fark edilecek kadar yavaş büyümektedirler (47). AOD'de OD'ye göre sağkalım daha belirgin olarak etkilenmektedir (44).

Kromozom 1p/19q kayıplı OD'lerin MGMT promotor, IDH1 mutasyonları ve son yıllarda tanımlanan CpG adacık metilatör fenotipi (G-CIMP) gibi birtakım pozitif prognostik belirteçleri de içerdiği gösterilmiştir (73). Bu belirteçler düşük dereceli A'lardan kaynaklanan sekonder GBM'lerde de gözlenmektedir ancak düşük dereceli A'ları düşük dereceli OD'lerden ayıran, moleküler patogeneizde rol oynayan en önemli fark 1p/19q kombine kaybının sıklıkla oligodendrogliomda, p53 mutasyonunun ise sıklıkla astrositomda gözlenmesidir (47).

Astrositom ve ependimom gibi diğer gliomlardan farklı olarak oligodendrogliom kemosenstiftir (alkilleyici ajanlardan temozolomid, PCV ya da prokarbazin ile 1-(2-kloretil)-3-siklohegzil-L-nitrozüre ve vinkristin ile kombinasyon tedavisine iyi yanıt verir), yavaş ilerler ve prognozu önceden tahmin edilebilir (47).

A'larda ise tanı koydurucu moleküler parametrelerin varlığına karşın prognostik faktörler sınırlıdır. Genetik değişiklikler içinde IDH mutasyonu ve 1p/19q kaybının varlığı iyi prognostik belirteçlerdir. Bu iki moleküler belirtece göre prognoz sıralaması yapılacak olursa IDH mutant ve 1p/19q kaybı olan tümörler en iyi prognozlu, IDH mutant olmayan tümörler en kötü prognozlu, IDH mutant ve 1p/19q kayıpsız olan tümörler ara prognozlidir (Tablo2) (52).

IDH mutant olmayan gliomların primer GBM'ye benzer şekilde genetik karakteristik özellikleri ve agresif klinik davranış gösterdikleri bildirilmiştir. Bu mutasyona sahip AA ve GBM'de genel sağkalımın belirgin olarak yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu mutasyon özellikle genç hastalarda uzun süreli sağkalımı gösteren bağımsız bir prognostik faktördür (106).

Günümüzde anaplastik gliomlar için mevcut olan tedavi seçenekleri değerlendirildiğinde IDH mutasyonlarının tedaviye yanıtta bir etkisi olmadığı gösterilmiştir (=prediktif değil). Prognostik faktör olan 1p/19q kaybının OD'lerde, terapiye olumlu yanıt alınacağına (=prediktif değeri) göstergesidir (6).

3.12.FLORESAN İN SİTU HİBRİDİZASYON (FISH)

Floresans in situ hibridizasyon (FISH) belli DNA veya RNA alanlarının, üzerlerine bağlanabilen floresans (ışık) gösterebilen problemler aracılığı ile görünebilir hale getirilmesi yöntemidir. Fikse edilmemiş, taze örnekler kullanılabileceği gibi, formolde fikse edilmiş, parafine gömülmüş örneklerde de çalışılabilir. Metafaz ya da interfaz evresindeki hücreler, uygun problemlerle işaretlenerek değerlendirilir. Problemlerin ışınması floresans mikroskopunda incelenir. Yüksek özgünlüğe sahip FISH problemleri kromozom üzerinde sentromerlere (sentromer sayım probu [centromere enumeration probe – CEP]), kromozomun bütününe ya da ilgilenilen gen bölgesine (lokusa özgü belirteç [locus specific identifier – LSI]) bağlanabilecek şekilde üretilir. Elde edilen ışınmanın yeri ve sinyal sayısı ile translokasyon, amplifikasyon, delesyon durumları gözlemlenebilir. FISH tekniğinin öne çıkan avantajı morfolojik değerlendirmeye de izin veriyor oluşudur. Karşıt boya olarak kullanılan DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol) görüntüsü, incelenen materyalin morfolojik özelliklerinin

seçilebilmesine olanak tanır. İncelenecek hücrelerde deterjan etkili Tween 20 ve NP-40 gibi solüsyonlar ve proteinaz K gibi proteazlar ile permeabilite sağlanır. DNA denatürasyonu için formamid ya da benzeri solüsyonlar kullanılır. Sonrasında uygulanan prob, DNA'da hedef bölgeye bağlanır. Çift iplikli ise, probun da denatürasyonu gereklidir. Prob uygulandıktan sonra yüksek sıcaklık ile hem DNA'daki hedef bölgenin hem de probun birlikte denatürasyonu sağlanır ve hibridizasyon olur. Problar kendilerine has belirlenen dalga boylarında ışığa yaparlar ve bu ışığa uygun filtreler altında değerlendirilir (107).

Delesyon ve amplifikasyon değerlendirmeleri için hedef gen alanı sayısı, aynı kromozomun sentromer bölgesi ile veya diğer kolda farklı bir gen bölgesi ile sayısal olarak kıyaslanır. Amplifikasyon ve delesyon değerlendirmelerinde laboratuvarların kendi çalışma koşullarına göre eşik değerler belirlemeleri önerilmektedir. Olağan sayıda sinyal içermesi beklenen doku ve hücrelerden ortalama değerler ve standart sapmalar elde edilir. Amplifikasyon değerlendirmelerinde amplifiye hücre sayısı, tümör dışı materyallerden yapılan sayımlarda elde edilen ortalamanın en az 2 standart sapma üzerinde ise pozitif kabul edilebilir (107).

Bir çalışmada hedef ve referans sinyal oranı amplifikasyon için ≥ 2.0 , delesyon için ise %20 ya da daha fazla hücrede < 0.85 olarak tespit edilmiştir. Bir başka merkezde bu sınırlar delesyon için 0.80, amplifikasyon için 1.30 olarak kabul edilmiştir (108). Avrupa Nöropatoloji Dernekleri Konfederasyonu Araştırma Komitesi'nin desteğiyle yapılan bir prosedür ve protokol çalışmasında 1p ve 19q delesyonları için, delesyon eşik değerinin, ortalamanın 3 standart sapma üzerinde olması önerilmektedir (50).

FISH ile PDGFR- α amplifikasyonu değerlendirmesi yapılan çalışmada vakalar şu şekilde skorlanmıştır; normal (artmış sinyal yok veya $< 10\%$ hücrede < 6 sinyal), polizomi ($> 10\%$ hücrede 2-6 sinyal), düşük seviye amplifikasyon ($< 10\%$ hücre > 12 veya sayılamayan sinyal veya $> 40\%$ hücrede 6-12 sinyal), yüksek seviye amplifikasyon ($> 10\%$ hücrede > 12 veya sayılamayan sinyal). Hem düşük hem de yüksek seviye amplifikasyon PDGFR- α amplifikasyonu olarak tanımlanmıştır. 2013 yılındaki bu çalışma, PDGFR- α sinyalini gösteren şu ana kadar yapılmış en geniş kapsamlı yüksek dereceli astrositom çalışması olmuştur (96).

Diğer çalışmada FISH yöntemiyle gen amplifikasyonu, her nükleusta 6 veya daha fazla sinyal varsa pozitif kabul edilmiştir. Nükleustaki 3-5 sinyal anöploidi, 2 sinyal ise diploid (normal kopya sayısı) olarak kabul edilmiştir (89).

Amplifikasyon tanımı için bir başka öneri de amplifikasyonun klinikopatolojik kullanımının öncüsü olan meme karsinomlarında HER2 amplifikasyon kriterlerini

kullanılmaktadır. Meme tümörlerinde FISH ile HER2/CEP17 sentromer sinyal oranı değerlendirilmiş ve >2 sinyal oranı veya tek başına her hücrede ortalama HER2 sinyal oranının >6 olması ile amplifikasyon sonucu verilmiştir. PDGFR- α kopya sayısını değerlendirmek için de benzer oran kullanılabilir. PDGFR- α /CEP4 sentromer oranına göre ya da tek başına PDGFR- α sinyal sayısında artışa göre amplifikasyon yorumunda bulunulabilmektedir (109).

3.13.PCR YÖNTEMİ

Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction - PCR), DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isimdir.

Metot basitçe tüp içerisinde nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması esasına dayanır. Bir çeşit "in vitro klonlama" olarak da tanımlanan PCR; 94 °C-98 °C aralığında gerçekleştirilen denatürasyon, 37 °C-65 °C aralığında gerçekleştirilen tavlama ve 72 °C'de gerçekleştirilen uzama aşamalarından oluşur ve bu döngülerin belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır.

PCR yönteminin gelişmesinde en büyük katkıyı Taq Polimeraz enziminin bulunması yapmıştır çünkü bu enzim yüksek sıcaklıklarda dahi dayanabilen tek enzimdir. Dr. Kary B. Mullis 1980'li yıllarda yaptığı PCR çalışmaları ile 1993 yılında Kimya alanında Nobel Ödülü almıştır.

Gen çoğaltılması dahil PCR'nin birçok uygulaması için kalıp DNA'ya tamamen tamamlayıcı olan primerlere ihtiyaç vardır.

PCR yaygın olarak tıbbi ve biyolojik araştırma laboratuvarlarında kalıtsal hastalıkların teşhisi, genetik parmak izlerinin tanımlanması, bulaşıcı hastalıkların teşhisi, genlerin klonlanması, babalık testi ve DNA hesaplaması gibi değişik konularda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. DNA dizilemesi, bir DNA molekülündeki nükleotit bazlarının (adenin, guanin, sitozin ve timin) sırasının belirlenmesidir. İlk DNA dizileri 1970'lerin başlarında üniversite araştırmacıları tarafından iki-boyutlu kromatografiye dayanan zahmetli yöntemlerle elde edilmiştir. Otomatik analizle çalışan boya-tabanlı dizileme yöntemlerinin gelişimiyle DNA dizilemesi çok daha kolaylaşmış ve birkaç büyüklük mertebesi hızlanmıştır (110).

Sanger ve ark. çalışmasında DNA polimeraz ile tek sarmallı DNA'daki nükleotid dizilerini belirlemek için basit ve hızlı bir yöntem anlatılmıştır (111).

“Pyrosekans”, sentezleme ile sıralama ilkesine dayanan bir DNA sekanslama metodudur (DNA'da nükleotidlerin sırasını belirleme). Sanger dizilimlerinden farklıdır, çünkü dideoksinükleotitlerle zincir sonlandırması yerine, nükleotid birleşmesinde pirofosfat salınımının saptanmasına dayanır. Bir defada tamamlayıcı şeridi, bir defada bir baz çifti sentezleyerek ve her adımda hangi tablonun eklendiğini tespit ederek tek bir DNA zincirinin dizilimine izin verir. Şablon DNA hareketsizdir ve A, C, G ve T nükleotidlerinin çözeltileri sırayla eklenir ve reaksiyondan çıkarılır. Işık, yalnızca nükleotid çözümü şablonun eşlenmemiş ilk tabanını tamamladığında üretilir.

Son yıllarda PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngüleri sağlamak için kullanılan cihazların (thermocycler) hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, gerçek zamanlı(real-time) PCR olarak adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesine neden olmuştur. “Real-time” PCR’da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır (110,111).

Yeni nesil sekanslama (NGS) tekniği son zamanlarda gündeme gelmiş, DNA dizi analizinde daha hızlı, verimli ve güvenilir bir tekniktir. Günümüzün karmaşık genetik araştırma soruları, geleneksel DNA sıralama teknolojilerinin kapasitesinin ötesinde bir bilgi derinliği istemektedir. Yeni nesil sıralama bu boşluğu doldurdu ve bu soruları çözmek için günlük bir araştırma aracı haline geldi.

Yeni nesil sekanslama ile numune hazırlama ve veri analizi seçenekleri, geniş bir uygulama aralığına olanak tanır. Yeni nesil sıralama ile;

- Bütün genomların hızla dizilmesi
- Hedef bölgeleri derine dizmek için yakınlaştırmak
- Yeni RNA varyantlarını ve ekleme yerlerini keşfetmek için RNA diziliminden yararlanmak veya gen ekspresyon analizi için mRNA’ları tam olarak ölçmek
- Genom çapında metilasyon veya DNA-protein etkileşimlerini analiz etmek
- İnsanlarda veya çevrede mikrobik çeşitliliği incelemek mümkün olmaktadır.

NGS'yi kullanarak, bütün bir insan genomu tek bir gün içerisinde dizilenebilir. Buna karşılık, insan genomunun şifresini çözmek için kullanılan önceki Sanger sıralama teknolojisi ile on yıla ihtiyaç vardır. Genom araştırmasında NGS çoğunlukla konvansiyonel Sanger diziliminin ne Real-time dizi analizinin yerini almasına rağmen, henüz rutin klinik uygulamaya dönüştürülmemiştir (110,111).

3.14.İMMÜNOHİSTOKİMYA YÖNTEMİ

Hücredeki antijenleri veya proteinleri, işaretlenmiş bir antikor ile bağlayarak saptama işlemidir. Doku kesitleri üzerine belli antikorlar damlatılarak gerçekleştirilen ve pek çok aşaması olan bu yöntem, tümörün köken aldığı hücre tipinin saptanması için kullanılabildiği gibi, kötü huylu tümörleri iyi huylu tümörlerden ayırmada veya kanserin tedavisinde seçilecek alternatiflerin belirlenmesinde kullanılabilmektedir.

Spesifik moleküler belirteçler, proliferasyon veya hücre ölümü (apoptoz) gibi belirli hücreyel olayların karakteristikleridir. Aynı zamanda biyolojik işaretin farklı bölümlerinde biyolojik belirteçlerin ve farklı şekilde ifade edilen proteinlerin dağılımını ve lokalizasyonunu anlamak için temel araştırmalarda yaygın şekilde kullanılmaktadır.



4.MATERYAL VE METOD

4.1.OLGULARIN SEÇİMİ, VERİ TOPLANMASI VE ÇALIŞMANIN DİZAYNI

Çalışmada 2011-2016 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2007 DSÖ SSST sınıflamasına göre tanı almış derece II ve derece III oligodendrogliom, astrositom ve 2014 yılından önce tanı almış mikst oligoastrostitom olmak üzere 60 vaka incelenmiştir. Olguların yaş, cinsiyet, radyolojik olarak saptanan en büyük tümör çapı, yerleşim gösterdiği lob, takip süreleri, 1 yıl ve 5 yıllık yaşam süreleri, Ki67 skoru, görüntüleme kontrast varlığı; eksizyonun tipi, tümörün nüks bir tümör olup olmadığı ve sonrasında hastada nüks tümör gelişip gelişmediği bilgileri kayıtlardan ve hasta veya hasta yakınlarına ulaşılarak elde edilmiştir. Prognoz hesaplaması yapılırken hastaların ilk tanı aldıkları gün ve Aralık 2016 tarihleri arasındaki yaşam bilgileri hesaba alınmıştır.

Çalışmada 2007 DSÖ SSST histopatolojik sınıflamasına göre 19 OD (%31.6), 10 AOD (%16.6), 19 OA (%31.6), 8 AOA (%13.3), 2 A (%3), 2 AA (%3) olmak üzere toplam 60 vaka yer almıştır. Vakalar rasgele seçilmiş olup tüm vakalarda 2014 Haarlem entegre sınıflaması ve DSÖ 2016 SSST sınıflamasının önermiş olduğu genetik değişiklikler araştırılmıştır. Saptanan genetik değişikliklere göre vakalar yeniden sınıflandırılmıştır. İmmünohistokimyasal olarak öncelikle IDH1 ekspresyonu araştırılmış ve mutant saptanmayan vakalara ve testin doğruluğunu kanıtlamak için rasgele seçilen ekspresyon pozitif vakalara Sanger sekans DNA dizi analizi yapılmıştır. IDH mutasyonunu takiben, immünohistokimyasal olarak uygulanan ATRX ve p53 sonucunda mutasyon saptanan vakalar A veya AA tanısına alınmıştır. IDH mutasyonunu takiben FISH ile 1p/19 durumu araştırılmış ve 1p/19 kaybı olan vakalar histomorfolojik özelliklerinden bağımsız OD veya AOD tanısına alınmıştır. Vakaların derecelendirilmesi DSÖ 2016 SSST sınıflamasında önerildiği gibi histomorfolojik kriterlerle yapılmıştır.

Seçilen olguların parafine gömülü dokularından elde edilmiş olan Hematoksilen& Eozin boyalı lamları ve olgulara önceden rutin uygulanmış olan tüm immünohistokimya lamları (IDH1, p53, ATRX, Ki-67) arşivden çıkarıldı ve yeniden incelendi. Vakaların tümünde tanı sırasında uygulanmış olan FISH 1p19q değerlendirmeleri bilgisayar ortamında tekrar yapıldı.

Belirlenen parafin bloklardan PDGFR- α FISH moleküler yöntemi için 4 μ m kalınlığında kesitler hazırlandı. Kesitler pozitif şarjlı lamlara alındı. Bu preparatlar 56°C etüvde bir gece bekletilerek kurutuldu ve kesitlerin lama yapışması sağlandı.

Sanger sekans analizi için formalinde fikse parafine gömülü doku bloklarından elde edilen 8-µm kalınlığındaki 10 histolojik doku kesitinden en çok tümör içeren alanlar manuel olarak diseke edildi.

IDH1 ve IDH2 geni 4. ekzonları PCR temelli direk sekanslama yöntemi ile incelendi.

4.2.PCR TEMELLİ DİREK SEKANSLAMA YÖNTEMİ İLE IDH1 VE IDH2 GENİ EKZON 4 MUTASYON ANALİZİ

4.2.1.DNA Ekstraksiyonu

Diseke edilen tümör kesitlerinden, standart deparafinizasyon ve rehidrasyon sonrası QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Almanya, Katolog No: 56404) kullanarak aşağıdaki protokole uygun olarak DNA ekstraksiyonu yapıldı. Diseke edilen doku kesitleri steril 1.5 ml'lik ependorf tüpüne alındı.

Parafini uzaklaştırmak için 1 ml ksilen eklendi ve 15 sn vortekslendi. Ardından 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Pipetleme ile doku pelletine dokunmadan süpernatant uzaklaştırıldı. Bu işlem iki kez daha tekrarlandı. Ksileni uzaklaştırmak için 1 ml ethanol (96–100%) eklendi ve 15 sn vortekslendi. 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Pipetleme ile doku pelletine dokunmadan süpernatant uzaklaştırıldı. Bu işlem iki kez daha tekrarlandı. Ethanolü tamamen uzaklaştırmak için 30 dk 56°C'de bekletildi. Tamamen kurumuş doku örneğine 180 µl buffer ATL ve 20 µl proteinaz K konuldu. 15 sn vortekslendi. Doku tamamen eriyene kadar lizis için 56°C'de 8 saat bekletildi. 90 °C'de 1 saat bekletildi. Kısa bir santrifüjden sonra 200 µl buffer AL eklendi ve 15 sn vortekslendi. 200 µl ethanol (%96–100) eklendi ve 15 sn vortekslendi.

Her bir hasta için ekstraksiyon kitinin içerisinde bulunan toplama tüpü ve filtreli tüpten bir adet hazırlandı ve kısa bir santrifüjden sonra ependorf tüpteki tüm karışım filtreli tüplere aktarıldı. Toplama tüpü ve filtreli tüp 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpü atılarak yenisi filtreli tüpün altına yerleştirildi ve filtreli tüpe 500 µl Buffer AW1 eklenerek tekrar 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpü atılarak yenisi filtreli tüpün altına yerleştirildi ve filtreli tüpe 500 µl Buffer AW2 eklenerek 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpü yenisi ile değiştirildikten sonra 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj

sonrası toplama tüpü atılarak filtreli tüp steril 1.5 ml'lik ependorf tüpüne yerleştirildi ve üzerine 50 µl Buffer ATE ilave edilerek oda ısısında 3 dakika beklendi. Süre sonunda 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılarak filtreli tüpte bulunan sıvının ependorf tüpe geçmesi sağlandı. Elde edilen DNA miktarı ve kalitesi spektrofotometre cihazında ölçüldükten sonra, çalışılncaya kadar -20°C'de saklandı.



Kullanıma hazır DNA

Şekil 4: QIAamp DNA FFPE Tissue Protokolü (FFPE: Formalin-Fixed Paraffin-Embedded)

4.2.2.PCR Reaksiyonu

Çalışmaya	Forward Primer Dizisi	Reverse Primer Dizisi (5'→3')
IDH1 ekzon	CCAAGTCACCAAGGATGC	TCACATTACTGCCAACATGAC
IDH2 ekzon 4	CCGTCTGGCTGTGTTGTTG	AGTCTGTTCGCCTTGTACTGC

Tablo 3: Herbir Hedefin Primer Sekansları

PCR Malzemeleri	Miktar (μ l)
Distile su	30,25
10X PCR tamponu	5
MgCl ₂ (25 mM)	2
dNTP mix (10 mM)	1.5
Primer (Fwd+Rev) (4 pmol/ μ l)	10
Hot Start Taq DNA polimeraz	0.25
DNA (100 ng)	1
Toplam Hacim	50 μl

Tablo 4: PCR Reaksiyon Karışımı

Oluşturulan PCR karışımı vortekste karıştırıldıktan sonra, her bir örneğe ait steril 0.2 ml'lik PCR tüplerine 49 μ l olacak şekilde paylaştırıldı. Üzerlerine de 1'er μ l DNA örneği konulup termal döngü cihazında tablo 5'teki koşullarda amplifiye edildi. Termal döngü cihazında reaksiyon tamamlandıktan sonra, örneklere elektroforez uygulanmak üzere +4°C'ye kaldırıldı.

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Aktivasyon	95	15 dk.	1
Denatürasyon	95	30 sn.	42
Primer Bağlanması (Annealing)	58 °C	30 sn.	
Zincir Uzaması (Extension)	72	45 sn.	
Son Uzaması (Extension)	72	10 dk.	1
Bekleme	4	∞	∞

Tablo 5: PCR Koşulları

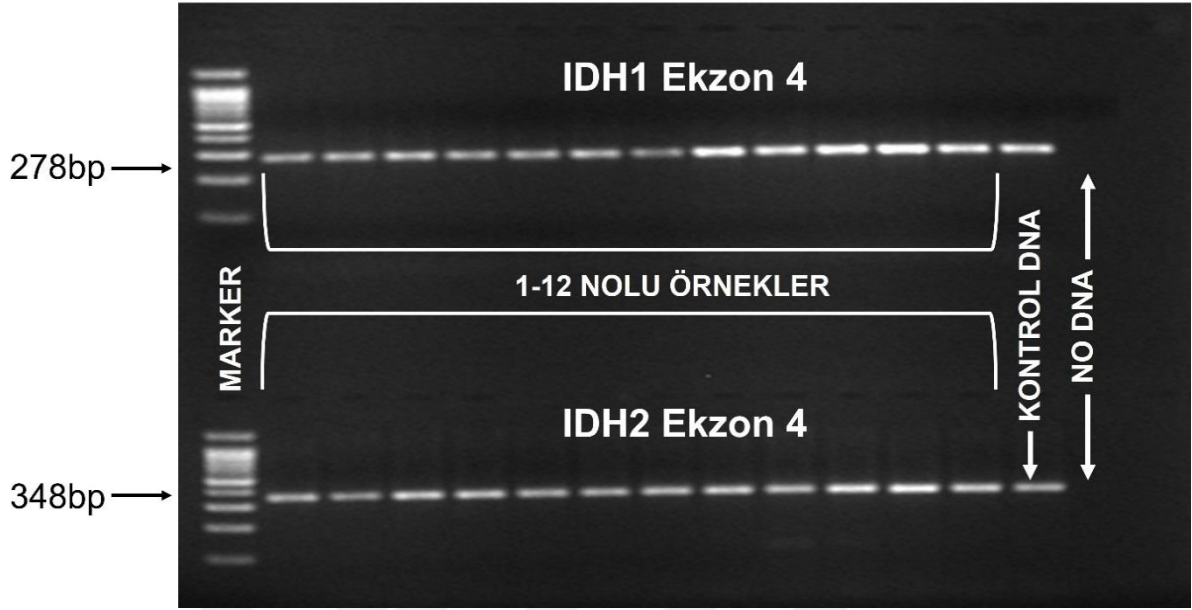
4.2.3. Agaroz Jelin Hazırlanması

Elektroforez tamponu olarak Tris-Borik Asit-Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) [TBE] kullanıldı. 10X konsantre stok olarak hazırlanan bu tampon kullanılmadan önce 1X olacak şekilde distile su ile sulandırıldı. Bir balon jode 2 gr agaroz 100 ml 1X TBE solüsyonu içerisinde mikrodalga fırında homojen şeffaf hale gelinceye kadar ısıtıldı. Biraz soğuduktan sonra Et-Br'den 10 µl eklendi. Daha sonra jel, tarakların yerleştirildiği jel tepsinine yavaşça döküldü. Katılaşana kadar (25-30 dakika) oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra elektroforez tankına yerleştirilerek amplifiye PCR ürünlerinin yüklenmesine hazır hale getirildi.

4.2.4. Agaroz Jel Elektroforez İşlemi

Termal döngü cihazında reaksiyon tamamlandıktan sonra buzdolabında bekleyen örneklerden 5'er µl alınarak parafilm üzerinde 2 µl DNA loading dye ile karıştırıldı. Daha sonra da elektroforez tankına yerleştirilen jelin kuyucuklarına sırasıyla yüklendi. Tankın kapağı kapatıldıktan sonra güç kaynağı çalıştırıldı. Kullanılan mini tank için 30 mA akım verilerek, örneklerin elektroforezi 50 dakika boyunca gerçekleştirildi. Yükleme tamponunda bulunan brom fenol mavisinin göçü takip ederek jelin 2/3'lük kısmına ulaştığında elektroforez durduruldu. Jel tanktan çıkarılarak 312 nm dalga boyunda ışık veren UV-translüminatöründe incelendi ve jel görüntüleme sisteminde kayıtları yapıldı (Şekil 5). Hazırlanan jelde hasta ve negatif kontrol örneklerinde beklenen uzunluklarda (IDH1 ekzon 4: 278 bp, IDH2 ekzon 4: 348 bp) PCR ürünleri gözlemlendi. Bu, büyüklükleri belli DNA fragmentlerini içeren moleküler ağırlık standardı ile kıyaslanarak saptandı. Kontaminasyon kontrolü için yapılan genomik DNA içermeyen kuyucukta PCR ürünü yoktu.

Örneklerin beklenen uzunlukta PCR ile amplifiye olduğu, kontrolün çalıştığı ve kontaminasyonun olmadığı görüldükten sonra. PCR ürünlerinin pürifikasyonu aşamasına geçildi.



Şekil 5: IDH1 ve IDH2 geni ekzon 4 için PCR Ürünlerinin örnek Jel Görüntüsü

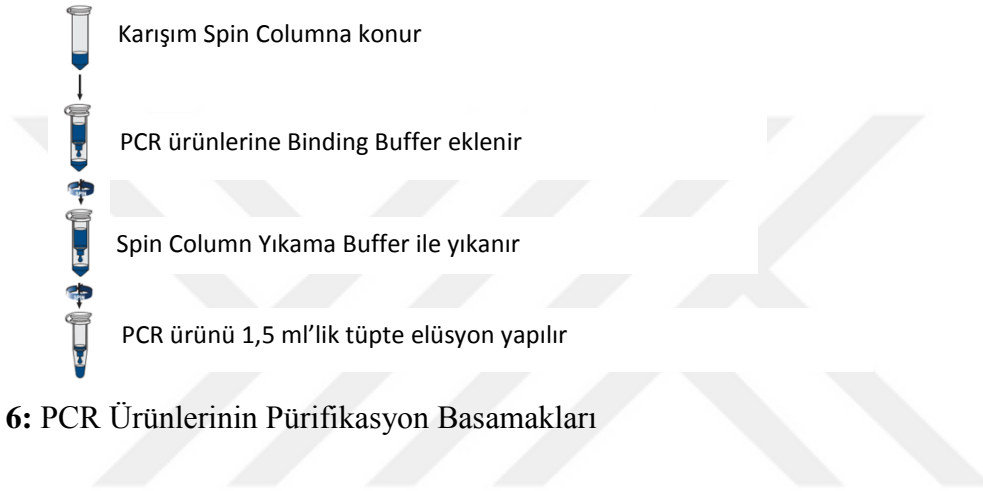
4.2.5.PCR Ürünlerinin Pürifikasyonu

QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Almanya, Katolog No: 28104) kullanılarak aşağıdaki protokole uygun olarak gerçekleştirildi.

PCR tüplerinde bulunan PCR ürünlerine 5 katı ($5 \times 45 \mu\text{l} = 225 \mu\text{l}$) PB buffer ve $7.5 \mu\text{l}$ 3 M sodyum asetat, pH 5.0 eklendi ve 5 sn vortekslendi. Her bir hasta için kitin içerisinde bulunan toplama tüpü ve filtreli tüpten bir adet hazırlandı ve karışımın tamamı filtreli tüplere aktarıldı. Toplama tüpü ve filtreli tüp 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpü atılarak yenisi filtreli tüpün altına yerleştirildi ve filtreli tüpe $750 \mu\text{l}$ PE buffer eklenerek tekrar 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpü atılarak yenisi filtreli tüpün altına yerleştirildi ve rezidüel wash buffer kalmaması için 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpü atılarak filtreli tüp steril 1.5 ml'lik ependorf tüpüne yerleştirildi ve üzerine $30 \mu\text{l}$ steril nükleaz free su ilave edilerek oda ısısında 3 dakika beklendi. Süre sonunda 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılarak filtreli tüpte bulunan sıvının ependorf tüpe geçmesi sağlandı. Pürifiye PCR ürünleri bir sonraki basamakta kullanılana kadar -20°C ' de saklandı.

Pürifiye PCR ürünleri BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit ile aşağıdaki protokole uygun olarak çift yönlü (forward ve reverse) olarak ABI-3730 (48 kapiller) DNA Sequencer cihazında sekanslandı.

PCR reaksiyonu son hacmi 20 µl olacak şekilde BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit, forward ve reverse primerler (4 pmol/µl), nükleaz free su ve pürifiye edilen PCR ürünleri konularak 96'lık pleyt'lerde hazırlandı. Her bir örnek için reaksiyon karışımı tablo-6'da belirtilmiştir.



Şekil 6: PCR Ürünlerinin Pürifikasyon Basamakları

PCR Malzemeleri	Miktar (µl)
Distile su	11
BigDye Buffer	2
BigDye	4
Forward / Reverse primer	2
Pürifiye PCR ürünü	1
Toplam hacim	20 µl

Tablo 6: Forward ve reverse okuma için Big Dye reaksiyon karışımı

4.2.6.Sekans Analizi

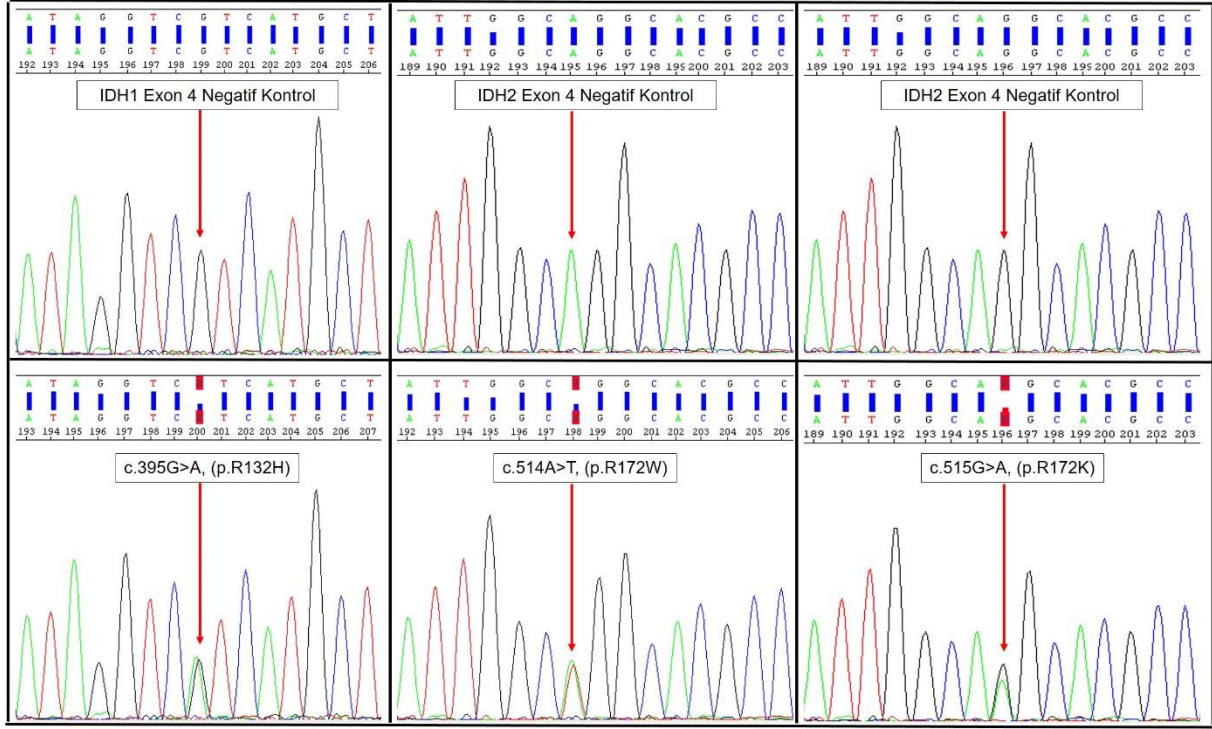
Oluşturulan PCR karışımı vortekste karıştırıldıktan sonra, her bir örneğe ait kuyucuklara 19 µl olacak şekilde paylaştırıldı. Üzerlerine de 1'er µl pürifiye PCR ürünü konulup termal döngü cihazına yerleştirildi. Sekans analizi için uygulanan PCR koşulları tablo-7'de gösterilmiştir. PCR döngüsü şu şekilde uygulandı:

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Aktivasyon	96	1 dk	1
Denatürasyon	96	10 sn	30
Primer Bağlanması (Annealing)	50	5 sn	
Zincir Uzaması (Extension)	60	4 dk	
Bekleme	4	∞	∞

Tablo 7: Sekans Analizi İçin PCR Koşulları

Termal döngü cihazında reaksiyon tamamlandıktan sonra, örneklere etanol presipitasyonu uygulandı. 4 ml 95% ethanol ile 160 µl 3M Sodyum asetat, pH 5.2 karıştırıldı. Bu karışımdan 50 µl herbir PCR ürünü içeren kuyucuğa konuldu ve kapaklar ile kapatıldı. Pleyt 3000 rpm hızında 45 dakika 4°C soğutmalı santrifüj cihazında (Nüve, Türkiye) santrifüj edildi. Santrifüj sonunda pleyt ters çevrilerek sıvı boşaltıldı ve 2000 rpm de 1 dakika ters şekilde santrifüj edildi. Presipite olan PCR ürününe %70 ethanol eklendi ve 3700 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Bu yıkama basamağı bir kez daha tekrarlandı. Santrifüj sonunda pleyt ters çevrilerek sıvı boşaltıldı ve 2000 rpm de 1 dakika ters şekilde santrifüj edildi. Presipite olan DNA'ların üzerine 30 µl Hi-Di Formamide eklendi. 2000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.

Örnekler 95°C'de 3 dakika denatüre edildi ve hemen hızlıca buz üzerinde soğutuldu. Daha sonra pleyt uygun programlama yapıldıktan sonra ABI-3730 (48 kapiller) DNA Analyzer cihazına yüklendi. Forward ve reverse sekans elektroforogramları, SeqScape Software v3.0 programı kullanarak ve manuel olarak analiz edildi (Resim 1).



Resim 1: Sanger sekans dizi analizi yöntemiyle saptanan IDH1 ve IDH2 mutasyonlarına ait örnekler. Üst resimde IDH1 ve IDH2 geni 4. ekzon negatif kontrolü ve alt resimde mutasyonlu hastaların örnek forward sekans elektroforagramı görülmektedir.

4.3.FISH UYGULAMASI VE ANALİZİ (PDGFRA/CEP4)

Çalışmamızda ticari problemler (Cytotest, RO, ABD ve Abbott Vysis, IL, ABD) kullanılarak PDGFR- α amplifikasyonu değerlendirilmiştir.

3-4 mikron kalınlığındaki kesitlerin 56°C’de 1 gece boyunca etüvde bekletilmesinin ardından;

Deparafinizasyon adımları:

- Ksilende 3 kere 10 dakika, absolü alkolde 2 kere 5 dakika; deparafinizasyon ön yıkama solüsyonu’nda 80°C’de 30 dakika bekletildi. Bu işlem esnasında Coplin şale kullanıldı. Deparafinizasyon ön yıkama solüsyonu toz halinde paketlenmiş olup, ilk kullanımda 240 ml distile suda çözülüp, sonraki kullanımlar için oda ısısında saklandı.

Hibridizasyon öncesi adımlar:

- Distile suda 10-15 sn çalkalandı.

- Önceden hazırlanmış ve 37°C’de beklemekte olan 15 cc distile su, 150µl 1M HCl’ye, 150µl distile su ile sulandırılan ‘enzim reaktifi’ eklendi (SigmaLife Science, USA). Enzim reaktifi toz halinde paketlenmiş olup, kullanımın hemen öncesinde hazırlanır. Lamlar bu solüsyonda 15 dakika bekletildi.
- Distile suda 10-15 saniye çalkalandı.
- 2 kez 2XSSC’de 3 dakika bekletildi.
- Sırasıyla %70, %85, %100’lük alkolde 3 dakika bekletildi.
- Kesitler havada kurutuldu.
- Prob uygulanıp lamel kapatıldı.
- Plastik çimento (Fixogum®, Almanya) uygulandı.
- Lamlar denatürasyon ve hibridizasyon işleminin gerçekleştirileceği cihaza (Hybridizer, Dako) konuldu.
- Hybridizer’da 73°C’de 5 dakika, 37 °C’de 16 saat işlem geçirdi.

Hibridizasyon sonrası:

- 73°C’de ve oda ısısında 2 şalede 50 ml 2XSSC/%0.3NP40 hazırlandı.
- Plastik çimento nazikçe ayrıldı.
- Lamel elle ayrıldı. Elle ayrılmakta güçlük yaşananlar oda ısısındaki 2XSSC/%0.3NP40’ta bekletildi.
- 73°C’deki 2XSSC/%0.3NP40’ta bir şalede 1-3 sn çalkalanarak 2 dakika tutuldu.
- Oda ısısındaki 2XSSC/%0.3NP40’ta çalkalandı.
- Açıkta ve karanlıkta kurutuldu.
- DAPI II 5-10µl uygulandı
- Değerlendirme öncesi 20-30 dakika (-)20°C’de bekletildi.

FISH uygulaması yapılan lamlar, bilgisayar bağlantılı floresans mikroskopunda (Olympus BX61; Olympus Optical, Japonya) değerlendirilmiştir. Bilgisayar ortamında

görüntüleme dijital kamera (XLMM, Dage-MTI, IN, ABD) ve uyumlu yazılım (Duet®, Bioview Ltd., İsrail) kullanılmıştır.

FISH tekniğinde PDGFR- α Break Apart, kromozom 4q12 bölgesi için ayrı ayrı çift renkli prob içeren (yeşil ve turuncu) yaklaşımla çalışıldı (Cytotest, RO, USA). Hedef problemler 4q12 bölgesinde 3' ucu hibridize olurken turuncu renkli sinyal, 5' ucu hibridize olurken de yeşil renkli sinyal elde edildi. Kontrol prob olarak da CEP4 4p11-q11 aqua prob eklendi. Sentromerik bölge hibridizasyonu ile aqua sinyal elde edildi. Prob uygulanmış normal (negatif) hücrelerde iki aqua, iki füzyon sarı (turuncu+yeşil) sinyal izlendi.

CEP4 sentromerik bölge polizomi değerlendirilmesi:

Normal bir hücrede sentromerik bölge değerlendirmesinde iki aqua sinyal görülmektedir. Bu, kromozom 4'ün iki intakt kopyası olduğunu bize gösterir.

4q12 bölgesinde kopya sayısında artış olan anormal bir hücrede ise, ikiden fazla sayıda füzyon sarı ve aqua sinyal gözlenir. 3 sinyal de aynı sayıda artış gösterirse ve >2 , <6 sinyal görülen hücre sayısı %10'dan fazlaysa polizomiden bahsedilmektedir. Polizomi görülen vakalar da kendi içinde; 3-4 sinyal düşük seviye polizomi, 5-6 sinyal yüksek seviye polizomi olarak değerlendirildi.

PDGFR- α amplifikasyon değerlendirilmesi:

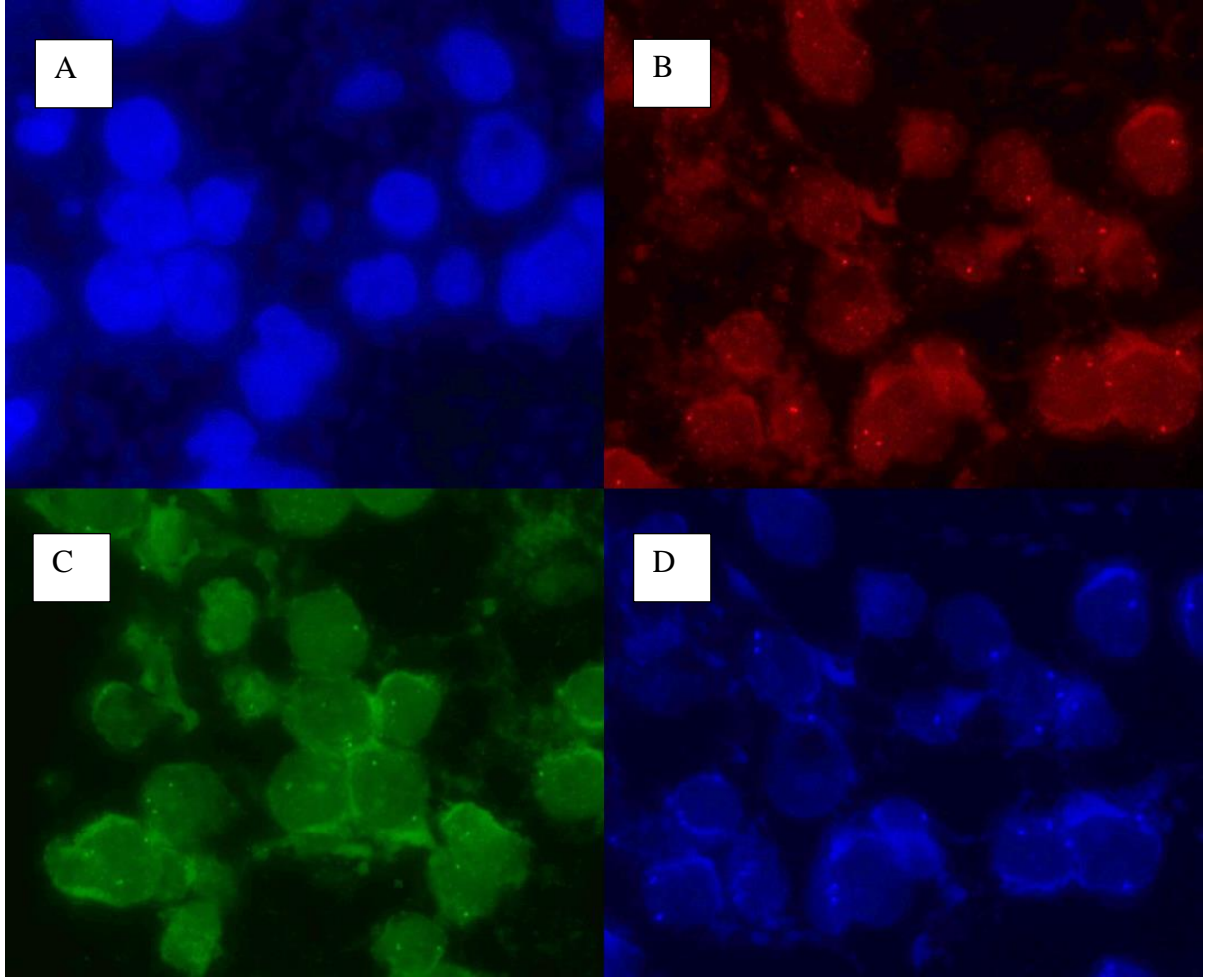
PDGFR- α /CEP4 sentromer oranı değerlendirilir.

Normal sonuç: PDGFR- α /CEP4 sentromer sinyal oranı <2 ise, her hücrede ortalama PDGFR- α sinyal sayısı <4 ise ve değerlendirilen hücre sayısı invaziv tümör alanının >10 'undan fazlaysa normal sonuç verilir.

Hafif düzeyde gen kopya sayısı artışı: PDGFR- α /CEP4 sinyal oranı <2 iken her hücrede ortalama PDGFR- α kopya sayısı 4-6 ise ve değerlendirilen hücre sayısı invaziv tümör alanının >10 'undan fazlaysa hafif düzeyde gen kopya sayısı artışından bahsedilir.

Amplifikasyon: PDGFR- α /CEP4 sinyal oranı ≥ 2 ise amplifikasyon olarak değerlendirilir (109).

Çalışmamızda, 4q12 bölgesinde PDGFR- α amplifikasyon ve 4p11-q11 sentromer bölgesinde CEP4 polizomi durumunu belirlemek için 100 komşu, üst üste binmeyen tümör hücresindeki turuncu, yeşil (belirleyici) ve aqua (referans) sinyaller sayılarak, turuncu ve yeşil/aqua sinyal oranı 2'nin üstünde olan veya aqua sinyal artışı olmadan sadece turuncu ve yeşil sinyallerde >6 olan vakalarda amplifikasyon var kabul edildi.



Resim 2: PDGFR- α /CEP4 FISH çalışmasında görülen sinyallerin fotoğrafları (amplifikasyon ve polizomi açısından negatif vakaya ait)

A: PDGFR- α /CEP4 prob DAPI görüntüsü

B: 4q12 lokusu kırmızı renk ile işaretli 3' bölgesi

C: 4q12 lokusu yeşil renk ile işaretli 5' bölgesi

D: 4p11-q11 mavi renk ile işaretlenen 4.kromozom sentromer bölgesi

4.4. FISH İLE 1P VE 19Q DEĞERLENDİRİLMESİ

60 vakaya ait “makro array” bloklarından hazırlanan kesitlerde “LSI 1p36/ LSI 1q25 ve LSI 19q13/ LSI 19p13” dual probu (Vysis) kullanılarak FISH yöntemiyle 1p36 ve 19q13 gen bölgelerinin kaybı (LOH) incelenmiştir. Seçilen tüm vakalara tanı sırasında bu inceleme yapılmış olup bilgisayar ortamında değerlendirmeleri tekrar edilmiştir.

FISH uygulaması yapılan lamalar, bilgisayar bağlantılı floresans mikroskopunda (Olympus BX61; Olympus Optical, Japonya) değerlendirilmiştir. Bilgisayar ortamında görüntüleme dijital kamera (XLMM, Dage-MTI, IN, ABD) ve uyumlu yazılım (Duet®, Bioview Ltd., İsrail) kullanılmıştır.

FISH tekniğinde, kromozom 1 ve 19 için ayrı ayrı çift renkli prob içeren (yeşil ve turuncu) yaklaşımla çalışıldı (Vysis Abbott Laboratories, Abbot Park, IL, USA). Hedef problemler subtelomerik 1p36 ve 19q13.3 ile hibridize olurken (turuncu renkli sinyal), kontrol problemleri 1q ve 19p ile hibridize oldu (yeşil renkli sinyal). İki yüz komşu, üst üste binmeyen interfaz nükleusundaki parasentromerik (yeşil renkli) ve subtelomerik (turuncu renkli) sinyaller sayıldı ve sinyal oranları değerlendirildi.

Kromozom 1p durumunun değerlendirilmesi:

1p FISH probu, iki kromozom bölgesinin değerlendirilmesine olanak tanır:

1p36 ve 1q25 probu ile hibridize olan normal bir hücrede, iki turuncu ve iki yeşil sinyal görülür. Bu, kromozom 1'in iki intakt kopyası olduğunu bize gösterir. 1p36 bölgesinde kayıp olan anormal bir hücrede ise, ikiden daha az sayıda turuncu sinyal gözlenir (112).

Kromozom 19q durumunun değerlendirilmesi:

19q FISH probu, iki kromozom bölgesinin değerlendirilmesine olanak tanır:

19q13 ve 19p13 probu ile hibridize olan normal bir hücrede, iki turuncu ve iki yeşil sinyal görülür. Bu, kromozom 19'un iki intakt kopyası olduğunu bize gösterir. 19q13 bölgesinde kayıp olan anormal bir hücrede ise, ikiden daha az sayıda turuncu sinyal gözlenir (112).

Çalışmamızda, hem kromozom 1p'nin hem de 19q'nun delesyon durumunu belirlemek için 200 komşu, üst üste binmeyen tümör hücresindeki turuncu (belirleyici) ve yeşil (referans) sinyaller sayılarak, turuncu (subtelomerik) /yeşil (parasentromerik) sinyal oranı 0.70'in altında olan vakalarda delesyon var kabul edildi. Değerlendirmesi daha güç olan ve arada kalan durumlarda ise sinyal sayılan hücre sayısı 200'ün üzerine çıkarıldı.

4.5.İMMÜNOHİSTOKİMYA UYGULAMALARI

Glial tümörlerin patolojik tanı aşamasında IDH1, p53, Ki-67 ve ATRX immünohistokimyası rutin olarak uygulandığından olgulara ait önceden boyanmış IDH1, p53, Ki-67 ve ATRX immünohistokimya lamaları patoloji arşivinden çıkarılarak semikantitatif değerlendirilmiştir.

4.5.1.Histopatolojik değerlendirme

Tümörlerin histolojik tipleri DSÖ 2016 SSST sınıflamasına göre yeniden değerlendirilmiştir. Değerlendirme esnasında nekroz/palizatlaşan nekroz, mitoz/atipik mitoz, mikrovasküler proliferasyon gibi DSÖ derecelendirmesi için gerekli histomorfolojik bulguların varlığı değerlendirildi. Oligodendroglial ve astrositik alanlar tekrar belirlendi. Bu değerlendirmeler sonucunda gerekli görüldüğü durumlarda orijinal patoloji raporundaki tanılarda değişiklik yapıldı.

4.5.2.IDH1, p53, Ki-67 ve ATRX İmmünekspresyonlarının Değerlendirilmesi

Olgularda p53, Ki-67 ve ATRX için nükleer boyanma, IDH1 için ise sitoplazmik granüler boyanma dikkate alınmıştır.

Ki67 değerlendirmesi; Ki67 skoruna ait bilgiler, vakaların patoloji raporu kayıtlarından elde edilmiştir. Ki67 skoru ayrıca gruplara ayrılarak da incelenmiştir. Merkezimizdeki uygulamalardaki deneyimler temel alınarak tespit edilen ve literatürde kimi çalışmalarda da kullanılan eşik değerlere göre Ki67 skorları ayrıca %0-%<%5 için grup 1; %5-%<%10 için grup 2; %10-%<%30 için grup 3; %30 ve daha yüksek için grup 4 olacak şekilde gruplanarak da değerlendirilmiştir (113).

P53 değerlendirmesi; Tümörde nükleer boyanma semikantitatif olarak yüzde (%) cinsinden hesaplanmıştır. Literatürdeki değerlendirmeler göz önüne alınarak skora yapılmıştır (114).

Buna göre;

0= Tümör hücrelerinin %10 ve daha azında nükleer boyanma (Mutasyon yok)

1+ = Tümör hücrelerinin en az %11, en fazla %25'inde nükleer boyanma

2+ = Tümör hücrelerinin en az %26'sında en fazla %50 sinde nükleer boyanma

3+ = Tümör hücrelerinin %50'den fazlasında nükleer boyanma

IDH1 değerlendirilmesi; Tümörde sitoplazmik granüler boyanma ve boyanma şiddeti değerlendirilmiştir. Boyanma izlenen tüm olgular yaygınlığına bakılmaksızın “IDH1 mutasyonu var” olarak değerlendirilmiştir. Boyanma şiddeti ise zayıf, orta şiddette ve kuvvetli olarak değerlendirilmiştir.

ATRX değerlendirilmesi; Tümörde nükleer boyanma semikantitatif olarak yüzde (%) cinsinden hesaplanmıştır. Buna göre %10'un altında boyanma olan olgular literatür göz önüne alınarak “mutasyon var”, % 10'dan fazla boyanma elde edilen olgular ise “mutasyon” yok olarak değerlendirilmiştir (87). Tümör hücrelerinin aynı tümörün farklı odaklarında farklı şiddetlerde boyandığı gözlemlenmiş ve bu nedenle boyanma şiddeti verilmemiştir. Tümöre ait kesitlerde izlenen damar endoteli ve normal glial hücreler ATRX ile boyanma gösterebildiğinden dolayı internal pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

4.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ YÖNTEMLERİ

Tanı, derece, hücresel komponent (pür oligodendrogial, mikst oligoastroitik ve pür astroitik), yaş, cinsiyet, tümörün yerleşim gösterdiği lob değişkenleri arasında; incelenen genetik değişiklik ve immünohistokimyasal ekspresyon sonuçlarının istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterip göstermediğini değerlendirmek için, p değeri 0.05'ten küçük durumlar anlamlı kabul edilmek üzere;

Çalışmamızda verilerin istatistiksel analizi için SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL, USA) programının 21.0 versiyonu kullanıldı. Tanımlayıcı istatistiklerinde sürekli değişkenler için ortalama değer, standart sapma, ortanca, minimum ve maksimum değerler; kesikli değişkenler için ise sayı ve yüzde değerleri hesaplandı.

Başlangıç analizleri olarak normal dağılımın değerlendirilmesinde Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri kullanıldı. İki grup arası karşılaştırmalarda parametrik verilerde Bağımsız gruplarda t testi, nonparametrik verilerde Mann Whitney U ve ki kare testi kullanıldı. İki'den fazla gruplar arası karşılaştırmalarda parametrik verilerde One way ANOVA, non parametrik verilerde Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Post-hoc analizler için Mann Whitney U testi kullanılıp istatistiksel anlamlılık düzeyi Bonferroni düzeltmesiyle saptandı.

İkili verilerin korelasyon analizleri için Kendall's tau-b testi kullanılmış olup, korelasyon gücü açısından $r=0.00-0.24$ zayıf; $0.25-0.49$ orta; $0.50-0.74$ güçlü; $0.75-1.00$ çok güçlü olarak kabul edilmiştir.

Sağ kalım analizleri için Kaplan- Meier sağ kalım analizi gruplar arası sağ kalım eğrilerini karşılaştırmak için Log rank analizi (Mantel Cox) kullanılmıştır.

Sağkalım analizi hem histopatolojik tanı hem de entegre tanıya göre yapılmıştır.

Sonuçlar %95 güven aralığında değerlendirilerek $p<0,05$ istatistiksel anlamlılık olarak tanımlandı.



5.BULGULAR

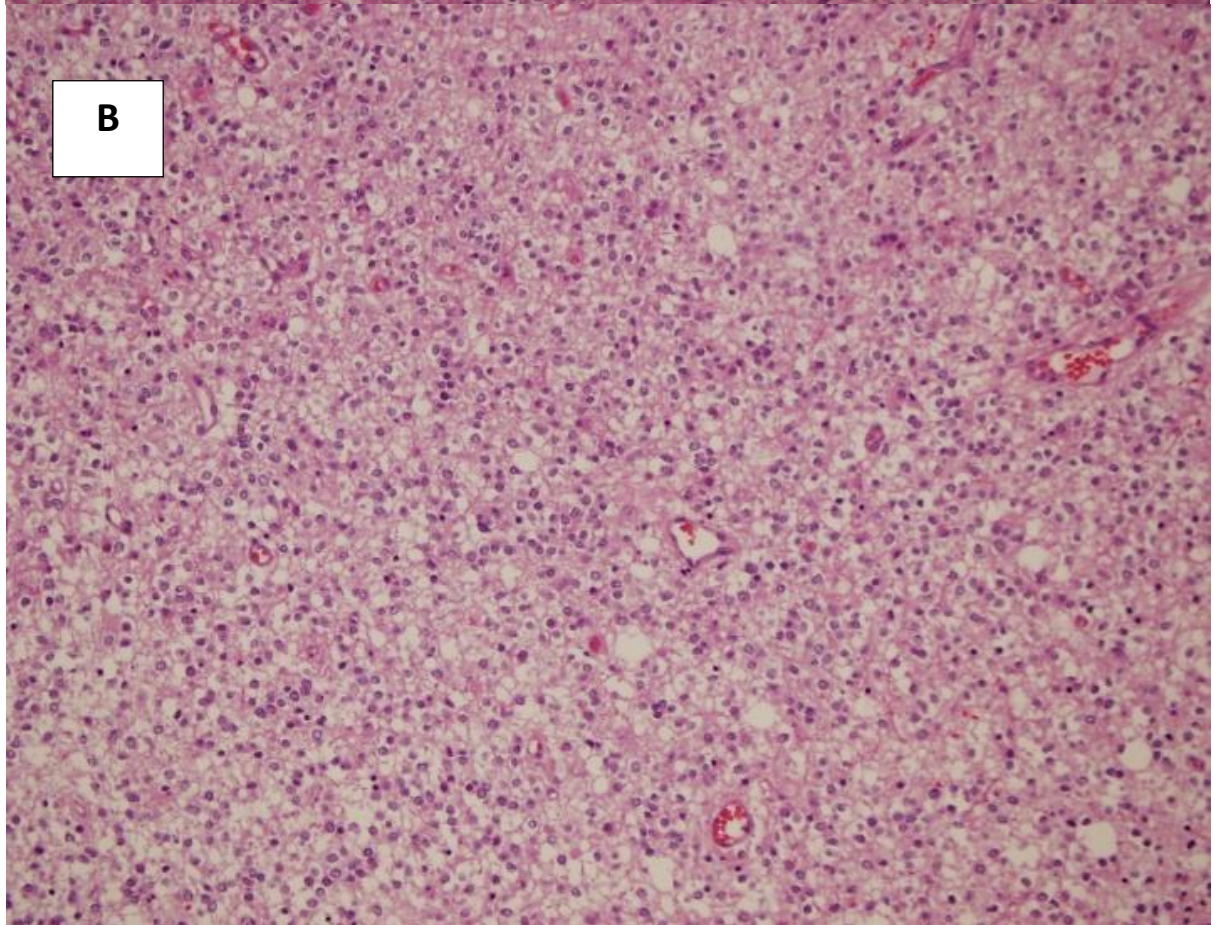
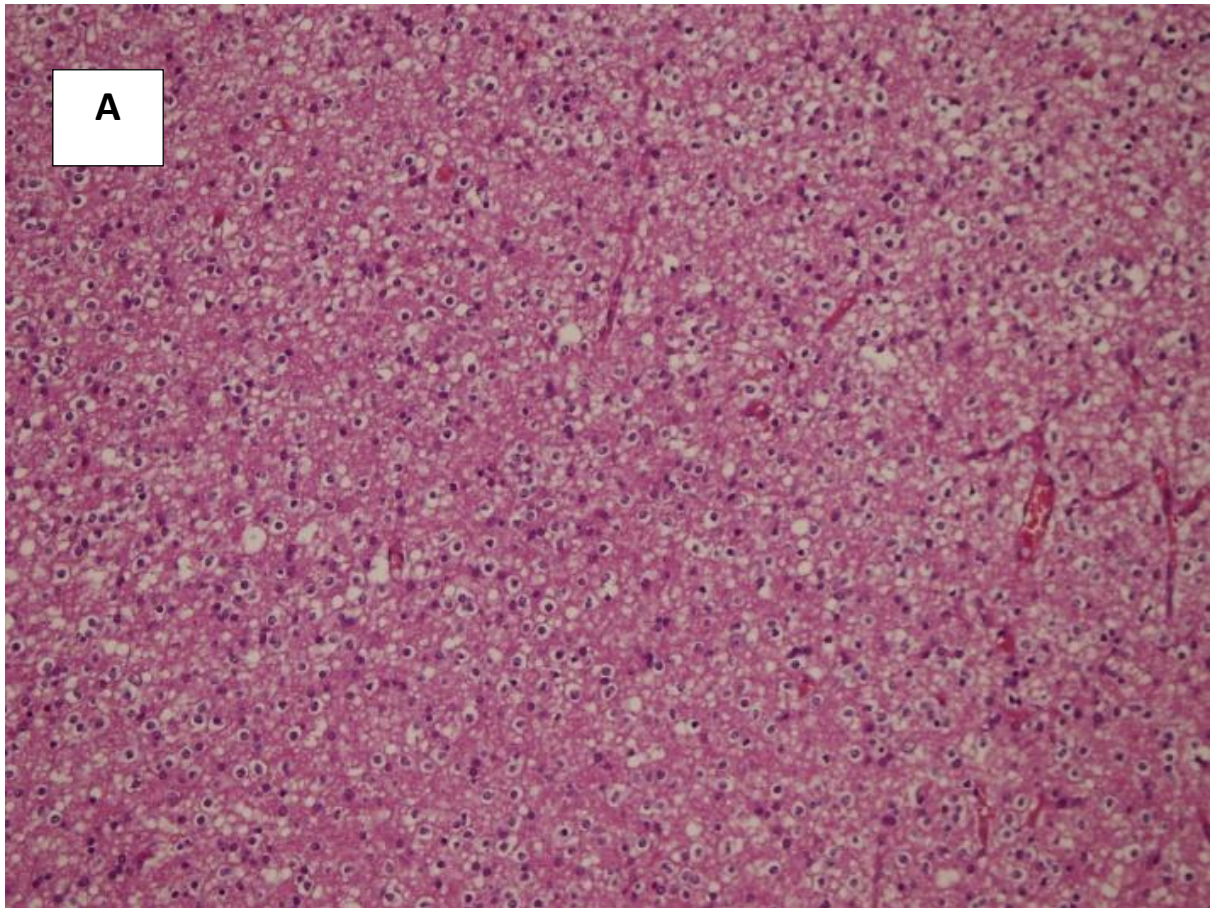
5.1.VAKALARIN KLİNİK VE HİSTOPATOLOJİK ÖZELLİKLERİ

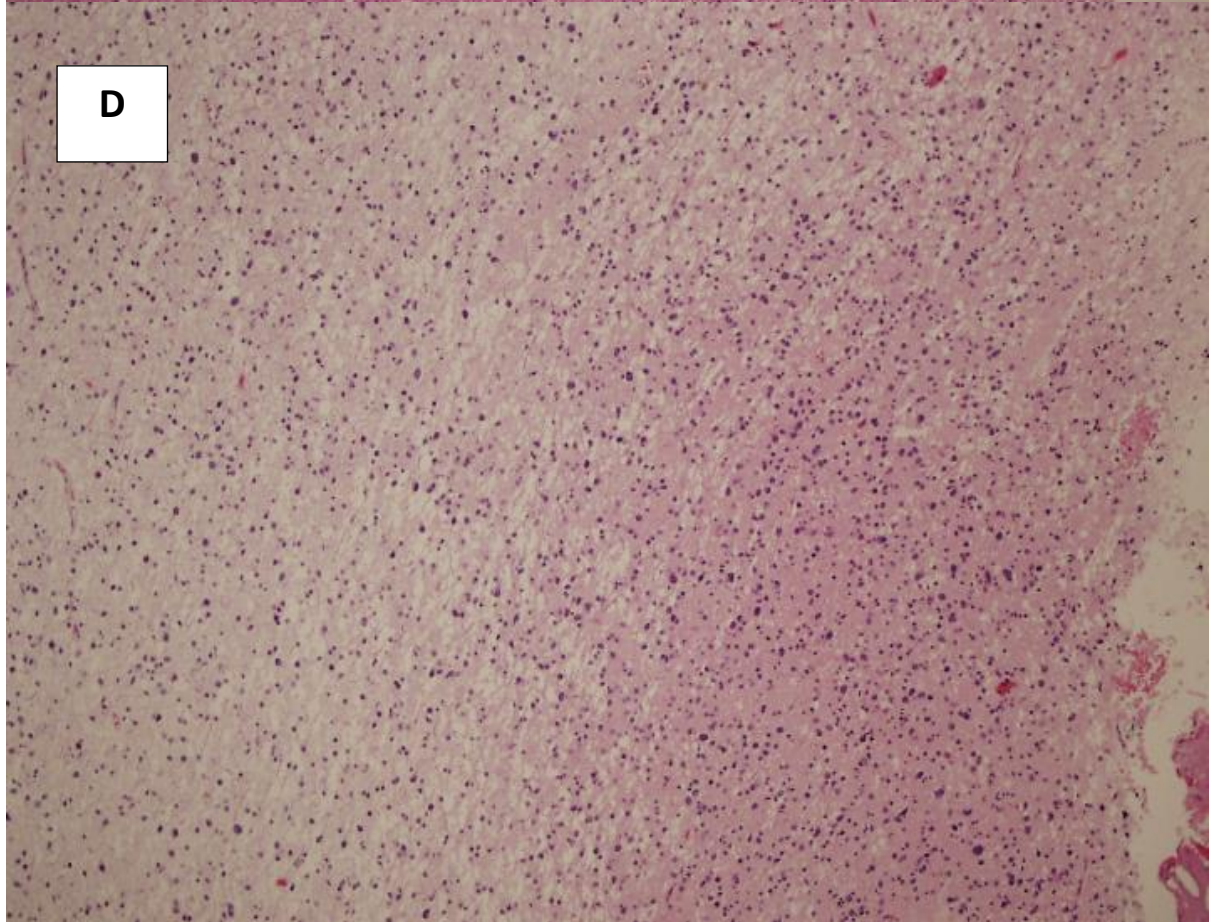
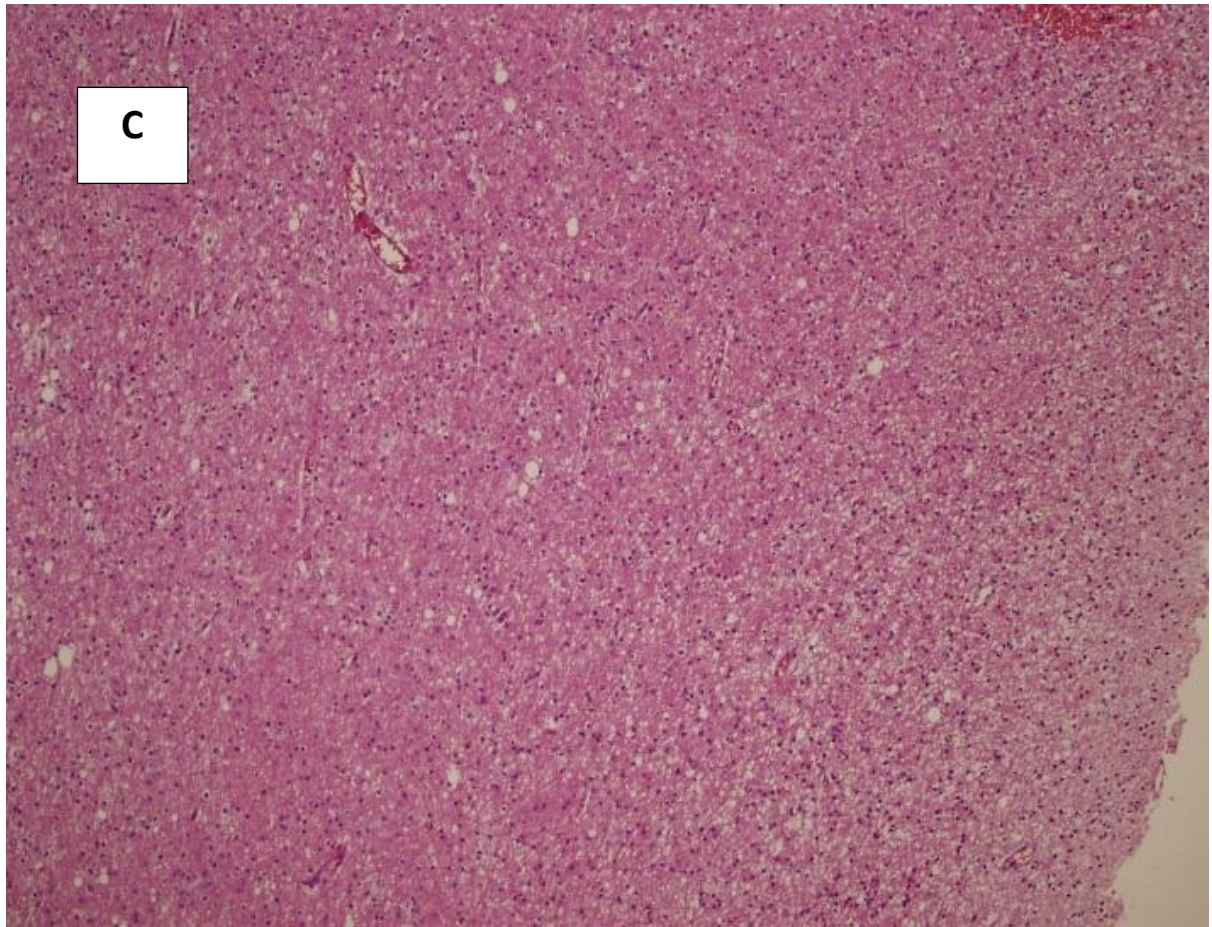
Değerlendirilen 60 olgudan histopatolojik olarak 19'u OD (%31.6), 10'u AOD (%16.6), 19'u OA (%31.6), 8'i AOA (%13.3), 2'si A (%3), 2'si AA (%3) tanılıydı (Resim 3). Hastaların tanı aldıkları yaşları 12 ile 69 arasında olup, ortalama değer 39.65; ortanca değer 44; standart sapma 11.43'dür. Olguların 24'ü (%40) kadın, 36'sı (%60) erkektir. Yaş ortalaması kadınlarda 38.91, erkeklerde 40.13'tür.

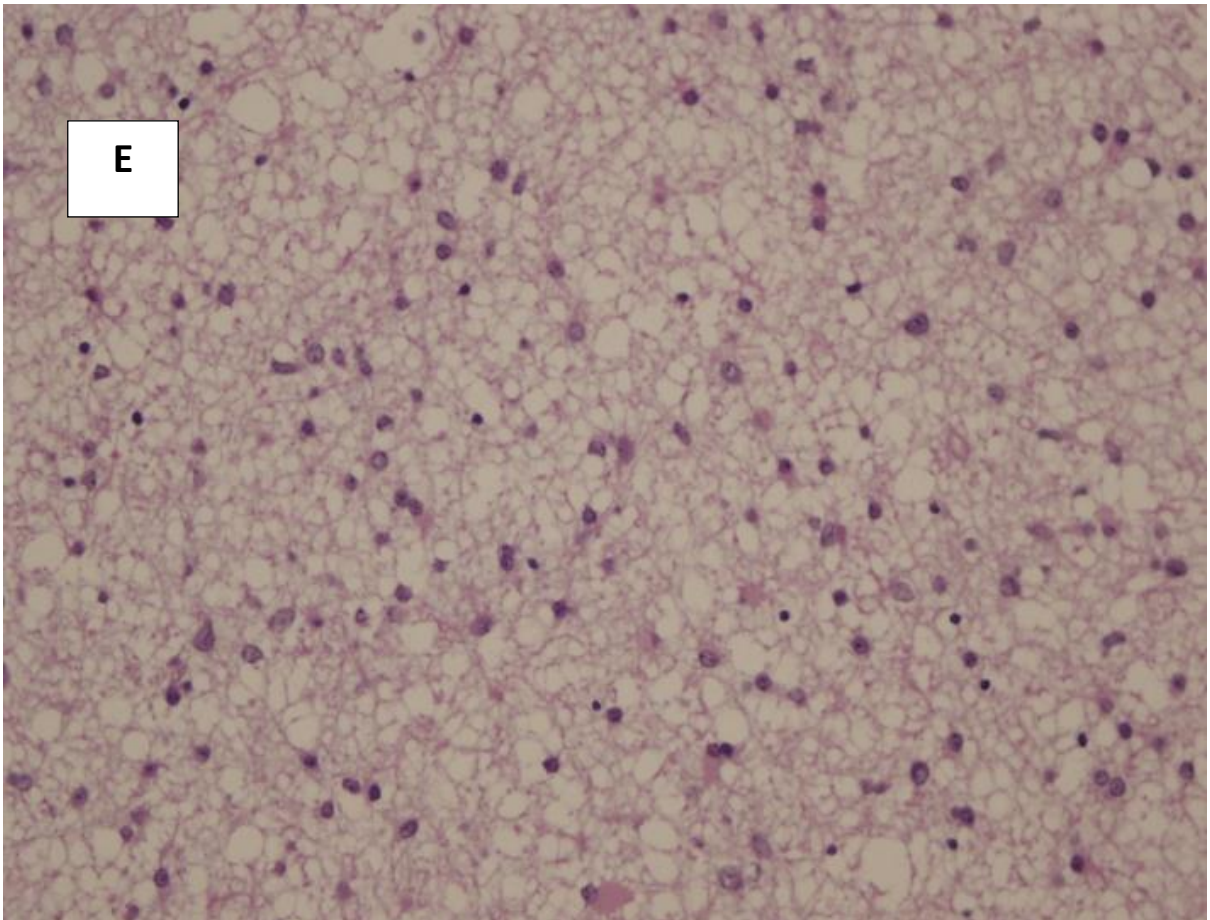
Yerleşim yeri bilinen tümörlerin 24'ü frontal (%40) , 12'si (%20) frontotemporal, 6'sı (%10) paryetal, 6'sı (%10) temporal, 5'i (%8) insüler, 4'ü (%6) frontoinsüler, 1'i (%1,6) frontoparyetal, 1'i (%1,6) temporoparyetooksipital yerleşim göstermektedir. 1 tümörün yerleşim yeri bildirilmemiştir.

Hastaların klinik bilgileri, histopatolojik tanıları, immünohistokimyasal ve moleküler testler sonucu verilen entegre tanıları ve uygulanan genetik değişikliklerin sonuçları tablo 8'de verilmiştir.

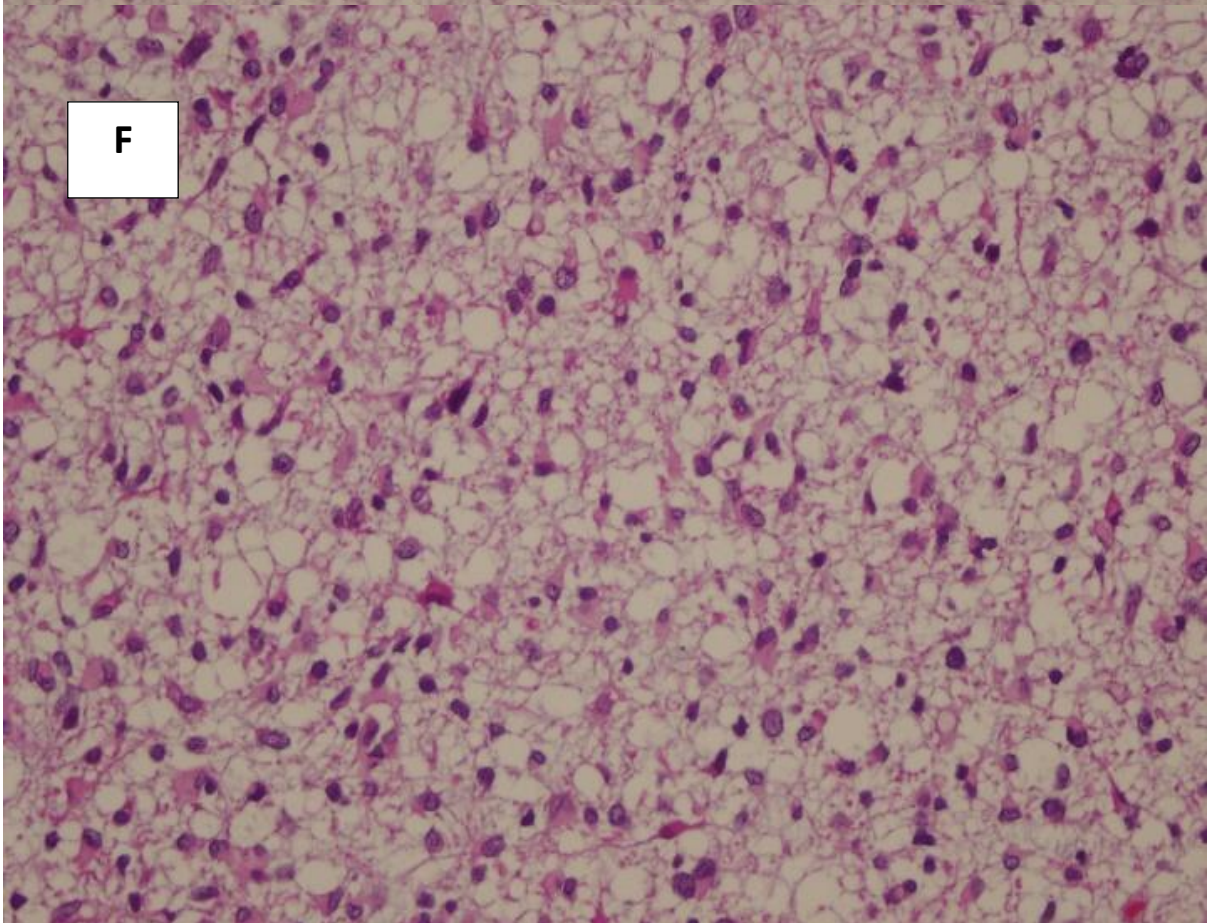
Çalışmamızda tanı grupları, derece, hücresel komponent, cinsiyet, hasta yaşı, tümörün yerleşim gösterdiği lob ile elde edilen immünohistokimyasal ve moleküler değişiklikler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunup bulunmadığı sorgulanmıştır.







E



F

Resim 3: Histopatolojik tanılardan örneklere ait mikroskopik fotoğraflar**A.** Oligodendrogliom. **B.** Anaplastik oligodendrogliom. **C.** Oligoastrozitom.**D.** Anaplastik oligoastrozitom **E.** Astrozitom **F.** Anaplastik astrozitom

(H/E; orijinal büyütme: A, B:200X C, D: 100X, E, F:400X)

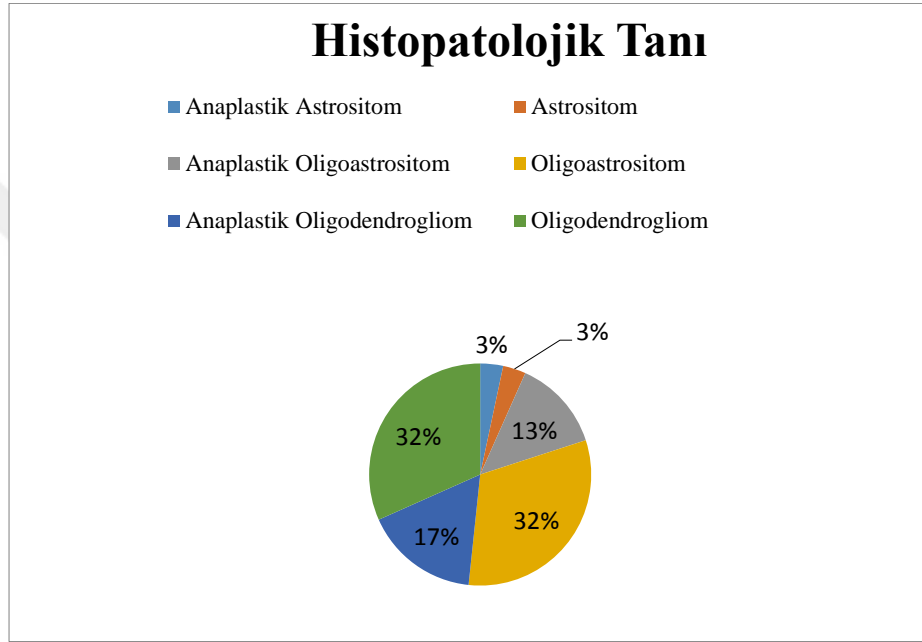
Vaka no	Yaş	Cinsiyet	Histopatolojik Tanı	Lokalizasyon	Tümör çapı (cm)	Kontrast tutulumu	IDH-1 eksp.	IDH1 mut.	IDH2 mut.	ATR-X mut.	1p kaybı	19q kaybı	p53 eksp.	Ki-67 skoru (%)	Entegre tanı	PDGFR- α amp.	CEP4 polizomi
1	69	E	AOA	F-İ	6	P	P	P	N	N	P	P	N	12	AOD	N	N
2	48	E	OA	F	B	B	P	B	B	N	P	P	N	2	OD	N	N
3	38	E	OA	F-T	3,5	N	P	P	N	P	N	N	N	3	A	N	P
4	44	E	OA	F	2	P	P	B	B	N	P	P	N	1	OD	N	N
5	28	K	AOA	P	4,5	N	P	P	N	P	N	N	P(1+)	5	AA	B	B
6	47	E	OA	F-T	4	B	P	P	N	P	N	P	P(2+)	5	A	B	B
7	32	E	OD	T	4,5	B	N	N	P	N	P	P	N	3	OD	N	N
8	42	E	OA	T	5	N	P	P	N	P	N	N	N	4	A	N	P
9	27	E	OA	F	3,5	N	P	B	B	N	P	P	N	1	OD	N	N
10	40	E	AOD	F	B	B	P	B	B	N	P	P	N	15	AOD	N	N
11	39	E	OA	F	2,5	P	P	P	N	N	P	P	N	6	OD	B	B
12	40	E	OA	İ	6	N	P	P	N	P	N	P	N	3	A	B	B
13	41	K	AOA	F	5	N	P	B	B	N	N	N	P(3+)	50	AA	N	P
14	27	K	OA	F-P	4,5	N	P	B	B	P	N	N	P(3+)	3	A	N	N
15	43	K	AOD	F	2,9	N	P	B	B	N	P	P	N	20	AOD	N	P
16	24	E	OA	F-İ	2	P	P	B	B	P	N	N	P(1+)	10	A	B	N
17	32	K	OD	İ	0,3	P	N	N	P	N	P	P	N	2	OD	N	N
18	35	K	OD	T	0,7	P	P	B	B	N	P	P	N	2	OD	N	N
19	38	E	AOD	F	3	N	P	P	N	N	P	P	N	9	AOD	N	N
20	12	E	AOA	F-T	7	N	N	N	N	N	P	P	N	50	AOD	N	N
21	39	E	OA	F-T	7	N	P	N	N	N	P	P	N	2	OD	B	B
22	49	E	AOA	F-T	2,5	P	P	B	B	P	P	P	P(1+)	20	AOA	N	N
23	30	K	OA	F	3	B	P	B	B	N	P	P	N	2	OD	B	B
24	47	E	AOA	F	2	N	P	P	N	N	P	P	N	50	AOD	N	P
25	44	E	OA	F	4	P	P	P	N	N	P	P	N	0,5	OD	N	N
26	57	K	AOD	P	3,6	P	N	P	N	N	P	P	P(3+)	30	AOD	N	P
27	28	E	OA	T	4	N	P	B	B	N	P	P	N	2	OD	N	N
28	57	E	OA	İ	5,2	N	N	N	N	N	N	N	P(1+)	0,5	A	N	N

29	37	E	OA	B	B	B	P	B	B	N	N	N	P(1+)	4	A	N	N
30	28	K	OA	F-T	4	N	P	B	B	P	N	P	P(2+)	5	A	B	B
31	46	K	AOA	F	4	N	P	N	N	N	P	P	P(1+)	8	AOD	N	P
31	49	K	OA	P	8	N	N	N	N	N	N	N	P(1+)	4	A	N	N
33	42	E	AOA	F	3,5	N	P	B	B	N	P	P	N	15	AOD	N	N
34	39	K	OD	F	3,5	N	P	B	B	P	N	N	N	30	A	N	N
35	26	K	OD	F	5	N	P	B	B	N	P	P	N	7	OD	N	N
36	34	K	OD	F-T	3,5	N	P	B	B	N	P	P	N	0,5	OD	N	P
37	25	E	OD	P	2,1	B	P	B	B	N	P	P	N	3	OD	N	N
38	48	E	OD	İ	3	N	P	B	B	N	P	P	N	1	OD	B	B
39	35	E	OD	F	5	N	P	B	B	N	P	P	N	3	OD	N	N
40	31	K	OD	F	7,5	N	P	B	B	N	P	P	N	0,5	OD	N	N
41	32	E	OA	F	4,5	N	P	B	B	N	N	N	P(1+)	2	A	N	N
42	66	K	AOD	P	3	N	P	B	B	N	P	P	N	15	AOD	N	N
43	56	K	AOD	F	4	N	P	B	B	N	P	P	N	10	AOD	N	N
44	41	K	AOD	T	6	N	P	P	N	N	P	P	N	3	AOD	N	N
45	38	K	OD	F-T	1,5	P	P	B	B	N	P	P	N	3	OD	N	N
46	43	E	OD	P	2,5	P	P	B	B	N	P	P	N	2	OD	N	N
47	30	K	A	F-İ	3	N	P	B	B	P	N	N	P(2+)	5	A	N	N
48	38	E	OD	T	3,5	N	P	B	B	N	B	B	N	2	OD NOS	B	B
49	59	E	OD	F	2	N	P	B	B	N	P	P	N	6	OD	B	B
50	53	K	AOD	F	6	P	N	P	N	N	P	P	N	10	AOD	N	N
51	42	E	AA	İ	2	N	N	P	N	P	N	N	P(3+)	15	AA	N	P
52	30	E	A	F	3	N	P	B	B	P	N	N	P(2+)	6	A	N	P
53	32	E	AA	F	4,5	N	P	B	B	P	N	N	P(2+)	4	AA	N	P
54	53	K	OD	F-T	3,5	N	P	B	B	N	P	P	N	10	OD	N	P
55	38	E	OD	F-T	3,7	N	P	B	B	N	P	P	N	10	OD	N	N
56	26	E	OD	F-T	5	N	P	B	B	N	P	P	N	4	OD	N	P
57	27	K	OD	F-T	5	N	P	B	B	N	P	P	N	2	OD	N	N
58	58	E	AOD	F	3	N	P	B	B	N	P	P	N	2	AOD	N	N
59	24	K	OD	F-İ	3	N	P	B	B	N	P	P	N	2	OD	B	B
60	56	E	AOD	T-P-O	7	N	P	B	B	N	P	P	N	8	AOD	N	N

Tablo 8: Olguların klinik ve moleküler özellikleri OD: Oligodendrogliom, AOD: Anaplastik oligodendrogliom, OA: Oligoastrocitom, AOA: Anaplastik oligoastrocitom, A: Astrocitom, AA: Anaplastik astrocitom, P: Pozitif, N: Negatif, F: Frontal, T: Temporal, P: Paryetal, O: Oksipital, İ: İnsular, B: Bilinmiyor-Bilgi yok, Y: Yüksek, D: Düşük

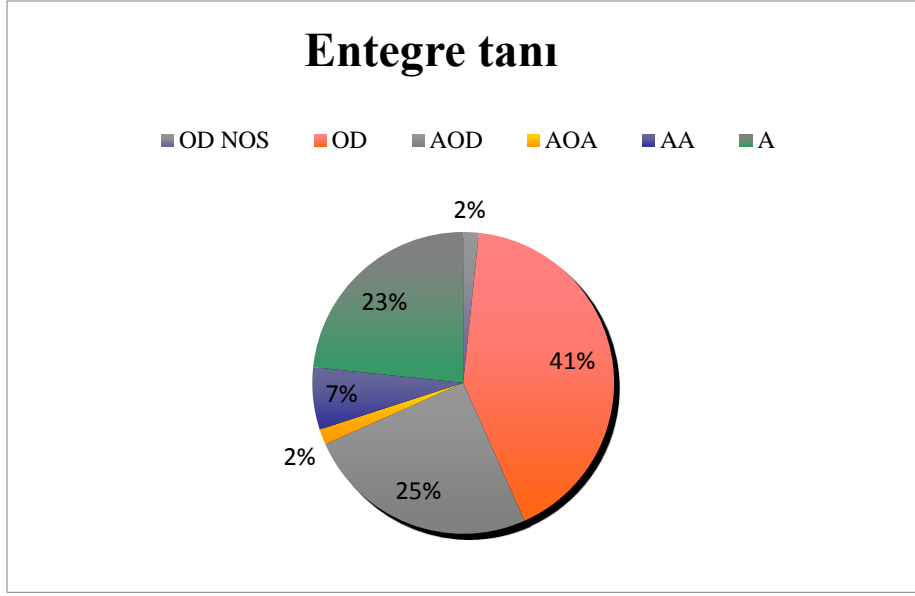
5.2.HİSTOPATOLOJİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Yukarıda belirtildiği gibi histopatolojik olarak 60 olgudan 19'u OD (%31.6), 10'u AOD (%16.6), 19'u OA (%31.6), 8'i AOA (%13.3), 2'si A (%3), 2'si AA (%3) tanılıydı (Grafik 1). Tümörler salt histomorfolojik özelliklerine göre 29 oligodendrogliyal (OD ve AOD), 27 mikst oligoastrostitik (OA, AOA) ve 4 astrositik (A ve AA) olarak sınıflandırılmıştı.

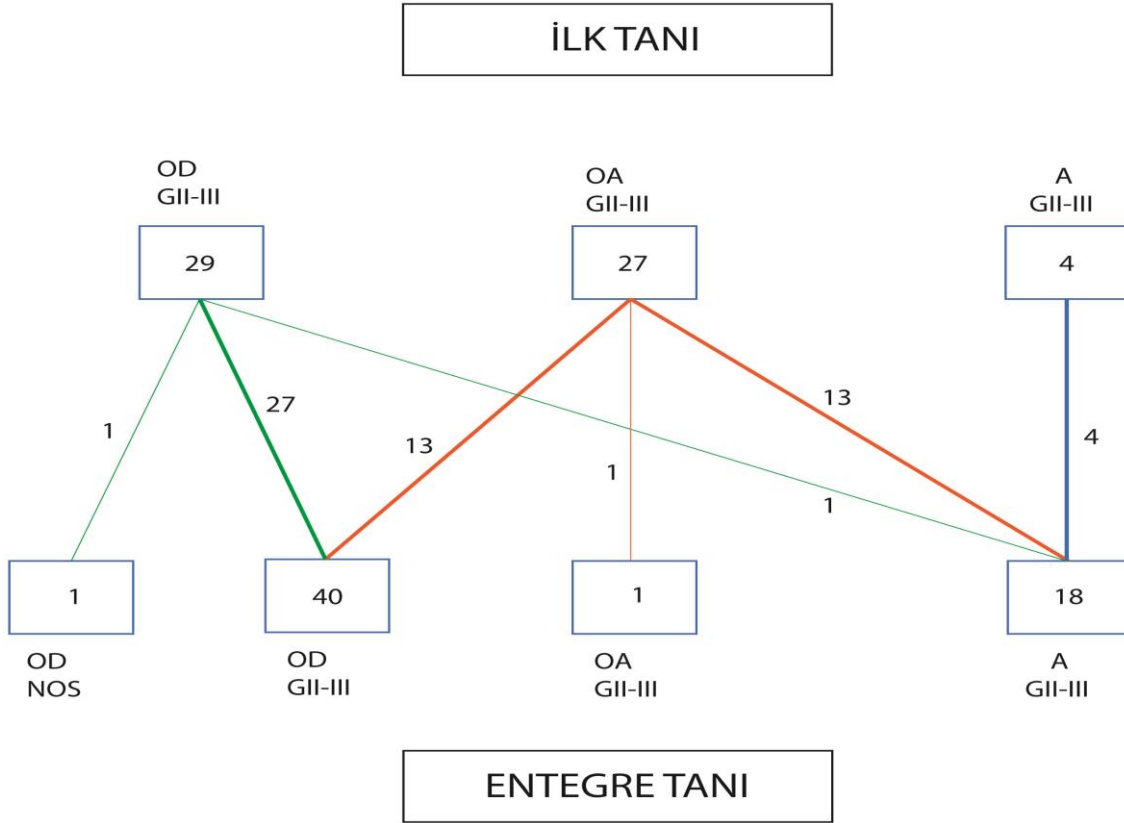


Grafik 1: Salt histopatolojik tanıya göre vakaların sayısı ve oranları

DSÖ SSST 2016 sınıflamasında önerilen genetik değişikliklerden IDH1, p53 ve ATRX immünohistokimyasal olarak uygulanmış, IDH1 ekspresyonu saptanmayan vakalarda Sanger sekans DNA dizi analizi ile IDH mutasyon durumu değerlendirilmiş ve FISH yöntemiyle 1p/19q kaybı olup olmadığına bakılmıştır. Saptanan genetik değişikliklere göre vakaların hepsi yeniden sınıflandırılmıştır (Grafik 2).



Grafik 2: Entegre (Histopatolojik+Moleküler) tanıya göre vakaların sayısı ve oranları

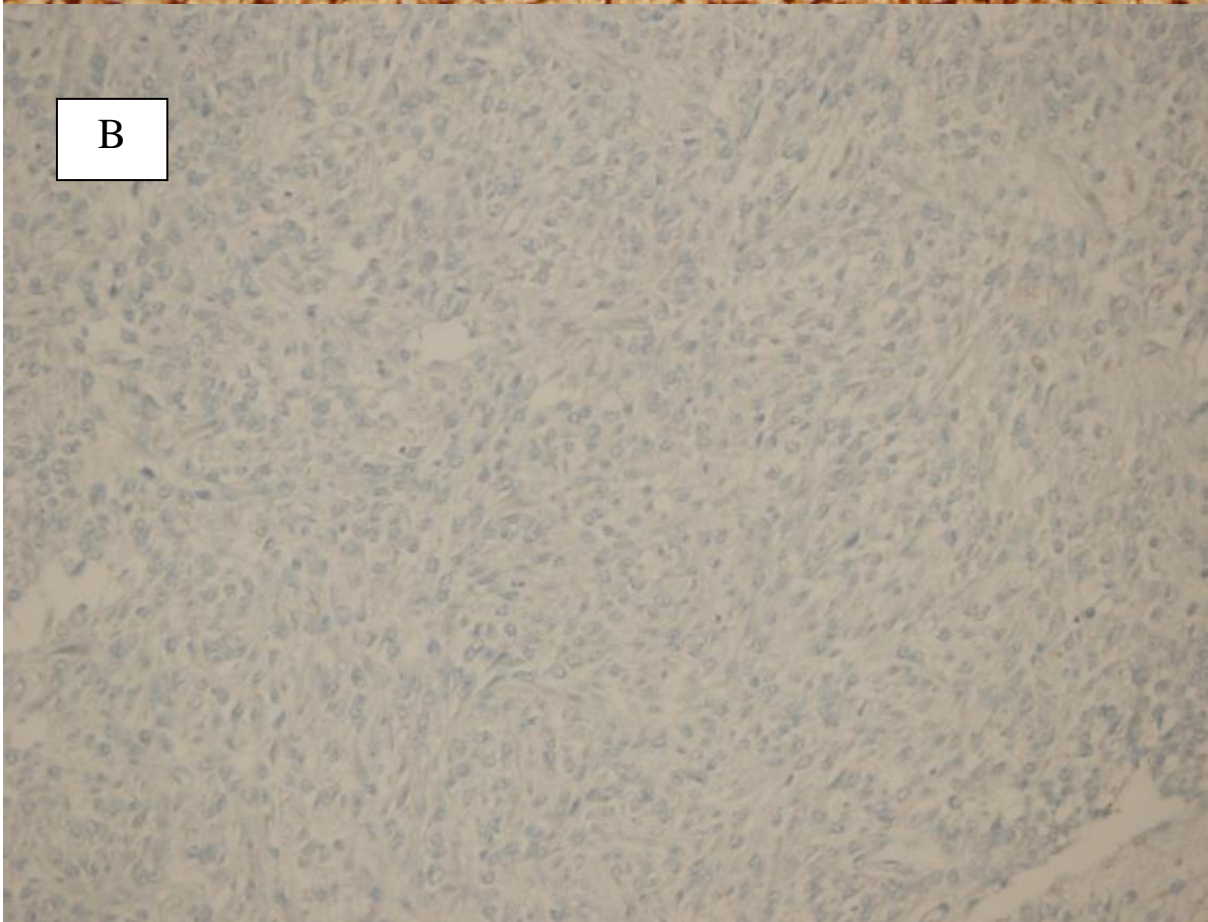


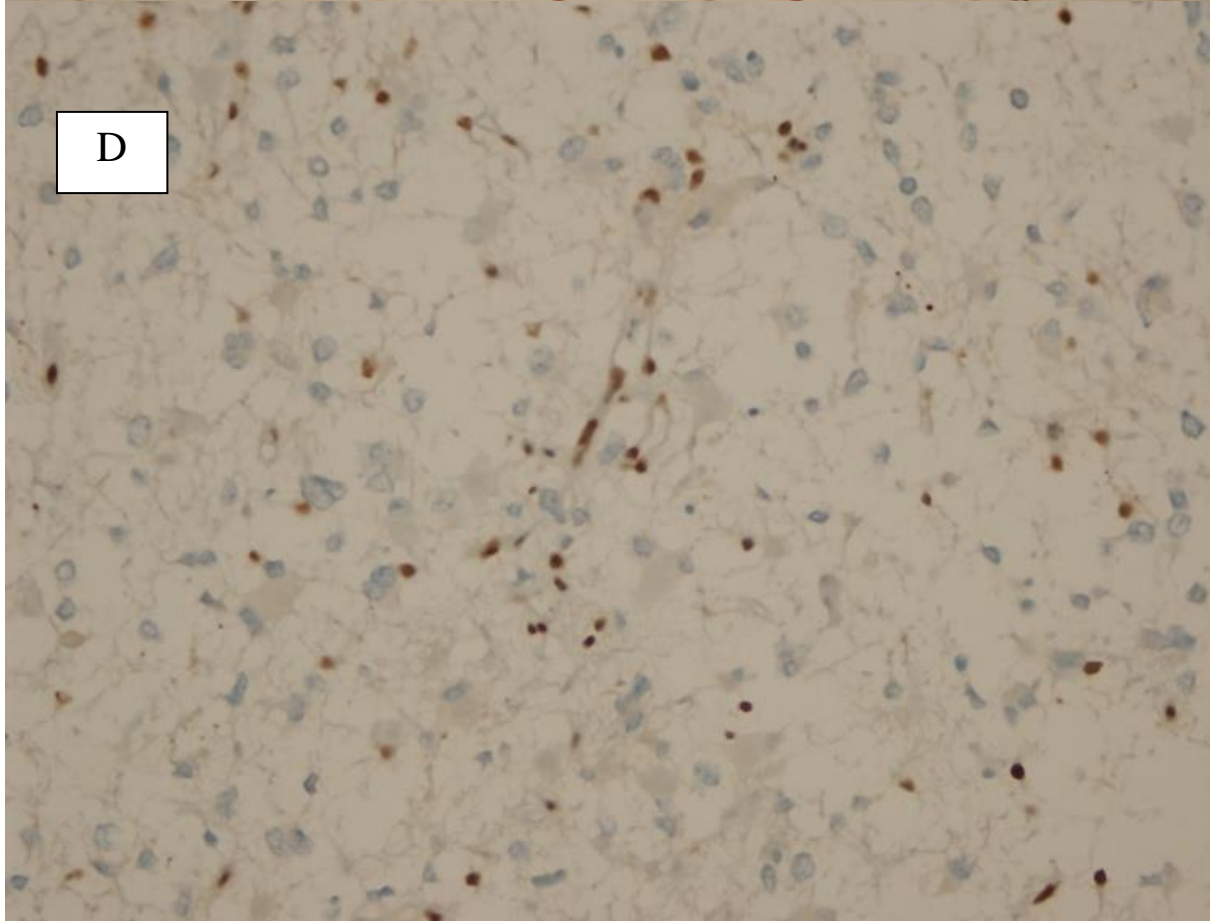
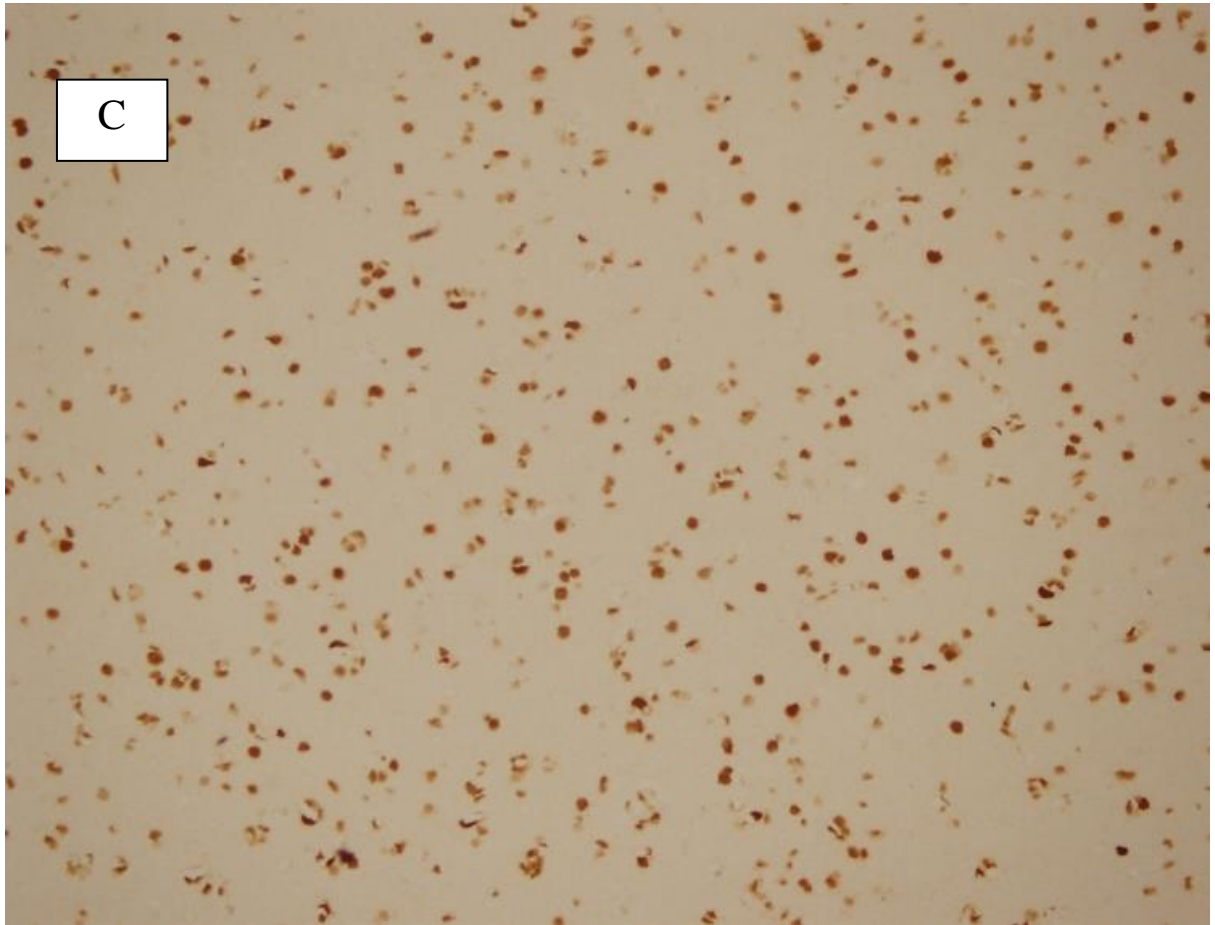
Şekil 7: Vakaların histopatolojik tanıdan (ilk tanı) entegre tanıya (yeni tanı) değişimlerinin sayısal karşılıkları (G: Grade-Derece)

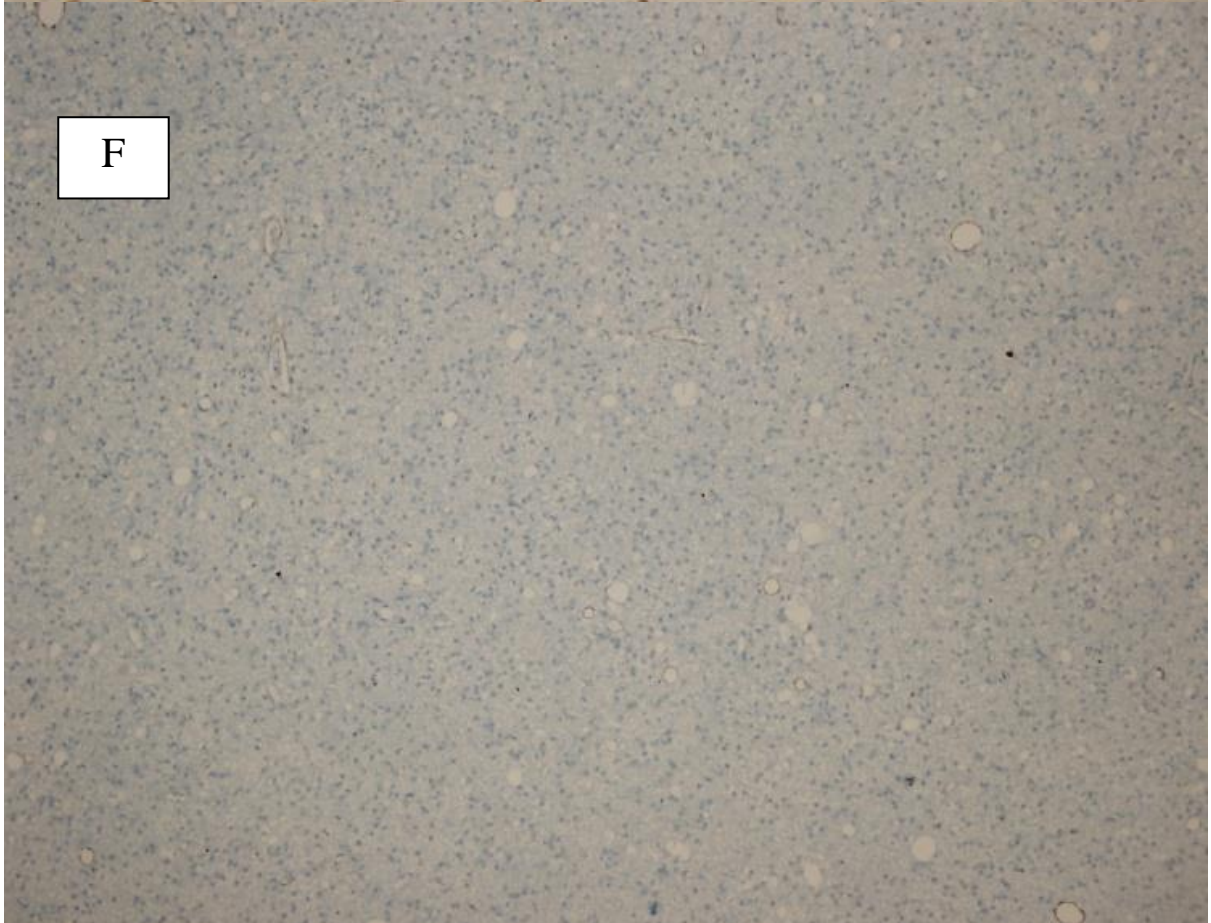
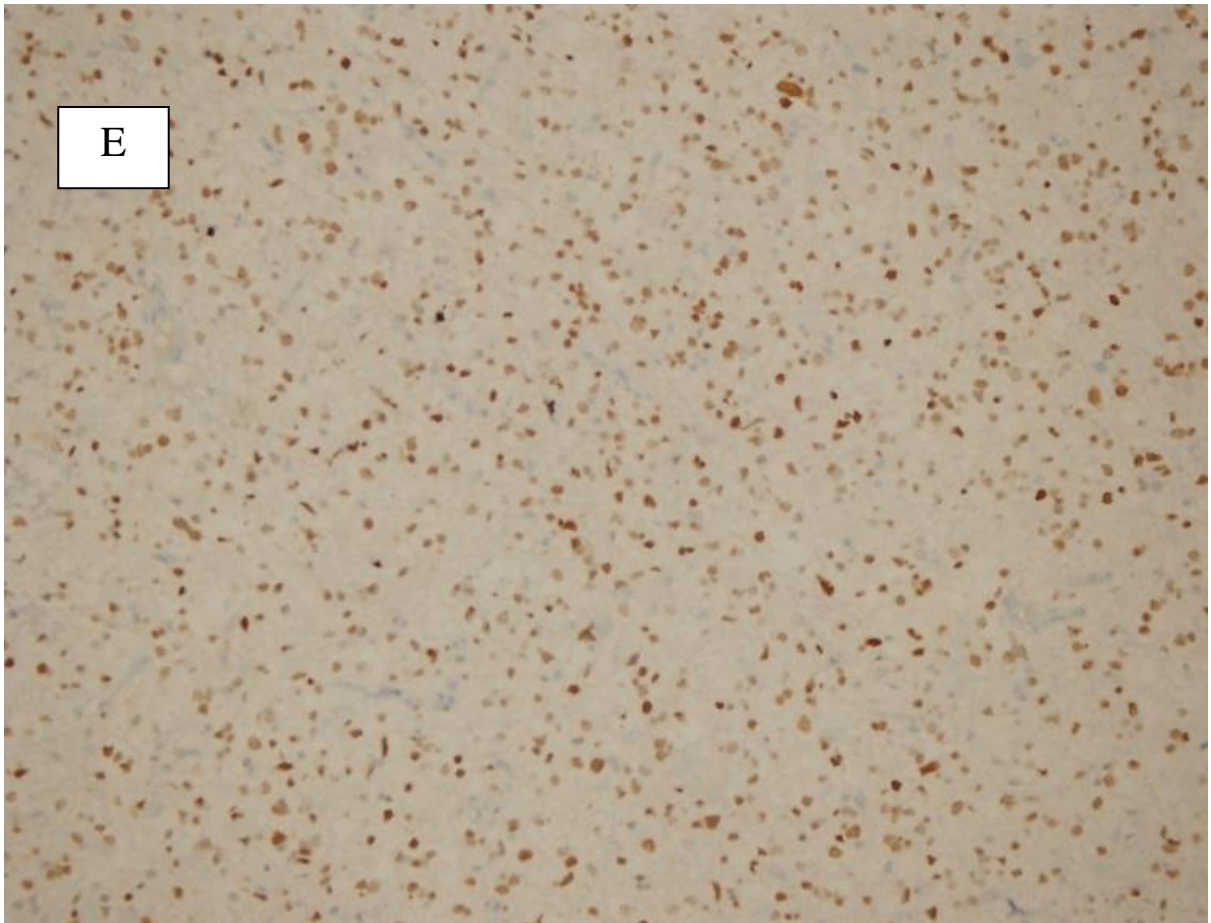
Histopatolojik olarak OD/AOD tanısı verilmiş 29 vakadan 2'sinde (%6.8) yeni bir entegre tanı verilmiştir. 1 vaka OD-NOS, 1 vaka da A tanısı olarak, histopatolojik tanıyla aynı derecede kalarak tanıları değiştirilmiştir. A/AA tanısı verilmiş vakaların hepsi (4/4) entegre tanı sistemiyle yine aynı tanıları almıştır. Histopatolojik olarak OA/AOA tanısı verilmiş olan vakaların neredeyse tamamında (26/27, %96.2) tanı değişmiş, yeni bir entegre tanı verilmiştir. Tanısı tamamen değişen 26 vakanın 13'ü OD/AOD, 13'ü A/AA tanısı almıştır. Histopatolojik olarak AOA tanılı 1 vaka ise entegre tanı sistemiyle de AOA tanısı almıştır. Sonuç olarak çalışmadaki tüm vakalar içinde 28 vakada (%46.6) tanı değişikliği olmuştur (Şekil 7).

DSÖ 2016 SSST entegre sınıflamasına göre vakaların 25'i (%41.6) OD-IDH mutant, 1p/19q kayıplı, 14'ü (%23.3) AOD-IDH mutant, 1p/19q kayıplı, 1'i (%1.6) AOD-IDH mutant olmayan, 1p/19q kayıplı, 1'i (%1.6) OD-NOS, 12'si (%20) A- IDH mutant, 2'si (%3.3) A-IDH mutant olmayan, 4'ü (%6.6) AA-IDH mutant, 1'i (%1.6) AOA tanısı almıştır.

Vakaların immünohistokimyasal özelliklerine ait fotoğraflar resim 4'te verilmiştir.







Resim 4: İmmünohistokimyasal olarak uygulanan genetik değişikliklerin mikroskopik fotoğrafları

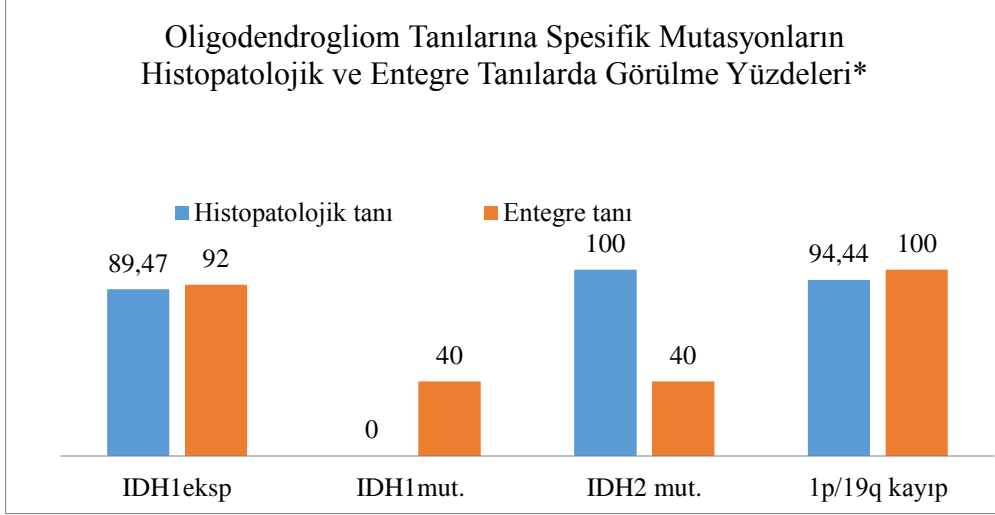
- A. IDH1 (R132H) antikoru ile sitoplazmik ve nükleer pozitiflik
- B. IDH1 (R132H) antikoru ile negatiflik
- C. ATRX antikoru ile nükleer pozitiflik (mutant olmayan)
- D. ATRX antikoru ile nükleer negatiflik (mutant), damar duvarlarında ve reaktif glial hücrelerde pozitiflik
- E. P53 antikoru ile nükleer pozitiflik (%90, skor 3+)
- F. P53 antikoru ile nükleer negatiflik (%0, skor 0)

(orijinal büyütmeler: A, B, C, E:200X , D: 400X, F:100X)

5.3.HİSTOPATOLOJİK TANILARA GÖRE VAKALARDAKİ GENETİK DEĞİŞİKLİKLER

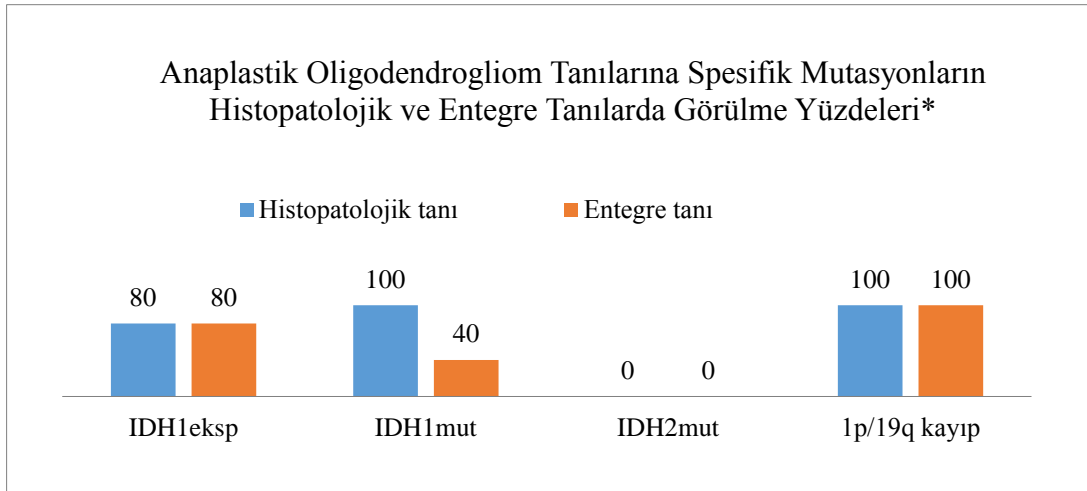
5.3.1.Histopatolojik olarak OD ve AOD tanısı verilmiş olgular

Histopatolojik olarak OD tanısı verilmiş 19 vakadan 17'sinde (%89.5) immünohistokimyasal olarak uygulanan IDH1 ile ekspresyon saptanmıştır (Grafik 3). IDH1 ekspresyonu saptanamayan vakalar için Sanger sekans dizi analizi uygulanmış ve 2 vakada da IDH2 mutasyonu izlenmiştir. Sonuç olarak histopatolojik OD tanılı tüm vakalarda (%100) IDH mutasyonu saptanmıştır. IDH mutasyonunu takiben uygulanan immünohistokimyasal ATRX ve p53 antikoru ile 19 vakadan 1'inde (%5.2) ATRX mutasyonu izlenmiş, ancak vakaların hiçbirinde (%0) p53 protein ekspresyonu izlenmemiştir. ATRX mutant vakada 1p/19q kaybı saptanmadığı için tanı A olarak değiştirilmiştir. 18 OD tanılı vakadan, FISH yöntemiyle sinyal elde edilebilen 17'sinde (%94.4) 1p/19q kaybı saptanmıştır (Grafik 3). Sinyal elde edilemeyen vakada histopatolojik görünüm ve diğer genetik değişiklikler OD lehine olduğu için tanı OD- NOS olarak değiştirilmiştir. Sonuç olarak OD tanılı vakalardan 2'sinde entegre sistemle yeni bir tanı verilmiştir.



Grafik 3: Histopatolojik ve entegre tanı olarak OD tanısı verilmiş vakalarda spesifik moleküler değişikliklerin görülme yüzdeleri

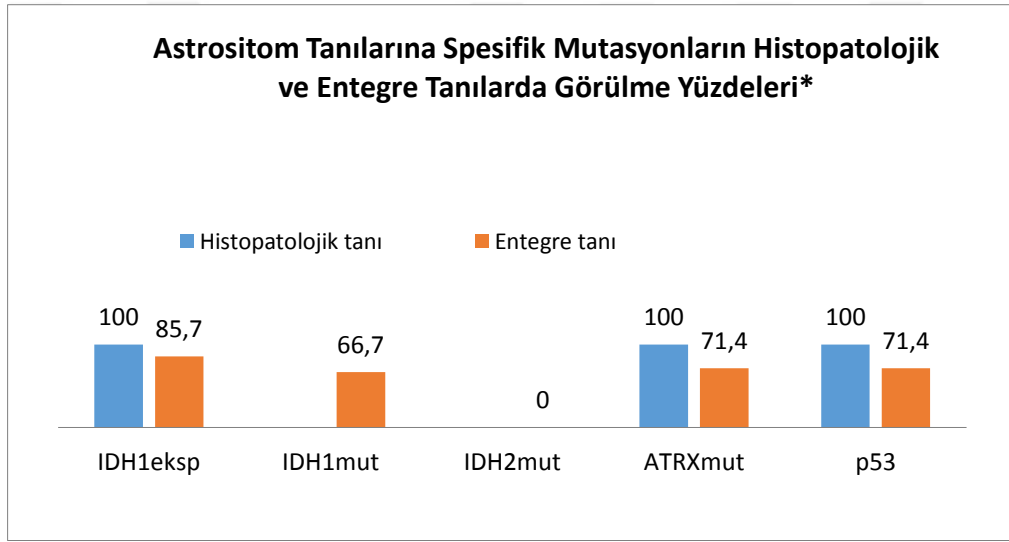
Histopatolojik olarak AOD derece III tanısı verilmiş 10 vakadan 8'inde (%80) immünohistokimyasal olarak IDH1 ekspresyonu saptanmıştır. Ekspresyon izlenmeyen 2 vakada Sanger sekans analizi ile IDH1 mutasyonu saptanmıştır. Sonuç olarak vakaların tümünde IDH mutasyonu izlenmiştir (Grafik 4). IDH mutasyonunu takiben uygulanan ATRX ve p53 antikorları ile hiçbir vakada ATRX mutasyonu saptanmamış, 1 vakada (%10) p53 protein ekspresyonu saptanmıştır. Vakaların hepsinde 1p/19q kaybı saptanmış olup histopatolojik tanı ile entegre tanı aynı olmuştur (Grafik 4).



Grafik 4: Histopatolojik ve entegre tanıyla AOD tanısı verilmiş vakalarda spesifik moleküler değişikliklerin görülme yüzdeleri

5.3.2.Histopatolojik olarak A ve AA tanısı verilmiş olgular

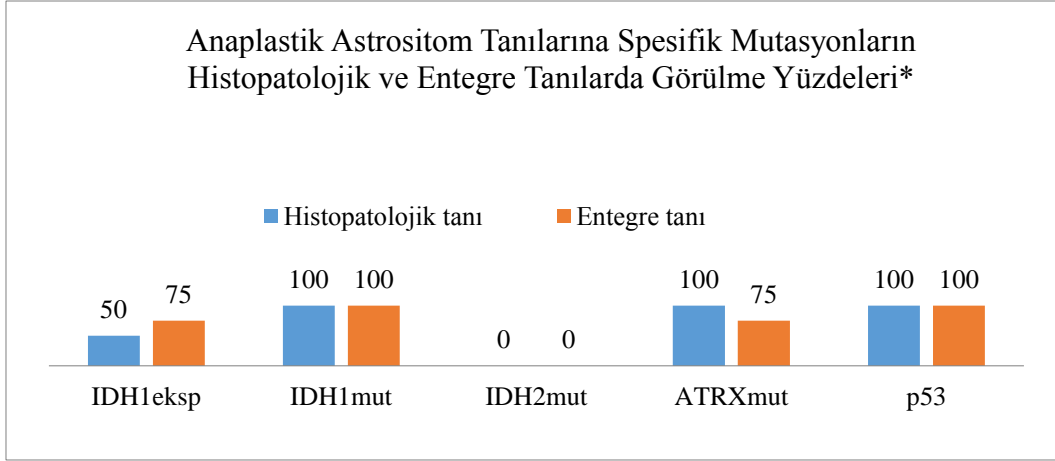
Histopatolojik olarak A ve AA tanısı verilmiş 4 vakadan 3'ünde (%75) immünohistokimyasal IDH1 ekspresyonu saptanmıştır. Ekspresyon izlenmeyen 1 vakada uygulanan Sanger sekans analizi ile IDH1 mutasyonu izlenmiştir. Sonuç olarak vakaların tümünde IDH mutasyonu izlenmiştir (Grafik 5,6). Takiben uygulanan immünohistokimyasal ATRX ve p53 antikorları ile tüm vakalarda ATRX mutasyonu ve p53 protein ekspresyonu saptanmıştır (Grafik 5,6). 1p/19q kaybı hiçbir vakada izlenmemiştir. Sonuç olarak A/AA tanılı vakalar entegre tanıyla aynı tanıda bırakılmıştır.



Grafik 5: Histopatolojik ve entegre tanıyla A tanısı verilmiş vakalarda spesifik moleküler değişikliklerin görülme yüzdeleri

Grafik 5'te verildiği üzere entegre tanıyla A tanısı verilmiş vakaların tümünde (14 vaka) eş zamanlı ATRX mutasyonu ve p53 protein ekspresyonu yoktu. Bu vakalarda 1p/19q kaybı saptanmamıştır. 14 vakalık bu grupta eş zamanlı olarak ATRX ve p53 mutasyonu saptanan vakaların (6 vaka) oranı %42.8'dir. Sadece ATRX mutasyonu saptanan 4 vaka (%28.5), sadece p53 protein ekspresyonu saptanan da 4 vaka (%28.5) mevcuttur.

Histopatolojik tanıda A tanısı verilen 2 vakada ise hem ATRX mutasyonu hem de p53 protein ekspresyonu eş zamanlı görülmüştür.



Grafik 6: Histopatolojik ve entegre tanıyla AA tanısı verilmiş vakalarda spesifik moleküler değişikliklerin görülme yüzdeleri

AA derece III entegre tanısı verilmiş 4 vakadaki spesifik genetik değişikliklerden ATRX mutasyonu %75’inde saptanmışken, vakaların tümünde p53 protein ekspresyonu saptanmıştır (Grafik 6). ATRX mutasyonu saptanmayan vakada, eşlik eden p53 protein ekspresyonuna karşılık 1p/19q kaybı olmadığı için entegre tanı AA olarak verilmiştir.

5.3.3. Histopatolojik olarak OA ve AOA tanısı verilmiş olgular

Histopatolojik olarak OA tanısı verilmiş 19 vakadan 17’sinde (%89.4) immünohistokimyasal IDH1 ekspresyonu saptanmıştır. Ekspresyon saptanmayan 2 vakada Sanger sekans analizi ile de IDH mutasyonu saptanmamıştır. Takiben uygulanan ATRX ve p53 antikoları ile 7 vakada (%36.8) ATRX mutasyonu, 8 vakada (%42.1) p53 protein ekspresyonu izlenmiştir. Uygulanan FISH yöntemiyle 8 vakada (%42.1) 1p/19q kaybı saptanmıştır. ATRX mutasyonu saptanan 7 vakada 1p/19q kaybı izlenmemiş ve tanı A olarak değiştirilmiştir. ATRX mutasyonu saptanmayan, p53 protein ekspresyonu saptanan 4 vakada, eşlik eden 1p/19q kaybı olmadığı için tanı A olarak değiştirilmiştir. 1p/19q kaybı izlenen 8 vakada eşlik eden ATRX mutasyonu izlenmemiş ve tanı OD olarak değiştirilmiştir. Sonuç olarak vakaların tümünde (%100) tanı değişmiş, 8 vaka (%42.1) OD, 11 vaka (%57.8) A tanısı almıştır.

Histopatolojik olarak AOA tanısı verilmiş 8 vakadan 7’sinde (%87.5) immünohistokimyasal IDH1 ekspresyonu saptanmıştır. Ekspresyon izlenmeyen 1 vakada Sanger sekans dizi analizi ile de IDH mutasyonu saptanmamıştır. Takiben uygulanan

immünohistokimyasal ATRX ve p53 antikorları ile 2 vakada (%25) ATRX mutasyonu, 4 vakada (%50) p53 protein ekspresyonu saptanmıştır. Uygulanan FISH yöntemiyle 6 vakada (%75) 1p/19q kaybı izlenmiştir. ATRX mutasyonu saptanan vakalardan 1'inde eşlik eden 1p/19q kaybı olmadığı için entegre tanı AA olmuştur. Diğer 1 vakada ise ATRX mutasyonuna eşlik eden 1p/19q kaybı izlendiği için entegre tanı AOA olarak bırakılmıştır. ATRX mutasyonu saptanmayan 6 vakada 1p/19q kaybı izlendiği için tanı AOD olarak değiştirilmiştir. Sonuç olarak AOA tanılı vakaların 6'sı (%75) AOD, 1'i (%25) AA tanısı olarak yeniden sınıflandırılmıştır. 1 vaka ise AOA tanısında bırakılmıştır.

5.4.GENETİK DEĞİŞİKLİKLER VE BİRBİRLERİYLE İLİŞKİLERİ

5.4.1.IDH1 ekspresyonu ve IDH mutasyonu

IDH1(R132H) antikoruna uygulanarak yapılan immünohistokimyasal çalışmada 52 vakada (%86.6) pozitif, 8 vakada (%13.3) negatif sonuç bulunmuştur. IDH1 ekspresyonu saptanmayan 8 vaka ve IDH1 ekspresyonu gösteren kontrol amaçlı rasgele seçilen 13 vakaya Sanger Sekans DNA Dizi Analizi yapılmıştır. Sanger sekans dizi analizi ile IDH1 ve IDH2 gen bölgelerine bakılmış ve en sık görülen mutasyonlar araştırılmıştır. İmmünohistokimyasal olarak IDH1 eksprese eden 13 vakadan 11'inde sekanslama ile de IDH1 R132H bölgesinde guanin adenin değişimi şeklinde nokta mutasyonu saptanmış, ancak diğer 2 vakada immünohistokimyasal IDH1 ekspresyonu 2 kez tekrar edilerek görülmesine rağmen sekanslama ile mutasyon görülmemiştir. Bu vakalara yeni nesil sekanslama yöntemi ile de DNA dizi analizi yapılmış ve negatif sonuç elde edilmiştir. İmmünohistokimyasal olarak IDH1 ekspresyonu saptanmayan 8 vakanın 3'ünde sekanslama ile IDH1 R132H bölgesinde nokta mutasyonu, 2'sinde sekanslama ile IDH2 R172K ve R172W bölgelerinde guanin adenin değişimi ve adenin timin değişimi şeklinde nokta mutasyonu saptanmıştır. Geri kalan diğer 3 vakada ne immünohistokimyasal ne de Sanger sekans analizi ile IDH mutasyonu görülmemiştir.

IDH mutasyonu saptanamayan vakaların özellikleri şu şekildedir;

Olgu 20; histopatolojik AOA tanılı vakada 1p/19q kaybı saptanmış, p53 protein ekspresyonu ve ATRX mutasyonu saptanmamış, entegre tanıyla AOD tanısı verilmiştir.

Olgu 28; histopatolojik OA tanılı vakada 1p/19q kaybı saptanmamış, p53 protein ekspresyonu saptanmış, ATRX mutasyonu saptanmamış, entegre tanıyla A tanısı verilmiştir.

Olgu 31; histopatolojik OA tanılı vakada 1p/19q kaybı saptanmamış, p53 protein ekspresyonu saptanmış, ATRX mutasyonu saptanmamış, entegre tanıyla A tanısı verilmiştir.

IDH mutasyonu gösteren 57 vakanın 14'ünde (%24.5) ATRX mutasyonu izlenmiştir. IDH mutasyonuna eşlik eden ATRX mutasyonu ve p53 protein ekspresyon birlikteliği ise 10 vakada (%17.5) saptanmıştır. p53 protein ekspresyonu ile ATRX mutasyonu arasında istatistiksel olarak pozitif yönde güçlü, anlamlı bir korelasyon saptanmıştır ($r=0,627$; $p<0,001$).

IDH mutasyonu saptanan 57 vakanın 40'ında (%70.1) FISH yöntemiyle 1p/19q kaybı izlenmiştir. İmmünohistokimyasal ve Sanger sekans dizi analizi ile IDH mutasyonu saptanamayan 3 vaka içerisinde 1 vakada IDH mutasyonu olmadan 1p/19q kaybı saptanmıştır.

5.4.2. ATRX mutasyonu

ATRX mutasyonu saptanan 14 vakanın hepsinde (%100) IDH mutasyonu da saptanmıştır. IDH mutasyonu ile ATRX mutasyonu arasında istatistiksel olarak pozitif yönde orta derecede, anlamlı bir korelasyon saptanmıştır ($r=-0,447$; $p=0,004$) (Tablo 9).

Astroitik seriyi destekleyen ATRX mutasyonu ile oligodendroglial seriyi destekleyen 1p/19q kaybı birbirini mutlak dışlayıcı genetik değişikliklerdir. ATRX mutasyonu saptanan 14 vakadan 1'inde (%7.1) 1p/19q kaybı da eşlik etmektedir. Bu vaka her iki seriyi destekleyen genetik değişikliği gösterdiği için AOA tanısında bırakılmıştır. Sonuç olarak 1p/19 kaybı ile ATRX mutasyonu arasında istatistiksel olarak negatif yönde güçlü, anlamlı bir korelasyon vardır ($r=-0,699$; $p<0,001$) (Tablo 9).

	1p/19q kaybı	ATRX mut	p53	IDH1mut	IDH2mut	IDH1eksp	CEP4
1p/19q kaybı		-0,699**	-0,659**	-0,139	0,255	0,430	-0,234
ATRX mut			0,528**	0,447**	-,205	,100	,269
p53				-,143	-,229	-,189	,234
IDH1mut					-0,459	,485*	,333
IDH2mut						-,414	-,293
IDH1eksp							,015
CEP4							

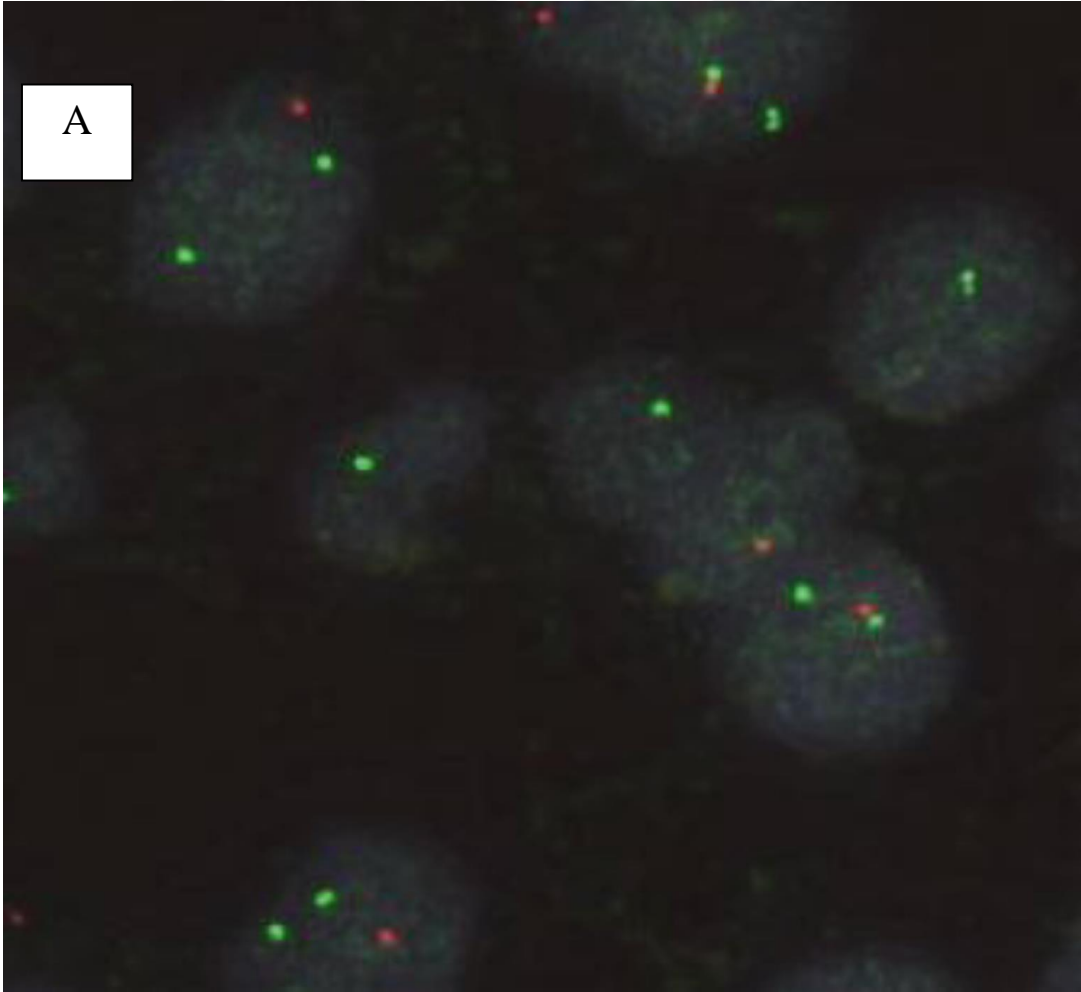
Tablo 9: Çalışmada incelenen genetik değişikliklerin birbirleriyle korelasyonu (* $p < 0,05$)

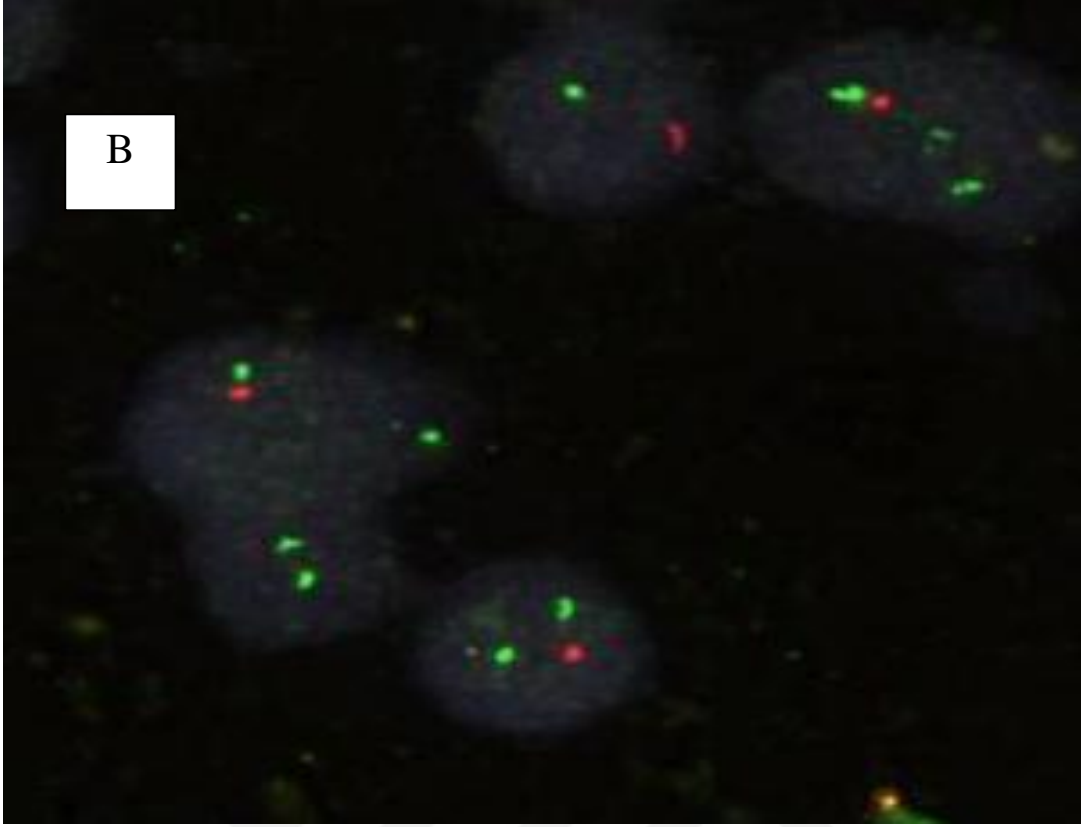
5.4.3.1p ve 19q kaybı

Histopatolojik tanı ve FISH yöntemiyle saptanan genetik değişikliklerin görülme oranlarına bakıldığında; 1p/19q kaybı OD'de 17/18 (%94.4) (1 vakada sinyal elde edilemedi), AOD'de 10/10 (%100), OA'da 8/19 (%42.1), AOA'da 6/8 (%75) olarak saptanmıştır. A ve AA tanılı vakalarda 1p/19q kaybı görülmemiştir. 1p/19q kaybı FISH sonuçlarına ait fotoğraflar resim 5'te verilmiştir.

Yalnız 19q kaybı saptanan A tanılı 3 vaka (%21.4) mevcuttur. Bu vakaların histopatolojik tanıları OA olarak verilmiştir. Her 3 vakada da IDH mutasyonu ve ATRX mutasyonu saptanmış olup tanı A olarak değiştirilmiştir.

1p kaybı olan vakaların hepsinin 19q kaybı da gösterdiği izlenmiştir.





Resim 5: 1p/19q FISH çalışmalarına ait mikroskopik fotoğraflar

A: 1p kaybı gösteren OD vakası (kırmızı sinyal: 1p36, yeşil sinyal 1q25).

B: Aynı vakada 19q kaybı (kırmızı sinyal: 19q13, yeşil sinyal 19p13).

Kromozom 1p/19q kaybı olan 41 vakanın 3'ünde (%7.3) p53 protein ekspresyonu fokal yada skor1+ olarak saptanmıştır. Bu vakaların 1'i AOA, diğer 2'si AOD entegre tanıları almıştır. 1p/19q kaybı ile p53 protein ekspresyonu arasında istatistiksel olarak negatif yönde orta derecede, anlamlı bir korelasyon vardır ($r=-0,489$; $p=0,001$).

Tablo 10'da entegre tanıya göre tüm vakalar içinde, sırasıyla 1p kaybı, 19q kaybı, 1p/19q kombine kaybı, "1p/19q kombine kaybı ve IDH ekspresyonun birlikte gözlemlendiği durumlar", ATRX mutasyonu, p53 protein ekspresyonu, PDGFR- α amplifikasyonu ve CEP4 polizomi durumlarına ait vaka sayıları ve görülme oranları gösterilmiştir.

	1p kaybı		19q kaybı		1p/19q kaybı		Sadece 19q kaybı		1p/19q kaybı ve IDH poz.		IDH1 ekspresyonu		IDH mut.		ATRX mut.		p53 eksp.		PDGFRA amp.		CEP4 polizomi	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
OD	25/25	100	25/25	100	25/25	100	0	0	23/25	92	23/25	92	5/5	100	0	0	0	0	0	0	3/19	15.7
AOD	15/15	100	15/15	100	15/15	100	0	0	12/15	80	12/15	80	6/8	75	0	0	2/15	13.3	0	0	4/15	26.6
A	0	0	3/14	21.4	0	0	3/14	21.4	0	0	12/14	85.7	4/6	66.6	10/14	71.4	7/14	50	0	0	3/11	27.2
AA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3/4	75	2/2	100	3/4	75	4/4	100	0	0	3/3	100
AOA	1/1	100	1/1	100	1/1	100	0	0	1/1	100	1/1	100	B	B	1/1	100	1/1	100	0	0	0	0

Tablo 10: Entegre tanıya göre immünohistokimyasal ve FISH sonuçları, birbirleriyle olan ilişkileri ve yüzde olarak karşılıkları B: Bilinmiyor. (OD-NOS entegre tanı vakalarında moleküler çalışma sonuçlanamadığı için tabloya alınmamıştır)

5.4.4.p53 protein ekspresyonu

Çalışmamızda 17 vakada (%28.3) p53 protein ekspresyonu bulunmuştur. Bu vakaların ekspresyon skorlarına göre dağılımları; 8 vaka (%47) “skor 1+”, 5 vaka (%35.7) “skor2+” ve 4 vaka da (%28.5) “skor 3+” olarak saptanmıştır. Ekspresyon görülen vakaların çoğunluğu entegre tanı sistemiyle A (%71.4) ve AA (%100) tanıları almışken 2 vaka (%13.3) AOD tanısı, 1 vaka (%7.1) AOA tanısı almıştır.

1p/19q kaybı ile p53 protein ekspresyonu arasında istatistiksel olarak negatif yönde güçlü, anlamlı bir korelasyon vardır.($r=-0,659$; $p<0,001$)

5.5.OLGULARIN HİSTOPATOLOJİK DERECE Sİ İLE GENETİK DEĞİŞİKLİKLER VE Ki-67 İLİŞKİSİ

Çalışmada DSÖ 2016 SSST histopatolojik sınıflamasına göre 41 derece II (OD, A ve OA), 19 derece III (AOD, AA ve AOA) tümör ele alınmıştır. Vakaların ilk tanıdaki dereceleri ile entegre tanıdaki histolojik derecelerinde değişiklik olmamıştır.

Tümör derece sınıfları arasında IDH mutasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilememiştir. Mutasyon görülen vakaların oranı derece II ve III'te sırasıyla %95.1 ve %94.7 oranında saptanmıştır.

1p/19q kaybı görülme sıklığı derece II tümörlerde %64.1; derece III tümörlerde %80 olarak saptanmıştır. Farklı derece grupları arasında 1p/19q kaybı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

Ki67 skoru pozitif hücrelerin yüzde cinsinden oranı olarak verilmiştir. Değerler tüm tümörler için %0.5 ile %50 arasında olup OD'de %0.5-%10; AOD'de %3-%50; A'da %0.5-%30; AA'da %4-%50 arasında değişmektedir. Ortalama değerler ise sırasıyla %3.45, %17.13, %6.46, %19.66'dır. OD NOS'ta %2; AOA'da %20 olan birer vaka bulunmaktadır. Derece gruplarına bakıldığında Ki67 skoru derece II tümörlerde %0.5-30, derece III tümörlerde %3-%50'dir. Derece gruplarında ortalama değerler ise sırasıyla %4.5 ve %17.5 olmuştur.

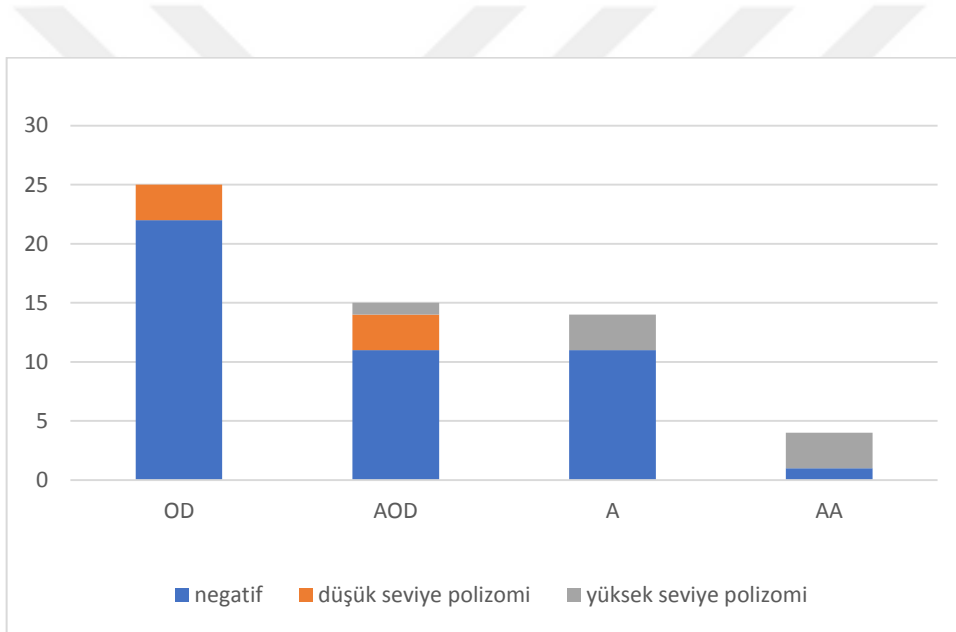
Ki67 skoru ayrıca gruplara ayrılarak incelenmiştir. Merkezimizin uygulama deneyimleri temel alınarak, kimi yayınlarda da kullanılmış eşik değerler üzerinden Ki67 skoru 4 grupta toplanmıştır. %0-%<5: grup 1; %5-<10: grup 2; %10-<30: grup 3; %30 ve daha yüksek: grup 4 olarak sınıflanmıştır. Bu sınıflarda sırasıyla 32, 11, 12, 5 vaka yer almıştır. Ki67 skor grubu, en sık olarak OD'de "grup 1" (%74.1); AOD'de "grup 3" (%46.6); OD NOS'ta "grup 1" (%100), AOA'da "grup 3" (%100), A'da "grup 1" (%57.1), AA'da her gruptan bir vaka şeklinde olmuştur. Ki67 skor grubu, en sık olarak derece II tümörlerde grup 1 (%72.5), derece III tümörlerde grup 3 (%47.4) olmuştur.

5.6.FISH YÖNTEMİYLE UYGULANAN PDGFR- α /CEP4 SONUÇLARI

Çalışmamızda PDGFR- α /CEP4 gen bölgesi FISH yöntemiyle değerlendirilmiş ve 60 vakadan 20'sinde ilk çalışmada sinyal elde edilememiştir. 2. kez FISH çalışması tekrar edilen 20 vakadan ise 9'unda (%45) PDGFR- α ve CEP4 gen bölgesi için sinyal elde edilebilmiştir. Tekrar çalışılan 1 vakada ise PDGFR- α bölgesi için değerlendirilebilecek sinyal yok iken, CEP4 bölgesi için sinyal elde edilmiş ve değerlendirilip sonuç verilen vakalar içerisine alınmıştır. Sonuç olarak 2 kez çalışılan vakalarla birlikte 60 vaka içerisinde PDGFR- α değerlendirmesi yapılabilen 49 vakada sonuç verilebilmiştir. CEP4 bölgesi için ise 50 vakada sonuç verilebilmiştir. PDGFR- α /CEP4 FISH görüntülemelerine ait fotoğraflar "Resim 6 ve 7'de" verilmiştir.

İlk çalışmada PDGFR- α amplifikasyon için şüpheli bulunan 3 vaka FISH yöntemiyle tekrar çalışılıp değerlendirilmiş ve ilk çalışmada artmış sinyal olarak düşünülen görüntülerin teknik kirlilik nedeniyle oluştuğu sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak hiçbir vakada PDGFR- α amplifikasyonu saptanmamıştır.

CEP4 polizomi değerlendirmesinde, sinyal elde edilen değerlendirilebilir 50 vakadan 13'ünde (%26) polizomi saptanmıştır. Bu vakaların 7'sinde (%53.8) yüksek seviye polizomi, 6'sında (%46.1) düşük seviye polizomi saptanmıştır. Polizomi saptanan vakaların entegre tanılarına göre dağılımları; OD'de 3/19 vaka (%15.7), AOD'de 4/15 vaka (%26.6), A'da 3/11 vaka (%27.2), AA'da 3/3 vaka (%100) şeklindedir. AOA tanılı 1 vakada polizomi saptanmamıştır. OD NOS tanılı 1 vakada ise sinyal elde edilemediği için değerlendirmeye alınamamıştır.



Grafik 7: Vakaların CEP4 sonuçlarına göre oranları

Grafik 7'de verildiği üzere, OD tanılı 25 vakanın 3'ünde (%12) düşük seviye polizomi saptanmıştır. AOD tanılı 15 vakanın 3'ünde (%20) düşük seviye polizomi, 1'inde (%6.6) yüksek seviye polizomi saptanmıştır. A tanılı 14 vakanın 3'ünde (%21.4) ve AA tanılı 4 vakanın 1'inde (%25) yüksek seviye polizomi saptanmıştır. A ve AA tanılı vakalarda düşük seviye polizomi saptanmamıştır.

Entegre tanı grupları CEP4 polizomi değerlendirmesi yapıldığında vaka azlığı nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0,157$). Ancak grafikten de anlaşılacağı üzere polizomi daha çok astrositik tümörlerde ve yüksek dereceli vakalarda saptanmıştır.

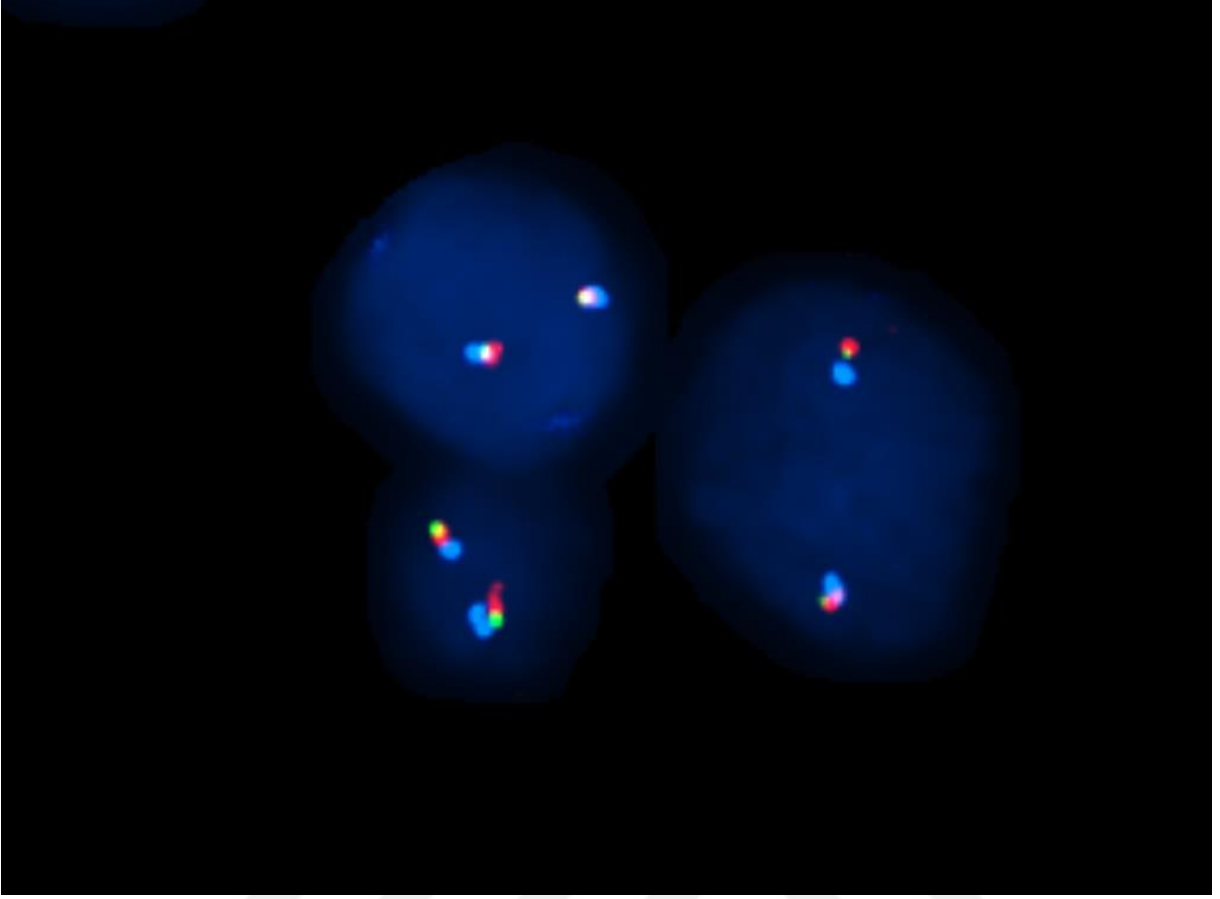
5.7. ENTEGRE TANILARA GÖRE KLİNİK VERİLER

Entegre tanı	Sayı	Cinsiyet		Yaş			
		Kadın (n)	Erkek (n)	En az	En fazla	Ortalama	Medyan
OD	25	10	15	24	59	36.2	35
AOD	15	7	8	12	69	48.2	47
A	14	5	9	24	57	37.1	37
AA	4	2	2	28	42	35.7	32
OD NOS	1	0	1	38			
AOA	1	0	1	49			

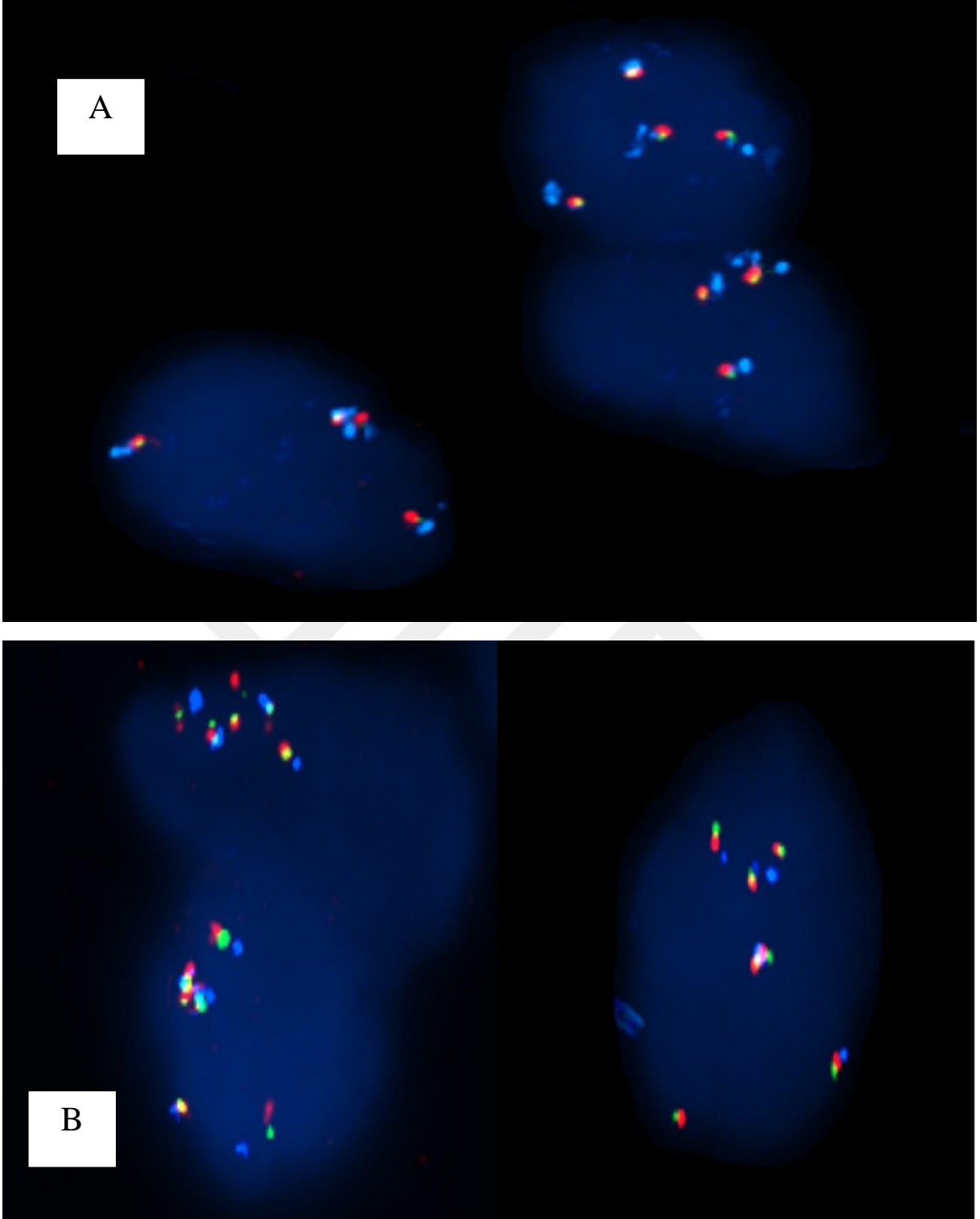
Tablo 11: Entegre tanılara göre sayı, cinsiyet ve yaş dağılımları

Histopatolojik tanı ve değişen entegre tanıya göre olgular yaş (sırasıyla $p=0,543$ ve $p=0,239$) ve cinsiyete ($p=0,796$) göre gözden geçirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 11).

Lezyonda kontrast tutulum durumu bildirilen 53 olgunun 12'sinde (%22.6) kontrast tutulumu mevcut iken, 41'inde (%77.3) tutulum görülmemiştir. Kontrast tutulum oranı OD'de %33.3, AOD'de %21.4, AOA'da %100 (1 vaka), A'da %8.3; derece II'de %20, derece III'te %20 olarak saptanmıştır. OD NOS ve AA tanılı vakalarda kontrast madde tutulumu saptanmamıştır.



Resim 6: FISH PDGFR- α /CEP4 çalışması sonucu PDGFR- α amplifikasyon negatif, polizomi negatif saptanan OD tanılı vakaya ait fotoğraf



Resim 7: FISH PDGFR- α /CEP4 çalışması sonucu düşük seviye polizomi ve yüksek seviye polizomi saptanan AA vakalarına ait fotoğraflar (A: Düşük seviye polizomi saptanan vaka, B: Yüksek seviye polizomi saptanan vaka)

5.8.KLİNİK, İMMÜNOHİSTOKİMYA VE FISH SONUÇLARINA GÖRE PROGNOZ VE SAĞKALIM

Hastaların ulaşılabilen takip süreleri 1 ile 156 ay arasında değişmekte olup, ortalama değer 26.67 ay, medyan değer 24 aydır. 1 yıllık sağkalım bilgisine ulaşılan 49 vaka (%81.6) içerisinde 47 vakada (%95.9) sağkalım 1 yıl ve daha fazla iken, 2 hasta (%4.2) 1 yıl içinde eks olmuştur. 5 yıllık sağkalım bilgisine ulaşılan 15 vakadan 3'ünde (%20) ise 5 yılı aşan yaşam saptanmıştır. Kadınlarda sağ kalım hızı % 89.5, erkeklerde %77.4 olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır (log rank= 2,84, p= 0,092).

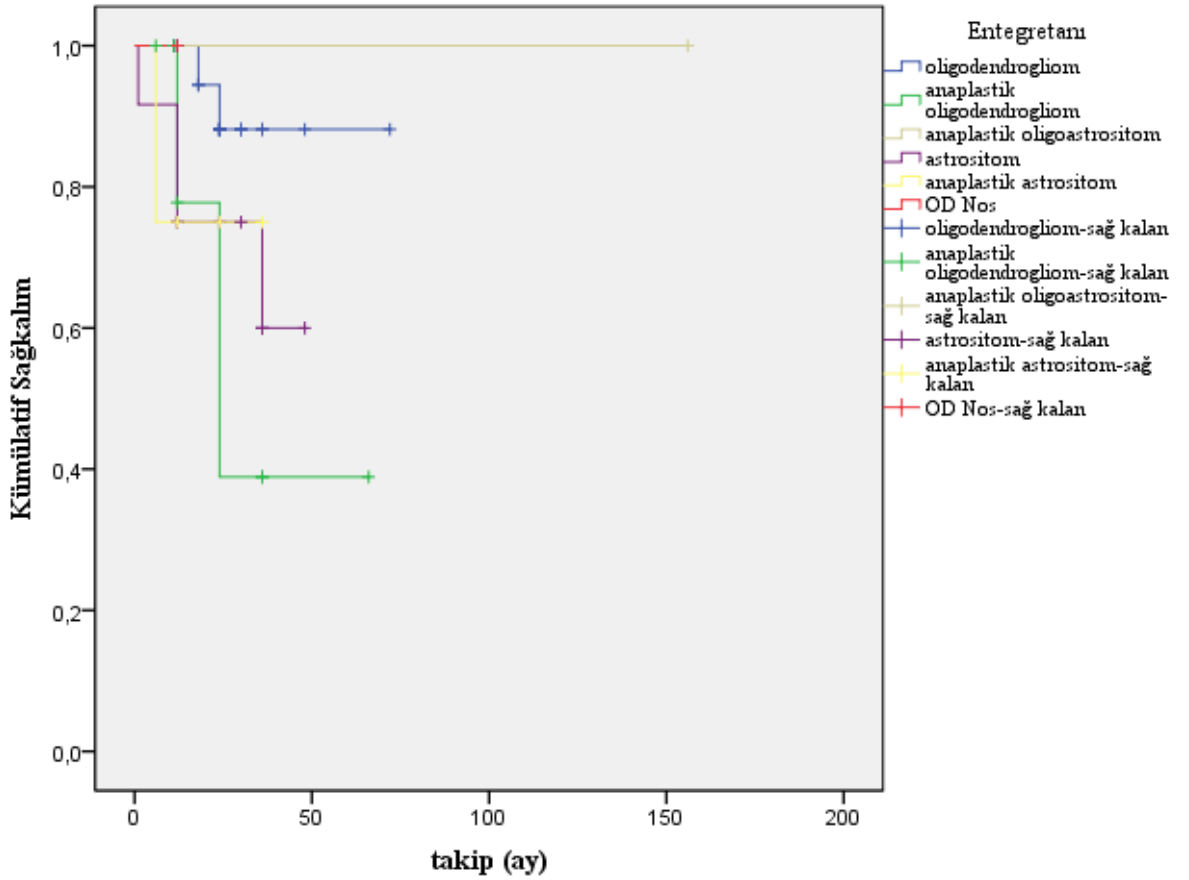
Takiplerinde nüks tümör gelişen olgu sayısı 10'dur. Nüks eden vakaların dağılımı; 1 AA, 4 OD, 4 AOD ve 1 AOA şeklindedir. Vakaların kendi tanı grupları içindeki yüzdeleri sırasıyla; %25, %16, %26 ve %100'dür.

Histopatolojik tanı takip süresine göre değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır (p=0,008). Yapılan post-hoc analizler sonrası farkın OA grubuyla A ve AA grubu arasındaki farktan kaynaklandığı saptanmıştır (p=0,005).

Entegre tanı takip süresine göre değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,901). OD tanılı vakalarda ortalama takip süresi 24.9, AOD tanılı vakalarda 23.9, A tanılı vakalarda 24.5 ve AA tanılı vakalarda ise 19.5 olarak saptanmıştır. Histopatolojik tanı ve entegre tanıya göre sağ kalım açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (sırasıyla log rank= 6,63, p=0,085 ve log rank= 1,149 p= 0,765).

Tümörlerin hücre komponentlerine göre sağkalım verileri açısından farklılık gösterdiği görülmüştür. Pür oligodendroglial tümörlerde 1 yıl yaşama oranı %100, 5 yıl yaşama oranı %40; mikst oligoastroitik tümörlerde 1 yıl yaşama oranı %95.6, 5 yıl yaşama oranı %11.1, astroitik tümörlerde 1 yıl yaşama oranı %75, 5 yıl yaşama oranı %0 olarak saptanmıştır.

Sağkalım bilgilerine ulaşılabilen vakalar içerisinde, en az 1 yıl yaşama oranı derece II ve III'te sırasıyla %97.1, %92.8; en az 5 yıl yaşama oranı derece II ve III'te sırasıyla %14.2, %25 olmuştur.

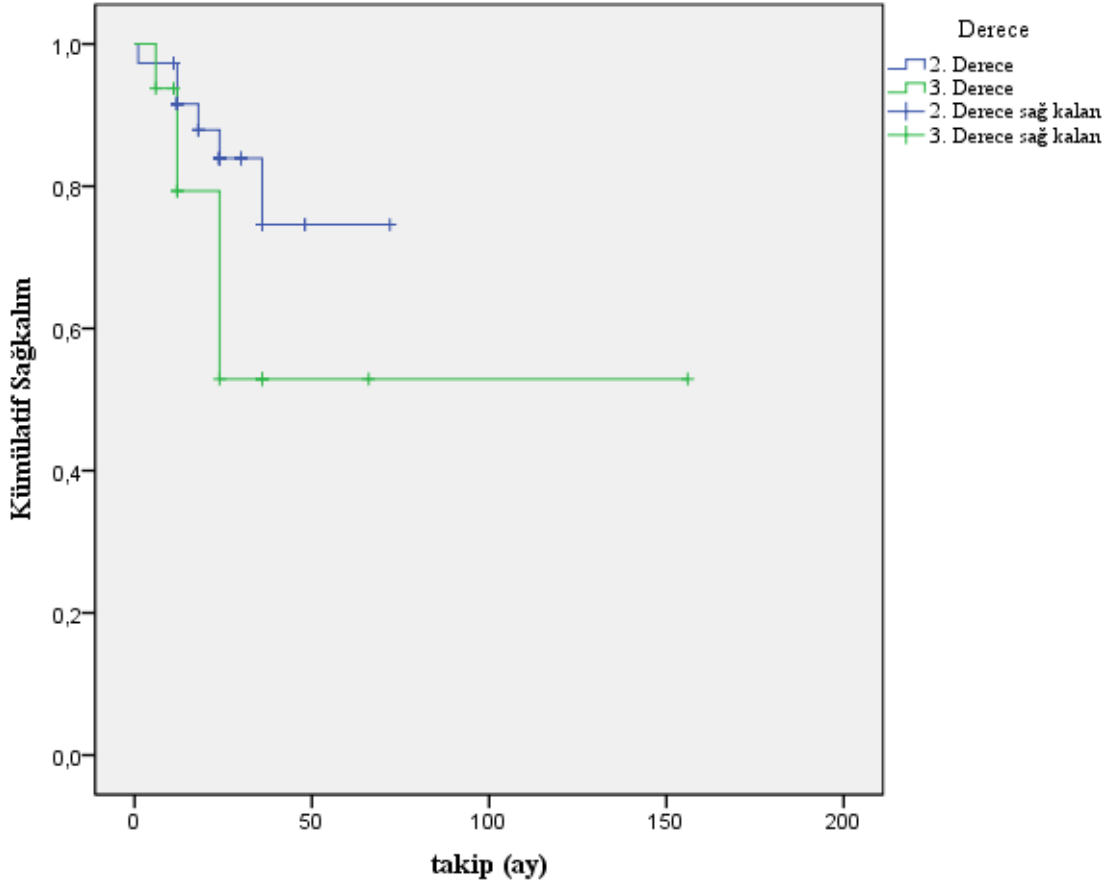


Grafik 8: Entegre tanılara göre sağkalım süreleri

İstatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilememiş olsa da entegre tanılara göre sağkalım durumu net olarak görülebilmektedir. En iyi sağkalım saptanan vakalar OD tanılı olan vakalar olmuştur. En kötü sağkalıma sahip olan vakalar A, AA ve AOD olmuştur (Grafik 8).

Derece ile yaşam verileri birlikte incelendiğinde farklı derecedeki vakalar ile en az 1 yıl veya en az 5 yıl yaşam sürdürme durumu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir (log rank= 2,675 , p= 0 ,102) (Grafik 9).

İstatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilememiş olsa da gözlemsel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır. Grafik 9’da verildiği üzere derece 2 tanılı vakaların sağkalımları derece 3 vakalara göre daha iyi bulunmuştur.

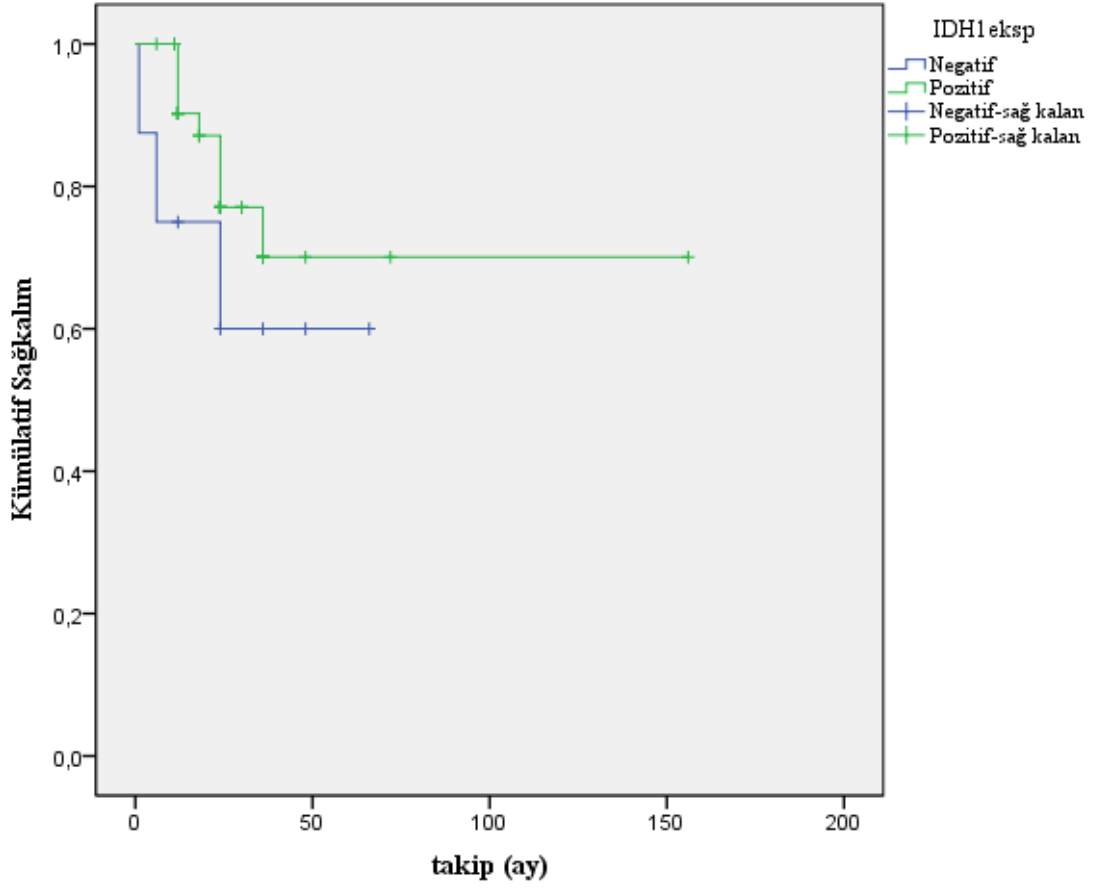


Grafik 9: Derece ile sağkalım arasındaki ilişki

Kontrast tutulumu negatif vakalarda sağ kalım hızı % 82,4, kontrast pozitif vakalarda %66,7 olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır (log rank= 0,408 , p= 0,523).

IDH1 ekspresyonu negatif olan vakalarda sağ kalım hızı % 62,5 IDH1 ekspresyonu pozitif olan vakalarda 80,0 olarak saptanmıştır. (log rank= ,994 , p=0,319) (Grafik 10)

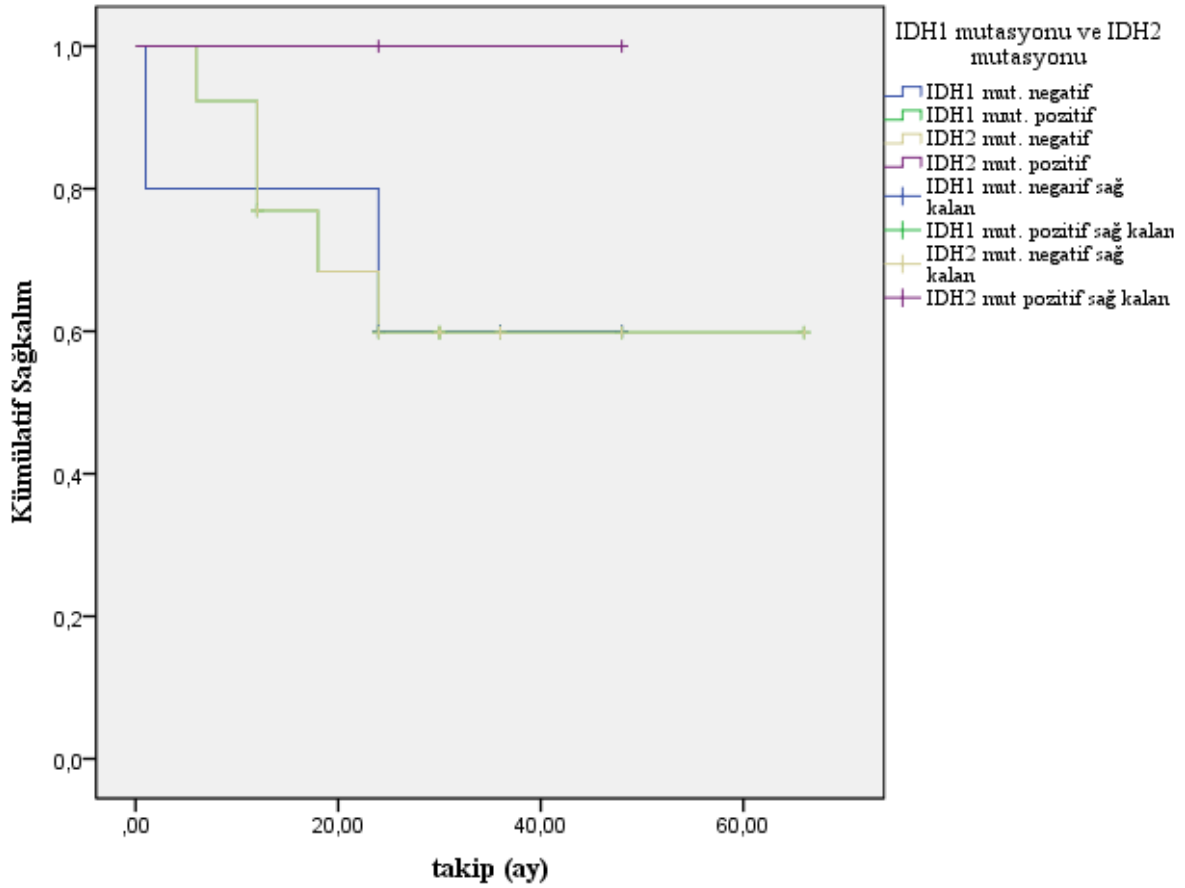
IDH1 ekspresyonu saptanan vakaların sağkalım süreleri ekspresyon saptanmayan vakalara göre daha uzun saptanmıştır(Grafik 10).



Grafik 10: IDH1 ekspresyonu saptanan ve IDH1 ekspresyonu saptanmayan vakalarda sağkalım

Oligodendrogliyal tümörler içinde 22 OD ve 12 AOD vakasında IDH mutasyonu ve 1p/19q kaybı birlikte saptanmıştır. Her iki genetik değişikliği de gösteren 34 vakadan 33'ünde sağkalım bilgisine ulaşılabilmiş ve 1 yıllık sağkalıma sahip oldukları görülmüştür.

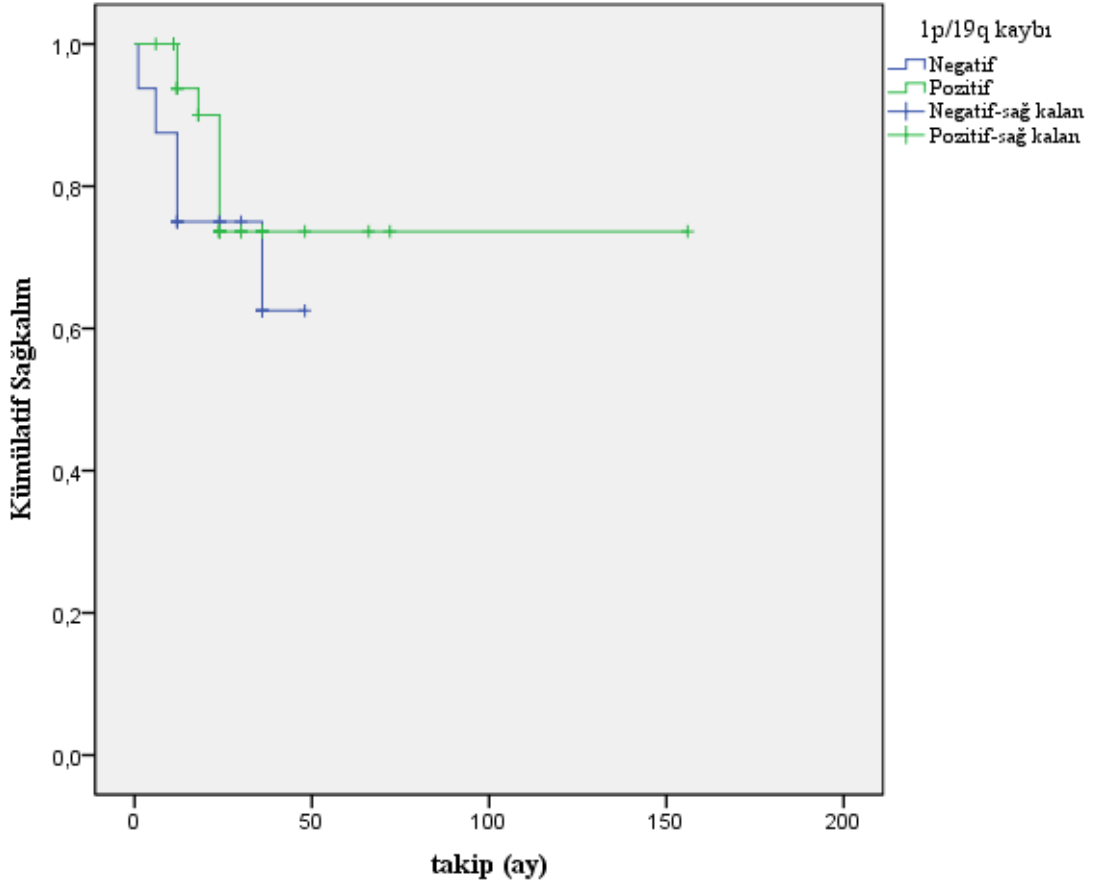
Sağkalım verilerine bakıldığında, IDH mutasyonu gösteren vakalarda 1 yıl ve 5 yıl yaşam oranları, mutasyon göstermeyenlere göre daha yüksektir. Mutasyon bulunan vakalarda 1 yıl yaşama oranı %97.8, 5 yıl yaşama oranı %23'tür (Grafik 11).



Grafik 11: IDH1 ve IDH2 mutasyonu saptanan ve mutasyon saptanmayan vakalarda sağkalım

1p/19q kaybı olmayan vakalarda sağ kalım hızı %64,3, 1p/19q kaybı olan vakalarda %81,6 olarak saptanmıştır. Vaka sayısındaki azlık ve tüm hastaların sağkalım bilgilerine ulaşılabilmesi nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (log rank= 1,816 , p= 0 ,178) (Grafik 12).

1p/19q kaybı saptanmış olan vakalarda sağkalım süresi kayıp saptanmayan vakalara göre daha uzun bulunmuştur (Grafik 12).



Grafik 12: 1p/19q kaybı olan ve 1p/19 kaybı olmayan vakalarda sağkalım

Çalışmamızda 1p/19q kaybı saptanan 41 vakadan 36'sı KT ve/veya RT almıştır. Tedavi alan 36 vakanın 29'u (%80.5) yaşamakta olup 7'si (%19.4) tedaviye rağmen 2-3 sene sonra eks olmuştur. Eks olan vakaların çoğu (%71.4) OD tanılıdır.

ATRX mutasyonu saptanan astrositik tümörlerde 1 yıllık sağkalım oranı %90.9, ATRX mutasyonu saptanmayan astrositik tümörlerde 1 yıllık sağkalım %80 olarak izlenmiştir. ATRX mutasyonu negatif grupta sağ kalım hızı %78, ATRX mutasyonu pozitif grupta %75 olarak saptanmıştır (log rank =010 , p= 0 ,922).

P53 protein ekspresyonu negatif olan vakalarda sağ kalım hızı %78, p53 protein ekspresyonu pozitif vakalarda %75 olarak saptanmıştır (log rank= 0,010, p= 0 ,922).

Ortalama Ki67 skoru 1 yıl sağkalım gösteren vakalarda %9.18, göstermeyen vakalarda %15; 5 yıl sağkalım gösteren vakalarda %20, göstermeyen vakalarda %16.09 olmuştur. 5 yıl sağkalım gösteren vakalarda anlamsız sonuç elde edilmiştir.

PGFR- α amplifikasyonu negatif olan vakalarda sağ kalım hızının %76,2 olduğu saptanmıştır. Pozitif vaka bulunmadığı için istatistiksel olarak değerlendirilememiştir.

CEP4 polizomisi negatif olan vakalarda sağ kalım hızı %74,2, CEP4 polizomisi pozitif olan vakalarda %75 olarak saptanmıştır (log rank=0,002, p= 0,966). CEP4 yüksek polizomili vakalarda sağ kalım hızı %71,4, CEP4 düşük polizomili vakalarda %80 olarak saptanmıştır (log rank=0,070, p=0,791).

Bir yıllık sağ kalım yaş, çap, p53 değeri, Ki 67 kuru açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır (sırasıyla p = 0,178; 0,866 ;0,170;0,823). Beş yıllık sağ kalım yaş, çap, p53 değeri, Ki 67 kuru açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır (sırasıyla p = 0,218; 0,817; 0,945; 0,295).

Tedavi grupları sağ kalım açısından incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır (log rank= 2,364 p= 0,500).

5.9.FISH İLE 1P/19Q KAYIP DEĞERLENDİRMESİNDE ÇALIŞMAYA ÖZGÜ EŞİK DEĞER YÖNTEMİ

Çalışmamızdaki 1p/19q kaybı incelemelerinde FISH sinyalleri, laboratuara özgü eşik değerin önceden hesaplandığı klasik yöntem ile değerlendirilmiştir.

6.TARTIŞMA

Çalışmamızda ara dereceli (derece II ve derece III) oligodendrogliom, astrositom ve 2014'ten önce tanı verilmiş oligoastrozitom vakalarına 2014 Haarlem ve DSÖ 2016 SSST sınıflama önerilerine uygun olarak moleküler çalışmalar yapılmıştır. Çalışmalar sonucunda vakaların büyük bir kısmında tanı güncel sınıflamadaki yeni isimlendirmeye birlikte tamamen değişmiş, vakalar yeni bir tanı almıştır. Yeni tanı verilmesi sürecinde öne çıkan genetik değişikliklerden 1p/19q kaybı FISH yöntemiyle, IDH1 (R132H), ATRX ve p53 durumu immünohistokimyasal olarak incelenmiştir. IDH1 ekspresyonu immünohistokimyasal olarak saptanamayan vakalara ve kontrol amaçlı rasgele seçilmiş pozitif vakalara PCR yöntemiyle Sanger sekans dizi analizi uygulanmıştır. IDH1 ekspresyonu görülen, ancak sanger sekans analizi ile mutasyon saptanamayan vakalara da yeni nesil sekanslama yöntemi ile DNA dizi analizi yapılmıştır. Mevcut çalışmada yeni sınıflamada belirtildiği üzere tipik olarak oligodendrogliyal tümörlerde gözlenen 1p/19q kaybı ve buna karşılık astrositik tümörlerde gözlenen ATRX mutasyonunun ve p53 ekspresyonunun, glial tümörlerde diagnostik ve prognostik değeri bilinen IDH mutasyonunun rutin kullanımda sağlayacağı katkıları araştırmak ve vakalara yeni sınıflamaya uygun olarak yeni tanıları verilmesi amaçlanmıştır. Bunun yanı sıra yüksek dereceli astrositik tümörlerde daha sık görülen PDGFR- α amplifikasyonu da yine patoloji uygulamalarındaki anlamlarını değerlendirmek amacıyla çalışmamıza dahil edilmiştir.

Çalışmaya alınan genetik değişikliklerin; tanı, derece, hücresel komponent gibi histopatolojik veriler ve yaş, cinsiyet, yerleşim yeri gibi klinik verilerle ilişkisi de araştırılmıştır.

Glial tümörler ilk defa Bailey ve Cushing tarafından 1900'lerin başında histogeneze dayalı olarak sınıflandırılmıştır. Sonraki farklı çalışmalarda Kernohan, Ringertz ve Doumas, Dupont histolojik sınıflandırma ve derecelendirmeyi yayınlamışlardır (13,14,15,115).

1993'te ilk olarak DSÖ'nün sınıflaması yayınlanmış ve uluslararası kabul gören tek sınıflama haline gelmiştir (16). 2016 DSÖ SSST sınıflamasına kadar glial tümör tanısı histopatolojik olarak verilmekteydi. Yeni sınıflama ile birçok moleküler değişiklik tanımlanmış, prognostik ve prediktif değeri olanlar vurgulanmıştır (1,6). Çalışmamızda, önemi vurgulanan genetik değişiklikler incelenmiş ve vakalara yeni entegre tanıları verilmiştir. Çalışmada yer alan 60 vakadan 28'inde (%46.6) tanı değiştirilmiş, yeni bir tanı verilmiştir. Tanısı tamamen değişen vakaların çoğunu OA/AOA histopatolojik tanıları vakalar oluşturmuştur.

Yeni sınıflamaya ihtiyaç duyulmasının pek çok sebebi vardır. En önemli sebeplerden biri glial tümörlerin heterojen oluşudur (6). Bir başka önemli sebep de histomorfolojik tanıda, gözlemciler arasında tanı farklılıklarının yaşanmasıdır (116). Hatta aynı gözlemci aynı vakayı farklı zamanlarda değerlendirdiğinde verdiği tanıları da değiştirebilmektedir.

Tanıda bir başka problem de eksizyon materyalinde yanlış ya da eksik örnekleme yapılmasıdır. Yüksek dereceli ve farklı morfolojideki tümöral alanların çok kolay atlanabileceği bilinmektedir. Lezyonun özellikle sadece periferinden yapılan örneklemler düşük dereceli tümör tanısı verilmesine neden olmaktadır. Bu nedenle daha yüksek dereceyi gösteren merkezden örneklemlerin de yapılması ile yanlış derecelendirme yapılmasının önüne geçilmiş olacaktır. Yaşanan problemler nedeniyle gözlemciler arası tanı farkını azaltmak adına, mevcut histomorfolojik kriterlerin dışında, nesnel yardımcı tanı yöntemlerine de ihtiyaç duyulmaktadır (2,3,78).

DSÖ 2016 SSST güncel sınıflamada; histomorfolojik kriterler ilk başvuru olan özellikler olmasına karşın bu kriterlerin yeterli olmadığı kanaatine varılarak tanıda ilk defa genetik değişikliklere yer verilmiştir (6).

1980'lerin sonunda yapılan çalışmalarda, oligodendrogliyal tümörlerde, prokarbazin, lomustin/CCNU ve vinkristin (PCV) tedavisi ile astrositik tümörlere göre daha iyi sonuçlar alındığının gösterilmesinden bu yana, oligodendrogliyal komponentin varlığının tedaviyi belirleyici bir anlamı olduğu kabul görmektedir (117).

Günümüzde çok nadir olan mikst oligoastrositik tümörlerin, aynı dereceli pür astrositik tümörlere göre medikal tedaviye daha iyi yanıt verdiği göz önüne alındığında, bu komponentin tanınması önem kazanmaktadır (117).

Patologların, genetik değişikliklerin bilinmediği dönemde histomorfolojik tanı olarak en çok kullandığı “oligoastrositom” terimi ilk defa Eugenia Cooper tarafından 1935 yılında ortaya atılmıştır (118). Miks popülasyondaki oligodendrositlerin tümöral, astrositlerin ise reaktif olduğunu düşünmüştür. Hart ve ark 1974'te mikst oligoastrositom çalışmasını daha geniş kapsamda incelemiş ve astrositik ve oligodendrogliyal hücre komponentlerinin infiltrasyon içinde kompakt ve difüz yerleştiğini ileri sürmüştür (119). Cooper'ın “astrositik hücreler reaktiftir” tezi Daumas-Duport sınıflandırma sisteminde de yerini almıştır (120).

DSÖ 2000 ve 2007 SSST sınıflamalarında morfolojik olarak oligodendrosit ve astrosite benzeyen hücrelerin her ikisinin de tümöral olduğu yayınlanmıştır (6). 2016 DSÖ SSST sınıflamasında mikst morfolojide olan glial tümörlerin çoğu genetik değişikliklerin varlığına bağlı olarak oligodendrogliom ya da astrositom tanısı almaya başlamıştır. Eski sınıflamalarda

oligoastrozitom tanısı çokça verilen bir tanıyken yeni sınıflamada oligoastrozitom tanısı çok küçük bir alanı kaplamaktadır. Ancak az da olsa oligoastrozitom tanısı hala vardır (1).

Felix Sahm ve ark. 43 oligoastrozitom içeren çalışmasında bizim çalışmamıza benzer şekilde vakaların 1p/19q, IDH, p53 ve ATRX durumları değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda oligoastrozitom tanısı almış 42 vaka genetik değişikliklerin saptanmasıyla oligodendrogliom ya da astrozitom tanısı olarak değişmiştir. Ancak 1 vakada 1p/19q kaybı, ATRX mutasyonu ve p53 nükleer ekspresyonu aynı anda izlenmiştir. Oligodendrogliom ve astrozitom için spesifik genetik değişiklikleri gösterdiği için moleküler hibrid olarak tanımlanmıştır (20).

Bir başka çalışmada 1041 glial tümör serisinden sadece 3'ünde ATRX ekspresyonu ve 1p/19q kaybı birlikte görülmüştür. Günümüzde çok nadir olduğu bilinen mikst oligoastrozitom tanısında kalmıştır (118).

Oligoastrozitom tanısı verilirken dikkat edilmesi gereken çok önemli bir teknik detay da mevcuttur. İmmünohistokimyasal yanlış negatif ATRX veya FISH ile yanlış pozitif 1p/19q kaybı saptanması da oligoastrozitom tanısına sevk etmektedir (1).

Çalışmamızda morfolojik olarak derece II-III oligodendrogliom ve astrozitom tanısı almış vakalar entegre tanıyla da aynı tanıları almışlardır. Morfolojik olarak derece II-III oligoastrozitom tanısı almış 19 OA ve 8 AOA vakalarından 8'i (%42.1) OD, 11'i AA (%57.8), 5'i AOD (%62.5) ve 2'si AA (%25) olarak değişmiştir. AOA tanılı 1 vakada moleküler çalışmaların yapılması sonucu hem 1p/19q kaybı hem de ATRX mutasyonu saptandığı için entegre tanıyla da AOA tanısı almıştır. OD tanılı 19 vakadan 2'sinde tanı değiştirilmiştir. Vakalardan 1'inde ATRX mutasyonu saptanmış, 1p/19q kaybı saptanamamıştır. Bu nedenle tanı A olmuştur. Diğer vakada ise FISH yöntemiyle 1p/19q durumu değerlendirilmiş ve sinyal elde edilememiştir, tanı OD-NOS olarak değiştirilmiştir.

“NOS (tanımlanmamış)” tanısı, önceki DSÖ sınıflamalarında yer almayan, DSÖ SSST 2016' da ilk defa tanımlanan bir alt gruptur. Yeni sınıflamadaki gerekli genetik değişiklikler için çalışma yapılmadıysa veya çalışmadan sonuç alınamadıysa “NOS (tanımlanmamış)” alt gruptan bahsedilebilmektedir. Çalışmamızda da olduğu üzere tümörde oligodendrogliyal histoloji, IDH mutasyon varlığı ve nükleer ATRX immunpozitif (non-mutant) olup 1p/19q kaybı başarılı bir şekilde test edilemediyse tanı oligodendrogliom NOS olmaktadır (6).

IDH1 mutasyonu oligodendrogliom ve astrozitomlarda gliomagenezde ilk gerçekleşen genetik olaydır. IDH mutasyonu sonrasında tümörün spesifik diferansiasyonuna ve davranış paternine bağlı olarak farklı genetik değişiklikler gerçekleşmektedir (115). IDH mutasyonu, rutin patolojik incelemelere büyük katkı sağlayan, diagnostik ve prognostik açıdan anlamlı,

önemli bir inceleme alanı olmuştur. Mutasyon değerlendirmelerinin immünohistokimya yöntemi ile incelenebiliyor olması, rutin patoloji uygulamalarına hızla dâhil olmasını sağlamıştır. Konu ile ilgili ilk yayınlardan birinde 22 glioblastom vakasında IDH mutasyonunu inceleyen Parsons ve ark. konuya dikkat çekmişlerdir (70). İlerleyen dönemde 6 merkezden 1010 glial tümör üzerine yapılan bir çalışma ile IDH mutasyonunun genel olarak glial tümörögenezdeki rolü incelenmiştir (72). IDH'in somatik mutasyonlarının tipik olarak astrositik, pür oligodendroglial ya da mikst oligoastrositik diferansiyasyon gösteren tümörler ile bunlardan gelişen glioblastomlarda görüldüğü, tersine primer glioblastomlarda olmadığı ya da az oranda rastlanabileceği bildirilmektedir (29,70).

Bugün astrositom ve oligodendrogliomlarda IDH geninin 132. kodonunda mutasyonun %70-80 oranında görüldüğü, bunların %90'ının IDH1(R132H) mutasyonu olduğu bilinmektedir (115). IDH1 mutasyonu oranları OD'de %42.9-%100, AOD'de %46- %100, A'da %74-90, AA'da %27.3-73, primer glioblastomda %1.8-%19.4; sekonder glioblastomlarda %15.4-%88 olarak verilmektedir (29,34).

Çalışmamızda IDH1(R132H) ekspresyonu, OD'de 23 (%92), AOD'de 12 (%80), OD NOS'ta 1 (%100), A'da 12 (%85.7), AA'da 3 (%75), AOA'da 1 (% 100) vakada gözlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen tüm ara derecedeki glial tümörlerde saptadığımız IDH1(R132H) ekspresyonu görülme sıklıkları literatürde bildirilen yüksek değerlerle uyumludur (29).

Çalışmamızda en sık görülen mutasyon olan IDH1(R132H) mutasyonu, yaygın bir yöntem olan immünohistokimya ile incelenmiştir. Sadece IDH1 (R132H) için ticari olarak primer antikor mevcut olup IDH1 R132G, R132S, R132C gibi sıkça saptanan diğer IDH1 bölgeleri ve IDH2 değerlendirilmesi için ticari antikor üretilmemiştir.

İmmünohistokimyasal olarak IDH1 ekspresyonu saptanamayan vakalarda Sanger sekans DNA dizi analizi uygulanmıştır. Yapılan çalışmalarda da immünohistokimyasal olarak IDH1 ekspresyonu saptanamayan vakalarda DNA dizi analizi yöntemi uygulandığında IDH1 veya IDH2 mutasyonunun saptandığı görülmüştür (115,121).

Çalışmamızdaki vakalardan IDH1 (R132H) immünohistokimyasal olarak negatif saptanan 8 vaka ve kontrol amaçlı randomize seçilen IDH1 (R132H) pozitif 13 vakaya Sanger Sekans DNA Dizisi yapılmıştır. Sanger sekans dizileme ile IDH1 ve IDH2 gen bölgelerine bakılmış ve en sık görülen IDH mutasyonları araştırılmıştır. İmmünohistokimyasal olarak IDH1 eksprese eden 13 vakadan 11'inde sekanslama ile de IDH1 R132H bölgesinde nokta mutasyonu saptanmış, ancak diğer 2 vakada DNA dizi analizi ile IDH mutasyonu saptanmamıştır. IDH1 immünohistokimya preparatı tekrar değerlendirilmiş, hatta immünohistokimyasal IDH1 çalışması tekrar edilmiştir. 2. çalışmada da

immünohistokimyasal olarak IDH1 ekspresyonu net olarak görülmüştür. Bu 2 vakaya yeni nesil sekanslama yöntemiyle DNA dizi analizi uygulanmış ve yine IDH mutasyonu saptanmamıştır.

IDH1 ekspresyonu saptanmayan 8 vakanın 3'ünde dizi analizi ile IDH1 R132H bölgesinde nokta mutasyonu, 2'sinde dizi analizi ile IDH2 R172K ve R172W bölgelerinde nokta mutasyonları saptanmıştır. Geri kalan diğer 3 vakada ne immünohistokimyasal ne de sanger sekans dizi analizi ile IDH mutasyonu görülmemiştir ve bu yüzden IDH mutant olmayan glial tümör olarak adlandırılmıştır.

İmmünohistokimyasal olarak uygulanan IDH1 primer antikorunun IDH1 geninin R132H bölgesindeki mutasyonları yüksek oranda saptadığı bilinmektedir (76). Ancak çalışmamızda da görüldüğü üzere, immünohistokimyasal olarak IDH1 ekspresyonu saptanamayan ve sonrasında Sanger sekans analizi ile yine aynı bölgede IDH1 (R132)'de mutasyon saptanan vakalar mevcuttur. Bu sonuçlara göre kullanılan antikorun spesifitesinin yüksek olamayabileceği düşünülmüştür. Dolayısıyla immünohistokimyasal olarak IDH1 negatif saptanan vakalarda, pozitif sonuç çıkabileceği adına kuvvetli şüphe mevcutsa diğer yöntemler de kullanılarak IDH mutasyonu daha doğru değerlendirilmelidir.

Çalışmalarda, hem IDH1 hem IDH2 genini içeren, Sanger metodu ile yapılan gen sıralaması altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak mutasyonun tespiti için en az %20 oranında mutant alel gerekirken, bu da DNA analizi için kullanılacak kesitlerdeki hücrelerin %40'ından fazlasının tümör olmasını gerektirmektedir. Bu nedenle de tümör içeriğinin düşük olduğu örneklerde yalancı negatif sonuçlar alınabilmektedir (71).

IDH1 mutasyonuna kıyasla IDH2 mutasyonu daha az sıklıkta görülmekte olup birinin varlığı diğerini dışlayıcıdır (73). Çalışmamızda da DNA dizi analizi yapılan vakalarda IDH1 ve IDH2 mutasyonları eş zamanlı görülmemiştir. DNA dizi analizi çalışılan ve pozitif sonuç alınan vakaların 14'ünde (%87.5) IDH1 mutasyonu, 2'sinde (%12.5) IDH2 mutasyonu izlenmiştir.

Çalışmamızda IDH mutasyonu saptanan 57 vakanın 40'ında (%70.1) FISH yöntemiyle 1p/19q kaybı izlenmiştir. 1p/19q kaybı görülen tümörlerde IDH mutasyonunun sıklıkla görülebileceğini bildiren çalışmalarda sunulanlar ile uyumludur (115).

Glial tümörlerde kromozom kayıpları çalışmalarının geçmişi 1991 yılına kadar uzanmaktadır. 1992'de von Deimling, 1994'te Reifenberger 1p ve 19q kaybının oligodendrogliyal tümörlerle ilişkisini ortaya koyan çalışmalar yayınlamışlardır (122). Literatürde 1p/19q kaybının oligodendroglioma göreceli olarak spesifik olabileceği; varlığı durumunda iyi prognoza işaret edebileceği ve terapötik etkisinin de olduğu bildirilmiştir (45).

Oligodendroglial neoplazilerde gözlemciler arası tanı değişkenliğinin belirgin olduğu göz önüne alındığında, 1p/19q kaybı durumunun sorgulanması tanıya gitmede önemli bir yardımcı olmaktadır. Kromozom 1p/19q kombine kaybının anaplastik oligodendroglıomlu hastalarda kemoterapiye yanıtta prediktif ve daha uzun sağkalımda etkili bir pozitif prognostik faktör olduğu da ilk defa 1998'de Cairncross ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır (44). Glial tümörlerin yüksek oranda değerlendirildiği merkezlerde DSÖ 2016 SSST sınıflamasının da önerdiği gibi glial tümörlerde 1p/19q durumu değerlendirilmesi gereken moleküler değişiklik olmuştur (3).

Çalışmamızda histopatolojik tanılara göre 1p/19q kaybı değerlendirildiğinde OD'de 17/18 (%94.4) (1 vakada sinyal elde edilemedi), AOD'de 10/10 (%100), OA'da 8/19 (%42.1), AOA'da 6/8 (%75) olarak saptanmıştır. A ve AA tanılı vakalarda 1p/19q kaybı görülmemiştir. 1p/19q kaybı saptadığımız vakalarda histopatolojik olarak da zaten oligodendroglial tümör tanısı konulmuştur. Yayınlanmış çalışmalarda OD'de 1p/19q kaybının görülme oranı %50-90 olarak verilmektedir (3). Kombine kayıp görülme oranları genel olarak OD'de daha yüksek olsa da çalışmamızdaki sonuçlara benzer şekilde kombine kaybın AOD'lerde de sık görüldüğünü bildiren yayınlar da mevcuttur (17,123).

Oligodendroglial tümörlerde 1p ve 19q ile ilişkili kayıp durumları için elde ettiğimiz oranlar literatürde bildirilenlerle uyumlu olmuştur (40). Derece II ve derece III oligodendroglial tümörlerde %100 oranında görülen 1p/19q kombine kaybı literatürde bildirilen 1p/19q kaybı olmayan oligodendroglial tümör yoktur tezini doğrulamıştır (6).

"1p veya 19q kaybı" gösteren vaka oranları çalışmamızda sadece A'da 19q kaybı şeklinde 3 vakada (%21.4) görülmüştür. Literatürde OD'de 1p kaybı görülme oranı %56-%76; 19q kaybı görülme oranı %56-%87.5 olarak verilmekte; yalnızca 1p kaybı %0-%3.8; yalnızca 19q kaybı %0, %4.7 ve %19 oranlarında bildirilmektedir (45,60). 19q kaybı oranlarının 1p kaybına göre yüksek oluşu nedeniyle 19q kaybının 1p kaybı öncesinde olduğu düşünülmektedir (45). AOD'de görülme sıklıkları 1p kaybı için %50-%89, 19q kaybı için %50-%78 olarak belirtilmektedir (40,123). Astrositik tümörlerde 1p kaybının anaplastik astrositomlarda %22 oranında olduğunu bildiren çalışma da mevcuttur. Bu çalışmada parsiyel 1p kaybının kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmiştir (17). Bir başka çalışmada sadece 19q kaybının saptandığı AA ve GBM tanılı vakalarda daha uzun sağkalım saptanmıştır (124).

Daha eski çalışmalarda astrositik tümörlerde de 1p/19q kaybı olabileceği bildirilmekteyken, güncel bilgilere göre astrositik tümörlerde 1p/19q kaybı kesinlikle bulunmamaktadır (6).

Gliomajeneze bakıldığında 1p/19q kaybının görülmesi için öncelikle IDH mutasyonunun olması gerekmektedir (56). Çalışmamızda IDH-1p/19q ilişkisine uymayan, immünohistokimyasal ve sonrasında Sanger sekans analizi uygulanarak IDH mutasyonu saptanmayan ve beraberinde 1p/19q kaybı saptanan 1 vaka izlenmiştir. Çalışmamızla benzer şekilde IDH mutant olmayan AOD'lerde 1p/19q kaybının gösterildiği yayın da mevcuttur (41).

Geçmişteki çalışmalarda ATRX ekspresyon kaybı derece III AA'larda %80.8, derece III AOA'larda %68.4, derece II A'larda %56, primer GBM'lerde %26.3, derece III AOD'lerde %37.5, derece II OD'lerde %20 ve OA'larda % 0 oranında görülmüştür (36). Jiao ve ark yaptığı 363 beyin tümörünü içeren çalışmada 93 vakada ATRX mutasyonu izlenmiştir. Tanılara göre mutasyon dağılım oranları A'da %67, AA'da %73, OA'da %68 ve sekonder GBM'de %57 olarak saptanmıştır. Primer GBM (%4) ve oligodendrogliyal tümörlerde (%14) çok nadir olduğu belirtilmiştir (79).

Günümüzde ise DSÖ 2016 SSST sınıflamasından da bilindiği üzere ATRX mutasyonu astrositik bir tümör tanısı verebilmek için kullanılan genetik değişikliktir. Henüz DSÖ sınıflamasında tanı kriterleri arasında yer almamıştır; ancak oligodendrogliyal tümörlerde görülmemesi ve 1p/19q kaybı ile birbirini dışlayıcı faktörler olması nedeniyle tanıda ve prognozu belirlemede yardımcı olmaktadır (6). Çalışmamızda da ATRX mutasyonu saptanılan vakalara A veya AA tanısı verilmiştir.

Çalışmamızda 1p/19q kaybı ile ATRX mutasyonu arasında istatistiksel olarak da negatif yönde güçlü, anlamlı korelasyon saptanmıştır ($p < 0,001$).

Çalışmamızda p53 protein ekspresyonu görülen vakaların çoğunluğunu astrositik tümörler oluşturmuştur. 2 AOD (%13.3) ve 1 (%100) AOA vakasında da ekspresyon saptanmıştır, ancak ekspresyon fokal ya da skor (1+) şeklinde olduğu için ve eşlik eden 1p/19q kaybı da saptandığı için tanı AA olmamıştır. Çalışmalarda da p53 ekspresyonu görülen vakalara bakılacak olursa astrositom ve glioblastomlarda %65.7 ve %58.5 ile yüksek oranda, günümüzün nadir tanılarında OA'larda %46.1 ve OD'lerde %12 ile daha düşük oranda görülmektedir. 1p/19q kaybı olan vakalarda daha da düşük (%11.4) olarak saptanmıştır (17,64,125).

IDH1 mutasyonu taşıyan astrositomların çoğunda p53 ekspresyonu da izlenmektedir. Yan ve ark yaptığı çalışmada 939 glial tümör incelenmiş, AA ve GBM'lerin %80'inde IDH1 veya IDH2 mutasyonu ile birlikte p53 mutasyonu saptanmıştır. IDH1 veya IDH2 mutasyonu izlenmeyen yüksek dereceli astrositomların ise sadece %18'inde p53 mutasyonu izlenmiştir (73,115). Watanabe ve ark yaptığı benzer çalışmada IDH mutasyonu izlenen derece II

astrocitomların %63'ünde p53 mutasyonu izlenmiştir. IDH mutant olmayan astrocitomların %20'den azında p53 mutasyonu saptanmıştır (126). Çalışmamızda Yan ve Watanabe serilerine uyumlu olarak IDH1 mutasyonu izlenen derece II astrocitomların %63.6'sında p53 protein ekspresyonu izlenmiştir.

IDH mutasyonu ile p53 ekspresyonu (%94) ve ATRX inaktivasyonu (%86) arasında güçlü bir ilişki olduğu bildirilmektedir (6). ATRX mutasyonu ile IDH mutasyonunun birlikte görülme oranı çalışmamızda %100 olarak tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak pozitif yönde orta derecede, anlamlı bir korelasyon saptanmıştır (p=0,004). ATRX mutasyonu ve p53 ekspresyonu da yüksek oranda birbirlerine eşlik etmektedir. ATRX mutasyonu saptadığımız vakalardan %71.4'ünde p53 ekspresyonu da izlenmiştir.

2014 yılında Cai ve Yang'ın çalışmasında 169 astrocitik tümör serisinde ATRX mRNA ekspresyon azalmasının düşük dereceli astrocitomlarla ilişkili olduğu ve IDH1/2 mutasyonu ile doğru orantılı olduğu saptanmıştır (34). Çalışmamızda derece II-III astrocitik tümör tanılı 13 vakada IDH mutasyonu ve ATRX ekspresyon kaybı literatüre paralel olarak saptanmıştır.

FISH yöntemiyle vakaların tümünde PDGFRA- α /CEP4 amplifikasyon, gen kopya sayısında artış durumu değerlendirilmiş ve amplifikasyon hiçbir vakada saptanmamıştır. OD tanılı vakaların %12'sinde düşük seviye polizomi, AOD tanılı vakaların %20'sinde düşük seviye polizomi, %6.6'sında yüksek seviye polizomi, A tanılı vakaların %21.4'ünde yüksek seviye polizomi ve AA tanılı vakaların %25'inde yüksek seviye polizomi saptanmıştır. Polizominin, amplifikasyon tanımına kıyasla daha az ve sentromeri de içeren gen kopya sayısında artış olduğu bilinmekte olup tam olarak prognostik değeri ortaya konulamamıştır. Ancak çalışmamızda literatür verilerine paralel olarak gen kopya sayısında artış daha çok astrocitik seri tümörlerde ve yüksek dereceli olanlarda saptanmıştır (10,89).

Çalışmamızda vakalar arasında Ki67 skoru ortalamaları OD'de %3.45, AOD'de %17.13, A'da %6.46, AA'da %19.66'dır. OD NOS'ta %2; AOA'da %20 olan birer vaka bulunmaktadır. Vakaların derecelerine göre bakıldığında Ki67 skoru derece II tümörlerde %0.5-30, derece III tümörlerde %3-%50'dir. Derecelerine göre ortalama değerler ise sırasıyla %4.5 ve %17.5 olmuştur. Tanı ve dereceye genel olarak bakıldığında, ayrıca dereceler birbirleri ile tek tek kıyaslandığında ortalama Ki67 skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Manyetik rezonans görüntüleme kontrast madde tutulumu oranı çalışmamızdaki vakalardan OD'de %33.3, AOD'de %21.4, AOA'da %100 (1 vaka), A'da % 8.3; derece II'de %20, derece III'te %20 olarak saptanmıştır. OD NOS ve AA tanılı vakalarda kontrast madde tutulumu saptanmamıştır. Literatürde derece yükseldikçe tümörlerde kontrast madde tutma

oranının arttığı söylenmiştir (127). Ancak çalışmamızda bazı vakaların kontrast tutulum verilerine ulaşamaması nedeniyle literatürle uyumsuz sonuç çıkmıştır.

IDH mutasyonu gösteren vakaların oranı derece II ve III'te %95 oranında saptanmıştır. Literatürle uyumlu olarak dereceden bağımsız olduğu anlaşılmıştır. Çalışmamızda olduğu gibi IDH mutasyonlarının derece II ve derece III oligodendrogliyal ve astrositik tümörlerde yüksek oranda saptandığı belirtilmektedir (29,40).

Sağkalım bilgisine ulaşılabilen 49 vakanın 47'si (%95.9) en az 1 yıl yaşamış; 5 yıl sağkalım bilgisine ulaşılan 15 vakanın 3'ü (%20) en az 5 yıl yaşamıştır. Vakaların tanılarına göre sağkalım durumu değerlendirildiğinde en iyi sağkalım OD tanılı vakalarda saptanmıştır. A, AA ve AOD tanılı vakalarda sağkalım süreleri daha kısa saptanmıştır. Çalışmamızdaki hastalarda da gözlenen, derece yükseldikçe sağkalımın kısalması durumu, glial tümörlerin genel özellikleri ile bağdaşmaktadır.

Sağkalımın OD'de, düşük dereceli astrositomlara göre daha iyi olduğu; tümörde oligodendrogliyal komponent varlığının daha iyi prognoz anlamına geldiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Ohgaki ve ark.'nın 987 vaka üzerinden yaptığı çalışmada medyan sağkalım süresi OD'de 11.6 yıl, düşük dereceli astrositomlarda ise 5.6 yıl olarak bildirilmiştir. Derece III tümörler için de benzer bir durum söz konusudur: Avrupa Kanser Tedavi ve Araştırma Örgütü – Beyin Tümörü Grubu'nun yürüttüğü, 368 hastanın dahil edildiği bir çalışmada medyan sağkalım süresi AOD'de 34.7 ay, AOA'da en fazla 21.9 ay olarak saptanmıştır (32,105). Çalışmamızda oligodendrogliyal tümör ve astrositik tümörler için 1 yıl sağkalım süreleri sırasıyla %100 ve %75'tir. Mevcut bulgular, genel olarak pür oligodendrogliomların prognostik ve prediktif olumlu yanlarına işaret eden literatür verileri ile uyumludur (2,3).

Genetik özelliklerinden bağımsız olarak glial tümörlerin prognostik sıralaması yapılacak olursa en iyi prognozlu oligodendrogliom en kötü prognozlu da astrositomdur. Oligodendrogliomlarda ortalama yaşam süresi 11,6 yıl, astrositik tümörlerde de 5.6 yıldır (105).

Çalışmamızda oligodendrogliyal tümörler içinde IDH mutant olup 1p/19q kaybı saptanan 23 OD, 12 AOD vakası mevcuttur. Bu vakalar içinde sağkalım bilgisine ulaşılabilen 22 OD vakasının ve 9 AOD vakasının hepsinde (%100) 1 yıllık sağkalım izlenmiştir. IDH-mutant ve 1p/19q kayıplı oligodendrogliomların derece II ve III olarak ayrılmasının prognostik bir ayırım sağlamadığını gösteren bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaya paralel sonuç elde edilmiştir (27).

IDH mutant difüz gliomların klinik özelliklerinin, büyüme hızlarının ve genomik değişikliklerinin IDH mutant olmayan gliomlardan farklı olduğu bilinmektedir. IDH mutant

olan tümörler dereceden bağımsız olarak daha iyi prognoza sahiptirler (115). Çalışmamızda IDH1 ekspresyonu negatif vakalarda sağ kalım hızı % 62,5, IDH1 ekspresyonu pozitif vakalarda % 80,0 olup gözlemsel olarak anlamlı fark saptanmıştır (log rank= 0,994, p=0,319).

1p/19q kaybı da IDH mutasyonu gibi iyi prognostik belirteçtir. Bu iki moleküler belirtece göre prognoz sıralaması yapılacak olursa IDH mutant ve 1p19q kaybı olan tümörler en iyi prognozlu, IDH mutant olmayan tümörler en kötü prognozlu, IDH mutant ve 1p19q kaybı olmayan tümörler ara prognozlidir (9). Çalışmamızda IDH mutant ve 1p/19q kaybı olan vakalarda sağkalım %97.8 ve %81.6 olarak saptanmıştır.

1p/19q kaybı varlığının tedaviden bağımsız olarak hastalarda uzun genel sağ kalım ile ilişkilendirilmiştir (47,52,105). Çalışmamızda 1p/19q kaybı olmayan vakalarda sağ kalım hızı %64,3, 1p/19q kaybı olan vakalarda %81,6 olarak saptanmış olup istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 1p/19q kaybı olan vakalarda daha uzun sağkalım saptanmıştır (log rank= 1,816, p= 0,178).

IDH mutasyonu ve 1p/19q kaybı saptanan oligodendroglial morfolojideki tümörler tipik olarak kemoradyoterapiye çok iyi cevap vermektedirler (52).

Çalışmamızda p53 ekspresyonu negatif olan vakalarda sağ kalım hızı %78,9, pozitif olan vakalarda %73,3 olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır (log rank= 0,102, p= 0,750).

P53 protein ekspresyonlarının prognoz üzerindeki etkisi tartışmalıdır. Bazı çalışmalara göre p53 protein ekspresyonları olumsuz klinik sonuçlarla ilişkilendirilmekte ise de, morfolojik özelliklerin dahil edildiği çok değişkenli analizlerde bağımsız bir etki oluşturmadığı gösterilmiştir (32,65,128). IDH-mutant ve 1p/19q kaybı olmayan derece II gliomların immünohistokimyasal p53 ile değerlendirildiği bir çalışmada, p53 ekspresyon artışının prognoz üzerinde herhangi bir etkisi gösterilememiştir (67). Başka bir çalışmada ise IDH-mutant ve p53 protein ekspresyonu gösteren tümörlerin klinik sonuçlarını IDH-mutant ve 1p/19q kayıplı tümörlere göre olumsuz bulmuşlardır (32). Bu sonuçların p53 ekspresyonunun olumsuz etkisi mi yoksa 1p/19q kaybının olumlu etkisi mi olduğu tartışmalıdır.

Literatür verilerine göre IDH1 pozitif veya ATRX ekspresyon kaybı olan astrositik tümörlerin daha uzun sağkalıma sahip oldukları görülmüştür (33). ATRX ekspresyon kaybı olan tümörler daha iyi prognoza sahip olup ortalama yaşam 31-55aydır (87). Bu veriler ışığında çalışmamızdaki vakaların 1 yıllık sağkalım ve ATRX mutasyonu durumu değerlendirildiğinde ATRX mutasyonu saptanan astrositik tümörlerde mutasyon saptanmayan

astroitik tümörlere göre daha yüksek oranda sağkalım (sırasıyla %90.9 ve %80) görülmüştür. Ancak istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilememiştir.

Astroitik tümörler içinde IDH1 ekspresyonu ile sağkalım süreleri değerlendirildiğinde A tanılı vakaların neredeyse tamamının (%80) en az 1 yıl yaşadığı görülmüştür. AA tanılı olan ve IDH1 ekspresyonu görülen vakaların ise hepsi en az 1 yıl yaşamıştır. Reuss ve ark çalışmasıyla uyumlu olarak IDH1 mutant difüz astroitom ile IDH1 mutant anaplastik astroitomlu hastalarda 1 yıllık sağkalım açısından anlamlı fark gözlenmemiştir (25).

Derece III glial tümörlerin moleküler yöntemlerle incelendiği bir çalışmada IDH, ATRX mutasyonu ve 1p/19q durumuna göre prognostik olarak 3 grup halinde sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırma prognozu belirlemek açısından histopatolojik sınıflandırmadan çok daha iyi bir sınıflandırma şeklidir. Bir başka çalışmada Ceccarelli ve ark difüz derece II-IV gliomları moleküler/genetik parametrelere göre 7 alt sınıfa ayırmışlardır. Moleküler sınıflandırmalar klinikçe önemli, tedavi ve prognozu belirlemek için yol göstericidir (36). Gelecekte de glial tümörlerde dereceden bağımsız prognostik sınıflama yapılabilecektir.

Ortalama Ki67 skoru 1 yıl sağkalım gösteren vakalarda %9.18, 1 yıldan daha kısa sürede eks olan vakalarda %15; 5 yıl sağkalım gösteren vakalarda %20, göstermeyen vakalarda %16.09 olmuştur. 1 yıl sağkalımın değerlendirildiği vakalarda Ki67 skorlarının derece ile gösterdiği korelasyon ve literatür verileri paraleldir (129). İstatistik anlam düzeyinde olmayan, Ki-67 skoru ile sağkalım arasında negatif korelasyon saptanmıştır.

IDH1 mutasyonu gösteren vakalarda Ki67 skoru daha düşük saptanmıştır. Ekspresyon gösteren vakalarda Ki67 skoru ortalama %8.14, göstermeyen vakalarda ise %16.28 olmuştur. Bu durum, IDH1(R132H) ekspresyonu ve Ki67 skoru verilerinin, histolojik derece ile ilişkilerine paralellik göstermektedir. Avrupa Kanseri Tedavi ve Araştırma Örgütü - Beyin Tümörü Grubu'nun IDH ve Ki67 ilişkisini araştıran bir çalışmasındaki sonuçları ile benzer niteliktedir (130).

Çalışmamızda vakaların hiçbirinde PDGFR- α amplifikasyonu saptanmadığı için sağkalım hakkında yorum yapılamamıştır. PDGFR- α amplifikasyonu saptanmayan vakalarda sağkalım hızının %76.2 olduğu saptanmıştır.

CEP4 polizomi negatif vakalarda sağ kalım hızı %74,2, CEP4 polizomi pozitif vakalarda %75,0 olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır (log rank=0,002, p=0,966).

Cerrahi rezeksiyon ve KT/RT'ye rağmen çalışmamızda 10 vakada nüks gelişmiştir. Nüks eden vakaların dağılımı; 1 AA, 4 OD, 4 AOD ve 1 AOA şeklindedir. Vakaların kendi tanı grupları içindeki yüzdeleri sırasıyla; %25, %16, %26 ve %100'dür.

Astrositik tümörlerin glial tümörler içinde malignleşme ve tekrarlama eğilimi en yüksek olan tümörler olduğu bilinmektedir (33). Çalışmamızda derece III astrositik tümörlerin yanında derece III oligodendrogial tümörlerde de nüks gelişmiştir.



7.SONUÇLAR

2014 Haarlem ve 2016 DSÖ SSST sınıflamasından önceki histopatolojik sınıflama kriterlerine göre tanı verilmiş derece II ve III oligodendrogliom, astrositom ve oligoastrozitom vakaları çalışmaya alınmıştır. Güncel sınıflamada önerilen genetik değişiklikler vakaların tümünde araştırılmış ve vakalara yeni tanıları verilmiştir. Vakaların klinik verileri ve histopatolojik özellikleri arasındaki ilişki değerlendirildi. Çalışmada öne çıkan veriler aşağıdaki gibidir:

- Çalışmaya alınan 60 vaka içerisinde 28 vakada (%46.6) tanı tamamen değişmiştir.

Histopatolojik olarak OD/AOD tanısı verilmiş 29 vakadan 2'sinde (%6.8) yeni bir entegre tanı verilmiştir. 1 vaka OD-NOS, 1 vaka da A tanısı olarak, histopatolojik tanıyla aynı derecede kalarak tanıları değiştirilmiştir. A/AA tanısı verilmiş vakaların hepsi (4/4) entegre tanı sistemiyle yine aynı tanıları almıştır. Histopatolojik olarak OA/AOA tanısı verilmiş olan vakaların neredeyse tamamında (26/27, %96.2) tanı değişmiş, yeni bir entegre tanı verilmiştir. Tanısı tamamen değişen 26 vakanın 13'ü OD/AOD, 13'ü A/AA tanısı almıştır. Histopatolojik olarak AOA tanılı 1 vaka ise entegre tanı sistemiyle de AOA tanısı almıştır. Tanı değişikliğinin en fazla görüldüğü grup oligoastrozitom tanılı vakalarda olmuştur. Vakaların hiçbirinde tümörün derecesinde değişiklik olmamıştır.

- OD ve AOD tanılı vakaların tümünde IDH1 mutasyonu ve 1p/19q kaybı izlenmiştir. A ve AA tanılı vakaların tümünde IDH1 mutasyonu, ATRX mutasyonu ve p53 ekspresyonu saptanmış olup, 1p/19q kaybı izlenmemiştir.
- OA tanılı vakaların 17'sinde (%89.5) IDH1 ekspresyonu saptanmış, 2 vakada DNA analizi ile de IDH mutasyonu saptanmamıştır. 7 vakada ATRX mutasyonu, 4 vakada p53 ekspresyonu, 8 vakada 1p/19q kaybı saptanmıştır. AOA tanılı vakaların 7'sinde (%87.5) IDH1 mutasyonu saptanmış olup 1 vakada mutasyon saptanamamıştır. 1 vakada ATRX mutasyonu, 6 vakada 1p/19q kaybı saptanmıştır. Bu vakalara spesifik moleküler genetik özelliklerine göre yeni tanıları verilmiştir. Ancak 1 AOA tanılı vakada hem ATRX mutasyonu hem de 1p/19q kaybı saptandığı için tanı aynı bırakılmıştır.
- IDH1(R132H) ekspresyonu ve IDH mutasyonu ağırlıklı olarak oligodendrogliyal ve astrositik tümörlerde pozitif saptanmıştır. Gliomagenizde ilk ortaya çıkan

değişikliklerden biri olduğu anlaşılmıştır. Bu incelemelerin histopatolojik bulgular ile bir arada değerlendirilmesinin, doğru tanı ve derece verilmesinde faydalı olacağı gösterilmiştir.

- En sık IDH mutasyonu olan IDH1 (R132H) mutasyonu immünohistokimyasal olarak saptanabilmektedir, ancak diğer IDH1 ve IDH2 mutasyonlarını gösterebilen primer antikor mevcut değildir. İmmünohistokimyasal IDH1 ekspresyon sonucu negatif vakalarda, mutasyon olasılığı açısından kuvvetli şüphe de mevcutsa PCR yöntemiyle diğer IDH1 mutasyonları ve IDH2 durumunu değerlendirmek gereklidir. Olgularımızdan immünohistokimyasal olarak IDH1 ekspresyonu saptanmayan 8 vakanın 3'ünde IDH1, 2'sinde IDH2 mutasyonu Sanger sekans DNA analizi yöntemiyle saptanmıştır. IDH1 ekspresyonu pozitif olan 13 vakanın da Sanger sekans dizi analizi sonucu 11'inde IDH1 mutasyonu saptanmıştır.
- İmmünohistokimyasal olarak IDH1 mutasyonu değerlendirmesinin yüksek spesifik olduğu bildirilmektedir. Ancak çalışmamızda bu saptamanın kesin olmadığı ortaya çıkmıştır. IDH1 ekspresyonu saptanmayan 3 vakada sonrasında uygulanan Sanger sekans analizi yöntemiyle IDH2 ya da IDH1'in farklı bölgelerinde değil de yine IDH1 (R132H) bölgesinde mutasyon saptanmıştır. Yeterince tümör hücresi bulunan vakalarda Sanger sekans dizi analizi yöntemi yeterlidir. Yeni nesil sekanslama yönteminin sanger sekanslamaya bir üstünlüğü olmadığı gösterilmiştir.
- İmmünohistokimyasal ve Sanger sekans dizi analizi ile IDH1 veya IDH2 mutasyonu saptanamayan 3 vaka (%5) mevcuttur. Bu vakalar;
 - 1. Histopatolojik olarak AOA tanılı, 1p/19q kaybı saptanmış, p53 protein ekspresyonu ve ATRX mutasyonu saptanmamış, entegre tanıyla AOD tanısı verilmiş vaka
 - 2. Histopatolojik OA tanılı, 1p/19q kaybı saptanmamış, p53 protein ekspresyonu saptanmış, ATRX mutasyonu saptanmamış, entegre tanıyla A tanısı verilmiş vaka
 - 3. Histopatolojik OA tanılı, 1p/19q kaybı saptanmamış, p53 protein ekspresyonu saptanmış, ATRX mutasyonu saptanmamış, entegre tanıyla A tanısı verilmiş olan vakalardır.

- 1p/19q kaybı varlığına göre oligodendrogial tümör tanısı verilmiş ve astrositik tümörlerde 1p/19q kaybı saptanmamıştır. Yalnız 19q kaybı saptanan A tanılı 3 vaka izlenmiştir. Eşlik eden ATRX mutasyonu ve p53 ekspresyonu izlendiği için tanı A olarak verilmiştir.
- 1p/19q kaybı ile ATRX mutasyonu arasında istatistiksel olarak negatif yönde anlamlı bir korelasyon saptanmıştır.
- Vakalarımızda incelenen genetik değişikliklerin kendi aralarındaki ilişkileri ve klinik verilerle uyumu literatür ile uyumluluk göstermektedir. 1p kaybı ile 19q kaybı arasında ve ayrıca IDH1(R132H) mutasyonu ile 1p/19q kaybı arasında saptanan korelasyon, glial tümörlerin histogenezinde bugün için kabul gören hipotezler ile uyumludur.
- İmmünohistokimyasal olarak değerlendirilen ATRX mutasyonu ve p53 ekspresyonunun birbirleriyle korele oldukları ve özellikle ATRX mutasyon varlığına göre astrositom tanısı verilebileceği saptanmıştır.
- Bu genetik değişikliklerin tersine, PDGFR- α amplifikasyonunun çalışmaya alınan vakaların hiçbirinde saptanmaması ise literatür ile uyumlu şekilde yüksek dereceli glial tümörlerde (özellikle GBM) saptanan değişiklik olduğu anlaşılmıştır. Düşük dereceli olduğu düşünülen tümörlerde PDGFR- α amplifikasyonunun bulunmaması tanıyı destekleyici bir veri olarak kullanılabilir.
- PDGFR- α polizomisinin özellikle astrositik seri tümörler ve yüksek dereceli astrositomlarda olduğu gösterilmiştir.
- Sağkalım analizlerine bakıldığında vaka sayısındaki azlık ve vakalara ait verilerin yetersizliği nedeniyle istatistiksel anlamlı sonuç elde edilemese de;
- ❖ 1p ve 19q kaybı durumu ile IDH1(R132H) ekspresyonunun ve mutasyonunun daha uzun sağkalım ile ilişkili olduğu gözlenmiştir.
- ❖ Tümör derecesi II olan vakaların sağkalım sürelerinin derece III tümörlere göre daha uzun olduğu saptanmıştır.

8.CONCLUSION

Cases which were diagnosed according to histopathological classification criteria before 2014 Haarlem and 2016 WHO central nervous system classification with stage II and III oligodendroglioma, astrocytoma and oligoastrocytoma were included in the study. The genetic changes proposed in current classifications have been researched and new diagnoses have been given to the cases. The relationship between clinical presentation and histopathologic features of the cases was evaluated. The key data in the study are as follows:

- Diagnosis has completely changed in 28 cases (46.6%) in 60 cases studied. Histopathologically, a new integrated diagnosis was given in 2 out of 29 cases (6.8%) diagnosed with OD / AOD. 1 case OD-NOS, 1 case A had diagnosed and the diagnosis was changed at the same level with histopathological diagnosis. All cases with A / AA diagnosis (4/4) received the same diagnosis with integrated diagnostic system. Nearly all cases (26/27, 96.2%) with histopathologic diagnosis of OA / AOA, the diagnosis was changed and a new integrated diagnosis was given. 26 cases whose diagnosis was totally changed, 13 had OD / AOD, 13 had A / AA. 1 case with AOA was diagnosed same with integrated diagnosis system. The group with the most frequent change of the diagnosis is oligoastrocytoma. There was no change in the grade of the tumor in any of the cases.
- IDH1 mutation and 1p / 19q loss were observed in all OD and AOD cases. IDH1 mutation, ATRX mutation and p53 expression were detected in all cases with A and AA, and 1p / 19q loss was not observed.
- IDH1 expression was detected in 17 cases (89.5%) of cases diagnosed with OA. No IDH mutation was detected by DNA analysis in 2 cases. 7 ATRX mutation in 4 cases, p53 expression in 4 cases, 1p / 19q loss in 8 cases were detected. IDH1 mutation was detected in 7 cases (87.5%) of AOA diagnosed cases and no mutation was detected in 1 case. ATRX mutation in 1 case, 1p / 19q loss in 6 cases were detected. In these cases, new diagnoses are given based on specific molecular genetic properties. However, the diagnosis was left unchanged because both ATRX mutation and 1p / 19q loss were detected in the case of 1 AOA.
- IDH1 (R132H) expression and IDH mutation were predominantly positive in oligodendroglial and astrocytic tumors. It was understood to be one of the first

changes in gliomagenesis. It has been shown that the evaluation of these examinations together with histopathological findings will be useful in correct diagnosis and grading.

- The IDH1 (R132H) mutation, the most common IDH mutation, can be detected by immunohistochemistry, but there is no primer antibody showing other IDH1 and IDH2 mutations. If there is strong suspicion for the possibility of mutation in immunohistochemical IDH1 expression-ending negative cases, it is necessary to evaluate other IDH1 mutations and IDH2 status by PCR method. IDH1 mutation was detected in 3 of 8 cases and IDH2 mutation was detected in 2 of 8 cases by Sanger sequence DNA analysis in which IDH1 expression was not detected immunohistochemically in our cases. In 13 cases with positive IDH1 expression, IDH1 mutation was detected in 11 cases in the result of Sanger sequence analysis.
- Immunohistochemically, it has been reported that the evaluation of IDH1 mutation is highly specific. However, in our study, the opposite result came out. Mutation was detected in the IDH1 (R132H) region and not in the different regions of IDH2 or IDH1 by the Sanger sequence analysis method applied after 3 cases in which IDH1 expression was not detected. In cases of sufficient tumor cells, the Sanger sequence analysis method is sufficient. It has been shown that the new generation sequencing method has no advantage over sanger sequencing.
- Immunohistochemical and Sanger sequence analysis revealed 3 cases (5%) with no IDH1 or IDH2 mutation. These cases;
 - 1 case histopathologically diagnosed as AOA, 1p / 19q loss was detected, p53 protein expression and ATRX mutation were not detected, AOD diagnosis was given with integrated diagnosis,
 - 1 case histopathologic diagnosed of OA, 1p / 19q loss was not detected, p53 protein expression was detected, ATRX mutation was not detected, A diagnosis was given with integrated diagnosis,
 - 1 case histopathologic diagnosed with OA, no 1p / 19q loss, p53 protein expression, no ATRX mutation, A diagnosis was given with integrated diagnosis.

- Oligodendroglial tumor was diagnosed according to the presence of 1p / 19q loss and 1p / 19q loss in astrocytic tumors was not detected. Only 3 cases with a loss of 19q were detected. The ATRX mutation and the p53 expression were detected and diagnosed A.
- A statistically significant negative correlation was found between loss of 1p / 19q and ATRX mutation.
- The relationship between the observed genetic changes in our cases and clinical compliance are consistent with the literature. Correlation between 1p loss and 19q loss, as well as between IDH1 (R132H) mutation and 1p / 19q loss, is consistent with today's accepted hypotheses in the histogenesis of glial tumors.
- It has been determined that immunohistochemically assessed ATRX mutation and p53 expression were correlated with each other and astrocytomic diagnosis could be given, especially according to the presence of ATRX mutation.
- In contrast to these genetic alterations, the fact that PDGFR- α amplification is not detected in any of the cases studied implies that it is an alteration that is detected in high-grade glial tumors (especially GBM), consistent with the literature. The absence of PDGFR- α amplification in tumors thought to be of low grade can be used as a diagnostic supportive data.
- PDGFR- α polysomy has been shown to be especially in astrocytic series tumors and high grade astrocytomas.
- Although there is not a significant result due to the small number of cases and the inadequacy of the data related to the case, survival analysis shows that;
 - It has been observed that the 1p and 19q loss status and IDH1 (R132H) expression and mutation are associated with longer survival.
 - Cases with grade II tumor were found to have longer survival duration than grade III tumors.

9.KAYNAKLAR

1. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 2007;114(2):97–109.
2. Perry A, Brat DJ. *Practical Surgical Neuropathology: A Diagnostic Approach*, Elsevier Health Sciences, 2010.
3. Aldape K, Burger PC, Perry A. Clinicopathologic aspects of 1p/19q loss and the diagnosis of oligodendroglioma. *Arch Pathol Lab Med.* 2007 Feb;131(2):242-51.
4. Horbinski C. Something old and something new about molecular diagnostics in gliomas. *Surg Pathol Clin.* 2012 Dec 1;5(4):919-939.
5. Cohen AL, Holmen SL, Colman H. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2013 May;13(5):345.
6. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. The 2016 World Health Organization Histological Classification of Tumours of the Central Nervous System. International Agency for Research on Cancer. France. 2016
7. Macaulay RJ. Impending Impact of Molecular Pathology on Classifying Adult Diffuse Gliomas. *Cancer Control.* 2015 Apr;22(2):200-5.
8. Haberler C, Wöhrer A. Clinical Neuropathology practice news 2-2014: ATRX, a new candidate biomarker in gliomas. *Clin Neuropathol.* 2014 Mar-Apr;33(2):108-11.
9. Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, Walsh KM, Decker PA, Sicotte H et al. Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. *N Engl J Med.* 2015 Jun 25;372(26):2499-508.
10. Koschmann C, Zamler D, MacKay A, Robinson D, Wu YM, Doherty R et al. Characterizing and targeting PDGFRA alterations in pediatric high-grade glioma. *Oncotarget.* 2016 Oct 4;7(40):65696-65706.
11. Virchow R, Chance F. *Cellular Pathology: As Based Upon physiological and pathological histology : Twenty Lectures Delivered in the Pathological Institute of Berlin During the Months of February, March and April, 1858.* Paperback. 2010 Mar 21.

12. Eastman, Frederic C. A Classification of the Tumors of the Glioma Group on a Histogenetic Basis With a Correlated Study of Prognosis. *Annals of Surgery*. 1926 Jul;84 (1):143-144.
13. Kernohan JW, Mabon RF, et al. A simplified classification of the gliomas. *Proc Staff Meet Mayo Clin*. 1949 Feb 2;24(3):71-5.
14. Ringertz N. Grading of gliomas. *APMIS*. 1950;27 (1): 51-64.
15. Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P. Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer*. 1988 Nov 15;62(10):2152-65.
16. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol*. 1993 Jul;3(3):255-68.
17. Durand KS, Guillaudeau A, Weinbreck N, DeArmas R, Robert S, Chaunavel A et al. 1p19q LOH patterns and expression of p53 and Olig2 in gliomas: relation with histological types and prognosis. *Mod Pathol*. 2010 Apr;23(4):619-28.
18. Aldape K, Simmons ML, Davis RL, Miike R, Wiencke J, Barger G et al. Discrepancies in diagnoses of neuroepithelial neoplasms: the San Francisco Bay Area Adult Glioma Study. *Cancer*. 2000 May 15;88(10):2342-9.
19. Wilcox P, Li CC, Lee M, Shivalingam B, Brennan J, Suter CM et al. Oligoastrocytomas: throwing the baby out with the bathwater? *Acta Neuropathol*. 2015 Jan;129(1):147-9.
20. Sahm F, Reuss D, Koelsche C, Capper D, Schittenhelm J, Heim S et al. Farewell to oligoastrocytoma: in situ molecular genetics favor classification as either oligodendroglioma or astrocytoma. *Acta Neuropathol*. 2014 Oct;128(4):551-9.
21. Louis DN, Perry A, Burger P, Ellison DW, Reifenberger G, von Deimling A et al. International Society Of Neuropathology--Haarlem.. International Society Of Neuropathology-Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain Pathol*. 2014 Sep;24(5):429-35.

22. Olar A, Wani KM, Alfaro-Munoz KD, Heathcock LE, van Thuijl HF, Gilbert MR et al. IDH mutation status and role of WHO grade and mitotic index in overall survival in grade II-III diffuse gliomas. *Acta Neuropathol.* 2015 Apr;129(4):585-96.
23. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016 Jun;131(6):803-20.
- 24 Coons SW, Johnson PC, Scheithauer BW, Yates AJ, Pearl DK. Improving diagnostic accuracy and interobserver concordance in the classification and grading of primary gliomas. *Cancer.* 1997 Apr 1;79(7):1381-93.
25. Reuss DE, Mamatjan Y, Schrimpf D, Capper D, Hovestadt V, Kratz A et al. IDH mutant diffuse and anaplastic astrocytomas have similar age at presentation and little difference in survival: a grading problem for WHO. *Acta Neuropathol.* 2015 Jun;129(6):867-73.
26. Hartmann C, Hentschel B, Wick W, Capper D, Felsberg J, Simon M et al. Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol.* 2010 Dec;120(6):707-18.
27. Figarella-Branger D, Mokhtari K, Dehais C, Jouvett A, Uro-Coste E, Colin C et al. Mitotic index, microvascular proliferation, and necrosis define 3 groups of 1p/19q codeleted anaplastic oligodendrogliomas associated with different genomic alterations. *Neuro Oncol.* 2014 Sep;16(9):1244-54.
28. Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, James CD, Wechsler W, Collins VP. Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol.* 1994 Nov;145(5):1175-90.
29. Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, von Deimling A. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol.* 2008 Dec;116(6):597-602.
30. Ostrom QT, de Blank PM, Kruchko C, Petersen CM, Liao P, Finlay JL et al. Alex's Lemonade Stand Foundation Infant and Childhood Primary Brain and Central Nervous

System Tumors Diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro Oncol.* 2015 Jan;16 Suppl 10:x1-x36.

31. Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol.* 2012 Nov;14.

32. Okamoto Y, Di Patre PL, Burkhard C, Horstmann S, Jourde B, Fahey M et al. Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol.* 2004 Jul;108(1):49-56.

33. Cai J, Zhang C, Zhang W, Wang G, Yao K, Wang Z et al. ATRX, IDH1-R132H and Ki-67 immunohistochemistry as a classification scheme for astrocytic tumors. *Oncoscience.* 2016 Sep 6;3(7-8):258-265.

34. Cai J, Yang P, Zhang C, Zhang W, Liu Y, Bao Z et al. ATRX mRNA expression combined with IDH1/2 mutational status and Ki-67 expression refines the molecular classification of astrocytic tumors: evidence from the whole transcriptome sequencing of 169 samples. *Oncotarget.* 2014 May 15;5(9):2551-61.

35. Suvà ML. Genetics and epigenetics of gliomas. *Swiss Med Wkly.* 2014 Oct 30;144:w14018.

36. Takano S, Ishikawa E, Sakamoto N, Matsuda M, Akutsu H, Noguchi M et al. Immunohistochemistry on IDH 1/2, ATRX, p53 and Ki-67 substitute molecular genetic testing and predict patient prognosis in grade III adult diffuse gliomas. *Brain Tumor Pathol.* 2016 Apr;33(2):107-16.

37. Tsigelny IF, Kouznetsova VL, Lian N, Kesari S. Molecular mechanisms of OLIG2 transcription factor in brain cancer. *Oncotarget.* 2016 Aug 16;7(33):53074-53101.

38. Berezovsky AD, Poisson LM, Cherba D, Webb CP, Transou AD, Lemke NW et al. Sox2 promotes malignancy in glioblastoma by regulating plasticity and astrocytic differentiation. *Neoplasia.* 2014 Mar;16(3):193-206.

39. Wren D, Wolswijk G, Noble M. In vitro analysis of the origin and maintenance of O-2Aadult progenitor cells. *J Cell Biol.* 1992 Jan;116(1):167-76.

40. Riemenschneider MJ, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G. Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathol.* 2010 Nov;120(5):567-84.
41. Felsberg J, Erkwoh A, Sabel MC, Kirsch L, Fimmers R, Blaschke B et al. Oligodendroglial tumors: refinement of candidate regions on chromosome arm 1p and correlation of 1p/19q status with survival. *Brain Pathol.* 2004 Apr;14(2):121-30.
42. Bello MJ, Leone PE, Vaquero J, de Campos JM, Kusak ME, Sarasa JL et al. Allelic loss at 1p and 19q frequently occurs in association and may represent early oncogenic events in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer.* 1995 Jun 22;64(3):207-10.
43. Smith JS, Alderete B, Minn Y, Borell TJ, Perry A, Mohapatra G et al. Localization of common deletion regions on 1p and 19q in human gliomas and their association with histological subtype. *Oncogene.* 1999 Jul 15;18(28):4144-52.
44. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR et al. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst.* 1998 Oct 7;90(19):1473-9.
45. Smith JS, Perry A, Borell TJ, Lee HK, O'Fallon J, Hosek SM et al. Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas. *J Clin Oncol.* 2000 Feb;18(3):636-45.
46. Bauman GS, Ino Y, Ueki K, Zlatescu MC, Fisher BJ, Macdonald DR et al. Allelic loss of chromosome 1p and radiotherapy plus chemotherapy in patients with oligodendrogliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000 Oct 1;48(3):825-30.
47. Yip S, Butterfield YS, Morozova O, Chittaranjan S, Blough MD, An J et al. Concurrent CIC mutations, IDH mutations, and 1p/19q loss distinguish oligodendrogliomas from other cancers. *J Pathol.* 2012 Jan;226(1):7-16.
48. Bettegowda C, Agrawal N, Jiao Y, Sausen M, Wood LD, Hruban RH et al. Mutations in CIC and FUBP1 contribute to human oligodendroglioma. *Science.* 2011 Sep 9;333(6048):1453-5.

49. Brat DJ, Verhaak RG, Aldape KD, Yung WK, Salama SR, Cooper LA et al. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med*. 2015 Jun 25;372(26):2481-98.
50. Horbinski C, Nikiforova MN, Hobbs J, Bortoluzzi S, Cieply K, Dacic S et al. The importance of 10q status in an outcomes-based comparison between 1p/19q fluorescence in situ hybridization and polymerase chain reaction-based microsatellite loss of heterozygosity analysis of oligodendrogliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012 Jan;71(1):73-82.
51. Sonabend AM, Lesniak MS. Oligodendrogliomas: clinical significance of 1p and 19q chromosomal deletions. *Expert Rev Neurother*. 2005 Nov;5(6 Suppl):S25-32.
52. Hartmann C, Hentschel B, Tatagiba M, Schramm J, Schnell O, Seidel C et al. Molecular markers in low-grade gliomas: predictive or prognostic? *Clin Cancer Res*. 2011 Jul 1;17(13):4588-99.
53. van den Bent MJ, Afra D, de Witte O, Ben Hassel M, Schraub S, Hoang-Xuan K et al. Long-term efficacy of early versus delayed radiotherapy for low-grade astrocytoma and oligodendroglioma in adults: the EORTC 22845 randomised trial. *Lancet*. 2005 Sep 17-23;366(9490):985-90.
54. Hayashi S, Sasaki H, Kimura T, Abe T, Nakamura T, Kitamura Y et al. Molecular-genetic and clinical characteristics of gliomas with astrocytic appearance and total 1p19q loss in a single institutional consecutive cohort. *Oncotarget*. 2015 Jun 30;6(18):15871-81.
55. Wiens AL, Cheng L, Bertsch EC, Johnson KA, Zhang S, Hattab EM. Polysomy of chromosomes 1 and/or 19 is common and associated with less favorable clinical outcome in oligodendrogliomas: fluorescent in situ hybridization analysis of 84 consecutive cases. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012 Jul;71(7):618-24.
56. Labussière M, Di Stefano AL, Gleize V, Boisselier B, Giry M, Mangesius S et al. TERT promoter mutations in gliomas, genetic associations and clinico-pathological correlations. *Br J Cancer*. 2014 Nov 11;111(10):2024-32.
57. Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz LA Jr et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Apr 9;110(15):6021-6.

58. Harris CC. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst.* 1996 Oct 16;88(20):1442-55.
59. Xiong J, Liu Y, Li C, Zhu JJ, Ye ZR, Mao Y et al. Loss of heterozygosity of chromosome 1p/19q and p53 protein expression in oligodendroglioma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2009 Jul;38(7):445-50.
60. Ueki K, Nishikawa R, Nakazato Y, Hirose T, Hirato J, Funada N et al. Correlation of histology and molecular genetic analysis of 1p, 19q, 10q, TP53, EGFR, CDK4, and CDKN2A in 91 astrocytic and oligodendroglial tumors. *Clin Cancer Res.* 2002 Jan;8(1):196-201.
61. Vogelstein B, Kinzler KW. p53 function and dysfunction. *Cell.* 1992 Aug 21;70(4):523-6.
62. Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S et al. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J.* 1998 Sep 1;17(17):5001-14.
63. Cui W, Kong X, Cao HL, Wang X, Gao JF, Wu RL et al. Mutations of p53 gene in 41 cases of human brain gliomas. *Ai Zheng.* 2008 Jan;27(1):8-11.
64. Jeuken JW, von Deimling A, Wesseling P. Molecular pathogenesis of oligodendroglial tumors. *J Neurooncol.* 2004 Nov;70(2):161-81.
65. Peraud A, Kreth FW, Wiestler OD, Kleihues P, Reulen HJ. Prognostic impact of TP53 mutations and P53 protein overexpression in supratentorial WHO grade II astrocytomas and oligoastrocytomas. *Clin Cancer Res.* 2002 May;8(5):1117-24.
66. Kurtkaya-Yapicier O, Scheithauer BW, Hebrink D, James CD. p53 in nonneoplastic central nervous system lesions: an immunohistochemical and genetic sequencing study. *Neurosurgery.* 2002 Nov;51(5):1246-54.
67. Figarella-Branger D, Bouvier C, de Paula AM, Mokhtari K, Colin C, Loundou A et al. Molecular genetics of adult grade II gliomas: towards a comprehensive tumor classification system. *J Neurooncol.* 2012 Nov;110(2):205-13.
68. Narahara K, Kimura S, Kikkawa K, Takahashi Y, Wakita Y, Kasai R et al. Probable assignment of soluble isocitrate dehydrogenase (IDH1) to 2q33.3. *Hum Genet.* 1985;71(1):37-40.

69. Labussiere M, Sanson M, Idbaih A, Delattre JY. IDH1 gene mutations: a new paradigm in glioma prognosis and therapy? *Oncologist*. 2010;15(2):196-9.
70. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008 Sep 26;321(5897):1807-12.
71. Felsberg J, Wolter M, Seul H, Friedensdorf B, Göppert M, Sabel MC et al. Rapid and sensitive assessment of the IDH1 and IDH2 mutation status in cerebral gliomas based on DNA pyrosequencing. *Acta Neuropathol*. 2010 Apr;119(4):501-7.
72. Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A et al. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol*. 2009 Oct;118(4):469-74.
73. Cohen AL, Holmen SL, Colman H. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2013 May;13(5):345.
74. Siegal T. Clinical impact of molecular biomarkers in gliomas. *J Clin Neurosci*. 2015 Mar;22(3):437-44.
75. Reitman ZJ, Yan H. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. *J Natl Cancer Inst*. 2010 Jul 7;102(13):932-41.
76. Cai J, Zhu P, Zhang C, Li Q, Wang Z, Li G et al. Detection of ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry in the progression of 211 paired gliomas. *Oncotarget*. 2016 Mar 29;7(13):16384-95.
77. Wang PF, Liu N, Song HW, Yao K, Jiang T, Li SW et al. IDH-1R132H mutation status in diffuse glioma patients: implications for classification. *Oncotarget*. 2016 May 24;7(21):31393-400.
78. Appin CL, Brat DJ. Biomarker-driven diagnosis of diffuse gliomas. *Mol Aspects Med*. 2015 Nov;45:87-96.
79. Jiao Y, Killela PJ, Reitman ZJ, Rasheed AB, Heaphy CM, de Wilde RF et al. Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget*. 2012 Jul;3(7):709-22.

80. Clynes D, Gibbons RJ. ATRX and the replication of structured DNA. *Curr Opin Genet Dev.* 2013 Jun;23(3):289-94.
81. Jiao Y, Shi C, Edil BH, de Wilde RF, Klimstra DS, Maitra A et al. DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science.* 2011 Mar 4;331(6021):1199-203.
82. Cheung NK, Zhang J, Lu C, Parker M, Bahrami A, Tickoo SK et al. Association of age at diagnosis and genetic mutations in patients with neuroblastoma. *JAMA.* 2012 Mar 14;307(10):1062-71.
83. Haas PS, Roy NB, Gibbons RJ, Deville MA, Fisher C, Schwabe M et al. The role of X-inactivation in the gender bias of patients with acquired alpha-thalassaemia and myelodysplastic syndrome (ATMDS). *Br J Haematol.* 2009 Feb;144(4):538-45.
84. Kannan K, Inagaki A, Silber J, Gorovets D, Zhang J, Kasthuber ER et al. Whole-exome sequencing identifies ATRX mutation as a key molecular determinant in lower-grade glioma. *Oncotarget.* 2012 Oct;3(10):1194-203.
85. Ikemura M, Shibahara J, Mukasa A, Takayanagi S, Aihara K, Saito N et al. Utility of ATRX immunohistochemistry in diagnosis of adult diffuse gliomas. *Histopathology.* 2016 Aug;69(2):260-7.
86. Mur P, Mollejo M, Hernández-Iglesias T, de Lope ÁR, Castresana JS, García JF et al. Molecular classification defines 4 prognostically distinct glioma groups irrespective of diagnosis and grade. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2015 Mar;74(3):241-9.
87. Wiestler B, Capper D, Holland-Letz T, Korshunov A, von Deimling A, Pfister SM et al. ATRX loss refines the classification of anaplastic gliomas and identifies a subgroup of IDH mutant astrocytic tumors with better prognosis. *Acta Neuropathol.* 2013 Sep;126(3):443-51.
88. Smith JS, Jenkins RB. Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance, and prognostic implications. *Front Biosci.* 2000 Jan 1;5:D213-31.
89. Puputti M, Tynninen O, Sihto H, Blom T, Mäenpää H, Isola J et al. Amplification of KIT, PDGFRA, VEGFR2, and EGFR in gliomas. *Mol Cancer Res.* 2006 Dec;4(12):927-34.

90. McCarthy N, Liu JS, Richarte AM, Eskiocak B, Lovely CB, Tallquist MD et al. Pdgfra and Pdgfrb genetically interact during craniofacial development. *Dev Dyn*. 2016 Jun;245(6):641-52.
91. Bonita DP, Miyake S, Lupher ML Jr, Langdon WY, Band H. Phosphotyrosine binding domain-dependent upregulation of the platelet-derived growth factor receptor alpha signaling cascade by transforming mutants of Cbl: implications for Cbl's function and oncogenicity. *Mol Cell Biol*. 1997 Aug;17(8):4597-610.
92. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N et al. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science*. 2003 Jan 31;299(5607):708-10.
93. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*. 2008 May 15;22(10):1276-312.
94. Buitenhuis M, Verhagen LP, Cools J, Coffey PJ. Molecular mechanisms underlying FIP1L1-PDGFR α -mediated myeloproliferation. *Cancer Res*. 2007 Apr 15;67(8):3759-66.
95. Ozawa T, Brennan CW, Wang L, Squatrito M, Sasayama T, Nakada M et al. PDGFRA gene rearrangements are frequent genetic events in PDGFRA-amplified glioblastomas. *Genes Dev*. 2010 Oct 1;24(19):2205-18.
96. Phillips JJ, Aranda D, Ellison DW, Judkins AR, Croul SE, Brat DJ et al. PDGFRA amplification is common in pediatric and adult high-grade astrocytomas and identifies a poor prognostic group in IDH1 mutant glioblastoma. *Brain Pathol*. 2013 Sep;23(5):565-73.
97. Burger PC, Pearl DK, Aldape K, Yates AJ, Scheithauer BW, Plass SM et al. Small cell architecture--a histological equivalent of EGFR amplification in glioblastoma multiforme? *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001 Nov;60(11):1099-104.
98. Little SE, Popov S, Jury A, Bax DA, Doey L, Al-Sarraj S et al. Receptor tyrosine kinase genes amplified in glioblastoma exhibit a mutual exclusivity in variable proportions reflective of individual tumor heterogeneity. *Cancer Res*. 2012 Apr 1;72(7):1614-20.
99. Chi AS, Batchelor TT, Yang D, Dias-Santagata D, Borger DR, Ellisen LW et al. BRAF V600E mutation identifies a subset of low-grade diffusely infiltrating gliomas in adults. *J Clin Oncol*. 2013 May 10;31(14):e233-6.

100. Schindler G, Capper D, Meyer J, Janzarik W, Omran H, Herold-Mende C et al. Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol.* 2011 Mar;121(3):397-405.
101. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet.* 1997 Apr;15(4):356-62.
102. Capelle L, Oei P, Teoh H, Hamilton D, Palmer D, Low I et al. Retrospective review of prognostic factors, including 1p19q deletion, in low-grade oligodendrogliomas and a review of recent published works. *J Med Imaging Radiat Oncol.* 2009 Jun;53(3):305-9.
103. Lin H, Bondy ML, Langford LA, Hess KR, Delclos GL, Wu X et al. Allelic deletion analyses of MMAC/PTEN and DMBT1 loci in gliomas: relationship to prognostic significance. *Clin Cancer Res.* 1998 Oct;4(10):2447-54.
104. Inda MM, Mercapide J, Muñoz J, Coullin P, Danglot G, Tuñon T et al. PTEN and DMBT1 homozygous deletion and expression in medulloblastomas and supratentorial primitive neuroectodermal tumors. *Oncol Rep.* 2004 Dec;12(6):1341-7.
105. Li YX, Shi Z, Aibaidula A, Chen H, Tang Q, Li KK et al. Not all 1p/19q non-codeleted oligodendroglial tumors are astrocytic. *Oncotarget.* 2016 Oct 4;7(40):64615-64630.
106. Yan W, Zhang W, You G, Bao Z, Wang Y, Liu Y et al. Correlation of IDH1 mutation with clinicopathologic factors and prognosis in primary glioblastoma: a report of 118 patients from China. *PLoS One.* 2012;7(1).
107. Tubbs RR, Stoler MH. *Cell and tissue based molecular pathology*, Philadelphia: Churchill Livingstone/Elsevier, 2009.
108. Mayo Medical Laboratories; 1p/19q Deletion in Gliomas, FISH procedure. [<http://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/80029>].
109. Zneimer, S. *Cytogenetic Abnormalities: Chromosomal, FISH, and Microarray-Based Clinical Reporting and Interpretation of Result*. John Wiley & Sons, 2014.

110. Olsvik O, Wahlberg J, Petterson B, Uhlén M, Popovic T, Wachsmuth IK et al. Use of automated sequencing of polymerase chain reaction-generated amplicons to identify three types of cholera toxin subunit B in *Vibrio cholerae* O1 strains. *J Clin Microbiol.* 1993 Jan;31(1):22-5.
111. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975 May 25;94(3):441-8.
- 112.<http://www.abbottmolecular.com/products/oncology/FISH/vysis-1p36/1q25-and-19q13/19p13>
113. Sanai N, Chang S, Berger MS. Low-grade gliomas in adults. *J Neurosurg.* 2011 Nov;115(5):948-65.
114. Takami H, Yoshida A, Fukushima S, Arita H, Matsushita Y, Nakamura T et al. Revisiting TP53 Mutations and Immunohistochemistry-A Comparative Study in 157 Diffuse Gliomas. *Brain Pathol.* 2015 May;25(3):256-65.
115. Appin CL, Brat DJ. Molecular genetics of gliomas. *Cancer J.* 2014 Jan-Feb;20(1):66-72.
116. Kros JM, Gorlia T, Kouwenhoven MC, Zheng PP, Collins VP, Figarella-Branger D et al. Panel review of anaplastic oligodendroglioma from European Organization For Research and Treatment of Cancer Trial 26951: assessment of consensus in diagnosis, influence of 1p/19q loss, and correlations with outcome. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2007 Jun;66(6):545-51.
117. Cairncross JG, Macdonald DR, Ramsay DA. Aggressive oligodendroglioma: a chemosensitive tumor. *Neurosurgery.* 1992 Jul;31(1):78-82.
118. Huse JT, Diamond EL, Wang L, Rosenblum MK. Mixed glioma with molecular features of composite oligodendroglioma and astrocytoma: a true "oligoastrocytoma"? *Acta Neuropathol.* 2015 Jan;129(1):151-3.
119. Hart MN, Petito CK, Earle KM. Mixed gliomas. *Cancer.* 1974 Jan;33(1):134-40.
120. Daumas-Duport C, Varlet P, Tucker ML, Beuvon F, Cervera P, Chodkiewicz JP. Oligodendrogliomas. Part I: Patterns of growth, histological diagnosis, clinical and imaging correlations: a study of 153 cases. *J Neurooncol.* 1997 Aug;34(1):37-59.

121. Reuss DE, Sahm F, Schrimpf D, Wiestler B, Capper D, Koelsche C. ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry with subsequent copy number analysis and IDH sequencing as a basis for an "integrated" diagnostic approach for adult astrocytoma, oligodendroglioma and glioblastoma. *Acta Neuropathol.* 2015 Jan;129(1):133-46.
122. von Deimling A, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, Wiestler OD, Seizinger BR. Evidence for a tumor suppressor gene on chromosome 19q associated with human astrocytomas, oligodendrogliomas, and mixed gliomas. *Cancer Res.* 1992 Aug 1;52(15):4277-9.
123. Barbashina V, Salazar P, Holland EC, Rosenblum MK, Ladanyi M. Allelic losses at 1p36 and 19q13 in gliomas: correlation with histologic classification, definition of a 150-kb minimal deleted region on 1p36, and evaluation of CAMTA1 as a candidate tumor suppressor gene. *Clin Cancer Res.* 2005 Feb 1;11(3):1119-28.
124. Brat, Daniel J., et al. Analysis of 1p, 19q, 9p, and 10q as prognostic markers for high-grade astrocytomas using fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays from Radiation Therapy Oncology Group trials. *Neuro-oncology.* 2004;6 (2):96-103.
125. Reifenberger G, Louis DN. Oligodendroglioma: toward molecular definitions in diagnostic neuro-oncology. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2003 Feb;62(2):111-26.
126. Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol.* 2009 Apr;174(4):1149-53.
127. Lev MH, Ozsunar Y, Henson JW, Rasheed AA, Barest GD, Harsh GR 4th et al. Glial tumor grading and outcome prediction using dynamic spin-echo MR susceptibility mapping compared with conventional contrast-enhanced MR: confounding effect of elevated rCBV of oligodendrogliomas. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2004 Feb;25(2):214-21. Erratum in: *AJNR Am J Neuroradiol.* 2004 Mar;25(3):B1.
128. Watanabe T, Katayama Y, Yoshino A, Komine C, Yokoyama T. Deregulation of the TP53/p14ARF tumor suppressor pathway in low-grade diffuse astrocytomas and its influence on clinical course. *Clin Cancer Res.* 2003 Oct 15;9(13):4884-90.

129. Hsu DW, Louis DN, Efid JT, Hedley-Whyte ET. Use of MIB-1 (Ki-67) immunoreactivity in differentiating grade II and grade III gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997 Aug;56(8):857-65.

130. Preusser M, Hoeffberger R, Woehrer A, Gelpi E, Kouwenhoven M, Kros JM et al. Prognostic value of Ki67 index in anaplastic oligodendroglial tumours-a translational study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group. *Histopathology*. 2012 May;60(6):885-94.

