



T.C

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**GLİOBLASTOMA VE HİSTOLOJİK VARYANTLARINDA ATRX,
IDH-1, P53 MUTASYONLARININ Kİ67 PROLİFERASYONU VE
PROGNOZLA İLİŞKİSİ**

DR. FATMA DİLEK KAYMAKÇI

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL-2014



T.C
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**GLİOBLASTOMA VE HİSTOLOJİK VARYANTLARINDA ATRX,
IDH-1, P53 MUTASYONLARININ Kİ67 PROLİFERASYONU VE
PROGNOZLA İLİŞKİSİ**

DR. FATMA DİLEK KAYMAKÇI

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Doç Dr. SÜHEYLA BOZKURT UYAR

İSTANBUL-2014

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim ve tezimin hazırlanması süresince bana bilgi ve deneyimlerini aktaran, hiçbir konuda desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç Dr. Süheyla Bozkurt Uyar'a, patoloji bilimini bana sevdiren, tecrübelerini bizlerle her koşulda paylaşan, birlikte çalışmaktan mutluluk ve onur duyduğum değerli hocalarım Prof. Dr. Çiğdem Ataizi Çelikel, Prof. Dr. Handan Kaya, Prof. Dr. Rengin Ahıskalı, Prof. Dr. Funda Tanay Eren, Prof. Dr. Leyla Cinel ve Doç. Dr. Kemal Türköz'e , asistanlığım süresince ve tez çalışmam sırasında desteklerini esirgemeyen Doç Dr. Pelin Bağcı, Yrd. Doç. Dr. İpek Erbarut Seven, Yrd. Doç. Dr. Emine Baş Bozkurtlar ve Yard. Doç Dr. Deniz Filinte' ye, sevgili dostlarım ve çalışma arkadaşlarım Dr. Aygün İkinci, Dr. Burcu Tüzüner Ergönül, Dr. Erdem Kombak, Dr. Gökçe Aşkan, Dr. Hande Mollamemişoğlu, Dr. Gülçiçek Ayrancı başta olmak üzere , asistan arkadaşlarım Dr. Fatma Gerin, Dr. Hasan Toper, Dr. Gamze Ak, Dr. Begüm Başyiğit, Dr. Ekin Parlak' a, bu çalışmada emeği geçen Gülcan Davulcu, Arınç Arpınar, Demet Bayrak başta olmak üzere tüm laboratuvar ekibine, bugüne kadar her konuda desteklerini benden esirgemeyen ve bana güven veren anneme, babama ve kız kardeşim Ayşegül Kaymakçı'ya teşekkürü bir borç bilirim.

ÖZET

Amaç: Glioblastomun (GBM) histolojik varyantlarında (küçük hücreli, dev hücreli, oligodendroglial komponent içeren, konvansiyonel GBM) ve gelişim mekanizmasına göre primer ve sekonder GBM'lerde ATRX, IDH-1, P53 mutasyonlarının sıklığını belirlemek ve bu mutasyon belirteçlerinin Ki67 proliferasyonu ve prognozla ilişkisini değerlendirmek.

Gereç ve yöntemler: Retrospektif olarak planlanan bu çalışmada 2001-2014 yılları arasında Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji ABD ve Marmara Üniversitesi Nörolojik Bilimler Enstitüsü Patoloji Bölümünde tanı alan ve klinik bilgilerine ulaşılabilen 82 GBM olgusu incelendi. Olgulara ait seçilen tümör bloklarına ATRX ve IDH1 immünhistokimyası uygulandı. p53 ve Ki67 immünhistokimya lamları arşivden elde edildi. İmmünhistokimya sonuçları semikantitatif olarak değerlendirilerek istatistiksel analiz yapıldı.

Bulgular: Olguların %60'ı konvansiyonel GBM (n=49), % 17'i (n=14) küçük hücreli GBM, %16'sı (n=%13) oligodendrogloma komponentli GBM, % 7'i (n=6) dev hücreli GBM'dir. GBM'in histolojik varyantlara göre Ki67 değerlendirilmesinde küçük hücreli GBM'in diğer varyantlara göre, dev hücreli GBM'in konvansiyonel GBM'e göre daha yüksek proliferasyon indeksine sahip olduğu, konvansiyonel GBM'in ise diğer varyantlara kıyasla daha düşük Ki67 proliferasyon indeksine (<%25) sahip olduğu görüldü. p53 mutasyonuna sahip olguların olmayanlara kıyasla yüksek Ki67 proliferasyon indeksine sahip olduğu saptandı. IDH1 ekspresyonu saptanan 5 olgunun tamamı sekonder GBM grubunda idi. ATRX değerlendirmesinde 82 olgunun 28'inde (%34,1), primer GBM'lerin %36,6'sında, sekonder GBM'lerin ise %18,2 sinde ATRX ekspresyon kaybı saptandı. ATRX ekspresyon kaybının düşük Ki67 proliferasyonu ile ilişkili olduğu görüldü. Sağkalım değerlendirmelerinde yüksek Ki67 proliferasyon indeksi, IDH1 ekspresyonu iyi sağkalımla ilişkili bulunurken ATRX ekspresyon kaybı ve p53 mutasyonu sağkalımla ilişkili bulunmadı

Sonuç: Ki67 proliferasyon indeksi GBM histolojik varyantları arasında farklılık göstermektedir ve yüksek Ki67 proliferasyonu iyi sağkalımla ilişkilidir. IDH1 sekonder GBM'lerde sık rastlanan bir mutasyondur ve iyi sağkalımla ilişkilidir. De novo gelişen primer GBM'lerde de ATRX ekspresyon kaybı görülmektedir ve düşük dereceli gliomların aksine GBM'lerde ATRX mutasyonu iyi sağkalımla ilişkilendirilemez.

SUMMARY

AIM: To detect frequencies of ATRX, IDH-1 and p53 mutations among histologic variants of glioblastoma (GBM) (conventional GBM, small cell GBM, giant cell GBM, GBM with oligodendroglioma component) with discrimination of developmental mechanism addressing primary (de novo) and secondary forms; and to evaluate the relationship between these mutations with Ki67 proliferation index and prognosis.

MATERIALS AND METHODS: 82 GBM cases with available clinical data, diagnosed at Marmara University Medical Faculty - Pathology Department and Marmara University - Neurological Sciences Institute between 2001 and 2014 were retrospectively evaluated. ATRX and IDH-1 immunohistochemistry were performed on selected tissues and assessed semiquantitatively under light microscope. Ki67 and p53 immunohistochemistry were assessed likewise semiquantitatively from previously prepared slides, performed for our routine practice and thus obtained from the archives of our department.

FINDINGS: 60% of the cases were conventional GBM (n=49), whereas 17% were small cell GBM (n=14), 16% were GBM with oligodendroglioma component (n=13), 7% were giant cell GBM (n=6). Assessment of Ki67 proliferation index in GBM's according to histologic variants, resulted in a superiority in small cell GBM's comparing to other variants and in giant cell GBM's comparing to conventional type. Conventional type GBM's displayed lower Ki67 index (<25%). p53 mutated cases displayed higher Ki67 index than the remainder. All 5 cases displaying expression with IDH-1 belonged to secondary GBM group. In ATRX evaluation; 28 of all cases (34.1%), 36.6% of primary GBM's and 18.2% of secondary GBM's displayed loss of ATRX expression. Loss of ATRX expression was found to be related to low Ki67 index. High Ki67 index and IDH-1 expression were found to be correlated with better prognosis, whereas loss of ATRX expression and p53 mutation could not be linked with prognosis.

RESULTS: Ki67 index shows dissimilarity among histologic variants of GBM.

High Ki67 index is associated with better prognosis in GBM's. IDH-1 is a frequent mutation in secondary GBM's and related to better prognosis. Loss of ATRX expression is often observed in de novo/primary GBM's and despite low grade gliomas; can not be linked with better prognosis.

İçindekiler

<u>1.GİRİŞ VE AMAÇ</u>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
<u>2.GENEL BİLGİLER</u>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
<u>2.1.Beyin Anatomisi</u>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
<u>2.2.Santral Sinir Sistemi Histolojisi</u>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
<u>2.2.1.Santral sinir sisteminin hücresel bileşenleri</u>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
<u>2.3.Santral Sinir Sistemi Tümörleri</u>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
<u>2.3.1.Santral Sinir Sistemi Tümörleri Sınıflaması</u>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
<u>2.3.2.Santral Sinir Sistemi Tümörlerinde DSÖ Derecendirme Sistemi</u>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
<u>2.4.GLİOBLASTOM</u>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
<u>2.4.1.Epidemiyoloji ve Etyoloji</u>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
<u>2.4.2.Lokalizasyon</u>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
<u>2.4.3.Prognostik ve Klinik Özellikler</u>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
<u>2.4.4.Uzak Yayılım ve Metastaz</u>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
<u>2.4.5.İnvazyon Mekanizması</u>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
<u>2.4.6.Makroskopik Özellikler</u>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
<u>2.4.7.Histopatoloji</u>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
<u>2.4.8.Proliferasyon</u>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
<u>2.4.9.Histogenez ve Genetik Özellikler</u>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
<u>2.4.10.Primer ve Sekonder Glioblastom</u>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
<u>2.4.11.Dev Hücreli Glioblastom</u>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
<u>2.4.12.Küçük Hücreli Glioblastom</u>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
<u>2.4.13.Oligodendroglioma Komponenti İçeren Glioblastom</u>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
<u>2.5.TP53 yolağı:</u>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
<u>2.6.IDH1</u>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
<u>2.7.ATRX</u>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
<u>3.GEREÇ VE YÖNTEMLER</u>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
<u>3.1.Olgu Seçimi</u>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
<u>3.2.Etik Kurul</u>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
<u>3.3.Yöntem</u>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
<u>3.4.İmmünohistokimya</u>	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

3.5.Değerlendirme.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.5.1.Histopatolojik değerlendirme	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.5.2.P53, Ki67, ATRX ve IDH1 İmmünekspresyonlarının Değerlendirilmesi	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.6.Klinik Bilgiler ve Tedavi Protokolü.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.7.İstatistiksel Analiz	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.BULGULAR.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.1.Genel Klinik Bulgular.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.2.Histomorfolojik değerlendirme sonuçları.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.2.1.Histomorfolojik değerlendirme sonucunda tanısı değiştirilen olgular: ..	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.2.2.Sekonder GBM grubuna ait olguların primer tanıları:	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.3.Primer ve Sekonder GBM Gruplarına Ait Klinik Bulgular:	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.4.Histolojik Varyantlara Ait Klinik Bulgular:	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.5.İmmünhistokimya Bulguları	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.5.1.Ki67.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.5.2.P53	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.5.3.IDH1	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.5.4.ATRX.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.6.Sağkalım Bulguları	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.6.1.Genel Sağkalım Analizi:	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.6.2.Hastalıksız Sağkalım Analizi	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.6.3.Primer ve Sekonder GBM'lerde Sağkalım Analizi.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.6.4.Primer ve Sekonder GBM'lerde Hastalıksız Sağkalım Analizi	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.6.5.Ki67 Proliferasyonuna Göre Sağkalım Analizi	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.6.6.P53 Boyanmasına Göre Sağkalım Analizi ..	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.6.7.IDH1 Boyanmasına Göre Sağkalım Analizi ..	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.6.8.ATRX Boyanmasına Göre Sağkalım Analizi	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

4.6.9. ATRX Boyanmasına Göre Primer ve Sekonder GBM'lerde Sağkalım Analizi.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
5. TARTIŞMA.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
6. SONUÇLAR.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
7. KAYNAKLAR	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. 2007 DSÖ Sinir Sistemi Tümörleri Sınıflaması

Tablo 2 : SSS Tümörlerinde DSÖ Dereceleri

Tablo 3. İmmünohistokimya da kullanılan antikorlar

Tablo 4. Primer ve Sekonder GBM gruplarında yaş dağılımı

Tablo 5. Primer ve Sekonder GBM gruplarında cinsiyet dağılımı

Tablo 6. Primer ve Sekonder GBM gruplarında Eksitus/ sağ hasta dağılımı

Tablo 7. Histolojik varyantlarda yaş dağılımı

Tablo 8. Histolojik varyantlarda cinsiyet dağılımı

Tablo 9. Histolojik varyantlarda eksitus/ sağ hasta dağılımı

Tablo.10. Ki67 boyanma dağılımı

Tablo 11. Primer ve Sekonder GBM'lerde Ki67 İHK sonuçları

Tablo.12. Primer ve sekonder GBM gruplarında Ki67 boyanma skoru

Tablo 13. Histolojik varyantlarda Ki67 İHK sonuçları

Tablo.14. P53 boyanma dağılımı

Tablo 15. Primer ve sekonder GBM'lerde P53 İHK bulguları;

Tablo 16. Histolojik varyantlara göre P53 İHK bulguları;

Tablo 17. IDH1 boyanma dağılımı;

Tablo 18. Primer ve Sekonder GBM'lerde IDH1 bulguları;

Tablo 19. Histolojik varyantlarda IDH1 Bulguları

Tablo 20. ATRX boyanma dağılımı

Tablo 21. Primer ve sekonder GBM'lerde ATRX bulguları:

Tablo 22. Histolojik varyantlarda ATRX bulguları:

Tablo 23. ATRX Boyanma Sonuçları ile P 53 ve IDH1 ve Ki67 Boyanma Sonuçları İlişkisi

Tablo 24. IDH1 ile P 53 ve Ki67 Boyanma Sonuçları İlişkisi

Tablo 25 : P 53 Boyanma Sonuçları ile Ki 67 Boyanma Sonuçları İlişkisi

Tablo 26. Primer-Sekonder'e Göre Sağkalım Analizi

Tablo 27. Ki 67 Proliferasyon İndeksine Göre Sağkalım Analizi

Tablo 28. P 53 Boyanma Skoruna Göre Sağkalım Analizi

Tablo 29. IDH Mutasyonu Varlığına Göre Sağkalım Analizi

Tablo 30 : IDH1 Mutasyonu Varlığına Göre Hastalıksız Sağkalım Analizi

Tablo 31. ATRX Mutasyonu Varlığına Göre Sağkalım Analizi

Tablo 32. ATRX Mutasyonu Varlığına Göre Hastalıksız Sağkalım Analizi

Tablo 33. ATRX Mutasyon Varlığına Göre Grupların Sağkalım Analizi

ŞEKİL DİZİNİ:

Şekil 1 . Üst: Beynin süperiordan görünümü. Alt: Beynin inferiordan görüntüsü

Şekil 2. GBM'de yaş ve cinsiyet dağılımı

Şekil 3. Primer ve sekonder glioblastomlarda genetik yolaklar

Şekil 4. P53 geninin temel fonksiyonları

Şekil 5. ATRX ve Histon H3.3 birleşimi ile kromatin organizasyonunun düzenlenmesi . A. Nükleozom olarak da bilinen DNA'nın histonlar

Şekil 6. Gliomların histolojik tip ve moleküler belirleyicilere dayalı önerilen moleküler sınıflaması

Şekil 7 A. Primer ve Sekonder GBM gruplarında hasta dağılımı B. Histolojik varyantlara göre hasta dağılımı.

Şekil 8. A. Mikrovasküler proliferasyon. B. Palizatlaşan nekroz alanları

Şekil 9. Çalışma serimize ait KGBM olgusu A. H&E x40 B. H&E x200 C. Palizatlaşan nekroz alanları, H&E, x100 D. Ki67 nükleer ekspresyonu, yüksek proliferasyon indeksi (%40)

Şekil 10. OGBM olgusu A. Oligodendrogliyal komponent B. Oligodendrogliyal komponentteki kümes teli damar paterni C. Aynı tümörde bulunan astrositik komponent.

Şekil 11. DGBM olgusu A. H&E x200 B. H&E x200, coğrafik nekroz alanları C.H&E x400

Şekil 12. Ki67 A. 1+ (Düşük proliferasyon indeksi) B. 2+ C. 3+ (B-C yüksek proliferasyon indeksi)

Şekil 13. Histolojik Varyantlarda Ki67 proliferasyon indeksi dağılımı

Şekil 14. Histolojik Varyantlarda Ki67 boyanma skoru dağılımı

Şekil 15. P53 A. Negatif B. 1+ C. 2+ D. 3+

Şekil 16. IDH1 A. Kuvvetli sitoplazmik boyanma X100, B. Kuvvetli sitoplazmik boyanma X400 C. Zayıf sitoplazmik boyanma X100 D. Zayıf sitoplazmik boyanma X200 E. Negatif ekspresyon

Şekil 17. Primer ve sekonder GBM’lerde IDH1 boyanma dağılımı

Şekil 18. ATRX yaygın nükleer ekspresyon A. x100 B. X400 (Damar endotelindeki nükleer ekspresyona dikkat ediniz)

Şekil 19. ATRX ekspresyon kaybı gösteren olgular A. X100, damar endotelindeki boyanma internal pozitif kontrol olarak alındı B. X400

Şekil 20. Genel sağkalım grafiği

Şekil 21. Hastalıksız sağkalım grafiği

Şekil 22. Primer ve Sekonder GBM gruplarına göre sağkalım analizi grafiği

Şekil 23. Primer ve Sekonder GBM gruplarına göre hastalıksız sağkalım analizi grafiği

Şekil 24. Ki67 proliferasyon indeksine göre sağkalım analizi grafiği

Şekil 25. P53 mutasyonu varlığına göre sağ kalım analizi grafiği

Şekil 26. IDH1 mutasyonu varlığına göre sağkalım analizi grafiği

Şekil 27. IDH1 mutasyonu varlığına göre hastalıksız sağkalım analizi grafiği

Şekil 28. ATRX mutasyonu varlığına göre sağkalım analizi grafiği

Şekil 29. ATRX mutasyonu varlığına göre hastalıksız sağkalım analizi grafiği

Şekil 30. ATRX mutasyonu varlığına göre primer ve sekonder GBM’lerde sağkalım analizi grafiği.

Kısaltmalar Dizini

GBM: Glioblastom

SSS: Santral sinir sistemi

İHK: İmmünohistokimya

OGBM: Oligodendrogial komponentli glioblastom

KGBM: Küçük hücreli glioblastom

DGBM: Dev hücreli glioblastom

GSK: Gliosarkom

IDH1: İzositrat dehidrogenaz 1

ATRX: Alfa talasemi mental retardasyon sendrom X

GFAP: Glial fibriller asidik protein

BOS: Beyin omurilik sıvısı

LOH: Heterozigosite kaybı

FISH: Floresan in situ hibridizasyon

ALT: Telomerazın alternatif uzatımı

RT: Radyoterapi

KT: Kemoterapi

GİRİŞ VE AMAÇ

Glioblastomlar (GBM) ve malign gliomlar, erişkinlerde görülen en yaygın primer beyin tümörleridir [1, 2]. GBM astrositik diferansiasyondan baskındır ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2007 sınıflamasına göre yüksek dereceli astrositom kategorisinde yer almaktadır [2]. Tedavideki son gelişmelere rağmen prognoz oldukça kötüdür ve ortalama sağkalım 12-15 aydır [3].

Beyin tümörleri ilk defa Bailey ve Cushing [4] tarafından 1900'lü yılların başında, tümörlerin mikroskopik görünüşleri esas alınarak sınıflandırılmıştır. Günümüzde yapılan sınıflamada bu sınıflama temel alınmış ve çeşitli araştırmalara göre şekillenmiştir.

Yardımcı tanısal testler olarak kullanılan immünohistokimya ve moleküler genetik çalışmalar son yıllarda tanıya yardımcı olmalarının yanı sıra, prognostik ve prediktif değerleri öngörmeye ve tedavi direncini belirlemede oldukça faydalı olmaktadır. Son zamanlarda prognozu öngörmeye tümörlerin moleküler profilinin histolojik profilden daha etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [5]. Özellikle yüksek dereceli gliomlar oldukça farklı klinik davranışlar gösterebilmektedir. 2007 DSÖ sınıflamasında prognozu öngörmek, tedavi direncini belirlemek gibi problemler ortaya çıkmaktadır. Patolojik tanının subjektif olması, tümör içi farklı histolojik varyasyonlar, yüksek dereceli gliomların farklı hücresel diferansiasyon gösterebilmesi de bu problemlere örnek teşkil edebilir. Günümüzde kanser tanısı saf morfolojik kriterlerden, moleküler kriterlere de dayalı bir yola doğru ilerlemektedir.

Glioblastomların bir kısmı de novo olarak gelişmekte (primer GBM), bazıları ise düşük dereceli astrositik tümörlerden derece IV GBM'e (sekonder GBM) dönüşmektedir [6]. Primer ve sekonder GBM'ler arasında da çeşitli moleküler farklılıklar olduğu ortaya konulmuştur. Bunlar arasında öncelikle; TP53 mutasyonu, primer GBM'larda nadir görülmekle birlikte sekonder GBM'lerde yaygındır [7]. Sekonder GBM'in prognozunun primer GBM'e göre daha iyi olduğu bilinmektedir [6, 8]

GBM'lerin 2007 DSÖ sınıflamasına göre morfolojik olarak farklı varyantları tanımlanmıştır. Bunlar küçük hücreli GBM (KGBM), oligodendroglioma komponenti içeren glioblastom (OGBM), dev hücreli glioblastom (DGBM) ve gliosarkomlardır (GSK). Bu varyantlar prognostik ve moleküler özellikler açısından farklılıklar gösterirler. OGBM ve GSK'ların diğerlerine oranla daha iyi prognoz gösterdiği bilinmektedir [9] [2]. DGBM ve KGBM ise klasik GBM'e oranla daha kötü prognoza sahiptir [10, 11]. Bu bulguların aksini gösteren çalışmalar da literatürde mevcuttur [12] [13, 14]. GBM'in farklı morfolojik varyantları arasında farklı moleküler özellikler tanımlanmıştır ve prognostik farklılıklardan bu moleküler farklılıkların sorumlu olduğu düşünülmektedir. Örneğin DGBM'de TP53 ve PTEN mutasyonları sıkken, KGBM'de EGFR mutasyonu sık olarak bulunmuştur [15, 16].

Glioblastomlar, histomorfolojik özelliklerinin yanısıra oldukça fazla miktarda genetik değişiklikler göstermektedir [17]. Bunlardan en iyi bilineni TP53 mutasyonudur. Hücre siklusunda DNA onarımında önemli görevleri vardır. Bu genin mutasyonu hücre siklusunda, genetik hasarın kontrolünü sekteye uğratar ve DNA hasarına neden olur [2, 18]. Bu mutasyonun düşük dereceli astrositomlarda ve sekonder glioblastomlarda sık görüldüğü bilinmektedir [2, 19].

Glioblastomda Ki67 proliferasyon indeksi çeşitli varyasyonlar gösterir; ortalama değeri %15-20 olarak bildirilmiştir [20]. Küçük hücreli, andiferansiye, füziform hücrelere sahip glioblastomların sıklıkla yüksek Ki67 proliferasyonu gösterdiği bilinmekle birlikte, Ki67 proliferasyonunun klinik sonuçlara etkisi henüz net olarak ortaya konulmamıştır [2].

Glial tümörlerde yakın zamanda saptanan bir diğer mutasyon ise izositrat dehidrogenaz-1 (IDH-1) mutasyonudur. İlk olarak 2008 yılında genom assosiye sekans çalışmaları ile glioblastom tümör örneklerinin bir kısmında (%12) IDH1 geninde mutasyonlar saptanmıştır [17]. IDH1 mutasyonunun saptanması glial tümör biyolojisinde, glial tümör histolojik tanısında, prognozda, hatta belki de bu tümörlerin gelecekteki sınıflandırmasında önemli olabilecek sonuçlar doğurmuştur [21].

Yakın zamanda tanımlanan bir diğ er gen α -talasemi mental retardasyon sendrom X genidir. (ATRX). Güncel çalışmalarda çeşitli derece ve subtiplerdeki gliomlarda bu mutasyonun varlığı saptanmıştır [22-24] [23, 25]. Wiestler B ve ark. yapmış olduğu 133 malign gliom olgusundan oluşan kohort çalışmasında nükleer ATRX ekspresyon kaybının astrositik tümörlerde daha iyi prognozla ilişkili olduğu saptanmıştır [26]. Ancak literatürde glioblastom histolojik alt tipleri arasında bu bağlamda fark olup olmadığını değerlendiren geniş vaka sayısına sahip çalışma oldukça azdır. Bu çalışmada amaç GBM ve histolojik varyantlarında ATRX, IDH-1, P53' n patogenezdaki rolünü ve bu tümörlerdeki yaygınlığını belirlemek, Ki67 proliferasyonu ile korelasyonunu değerlendirerek, klasik glioblastom ve histolojik varyantlarında prognozla ilişkisini saptamaktır.

GENEL BİLGİLER

Beyin Anatomisi

Beyin, kranial kavite içinde yer alır ve foramen magnumdan spinal kordla devamlılık gösterir. Dıştan içe doğru üç tabakahalinde meningial zarla çevrilidir. Bunlar; dura mater, araknoid mater ve pia materdir. Beyin-omurilik sıvısı subaraknoid alanda yer almaktadır.

Filogenetik olarak beyin spinal kord'dan başlayarak asendan olarak rhombensefalon ya da arka beyin, mezensefalon ya da orta beyin, ve prosensefalon ya da önbeyin olarak üçe ayrılır [27] [28].

Beyin (Ensefalon)

➤ **Rhombensefalon (arka beyin)**

a. Miyelensefalon; medulla oblongata, 4. ventrikül kaudal kısmı ve inferior serebellar pedünkül.

b. Metensefalon; pons, serebellum, 4. ventrikül orta kısmı ve orta serebellar pedünkül

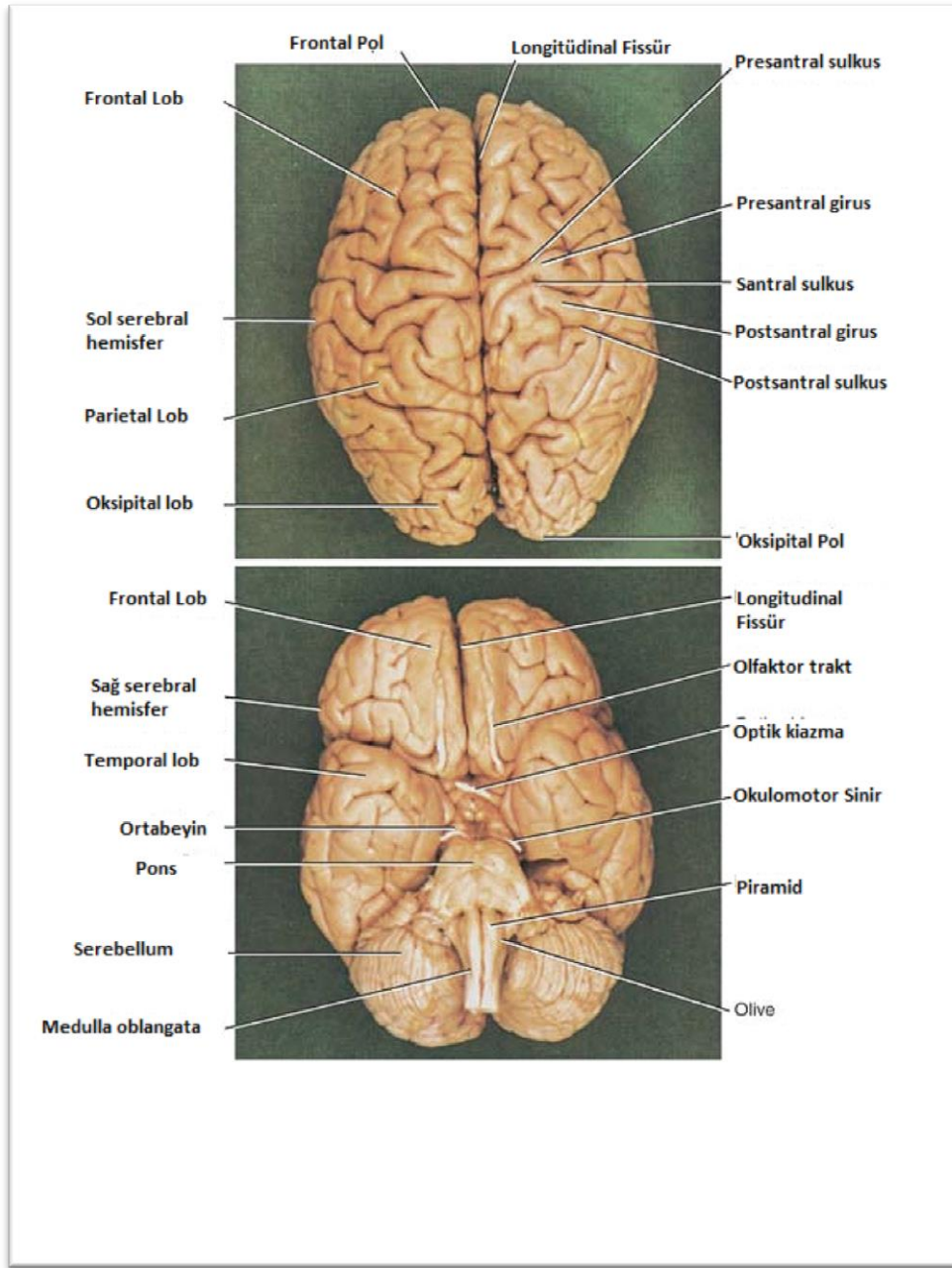
c. İstmus Rhombensefali; superior meduller serebellum, superior serebellar pedünkül ve 4. ventrikül rostral kısmı

➤ **Mezensefalon (orta beyin);** Serebral pedünküller, tegmentum, tektum ve akuadukt

➤ **Prosensefalon (ön beyin)**

a. Diensefalon; talamus, metatalamus, subtalamus, epitalamus, hipotalamus kaudal kısmı ve 3. ventrikül kaudal kısmı

b. Telensefalon; hipotalamus rostral kısmı, 3. ventrikül rostral kısmı, serebral hemisferler, lateral ventriküller, korteks (arkaeokorteks, palaeokorteks, neokorteks) ve korpus striatum.



Şekil 1 . Üst: Beynin süperiordan görünümü. Alt: Beynin inferiordan görüntüsü.

Her iki serebral hemisfer beyaz maddeden oluşan korpus kallozum aracılığıyla bağlantı kurarlar. Longitudinal fissür ise hemisferleri ikiye böler. Her iki hemisferin korteksi gri maddeden, santrali ise beyaz maddeden oluşmaktadır. Gri madde yer yer beyaz maddenin derinlerine kadar yerleşim gösterebilmekte ve bazı önemli yapıları meydana getirmektedir. Bunlara

serebellar nükleuslar, talamik, kaudat ve lentiform nükleuslar örnek olarak verilebilir [27, 28].

Santral Sinir Sistemi Histolojisi

Santral sinir sisteminin hücresel bileşenleri:

- **Gri madde ve beyaz madde:** Santral sinir sisteminin (SSS) büyük kısmını meydana getiren yapı gri madde ve beyaz maddedir. Gri maddenin ayırt edici özelliği nöronal hücre gövdelerini içermesi ve zemininde nöropil olarak adlandırılan gevşek eozinofilik ince dokuyu bulundurmasıdır. Nöropil, nöronal ve glial uzantıları içeren içiçe geçmiş ağ örgüsüdür ve nöronlarla glial hücrelerin dendritik uzantıları burda sinapslarını oluştururlar. Beyaz madde ise miyelinli aksonlardan, destek hücrelerinden, oligodendroglial hücrelerden oluşmaktadır. Aksonları saran miyelin tabakası beyaz maddeye beyaz rengini verir [29, 30].
- **Nöronlar:** Prototipik nöronlar, motor korteksin büyük, çok kutuplu, Betz hücreleri, spinal kordun ventral boynuzundaki alfa motor nöronlar ve beyincikteki Purkinje hücreleridir. Bu hücreler bolca Nissl cisimciği (granüler endoplazmik retikulum) içeren büyük hücre gövdeleri, sağlam dendritik dallanmalar ve belirgin tek çekirdekçi içeren büyük çekirdekle karakterizedir [29]. Nöronlar temel olarak üç ana kısımdan oluşur; 1. hücre gövdesi (soma), 2. dendrit, 3. akson. Ayrıca nöronlar çıkıntı sayılarına göre bipolar, multipolar ve yalancıunipolar nöron olmak üzere de sınıflandırılırlar [31].
- **Astrositler:** Destek hücreleridir, nöronlara uygun kimyasal ortam sağlamak, yara iyileşmesi, hücreler arası iletişimde rol alırlar. Kapillerlere ve nöronlara bitişiktirler ve kan beyin bariyerini oluştururlar. Sitoplazmalarında spesifik bir ara filaman olan glial fibriller asidik protein (GFAP) içerirler [18]. Klasik yıldızlı astrositler dışında, fibriller ve protoplasmik formda astrositler

mevcuttur. Fibriller astrositler genellikle beyaz maddede bulunur ve uzun ince birkaç dalcık içerirler. Protoplazmik astrositler ise genellikle gri maddededir ve çok sayıda kısa dalcık bulundururlar. Polar formdaki astrositler ise pilositik ve Bergmann tipi olmak üzere iki tiptir. Pilositik astrositler gliosis sırasında belirginleşir ve Rozenthal fiberlerini (tirbuşon şekilli eozinofilik yapı) oluştururlar. Bergmann tip astrositler ise serebellumda moleküler ve granüler tabaka arasında gliozisten sorumludur [29-31] [30].

- **Oligodendrositler:** Temel görevleri aksonal myelinizasyondur. Hem gri hem beyaz maddede bulunurlar. Küçük yuvarlak, koyu çekirdekli, perinükleer halooya sahip hücrelerdir. Nöronların çevresinde satellizasyon yaparlar. [29-31] [30]
- **Ependim:** Ventriküllerin ve spinal kordun santral kanalının içini döşeyen küboidal epiteldir. Ependim iki tip hücre içerir; ependimal hücreler ve tanisitler. Ependimal hücreler apikal yüzlerinde mikrovilli ve silya bulundurur, bol mitokondri içerir ve desmozomlarla birbirine bağlıdır. Tanisitler özelleşmiş ependimal hücrelerdir. Birbirlerine ve ependimal hücrelere sıkı bağlantılarla bağlıdır. Uzantılarını hipotalamus içine doğru uzatarak kan damarları ve nörosekretuar hücrelerde sonlanırlar. Tanisitlerin beyin omurilik sıvısını (BOS) hipotalamustaki nörosekretuar hücrelere taşıdıkları düşünülmektedir.
- **Mikroglia:** Kan monositlerinden köken alır ve mononükleer fagositik sistem- makrofaj sistemine ait bir hücredir. Kan monositlerinden (mezoderm) köken aldığından mezoglia; fagositik hücreler olduklarından da SSS'nin çöpçü hücreleri olarak da adlandırılır. Aktifleştiklerinde antijen sunan hücreler olarak davranarak bir dizi bağışıklığı düzenleyici sitokin salgırlar. Küçük, oval, koyu çekirdekleri vardır ve normal beyin dokusunda yaygın olarak bulunurlar.

Santral Sinir Sistemi Tümörleri

Santral Sinir Sistemi Tümörleri Sınıflaması:

Beyin tümörleri ilk olarak 1829'da Cruveilhier tarafından makroskopik olarak tanımlanmış 1836'da ise Bressler tarafından makroskopik olarak sınıflandırılmışlardır. Ancak beyin tümörlerinin bugünkü sınıflamanın temelini Virchow atmıştır. 1860'da beynin hücrelerarası matriksi olarak nörogliaı tariflemiştir. Yine Virchow tarafından tümörlerin makroskopik ve mikroskopik özellikleri arasında bağlantı kurulmasını sağlamış ve "glioma" tarifini de ilk kez yapmıştır [32].

Bailey ve Cushing 1926 yılında gliomaların bir sınıflamasını yaptılar [4]. Yapmış oldukları şema tam 14 tümör tipini içermekte olup sınıflama karmaşıklığı dolayısı ile geniş bir kabul görmemiştir. Yirminci yüzyılın ortasında Kernohan yeni ve basit bir sınıflama geliştirmiştir [33]. Bu sınıflamaya göre 5 glial tümör kategorisi tanımlanmıştır. Bunlar, astrositoma, ependimoma, nöroastrositoma, medulloblastoma ve oligodendrogliomadır. Ancak daha önemlisi, glial tümörleri kendi içinde 4 farklı histolojik dereceye ayıran gruplandırma sistemini geliştirmiştir. Bu sistem anaplazi ve diferansiasyona dayanmakta idi. Ancak 1. Ve 2. derece tümörlerle 3. ve 4. derece tümörler arasında anlamlı bir biyolojik davranış farkı saptanamaması nedeniyle Ringertz 1950'de 3 dereceli bir sistem ortaya koydu [34]. Yine 1980'lerde Doumas ve Duport şimdi St Anne-Mayo diye bilinen hücre morfolojik özelliklerine dayanan 4 basamaklı bir grade sistemini ileri sürmüştür [35].

1993'te ise DSÖ sınıflaması yayınlanmış ve beyin tümörleri benignden maligne "derece 1-4" olarak sınıflanmıştır [36]. Bu sınıflama histopatolojik özellikler kadar yaşam süresi verilerine de dayanmakta idi. 2000 ve 2007 yılında ise tekrar düzenlenerek bugün kullandığımız sınıflama meydana geldi [37] ve [38]. (Tablo 1)

Tablo 1. 2007 DSÖ Sinir Sistemi Tümörleri Sınıflaması

NÖROEPİTELYAL DOKU TÜMÖRLERİ : - Astrositik Tümörler Pilositik astrositom Pilomiksoid astrositom Subependimal dev hücreli astrositom Pleomorfik ksantostrositom Diffüz astrositom Fibriller astrositom Gemistositik astrositom Protoplazmik astrositom Anaplastik astrositom Glioblastom Dev hücreli glioblastom Gliosarkom - Oligodendrogliyal Tümörler Oligodendrogliom Anaplastik oligodendrogliom - Oligoastrositik Tümörler Oligoastrositom Anaplastik oligoastrositom - Ependimal Tümörler Subependimom Miksopapiller Ependimom Ependimom Selluler Papiller Berrak hücreli Tanisitik Anaplastik ependimom - Pineal Bölge Tümörleri Pineositom Intermediate diferansiasyon gösteren pineal parankimal tümör Pineoblastom Pineal bölgenin papiller tümörü - Embriyonel Tümörler Medulloblastom Desmoplastik/nodüler medulloblastom Yaygın nodüler medulloblastom Anaplastik medulloblastom Büyük hücreli medulloblastom SSS primitif nöroektodermal tümörü SSS nöroblastom SSS Ganglionöroblastom Medulloepitelyom Ependimoblastom Atipik teratoid rabdoid tümör	- Koroid Pleksus Tümörleri Koroid pleksus papillomu Atipik koroid pleksus papillomu Koroid pleksus karsinomu - Diğer Nöroepitelyal Tümörler Astroblastom Üçüncü ventrikülün koroid gliomu Anjiyosentrik gliom - Nöronal ve Miks Nöronal Glial Tümörler Serebellumun displastik gangliositomu Desmoplastik infantil astrositom/gangliogliom Disembriyoblastik nöroepitelyal tümör Gangliositom Gangliogliom Anaplastik gangliogliom Santral nörositom Ekstraventriküler nörositom Serebellar liponörositom Papiller glionöronal tümör Dördüncü ventrikülün rozet oluşturan glionöronal tümörü Paragangliom KRANİYAL VE PARASPINAL SİNİR TÜMÖRLERİ - Schwannom Selluler Pleksiform Melanotik - Nörofibrom Pleksiform - Perinörom Perinöroma, NOS Malign perinörom - Malign periferik sinir kılıfı tümörü (MPSKT) Epiteloid MPSKT Mezenkimal diferansiasyon gösteren MPSKT Melanotik MPSKT Glandüler diferansiasyon gösteren MPSKT
--	---

MENİNGİAL TÜMÖRLER - Meningoendotelyal hücre tümörleri Meningioma Meningotelyal Fibröz/fibroblastik Transizyonel Psammomatöz Anjiomatöz Miktokistik Sekretuar Lenfoplazmasitten zengin Metaplastik Kordoid Berrak hücreli Atipik Papiller Rabdoid Anaplastik (malign) - Primer melanositik lezyonlar Diffüz melanositozis Melanositoma Malign melanom Meningial melanomatozis - Meninkslerle ilişkili diğer neoplasmlar Hemanjioblastom LENFOMA VE HEMATOPOETİK NEOPLASMLAR - Malign lenfoma - Plazmasitom - Granulositik sarkom	- Mezenkimal Tümörler Lipom Anjiolipom Hibernom Liposarkom Soliter fibröz tümör Fibrosarkom Malign fibröz histiositom Leiomyom Leiomyosarkom Rabdomiyom Rabdomiyosarkom Kondroma Kondrosarkom Osteoma Osteosarkom Osteokondrom Hemanjiom Epiteloid hemanjiendoendotelyom Hemanjioperisitom Anaplastik hemanjioperisitom Anjiosarkom Kaposi sarkomu Ewing sarkom- PNET SELLAR BÖLGE TÜMÖRLERİ - Kraniofaringioma Adamantinomatoz Papiller - Granüler hücreli tümör - Pituisitoma - Adenohipofizin işçi hücreli onkositomu
GERM HÜCRELİ TÜMÖRLER - Germinom - Embriyonel karsinom - Yolk sac tümörü - Koryokarsinom - Teratom Matür İmmatür Malign transformasyon gösteren teratom - Mikst germ hücreli tümör	METASTATİK TÜMÖRLER

Santral Sinir Sistemi Tümörlerinde DSÖ Derecendirme Sistemi

Histolojik derecelendirme neoplazmin biyolojik davranışını öngörebilme anlamına gelmektedir. Klinikte tümör derecesi tedavi seçimi, adjuvan radyoterapi kararı ve spesifik kemoterapi seçiminde anahtar rol oynar. DSÖ derecelendirme sistemi geniş kabul görmüştür ve bugün yaygın olarak kullanılmaktadır.

Derece I tümörler düşük proliferasyon potansiyeline sahiptir ve tek başına cerrahi tedaviyle muhtemel kür şansları yüksektir. Derece II tümörler genellikle infiltratif karakterdedir ve düşük proliferatif aktiviteye sahiptirler. Genellikle tekrar ederler. Bazı derece II tümörler daha yüksek dereceli tümörlere progrese olabilirler. Örneğin düşük dereceli diffüz astrositom zamanla anaplastik astrositoma veya glioblastoma dönüşebilir. Derece III tümörler histolojik olarak malign özellikler taşımaktadırlar, bunlar; nükleer atipi, artmış mitotik aktivitedir. Derece III tümörü olan hastalar genellikle adjuvan kemoterapi ve radyoterapi almaktadırlar. Derece IV tümörler ise sitolojik olarak malign özelliktedir. Mitotik aktivite, nekroza yatkınlık, operasyon öncesi ve sonrası hızlı hastalık gelişimi ve fatal sonuç bu tümörün temel özellikleridir. Bazı derece IV tümörler kraniospinal yayılımla karakterizedir.

Astrositik tümörlerde derecelendirme; DSÖ tanımlamasına göre yalnızca sitolojik atipi içeren tümörler derece II (diffüz 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. Bu sistem St. Anne Mayo sınıflamasıyla benzer özelliktedir [35]. En önemli fark derece I tümörlerdedir. DSÖ derece I tümörleri iyi sınırlı, pilositik astrositom olarak tanımlarken, St. Anne Mayo ise nadir görülen atipisiz diffüz astrositom olarak tanımlamıştır. St. Anne Mayo'nun derece II, III ve IV tümörleri ise DSÖ'nün tanımlamasına oldukça yakındır [35]. Atipi, çekirdek şeklinde ve boyutundaki değişikliklerle birlikte hiperkromazi olarak tanımlanmıştır. Mitoz net seçilebilir

olmalıdır ancak sayısı ve morfolojisiyle ilgili kesin bir tanımlama yoktur. Ancak yeterli miktardaki bir örnekte saptanan tek bir mitoz bu tümörün derece III davranış göstereceği anlamına gelmez, dolayısıyla derece II ve III tümörleri ayırt etmek için MIB-1 proliferasyon indeksi yardımcı olabilmektedir [39, 40] [41]. Endotelyal proliferasyon ise endotelyumun çok tabakalı görünümde olması olarak tanımlanmıştır. Bunu basit hipervasküleriteden ayırt etmek gerekmektedir. Nekroz her tipte olabilir, nekroz çevresi palizatlanma sık görülen bir özelliktir.

DSÖ derecelendirme sistemi tedaviye cevabı ve klinik sonuçları öngörebilmektedir. Derece II tümörlerde sağkalım genellikle 5 yıldan fazlayken, derece III tümörlerde 2-3 yıl, derece IV tümörlerde ise 1 yıldan azdır.

Tablo 2 : SSS Tümörlerinde DSÖ Dereceleri

Astrositik Tümörler;	I	II	III	IV			I	II	III	IV
Subependimal dev hücreli astrositom	x					Santral nörositom		x		
Pilositik Astrositom	x					Ekstraventricüler nörositom		x		
Pilomiksoid astrositom		x				Serebellar liponörositom		x		
Diffüz astrositom		x				Spinal kordun paragangliomu	x			
Pleomorfik ksantoastrositom		x				Papiller glionöronal tümör	x			
Anaplastik astrositom			x			4. ventrikülün rozet yapan glionöronal tümörü	x			
Glioblastom				x						
Dev hücreli glioblastom				x		Pineal Tümörler;				
Gliosarkom				x		Pineositom	x			
						İntermediate diferansiasyon gösteren pineal parankimal tümör		x	x	
Oligodendroglial tümörler						Pineoblastom				x
Oligodendrogliom		x				Pineal bölgenin papiller tümörü		x	x	
Anaplastik oligodendrogliom			x							
						Embriyonel Tümörler;				
Oligoastrositik tümörler;						Medulloblastom				x
Oligoastrositom		x				SSS primitif nöroektodermal tümörü (PNET)				x
Anaplastik oligoastrositom			x			Atipik teratoid rabdoid tümör				x
Ependimal tümörler;						Kranial ve Paraspinal Sinir Tümörleri				
Subependimom	x					Schwannom	x			
Miksopapiller ependimom	x					Nörofibrom	x			
Ependimom		x				Perinörom	x	x	x	
Anaplastik ependimom		x				MPSKT		x	x	x

Koroid pleksus tümörleri;						Meningial tümörler;				
Koroid pleksus papillomu	x					Meningiom	x			
Atipik koroid pleksus papillomu		x				Atipik meningiom		x		
Koroid pleksus karsinomu			x			Anaplastik/ malign meningiom			x	
						Hemanjioperisitoma		x		
Diğer nöroepitelyal tümörler;						Anaplastik hemanjioperisitoma			x	
Anjiyosentrik glioma	x					Hemanjioblastom	x			
Üçüncü ventrikülün koroid gliomu		x								
Nöronal ve mikst nöronal-glial tümörler;						Sellar bölge tümörleri;				
Gangliositoma	x					Kraniofaringioma	x			
Ganglioma	x					Pituisitoma	x			
Anaplastik ganglioglioma			x			İğsi hücreli onkositoma	x			
Desmoplastik infantil astrositom ve gangliogliom	x					Nörohipofizin granüler hücreli tümörü	x			
Desmoplastik nöroepitelyal tümör	x									

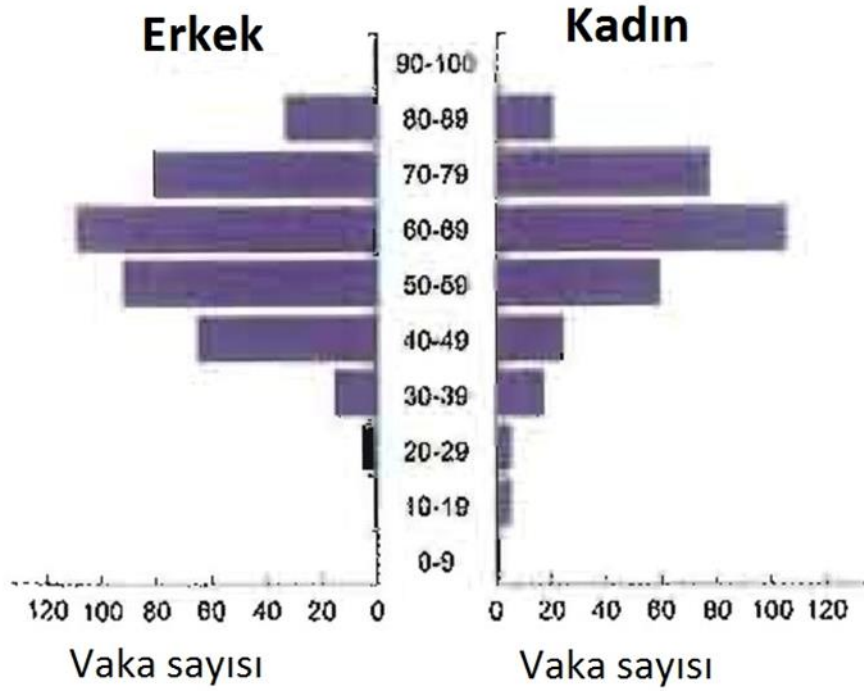
GLİOBLASTOM

Epidemiyoloji ve Etyoloji

- **İnsidans;** Beyin ve santral sinir sistemi tümörleri tüm dünyada en sık görülen onüçüncü kanserdir [42] .Glioblastomlar ise en sık görülen primer beyin tümörleridir. Tüm intrakranial tümörlerin %12-15'ini, astrositik tümörlerin %60-70'ini meydana getirirler [38, 43]. Birleşik Devletler' de her yıl primer malign beyin tümörlerine bağlı yaklaşık 13000 ölüm ve 18000 yeni vaka bildirilmektedir [43] [41]. Çocuklarda ise SSS tümörlerinin sadece %8,8'i GBM'dir [44].

Türkiye'de ise, elde olan kanser istatistik verileri gerek toplum tabanlı kayıt sistemlerinin yokluğu, gerekse var olan kayıt sistemlerinin yetersizliği nedeni ile kanser probleminin büyüklüğünü tam ve ayrıntılı bir biçimde ortaya koymaktan uzaktır [45]. Öte yandan Dünya Sağlık Örgütü'nün Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı'nın (IARC; International Agency for Research on Cancer) 2012 yılı istatistikleri, Türkiye'de beyin ve diğer sinir sistemi tümörlerinin vaka sayısını 2,044 ve ölümleri 1,567 olarak vermektedir [46] .

- **Yaş ve cinsiyet;** GBM'ler herhangi bir yaşta görülebilir ancak genellikle yetişkinleri etkileyen bir hastalıktır. En yüksek görülme insidansı 45-75 yaş arasındadır. Birleşik devletlerde 1998-2002 yılları arası beyin tümörü verilerini toplayan bir çalışmada median yaş 64 olarak bulunmuştur [47]. İsviçre Zürih'te yapılan bir araştırmada ise ortalama yaş 61,3 olarak hesaplanmıştır, aynı çalışmada hastaların %80' inin 50 yaş ve üstü olduğu, erkek:kadın oranının 1,28 olduğu bulunmuştur. Bu oran Amerika Birleşik Devletleri'nde 1,26 olarak hesaplanmıştır [19] [48].



Şekil 2. GBM’de yaş ve cinsiyet dağılımı [19].

- **Risk faktörleri:** Gliomlar için bilinen kanıtlanmış çevresel risk faktörleri tedavi amaçlı yüksek doz radyoterapiye maruz kalmak ve yüksek doz kemoterapi almaktır [49][44]. Relling MV ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada akut lenfositik lösemi tanısıyla, kranial ışınlamaya maruz kalan ve yoğun antimetabolit tedavisi alan çocuklarda beyin tümörlerine yatkınlığın daha fazla olduğu gösterilmiştir [50].

Lokalizasyon

Glioblastom sıklıkla serebral hemisferlerde, subkortikal beyaz maddede yerleşimlidir [2]. Zürih üniversite hastanesinde 987 GBM olgusuyla yapılan çalışmada en sık etkilenen bölgeler, %31 temporal lob, %24 parietal lob, %23 frontal lob, %16 oksipital lob olarak bildirilmiştir. Fronto-temporal lokalizasyon

ise tipiktir. Tümör invazyonu çoğunlukla komşu kortekse veya korpus kallozum aracılığıyla kontrolateral hemisfere olur [2].

Prognostik ve Klinik Özellikler

Glioblastomda prognoz genellikle kötüdür. 65 yaş üstü hastaların yaklaşık %2'si, 45 yaş altı hastalarinsa yaklaşık %30'u GBM tanısından sonra 2 yıldan fazla yaşar [41]. %50'den fazla olguda sağkalım 3 aydan kısadır [2]. Ancak neoplazm daha düşük dereceli astrositomlardan geliştirse (sekonder GBM) sağkalım daha iyidir. Semptomlar intrakranial basınç artışına bağlı geliştiği için tümör büyük boyutlara ulaşana kadar genellikle bulgu vermez. Primer (de novo) GBM'ler daha yaşlı hastalarda görülüp, daha hızlı bulgu verirken, sekonder GBM'ler ise daha genç hastalarda görülür ve daha yavaş bulgu verirler [6] [8]. Sık görülen semptomlar intrakranial basınç artışına bağlı baş ağrısı, bulantı-kusma, papilödemdir. Üçte birden fazla hastada epileptik nöbet tanımlanmıştır, non-spesifik nörolojik semptomlar ve kişilik değişiklikleri de görülebilir [2].

Uzak Yayılım ve Metastaz

GBM, infiltratif özelliğinden dolayı çevre parankime invazyon gösteren bir yayılım paterni gösterir. Bu yayılımın beyaz madde içindeki fiber traktüsler yoluyla çevre parankime ve korpus kallozuma ilerlediği düşünülmektedir [51] [52, 53]. Tümör, korpus kallozum yoluyla her iki hemisfere de yayılırsa karakteristik bilateral simetrik görüntü (kelebek glioma) oluşur. Bu hızlı yayılabilme özelliğine rağmen GBM subaraknoid boşluğa ve beyin omurilik sıvısına nadiren yayılım gösterir [54, 55] . Lenfoid ve hematojen yayılımsa nadir görülür [56] [57].

İnvazyon Mekanizması

GBM invazyonunda tanımlanmış çeşitli moleküler yollar mevcuttur, bunların başında TGF- β ve AKT yolları gelir [58, 59]. Tümör hipoksisi de HIF-1 α aktivasyonu ile invazyona yardım eder [60]. Bir diğer teori ise tümör hücrelerinin ekstraselüler matriks proteini üretebildiği ve bunlarla ilişkiye giren bazı spesifik integrinleri eksprese edebildiği, buna bağlı migrasyonun ve invazyonun kolaylaştığı yönündedir [61].

Makroskopik Özellikler

Büyük, düzensiz sınırlı, kanamalı ve nekrotik kitle oluşturmaları, çevre dokuya invazyon göstermeleri karakteristik özellikleridir. Tümör çevresindeki hücreden zengin alan yumuşak- gri bir zon oluşturur. Kesit yüzünde periferi gri, santrali ise sarı-nekrotik, hemorajik görünümündedir. Çoğu GBM serebral hemisferlerde yerleşimli, merkezi beyaz maddede yer alan, intraparakinkial kitle oluşturur. [2,[62]].

Histopatoloji

GBM kötü diferansiye, pleomorfik astrositik hücrelerden oluşan anaplastik, sellüler gliomadır. Bu hücrelerde belirgin atipi ve mitotik aktivite dikkat çekicidir. GBM'de tanı temel olarak paterne bağlıdır. Yüksek derecede anaplastik glial hücreler, nekroz, belirgin mitoz ve vasküler proliferasyon temel özelliklerdir [63, 64].

Tümör nekrozu GBM tanısında temel özelliklerdendir. Astrositik tümörlerdeki nekroz varlığı, agresif klinik davranışın en önemli göstergelerinden biridir [65]. Çoğu zaman total tümör kitlesinin %80'inden fazlasını nekroz oluşturur. Mikroskopik olarak nekrotik odağın etrafında ışınal olarak dizilmiş canlı tümör hücrelerinin görünümü karakteristiktir, bu görünüme "pseudopalisading patern" denilmektedir. Bu tip nekroz primer ve sekonder GBM' de sıklıkla bulunur [66]. Nekrozun çevresinde palizatlanmış

hücreler komşu tümör hücrelerine oranla daha fazla apoptoz ve daha az proliferasyon özelliğine sahiptir. Bu hücreler daha hipoksiktir ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) için hedef molekül olan HIF-1 α üretirler [67, 68] Nekrotik alanların içinde geniş soluk damar yapıları görülebilir. Nekroza histiositler genellikle eşlik etmez .

GBM'ler insanlardaki en vasküler tümörlerdendir. GBM anjiogenezini tetikleyen temel faktör hipoksidir. GBM anjiogenezini sonucu vasküler endotelde proliferasyon meydana gelir ve endotel hücreleri çok katlı tabakalar ve kümeler yaparak mikroagregatlar oluştururlar. Bu agregatlar arasında çok sayıda damar lümeni meydana gelir ve bunun sonucunda renal glomerüllere benzeyen damar yapıları oluşur. Bu proliferasyon genellikle tümörün tamamında görülmekle birlikte, infiltrasyon zonunun çevresinde ve nekrotik alanlarda yoğunlaşır. Mikrovasküler proliferasyon GBM için tipik bir özelliktir [2, 64].

Eskiden kullanılan glioblastoma “multiforme” tanımlamasının nedeni tümörde görülen histopatolojik özelliklerin çok çeşitli olmasıdır. Hücresel pleomorfizm küçük , andiferansiye, lipidize, granüler veya dev hücreler şeklinde karşımıza çıkabilir. Demetler ve fasiküller halinde iğsi bipolar hücreler görülebilir. Bu hücre tiplerinin baskın olduğu durumlar için farklı histolojik varyantlar tanımlanmıştır [2].

Proliferasyon

GBM'de proliferatif aktivite ve mitoz hemen her vakada belirgindir. Atipik mitoz sıklıdır. Mitotik aktivite vakadan vakaya, hatta aynı tümörün farklı alanlarına göre bile değişkenlik göstermektedir. Proliferasyonu gösteren temel antikor Ki67/MIB1' dir. Ki67 hücre siklusunun G0 hariç mitozun tüm fazlarında sentezlenen bir proteindir. MIB-1 ise bu proteinle etkileşen antikordur [69]. Literatürde ortalama Ki67 değeri %15-20 olarak bildirilmiştir [70-73]. Küçük, andiferansiye, fuziform hücreli tümörler sıklıkla daha yüksek proliferatif aktivite gösterir [2]. Proliferasyon indeksinin sağkalımı öngörmeye

olan etkisi henüz net olarak ortaya konamamıştır [74]. Bu konuda literatürde farklı sonuçlara ulaşan çok sayıda yayın mevcuttur.

Histogenez ve Genetik Özellikler

Gliomların büyük olasılıkla glial dokudan 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 [75-77]. Glial hücrelerin gliom hücreleriyle histomorfolojik olarak benzerlik göstermeleri ve bu benzerliğin immunhistokimya boyalarıyla desteklenmiş olması, gliogenezde ortaya atılan ilk teoridir. İlerleyen yıllarda glial kök hücrelerin ve progenitör hücrelerin keşfedilmesiyle birlikte araştırmalar bu yönde yoğunlaşmıştır [78, 79].

Yapılan geniş ölçekli çalışmalarda GBM'lerde mutasyona uğramış çok sayıda gen tesbit edilmiştir. Moleküler değişiklikleri gösterebilmek için rutinde kullanılan teknikler Floresan in situ hibridizasyon (FISH), heterozigosite kaybı (LOH), karşılaştırmalı genomik hibridizasyondur. Bu teknikler arasında en yüksek uyumluluk FISH ve LOH arasındadır [80, 81]. Gliomlarda şu ana kadar tanımlanan en temel mutasyonlar arasında TP53 mutasyonunun çeşitli kombinasyonları, kromozom 10 ve 17p'de heterozigosite kaybı, EGFR amplifikasyonu, IDH1 ve IDH2 mutasyonu, 1p19q kodelesyonu, PTEN delesyonu, BRAF mutasyonu sayılabilir [82-84].

Kanser genom atlas konsorsiyumu "The Cancer Genome Atlas (TCGA)" yakın zamanda GBM'lerdeki genomik anormallikleri kataloglamıştır. Bu

veriler ışığında GBM'ler gen ekspresyonu temeline bağlı güçlü bir moleküler sınıflama yapılmıştır [85]. Bu sınıflamaya göre GBM'ler, DNA kopya numaraları ve somatik mutasyon paternleri gözönüne alınarak 4 alt tipe ayrılmıştır. Alt tiplendirmede temel alınan moleküller EGFR, NF1 ve PDGFRA/IDH1. Oluşturulan alt tipler ; pronöral, nöral, mezenkimal ve klasik alt tiplerdir. Bu tiplendirmede normal beyin dokusu hücrelerinin genetik imzaları ile alt tipler ve çeşitli nöral kökenler arasında kuvvetli bir ilişki saptanmıştır. Bu alt tiplere göre;

- **Klasik:** Tamamında kromozom 7 amplifikasyonu ve kromozom 10 kaybı görülür. %87'sinde EGFR amplifikasyonu mevcuttur. TP53 mutasyonu GBM'lerde yaygın olmasına rağmen bu subtipde az oranda görülür. Klasik subtipin agresif tedaviye iyi yanıt verdiği görülmüştür.
- **Mezenkimal:** NF1'in de dahil olduğu 17q11.2 bölgesinde fokal hemizigot delesyon bu subtip için karakteristiktir. Mezenkimal subtip CHI3L1 (YKL40) ve MET gibi mezenkimal belirteçleri de ekspres eder. Ayrıca NF-kB tümör nekroz yolağında görev yapan TRADD, RELB, ve TNFRSF1A bu subtipde sıklıkla eksprese olur ve bu gruba ait tümörlerde nekrozun oldukça yüksek oranlarda görülmesinden sorumludur.
- **Pronöral:** Bu grupta yer alan temel genetik anomaliler PDGFRA değişiklikleri ve IDH1'de nokta mutasyon görülmesidir. TP53 mutasyonu ve heterozigosite kaybı da sık görülmektedir. Ayrıca bu grupta PDGFRA, NKX2-2 ve OLIG2 gibi oligodendrogial gelişimi gösteren belirteçlerin varlığı da saptanmıştır. Pronöral alt tipte agresif tedaviye yanıt kötüdür.
- **Nöral:** Bu grup NEFL, GABRA1, SYT1, ve SLC12A5 gibi nöral belirteçleri eksprese etmesiyle karakterizedir.

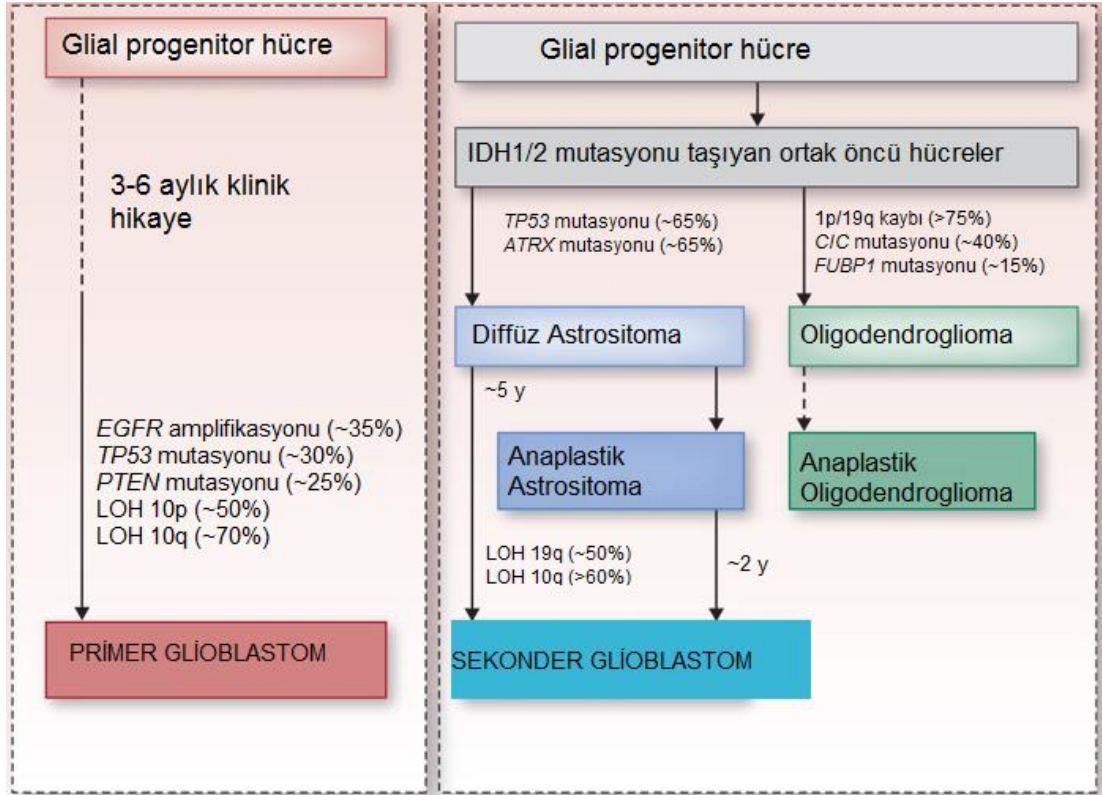
Primer ve Sekonder Glioblastom

Primer ve sekonder glioblastom terimi ilk kez 1940 yılında Schere tarafından kullanılmış ve astrositomlardan gelişen sekonder GBM'in primer GBM'den mutlaka ayırt edilmesi gerektiği, çünkü bu tümörlerin klinik ve biyolojik açıdan

farklılık gösterdiğini belirtilmiştir [86]. GBM'lerin büyük bir kısmı (>%90) 3 aydan kısa sürede, daha önceden var olan düşük dereceli lezyona dair klinik ve/veya histopatolojik bir kanıt olmaksızın hızlı gelişim gösterirler. Bu tümörlere de novo veya primer GBM denilmektedir [2]. Primer GBM'ler genellikle yaşlı insanlarda görülmekteyken, sekonder GBM'ler sıklıkla daha genç insanları etkilemektedir [6, 19].

Düşük dereceli bir gliomdan sekonder glioblastom gelişme süresi derece II tümörlerde 1 yıldan daha kısa veya 10 yıldan daha uzun zamanda gerçekleşebilmektedir. Ortalama süre 4-5 yıl kadardır [6].

Primer ve sekonder GBM'ler farklı genetik yollardan gelişir ve farklı ekspresyon profilleri gösterirler. Bunun sonucunda tedavi yanıtları ve sağkalım düreleri de farklılık göstermektedir (Şekil 2.4.). Primer GBM'lerde EGFR amplifikasyonu, PTEN mutasyonu ve kromozom 10 kaybı görülürken, sekonder GBM'ler ise IDH1 mutasyonu, TP53 mutasyonu ile karakterizedir. Yapılan araştırmalar IDH1 mutasyonunun gliomagenез için öncü bir mutasyon olduğu görüşünü ortaya çıkarmıştır. Bu genetik yolda dikkat çeken bir diğer özellik ise sekonder GBM'lerin oligodendroglial tümörlerle ortak yoldan köken aldığıdır [6].



Şekil 3. Primer ve sekonder glioblastomlarda genetik yollar [6].

Dev Hücreli Glioblastom

Dev hücreli glioblastom nadir görülen bir varyanttır. Tüm beyin tümörlerinin %1'ini, GBM'lerin %5'ini oluşturur [87]. 55 olguyla yapılan bir araştırmada ortalama yaş 41 olarak saptanmıştır. Yaş dağılımının bu varyantta pediatrik olgular da dahil geniş bir aralığı kapsadığı görülmüştür [88-90].

DGBM histomorfolojik olarak baskın multinükleer dev hücrelerden oluşmaktadır. Bunun dışında daha küçük füziform hücreler ve retikülin ağına sahiptir. Multinükleer dev hücreler genellikle bizar görünümde ve 500 µm'den büyük ölçüdedir. Hücreleri genellikle köşeli, belirgin nükleollüdür. Sitoplazmik inklüzyona ve lipidize hücrelere rastlanabilir. Atipik mitoz oldukça sıktır ancak proliferasyon indeksi konvansiyonel GBM ile benzer özelliklere sahiptir. Genellikle coğrafik nekroz görülürken, palizatlaşan nekroz daha

nadir görülmektedir. Dev hücreler immünohistokimyasal olarak S-100, vimentin, P53 ve EGFR ile boyanma gösterirlerken, GFAP ile değişken boyanma göstermektedirler [2].

DGBM' de sık P53 mutasyonu (%75-90) ve PTEN mutasyonu (%33) görülmekteyken, EGFR amplifikasyonu/overekspresyonu ve homozigot p16 delesyonu göstermez [90]. Bu sonuçlar doğrultusunda DGBM'in hibrid bir varyant olduğu ve de novo geliştiği görüşü hakim olmuştur [15].

DGBM'lerin prognozu genellikle kötüdür, ancak konvansiyonel GBM'e kıyasla daha iyi prognoza sahip olduğunu bildirir yayınlar da literatürde mevcuttur. Bunun nedeni daha az infiltratif bir lezyon olmasına bağlanmaktadır [14].

Küçük Hücreli Glioblastom

Konvansiyonel GBM'de histomorfolojik olarak daha küçük, uniform, oval nükleuslu, hafif hiperkromatik, düzgün nükleer kontura sahip hücreler bulunabilmektedir. Ancak tümör bu tip hücrelerden baskın hale gelir ve konvansiyonel GBM'in pleomorfik görünümünü kaybeder ve daha monoton bir görünüm kazanırsa bu histomorfolojik varyant küçük hücreli GBM olarak adlandırılmaktadır. Bu varyantta atipi daha az ancak mitoz belirgindir. KGBM sıklıkla anaplastik oligodendrogliomayla (AO) karıştırılır. Ancak AO' a kıyasla GBM'de kısa sağkalım süresi, tedaviye direnç gibi kötü prognostik özellikler olması nedeniyle bu iki tümör mutlaka ayırt edilmelidir [10]. Bu bağlamda moleküler yöntemlerin yanı sıra Ki67 proliferasyon indeksinin oldukça yüksek olması ve belirgin nekrozun varlığı KGBM lehine ayırıcı tanıda faydalıdır.

Moleküler olarak KGBM sıklıkla EGFR amplifikasyonu taşımaktadır [16]. Ayrıca p16INK4a homozigot delesyonu, PTEN mutasyonu ve LOH 10q göstermektedirler [88]. Bir çalışmada bu tümörlerin EGFR (83 - 35%) eksprese ettikleri ve bu özellikleriyle diğer GBM varyantlarından ayırt edilebilecekleri ortaya atılmıştır [10]. KGBM'in kötü prognoza sahip olduğu

bilinmektedir ancak yapılan araştırmalarda diğerk GBM varyantlarıyla arasında prognostik ağıdan anlamlı farklılık saptanamamıştır [10, 88].

Oligodendroglioma Komponenti İçeren Glioblastom

2007 DSÖ sınıflamasına göre fokal oligodendroglial alanlar içeren GBM'ler "Oligodendroglioma komponenti içeren glioblastom" olarak adlandırılmaktadır. OGBM'lerde oligodendroglial odak fokal veya birden fazla olabileceğı gibi, miktarı da belirli bir ölçölendirmeye dahil değıldir. GBM'i OGBM olarak adlandırabilmek için oligodendroglial odağın görölmesi yeterlidir [2]. OGBM tüm GBM'lerin %4-27'sini oluşturmaktadır [63, 91].

Oligodendroglial tümörler astrositik tümörlere kıyasla daha iyi prognoza sahiptirler ve bunun 1p19q kodelesyonuna bağılı olduğı düşünölmektedir [92]. Aynı şekilde OGBM'lerin de konvansiyonel GBM'e kıyasla daha iyi prognoza sahip olduğı gösterilmiştir. OGBM'lerde ortalama sağıkalım 14-26 ayken, konvansiyonel GBM'de 12 aydan kısadır [93]. Ancak 1p19q kodelesyonu OGBM hastalarında az oranda saptanmıştır (< %10) [63, 91].

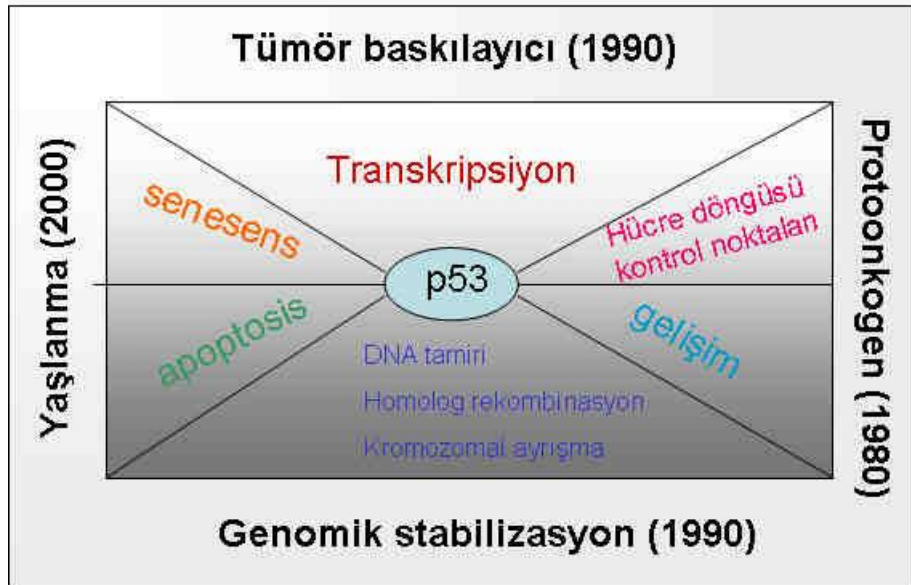
Histomorfolojik olarak OGBM'in tanımı nekroz içeren anaplastik oligoastrositomadır. Tümörde hem oligodendroglial hem de astrositik diferansiasyon bulunmalıdır [94]. Bu tanımlama daha yakın tarihte yapıldığı için OGBM'lerin klinik ve moleküler profilleri henüz net olarak belirlenmemiştir.

Sekonder GBM'ler için belirlenmiş mevcut en iyi genetik faktörün IDH1 olduğı düşünölmektedir. OGBM'lerle yapılan bir çalışmada OGBM'lerde IDH1 mutasyonu %31 oranında saptanmıştır. Mutasyona sahip olgular incelendiğinde bunların %5'ten azının primer GBM olduğı görölmüştür [9]. OGBM'lerin moleküler özelliklerini anlayabilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

TP53 yolağı:

P53 geni 17. Kromozomun kısa kolunda p13 gen bölgesinde yerleşimlidir. Hücre proliferasyonunu düzenleyen 53 K_D'lik bir proteini kodlar. Hücre siklusunda DNA onarımında önemli görev yapan, hücre döngüsünü düzenleyen bir tümör süpresör gendir. TP53 ile ilgili yapılan çalışmaların artmasıyla birlikte tümör baskılayıcı bir gen olduğu ve ayrıca bir çok kanser türünde mutasyona uğradığı bildirilmiştir [95]. TP53 tümör baskılayıcı gende meydana gelen yapısal mutasyonların yanı sıra, yabanıl tip (wild type) P53'ün fonksiyonel inaktivasyonu da bu genin düzenlenmesini içeren yolların bozulmasına neden olmakta, bu da malignansinin oluşmasına yol açmaktadır [96].

P53 geninin temel fonksiyonları arasında hücre siklusunda düzenleyici rol alması, DNA hasarına yanıt, hücre diferansiasyonu, neovaskülarizasyon vardır [97].



Şekil 4. P53 geninin temel fonksiyonları

P53 geni normalde inaktiftir. Hücre stres altındayken veya DNA hasarı olduğu durumlarda aktive olur [98, 99]. 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 [100-102].

DNA hasarının ardından P53 aktive olur ve p21Waf1/Cip1 gibi transkripsiyon genlerini indükler [103, 104]. Mdm2, “Murine Double-Minute” onkoproteini P53’ ün potansiyel inhibitörüdür. Mdm2, P53’ ün transkripsiyonel aktivasyon domainine bağlanmakta ve böylece hedef genlerin düzenlemesini sağlamakta ve antiproliferatif etkiyi bloke etmektedir. Diğer yandan P53, Mdm2’ nin ekspresyonunu aktive etmekte ve böylece geri-bildirim mekanizmasıyla otoresüregülasyonu gerçekleştirmektedir [105].

TP53 mutasyonu sekonder GBM’ler için genetik bir ayırıcı özelliktir (>%65) ve hemen hemen tüm vakalarda ve bunların primer prekürsör düşük dereceli lezyonlarında mevcuttur. [7, 106]. TP53 mutasyonu primer glioblastomlarda daha nadirdir (yaklaşık %25) [7, 19]. Bu mutasyonun dağılımı primer ve sekonder GBM’lar arasında farklılık göstermektedir. Sekonder GBM’de mutasyon %57 oranında iki etkin noktada (hot spot) görülmektedir, bunlar 248. ve 273. kodonlardır.

Mdm2’ nin aşırı ekspresyonu veya amplifikasyonu da hasarlı genomun P53’ün siklus kontrol noktasından kaçmasına neden olan alternatif bir mekanizmadır. Amplifikasyonu %10 oranında ve genelde sekonder GBM’lerde izlenirken, aşırı ekspresyonu %50’den fazla primer GBM’de immünohistokimyasal olarak saptanabilir [107, 108].

P53 mutasyonunun gliom prognozundaki rolü ile ilgili veriler çelişkilidir. Bazı hastane temelli çalışmalarda GBM ile P53 mutasyonu arasında prognostik korelasyon saptanmazken [109, 110]; yapılan geniş tabanlı tek değişkenli çalışmalardan birinde P53 mutasyonu uzun sağkalımla ilişkili olarak bulunmuştur. Ancak yaş ilişkili çok değişkenli çalışmada sonuçlar anlamlı bulunmamıştır [19].

IDH1

İzositrat dehidrogenaz, sitrik asit siklüsünde izositratın alfa ketoglutarata dönüşümünü sağlayan oksidatif dekarboksilasyon reaksiyonunu katalizleyen enzimdir. Bu reaksiyon oksidatif hasarın hücresel kontrolünde ve lipid sentezinde önemli rolü olan, trikarboksilik asit siklüsünde bulunan indirgenmiş NADP (NADPH)'ın oluşumuyla sonuçlanır [111].

Diffüz gliomlarda sitozolik NADP +/- bağımlı izositrat dehidrogenaz (IDH1) enzimini kodlayan gende meydana gelen çok sayıdaki spontan mutasyonun varlığı yapılan bir çok araştırmayla ortaya konulmuştur. [17, 112-115]. Mitokondriyal NADP +/- bağımlı izositrat dehidrogenaz (IDH2) enzimini kodlayan genin mutasyonu ise daha az oranda görülmektedir [115].

Diffüz astrositomlarda daha sık olmak üzere hem diffüz hem de anaplastik astrositomlarda sıklıkla IDH1 mutasyonuna rastlanmıştır (%70-75) [116].

GBM'lerde 20,661 adet protein kodlayan genin genomik analizinin yapıldığı bir çalışmada IDH1 mutasyonu %12 oranında saptanmıştır. Bu çalışmada mutasyon bulunan olguların büyük çoğunluğunun sekonder GBM olduğu ve aynı zamanda TP53 mutasyonu da barındırdığı görülmüştür [17]. Daha sonra yapılan araştırmalar düşük dereceli astrositomların, oligoastrositomların, oligodendrogliomların ve sekonder GBM'lerin büyük çoğunluğunun (%70'den fazla) IDH1 mutasyonu taşıdığını göstermiştir. Bu da IDH1'in gliomagenezde erken dönemde etkili bir mutasyon olduğu görüşünün ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. IDH1 mutasyonu primer GBM'lerde ve diğer santral sinir sistemi tümörlerinde nadir olarak saptanmıştır [112, 114, 115, 117].

Yakın zamanda IDH1-R132H'e spesifik monoklinal antikor olan IMab-1 proteini geliştirilmiştir [118]. IMab-1, IDH1-R132H peptidiyle reaksiyona girer ancak yabancıl tip (wild type) IDH1 peptidiyle (IDH1-wt) veya diğer IDH1 mutasyonlarıyla (IDH1-R132C, IDH1-R132L, IDH1-R132S, IDH1-R132G, IDH2-R172K, IDH2-R172M, ve IDH2-R172G) reaksiyon vermez. IDH1/2

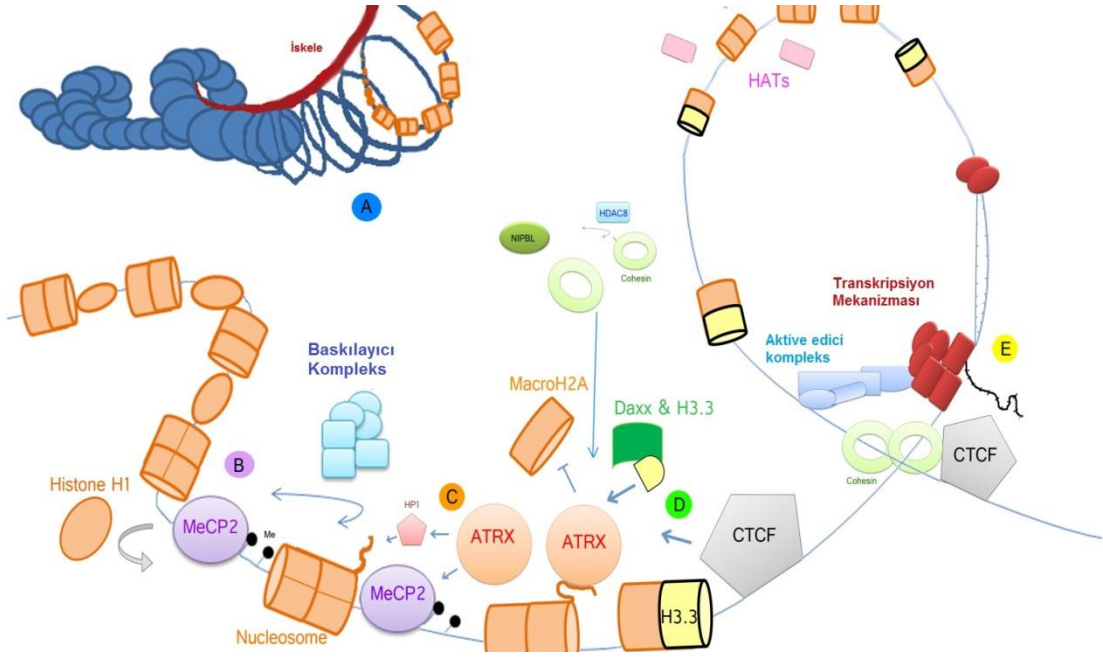
mutasyonlarını saptamada altın standart yöntemler Sangers sekanslama ve PCR amplifikasyonudur. Diğer sekanslama yöntemlerinin ve immunhistokimyanın karşılaştırıldığı bir çalışmada immünhistokimyanın duyarlılığı %94, özgüllüğü %100 olarak bildirilmiş ve immünhistokimyanın geçerli bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır [115, 119, 120].

IDH1 ve IDH2 mutasyonları gliomlarda prognostik açıdan önem taşımaktadırlar. Bu mutasyona sahip anaplastik astrositomlarda ve GBM' de genel sağkalımın belirgin olarak yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu mutasyon özellikle genç hastalarda uzun süreli sağkalımı gösteren bağımsız bir prognostik faktördür [121]. Aynı histolojik özelliğe sahip IDH1 mutant gliomlar diğerlerine oranla daha iyi prognoz göstermekte, hatta bu mutasyonu taşıyan GBM'lerin mutasyonu olmayan anaplastik astrositomlara (AA) kıyasla daha iyi prognoza sahip olduğu bilinmektedir. [122] [115].

ATRX

Alfa-talasemi mental retardasyon sendrom X geni (ATRX) kromozom Xq21.1' de yerleşimlidir. H3.3-ATRX-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 [123].

ATRX, perisentrik heterokromatin ve telomerdeki H3.3 histon varyantı birleştirilmesinin yanı sıra çeşitli transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgeleri için de gereklidir [24]. 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 [124, 125].



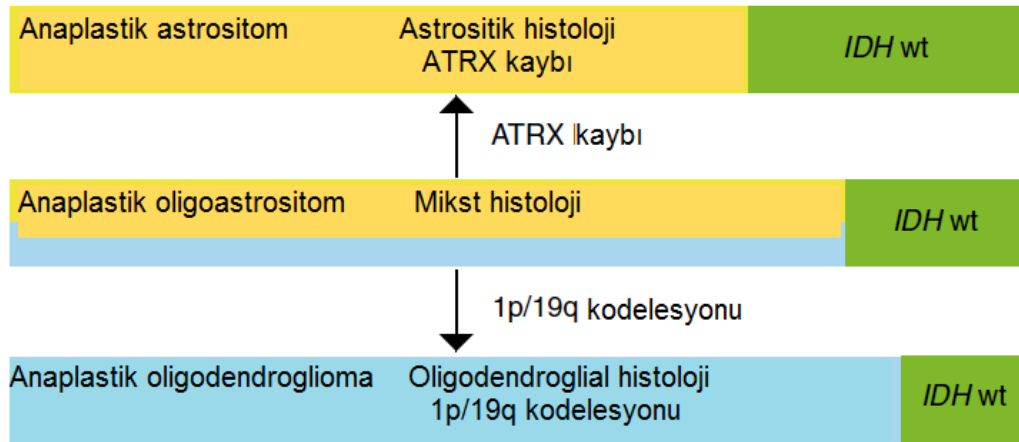
Şekil 5. ATRX ve Histon H3.3 birleşimi ile kromatin organizasyonunun düzenlenmesi [125]. A. Nükleozom olarak da bilinen DNA'nın histonlar etrafında sarılması. B. Methyl-CpG-binding protein (MeCP2) sitozin kalıntılarına bağlanmak için Histon-1 ile yarışır. C. ATRX, MeCP2 tarafından bağlanır, MeCP2 ve HP1alpha ATRX ile direk etkileşir. D. ATRX Histon H3.3 proteini ile bağlanır, nükleozoma macroH2A birleşmesini inhibe eder ve Histone H3.3 için şaperon olan DAXX'ı sürece dahil eder. E. Sarmalı dengelemek için kohezin ve CTCF etkileşir.

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 [126-129].

ATRX mutasyonu glial tümörlerde de saptanmış ve gliogenezde rolü olduğu belirlenmiştir. İlk defa 2011 yılında erişkin ve pediatrik GBM'lerde ve oligodendrogial tümörlerde ATRX mutasyonu tesbit edilmiş ve bu mutasyonun genomik instabiliteden sorumlu olduğu düşünülen telomerazın alternatif uzatılması (alternative lengthening of telomeres (ALT)) ile anlamlı bir ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre pediatrik GBM'lerin %14,3'ünde, erişkin GBM'lerinin ise %7,1'inde ATRX mutasyonu

saptanmıştır [130]. 363 farklı derece ve alt tipteki gliomun analiz edildiği bir çalışmada ise tüm tümörlerin %25,6 sında bu mutasyon tesbit edilmiştir. Bu araştırmada sekonder GBM'lerin % 57'sinde, primer GBM'lerin ise %4'ünde ATRX mutasyonu saptanmıştır [23].

ATRX mutasyonu, protein inaktivasyonu ve ekspresyon kaybıyla sonuçlanır [26, 130]. İmmünohistokimyasal nükleer ATRX ekspresyon kaybı derece II astrositomların %27'sinde, derece III astrositomların % 41'inde, sekonder GBM'lerin %80'inde, primer GBM'lerin ise %7 sinde saptanmıştır [22]. Bir başka çalışmada ise 44 anaplastik astrositom olgusunun %73'ünde bu mutasyon belirlenmiştir [23]. Tüm bunların sonucunda ATRX'in astrositik tümörlerde, mikst glial ve pür oligodendrogliyal tümörlere kıyasla daha yaygın olduğu gösterilmiştir.



Şekil 6. Gliomların histolojik tip ve moleküler belirleyicilere dayalı önerilen moleküler sınıflaması [26].

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Olgu Seçimi

Retrospektif olarak tasarlanan çalışmamızda, Ocak 2001- Ocak 2014 tarihleri arasında Marmara Üniversitesi Nörolojik Bilimler Enstitüsü Patoloji Laboratuvarında ve Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı'nda glioblastom WHO 2007 derece IV tanısı alan olgular incelenerek prognoz bilgisine ulaşılabilen 82 olgu seçildi. Prognoz hesaplaması yapılırken hastaların ilk tanı aldıkları gün ve Temmuz 2014 tarihleri arasındaki yaşam bilgileri hesaba alındı. Seçilen olguların parafine gömülü dokularından elde edilmiş olan Hematoksilen& Eozin boyalı lamları ve olgulara önceden uygulanmış olan tüm immünohistokimya lamları arşivden çıkarıldı ve yeniden incelendi. İnceleme sonucu tanı konusunda şüphe uyandıran olgular ve tüm OGBM olguları tez danışmanı tarafından tekrar incelendi ve kesin tanı korelasyonu sağlandı. Sekonder GBM tanısı almış olan tüm olguların primer tümörlerine ait patoloji raporlarına ulaşıldı. Primer tümörünün patoloji raporuna ulaşamayan Sekonder GBM olguları bu gruptan dışlandı. Gliosarkom tanısı alan olgularının prognoz bilgilerine ulaşamadığı için bu olgular çalışmadan çıkarıldı.

Etik Kurul

84 protokol numaralı projemiz 27.06.2014-13 sayılı yazı ile Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırma Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Yöntem

Seçilmiş olan olguların parafine gömülü dokularından elde edilmiş olan Hematoksilen& Eozin boyalı lamlar ve olgulara önceden uygulanmış olan tüm immünohistokimya lamları incelendi. İnceleme sonucunda olgulara ait tümör morfolojisini en iyi yansıtan blok seçildi ve bu bloğa ATRX ve IDH1 immünohistokimyası uygulandı. Glial tümörlerin patolojik tanı aşamasında

Ki67 ve P53 immunhistokimyası rutin olarak uygulandığından olgulara ait önceden boyanmış P53 ve Ki67 immünhistokimya lamaları patoloji arşivinden çıkarılarak semikantitatif değerlendirilmiştir.

İmmünhistokimya

Formalin fikse parafine gömülü dokuda, ATRX ve IDH1 immünhistokimyası uygulanmak için seçilen parafine gömülü dokulardan 4 mikron kalınlığındaki kesitler pozitif şarjlı lama alınarak 1 gece bekletildi. Kesitler 60°C lik etüvde 1 saat deparafinize edildi. Xylene ve alkollerden geçirilen kesitler distile su ile yıkandı.

IDH1 [Dianova (IDH1 R132H)] clone : H09 için Citrate Buffer (Bio Optica 15-M103) ile, ATRX [Atlas Antibodies (HPA001906)] için EDTA Buffer (Bio Optica 15-M820) ile Antigen Retrieval yapıldı.

Distile su ile yıkanan kesitler 20 dakika %3' lük H₂O₂ (Hidrojen Peroksit) ile peroksidaz blokajı yapıldı. PBS ile yıkanan kesitler 5 dakika protein blokajı (Thermo Ultra V blok TA-125-UB) yapıldı. Kesitlerin üzerindeki blokaj akıtılarak yıkanmadan, kesit üzerlerine ilgili primer antikorlar aşağıda belirtilen oranlarda damlatıldı. Antikorlar dilue edilirken diluent olarak Bio Optica (15-M35T) kullanıldı.

- IDH Dianova (IDH1 R132H) - Konsantrasyon : 1/50 overnight (+4) derecede,

- ATRX Atlas Antibodies (HPA001906) - Konsantrasyon : 1/200 – 1 saat oda sıcaklığında bekletildi.

Kesitler PBS te 3x5 yıkandıktan sonra Biotinylated Goat Anti-Polyvalent (Thermo TP-125-BN) solüsyonu damlatılarak 30 dakika bekletildi. Yine kesitler PBS te 3x5 dakika yıkandıktan sonra kesitlerin üzerine Streptavidin Peroxidase (Thermo TS-125-HR) solüsyonu damlatılarak 30 dakika bekletildi. PBS te 3x5 dakika yıkanan kesitler DAB kromojen'de 6 dakika bekletildi. (DAB Chromojen (Thermo TA-012-HDC) ve DAB Substrate Buffer (Thermo TA-125-HDS) / Oran : 500 mikrolitre

substrata 1 damla kromojen). Daha sonra musluk suyu ile iyice yıkanan kesitler hematoksilin ile counter stain yapıldı (1 dakika). Daha sonra dehidrate edilen kesitler kurutularak kapatıldı.

PBS Hazırlanışı : Na₂HPO₄ (diSodiumHidrogenPhosphate) - 3,710 gr, NaH₂PO₄ (SodiumdiHidrogenPhosphate) - 0,989 gr, NaCl (SodiumChloride) - 14,4 gr. Malzemeler 2 Litre Distile su içinde çözündürülür.

Tablo 3. İmmünohistokimya kullanılan antikorlar

Antikor	Ticari isim ve klon	Dilüsyon	İnkübasyon Süresi
ATRX	Atlas Antibodies (HPA001906)	1/200	1 saat (oda ısısında)
IDH1	Dianova (IDH1 R132H)] clone : H09	1/50	Bir gece (+4) derecede

Değerlendirme

Histopatolojik değerlendirme

Tümörlerin histolojik tipleri DSÖ 2007 Santral Sinir Sistemi tümörleri sınıflamasına göre yeniden değerlendirilmiştir.

Değerlendirme esnasında nekroz/palizatlaşan nekroz, mitoz/atipik mitoz, mikrovasküler proliferasyon gibi DSÖ derece IV glioblastom tanısı için gerekli histomorfolojik bulguların varlığı değerlendirildi. Ayrıca olgularda dev hücre varlığı, içsi hücreli sarkomatöz alanların varlığı, oligodendrogial alanların varlığı ve küçük hücre morfolojisinin varlığı yeniden gözden geçirildi. Bu değerlendirmeler sonucunda gerekli görüldüğü durumlarda orijinal patoloji raporundaki tanılarda değişiklik yapıldı.

P53, Ki67, ATRX ve IDH1 İmmünekspresyonlarının Değerlendirilmesi

Olgularda P53, Ki67 ve ATRX için nükleer boyanma, IDH1 için ise sitoplazmik granüler boyanma dikkate alınmıştır.

Ki67 değerlendirmesi: tümörde Ki67 ile en yoğun boyanma gösteren odakta (hotspot) semikantitatif sayım yapılmış ve oran yüzde (%) olarak hesaplanmıştır. Buna göre %25' ten fazla nükleer boyanma izlenen olgular yüksek proliferasyon gösteren, %25'ten az nükleer boyanma gösteren olgular ise düşük proliferasyon gösteren grup olarak sınıflanmıştır [131]. Ayrıca tümör hücrelerindeki boyanma skorlanarak da değerlendirilmiştir.

1+ = Tümör hücrelerinin %25 ve azında boyanma

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

3+ = Tümör hücrelerinin %50'sinden fazlasında boyanma

P53 değerlendirmesi: Tümörde nükleer boyanma semikantitatif olarak yüzde (%) cinsinden hesaplanmıştır. Literatürdeki değerlendirmeler göz önüne alınarak skora yapılmıştır [132]. 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 değerlendirmesi: 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 değerlendirmesi: 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 [26]. 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.

Klinik Bilgiler ve Tedavi Protokolü

Tedavi, sağkalım ve progresyon bilgileri Marmara üniversitesi Tıp Fakültesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Radyasyon Onkolojisi Ana Bilim Dalı, Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı ve Beyin Cerrahisi Ana Bilim Dallarından elde edilmiştir. Tüm hastalar total, subtotal ve stereotaktik biyopsi sonrası tümörün yerleşimine göre 60 Gray radyoterapi almış, radyoterapiyle eş zamanlı (75 mg/m² gün) ve radyoterapi sonrası adjuvan (150-200 mg/m² ay) Temozolomid tedavisi uygulanmıştır. Progresyon klinik ve/veya radyolojik olarak değerlendirilmiştir. Progresyon olduğu düşünülen hastalarda Bevacizumab + İrinotekan tedavisine geçilmiştir. Sınırlı lezyonlar için semptomatik iyileşme adına stereotaktik radyocerrahi seçilmiş hastalara (16-18 Gray/ %50’lik izodoza) uygulanmıştır.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007&PASS (Power Analysis and Sample Size) 2008 Statistical Software (Utah, USA) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart Sapma, Medyan, Frekans, Oran, Minimum, Maksimum) yanısıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında normal dağılım göstermeyen parametrelerin iki grup karşılaştırmalarında ise Mann Whitney U testi kullanıldı. Normal dağılım

göstermeyen üç ve üzeri grupların karşılaştırmalarında ise Kruskal Wallis test ve farklılığa neden olan grubun tespitinde Mann Whitney U test kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Fisher-Freeman-Halton testi, Fisher's Exact test ve Yates Continuity Correction test (Yates düzeltmeli Ki-kare) kullanıldı. Sağ kalımların değerlendirmesinde ise Kaplan Meier Sağkalım analizi ve Log Rank testi kullanıldı. Anlamlılık $p<0,01$ ve $p<0,05$ düzeylerinde değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmamız Ocak 2001- Ocak 2014 tarihleri arasında Marmara Üniversitesi Nörolojik Bilimler Enstitüsü ve Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Laboratuvarında %42,7'si (n=35) kadın, %57,3'ü (n=47) erkek olmak üzere toplam 82 olgu ile yapılmıştır.

Genel Klinik Bulgular

- **Yaş:** Olguların yaşları 22 ile 83 arasında değişmekte olup, ortalama yaş $54,53 \pm 13,29$ yıldır.
- **Cinsiyet:**
 - Kadın %42,7 (n=35)
 - Erkek %57,3'ü (n=47)
- **Klinik İzlem Verileri**
 - **Cerrahi Tedavi:** 82 olgunun 68'sine total veya subtotal eksizyon yapılmış, 14 olgudan ise stereotaktik biyopsi ile örnekleme yapılmıştır.
 - **Cerrahi sonrası tedavi:** Olguların tamamına standart tedavi protokolü uygulanmıştır. (Cerrahi sonrası radyoterapi + Temozolomid, progresyonlu olgularda Bevacizumab + İrinotekan)
 - **Eksitus :**
 - Eksitus: İzlem süresi içinde olguların %81,7'si (n=67) eksitus olmuştur.
 - Sağ : İzlem süresi içinde toplam %18,3'ü (n=15) sağdır.

Histomorfolojik değerlendirme sonuçları

Histomorfolojik değerlendirme sonucunda tanısı değiştirilen olgular:

Orijinal patoloji raporunda OGBM olarak raporlanmış 2 adet olgunun tanısı konvansiyonel GBM olarak değiştirildi. Konvansiyonel GBM olarak raporlanmış 1 adet olguda oligodendroglial alan tesbit edildi ve tanısı OGBM olarak değiştirildi. Konvansiyonel GBM olarak raporlanmış 1 olgunun tanısı küçük hücreli GBM olarak değiştirildi.

Sekonder GBM grubuna ait olguların primer tanıları:

Çalışmamıza dahil olan sekonder GBM tanılı 11 olgunun ilk patoloji raporlarına ulaşılmıştır. Buna göre bu olgulardan 3' ünün primer tümörü diffüz astrositom, 3' ü gemistositik astrositom, 1 olgu derece II oligodendroglioma, 3 olgu anaplastik oligodendroglioma, 1 olgu anaplastik astrositoma'dır.

Primer ve Sekonder GBM Gruplarına Ait Klinik Bulgular;

- **Olgu sayısı:** 82 olgunun %86,5'i (n=71) primer GBM, %13,5'i (n=11) sekonder GBM grubuna aittir. (şekil 7)
- **Yaş:** Primer GBM'lerde ortalama yaş 56,04, sekonder GBM'lerde ortalama 43,7'dir. Gruplara göre olguların yaş ortalamaları arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0,008; p<0,01). Primer gruptaki olguların yaş ortalaması, Sekonder gruptaki olgulardan anlamlı düzeyde yüksektir (Tablo 4).

Tablo 4. Primer ve Sekonder GBM gruplarında yaş dağılımı

	PRIMER	SEKONDER	<i>p</i>
	Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)	
Yaş (yıl)	56,04±12,54 (56)	43,70±13,42 (45)	^a 0,008**
^a Mann Whitney U Test ^b Fisher's Exact Test ** <i>p</i> <0,01			

- **Cinsiyet:** Primer GBM grubundaki olguların %42,3'ü kadın (n=30), %57,7'ü erkek (n=41) tir. Sekonder GBM olgularının %45,5'i (n=5) kadın, %54,5'i (n=6) erkektir. Gruplara göre olguların cinsiyetleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir (*p*>0,05) (Tablo 5.)

Tablo 5. Primer ve Sekonder GBM gruplarında cinsiyet dağılımı

		PRIMER	SEKONDER	<i>p</i>
		Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)	
		n (%)	n (%)	
Cinsiyet	Kadın	30 (%42,3)	5 (%45,5)	^b 1,000
	Erkek	41 (%57,7)	6 (%54,5)	
^a Mann Whitney U Test		^b Fisher's Exact Test		** <i>p</i> <0,01

- **Klinik izlem verileri:** Primer GBM grubuna ait olguların %83,1'i (n=59) eksitus, %16,9'u (n=12) sağdır. Sekonder gruba ait olguların %72,7'i (n=8) eksitus, %27,3'ü (n=3) sağdır. Gruplara göre olguların eksitus durumları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir (*p*>0,05) (Tablo 6)

Tablo 6. Primer ve Sekonder GBM gruplarında Eksitus/ sağ hasta dağılımı

	PRIMER	SEKONDER	<i>p</i>
	Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)	
Eksitus	59 (%83,1)	8 (%72,7)	^b 0,414
Sağ	12 (%16,9)	3 (%27,3)	
^a Mann Whitney U Test	^b Fisher's Exact Test	^{**} <i>p</i> <0,01	

Histolojik Varyantlara Ait Klinik Bulgular;

- **Olgu Dağılımı:** Olguların %60'ı konvansiyonel GBM (n=49), % 17'i (n=14) küçük hücreli GBM, %16'sı (n=13) oligodendroglioma komponentli GBM, % 7'i (n=6) dev hücreli GBM'dir (Şekil 7).
- **Yaş:** DGBM grubunda ortalama yaş 49,50, konvansiyonel grupta 55,35, KGBM grubunda 51,71, OGBM grubunda 56,77 olarak hesaplanmıştır. Gruplara göre olguların yaşları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir (*p*>0,05) (Tablo 7)

Tablo 7. Histolojik varyantlarda yaş dağılımı

	DGBM (n=6)	Konvansiyonel (n=49)	KGBM (n=14)	OGBM (n=13)	<i>p</i>
	Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)	
Yaş (yıl)	49,50±13,22 (50)	55,35±12,53 (55,5)	51,71±13,48 (51,5)	56,77±15,76 (65)	^d 0,497
^a Mann Whitney U Test ^b Fisher's Exact Test ** <i>p</i> <0,01					

- **Cinsiyet:** DGBM grubundaki olguların %33,3'ü (n=2) kadın, %66,7'si (n=4) erkektir. Konvansiyonel gruptaki olguların %40,8'i (n=20) kadın, %59,2'si (n=29) erkektir. KGBM grubundaki olguların %57,1'i (n=8) kadın, %42,9'u (n=6) erkektir. OGBM grubundaki olguların %38,5'i (n=5) kadın, %61,5'i (n=8) erkektir. Gruplara göre olguların cinsiyetleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0,05$) (Tablo 8)

Tablo 8. Histolojik varyantlarda cinsiyet dağılımı

		DGBM (n=6)	Konvansiyon el (n=49)	KGBM (n=14)	OGBM (n=13)	<i>p</i>
		Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)	
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Cinsiyet	Kadın	2 (%33,3)	20 (%40,8)	8 (%57,1)	5 (%38,5)	^c 0,704
	Erkek	4 (%66,7)	29 (%59,2)	6 (%42,9)	8 (%61,5)	

^cFisher-Freeman-Halton Test

^dKruskal Wallis Test

- **Klinik İzlem verileri:** DGBM grubuna ait olguların %83,3'ü (n=5) eksitus, %16,7'si (n=1) sağdır. Konvansiyonel gruptaki olguların %77,6'sı (n=38) eksitus, %22,4'ü (n=11) sağdır. KGBM grubundaki olguların %85,7'si (n=12) eksitus, %14,3'ü (n=2) sağdır. OGBM grubundaki olguların %92,3'ü (n=12) eksitus, %7,7'si (n=1) sağdır. Gruplara göre olguların eksitus durumları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0,05$) (Tablo 9)

Tablo 9. Histolojik varyantlarda eksitus/ sağ hasta dağılımı

	DGBM (n=6)	Konvansiyon el (n=49)	KGBM (n=14)	OGBM (n=13)	<i>p</i>
	Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Eksitus	5 (%83,3)	38 (%77,6)	12 (%85,7)	12 (%92,3)	^c 0,736
Sağ	1 (%16,7)	11 (%22,4)	2 (%14,3)	1 (%7,7)	

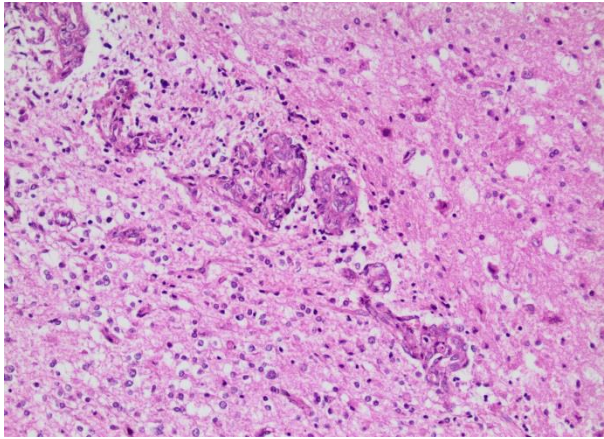
^cFisher-Freeman-Halton Test

^dKruskal Wallis Test

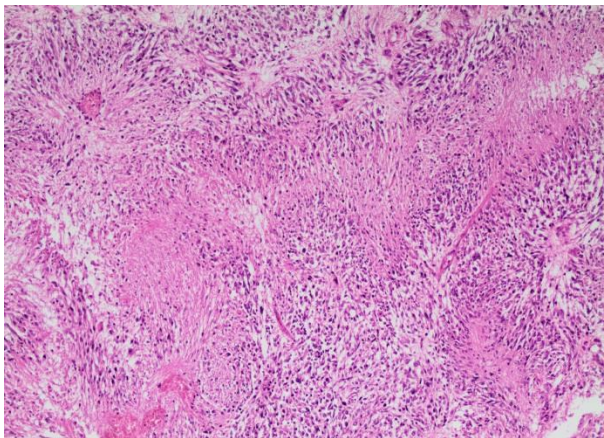
■ Primer GBM ■ Sekonder GBM ■ Konvansiyonel GBM ■ DGBM ■ OGBM ■ KGBM



Şekil 7 A. Primer ve Sekonder GBM gruplarında hasta dağılımı B. Histolojik varyantlara göre hasta dağılımı.

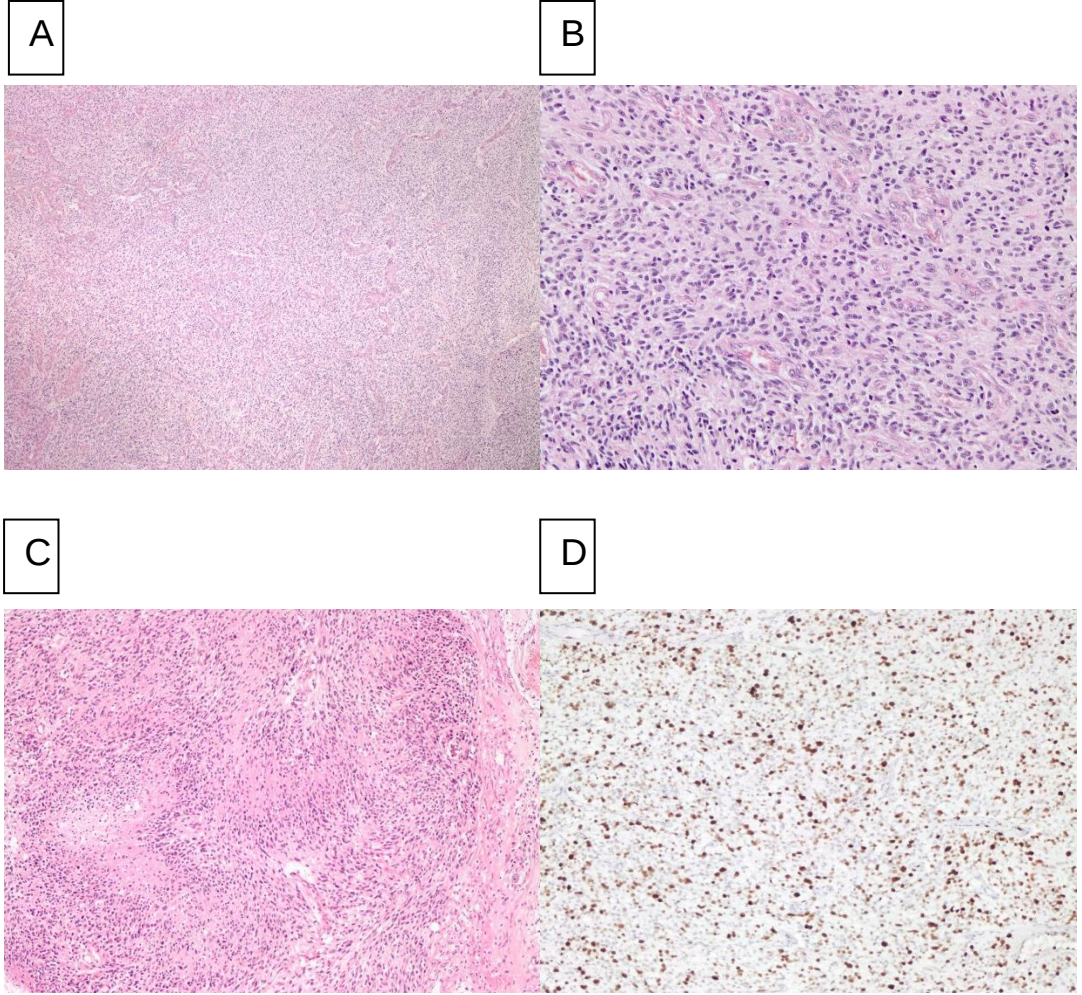


A

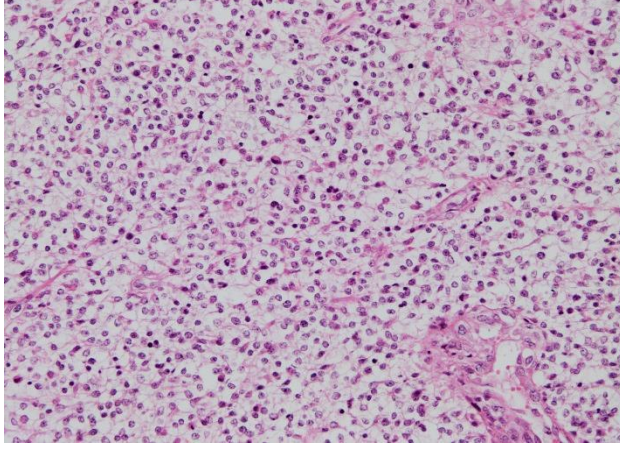


B

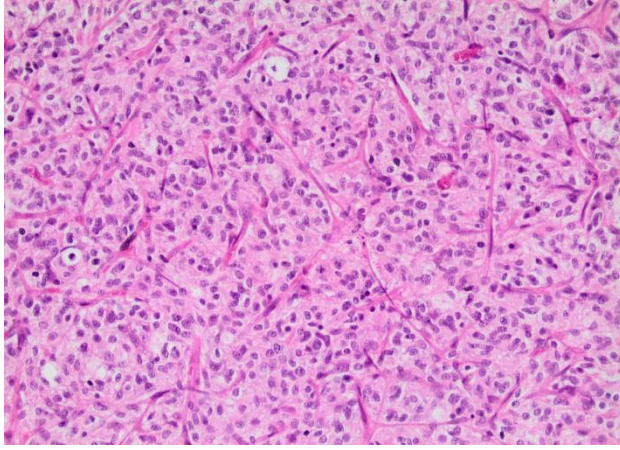
Şekil 8. A. Mikrovasküler proliferasyon. B. Palizatlaşan nekroz alanları



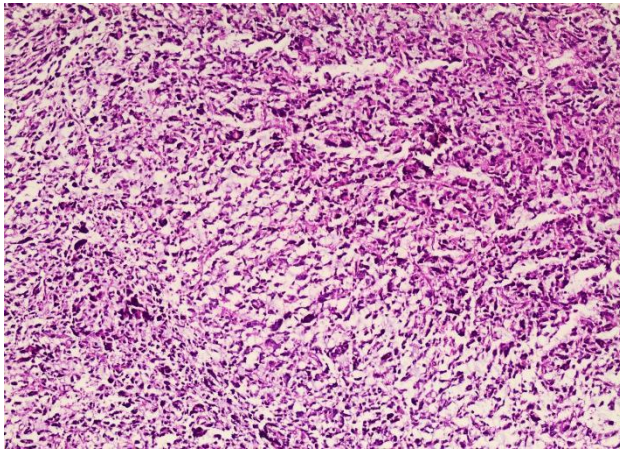
Şekil 9. Çalışma serimize ait KGBM olgusu A. H&E x40 B. H&E x200
C. Palizatlaşan nekroz alanları, H&E, x100 D. Ki67 nükleer ekspresyonu,
yüksek proliferasyon indeksi (%40)



A

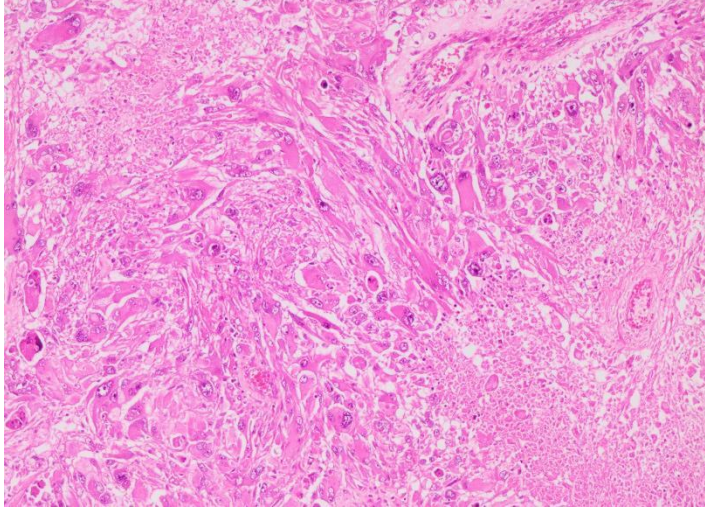


B

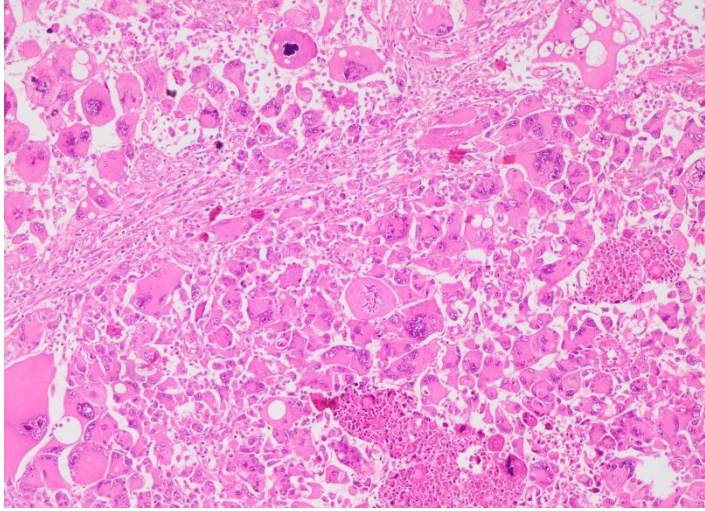


C

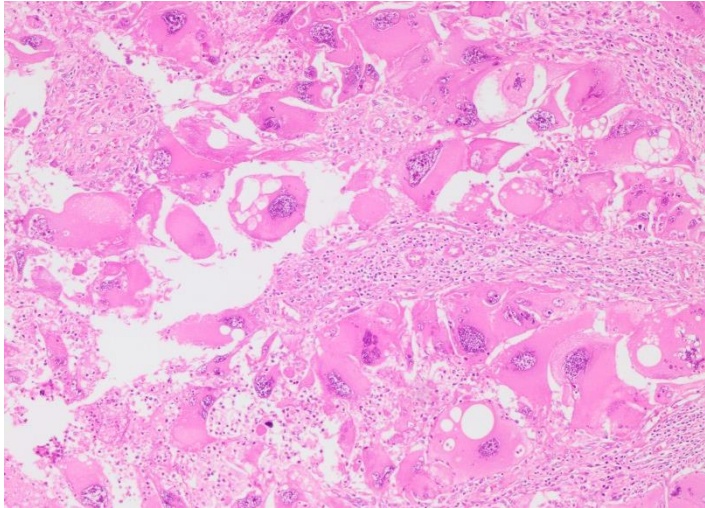
Şekil 10. OGBM olgusu A. Oligodendroglial component B. Oligodendroglial komponentteki kümes teli damar paterni C. Aynı tümörde bulunan astrositik komponent.



A



B



C

Şekil 11. DGBM olgusu A. H&E x200 B. H&E x200, coğrafik nekroz alanları
C.H&E x400

İmmünohistokimya Bulguları

Ki67

- **Genel Dağılım:** Toplam 81 olgu değerlendirmeye alınmıştır. Genel boyanma dağılımı tablo 10'da gösterilmiştir. Olguların Ki 67 boyanma düzeyleri 1 ile 80 arasında değişmekte olup, ortalama yüzde $32,14 \pm 23,31$ 'dir. Olguların %40,7'sinin (n=33) Ki 67 sonucu 1+ iken; %38,3'ünün (n=31) 2+ ve %21,0'inin (n=17) 3+'dır. Olguların Ki 67 düzeyleri incelendiğinde; %40,7'sinin (n=33) düzeyi düşük, %59,3'ünün (n=48) yüksek düzeydedir (Tablo 10).

Tablo.10. Ki67 boyanma dağılımı

		Min-Mak	Ort $\pm$ SD	Medyan
Ki 67 (%)		1-80	$32,14 \pm 23,31$	30
		n	%	
Ki 67 skor (n=81)	1+	33	40,7	
	2+	31	38,3	
	3+	17	21,0	
Ki 67 durum (n=81)	Düşük	33	40,7	
	Yüksek	48	59,3	

- **Primer ve Sekonder GBM'lerde Ki67:**
 - **Ki67 Boyanma Durumu:** Primer GBM grubundaki olguların % 42,9'unun (n=30), sekonder GBM grubundaki olguların ise %27,3'ünün (n=3) düşük proliferasyon indeksine sahip olduğu, primer GBM grubundaki olguların %57,1'inin (n=40), sekonder GBM grubundaki olguların ise %72,7'sinin (n=8) yüksek proliferasyon indeksine sahip olduğu görüldü. Bu iki grup arasında Ki67 proliferasyon indeksinin düşük veya yüksek olması durumuna bağlı istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır. ($p>0,05$) (Tablo 11)

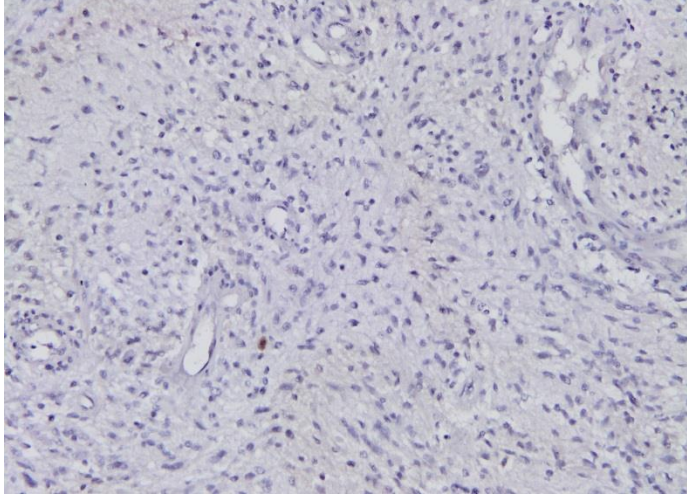
Tablo 11. Primer ve Sekonder GBM’lerde Ki67 İHK sonuçları

		PRIMER	SEKONDER	<i>p</i>
Ki 67 (%) ; Ort±SD (Medyan)		30,73±22,47 (30)	41,82±26,39 (40)	^a 0,182
Ki 67 durum; <i>n (%)</i>	Düşük	30 (%42,9)	3 (%27,3)	^b 0,511
	Yüksek	40 (%57,1)	8 (%72,7)	
^a Mann Whitney U Test ** <i>p</i> <0,01		^b Fisher’s Exact Test	^c Fisher-Freeman-Halton	Test

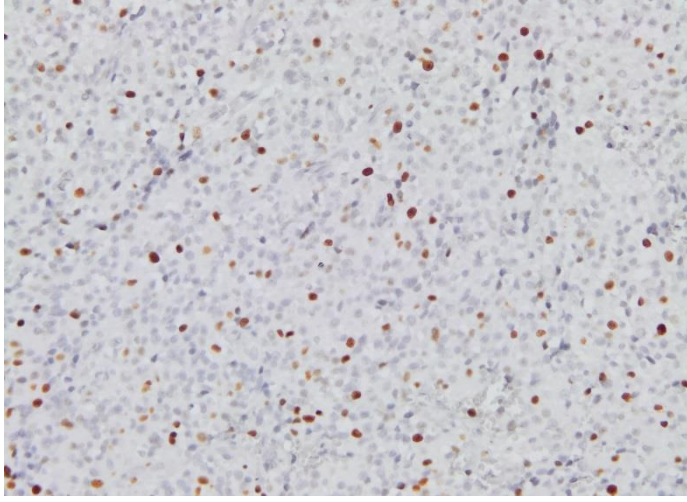
- **Ki67 boyanma skoru:** Primer ve sekonder GBM gruplarında Ki67 boyanma skoru dağılımı tablo 12’de gösterilmiştir. Buna göre bu iki grup arasında Ki67 boyanma skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (Tablo 12).

Tablo.12. Primer ve sekonder GBM gruplarında Ki67 boyanma skoru

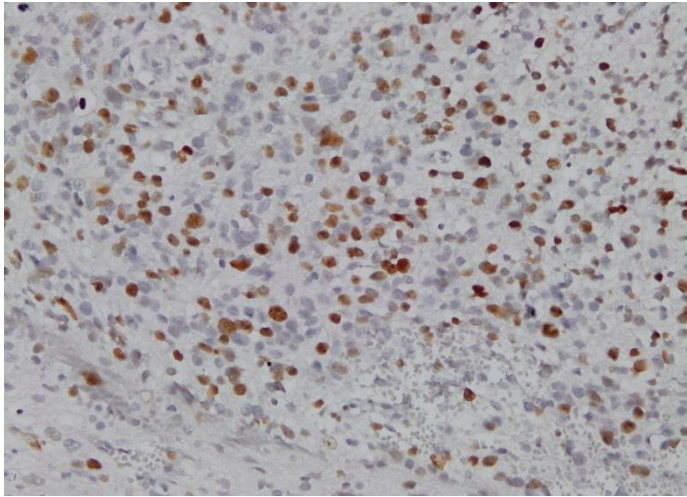
		PRIMER	SEKONDER	<i>p</i>
Ki 67 skor; <i>n (%)</i>	1+	30 (%42,9)	3 (%27,3)	^c 0,370
	2+	27 (%38,6)	4 (%36,4)	
	3+	13 (%18,6)	4 (%36,4)	
^a Mann Whitney U Test		^b Fisher’s Exact Test	^c Fisher-Freeman-Halton	Test ** <i>p</i> <0,01



A



B



C

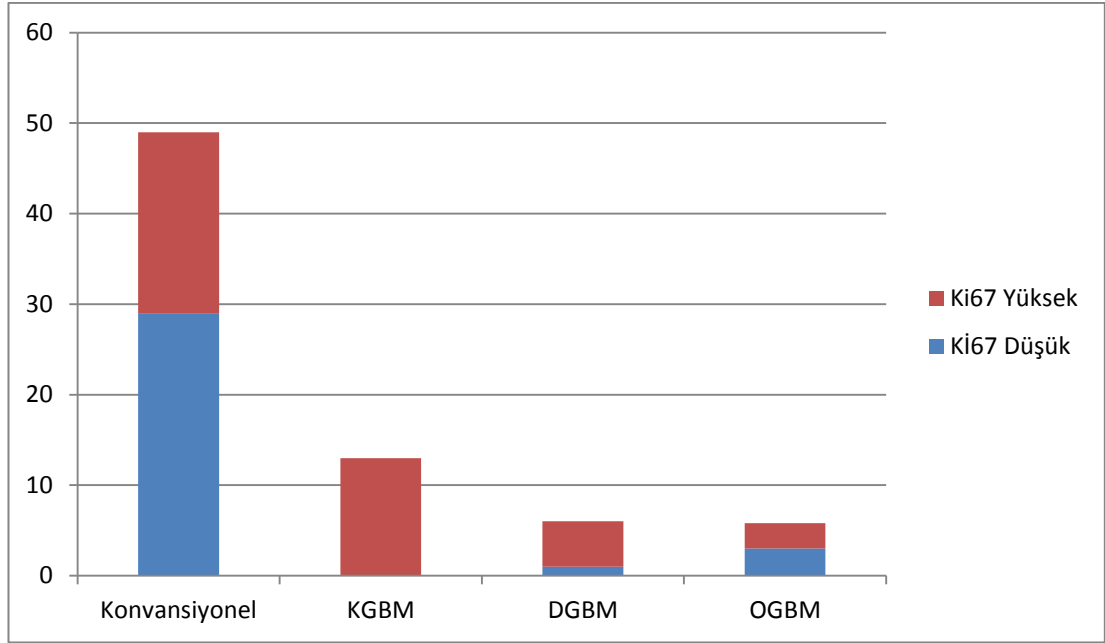
Şekil 12. Ki67 A. 1+ (Düşük proliferasyon indeksi) B. 2+ C. 3+ (B-C yüksek proliferasyon indeksi)

- **Histolojik varyantlarda Ki67:**

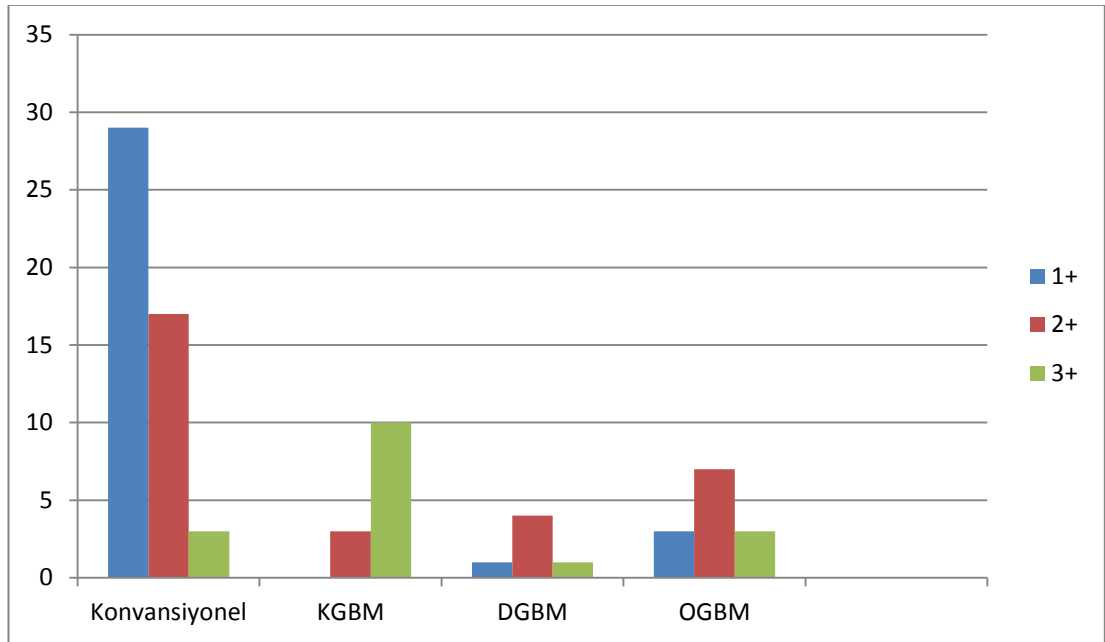
- **Ki67 boyanma durumu (Düşük/Yüksek):** GBM'in histolojik varyantlarında Ki67 ekspresyon yüzdeleri ve proliferasyon indeksi durumu Tablo 13'te belirtilmiştir. Bu sonuçlara göre Ki 67 yüzdeleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0,001$; $p<0,01$). Farklılığı yaratan grubu belirlemek amacıyla yapılan ikili karşılaştırmalara göre; KGBM grubundaki olguların Ki 67 boyanma yüzdeleri, DGBM, konvansiyonel GBM ve OGBM grubundaki olgulardan anlamlı düzeyde yüksektir ($p=0,044$; $p=0,001$; $p=0,026$; $p<0,05$). DGBM grubundaki olguların Ki 67 boyanma yüzdeleri de konvansiyonel gruptaki olgulardan anlamlı düzeyde yüksektir ($p=0,050$; $p\leq 0,05$). Diğer grupların Ki 67 boyanma yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 12).
- **Ki67 boyanma skoru:** Olguların boyanma skoruna göre dağılımı Tablo 13'te gösterilmiştir. Gruplara göre olguların Ki 67 skorları arasında da istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0,001$; $p<0,01$). Klasik gruptaki olguların 1+ olma oranları, Küçük hücreli gruptaki olguların ise 3+ olma oranları diğer gruplardan anlamlı düzeyde yüksektir. Gruplara göre Ki 67 skorlarının 2+ olma oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemektedir (Şekil 13).

Tablo 13. Histolojik varyantlarda Ki67 İHK sonuçları

		DGBM (n=6)	Konvansiyonel (n=49)	KGBM (n=14)	OGBM (n=13)	<i>p</i>
		Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)	
Ki 67 (%)		38,33±20,65 (40)	22,75±16,77 (20)	61,15±16,20 (70)	36,23±26,59 (30)	^d 0,001**
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Ki67 durum	Düşük	1 (%16,7)	29 (%59,2)	0 (%0)	3 (%23,1)	^c 0,001**
	Yüksek	5 (%83,3)	20 (%40,8)	13 (%100)	10 (%76,9)	
	1+	1 (%16,7)	29 (%59,2)	0 (%0)	3 (%23,1)	^c 0,001**
Ki67 skor	2+	4 (%66,7)	17 (%34,7)	3 (%23,1)	7 (%53,8)	
	3+	1 (%16,7)	3 (%6,1)	10 (%76,9)	3 (%23,1)	
^c Fisher-Freeman-Halton Test		^d Kruskal Wallis Test		^{**} <i>p</i> <0,01		



Şekil 12. Histolojik Varyantlarda Ki67 proliferasyon indeksi dağılımı



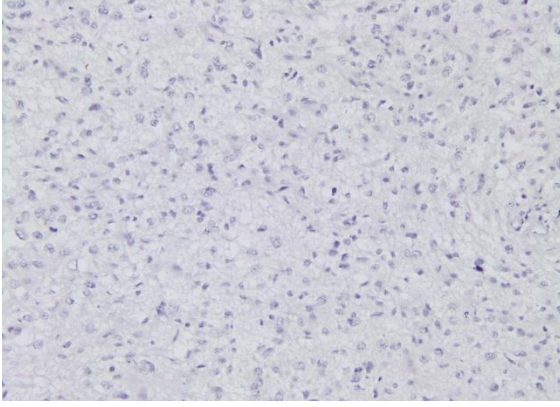
Şekil 13. Histolojik Varyantlarda Ki67 boyanma skoru dağılımı

P53

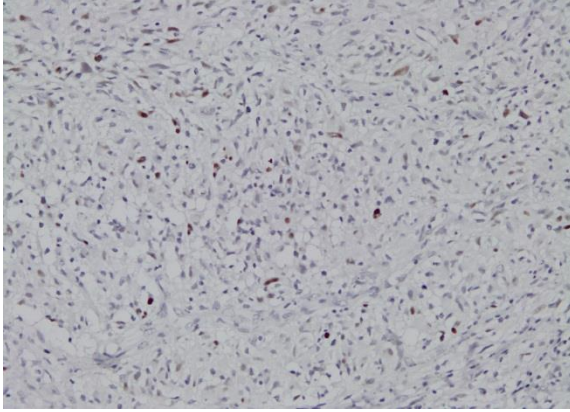
- **Genel Dağılım:** Genel boyanma dağılımı tablo 14'te gösterilmiştir. Bu bulgulara göre olguların P 53 boyanma düzeyleri 0 ile 90 arasında değişmekte olup, ortalama yüzde $18,63 \pm 27,40$ 'dir. Olguların %67,1'inin (n=55) P 53 sonucu negatif iken; %32,9'unun (n=27) P53 sonucu pozitifdir. Pozitif olguların skora göre %4,9'unun (n=4) 1+, %12,1'inin (n=10) 2+ ve %15,9'unun (n=13) 3+ olduğu görülmüştür.

Tablo.14. P53 boyanma dağılımı

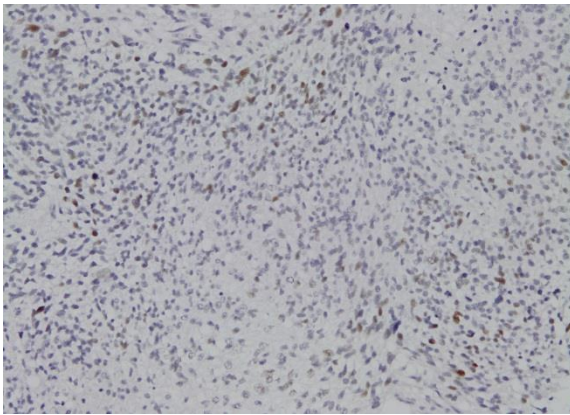
		Min-Mak	Ort $\pm$ SD	Medyan
P 53 (%)		0-90	18,63 $\pm$ 27,40	5
		n	%	
P 53 skor	Negatif	55	67,1	
	Pozitif	27	32,9	
P 53 skor	Negatif	55	67,1	
	1+	4	4,9	
	2+	10	12,1	
	3+	13	15,9	



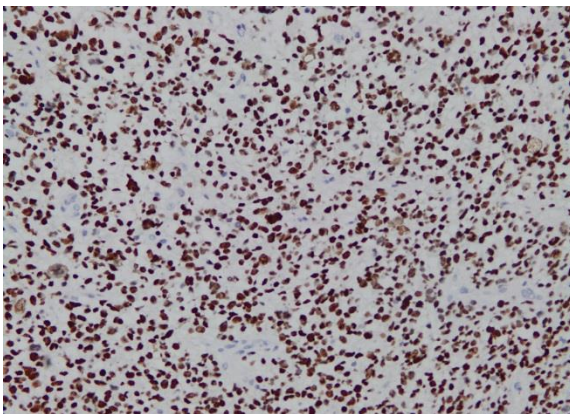
A



B



C



D

Şekil 14. P53 A. Negatif B. 1+ C. 2+ D. 3+

- **Primer ve Sekonder GBM'lerde P53:** Primer ve sekonder GBM'lerde P53 İHK bulguları Tablo 15'te gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre iki grup açısından olguların P53, boyanma yüzdeleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0,05$). Gruplara göre olguların P53 skorları ve P53 pozitifliği, istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0,05$).

Tablo 15. Primer ve sekonder GBM'lerde P53 İHK bulguları;

		PRIMER	SEKONDER	<i>p</i>
P 53 (%);Ort±SD (Medyan)		18,37±26,40 (5)	21,82±33,77 (2)	^a 0,582
P 53 skor; n (%)	Negatif	48 (%67,6)	7 (%63,6)	^c 0,287
	1+	3 (%4,2)	1 (%9,1)	
	2+	10 (%14,1)	0 (%0)	
	3+	10 (%14,1)	3 (%27,3)	
P 53; n (%)	Negatif	48 (%67,6)	7 (%63,6)	^b 1,000
	Pozitif	23 (%32,4)	4 (%36,4)	
^c Fisher-Freeman-Halton Test		^d Kruskal Wallis Test	^{**} <i>p</i> <0,01	

- **Histolojik Varyantlarda P53:** Histolojik varyantlara göre P53 İHK bulguları Tablo 16'da gösterilmiştir. Bu gruplarda P53 boyanma yüzdesi, mutasyon varlığı ve boyanma skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 16. Histolojik varyantlara göre P53 İHK bulguları;

		DGBM (n=6)	Konvansiyonel (n=49)	KGBM (n=14)	OGBM (n=13)	p
		Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)	
P 53 (%)		41,33±34,30 (47,5)	15,65±25,32 (3)	14,79±24,27 (5)	24,77±31,36 (8)	^d 0,288
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
P 53	Negatif	2 (%33,3)	36 (%73,5)	10 (%71,4)	7 (%53,8)	^c 0,162
	Pozitif	4 (%66,7)	13 (%26,5)	4 (%28,6)	6 (%46,2)	
	Negatif	2 (%33,3)	36 (%73,5)	10 (%71,4)	7 (%53,8)	^c 0,261
P 53 skor	1+	0 (%0)	2 (%4,1)	1 (%7,1)	1 (%7,7)	
	2+	1 (%16,7)	4 (%8,2)	2 (%14,3)	3 (%23,1)	
	3+	3 (%50)	7 (%14,3)	1 (%7,1)	2 (%15,4)	

^cFisher-Freeman-Halton Test^dKruskal Wallis Test

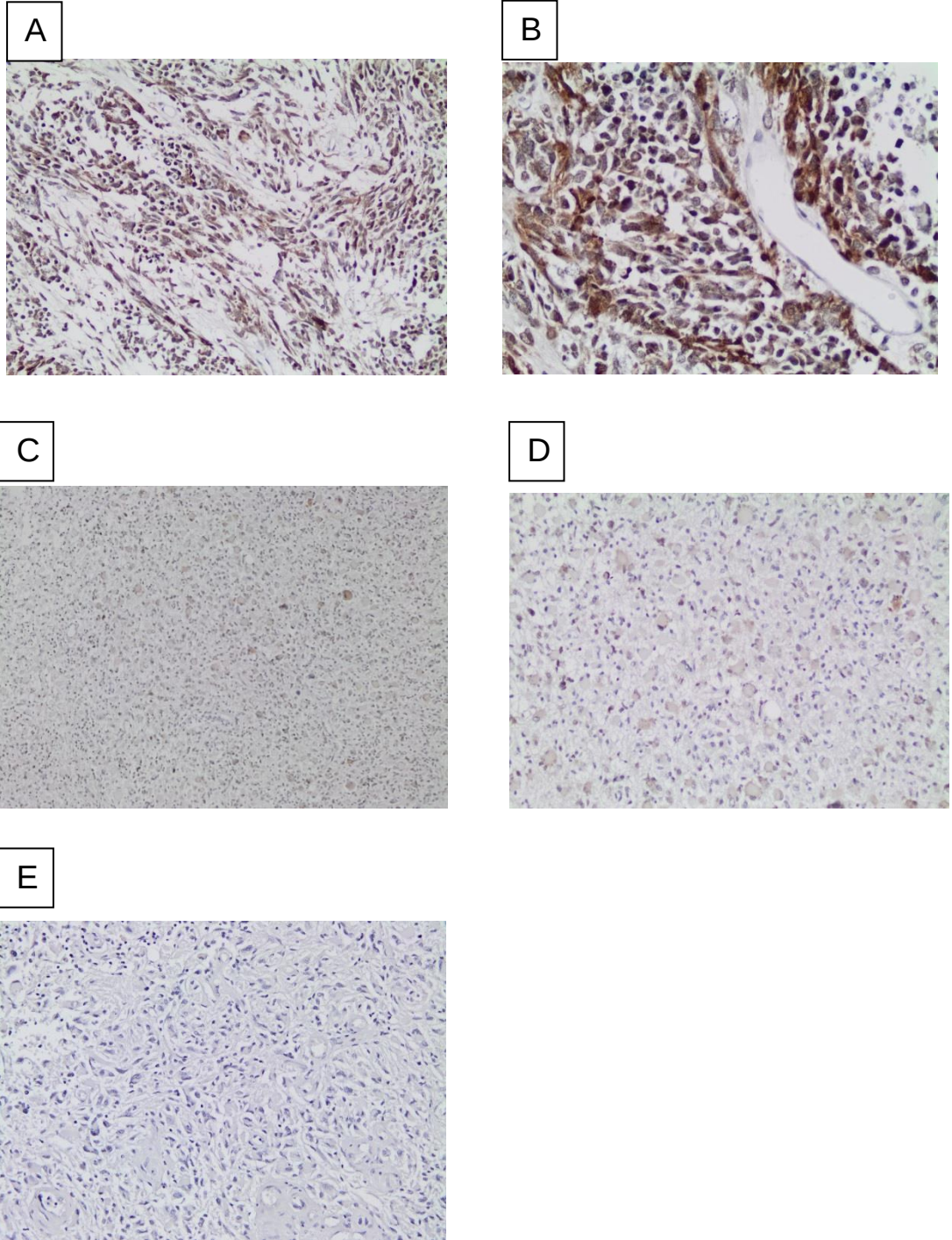
**p<0,01

IDH1

- **Genel Dağılım:** IDH1 genel boyanma dağılımı Tablo 17' de gösterilmiştir. 82 olgudan %93,9'unda (n=77) IDH1 ile ekspresyon izlenmezken, %6,1'inde (n=5) IDH1 ile ekspresyon izlenmektedir. Pozitif olguların 4'ünün boyanma şiddeti kuvvetli iken, 1'inin zayıf düzeydedir.

Tablo 17. IDH1 boyanma dağılımı;

		n	%
IDH1	Negatif	77	93,9
	Pozitif	5	6,1
IDH1 Boyanma şiddeti (n=5)	Kuvvetli	4	80,0
	Zayıf	1	20,0



Şekil 15. IDH1 A. Kuvvetli sitoplazmik boyanma X100, B. Kuvvetli sitoplazmik boyanma X400 C. Zayıf sitoplazmik boyanma X100 D. Zayıf sitoplazmik boyanma X200 E. Negatif ekspresyon

- **Primer ve Sekonder GBM’lerde IDH1;** Bulgular Tablo 18’de gösterilmiştir. IDH1 ile ekspresyon izlenen olguların tamamı sekonder GBM grubundadır. Gruplara göre olguların IDH1 pozitiflikleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0,001$; $p<0,01$). Sekonder gruptaki olgularda IDH pozitifliği, primer olgulardan anlamlı düzeyde yüksektir.

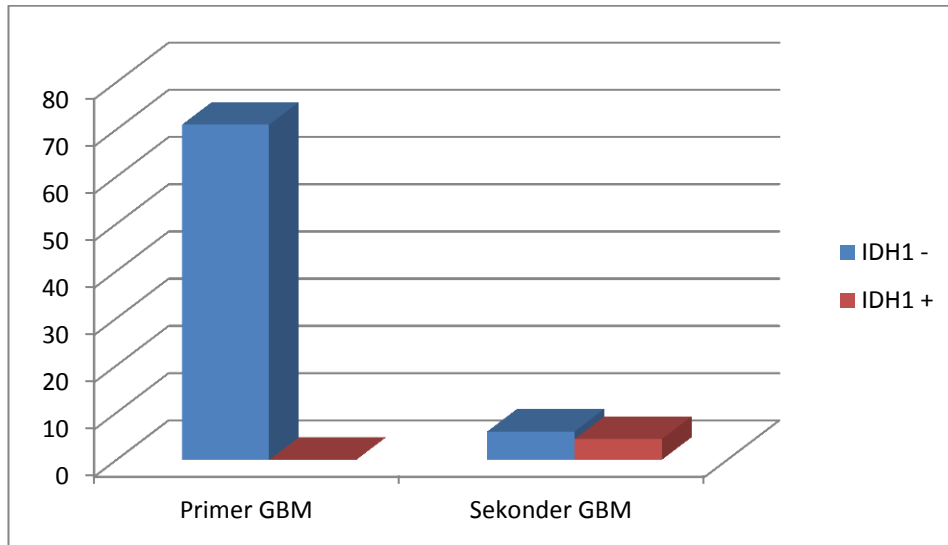
Tablo 18. Primer ve Sekonder GBM’lerde IDH1 bulguları;

		PRIMER	SEKONDER	<i>p</i>
IDH1; n (%)	Negatif	71 (%100)	6 (%54,5)	^b 0,001**
	Pozitif	0 (%0)	5 (%45,5)	

^cFisher-Freeman-Halton Test

^dKruskal Wallis Test

** $p<0,01$



Şekil 16. Primer ve sekonder GBM’lerde IDH1 boyanma dağılımı

- **Histolojik varyantlarda IDH1:** Bulgular Tablo 19’da gösterilmiştir. IDH1 ile ekspresyon gösteren 5 olgunun dağılımına bakıldığında 4 olgunun konvansiyonel GBM, 1 olgunun ise OGBM olduğu görülmüştür. Histolojik varyantlar arasında IDH1 ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 19. Histolojik varyantlarda IDH1 Bulguları

		DGBM	Konvansiyonel	KGBM	OGBM	<i>p</i>
		(n=6)	(n=49)	(n=14)	(n=13)	
		Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)	
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
IDH	Negatif	6 (%100)	45 (%91,8)	14 (%100)	12 (%92,3)	^c 0,768
	Pozitif	0 (%0)	4 (%8,2)	0 (%0)	1 (%7,7)	
^c Fisher-Freeman-Halton Test		^d Kruskal Wallis Test		^{**} <i>p</i> <0,01		

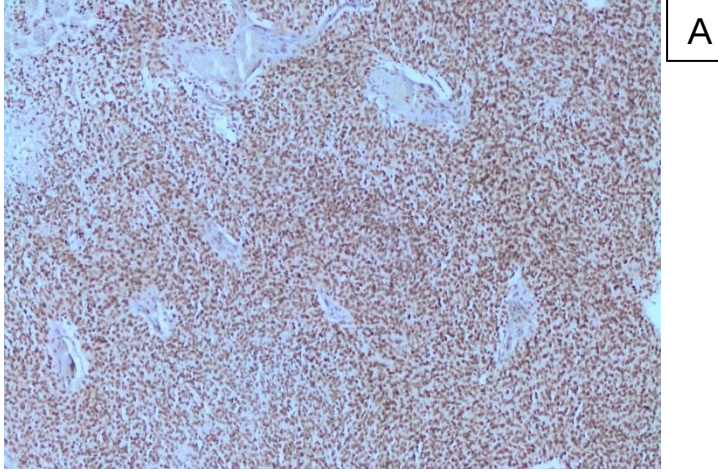
^cFisher-Freeman-Halton Test^dKruskal Wallis Test***p*<0,01

ATRX

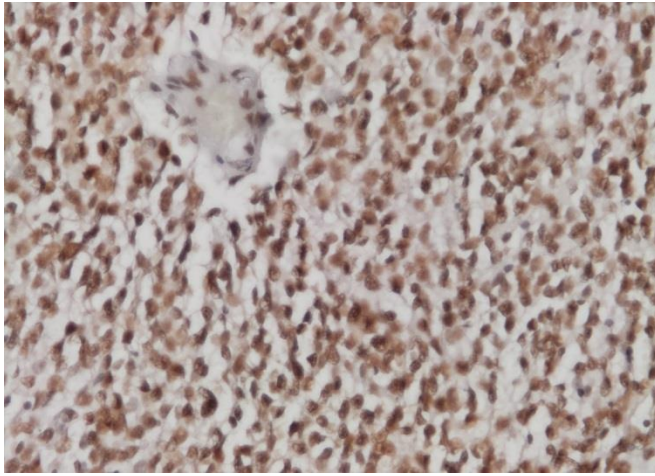
- **Genel Dağılım:** ATRX İHK bulgularının tüm olgulardaki genel dağılımı tablo 20’de gösterilmiştir. %90 ve üzerinde ekspresyon kaybı olan olgular “mutasyon var” olarak kabul edildiğinde tüm olguların % 34,1’i (n=28) mutasyon var, %65,9’u (n=54) “mutasyon yok” olarak saptanmıştır.

Tablo 20. ATRX boyanma dağılımı

		Min-Mak	Ort±SD	Medyan
ATRX (%)		0-90	34,32±29,55	30
		n	%	
ATRX	Var	28	34,1	
Mutasyonu	Yok	54	65,9	

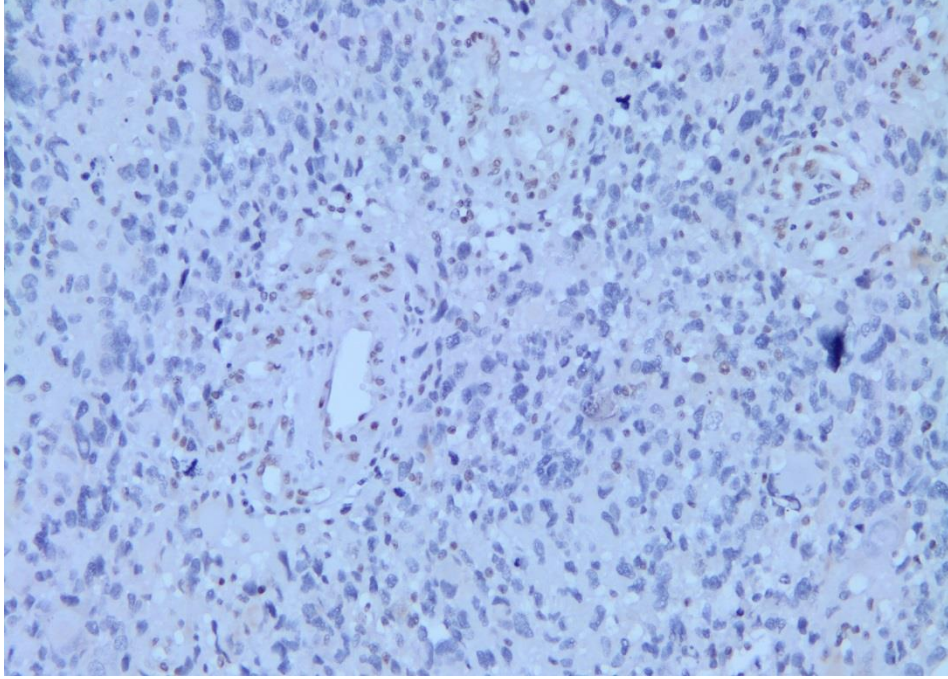


A

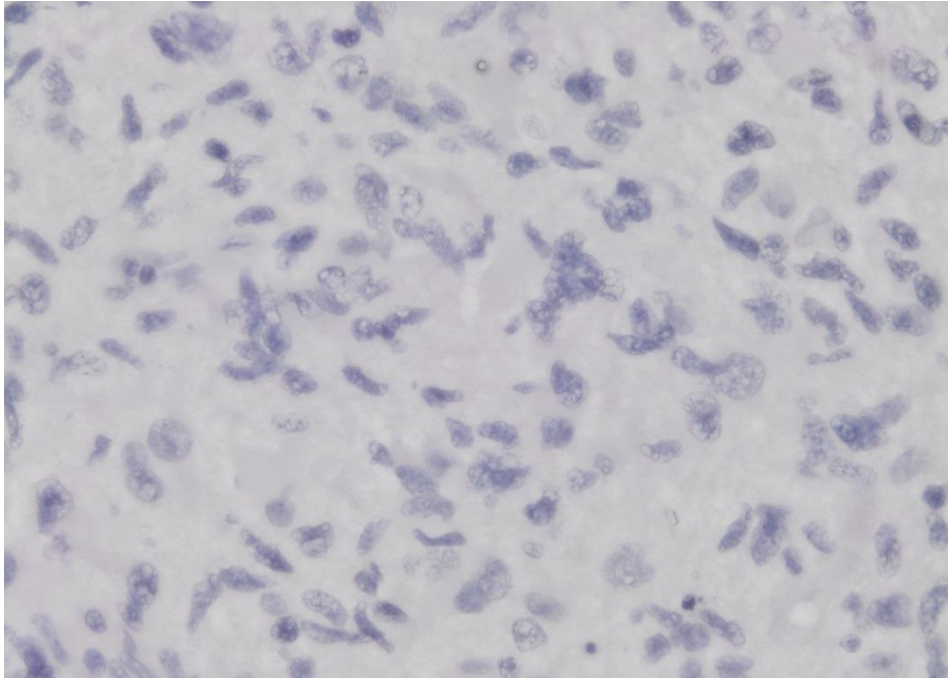


B

Şekil 17. ATRX yaygın nükleer ekspresyon A. x100 B. X400 (Damar endotelindeki nükleer ekspresyona dikkat ediniz)



A



B

Şekil 18. ATRX ekspresyon kaybı gösteren olgular A. X100, damar endotelindeki boyanma internal pozitif kontrol olarak alındı B. X400

- **Primer ve sekonder GBM gruplarında ATRX:** Bulgular Tablo 21’de gösterilmiştir. Primer GBM grubuna ait olguların % 36,6’ında (n=26) ATRX ile ekspresyon kaybı saptanırken, bu oran sekonder GBM’lerde % 18,2 (n=2) olarak saptanmıştır. Bu iki grup arasında ATRX mutasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (p>0,05).

Tablo 21. Primer ve sekonder GBM’lerde ATRX bulguları:

		PRIMER	SEKONDER	p
ATRX (%);; Ort±SD (Medyan)		34,41±30,10 (30)	37,00±27,60 (30)	^a 0,613
ATRX	Var	26 (%36,6)	2 (%18,2)	^b 0,316
mutasyonu; n (%)	Yok	45 (%63,4)	9 (%81,8)	

^aMann Whitney U Test

^bFisher’s Exact Test

^cFisher-Freeman-Halton

Test

**p<0,01

- **Histolojik varyantlarda ATRX:** Bulgular Tablo 22’ de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre DGBM grubuna ait olguların %33,3’ünde (n=2), konvansiyonel gruptaki olguların %40,8 ‘inde (n=20), KGBM grubundaki olguların %21,4’ünde (n=3), OGBM grubundaki olguların ise %23,1’inde (n=3) ATRX immünekspresyon kaybı saptanmıştır. Bu dört grup arasında ATRX mutasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (p<0,05).

Tablo 22. Histolojik varyantlarda ATRX bulguları:

		DGBM (n=6)	Konvansiyonel (n=49)	KGBM (n=14)	OGBM (n=13)	<i>p</i>
		Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)	Ort±SD (Medyan)	
ATRX (%)		37,83±28,43 (45)	29,79±28,35 (30)	45,00±32,76 (35)	41,00±30,69 (40)	^a 0,319
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
ATRX mutasyo nu	Var	2 (%33,3)	20 (%40,8)	3 (%21,4)	3 (%23,1)	^c 0,488
	Yok	4 (%66,7)	29 (%59,2)	11 (%78,6)	10 (%76,9)	

^cFisher-Freeman-Halton Test

^aKruskal Wallis Test

^{**}*p*<0,01

- **Mutasyon belirteçleri arası ilişkiler:**

- **ATRX ekspresyon kaybı ve P53 ve IDH1**

ekspresyonu ve Ki67 proliferasyonu ilişkisi: Tablo 23'te gösterilmiştir. ATRX ekspresyon kaybı saptanan 28 olgudan 9'unda P53 mutasyonu mevcuttur. ATRX ekspresyon kaybı saptanan 28 olgudan 1'inde IDH1 ekspresyonu mevcuttur. ATRX ekspresyon kaybı ile P53 ve IDH1 ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır (*p*>0,05). ATRX boyanma sonuçları ile Ki 67 boyanma düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır (*p*<0,05). ATRX mutasyonu görülenlerin Ki 67 durumlarının düşük düzeyde olması, ATRX mutasyonu görülmeyenlerden anlamlı düzeyde yüksektir.

Tablo 23. ATRX Boyanma Sonuçları ile P 53 ve IDH1 ve Ki67 Boyanma Sonuçları İlişkisi

		ATRX mutasyonu		<i>p</i>
		Yok	Var	
		n (%)	n (%)	
P 53	Negatif	36 (%66,7)	19 (%67,9)	^e 1,000
	Pozitif	18 (%33,3)	9 (%32,1)	
IDH	Negatif	50 (%92,6)	27 (%96,4)	^b 0,656
	Pozitif	4 (%7,4)	1 (%3,6)	
Ki 67 durum	Düşük	17 (%32,1)	16 (%57,1)	^e 0,029*
	Yüksek	36 (%67,9)	12 (%42,9)	

^bFisher's Exact Test

^eYates's Continuity Correction Test

- **IDH1 boyanma Sonuçları ile P 53 ve Ki67 boyanma sonuçları ilişkisi:** Tablo 24 'te gösterilmiştir. P53 ile ekspresyon izlenen 26 olgunun 2'sinde IDH1 ile ekspresyon saptanmıştır. Bu iki mutasyon belirteci arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$). IDH1 ve Ki67 proliferasyon indeksi durumu arasında ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 24. IDH1 ile P 53 ve Ki67 Boyanma Sonuçları İlişkisi

		IDH1		<i>p</i>
		Negatif	Pozitif	
		n (%)	n (%)	
P 53	Negatif	52 (%67,5)	3 (%60,0)	^b 1,000
	Pozitif	25 (%32,5)	2 (%40,0)	
Ki 67 durum	Düşük	31 (%40,8)	2 (%40,0)	^b 1,000
	Yüksek	45 (%59,2)	3 (%60,0)	

^bFisher's Exact Test

- **P53 ve Ki67 ekspresyonu ilişkisi:** Bulgular Tablo 25’te gösterilmiştir. P53 boyanma sonuçları ile Ki 67 boyanma düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır ($p<0,05$). P 53 boyanma sonuçları pozitif olan olgularda Ki 67 durumlarının yüksek düzeyde olması, P 53 boyanma sonuçları negatif olan olgulardan anlamlı düzeyde yüksektir.

Tablo 25 : P 53 Boyanma Sonuçları ile Ki 67 Boyanma Sonuçları İlişkisi

		P 53		p
		Negatif	Pozitif	
		n (%)	n (%)	
Ki 67 durum	Düşük	27 (%50,0)	6 (%22,2)	^e 0,031*
	Yüksek	27 (%50,0)	21 (%77,8)	

➤ ^eYates’s Continuity Correction Test

* $p<0,05$

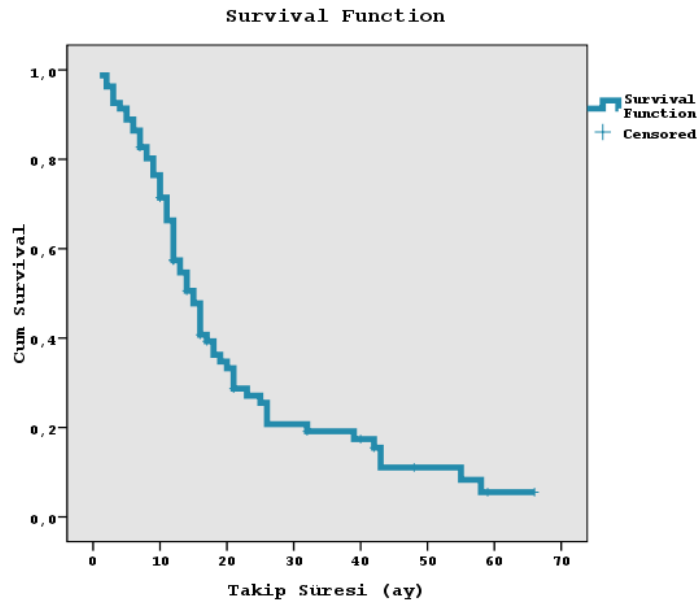
Sağkalım Bulguları

Genel Sağkalım Analizi:

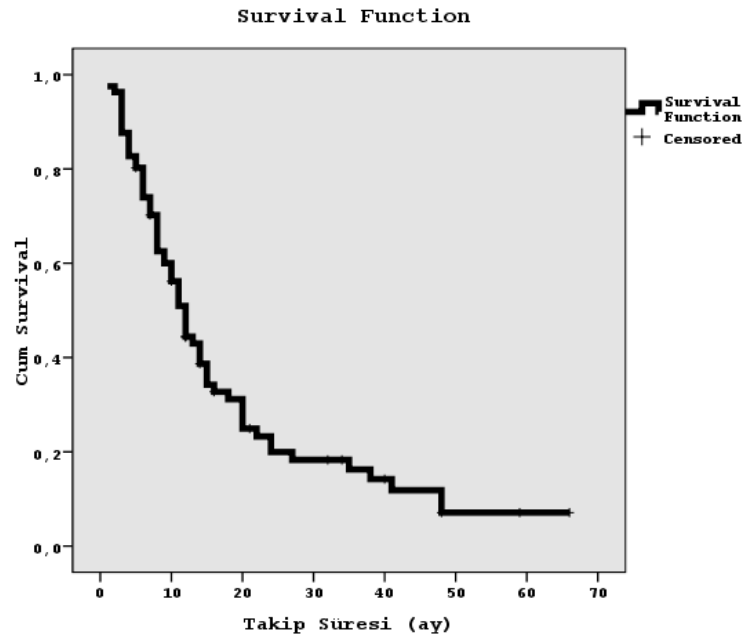
Mortalite bilgisine ulaşılabilen 81 olgudan; 15 olgu yaşarken (%18.5); 66 ölüm gözlenmiştir. Ortalama sağkalım süresi 20.91 ± 2.09 aydır. En son ölüm 58. ayda görülmüş olup; bu aydaki kümülatif sağkalım oranı %5.3, standart hatası %3.5’dir (Şekil 7).

Hastalıksız Sağkalım Analizi

Mortalite bilgisine ulaşılabilen 81 olgudan; 15 olgu yaşarken (%18.5); 66 ölüm gözlenmiştir. Ortalama sağkalım süresi 18.11 ± 2.13 aydır. En son ölüm 48.ayda görülmüş olup; bu aydaki kümülatif sağkalım oranı %7.1, standart hatası %3.7’dir (Şekil 8).



Şekil 19. Genel sağkalım grafiği



Şekil 20. Hastalıksız sağkalım grafiği

Primer ve Sekonder GBM’lerde Sağkalım Analizi

Primer grupta olan 70 olgudan; 12 olgunun yaşadığı (%17,1); 58 ölümün gözleendiği; ortalama sağkalım süresinin $19,12 \pm 2,09$ ay olduğu anlaşılmaktadır. En son ölüm 58. ayda görülmüş olup; 5 yıllık kümülatif sağkalım oranı %5,2, standart hatası %3,4’dür (Şekil 21). Sekonder grupta olan 11 olgudan; 3 olgunun yaşadığı (%27,3); 8 ölümün gözleendiği; ortalama sağkalım süresinin $30,14 \pm 6,47$ ay olduğu anlaşılmaktadır.

En son ölüm 55. ayda görülmüş olup; 5 yıllık kümülatif sağkalım oranı %0, standart hatası %0’dır. Gruplara göre sağkalım oranları Log Rank test ile değerlendirildiğinde 5,5 yıllık sağ kalım oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, anlamlılığa yakın farklılık bulunmaktadır ($p:0.089$; $p>0.05$). Sekonder olguların sağ kalım oranlarının, primer olgulardan yüksek olması dikkat çekici düzeydedir.

Tablo 26. Primer-Sekonder’e Göre Sağkalım Analizi

	N	Ex	Yaşayan	Sağkalım Oranı	Ortalama Sağkalım Süresi	95% Confidence Interval
						Lower-Upper
Primer	70	58	12	%17,1	$19,12 \pm 2,09$	15,032-23,219
Sekonder	11	8	3	%27,3	$30,14 \pm 6,47$	17,449-42,824

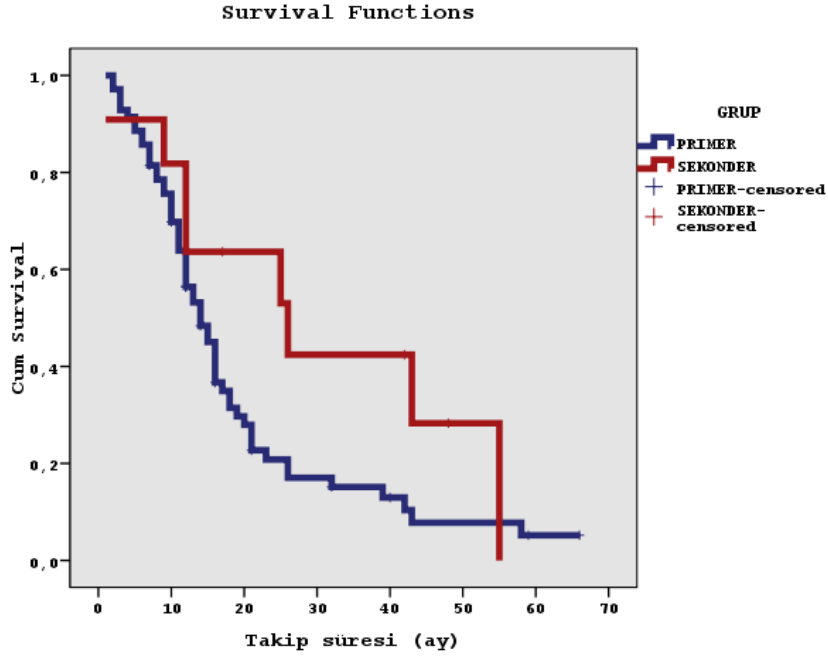
Kaplan-Meier Analizi

Primer ve Sekonder GBM’lerde Hastalıksız Sağkalım Analizi

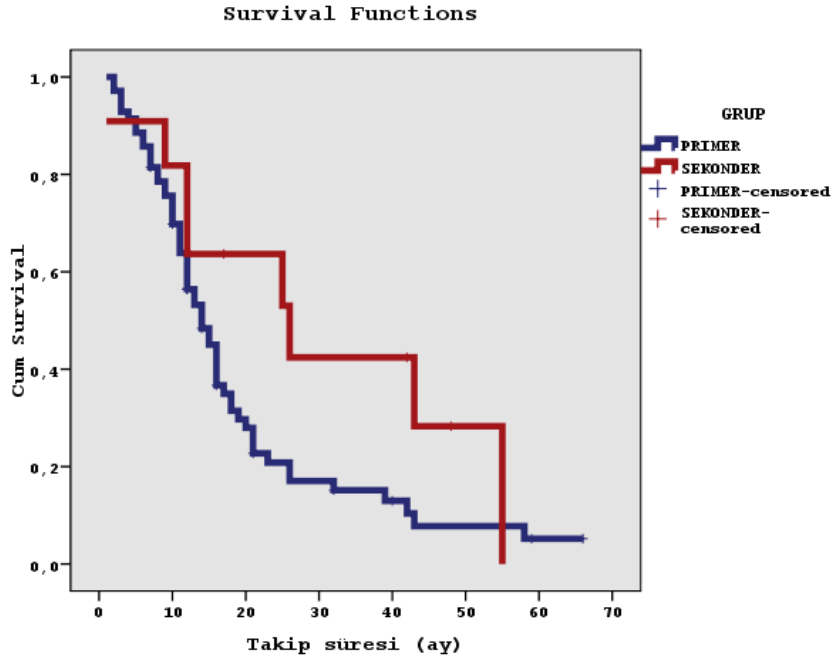
Primer grupta olan 70 olgudan; 12 olgunun yaşadığı (%17,1); 58 ölümün gözleendiği; ortalama hastalıksız sağkalım süresinin $16,45 \pm 2,14$ ay olduğu anlaşılmaktadır. En son ölüm 48. ayda görülmüş olup; 4 yıllık kümülatif hastalıksız sağkalım oranı %5,9, standart hatası %3,7’dir (Şekil 22).

Sekonder GBM grubunda olan 11 olgudan; 3 olgunun yaşadığı (%27,3); 8 ölümün gözleendiği; ortalama hastalıksız sağkalım süresinin $25,49 \pm 5,89$ ay olduğu anlaşılmaktadır. En son ölüm 48. ayda görülmüş olup; 4 yıllık kümülatif hastalıksız sağkalım oranı %14,1, standart hatası %12,7’dir.

Gruplara göre hastalıksız sağkalım oranları Log Rank test ile değeriendirildiğinde 5,5 yıllık hastalıksız sağ kalım oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p:0.107$; $p>0.05$)



Şekil 21. Primer ve Sekonder GBM gruplarına göre sağkalım analizi grafiği



Şekil 22. Primer ve Sekonder GBM gruplarına göre hastalıksız sağkalım analizi grafiği

Ki67 Proliferasyonuna Göre Sağkalım Analizi

Ki67 proliferasyon indeksi düşük olan 33 olgudan; 5 olgunun yaşadığı (%15,2); 28 ölümün gözleendiği; ortalama sağkalım süresinin $15,29 \pm 1,95$ ay olduğu anlaşılmaktadır. En son ölüm 38. ayda görülmüş olup; 3,5 yıllık kümülatif sağkalım oranı %5.8, standart hatası %5.2'dir.

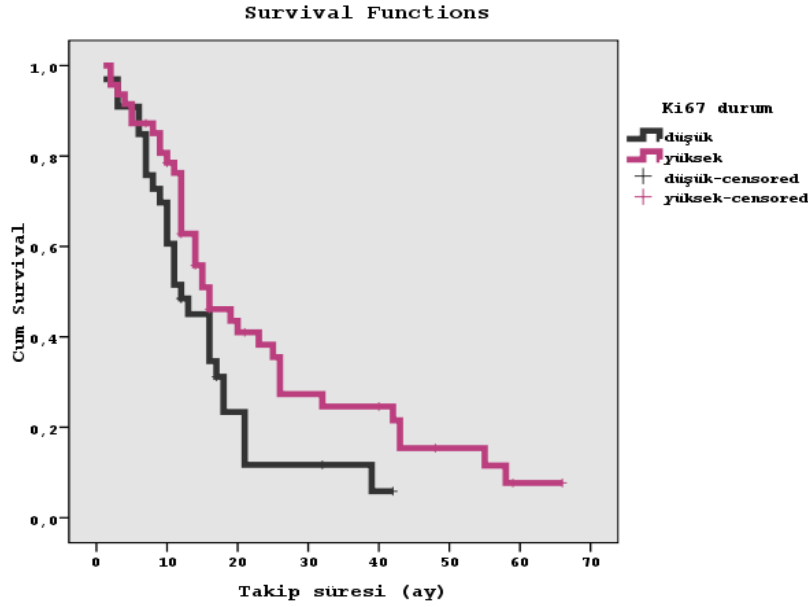
Ki 67 proliferasyon indeksi yüksek 47 olgudan; 10 olgunun yaşadığı (%21,3); 37 ölümün gözleendiği; ortalama sağkalım süresinin $24,24 \pm 2,97$ ay olduğu anlaşılmaktadır. En son ölüm 58. ayda görülmüş olup; 5 yıllık kümülatif sağkalım oranı %7.7, standart hatası %4.9'dur.

Ki 67 boyanma düzeylerine göre sağkalım oranları Log Rank test ile değerlendirildiğinde 5,5 yıllık sağ kalım oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p:0.039$; $p<0.05$). Ki 67 boyanma düzeyi yüksek olan olguların sağ kalım oranlarının, Ki 67 boyanma düzeyi düşük olanlardan anlamlı düzeyde yüksektir.

Tablo 27. Ki 67 Proliferasyon İndeksine Göre Sağkalım Analizi

	N	Ex	Yaşayan	Sağkalım Oranı	Ortalama Sağkalım Süresi	95% Confidence Interval
						Lower-Upper
Düşük	33	28	5	%15,2	$15,29 \pm 1,95$	11,477-19,108
Yüksek	47	37	10	%21,3	$24,24 \pm 2,97$	18,413-30,077

Kaplan-Meier Analizi



Şekil 23. Ki67 proliferasyon indeksine göre sağkalım analizi grafiği

P53 Boyanmasına Göre Sağkalım Analizi

P53 mutasyonu görülmeyen 55 olgudan; 10 olgunun yaşadığı (%18,2); 45 ölümün gözleendiği; ortalama sağkalım süresinin $19,23 \pm 2,23$ ay olduğu anlaşılmaktadır. En son ölüm 55. ayda görülmüş olup; 5 yıllık kümülatif sağkalım oranı %4.6, standart hatası %4.0'dür.

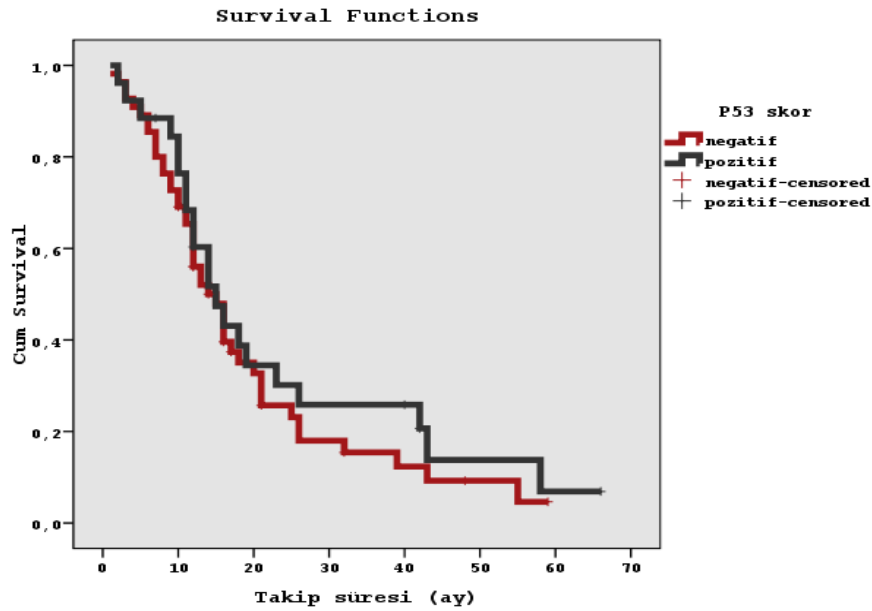
P53 mutasyonu görülen 26 olgudan; 5 olgunun yaşadığı (%19,2); 21 ölümün gözleendiği; ortalama sağkalım süresinin $23,33 \pm 3,94$ ay olduğu anlaşılmaktadır. En son ölüm 58. ayda görülmüş olup; 5 yıllık kümülatif sağkalım oranı %6.9, standart hatası %6.3'dür.

P53 mutasyonu varlığına göre sağkalım oranları Log Rank test ile değerlendirildiğinde; 5,5 yıllık sağ kalım oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p:0.434$; $p>0.05$).

Tablo 28. P 53 Boyanma Skoruna Göre Sağkalım Analizi

	N	Ex	Yaşaya n	Sağkalı m Oranı	Ortalama Sağkalım Süresi	95% Confidence Interval
						Lower-Upper
Negatif	55	45	10	%18,2	19,23±2,23	14,850-23,610
Pozitif	26	21	5	%19,2	23,33±3,94	15,607-31,053

Kaplan-Meier Analizi



Şekil 24. P53 mutasyonu varlığına göre sağ kalım analizi grafiği

IDH1 Boyanmasına Göre Sağkalım Analizi

IDH1 Boyanmasına Göre Genel Sağkalım Analizi

IDH mutasyonu görülmeyen 76 olgudan; 12 olgunun yaşadığı (%15,8); 64 ölümün gözleendiği; ortalama sağkalım süresinin $19,57 \pm 2,01$ ay olduğu anlaşılmaktadır. En son ölüm 58. ayda görülmüş olup; 5 yıllık kümülatif sağkalım oranı %4.3, standart hatası %2.9'dur.

IDH mutasyonu görülen 5 olgudan;3 olgunun yaşadığı (%60,0); 2 ölümün gözleendiği; ortalama sağkalım süresinin $34,67 \pm 7,12$ ay olduğu anlaşılmaktadır. En son ölüm 25. ayda görülmüş olup; 3,5 yıllık kümülatif sağkalım oranı %53.3, standart hatası %24.8'dir.

IDH mutasyonu varlığına göre sağkalım oranları Log Rank test ile değerlendirildiğinde 5,5 yıllık sağ kalım oranları arasında istatistiksel olarak sınırda anlamlı farklılık saptanmıştır ($p:0.05$; $p \leq 0.05$). Mutasyon görülen olguların sağ kalım oranları, mutasyon görülmeyenlerden yüksektir.

Tablo 29. IDH Mutasyonu Varlığına Göre Sağkalım Analizi

	N	Ex	Yaşayan	Sağkalım Oranı	Ortalama Sağkalım Süresi	95% Confidence Interval
						Lower-Upper
Mutasyon (-)	76	64	12	%15,8	$19,57 \pm 2,01$	15,638-23,504
Mutasyon (+)	5	2	3	%60,0	$34,67 \pm 7,12$	20,701-48,632

Kaplan-Meier Analizi

IDH1 Boyanmasına Göre Hastalıksız Sağkalım Analizi

IDH1 mutasyon görülmeyen 76 olgudan; 12 olgunun yaşadığı (%15,8); 64 ölümün gözleendiği; ortalama hastalıksız sağkalım süresinin $16,75 \pm 2,00$ ay olduğu anlaşılmaktadır. En son ölüm 48. ayda görülmüş olup; 4 yıllık kümülatif hastalıksız sağkalım oranı %4.8, standart hatası %3,1'dir.

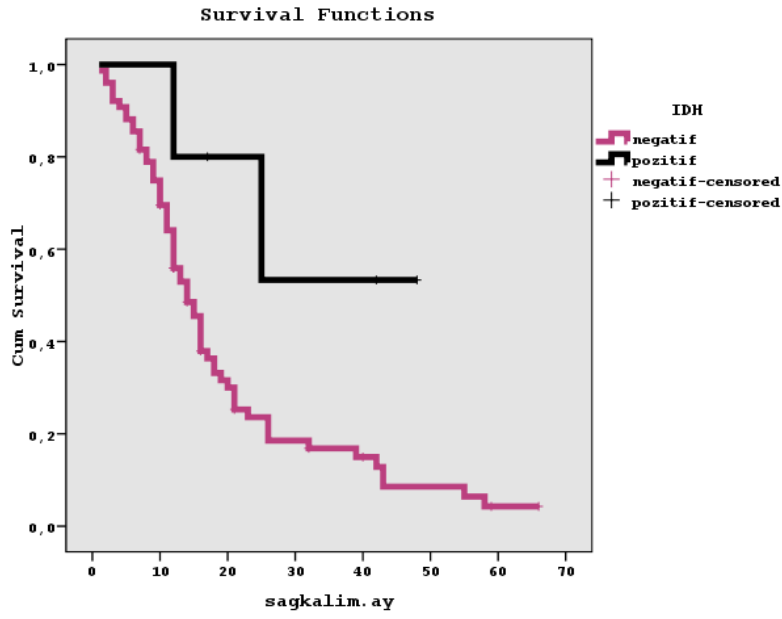
IDH1 mutasyonu görülen 5 olgudan; 3 olgunun yaşadığı (%60,0); 2 ölümün gözleendiği; ortalama hastalıksız sağkalım süresinin $32,13 \pm 8,44$ ay olduğu anlaşılmaktadır. En son ölüm 20. ayda görülmüş olup; 2 yıllık kümülatif hastalıksız sağkalım oranı %53.3, standart hatası %24.8'dir.

IDH1 mutasyonu varlığına göre hastalıksız sağkalım oranları Log Rank test ile değerlendirildiğinde; 5,5 yıllık sağ kalım oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, anlamlılığa yakın farklılık saptanmıştır ($p:0.055$; $p>0.05$). Mutasyon görülen olgularda hastalıksız sağ kalım oranlarının, mutasyon görülmeyenlerden yüksek olması dikkat çekici düzeydedir.

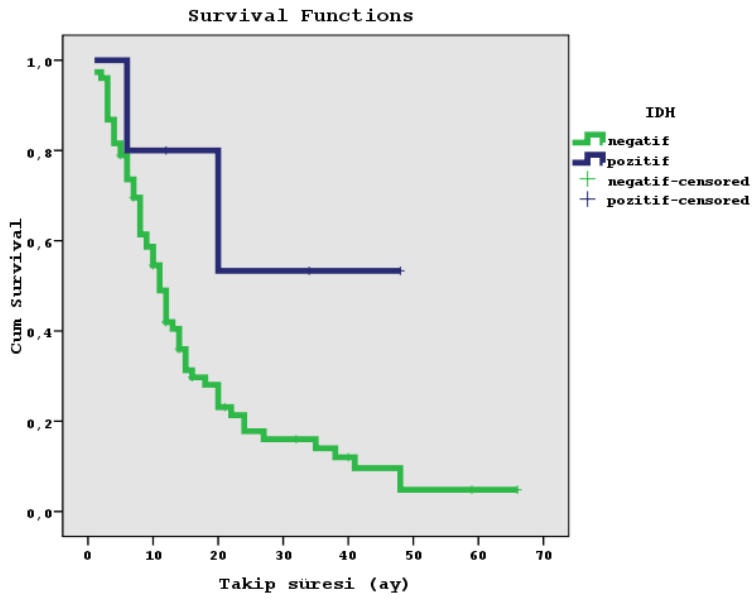
Tablo 30 : IDH1 Mutasyonu Varlığına Göre Hastalıksız Sağkalım Analizi

	N	Ex	Yaşayan	Sağkalım Oranı	Ortalama Sağkalım Süresi	95% Confidence Interval
						Lower-Upper
Mutasyon (-)	76	64	12	%15,8	$16,75 \pm 2,00$	12,825-20,673
Mutasyon (+)	5	2	3	%60,0	$32,13 \pm 8,44$	15,581-48,685

Kaplan-Meier Analizi



Şekil 25. IDH1 mutasyonu varlığına göre sağkalım analizi grafiği



Şekil 26. IDH1 mutasyonu varlığına göre hastalıksız sağkalım analizi grafiği

ATRX Boyanmasına Göre Sağkalım Analizi

ATRX Boyanmasına Göre Genel Sağkalım Analizi

ATRX mutasyonu görülmeyen 54 olgudan; 11 olgunun yaşadığı (%20,4); 43 ölümün gözleendiği; ortalama sağkalım süresinin $22,95 \pm 2,56$ ay olduğu anlaşılmaktadır. En son ölüm 58. ayda görülmüş olup; 5 yıllık kümülatif sağkalım oranı %4,4, standart hatası %4,0'dür.

ATRX mutasyonu görülen 27 olgudan; 4 olgunun yaşadığı (%14,8); 23 ölümün gözleendiği; ortalama sağkalım süresinin $16,03 \pm 10,24$ ay olduğu anlaşılmaktadır. En son ölüm 43. ayda görülmüş olup; 3,5 yıllık kümülatif sağkalım oranı %6,5, standart hatası %5,7'dir.

ATRX mutasyonu varlığına göre sağkalım oranları Log Rank test ile değerlendirildiğinde 5,5 yıllık sağ kalım oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, anlamlılığa yakın farklılık bulunmaktadır ($p:0.077$; $p>0.05$). Mutasyon görülmeyen olguların sağ kalım oranlarının, mutasyon görülenlerden yüksek olması dikkat çekici düzeydedir.

Tablo 31. ATRX Mutasyonu Varlığına Göre Sağkalım Analizi

	N	Ex	Yaşayan	Sağkalım Oranı	Ortalama Sağkalım Süresi	95% Confidence Interval
						Lower-Upper
Mutasyon (-)	54	43	11	%20,4	$22,95 \pm 2,56$	17,883-28,027
Mutasyon (+)	27	23	4	%14,8	$16,03 \pm 10,24$	10,245-21,812

Kaplan-Meier Analizi

ATRX Boyanmasına Göre Hastalıksız Sağkalım Analizi

ATRX mutasyonu görülmeyen 54 olgudan; 11 olgunun yaşadığı (%20,4); 43 ölümün gözlendiği; ortalama hastalıksız sağkalım süresinin $20,21 \pm 2,64$ ay olduğu anlaşılmaktadır. En son ölüm 48. ayda görülmüş olup; 4 yıllık kümülatif hastalıksız sağkalım oranı %6,8, standart hatası %4,4'dür.

ATRX mutasyonu görülen 27 olgudan; 4 olgunun yaşadığı (%14,8); 23 ölümün gözlendiği; ortalama hastalıksız sağkalım süresinin $13,53 \pm 3,15$ ay olduğu anlaşılmaktadır. En son ölüm 20. ayda görülmüş olup; 1,5 yıllık kümülatif hastalıksız sağkalım oranı %9,3, standart hatası %6,1'dir.

ATRX mutasyonu varlığına göre hastalıksız sağkalım oranları Log Rank test ile değerlendirildiğinde; 5,5 yıllık hastalıksız sağ kalım oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, anlamlılığa yakın farklılık bulunmaktadır ($p:0.061$; $p>0.05$). Mutasyon görülmeyen olguların hastalıksız sağ kalım oranlarının, mutasyon görülenlerden yüksek olması dikkat çekici düzeydedir.

Tablo 32. ATRX Mutasyonu Varlığına Göre Hastalıksız Sağkalım Analizi

	N	Ex	Yaşayan	Sağkalım Oranı	Ortalama Sağkalım Süresi	95% Confidence Interval
						Lower-Upper
Mutasyon (-)	54	43	11	%20,4	$20,21 \pm 2,64$	15,040-25,384
Mutasyon (+)	27	23	4	%14,8	$13,53 \pm 3,15$	7,365-19,705

Kaplan-Meier Analizi

ATRX Boyanmasına Göre Primer ve Sekonder GBM'lerde Sağkalım Analizi

Primer grupta olan 70 olgudan; 45 olguda mutasyon görülmediği (%64,3); 25 olguda ise mutasyon gözleendiği; ortalama sağkalım süresinin $36,29 \pm 4,20$ ay olduğu anlaşılmaktadır. En son mutasyon varlığı 59. ayda görülmüş olup; 5 yıllık kümülatif sağkalım oranı %19.1, standart hatası %15.0'dir.

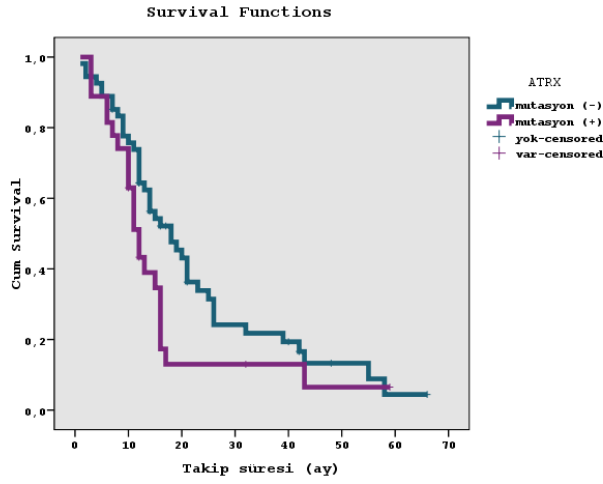
Sekonder grupta olan 11 olgudan; 9 olguda mutasyon görülmediği (%81,8); 2 olguda ise mutasyon gözleendiği; ortalama sağkalım süresinin $45,44 \pm 5,96$ ay olduğu anlaşılmaktadır. En son mutasyon varlığı 12. ayda görülmüş olup; 1 yıllık kümülatif sağkalım oranı %77.8, standart hatası %13.9'dur.

Gruplara göre sağkalım oranları Log Rank test ile değerlendirildiğinde; 5,5 yıllık sağ kalım oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p:0.153$; $p>0.05$). Sekonder olguların sağ kalım oranlarının, Primer olgulardan yüksek olması dikkat çekici düzeydedir.

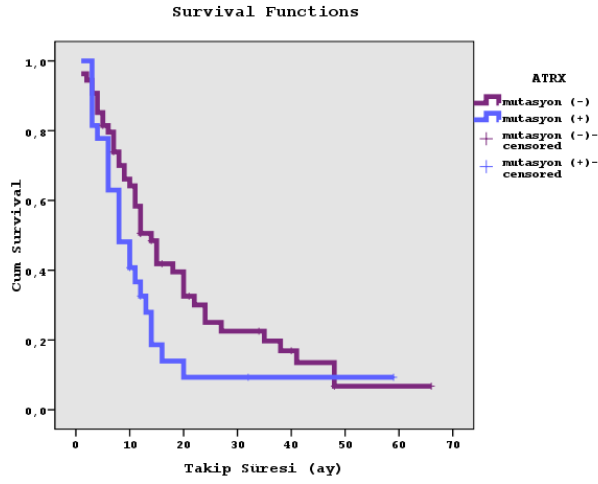
Tablo 33. ATRX Mutasyon Varlığına Göre Grupların Sağkalım Analizi

	N	ATRX (+)	ATRX (-)	Sağkalım Oranı	Ortalama Sağkalım Süresi	95% Confidence Interval Lower-Upper
Primer	70	25	45	%64,3	$36,29 \pm 4,20$	28,065-44,518
Sekonder	11	2	9	%81,8	$45,44 \pm 5,96$	33,765-57,124

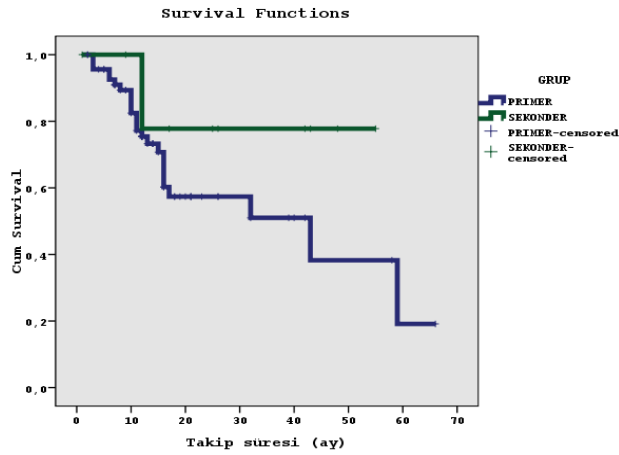
Kaplan-Meier Analizi



Şekil 27. ATRX mutasyonu varlığına göre sağkalım analizi grafiği



Şekil 28. ATRX mutasyonu varlığına göre hastalıksız sağkalım analizi grafiği



Şekil 29. ATRX mutasyonu varlığına göre primer ve sekonder GBM'lerde sağkalım analizi grafiği.

TARTIŞMA

SSS tümörleri tüm dünyada onüçüncü sıklıkta görülmektedir. Glioblastomlar ise en sık görülen primer beyin tümörleridir. Tüm intrakranial tümörlerin %12-15'ini, astrositik tümörlerin %60-70'ini meydana getirirler. Glioblastomda prognoz genellikle kötüdür. 65 yaş üstü hastaların yaklaşık %2'si, 45 yaş altı hastalarinsa yaklaşık %30'u GBM tanısından sonra 2 yıldan fazla yaşar. Olguların %50'sinden fazlası ise 3 aydan kısa sağkalıma sahiptir [2, 42, 43]. GBM'lerde sağkalım genel olarak kısa olsa da, zamanla benzer histomorfolojiye ve klinik özelliklere sahip olan olguların bile farklı prognostik özellikler göstermesi GBM'lerde moleküler çalışmalar üzerinde daha çok durulması gerektirdiğini düşündürmüştür. Son zamanlarda prognozu öngörmede tümörlerin moleküler profilinin histolojik profilden daha etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [5]. GBM'lerde histomorfolojik özelliklerinin yanı sıra, oldukça fazla miktarda genetik değişiklik belirlenmiştir ve bu değişikliklerin GBM' in gelişim şekillerine ve histolojik varyantlarına göre farklılık gösterebildiği, bunun sonucunda prognozu öngörme ve tedavi direncini belirlemede yol gösterici olabileceği düşünülmüştür. Bu çalışmada amaç, son yıllarda gliom patogenezinde önemli rol oynadığı düşünülen ve sağkalıma etkileri araştırılan ATRX, IDH-1 ve p 53 mutasyonunun, GBM ve histolojik varyantlarının patogenezindeki rolünü ve bu tümörlerdeki yaygınlığını belirlemek, Ki67 proliferasyonu ile korelasyonunu değerlendirerek, klasik glioblastom ve histolojik varyantlarda prognozla ilişkisini saptamaktır.

Bu çalışmada değerlendirmeye alınan 82 GBM olgusu gelişim şekillerine göre primer ve sekonder GBM olarak da değerlendirilmiş, buna göre 71 olgunun primer, 11 olgunun ise sekonder GBM olduğu saptanmıştır. Histolojik varyantlarına göre 49 olgu konvansiyonel GBM, 14 olgu KGBM, 13 olgu OGBM ve 6 olgu DGBM'dir. Morfolojik, moleküler, prognostik ve klinik sonuçlar açısından farklı özelliklere sahip olduğu bilinen bu varyantlarda immünohistokimyasal olarak Ki67, P53, IDH1 ve ATRX boyalarıyla değerlendirme yapılmış, ortaya çıkan sonuçların prognostik parametrelerle ilişkisi değerlendirilmiştir. Çalışmamız, GBM varyantları ve primer/sekonder

GBM'lerde bu özellikler açısından değerlendirme yapan literatürdeki nadir çalışmalardan biridir.

De novo gelişen primer GBM'ler ve düşük dereceli gliomlardan gelişen sekonder GBM'ler klinik ve moleküler özellikler açısından farklılıklar göstermektedir. Çalışmamızda sekonder GBM grubunun yaş ortalaması 43,70 iken primer grubun yaş ortalaması 56,04 olarak bulunmuş ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p<0,05$, $p=0,008$). Sekonder GBM grubunu oluşturan olguların daha genç yaşta oldukları dikkat çekicidir ve bu bulgu literatürle uyumlu olarak değerlendirilmiştir [6, 19].

GBM'lerde proliferatif aktivite ve mitoz belirgindir. Proliferatif aktiviteyi göstermekte kullanılan temel antikor Ki67' dir. Ki67 proliferasyon indeksi olgudan olguya farklılık göstermektedir. GBM'lerde literatürde belirtilen ortalama değer %15-20'dir [70]. Çalışmamızda bu değer %32,14 olarak bulunmuştur. Literatürdeki çalışmalar genel olarak konvansiyonel GBM'lerle yapılmış, olgu dağılımındaki KGBM oranı genellikle belirtilmemiş, bazı çalışmalara KGBM'ler dahil edilmemiştir [74, 133-136]. Bilindiği gibi KGBM'ler yüksek proliferatif aktiviteye sahip tümörlerdir [2] ve bizim çalışmamızdaki olguların %14'ünü bu grup oluşturmaktadır. Çalışmamızda KGBM olgularında ortalama Ki67 proliferasyon indeksi ortalama $\pm$ SD %61,15 $\pm$ 16,20 olarak bulunmuştur. Literatüre göre Ki67 ortalama değerini yüksek bulmamızı, çalışmamızdaki KGBM olgularının oranına bağlamaktayız. Literatürde bu oranı yüksek bulan(%31,6) bir diğer çalışma Wakimoto ve arkadaşlarının çalışmasıdır [137]. Wakimoto ve arkadaşları bu oranın yüksek bulunmasını kullandıkları klonun (MIB-1 MoAb) farklı olmasına bağlanmışlardır. Ancak görülmektedir ki, geçmiş çalışmaların büyük kısmında kullanılan Ki67 klonu MIB-1'dir. GBM'in histolojik varyantları arasında Ki67 proliferasyon indeksi açısından farklı olduğu bilinen grup KGBM olmakla birlikte, oldukça fazla mitoz ve bizar hücrelerin görüldüğü DGBM grubunda ise ortalamanın konvansiyonel GBM ile benzer olduğu düşünülmektedir [10, 38]. Ancak literatürde bizim çalışmamıza dahil olan varyantlar arasında proliferasyon indeksi farkını değerlendiren bir çalışma mevcut değildir. Literatürle benzer olarak KGBM grubumuzda Ki67 yüzdesinin diğer varyantlara oranla yüksek

olduğu saptanmıştır ve sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. DGBM grubunda ise bu oranın konvansiyonel GBM'lere kıyasla yüksek olması istatistiksel olarak anlamlıdır. Ayrıca Ki67 açısından yaptığımız skrolama sonucunda, konvansiyonel GBM grubundaki olguların 1+ skorunda, KGBM grubundaki olguların ise 3+ skorunda yoğunlaştığı dikkati çekmiş ve sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Konvansiyonel GBM'lerin diğer gruplara kıyasla daha düşük proliferatif aktiviteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

GBM'ler ile Ki67'nin sağkalımla ilişki net olarak ortaya konamamıştır. Yüksek Ki67 proliferasyonunun kötü sağkalımla ilişkili olduğunu gösteren yayınların yanısıra [131, 134, 138, 139], sağkalımla ilişkinin bulunmadığı sonucuna varan yayınlar da [74] mevcuttur. Tüm bu yayınlardaki Ki67 eşik değerleri farklıdır. Çalışmamızda eşik değer %25 olarak alınmıştır. Bizim sonuçlarımız literatürün aksine, yüksek proliferatif aktiviteye sahip GBM'lerin düşük olan gruba oranla sağkalımının daha iyi olduğunu göstermektedir (24,24±2,97 ay/15,29±195 ay) ve sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p:0.039; p<0.05). Literatürde GBM'lerde yüksek proliferatif aktivitenin iyi prognozla ilişkili olduğunu gösterir veri bulunmamaktadır. Ancak bilindiği üzere GBM tedavisinde de kullanılan radyoterapi tedavisinin yüksek proliferasyon gösteren kanser hücrelerine etkisi daha yüksek orandadır. Bir başka deyişle yüksek proliferatif indekse sahip kanser hücreleri daha radyosensitiftir [140-142]. Özellikle baş-boyun skuamoz hücreli karsinomlarında ve prostat karsinomunda yüksek proliferatif aktiviteye sahip tümörlerin RT'ye daha fazla yanıt verdiği ve bu tümörlerde lokal kontrolün ve nüksün daha az oranda görüldüğünü saptayan yayınlar mevcuttur [143-145]. GBM tedavisinde kullanılan, alkilliyici bir ajan olan temozolomid tümör hücrelerini apoptozise uğramadan önce hücre siklüsünün G2/M geçiş fazında durdurur ve bu nedenle aktif bölünme durumundaki hücrelere etkinliğinin daha yüksek olduğu bilinmektedir[146-148]. Bu sonuçlar doğrultusunda tamamı RT ve temozolomid tedavisi almış olan bizim popülasyonumuza ait yüksek proliferasyona sahip GBM hastalarının tedaviye yanıtlarının iyi olduğu

ve bu nedenle sağkalımlarının da düşük proliferasyona sahip gruba kıyasla daha iyi olduğu sonucuna varmaktayız.

Hücre siklüsünde ve DNA onarımında önemli görev yapan, hücre döngüsünü düzenleyen bir tümör süpresör gen olan TP53 geninin mutasyonu birçok neoplazmda olduğu gibi GBM'lerde de sıktır. GBM patogenezinde önemli rol oynayan bu mutasyona özellikle düşük dereceli gliomlardan gelişen sekonder GBM'lerde daha sık rastlandığı bilinmektedir. Primer GBM'lerde ortalama %17-35 oranında, sekonder GBM'lerde ise %60-88 oranında saptanmıştır [6]. Bizim serimizde İHK ile yapılan analiz sonucu tüm olguların toplam %32'sinde, primer GBM'lerin %32,4'ünde, sekonder GBM'lerin ise %36,4'ünde %10'un üstünde immün ekspresyon tesbit edilmiştir. Bu mutasyon belirteci açısından primer ve sekonder GBM grupları arasında anlamlı istatistiksel fark bulunmamıştır. Bu çalışmada sekonder GBM'lerin sayısı oldukça azdır ve P53 mutasyonuna sadece İHK yöntemi ile bakılmış, moleküler genetik yöntemler kullanılmamıştır. P53 ekspresyonu Ki67 proliferasyon indeksiyle karşılaştırıldığında %10'un üzerinde P53 ekspresyonu görülen olguların dikkat çekici oranda yüksek Ki67 proliferasyon indeksine sahip oldukları saptanmış ve ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu sonuç literatürle uyumlu olmakla birlikte, P53 mutasyonunun tümör patogenezindeki rolü ve hücre siklüsü üzerindeki etkileriyle de bağdaşmaktadır. Bilinmektedir ki; bir tümör süpressör gen olan P53'te meydana gelen mutasyonların sonucunda, hücre siklüs inhibisyonundan kurtulmakta ve anormal proliferasyona gitmektedir. Bunun sonucunda P53 mutasyonu görülen tümörlerin hızlı proliferatif aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. Bu durum beyin tümörleri için de geçerlidir [149, 150].

Çalışmamızın sonuçları P53 mutasyonunun sağkalımla ilişkisiz olduğu yönündedir. Literatürde P53 mutasyonunun prognozundaki rolü ile ilgili veriler çelişkilidir. Çalışmaların bir kısmında GBM ile P53 mutasyonu arasında prognostik korelasyon saptanmazken [109, 110] yapılan geniş tabanlı tek değişkenli çalışmalardan birinde P53 mutasyonu uzun sağkalımla ilişkili olarak bulunmuştur. Ancak yaş ilişkili çok değişkenli çalışmada sonuçlar anlamlı bulunmamıştır [19].

Sitozolik NADP +/- bağımlı izositrat dehidrogenaz enzimini kodlayan gen olan IDH1 mutasyonunun diffüz gliomlardaki varlığı çok sayıda çalışma ile tesbit edilmiştir [112, 117, 119]. Bu çalışmalarda IDH1 mutasyonunun sıklıkla düşük dereceli gliomlarda ve bunlardan gelişen sekonder GBM'lerde primer GBM'lere ve diğer SSS tümörlerine oranla daha sık rastlandığı sonucunu ortaya koymuştur. Bu doğrultuda IDH1 mutasyonunun glial tümör patogenezinin erken dönemlerinde rol oynadığı görüşünü ortaya çıkarmıştır. Çalışmamızda IDH1 ekspresyonu gösteren 5 olgunun tamamının sekonder GBM grubunda olması, literatürdeki bilgiler ile örtüşmekte, IDH1'in düşük dereceli glial tümörlerden gelişen GBM'lerin patogenezinde etkin rol oynadığı görüşünü desteklemekte, de-novo gelişim gösteren GBM'lerin patogenezinde rol oynamadığını düşündürmektedir.

Labussiere ve arkadaşlarının 2010 yılında yapmış oldukları literatür analizinde, literatürde incelenen toplam 1392 adet primer GBM'in 80' inde (%6), 123 adet sekonder GBM'in ise 94'ünde (%76) IDH1 mutasyonu saptandığı görülmüştür [151]. Bu araştırmanın referans aldığı yayınlara bakıldığında GBM'lerin dahil olduğu 9 yayının tamamında IDH1 mutasyonunun çeşitli sekanslama yöntemleriyle değerlendirildiği görülmüştür [17, 112, 114, 115, 117, 152, 153]. Takano ve arkadaşlarının IDH1'de İHK ile sekanslama yöntemini karşılaştıran çalışmalarında immünhistokimyasal yöntemin duyarlılığı %94, özgüllüğü ise %100 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada duyarlılığın düşük olması, İHK'sal analizde saptanabilen tek mutasyonun IDH1-R132H olmasına bağlanmıştır. Ancak IDH1' in bilinen pek çok farklı mutasyonu da mevcuttur (IDH1-R132C, IDH1-R132L, IDH1-R132S, IDH1-R132G, IDH2-R172K, IDH2-R172M, ve IDH2-R172G) [120]. Her ne kadar IDH1, immünhistokimyasal olarak güvenilir, sensitif ve spesifik bir belirteç olarak biliniyor olsa da, IDH1-R132H dışındaki IDH1 mutasyonlarını saptayamıyor olması bu yöntemin duyarlılığını düşürmektedir. Bu çalışmada sekonder GBM grubunun %45,5' inde IDH1 ekspresyonu saptanmış, primer GBM grubunda ise boyanma görülmemiştir. Bu sonuçlar literatür ortalamasının altında olarak değerlendirilmiştir [151]. Bu uyumsuzluğu olgu

sayısının azlığına ve sadece immünohistokimyasal yöntem kullanmış olmamıza bağlamaktayız.

IDH1 mutasyonu, gliomlarda prognostik açıdan önem taşımaktadırlar. Bu mutasyona sahip anaplastik astrositomlarda ve GBM' de genel sağkalımın belirgin olarak yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu mutasyon, özellikle genç hastalarda uzun süreli sağkalımı gösteren bağımsız bir prognostik faktördür [121]. Olgu serimizde IDH1 immün ekspresyonu saptanan olguların sağkalımı Log Rank test ile değerlendirildiğinde; 5,5 yıllık sağ kalım oranları arasında istatistiksel olarak sınırda anlamlı farklılık saptanmıştır ($p:0.05$; $p\leq 0.05$). IDH1 immünekspresyonu saptanan olguların saptanmayanlara oranla daha iyi sağkalıma sahip olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu literatürle uyumludur. Literatürde aynı histolojik özelliğe sahip IDH1 mutant gliomların diğerlerine oranla daha iyi prognoz gösterdiği hatta bu mutasyonu taşıyan GBM'lerin mutasyonu olmayan anaplastik astrositomlara kıyasla daha iyi prognoza sahip olduğu bilinmektedir [122] [115]. Bu bilgiler ışığında IDH1 mutasyonu taşıyan sekonder GBM'lerin, taşımayanlara oranla daha iyi prognoza sahip olabileceği ve IDH1 mutasyon analizinin sekonder GBM hastalarının klinik takiplerinde yol gösterici olabileceği akla gelmektedir, bu varsayımı doğrulamak adına sekonder GBM'lerde geniş vaka serisine sahip çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

ATRX, perisentrik heterokromatinde, telomerdeki H3.3 histon varyantı ve DAXX ile bir kompleks oluşturup genom stabilizasyonunu sağlayan önemli bir gendir. Bu birleşme gerçekleşmediğinde genom stabilizasyonunu yitirir ve DNA metilasyonu bozuklukları, mitozda anormal kromozom kümelenmesi, mayozda kromozom ayrışması ve telomer disfonksiyonu gibi pek çok anomali meydana gelir [124, 125]. Bu bozukluk sonucunda neoplastik süreç tetiklenmektedir. Dolayısıyla ATRX mutasyonu ve ekspresyon kaybı varlığı çeşitli tümörlerde gösterilmiştir. Bunlar pankreatik nöroendokrin tümör, nöroblastom, myelodisplastik sendrom ve SSS tümörleridir [126-129].

ATRX mutasyonu glial tümörlerde de saptanmış, ATRX'in astrositik tümörlerde, mikst glial ve pür oligodendrogial tümörlere kıyasla daha yaygın

olduğu gösterilmiştir. Bunun sonucunda ATRX'in astrositik diferansiasyonu gösteren bir belirteç olduğu görüşü doğmuştur [26]. Son yıllarda yapılan araştırmalar astrositik tümörlerde ATRX mutasyonunun ve ekspresyon kaybının kuvvetli ilişkili olduğu ve IDH1 mutasyonu ile birlikte iyi prognozla ilişkili olduğunu göstermiştir [23, 130, 154].

82 vakalık GBM serimizin %34,1'inde, primer GBM'lerin %36,6'sında, sekonder GBM'lerin ise %18,2 sinde ATRX ekspresyon kaybı saptanmıştır. Literatürde çalışmalar genellikle düşük dereceli gliomlarda yapılmış, az sayıda çalışmaya GBM'ler dahil edilmiştir. Heaphy ve ark. 'nın 112 GBM'in dahil edildiği çalışmalarında erişkin GBM'lerde %7 oranında, Jiao Y. ve ark. 108 GBM'in dahil edildiği çalışmalarında primer GBM'lerde %4, sekonder GBM'lerde %8, Xiao-yang Liu ve ark., 112 GBM içeren çalışmalarında erişkin GBM'lerde %7,2, Jinquan Cai ve ark. 101 GBM ile yaptıkları araştırmalarında primer GBM'lerde %43, sekonder GBM'lerde %33 oranında ATRX mutasyonu ve ekspresyon kaybı saptamışlardır [22, 23, 25, 130].

Xiao-yang Liu. ve ark. çalışmalarında GBM'lerdeki ATRX mutasyonu açısından Kanseri Genom Atlası (The Cancer Genom Atlas (TCGA)) data verilerini kullanarak bir değerlendirme yapmışlardır (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>). Bu veriler doğrultusunda, azalmış ATRX mRNA ekspresyonu gösteren GBM olgularının pronöral grupta yığılma gösterdiği belirlenmiştir. Bu datada analiz edilen 484 GBM'in 106'sı pronöral GBM'dir. 106 pronöral GBM'in 39'u (% 36,7) düşük ATRX mRNA ekspresyonu gösterdiği saptanmıştır. Bu rakam bizim çalışmamızın verilerine oldukça yakındır. Bu sonuçlar çalışmamızın popülasyonunun pronöral GBM'lerden baskın olabileceğini düşündürmektedir.

Literatürdeki tüm bu çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde, bizim çalışmamızın sonuçlarına en yakın araştırma Jinquan Cai ve arkadaşlarına aittir. Diğer çalışmalarda özellikle primer GBM'lerde ATRX mutasyon sıklığı %4-7,2 aralığında saptanmıştır. Bu araştırmalardan sadece Xiao-yang Liu ve Jiao Y. nin çalışmasında İHK yöntemi ve sekanslama yöntemleri birlikte kullanılırken diğer çalışmalarda sadece sekanslama yöntemleri kullanılmıştır.

Jinquan Cai ve arkadaşları primer GBM'lerde ortaya çıkan bu farkın nedenini çalışmalarında ATRX mRNA ekspresyonunun tüm transkriptom sekanslama yöntemiyle değerlendirilirken diğer çalışmalarda Sanger sekanslama kullanılmasına bağlamışlardır. Çalışmamızda ATRX ekspresyon kaybı immünohistokimyasal yöntemle bakılmasına karşın, primer GBM'lerde %36,6 oranında tesbit edilmiş, geçmiş çalışmalarda düşük dereceli astrositik tümörlerde ve sekonder GBM'lerde yaygın olduğu düşünülen bu mutasyona primer GBM'lerde de sık rastlanabileceği ve de novo yolağtan gelişim gösteren bu tümörlerde de ATRX mutasyonunun patogeneizde rol oynayabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda GBM'in histolojik varyantları arasında ATRX mutasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Literatürde GBM'in histolojik varyantlarındaki ATRX mutasyonu ilgili bir çalışma bulunmamakla birlikte, ATRX'in astrositik diferansiasyonu gösteren bir belirteç olduğu, oligodendrogial ve mikst histolojiye sahip glial tümörlerde daha nadir görüldüğünü bildiren yayınlar mevcuttur [26, 155].

Çalışmamızda ATRX ekspresyon kaybı ile Ki67 proliferasyon indeksi durumu arasındaki ilişkiyi değerlendirdiğimizde; ATRX ekspresyon kaybı olan olguların Ki67 proliferasyon indekslerinin düşük olması, ekspresyon kaybı olmayanlara oranla istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Bilindiği üzere, ATRX hücrede genom stabilizasyonunda görev almakta ve tüm hücre siklusü boyunca kromatin yeniden modellemesinde rol almaktadır. Sonuçta ATRX aslında tüm hücre siklusü boyunca aktif rol almakta özellikle de M fazında kondanse kromatin ile yakın ilişkide bulunmaktadır [156, 157]. Bu veriler ışığında ATRX fonksiyon kaybında hücre siklusünün devamlılığının bozulacağı ve hücre proliferasyonunun baskılanacağı düşünülmektedir. Literatürde fare deneyiyle yapılan bir araştırmada fare myeloblastlarında ATRX geni bloke edilmiş ve sonuçta hücre siklusünün S fazının uzadığı ve hücrede replikatif defektlerin olduğu saptanmıştır [158]. ATRX geninin genom stabilizasyonu ve kromatin düzenlenmesindeki rolünün yanı sıra

hücre siklusünde de önemli rol oynadığı görülmektedir ve bu konuda daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç vardır.

Literatürde Ki67 ile ATRX ilişkisini değerlendiren Cai J. ve arkadaşları derece II-IV gliomları kapsayan araştırmalarında, Ki67 eşik değeri %10 olarak belirlendiğinde Ki67 ile ATRX arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptamamışlardır [25]. Bizim çalışmamızda ise olgu grubumuzu sadece GBM'ler oluşturmaktadır ve Ki67 eşik değeri %25 olarak alınmıştır. İki çalışma arasındaki sonuç farklılığını bu sebeplere bağlamaktayız.

ATRX mutasyonunun gliomlarda sağkalıma etkisine bakıldığında literatürdeki çalışmalar bu mutasyonun daha iyi sağkalımla ilişkili olduğunu göstermektedir [22, 23, 25, 26, 130, 155]. Ancak bu çalışmalar düşük dereceli gliomların ve anaplastik astrositomların ağırlıklı olarak ele alındığı çalışmalar olup, GBM'ler oran olarak bu çalışmalarda az yer tutmaktadır. Ayrıca sağkalım analizi yapılırken bu çalışmaların tamamında, GBM'ler diğer gruplardan ayrıştırılmadan sağkalım analizi yapılmıştır. Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre GBM'lerde ATRX mutasyonu iyi prognozla ilişkilendirilememiş, aksine istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilememekle birlikte mutasyon görülmeyen olguların sağkalım oranlarının, mutasyon görülenlerden yüksek olması dikkat çekici düzeyde bulunmuştur.

Düşük dereceli glial tümörlerde iyi prognostik gösterge olarak kabul edilen ve rutin uygulamaya giren ATRX mutasyonunun, GBM'lerin prognozunu değerlendirmede aynı rolü üstlenemeyeceği, de novo gelişim gösteren GBM'lerin patogenezinde ATRX mutasyonunun farklı bir rolü olduğu açıktır. İlerleyen zamanlarda bu mekanizmayı ortaya koyacak araştırmaların yapılmasının gerekliliği kaçınılmazdır.

SONUÇLAR

- Sekonder GBM'ler primer GBM'lere oranla daha genç hastalarda görülmektedir.
- KGBM'ler GBM'in diğer histolojik varyantlarına oranla daha yüksek Ki67 proliferasyon indeksine sahiptir.
- DGBM'ler konvansiyonel GBM'lere oranla daha yüksek Ki67 proliferasyon indeksine sahiptir.
- Konvansiyonel GBM'ler GBM'in diğer histolojik varyantlarına kıyasla daha düşük Ki67 proliferasyon indeksine sahiptirler.
- Bizim olgu serimizde yüksek Ki67 proliferasyon indeksi literatürün aksine daha iyi sağkalımla ilişkili bulunmuştur.
- P53 mutasyonu saptanan olgularda Ki67 proliferasyon indeksinin yüksek olduğu belirlenmiştir.
- ATRX ekspresyon kaybı saptanan olguların düşük Ki67 proliferasyon indeksiyle ilişkili olduğu saptanmıştır ve bu ATRX'in ayrıca hücre siklusuyla ilişkili önemli fonksiyonları olduğunu düşündürmektedir.
- P53 mutasyonu ve sağkalım arasında anlamlı ilişkisi saptanmamıştır.
- IDH1 ekspresyonu saptanan olguların tamamı sekonder GBM grubundadır ve bu grupta sağkalımın daha iyi olduğu saptanmıştır.
- De novo gelişim gösteren primer GBM'lerde de ATRX ekspresyon kaybı yaygın olarak saptanabilmektedir.
- Düşük dereceli gliomların ve derece III gliomların aksine GBM'lerde ATRX ekspresyon kaybı iyi prognozla ilişkilendirilememiştir.

KAYNAKLAR

1. Omuro, A. and L.M. DeAngelis, *Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review*. JAMA, 2013. **310**(17): p. 1842-50.
2. Louis, D.N., et al., *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*. 2007: International Agency for Research on Cancer.
3. Wen, P.Y. and S. Kesari, *Malignant gliomas in adults*. N Engl J Med, 2008. **359**(5): p. 492-507.
4. P, B. and C. H, *A classification of the tumors of the glioma group on histogenetic basis with a correlated study of prognosis*. Philadelphia: J.D. Lippincott, 1926.
5. Gravendeel, L.A., et al., *Intrinsic gene expression profiles of gliomas are a better predictor of survival than histology*. Cancer Res, 2009. **69**(23): p. 9065-72.
6. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *The definition of primary and secondary glioblastoma*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(4): p. 764-72.
7. Watanabe, K., et al., *Overexpression of the EGF receptor and P53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas*. Brain Pathol, 1996. **6**(3): p. 217-23; discussion 23-4.
8. Maher, E.A., et al., *Marked genomic differences characterize primary and secondary glioblastoma subtypes and identify two distinct molecular and clinical secondary glioblastoma entities*. Cancer Res, 2006. **66**(23): p. 11502-13.
9. Wang, Y., et al., *Glioblastoma with an oligodendroglioma component: distinct clinical behavior, genetic alterations, and outcome*. Neuro Oncol, 2012. **14**(4): p. 518-25.
10. Perry, A., et al., *Small cell astrocytoma: an aggressive variant that is clinicopathologically and genetically distinct from anaplastic oligodendroglioma*. Cancer, 2004. **101**(10): p. 2318-26.
11. Huang, M.C., et al., *A clinico-immunohistochemical study of giant cell glioblastoma*. Noshuyo Byori, 1996. **13**(1): p. 11-6.
12. Burger, P.C. and R.T. Vollmer, *Histologic factors of prognostic significance in the glioblastoma multiforme*. Cancer, 1980. **46**(5): p. 1179-86.
13. Margetts, J.C. and U.P. Kalyan-Raman, *Giant-celled glioblastoma of brain. A clinico-pathological and radiological study of ten cases (including immunohistochemistry and ultrastructure)*. Cancer, 1989. **63**(3): p. 524-31.
14. Shinojima, N., et al., *The influence of sex and the presence of giant cells on postoperative long-term survival in adult patients with supratentorial glioblastoma multiforme*. J Neurosurg, 2004. **101**(2): p. 219-26.
15. Peraud, A., et al., *Genetic profile of the giant cell glioblastoma*. Lab Invest, 1999. **79**(2): p. 123-9.
16. Burger, P.C., et al., *Small cell architecture--a histological equivalent of EGFR amplification in glioblastoma multiforme?* J Neuropathol Exp Neurol, 2001. **60**(11): p. 1099-104.
17. Parsons, D.W., et al., *An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme*. Science, 2008. **321**(5897): p. 1807-12.
18. Robbins, S.L., V. Kumar, and R.S. Cotran, *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 2010: Saunders/Elsevier.
19. Ohgaki, H., et al., *Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study*. Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 6892-9.
20. Louis, D.N., et al., *Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 immunohistochemistry in brain tumors: a comparative study*. Acta Neuropathol, 1991. **81**(6): p. 675-9.

21. Nobusawa, S., et al., *IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(19): p. 6002-7.
22. Liu, X.Y., et al., *Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations*. Acta Neuropathol, 2012. **124**(5): p. 615-25.
23. Jiao, Y., et al., *Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas*. Oncotarget, 2012. **3**(7): p. 709-22.
24. Clynes, D., D.R. Higgs, and R.J. Gibbons, *The chromatin remodeller ATRX: a repeat offender in human disease*. Trends Biochem Sci, 2013. **38**(9): p. 461-6.
25. Cai, J., 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. **5**(9): p. 2551-61.
26. Wiestler, B., 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. **126**(3): p. 443-51.
27. Snell, R.S., *Clinical Neuroanatomy*. 2010: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
28. Gray, H., P.L. Williams, and L.H. Bannister, *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Medicine and Surgery*. 1995: Churchill Livingstone.
29. Mills, S.E., *Histology for Pathologists*. 2007: Lippincott Williams & Wilkins.
30. Eroschenko, V.P., *Di Fiore's Atlas of Histology with Functional Correlations*. 2005: Lippincott Williams & Wilkins.
31. Kierszenbaum, A.L., *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*. 2007: Mosby Elsevier.
32. Virchow, R.L.K. and F. Chance, *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*. 1860: R. M. De Witt.
33. Kernohan, J.W., R.F. Mabon, and et al., *A simplified classification of the gliomas*. Proc Staff Meet Mayo Clin, 1949. **24**(3): p. 71-5.
34. Ringertz, N., *Grading of gliomas*. Acta Pathol Microbiol Scand, 1950. **27**(1): p. 51-64.
35. Daumas-Duport, C., et al., *Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method*. Cancer, 1988. **62**(10): p. 2152-65.
36. Kleihues, P., P.C. Burger, and B.W. Scheithauer, *The new WHO classification of brain tumours*. Brain Pathol, 1993. **3**(3): p. 255-68.
37. Kleihues, P. and L.H. Sobin, *World Health Organization classification of tumors*. Cancer, 2000. **88**(12): p. 2887.
38. Louis, D.N., et al., *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. Acta Neuropathol, 2007. **114**(2): p. 97-109.
39. Giannini, C., et al., *Cellular proliferation in pilocytic and diffuse astrocytomas*. J Neuropathol Exp Neurol, 1999. **58**(1): p. 46-53.
40. Hsu, D.W., et al., *Use of MIB-1 (Ki-67) immunoreactivity in differentiating grade II and grade III gliomas*. J Neuropathol Exp Neurol, 1997. **56**(8): p. 857-65.
41. Neder, L., et al., *MIB-1 labeling index in astrocytic tumors--a clinicopathologic study*. Clin Neuropathol, 2004. **23**(6): p. 262-70.
42. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer, 2014.
43. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas*. J Neuropathol Exp Neurol, 2005. **64**(6): p. 479-89.

44. Dohrmann, G.J., J.R. Farwell, and J.T. Flannery, *Glioblastoma multiforme in children*. J Neurosurg, 1976. **44**(4): p. 442-8.
45. Hayran, M., *Appropriate analysis and presentation of data is a must for good clinical practice*. Acta Neurochir Suppl, 2002. **83**: p. 121-5.
46. Ferlay, J.B., F., *GLOBOCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version IARC CancerBase, 2001. No. 5 [CD-ROM]*.(Version 1.1. Lyon: IARC Press; 2001.).
47. Schwartzbaum, J.A., et al., *Epidemiology and molecular pathology of glioma*. Nat Clin Pract Neurol, 2006. **2**(9): p. 494-503; quiz 1 p following 516.
48. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Epidemiology and etiology of gliomas*. Acta Neuropathol, 2005. **109**(1): p. 93-108.
49. Relling, M.V., et al., *High incidence of secondary brain tumours after radiotherapy and antimetabolites*. Lancet, 1999. **354**(9172): p. 34-9.
50. Edick, M.J., et al., *Lymphoid gene expression as a predictor of risk of secondary brain tumors*. Genes Chromosomes Cancer, 2005. **42**(2): p. 107-16.
51. Burger, P.C., et al., *Topographic anatomy and CT correlations in the untreated glioblastoma multiforme*. J Neurosurg, 1988. **68**(5): p. 698-704.
52. Pedersen, P.H., et al., *Migratory patterns of lac-z transfected human glioma cells in the rat brain*. Int J Cancer, 1995. **62**(6): p. 767-71.
53. Amberger, V.R., et al., *Spreading and migration of human glioma and rat C6 cells on central nervous system myelin in vitro is correlated with tumor malignancy and involves a metalloproteolytic activity*. Cancer Res, 1998. **58**(1): p. 149-58.
54. Choucair, A.K., et al., *Development of multiple lesions during radiation therapy and chemotherapy in patients with gliomas*. J Neurosurg, 1986. **65**(5): p. 654-8.
55. Smoll, N.R. and E.V. Villanueva, *The epidemiology of extraneural metastases from primary brain, spinal cord, and meningeal tumors*. Neurosurgery, 2010. **67**(5): p. E1470-1.
56. Bernstein, J.J. and C.A. Woodard, *Glioblastoma cells do not intravasate into blood vessels*. Neurosurgery, 1995. **36**(1): p. 124-32; discussion 132.
57. Pasquier, B., et al., *[The metastatic potential of primary central nervous tumours (author's transl)]*. Rev Neurol (Paris), 1979. **135**(3): p. 263-78.
58. Wick, W., U. Naumann, and M. Weller, *Transforming growth factor-beta: a molecular target for the future therapy of glioblastoma*. Curr Pharm Des, 2006. **12**(3): p. 341-9.
59. Koul, D., et al., *Targeting integrin-linked kinase inhibits Akt signaling pathways and decreases tumor progression of human glioblastoma*. Mol Cancer Ther, 2005. **4**(11): p. 1681-8.
60. Kaur, B., et al., *Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis*. Neuro Oncol, 2005. **7**(2): p. 134-53.
61. Knott, J.C., et al., *Stimulation of extracellular matrix components in the normal brain by invading glioma cells*. Int J Cancer, 1998. **75**(6): p. 864-72.
62. Gray, F., U. De Girolami, and J. Poirier, *Escourolle & Poirier Manual of Basic Neuropathology*. 2004: Butterworth Heinemann.
63. Miller, C.R. and A. Perry, *Glioblastoma*. Arch Pathol Lab Med, 2007. **131**(3): p. 397-406.
64. Perry, A. and D.J. Brat, *Practical Surgical Neuropathology: A Diagnostic Approach*. 2010: Churchill Livingstone/Elsevier.
65. Raza, S.M., et al., *Necrosis and glioblastoma: a friend or a foe? A review and a hypothesis*. Neurosurgery, 2002. **51**(1): p. 2-12; discussion 12-3.

66. Tohma, Y., et al., *Necrogenesis and Fas/APO-1 (CD95) expression in primary (de novo) and secondary glioblastomas*. J Neuropathol Exp Neurol, 1998. **57**(3): p. 239-45.
67. Zhong, H., et al., *Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases*. Cancer Res, 1999. **59**(22): p. 5830-5.
68. Brat, D.J., et al., *Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population*. Cancer Res, 2004. **64**(3): p. 920-7.
69. Brown, D.C. and K.C. Gatter, *Ki67 protein: the immaculate deception?* Histopathology, 2002. **40**(1): p. 2-11.
70. Burger, P.C., T. Shibata, and P. Kleihues, *The use of the monoclonal antibody Ki-67 in the identification of proliferating cells: application to surgical neuropathology*. Am J Surg Pathol, 1986. **10**(9): p. 611-7.
71. Deckert, M., G. Reifenberger, and W. Wechsler, *Determination of the proliferative potential of human brain tumors using the monoclonal antibody Ki-67*. J Cancer Res Clin Oncol, 1989. **115**(2): p. 179-88.
72. Jaros, E., et al., *Prognostic implications of P53 protein, epidermal growth factor receptor, and Ki-67 labelling in brain tumours*. Br J Cancer, 1992. **66**(2): p. 373-85.
73. Schroder, R., et al., *The relationship between Ki-67 labeling and mitotic index in gliomas and meningiomas: demonstration of the variability of the intermitotic cycle time*. Acta Neuropathol, 1991. **82**(5): p. 389-94.
74. Moskowitz, S.I., T. Jin, and R.A. Prayson, *Role of MIB1 in predicting survival in patients with glioblastomas*. J Neurooncol, 2006. **76**(2): p. 193-200.
75. Wren, D., G. Wolswijk, and M. Noble, *In vitro analysis of the origin and maintenance of O-2Adult progenitor cells*. J Cell Biol, 1992. **116**(1): p. 167-76.
76. Mayer-Proschel, M., et al., *Isolation of lineage-restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial stem cells*. Neuron, 1997. **19**(4): p. 773-85.
77. Lottaz, C., et al., *Transcriptional profiles of CD133+ and CD133- glioblastoma-derived cancer stem cell lines suggest different cells of origin*. Cancer Res, 2010. **70**(5): p. 2030-40.
78. Doetsch, F., et al., *Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain*. Cell, 1999. **97**(6): p. 703-16.
79. Levison, S.W. and J.E. Goldman, *Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain*. Neuron, 1993. **10**(2): p. 201-12.
80. Gupta, M., A. Djalilvand, and D.J. Brat, *Clarifying the diffuse gliomas: an update on the morphologic features and markers that discriminate oligodendroglioma from astrocytoma*. Am J Clin Pathol, 2005. **124**(5): p. 755-68.
81. Smith, J.S., et al., *Localization of common deletion regions on 1p and 19q in human gliomas and their association with histological subtype*. Oncogene, 1999. **18**(28): p. 4144-52.
82. von Deimling, A., et al., *Subsets of glioblastoma multiforme defined by molecular genetic analysis*. Brain Pathol, 1993. **3**(1): p. 19-26.
83. Appin, C.L. and D.J. Brat, *Molecular genetics of gliomas*. Cancer J, 2014. **20**(1): p. 66-72.
84. Lang, F.F., et al., *Pathways leading to glioblastoma multiforme: a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors*. J Neurosurg, 1994. **81**(3): p. 427-36.
85. Verhaak, R.G., et al., *Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1*. Cancer Cell, 2010. **17**(1): p. 98-110.

86. Scherer, H.J., *CEREBRAL ASTROCYTOMAS AND THEIR DERIVATIVES* Am J Cancer, 1940. **40**: p. 159-198.
87. Palma, L., et al., *Malignant monstrocellular brain tumours. A study of 42 surgically treated cases.* Acta Neurochir (Wien), 1989. **97**(1-2): p. 17-25.
88. Homma, T., et al., *Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma.* J Neuropathol Exp Neurol, 2006. **65**(9): p. 846-54.
89. Peraud, A., et al., *P53 mutations versus EGF receptor expression in giant cell glioblastomas.* J Neuropathol Exp Neurol, 1997. **56**(11): p. 1236-41.
90. Meyer-Puttlitz, B., et al., *Molecular genetic analysis of giant cell glioblastomas.* Am J Pathol, 1997. **151**(3): p. 853-7.
91. Kraus, J.A., et al., *Molecular genetic alterations in glioblastomas with oligodendroglial component.* Acta Neuropathol, 2001. **101**(4): p. 311-20.
92. Kouwenhoven, M.C., et al., *Molecular analysis of anaplastic oligodendroglial tumors in a prospective randomized study: A report from EORTC study 26951.* Neuro Oncol, 2009. **11**(6): p. 737-46.
93. Pinto, L.W., et al., *Glioblastomas: correlation between oligodendroglial components, genetic abnormalities, and prognosis.* Virchows Arch, 2008. **452**(5): p. 481-90.
94. Brat, D.J., et al., *Surgical neuropathology update: a review of changes introduced by the WHO classification of tumours of the central nervous system, 4th edition.* Arch Pathol Lab Med, 2008. **132**(6): p. 993-1007.
95. Hussain, S.P. and C.C. Harris, *P53 biological network: at the crossroads of the cellular-stress response pathway and molecular carcinogenesis.* J Nippon Med Sch, 2006. **73**(2): p. 54-64.
96. Liang, S.H. and M.F. Clarke, *Regulation of P53 localization.* Eur J Biochem, 2001. **268**(10): p. 2779-83.
97. Bogler, O., et al., *The P53 gene and its role in human brain tumors.* Glia, 1995. **15**(3): p. 308-27.
98. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, *P53 function and dysfunction.* Cell, 1992. **70**(4): p. 523-6.
99. Carr, A.M., *Cell cycle. Piecing together the P53 puzzle.* Science, 2000. **287**(5459): p. 1765-6.
100. Vogelstein, B., D. Lane, and A.J. Levine, *Surfing the P53 network.* Nature, 2000. **408**(6810): p. 307-10.
101. Vousden, K.H. and X. Lu, *Live or let die: the cell's response to P53.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 594-604.
102. Wesierska-Gadek, J. and G. Schmid, *The subcellular distribution of the P53 tumour suppressor, and organismal ageing.* Cell Mol Biol Lett, 2005. **10**(3): p. 439-53.
103. Sherr, C.J. and J.M. Roberts, *CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression.* Genes Dev, 1999. **13**(12): p. 1501-12.
104. Stott, F.J., 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. **17**(17): p. 5001-14.
105. Levav-Cohen, Y., S. Haupt, and Y. Haupt, *Mdm2 in growth signaling and cancer.* Growth Factors, 2005. **23**(3): p. 183-92.
106. Watanabe, K., et al., *Incidence and timing of P53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies.* Clin Cancer Res, 1997. **3**(4): p. 523-30.
107. Biernat, W., et al., *Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastomas.* J Neuropathol Exp Neurol, 1997. **56**(2): p. 180-5.

108. Reifenger, G., et al., *Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without P53 mutations*. Cancer Res, 1993. **53**(12): p. 2736-9.
109. Simmons, M.L., et al., *Analysis of complex relationships between age, P53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients*. Cancer Res, 2001. **61**(3): p. 1122-8.
110. Smith, J.S., et al., *PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(16): p. 1246-56.
111. Margittai, E. and G. Banhegyi, *Isocitrate dehydrogenase: A NADPH-generating enzyme in the lumen of the endoplasmic reticulum*. Arch Biochem Biophys, 2008. **471**(2): p. 184-90.
112. Balss, J., et al., *Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors*. Acta Neuropathol, 2008. **116**(6): p. 597-602.
113. Ichimura, K., et al., *IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas*. Neuro Oncol, 2009. **11**(4): p. 341-7.
114. Watanabe, T., et al., *IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas*. Am J Pathol, 2009. **174**(4): p. 1149-53.
115. Yan, H., et al., *IDH1 and IDH2 mutations in gliomas*. N Engl J Med, 2009. **360**(8): p. 765-73.
116. Kloosterhof, N.K., et al., *Isocitrate dehydrogenase-1 mutations: a fundamentally new understanding of diffuse glioma?* Lancet Oncol, 2011. **12**(1): p. 83-91.
117. Bleeker, F.E., et al., *IDH1 mutations at residue p.R132 (IDH1(R132)) occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors*. Hum Mutat, 2009. **30**(1): p. 7-11.
118. Kato, Y., et al., *A monoclonal antibody IMab-1 specifically recognizes IDH1R132H, the most common glioma-derived mutation*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **390**(3): p. 547-51.
119. Capper, D., et al., *Characterization of R132H mutation-specific IDH1 antibody binding in brain tumors*. Brain Pathol, 2010. **20**(1): p. 245-54.
120. Takano, S., et al., *Detection of IDH1 mutation in human gliomas: comparison of immunohistochemistry and sequencing*. Brain Tumor Pathol, 2011. **28**(2): p. 115-23.
121. Yan, W., 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): p. e30339.
122. Hartmann, C., 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. **120**(6): p. 707-18.
123. Haberler, C. and A. Wohrer, *Clinical Neuropathology practice news 2-2014: ATRX, a new candidate biomarker in gliomas*. Clin Neuropathol, 2014. **33**(2): p. 108-11.
124. Clynes, D. and R.J. Gibbons, *ATRX and the replication of structured DNA*. Curr Opin Genet Dev, 2013. **23**(3): p. 289-94.
125. Elbert, A. and N.G. Bérubé, *Chromatin Structure and Intellectual Disability Syndromes*. Developmental Disabilities - Molecules Involved, Diagnosis, and Clinical Care. 2013.
126. Jiao, Y., et al., *DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors*. Science, 2011. **331**(6021): p. 1199-203.

127. Weisbrod, A.B., et al., *Altered PTEN, ATRX, CHGA, CHGB, and TP53 expression are associated with aggressive VHL-associated pancreatic neuroendocrine tumors.* Horm Cancer, 2013. **4**(3): p. 165-75.
128. Cheung, N.K., et al., *Association of age at diagnosis and genetic mutations in patients with neuroblastoma.* JAMA, 2012. **307**(10): p. 1062-71.
129. Haas, P.S., 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. **144**(4): p. 538-45.
130. Heaphy, C.M., et al., *Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations.* Science, 2011. **333**(6041): p. 425.
131. Jin, Q., et al., *Gene expression profiling reveals Ki-67 associated proliferation signature in human glioblastoma.* Chin Med J (Engl), 2011. **124**(17): p. 2584-8.
132. Takami, H., et al., *Revisiting TP53 mutations and immunohistochemistry - a comparative study in 157 diffuse gliomas.* Brain Pathol, 2014.
133. Khalid, H., et al., *Immunohistochemical analysis of progesterone receptor and Ki-67 labeling index in astrocytic tumors.* Cancer, 1997. **80**(11): p. 2133-40.
134. Di, X., et al., *Proliferative potentials of glioma cells and vascular components determined with monoclonal antibody MIB-1.* J Exp Clin Cancer Res, 1997. **16**(4): p. 389-94.
135. Ralte, A.M., et al., *Clinicopathological features, MIB-1 labeling index and apoptotic index in recurrent astrocytic tumors.* Pathol Oncol Res, 2001. **7**(4): p. 267-78.
136. Torp, S.H., *Diagnostic and prognostic role of Ki67 immunostaining in human astrocytomas using four different antibodies.* Clin Neuropathol, 2002. **21**(6): p. 252-7.
137. Wakimoto, H., et al., *Prognostic significance of Ki-67 labeling indices obtained using MIB-1 monoclonal antibody in patients with supratentorial astrocytomas.* Cancer, 1996. **77**(2): p. 373-80.
138. Ellison, D.W., et al., *Prognostic indicators in a range of astrocytic tumours: an immunohistochemical study with Ki-67 and P53 antibodies.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1995. **59**(4): p. 413-9.
139. Johannessen, A.L. and S.H. Torp, *The clinical value of Ki-67/MIB-1 labeling index in human astrocytomas.* Pathol Oncol Res, 2006. **12**(3): p. 143-7.
140. Rodriguez, A., et al., *Recovery from potentially lethal damage and recruitment time of noncycling clonogenic cells in 9L confluent monolayers and spheroids.* Radiat Res, 1988. **114**(3): p. 515-27.
141. Mendonca, M.S., A. Rodriguez, and E.L. Alpen, *Quiescence in 9L cells and correlation with radiosensitivity and PLD repair.* Radiat Res, 1989. **117**(3): p. 433-47.
142. Masunaga, S., K. Ono, and M. Abe, *A method for the selective measurement of the radiosensitivity of quiescent cells in solid tumors--combination of immunofluorescence staining to BrdU and micronucleus assay.* Radiat Res, 1991. **125**(3): p. 243-7.
143. Okuno, Y., et al., *Prognostic values of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 for radiotherapy of oesophageal squamous cell carcinomas.* Br J Cancer, 1999. **80**(3-4): p. 387-95.
144. Cowen, D., et al., *Ki-67 staining is an independent correlate of biochemical failure in prostate cancer treated with radiotherapy.* Clin Cancer Res, 2002. **8**(5): p. 1148-54.
145. Couture, C., et al., *P53 and Ki-67 as markers of radioresistance in head and neck carcinoma.* Cancer, 2002. **94**(3): p. 713-22.
146. Zhang, M. and A. Chakravarti, *Novel radiation-enhancing agents in malignant gliomas.* Semin Radiat Oncol, 2006. **16**(1): p. 29-37.

147. D'Atri, S., et al., *Involvement of the mismatch repair system in temozolomide-induced apoptosis*. Mol Pharmacol, 1998. **54**(2): p. 334-41.
148. Hirose, Y., M.S. Berger, and R.O. Pieper, *Abrogation of the Chk1-mediated G(2) checkpoint pathway potentiates temozolomide-induced toxicity in a P53-independent manner in human glioblastoma cells*. Cancer Res, 2001. **61**(15): p. 5843-9.
149. Isola, J., et al., *Association of overexpression of tumor suppressor protein P53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node-negative breast cancer patients*. J Natl Cancer Inst, 1992. **84**(14): p. 1109-14.
150. Haapasalo, H., et al., *Aberrant P53 expression in astrocytic neoplasms of the brain: association with proliferation*. Am J Pathol, 1993. **142**(5): p. 1347-51.
151. Labussiere, M., et al., *IDH1 gene mutations: a new paradigm in glioma prognosis and therapy?* Oncologist, 2010. **15**(2): p. 196-9.
152. Sanson, M., et al., *Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas*. J Clin Oncol, 2009. **27**(25): p. 4150-4.
153. Kang, M.R., et al., *Mutational analysis of IDH1 codon 132 in glioblastomas and other common cancers*. Int J Cancer, 2009. **125**(2): p. 353-5.
154. Schwartzentruber, J., et al., *Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma*. Nature, 2012. **482**(7384): p. 226-31.
155. Kannan, K., et al., *Whole-exome sequencing identifies ATRX mutation as a key molecular determinant in lower-grade glioma*. Oncotarget, 2012. **3**(10): p. 1194-203.
156. Berube, N.G., C.A. Smeenk, and D.J. Picketts, *Cell cycle-dependent phosphorylation of the ATRX protein correlates with changes in nuclear matrix and chromatin association*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(4): p. 539-47.
157. Ishov, A.M., O.V. Vladimirova, and G.G. Maul, *Heterochromatin and ND10 are cell-cycle regulated and phosphorylation-dependent alternate nuclear sites of the transcription repressor Daxx and SWI/SNF protein ATRX*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 17): p. 3807-20.
158. Clynes, D., et al., *ATRX dysfunction induces replication defects in primary mouse cells*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e92915.