

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İstanbul Tıp Fakóltesi
Patoloji Anabilim Dalı



Grad 2 ve Grad 3 Astrositomlarda CDKN2A/B ve EGFR FISH İnceleme Bulguları ile Morfolojik Özelliklerin Prognozla İlişkisi

UZMANLIK TEZİ
Dr. Ahmet Yasir Yıldırım

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Gökçen Ünverengil

İSTANBUL
2022

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İstanbul Tıp Fakóltesi
Patoloji Anabilim Dalı

**Grad 2 ve Grad 3 Astrositomlarda CDKN2A/B ve
EGFR FISH İnceleme Bulguları ile Morfolojik
Özelliklerin Prognozla İlişkisi**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Ahmet Yasir YILDIRIM

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Gökçen ÜNVERENGİL

İSTANBUL
2022

Bu tez çalışması İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.
(Proje No: 38938)

TEŞEKKÜR

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'ndaki eğitim sürecimde ilgi, destek ve deneyimlerinden yararlandığım, başta Anabilim Dalı Başkanı Sn. Prof. Dr. Bilge BİLGİÇ'e ve danışman hocam Sn. Prof. Dr. Yasemin ÖZLÜK'e olmak üzere, bilgi ve tecrübelerini aktaran tüm hocalarım ve uzmanlarıma,

Tezimin ve eğitimimin her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, değerli hocam, tez danışmanım Sn. Doç. Dr. Gökçen ÜNVERENGİL'e,

Önerileriyle tezime katkıda bulunan Sn. Uz. Dr. Hüseyin KARATAY, Sn. Uz. Dr. Ecem KARATAY, Sn. Uz. Dr. Ali Yılmaz ALTAY, Sn. Uz. Dr. Mehmet GÜNDÜZ, Sn. Dr. Begüm YENİ ERDEM ve istatistik çalışmalarında değerli vaktini benim için ayıran Sn. Uz. Dr. Sidar BAĞBUDAR'a

Teknik çalışmalardaki yardımlarından ötürü Sn. Yasin GÜLSU, Sn. Cuma ERKMEN, Sn. Gönül BURUK, Sn. Jülide HOCAOĞLU, Sn. Derya ŞAHİN ve Sn. Ergin CANTÜRK'e

FİSH çalışmalarındaki desteklerinden ötürü Sn. Murat KUTLUDUR, Sn. Zeynep TALAS ve Sn. Melek ÇOBAN'a

Arşiv çalışmalarındaki katkılarından dolayı Sn. Balabey KALAÇA'ya

Beraber çalışmaktan her zaman keyif aldığım, giden ve geride kalan tüm asistan arkadaşlarıma,

Hayat yolculuğumda bana yoldaşlık eden değerli eşime, bugünlere gelmem için sayısız fedakarlıkta bulunan canım aileme ve yoluma ışık tutan tüm dostlarıma sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
KISALTMALAR	v
TABLO LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
RESİM LİSTESİ	ix
BÖLÜM I	1
I. ÖZET	1
II. ABSTRACT	3
BÖLÜM II.....	5
I. GİRİŞ	5
II. GENEL BİLGİLER.....	6
ASTROSİTOM, İDH MUTANT	6
A. Lokalizasyon	6
B. Klinik ve Radyolojik Özellikler	6
C. Epidemiyoloji	7
D. Etiyoloji	7
E. Patogenez	8
F. Genetik Özellikler	9
G. Histopatolojik Özellikler ve Derecelendirme.....	9
H. İmmünohistokimya.....	11
I. İzositrat Dehidrojenaz	11
J. ATRX	12
K. CDKN2A/B	13
L. EGFR	14
BÖLÜM III	15

GEREÇ VE YÖNTEM	15
I. Çalışma Olgularının Belirlenmesi.....	15
II. Doku Microarray Yöntemi	16
III. İmmunhistokimyasal Yöntem ve Değerlendirme	16
IV. Floresan İn Situ Hibridizasyon Yöntemi	17
IV.A. CDKN2A FİSH Değerlendirmesi	18
IV.B. EGFR FİSH Değerlendirmesi	18
V. Biyoistatistiksel Analiz.....	18
BÖLÜM IV	19
BULGULAR	19
I. Demografik, Klinik ve Histopatolojik Bulgular	19
II. Genel Sağkalım ve Hastalısız Sağkalım Özellikleri.....	20
III. FİSH İnceleme Bulguları	24
III.A. CDKN2A/B FİSH İnceleme Bulguları.....	24
III.B. EGFR FİSH İnceleme Bulguları.....	27
BÖLÜM V.....	28
TARTIŞMA	28
BÖLÜM VI	31
SONUÇLAR	31
BÖLÜM VII.....	32
KAYNAKLAR.....	32
ÖZGEÇMİŞ	46

KISALTMALAR

AKT: Protein kinaz B

AKT3: Protein kinaz B ailesine baęlı serin/treonin kinaz 3

ATP: Adenin trinükleotid fosfat

ATRX: X'e Baęlı Alfa Talasemi/Mental Retardasyon Sendromu

BBA: Büyük Büyütme Alanı

CDKN2A/B: Siklin Bağımlı Kinaz 2A/B

CpG: Sitozin-Fosfat-Guanin

D2HDGH: D-2-hidroksiglutarat dehidrojenaz

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

DAXX: Ölüm alanı asosiye protein

DGT: Diffüz Glial Tümör

DNA: Deoksiribonükleik asit

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

EGFR: Epitelyal Büyüme Faktörü Reseptörü

FLAIR: Fluid Attenuation Inversion Recovery

G-CİMP: Gliom, Sitozin-Fosfat-Guanin Adaları Metilasyon Fenotipi

GFAP: Glial fibriller asidik protein

GLUD2: Glutamat dehidrojenaz 2

HE: Hematoksilen-Eozin

FİSH: Floresan İn Situ Hibridizasyon

İDH-1: İzositrat Dehidrojenaz 1

İDH-2: İzositrat Dehidrojenaz 2

K-RAS: Kirsten fare sarkom virüsü

MMR: DNA yanlış eşleşme tamiri

MSS: Merkezi Sinir Sistemi

MVP: Mikrovasküler Proliferasyon

NADP: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

OLİG-2: Oligodendrosit transkripsiyon faktörü

PHLDB1: Plekstrin homologisi benzeri etki alanı üyesi B 1

RNA: Ribonükleik asit

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

SSC: Saline-sodyum sitrat

TERT: Telomeraz ters transkriptaz

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Hastaların demografik, klinik ve histopatolojik özellikleri	20
---	----



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Genel sağkalımın tümör gradı ile ilişkisi.....	21
Şekil 2: Hastalıksız sağkalımın tümör gradı ile ilişkisi	22
Şekil 3: Mitoz sayısı ile genel sağkalım arasındaki ilişki	23
Şekil 4: Mitoz sayısı ile hastalıksız sağkalım arasındaki ilişki.....	24
Şekil 5: %20 ve üzerinde heterozigot delesyon varlığının genel sağkalım ile ilişkisi.....	25
Şekil 6: %20 ve üzerinde heterozigot delesyon varlığının hastalıksız sağkalım ile ilişkisi	25



RESİM LİSTESİ

- Resim 1:** A. Grad 2 astrositom, tümör hücreleri kortekste diffüz infiltrasyon oluşturmuş (sarı oklar: hapsolmuş nöronlar), HE x100 B. Grad 2 astrositom, kistik değişiklikler gözlenebilir, HE x100 C. Grad 2 astrositom, geniş eozinofilik sitoplazmayla karakterize gemistositik morfoloji, HE x400 D. Grad 3 astrositom, artmış sellülerite, perivasküler lenfositik infiltrasyon, HE x100 (İTF Patoloji Arşivi: 22661-20, 16078-20, 26386-17, 36815-17). 10
- Resim 2:** İDH-1 antikoru ile tümör hücrelerinde sitoplazmik-zayıf nükleer reaksiyon görülürken, endotel hücrelerinde ise reaksiyon görülmemektedir x400 (İTF Patoloji Arşivi: 1112-22) 12
- Resim 3:** ATRX antikoru ile reaktif astrositler ve damar endotelinde nükleer reaksiyon mevcutken, tümör hücrelerinde reaksiyon görülüyor x400 (İTF Patoloji Arşivi: 41646-18)13
- Resim 4:** Doku microarray yöntemi ile blokların hazırlanması 16
- Resim 5:** A. 2019 yılında opere olan hasta grad 2 astrositom tanısı alıyor (HE x400, İTF Patoloji Arşivi: 4140-19) B. 2022 yılında nüks sebebiyle opere edilen hastanın biyopsi materyaline ait kesitlerde grad 4'e progrese olduğu belirlendi (HE x400, İTF Patoloji Arşivi: 1112-22) C. Bu tümörde anti İDH-1 antikoruyla izlenen pozitiflik (x400, İTF Patoloji Arşivi: 1112-22) 22
- Resim 6:** A. 2019 yılında opere olan hasta grad 3 astrositom tanısı almıştı (siyah oklar hapsolmuş nöronları göstermektedir) (HE x400, İTF Patoloji Arşivi: 33563-19) B. Hastanın 2020 yılında nüks sebebiyle yapılan operasyon materyaline ait kesitlerde yaygın mikrovasküler proliferasyon odakları izlenmiş olup, grad 4 astrositom tanısı almıştır (HE x200, İTF Patoloji Arşivi: 14347-20) C. Bu tümörde anti İDH-1 antikoru ile izlenen reaksiyon (x200, İTF Patoloji Arşivi: 14347-20). 23
- Resim 7:** Beyaz oklar: Homozigot delesyon, Sarı ok: Normal sinyaller (İTF Patoloji Arşivi: 28030-20) 26
- Resim 8:** Sarı oklar: Heterozigot delesyon Beyaz ok: Normal sinyaller (İTF Patoloji Arşivi: 32884-18) 27

BÖLÜM I

I. ÖZET

Amaç: Grad 2 ve grad 3 astrositomlar MSS’de özellikle frontal lob yerleşimi gösteren erişkin ve genç erişkinlerde görülen tümörlerdir. Astrositomların sınıflandırılmasında eskiden beri kullanılan histopatolojik özelliklere dayanan derecelendirme sistemi hem patologlar arasında uyumsuzluğa neden olmuş, hem de hastaların tedavisini ve sağkalımını öngörmeye anlamlı farklılıklar oluşturmamıştır. Son yıllarda özellikle tümörlerin histopatolojik özellikleri yanında başta İDH mutasyonu olmak üzere genetik özelliklerine de dayanan sınıflandırma biçimleri hız kazanmış ve hastaların sağkalımını öngörmeye başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

CDKN2A/B dokuzuncu kromozomun kısa kolunda yer alan, p16, p14, p15 gibi siklin bağımlı kinazları inhibe ederek hücre bölünmesini durduran proteinlerin sentezlenmesinde görev alan bir genidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda CDKN2A/B geninde meydana gelen homozigot delesyonların kötü klinik seyirle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında İDH mutasyonu göstermeyen astrositomlarda EGFR gen amplifikasyonlarının kötü klinik seyirle ilişkili olduğu belirlenmiş olup, İDH mutant astrositomlarda bu konu hakkında veri sınırlıdır.

Amacımız bahsedilen gen mutasyonlarıyla beraber 10 BBA’ya (2,37mm²) düşen mitoz sayılarını belirleyerek grad 2 ve grad 3 astrositomları daha objektif bir şekilde sınıflandırmak, hasta sağkalımını daha iyi bir şekilde öngörmektir.

Gereç ve yöntem: İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı’nda 2016-2020 yılları arasında astrositom tanısı almış İDH mutasyonu gösteren, ATRX ekspresyon kaybı ve/veya P53 mutasyonu gösteren 39 vaka çalışmaya alındı. Hastaların sağkalım verilerine ve radyoloji bilgilerine ulaşıldı. HE boyalı preparatlarda 10 BBA’ya (2,37mm²) düşen mitoz sayısı belirlendi, tümör yoğunluğu fazla olan alanlar işaretlendi. Doku microarray yöntemiyle dörder doku içeren bloklar oluşturuldu. Bloklar üzerinde CDKN2A/B, EGFR FİSH incelemeleri ve ATRX immünhistokimyasal incelemesi gerçekleştirildi. CDKN2A/B geninde delesyon varlığı-oranı, EGFR gen amplifikasyonu ve immünhistokimyasal olarak ATRX nükleer ekspresyon kayıpları belirlendi.

Bulgular: Tüm olgularda 10 BBA’ya (2,37mm²) düşen mitoz sayısı 0 ile 3 arasında değişmekteydi. Mitoz sayısının genel sağkalıma ve hastalıksız sağkalıma anlamlı etkisi bulunmadı. Grad 2 ve grad 3 tümörlerin benzer yaş gruplarında görüldüğü, benzer genel

sağkalım ve hastalıksız sağkalıma sahip oldukları belirlendi. İki vakada grad 4 astrositoma progresyon mevcuttu. CDKN2A/B FISH incelemesinde 2 vakada yüksek oranda homozigot delesyon saptandı ancak hastalarda kötü klinik seyri düşündürecek bulgu yoktu. EGFR FISH incelemesinde amplifikasyon saptanmadı.

Sonuç: Tümör gradının ve mitoz sayısının genel sağkalım ve hastalıksız sağkalım üzerine etkisi olmadığı anlaşıldı. İki vakada CDKN2A/B geninde saptanan yüksek oranda delesyon saptandı ancak sağkalım konusunda yorum yapmak için takip süreleri yetersiz bulundu. EGFR geninde amplifikasyon belirlenmedi, IDH mutant tümörlerin patogeneğinde etken bir genetik mekanizma olmadığı düşünüldü.



II. ABSTRACT

Objective: Grade 2 and grade 3 astrocytomas are tumors seen in adults and young adults, especially in the frontal lobe of the central nervous system. Grade 2 and grade 3 astrocytomas are central nervous system tumors of adults and young adults which frequently occurs frontal lobe localisation. The classical grading system based on histopathological features, which has been used in the classification of astrocytomas, caused inconsistency among pathologists and did not create significant differences in predicting the treatment and survival of patients. In recent years, classification systems based on both genetic characteristics, especially IDH mutation, as well as histopathological features of tumors have gained momentum and successful results have been obtained in predicting the survival of patients.

CDKN2A/B gene is located on the short arm of the ninth chromosome that is involved in the synthesis of proteins that controls cell division by inhibiting cyclin-dependent kinases such as p16, p14 and p15. In recent years, multiple studies demonstrated that homologous deletions in CDKN2A/B gene is associated with poor clinical outcome. In addition, it has been determined that EGFR gene amplifications are associated with poor clinical outcomes in astrocytomas that do not show IDH mutations, although data on this subject are limited in IDH mutant astrocytomas.

Our aim is to classify grade 2 and grade 3 astrocytomas more objectively by determining the number of mitoses per 10 high power field (2,37 mm²) with the mentioned gene mutations and to predict survival of patients more accurately.

Materials and methods: Thirty-nine cases with IDH mutation, loss of ATRX expression and/or P53 mutation, who were diagnosed with astrocytoma in Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Pathology between 2016 and 2020 were included in the study. Survival data and radiological findings of the patients obtained. The number of mitoses in 10 high power field (2,37mm²) were determined on HE stained slides, areas with high tumor density were marked. With the tissue microarray method, 10 blocks containing four tissues were created. CDKN2A/B, EGFR FISH analyses and ATRX immunohistochemistry analyses performed on these newly created blocks. CDKN2A/B deletion presence/rate, EGFR gene amplification and loss of ATRX nuclear expression immunohistochemically were determined.

Results: The number of mitotic figures per 10 high power field (2,37mm²) in all cases ranged between 0 to 3. The number of mitotic figures had no significant effect on overall survival and disease free survival. Grade 2 and grade 3 tumors were found to be seen in similar age groups and had similar overall survival and disease free survival. Two cases had progression to grade 4 astrocytoma. CDKN2A/B FISH studies revealed high rate of homozygous deletion in two cases, but there was no evidence suggesting a poor clinical outcome. No amplifications was detected in EGFR FISH studies.

Conclusion: It was observed that tumor grade and mitotic figures per 10 high power field had no significant effect on overall survival and disease free survival. In two cases, a high rate of homozygous deletion in CDKN2A/B gene was detected, but follow-up periods were insufficient to comment on survival. No amplification detected in EGFR gene, and it was thought that there was no effective genetic mechanism in the pathogenesis of IDH mutant astrocytomas.

BÖLÜM II

I. GİRİŞ

Astrositomlar (DSÖ 2021 sınıflamasına göre astrositom grad 2 ve grad 3) erişkin ve genç erişkinlerde, merkezi sinir sisteminde (MSS), özellikle frontal korteks yerleşimi gösteren tümörlerdir. Astrosit kaynaklı tümörlerin prognozunu ve hasta sağ kalımını belirlemede en sık olarak kullanılan sistem Dünya Sağlık Örgütü'nün de önerdiği, tümörün histolojik özelliklerine dayanan derecelendirme sistemidir(1). Bu sisteme göre sitolojik atipi varlığı (örneğin diffüz astrositomlar) gösteren tümörler grad 2, artmış mitotik aktivite ve anaplazi varlığı derece 3, mikrovasküler proliferasyon veya nekroz izlenen tümörler grad 4 olarak değerlendirilir(2).

Histolojik parametrelerin yanında hem tanıyı belirlemek ve hem de prognozu öngörmek açısından moleküler incelemeler son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. Tüm glial tümörler DSÖ sınıflamasında İDH1 veya İDH2 gen mutasyonlarına göre *IDH mutant* ve *IDH wild type* olarak iki kategoriye ayrılırlar. İDH1 veya İDH2 mutasyonu gösteren tümörlerin prognozunun bu mutasyonu göstermeyen tümörlere kıyasla daha iyi olduğu bilinmektedir(3–5). Ancak hem histolojik özelliklere dayanan derecelendirme sistemi hem de İDH mutasyonu araştırmalarına rağmen, derece 2 ya da derece 3 olarak sınıflanan tümörlerin bazı hastalardaki prognozunun grad 4 tümörlerle benzer şekilde seyrettiği gösterilmiştir(6). Ayrıca histolojik özelliklere dayanan derecelendirme sisteminin patologlar arasında özellikle derece 2 ve derece 3 tümörlerin ayrımında yüksek oranda uyumsuzluğa sebep olduğu gösterilmiştir(7). Bunun yanında CDK2A/2B mutasyonları astrositomlarda ve EGFR gen bölgesinde görülen mutasyonlar İDH mutasyonu göstermeyen gliomlarda hastalık prognozunun kötü seyretmesiyle ilişkili bulunmuştur(8).

Bu çalışmadaki amacımız yukarıda bahsedilen gen bölgelerindeki mutasyonları saptayarak tanı güçlüklerini ortadan kaldırmak ve sağkalımı daha doğru bir şekilde öngörmektir.

II. GENEL BİLGİLER

ASTROSİTOM, İDH MUTANT

Astrositomlar İDH-1 veya İDH-2 genlerinde mutasyonu gösteren, diffüz infiltratif karakterde, TP53 ve/veya ATRX mutasyonlarının da eşlik ettiği glial tümörlerdir. Oligodendrogliomlarda izlenen 1p/19q kodelesyonu astrositomlarda izlenmez.

A. Lokalizasyon

Astrositomlar MSS’de beyin sapı ve medulla spinalis de dahil olmak üzere tüm lokalizasyonlarda karşımıza çıkabilir. Bu lokalizasyonlar içinde en sık karşılaşılan bölge supratentoryal kompartman olup, bunlar içinde de frontal lob ve çevresi en sık görülendir(9–11).

B. Klinik ve Radyolojik Özellikler

Klinik bulgular tümörün bulunduğu lokalizasyona göre değişkenlik gösterir. Nöbet sık görülen bir bulgu olup, bunun yanında konuşma bozuklukları, duyuşsal ya da motor kayıplar, görme bozuklukları gibi semptomlar eşlik edebilir. Frontal lob yerleşimli tümörlerde aylar hatta yıllar önce başlayan davranış değişiklikleri izlenir. Bu tümörlerin küçük bir kısmı ise başka sebeplerle yapılan (travma gibi) görüntülemeler sonucu tespit edilir(12).

Görüntüleme bulguları tümörün lokalizasyonuna, hastalığın yaygınlığına ve histolojik derecesine göre değişkenlik gösterir. BT’de grad 2 tümörler sınırları belirsiz, düşük yoğunluklu homojen kitleler yaparlar. Tümörlerin %90’ı kadarında kontrast tutulumu görülmez(13). MRG’de T1 sekanslar hipodens, T2 sekanslar hiperintens olup, T2 hiperintens sekanslara FLAIR sekanslardaki görece hipointensite eşlik eder (T2-FLAIR uyumsuzluk bulgusu). Bu bulgu grad 2 ve grad 3 tümörler için oldukça spesifiktir(14). Gadolinium sonrası kontrastlanma derece 2 tümörlerde izlenmezken grad 3 ve grad 4 tümörlerde artan sıklıkta gözlenir(13,15,16). Santral nekroz çevresi halkasal kontrastlanma grad 4 tümörü düşündürürken, belirgin peritümöral ödem yüksek gradlı tümörleri akla getirir.

Grad 2 tümörler için tedavide en etkili yöntem eğer mümkünse maksimal cerrahi rezeksiyondur(17). İlk tanı anında asemptomatik olan veya tek şikayeti nöbet olan genç hastalarda (40-45 yaş altı) maksimal cerrahi rezeksiyon sonrası radyolojik takip yapılabilir.

Ancak 40-45 yaş üstü bireylerde inkomplet cerrahi söz konusu olduğunda etkilenen bölgeye yönelik radyoterapi (toplam 50-54 Gray düzeyinde 1,8-2 Gray'lık fraksiyonlar şeklinde) ve temozolomid kemoterapisi önerilmektedir(18). Grad 3 tümörlerin tedavisi de grad 2 tümörlere benzer özellikte olup mümkünse maksimal düzeyde cerrahi rezeksiyon sonrasında radyoterapi (60 Gray dozunda 1,8-2 Gray'lık fraksiyonlar şeklinde) ve temozolomid bazlı kemoterapi uygulanmaktadır(18).

C. Epidemiyoloji

Hastaların büyük çoğunluğu otuzlu-kırklı yaşlardaki (ortalama 38) erişkinler olup, grad 2 ya da grad 3 tümörler ile prezente olurlar(3). DSÖ grad 2 ve grad 3 tümörler benzer yaşlarda prezente olurken(7), grad 4 tümörler daha ileri yaşlarda görülür. IDH mutasyonları pedyatrik yaş grubunda nadiren görülür; bu mutasyonu gösteren tümörlere sahip kişilerin çoğu adolesan yaş grubundadır(19,20). İDH mutant astrositomların 55 yaş üstü bireylerde görülmesi nadirdir(21,22). DSÖ grad 2 ve grad 3 astrositomlar erkeklerde kadınlara kıyasla bir miktar daha sık gözlenir(3).

D. Etyoloji

İDH mutant astrositomların büyük çoğunluğu sporadik olarak gelişmekte olup, altta yatan ailesel ya da genetik bir faktör çoğu olguda bulunmaz. Buna karşın 8q24.21 lokusundaki düşük frekanslı tek nükleotid pleomorfizmlerinin İDH mutant astrositomlar ve oligodendrogliomlar için yatkınlık oluşturduğu gösterilmiştir(23). Yine aynı lokusta görülen varyasyonlar ve PHLDB1, AKT3, İDH1, D2HDGH lokuslarındaki varyasyonlar İDH mutant astrositomlar için artmış risk oluşturur(24–26)

Kalıtsal TP53 gen mutasyonu ile ortaya çıkan Li-Fraumeni sendromunda da beyin tümörleri içerisinde en sık ilişkisi olan İDH mutant gliomlardır(27,28). Literatürde TP53 kalıtsal mutasyonuna sahip kişiler üzerine yapılan bir çalışmada bu kişilerde görülen astrositomların sıklıkla İDH R132C mutasyonu gösterdikleri tespit edilmiştir(29). R132C mutasyonu astrositomlarda görülen tüm İDH1 mutasyonları içerisinde (sporadik ya da kalıtsal tüm olgular dahil edildiğinde) %5'ten az oranda görülmektedir(30–32). Post zigotik aşamada gerçekleşen İDH mozaizmi sonucu ortaya çıkan ve multipl encondromlarla seyreden Ollier hastalığında genel popülasyona göre daha genç yaşta ve daha yüksek oranda beyin sapında ortaya çıkan İDH mutant gliomlar izlenir(33–36).

Çocukluk çağında ve genç erişkinlerde görülen İDH mutant astrositomlarda MMR genlerinde mutasyonlar gözlenir(37). MMR genlerindeki mutasyonlar immünohistokimyasal olarak kolayca ortaya konabilir(38). Bu durum mikrosatellit instabilitesine sahip İDH mutant astrositomların tedavisinde ve klinik yönetiminde diğer İDH mutant astrositomlara göre farklılıklar oluşturabilir(39).

Diffüz gliomlar başka bir MSS malignitesini tedavi etmek için kullanılan radyoterapi sonrası gelişebilir, ancak bu tümörler İDH mutasyonları taşımaz(40). Ayrıca polyoma virüslerin (SV40, BK virüs, JC virüs gibi) DNA'larının ve proteinlerinin örnekleri glial tümörlerde gösterilmiş olsa da 225 gliom üzerine yapılan güncel bir araştırmada bu durumun nadir olduğu tespit edilmiştir(41).

E. Patogenezi

İDH mutant astrositomların hangi hücre veya hücrelerden köken aldığı halen devam eden araştırmaların konusudur. Morfolojik bulgular ve tek hücre RNA sekans analizleri hücre kökeni olarak astrositik, oligodendroglial ve nöral prekürsör benzeri hücrelerin bir karışımını işaret etmektedir(42). Ölümsüzleştirilmiş insan astrositleri üzerine yapılan deneysel bir çalışmada İDH1 R132H mutasyonunun astrositleri progenitör hücre benzeri bir aşamaya taşıdığı saptanmıştır(43). Transgenik fare deneylerinde astrositomların nöral kök hücreler, oligodendroglial prekürsör hücreler ve astrositler gibi MSS'nin farklı hücrelerinden köken alabildiği gösterilmiştir(44). Oligodendroglial progenitör hücrelerin K-RAS ve AKT aşırı ekspresyonları ve p19 kaybı sonucunda astrositik fenotip kazandığı ve astrositik belirteçleri yüksek oranda eksprese ettiği belirlenmiştir(45). İDH mutant gliomlar, İDH mutasyonu göstermeyen gliomlardan hasta yaşları, cinsiyete göre dağılım ve klinik sonuçlar açısından farklılık gösterirler. Bu bulgular ışığında İDH mutant ve İDH mutasyonu göstermeyen (*wildtype*) gliomlar kendilerine özgü sellüler patogenetik mekanizmalara sahiptir. Örneğin İDH mutant gliomlar frontal lob lokalizasyonunda daha sık görülür(46). Bu durum bize İDH mutant astrositomların köken aldığı hücrelerin ya frontal lobda yerleşmiş prekürsör hücreler ya da bu bölgeye göç eden prekürsör hücreler olduğunu düşündürmektedir. Dahası frontal lob yerleşimi, GLUD2 gen ekspresyonunun frontal lob lokalizasyonunda sınırlı olmasıyla açıklanabilir(47,48).

F. Genetik Özellikler

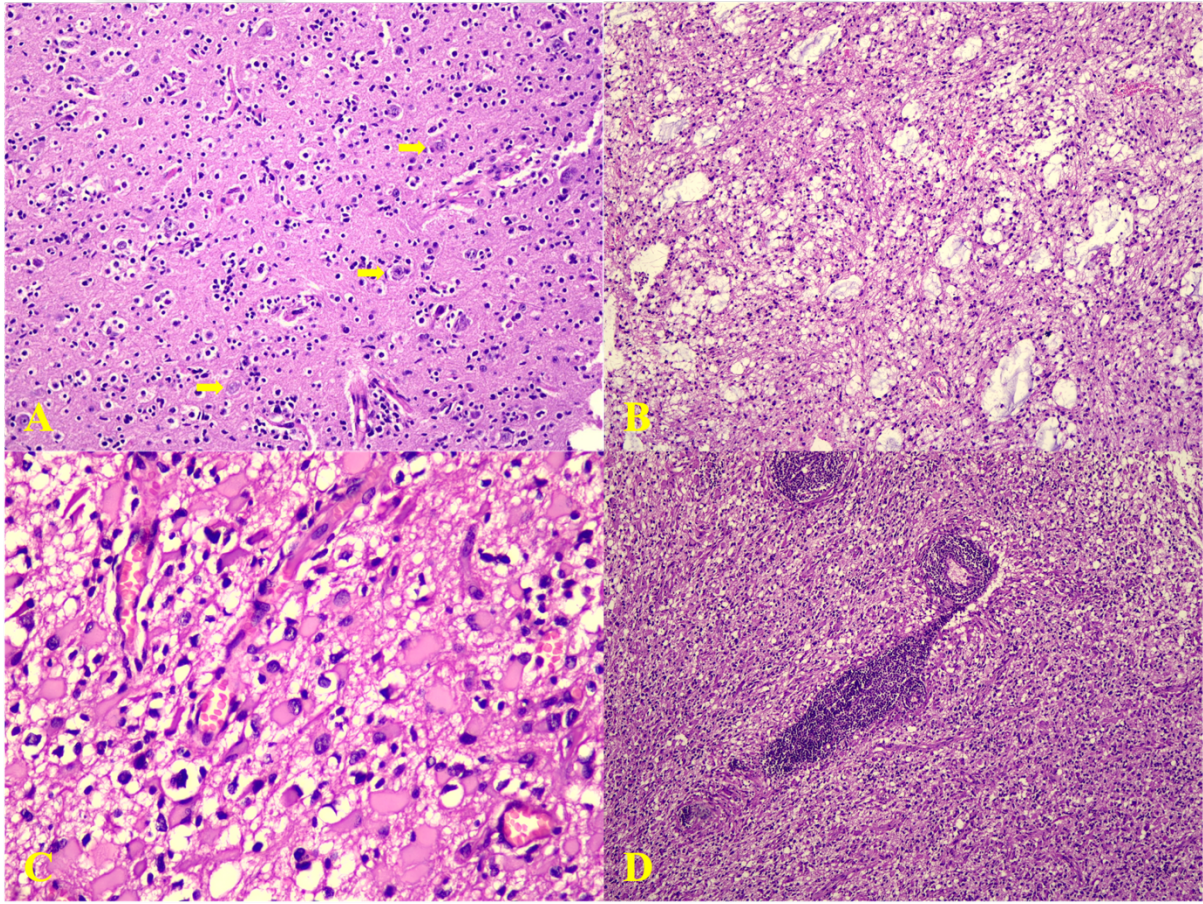
İDH mutasyonu ilk olarak 2008 yılında saptanmış olup, İDH mutant astrositomlar için tanımlayıcı bir özelliktir(49). İDH mutasyonları gliomagenezde erken ortaya çıkan bir basamaktır ve tümörögenез boyunca persiste eder. Aynı hastalardan alınan seri biyopsi örneklerinde İDH1 mutasyonu öncesi gerçekleşmiş TP53 gen mutasyonları saptanamamıştır(31). Bunun bir istisnası Li-Fraumeni sendromlu bireyler olup, bu kişilerde İDH1 mutasyonu TP53 mutasyonlarından sonra gelişmektedir(29). Tespit edilmiş İDH1 mutasyonlarının çoğu 132'nci kodonun birinci ya da ikinci bazında gerçekleşir(31,32,49). İDH mutasyonları içinde en sık görülen İDH1 p.R132H mutasyonu olup, tüm İDH mutant gliomların yaklaşık %83-%91'inde gözlenir(31,32,50). Diğer nadir görülen İDH1 mutasyonları sırasıyla p.R132C (vakaların %3,6-%4,6'sında), p.R132G (vakaların %0,6-%3,8'i), p.R132S (vakaların %0,8-%2,5'i) ve p.R132L (vakaların %0,5-%4,4'ü) mutasyonlarıdır(31,32,50). İDH2 geni İDH1 gen ürününün homoloğu olan ve benzer şekilde NADP⁺'yı elektron alıcısı olarak kullanan proteini kodlayan tek gendir. Gliomlarda izlenen İDH2 mutasyonları p.R172'de lokalize olup p.R172K en sık görülenidir(50,51).

İDH mutant astrositomlar ayrıca TP53 ve ATRX genlerinde fonksiyon kaybıyla sonuçlanan mutasyonlara sahiptir(52–54). ATRX mutasyonları telomer bakımı işlevini bozarak telomerlerde uzamalara sebep olur(55). Bunun yanında genomik instabiliteye sebep olarak hücreyi p53 aracılı hücre ölümüne sürükler(56). İşte bu sebeple TP53 mutasyonları tümöral hücrelerin hayatta kalmasına yardımcı olmaktadır.

G. Histopatolojik Özellikler ve Derecelendirme

İDH mutant astrositomlar yavaş büyüme gösteren iyi diferansiye tümörlerden (DSÖ grad 2) hızlı büyüme gösteren, hipersellüler ve anaplastik özellikler gösteren tümörlere kadar (DSÖ grad 4) geniş bir morfolojik spektrum içerisinde yer almaktadır. Tümör hücreleri genellikle normal beyin parankimi içerisine diskoheziv biçimde infiltre olarak normal elemanların (örneğin nöronlar) arada hapsolmasına sebep olur ve mikroskopik olarak hipersellüler bir görünüm izlenir(57). Bu özellikten dolayı makroskopik olarak tümör sınırları net olarak belirlenemez. Tümör hücreleri nükleer hiperkromazi, nükleer irileşme, hücrelerin gruplaşması ve kümeler oluşturması gibi bulgularla reaktif astrositlerden ayrılır(57). Bu hücreler köşeli ve uzamış nükleuslara, elonge ve fibriller özellikte sitoplazmaya sahiptir(57). Bazı vakalarda ise eozinofilik geniş sitoplazmalı hücreler izlenir (gemistositik morfoloji).

Belirgin proliferatif aktivite, anaplazi, mikrovasküler proliferasyon içermeyen ve CDKN2A/B delesyonu göstermeyen tümörler DSÖ grad 2 olarak sınıflanır(2). DSÖ grad 2 tümörler 10 yıldan uzun ortalama sağkalıma sahiptir(58,59). Grad 3 tümörlerde ortalama sağkalım grad 2 tümörlere benzerdir(60). Ek olarak histolojik anaplazi gösteren, artmış mitotik aktiviteye sahip olan, ancak mikrovasküler proliferasyon ve CDKN2A/B delesyonu içermeyen tümörler DSÖ grad 3 olarak kabul edilir(2). Grad 2 ve grad 3 tümörleri ayırmak için belirlenmiş bir mitoz sayısı yoktur(2). Birçok nöropatoloji uzmanı tüm piyes içerisinde 2'den fazla sayıda mitoz varlığını kabul ederken küçük bir biyopside izlenen tek bir mitoz da grad 3 olarak sınıflandırmak için anlamlı kabul edilmektedir(61,62). Mikrovasküler proliferasyon, nekroz ya da CDKN2A/B delesyonlarından herhangi birini gösteren tümörler ise DSÖ grad 4 olarak sınıflandırılır(2). Grad 4 tümörlerde ortalama sağkalım 5 yıl kadardır(63).



Resim 1: A. Grad 2 astrositom, tümör hücreleri kortekste diffüz infiltrasyon oluşturmuş (sarı oklar: hapsolmuş nöronlar), HEx100 B. Grad 2 astrositom, kistik değişiklikler gözlenebilir, HEx100 C. Grad 2 astrositom, geniş eozinofilik sitoplazmayla karakterize gemistositik morfoloji, HEx400 D. Grad 3 astrositom, artmış sellülerite, perivasküler lenfositik infiltrasyon, HEx100 (İTF Patoloji Arşivi: 22661-20, 16078-20, 26386-17, 36815-17).

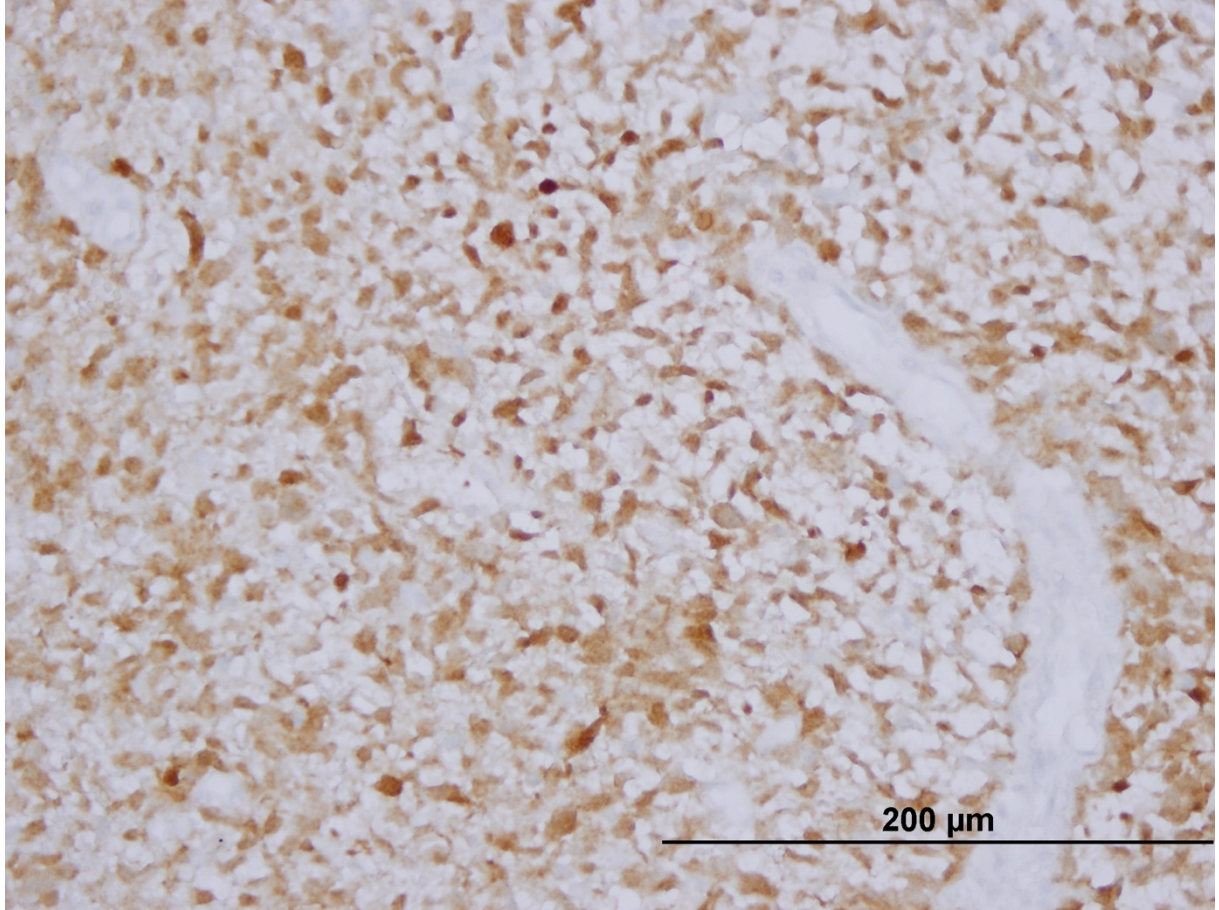
H. İmmünohistokimya

Tümör hücrelerinde GFAP ile değişken oranda pozitif reaksiyon görülmektedir(64). Gemistositik morfolojiye sahip hücreler ise GFAP ile kuvvetli reaksiyon verir(65). Benzer şekilde OLİG2 de birçok diffüz glial tümörde kuvvetli nükleer boyanma sergiler. Vimentin GFAP'ye benzer şekilde boyanır(66). TP53 astrositomların tümörögenezinde etkisi olduğu kanıtlanmış bir genetik mutasyondur(67). Anti-p53 antikoruyla tümör hücrelerinde %10'dan yüksek oranda görülen boyanma TP53 gen mutasyonlarıyla ilişkili olup, tanıda yardımcı olur(68). İDH ve ATRX'e ait boyanma paternleri ilgili konu başlıkları altında belirtilecektir.

I. İzositrat Dehidrojenaz

İDH1 ve İDH2 sırasıyla sitoplazma ve mitokondride bulunan ve birbirlerine büyük oranda homoloji gösteren izositrat dehidrojenazlardır(57). Her ikisi de NADP'yi kofaktör olarak kullanarak izositratı alfa ketoglutarata çevirir. Aynı zamanda hücre için majör bir NADPH sağlayıcısı olup(69), bu sayede glutatyonun yenilenmesini ve hücreler için antioksidan etki oluşturmaya katkı sağlar(70,71). İDH mutasyonları sonucu oluşan enzimler NADPH'ye bağımlı biçimde d-2-hidroksiglutarat oluşturur(72). D-2-hidroksiglutarat alfa ketoglutarat ile yarışmalı inhibisyona girerek alfa ketoglutaratı kofaktör olarak kullanan dioksijenazları inhibe eder(73). Bu durum on-on bir translokasyon ½ metilsitozin dioksijenazlar ve histon demetilaz gibi enzimlerin fonksiyonlarını bozarak özellikle genlerin promoter bölgelerinde bulunan CpG adalarında spesifik bir metilasyon profiline sebep olur (G-CİMP)(74–76). CpG adaları normalde susturulmak istenen gen bölgelerinde metilasyona uğrar (X kromozomunun inaktive kısımları gibi)(77). Bu sebeple promoter bölgelerinde meydana gelen hipermetilasyon sonucu tümör süpresör genlerin susturulduğu(78,79) ve bu şekilde gliomagenezin meydana geldiği düşünülmektedir. Ancak hem hipermetilasyonun ortaya çıkış mekanizmaları hem de etkilenen genlerin hangileri olduğu konusunda çalışmalar devam etmektedir.

İDH mutasyonları içinde en sık gözlenen mutasyon İDH1 R132H mutasyonudur(49). Bu mutasyon anti İDH1 R132H antikoru ile yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda güçlü sitoplazmik ve zayıf nükleer pozitiflik ile tespit edilebilmektedir(80).

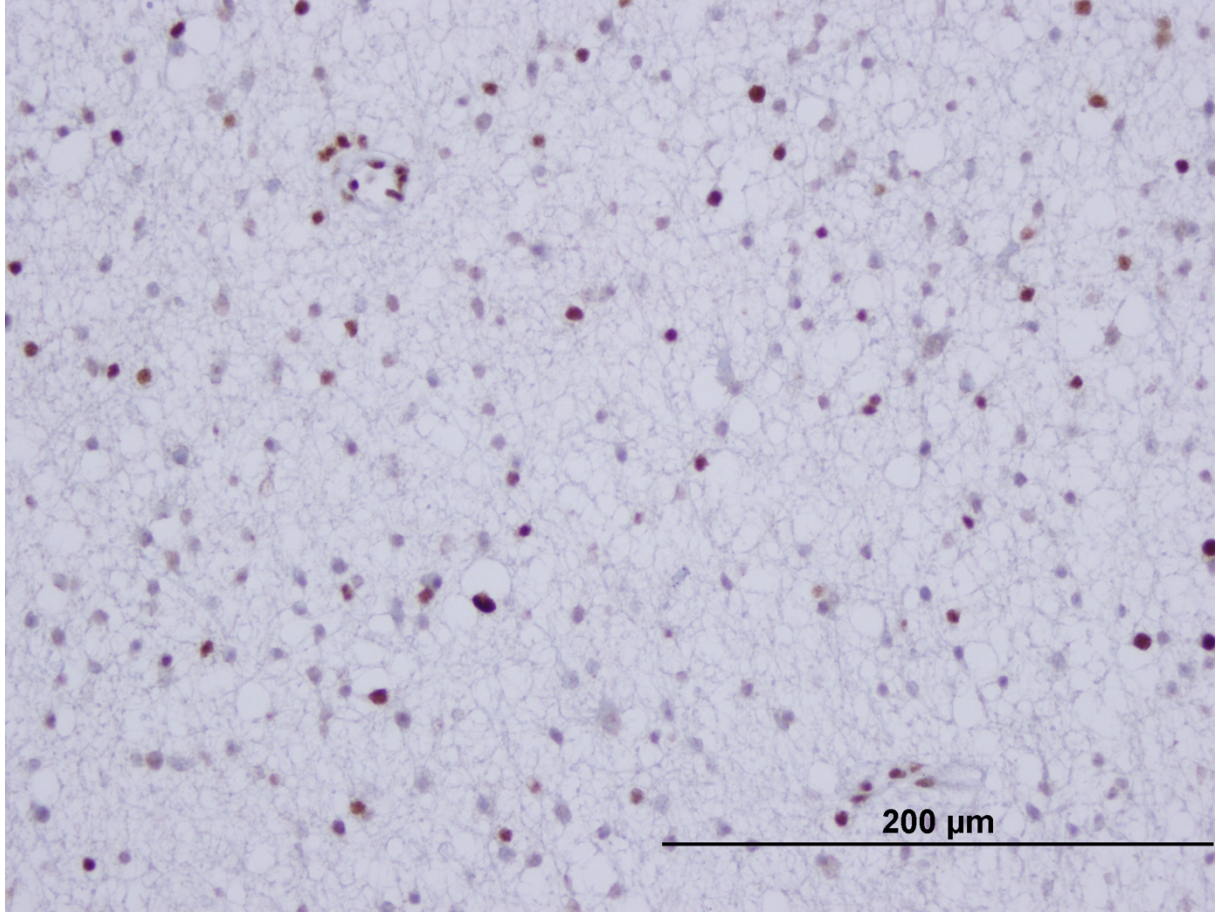


Resim 2: İDH-1 antikoru ile tümör hücrelerinde sitoplazmik-zayıf nükleer reaksiyon görülürken, endotel hücrelerinde ise reaksiyon görülmemektedir x400 (İTF Patoloji Arşivi: 1112-22)

J. ATRX

ATRX kromatin yeniden düzenlenmesinde görev alan “switch/sucrose non-fermentable” yani SNİ2/SNF2 ailesi üyesi bir helikaz/ATPazdır(81). ATRX DAXX ile birleşerek histon H3.3 ile etkileşime girer(81). ATRX yeniden düzenleme etkisi ile histon H3.3’ün perisentromerik heterokromatin ve telomer ile birleşmesini sağlar(81). ATRX geninde meydana gelen mutasyonlar (çerçeve kayması ve anlamsız mutasyonlar şeklinde) genellikle fonksiyon kaybına sebep olur ve genin herhangi bir bölgesinde meydana gelebilir(52,53,82). Bu mutasyonlar sonucu olarak alternatif telomer uzaması denilen süreç gerçekleşir ve hücreler sınırsız şekilde telomerlerini uzatma yeteneği kazanır(55,83–86). ATRX mutasyonları İDH ve TP53 mutasyonu gösteren astrositomların çoğunda gözlenirken oligodendrogliomlarda TERT promotor mutasyonları görülmektedir(52,53,84). Son yıllarda ATRX mutasyonu göstermeyen İDH ve TP53 mutant astrositomlarda SMARCA1 mutasyonları saptanmıştır(87,88).

ATRX mutasyonu immünohistokimya yöntemi ile anti ATRX antikorunun nükleer ekspresyonunun kaybıyla kolayca ortaya konabilir.



Resim 3: ATRX antikoruna ile reaktif astrositler ve damar endotelinde pozitif nükleer reaksiyon görülürken tümör hücrelerinde reaksiyon görülmemektedir x400 (İTF Patoloji Arşivi: 41646-18)

K. CDKN2A/B

CDKN2A/B dokuzuncu kromozomun kısa kolunda p21.3 bölgesinde bulunan, sırasıyla p16, p14 (CDKN2A) ve p15 (CDKN2B) tümör süpresör proteinlerini kodlayan gen bölgeleridir(89). Hücre bölünmesinde G1 fazından S fazına geçiş aşamasında etkili olan siklin bağımlı kinaz 4 ve siklin bağımlı kinaz 6 p16 ve p15 proteinlerince inhibe edilerek retinoblastomun aktive yani anti proliferatif durumda bulunmasını sağlar(90). Bunun yanında p14 ise MDM2'nin inhibisyonu üzerinden p53'ün inhibe edilmesini önler ve apoptotik etki oluşturur(91). Son yıllarda yapılan birçok çalışmada İDH mutant astrositomlarda meydana gelen CDKN2A/B homozigot delesyonlarının hastaların prognozuna kötü etkisi olduğu anlaşılmıştır(60,92–97). Benzer şekilde DSÖ grad 2 ve grad 3 İDH mutant astrositomlarda CDKN2A/B delesyonları bağımsız prognostik bir parametre olarak araştırılmış ve bu delesyona

sahip tümörlerin histolojik özelliklerinden bağımsız olarak DSÖ grad 4 tümörlere benzer prognozlara sahip olduğu saptanmıştır(8,92,94,96). CDKN2A/B gen delesyonları kromozom 9p21 bölgesine yönelik FISH yöntemi ile tespit edilebilir.

L. EGFR

Tirozin kinazlar hücrede diferansiyasyon, proliferasyon, göç ve hücre sağkalımı gibi birçok kompleks fonksiyona sahip sinyal molekülleridir(98). Reseptör tirozin kinazlar kendilerine bağlanan ligandlar aracılığıyla veya ligand olmaksızın aşırı ekspresyon ile hücrede yukarıda bahsedilen kompleks işlemleri başlatacak sinyal kaskadını başlatır(98,99). Eski DSÖ sınıflamasına göre IDH mutasyonu gösteren glioblastomlar ve bu mutasyonu göstermeyen glioblastomlar üzerine yapılan çalışmalarda bu tümörlerin kromozom 7 kazanımı, 10q kaybı, TERT promotor mutasyonu veya EGFR amplifikasyonu gibi genetik anomalilerin biri veya birkaçına sahip oldukları tespit edilmiştir(100,101). Ancak IDH mutant astrositomlarda EGFR gen amplifikasyonu oranları %13 oranında saptanmış olup prognoza olan etkisi konusundaki çalışmalar sınırlıdır(102). EGFR gen amplifikasyonları da FISH analizi ile tespit edilebilmektedir.

BÖLÜM III

GEREÇ VE YÖNTEM

I. Çalışma Olgularının Belirlenmesi

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda bilgisayar ortamında oluşturulmuş arşiv kayıtları gözden geçirildi ve 2016-2021 yılları arasında beyin biyopsi veya eksizyon materyalinde primer diffüz glial tümör tanısı almış hastaların kayıtlarına ulaşıldı, immünohistokimyasal olarak İDH R132H antikoru ile reaksiyon göstermeyen vakalar çalışma dışı bırakıldı. İmmünohistokimyasal olarak ATRX ekspresyon kaybı ve/veya P53 ekspresyonu gösteren tümörler ile 1p-19q kodelesyonu göstermeyen tümörlerden çalışma grubu oluşturuldu. Bunun yanında parafin bloklarına ulaşılamayanlar ve parafin bloklarında yeterli tümör hücresi içermeyenler de çalışmaya dahil edilmedi. Sonuç olarak 39 adet olgu değerlendirildi.

Hastaların cinsiyeti, tanı anındaki yaşı, tümörün yerleşim yerine ait bilgiler patoloji raporlarından elde edildi. İstanbul Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı arşiv kayıtlarından hastaların sağkalım bilgilerine ulaşıldı. Bu şekilde bilgilerine ulaşılamayan hastaların ve takipleri hastanemiz dışında yapılan hastaların bilgilerine sözel olarak ulaşıldı. Lokal nüks varlığı hastalık rekürrensi olarak değerlendirildi. Hastalısız sağkalım süresi belirlenirken hastalık rekürrensi bulunan hastalarda bu durumun meydana geliş süresi, hastalık rekürrensi bulunmayan hastalarda ise hastanın en son muayene zamanı dikkate alındı.

Değerlendirmeye alınan olguların Hematoksilen-Eozin boyalı preparatları yeniden incelendi. Bu olgularda Olympus BX51 (Olympus, Japonya) marka mikroskop aracılığıyla 10 BBA (2.37 mm²) başına düşen mitoz sayıları belirlendi. Daha sonra tümör yoğunluğu en yüksek olan ve canlı tümör hücreleri içeren alanlardan 5mm çaplı alanlar işaretlendi. Bu alanlardan doku microarray yöntemi aracılığıyla her biri 4 olgu içeren parafin bloklar oluşturuldu.

II. Doku Microarray Yöntemi

Hematoksilen-Eosin boyalı preparatlarda tümör yoğunluğu yüksek olan ve canlı tümör hücreleri içeren alanlar işaretlendi. İşaretli alanlardan dermatoloji kliniğinde kullanılan 5 mm'lik (Kai Medikal) punch biyopsi aleti ile örnekler alındı. Daha sonra bu parçalar her blokta 4 doku olacak şekilde sistematik olarak parafin bloklara gömüldü. Bu bloklardan immünohistokimya ve FISH analizi için 3-5 mikrometre kalınlığında kesitler hazırlandı.



Resim 4: Doku microarray yöntemi ile blokların hazırlanması

III. İmmünohistokimyasal Yöntem ve Değerlendirme

Primer antikor olarak Santa Cruz anti-ATRAX (D-5, sc 55584) tavşan monoklonal antikorları kullanıldı. Kontrol olarak doku içerisinde yer alan endotel hücreleri veya hapsedilmiş nöronal hücreler değerlendirildi. DMA yöntemi ile oluşturulan bloklardan her iki antikor için 1'er tane 3-5 mikrometre kalınlığında kesitler hazırlanıp pozitif yüklü cam üzerine alındı. Hazırlanan camlar 56 °C etüvde bir gece boyunca bekletilerek kurutuldu ve camlara yapışması sağlandı. Daha sonra bu lamalar Ventana Medical System-Benchmark XT/ISH staining modüle yerleştirildi ve antikorlar için sırasıyla aşağıdaki protokoller uygulandı.

1. On beş dakika deparafinizasyon
2. EDTA ile pH 8’de antijen geri kazanım yöntemi
3. Yüz yirmi dakika boyunca 37 derecede primer antikor inkübasyonu
4. İki kez 8 dakika boyunca amplifier A ve B
5. Dört dakika boyunca asetat buffer içinde bakır sülfat çözeltisi
6. HE ile zıt boyama

Tümör dışı hücrelerde izlenen pozitif reaksiyon varlığında, tümör hücrelerinde negatiflik nükleer ekspresyon kaybı olarak kabul edildi.

IV. Floresan İn Situ Hibridizasyon Yöntemi

DMA yöntemi ile hazırlanan parafin bloklardan 3-5 mikrometre kalınlığında kesitler pozitif yüklü camlara alındı. Bu kesitler 56 °C fırında bir gece bekletildi. Daha sonra deparafinizasyon işlemi için camlar 10 dk arayla toplam üç kez ksilen içerisinde bekletildi. Ön yıkama aşaması Depamiks solüsyonu içeren 85 °C sıcaklıktaki su banyosunda 30 dakika süreyle gerçekleştirildi ve camlar distile suda yıkandı. Proteoliz aşaması için distile su, hidroklorik asit ve enzim (pepsin) içeren karışım içine alınan camlar burada 37 °C sıcaklıkta 30 dakika bekletildikten sonra distile su ile yıkandı ve proteolizi durdurmak amacıyla SSC solüsyonunda 4 dakika süreyle tutuldu. Artan oranda alkol solüsyonlarında (sırasıyla %70, %85 ve %90) üçer dakika olmak üzere toplam dokuz dakika prehibridizasyon aşaması gerçekleştirildi. Abbott-Vysis CDKN2A/CEP9 (MTAP, CDKN2A ve CDKN2B bölgelerini kapsayan, 222 kilobazlık gen bölgesini içeren alan kırmızı, dokuzuncu kromozomun alfa satellit bölgesine spesifik alan yeşil) iki renkli prob ve Abbott-Vysis EGFR/CEP7 (EGFR genini tamamını içeren 303 kilobazlık bölge kırmızı, yedinci kromozomun sentromer bölgesinde bulunan alfa satellit bölgesi yeşil) iki renkli prob ile karanlık ortamda işaretlenen dokuların çevresine problemlerin dağılmasını önlemek için “rubber sement” uygulandı. Camlar Thermo Brite (Abbott Moleküler, Amerika Birleşik Devletleri) cihazında dört dakika boyunca 90 °C sıcaklıkta denatürasyon işlemi ardından aynı cihazda 16-17 saatlik 37 °C sıcaklıktaki inkübasyon işlemine alındı. Hibridizasyon sonrası SSC solüsyonunda yıkama işlemi yapıldı. Daha sonra DAPI ile zıt boyama işlemi gerçekleştirildi. Preparatlar Biowiev Allegra Plus

yazılımı (Bioview, İsrail) ile dijital olarak tarandı. Dijital görüntüler Duet yazılımı aracılığıyla değerlendirildi.

IV.A. CDKN2A FİSH Değerlendirmesi

Kırk-yüz adet tümör hücresi nükleusu kırmızı ve yeşil sinyaller açısından değerlendirildi. Vasküler endotel hücreleri iç kontrol olarak belirlendi. Polizomi gösteren hücreler (ortalama 2'den fazla kırmızı veya yeşil sinyal varlığında) değerlendirme dışı bırakıldı. Kırmızı sinyallerin yeşil sinyallere oranı 0,8'in altında kaldığı durumlar heterozigot delesyon kabul edildi. Her iki kırmızı sinyalin kaybı veya tek kromozom 9 sinyaline karşı kırmızı sinyal görülmemesiyle karakterize homozigot delesyon gösteren vakalar ve delesyon oranları not edildi. Heterozigot delesyonların homozigot delesyonlara kıyasla sağkalıma etkisi ve homozigot delesyon oranının sağkalıma etkisi araştırıldı.

IV.B. EGFR FİSH Değerlendirmesi

Kırk adet tümör hücresi nükleusu kırmızı (EGFR) ve yeşil (kromozom 7) sinyaller açısından değerlendirildi. Vasküler endotel hücreleri iç kontrol kabul edildi. Tümör hücrelerinde kırmızı sinyallerin yeşil sinyallere oranı 2'den büyük olduğunda amplifikasyon kabul edildi ve amplifikasyon gösteren hücre oranı değerlendirildi(103). Amplifikasyon yüzdesi ile sağkalım ve hastalık nüksü arasındaki ilişki araştırıldı.

V. Biyoistatistiksel Analiz

Çalışmanın biyoistatistiksel çözümlemelerinde Statistical Package for Social Sciences (SPSS, Sürüm: 28.0) paket programı kullanıldı. Gruplar arası dağılım farkları Ki-kare testleri ile incelendi. Gruplar arasında sayısal verilerin karşılaştırılmasında uygunluklarına göre Student t-test veya Mann Whitney U testi kullanıldı. Sağkalım eğrileri Kaplan-Meier metodu ile oluşturuldu, son muayene tarihi veya ölüm tarihi esas alındı. Sağkalıma etki eden faktörlerin araştırılması log-rank testi ile yapıldı. Tüm istatistiksel karşılaştırmalarda anlamlılık sınırı $p<0,05$ olarak alındı.

BÖLÜM IV

BULGULAR

I. Demografik, Klinik ve Histopatolojik Bulgular

Klinik ve demografik ve histopatolojik bulgular Tablo 1’de özetlenmiştir. Hastaların tanı anındaki yaş ortalaması $36,3 \pm 7,9$ olup, 18-55 aralığında değişmektedir (medyan 38). Olguların 24’ü (%61,53) erkek, 15’i (%38,46) kadındır.

Çalışmaya dahil edilen 39 vakanın tamamı supratentoryal yerleşim göstermekteydi. En sık tutulum gösteren lob 19 olguyla frontal lob (%48,71) olup, bunu sırasıyla 18 olguyla temporal lob (%46,15), 11 olguyla parietal lob (%28,2) ve 1 olguyla oksipital lob (%2,5) izlemekteydi. Olguların 9’unda (%23,07) bilobar tutulum mevcuttu.

DSÖ sınıflamasına göre olguların 28’i (%71,8) grad 2 olarak değerlendirilmiş olup, 11’i (%28,2) grad 3 olarak sınıflandırılmıştır. Grad 2 tümörlerde yaş ortalaması $35,57 \pm 10,3$ olup, grad 3 tümörlerde yaş ortalaması $38,36 \pm 8,45$ olarak belirlendi. Her iki tümör grubu da benzer yaşlarda görülmekte olup, aralarında görülme yaşı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,211$). Benzer şekilde grad 2 ve grad 3 tümörlerin cinsiyetlere göre dağılımı araştırıldığında istatistiksel anlamlı bir fark yoktur ($p=0,301$).

Tüm olguların 10 BBA’daki (2.37 mm^2) mitoz sayısı değerlendirilmiş olup, 23 (%59) vakada sıfır, 13 (%33,3) vakada bir, 1 (%2,6) vakada iki ve 2 (%5,1) vakada üç mitoz saptanmıştır. Hücre özelliklerine göre yapılan değerlendirmede 39 olgunun 15’inde (%38,46) gemistositik morfoloji mevcuttu.

ATRX immunhistokimyasal incelemesinde 29 (%74,35) vakada nükleer ekspresyon kaybı belirlendi. Bu oran grad 2 tümörlerde %71,42 ve grad 3 tümörlerde %72,72 oranında olup, aralarında anlamlı bir fark yoktu. P53 immünhistokimyasal incelemesi 12 vakada çalışılmış olup, 3 vakada (%25) eşlik eden ATRX ekspresyon kaybı belirlenmedi.

Tablo 1: Hastaların demografik, klinik ve histopatolojik özellikleri

Özellik	Olgu Sayısı (n)	Sıklık (%)
Cinsiyet		
Kadın	15	%61,53
Erkek	24	%38,46
Lokalizasyon		
Frontal	19	%48,71
Temporal	18	%46,15
Parietal	11	%28,2
Oksipital	1	%2,5
Bilobar	9	%23,07
DSÖ Grad		
Grad 2	28	%71,8
Grad 3	11	%28,2
Gemistositik Morfoloji		
Var	15	%38,46
Yok	24	%61,53
10 BBA'da (2,37 mm²) mitoz		
Yok	23	%59
1 adet	13	%33,3
2 adet	1	%2,6
3 adet	2	%5,1

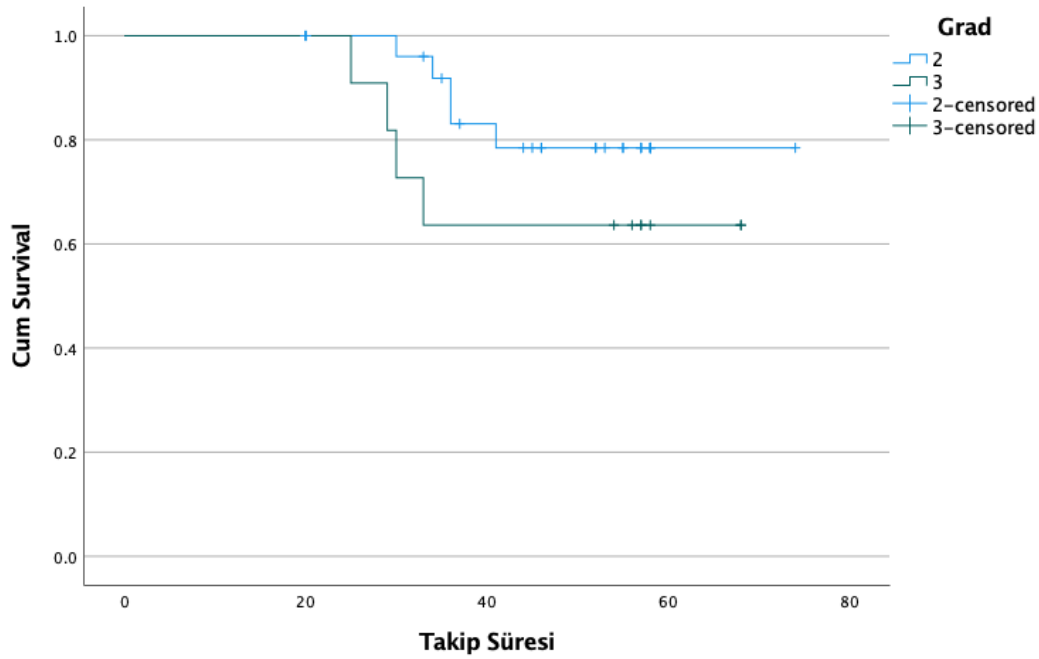
II. Genel Sağkalım ve Hastalıksız Sağkalım Özellikleri

Çalışmaya dahil edilen tüm hastaların sağkalım verilerine ulaşıldı. Hastaların 30'unun (%76,9) sağ, 9'unun (%23,1) ölü olduğu belirlendi. Takip süresi minimum 20 ay, maksimum 74 ay olup, ortalama takip süresi 46.21 ± 14.24 aydı (medyan 52).

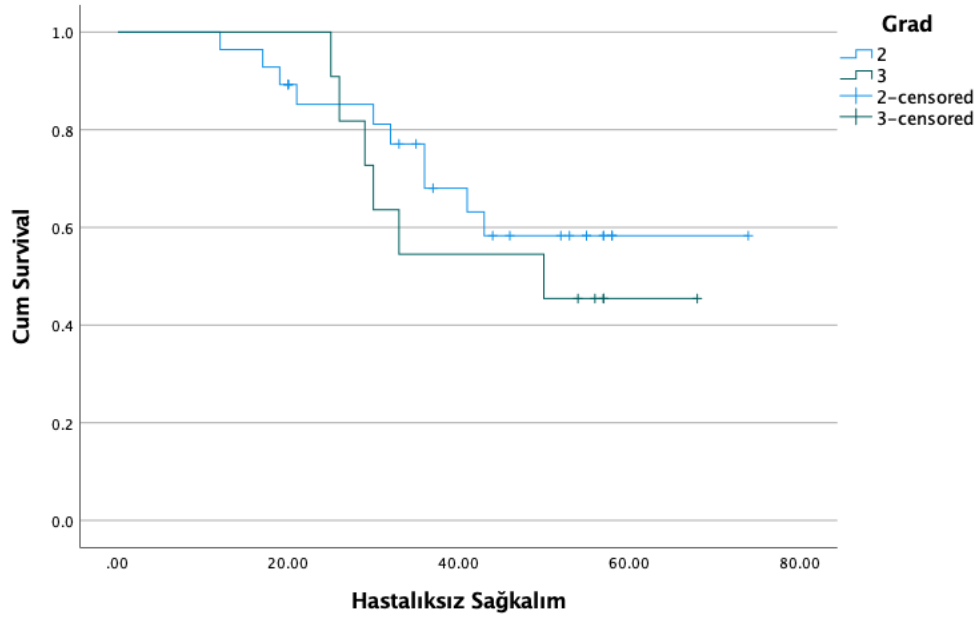
Tümör gradının genel sağkalıma olan etkisi araştırıldığında sağkalım grad 2 tümörlerde ortalama $65,72 \pm 3,29$ ay olup, grad 3 tümörlerde ortalama $53.91 \pm 5,64$ ay olarak belirlendi. Grad

2 ve grad 3 tümörlerin genel sağkalımla olan ilişkisi araştırıldığında anlamlı istatistiksel fark görülmedi ($p=0,218$).

Hastaliksız sağkalım ile olan ilişki değerlendirildiğinde ise grad 2 tümörlerde ortalama hastaliksız sağkalım $55,587 \pm 4,602$ ay, grad 3 tümörlerde ortalama hastaliksız sağkalım $48,455 \pm 5,695$ olarak saptandı. Yine her iki tümör grubunun hastaliksız sağkalıma olan etkisi araştırıldığında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı ($p=0,495$).

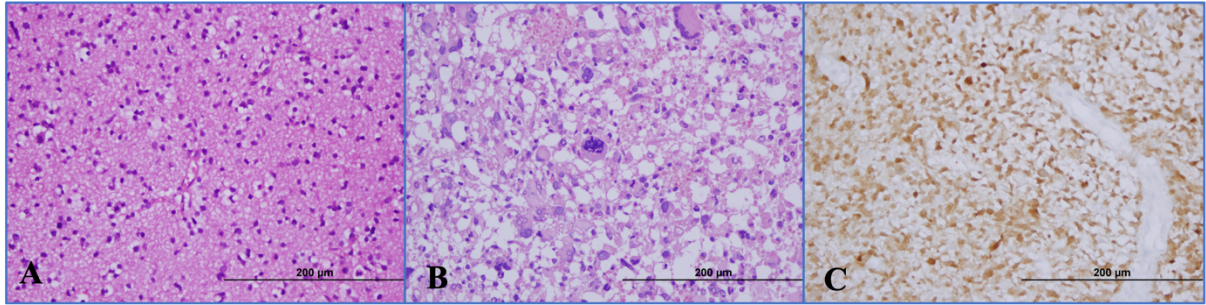


Şekil 1: Genel sağkalımın tümör gradı ile ilişkisi



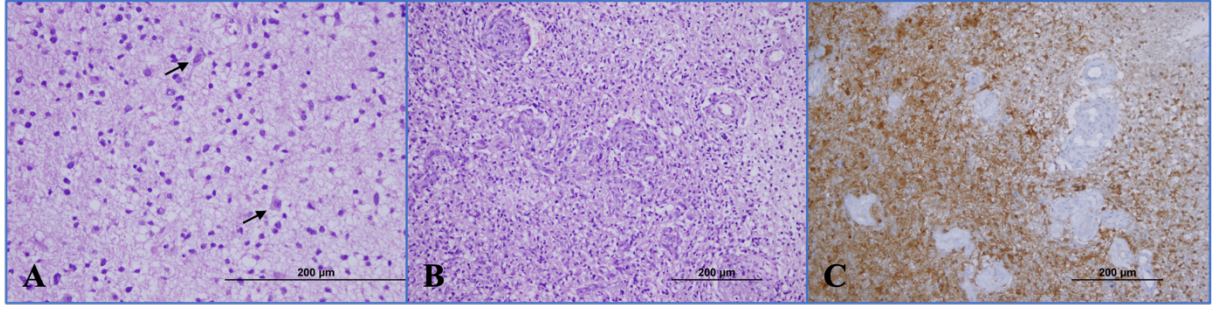
Şekil 2: Hastaliksız sağkalımın tümör gradı ile ilişkisi

Grad 2 veya grad 3 astrositom sebebiyle ameliyat edilen hastaların ikisinin (%5,12) takiplerinde grad 4 astrositoma dönüşüm saptandı. Bu hastalardan biri daha önce grad 2 astrositom tanısı almış 41 yaşında bir erkek hastaydı. Sonuç olarak hastanın ilk tanısından 34 ay sonra öldüğü tespit edildi.



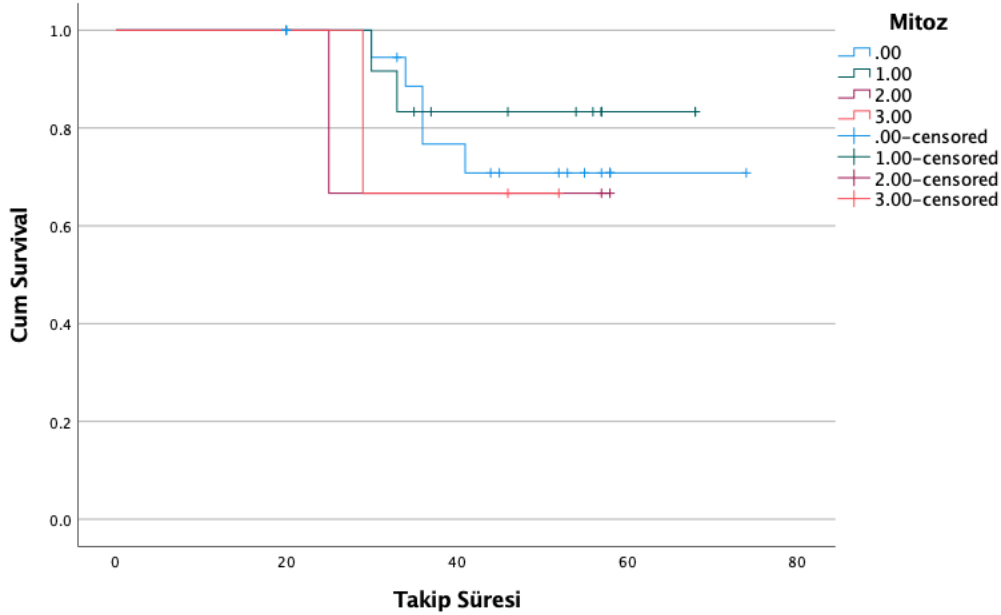
Resim 5: A. 2019 yılında opere olan hasta grad 2 astrositom tanısı alıyor (HEx400, İTF Patoloji Arşivi: 4140-19) B. 2022 yılında nüks sebebiyle opere edilen hastanın biyopsi materyaline ait kesitlerde grad 4'e progrese olduğu belirlendi (HEx400, İTF Patoloji Arşivi: 1112-22) C. Bu tümörde anti İDH-1 antikoruyla izlenen pozitiflik (x400, İTF Patoloji Arşivi: 1112-22)

Diğer vaka ise 2019 yılında opere olmuş ve grad 3 astrositom tanısı alan 39 yaşındaki bir erkek hastaya aitti. Bu hastanın da takiplerinde 2020 yılında nüks gözlemlendi ve tekrar opere edildi. Yapılan histopatolojik değerlendirmede tümörün grad 4 astrositom olduğu saptandı. Hastanın ilk tümör tanısından ölümüne kadar geçen süre 30 aydı.

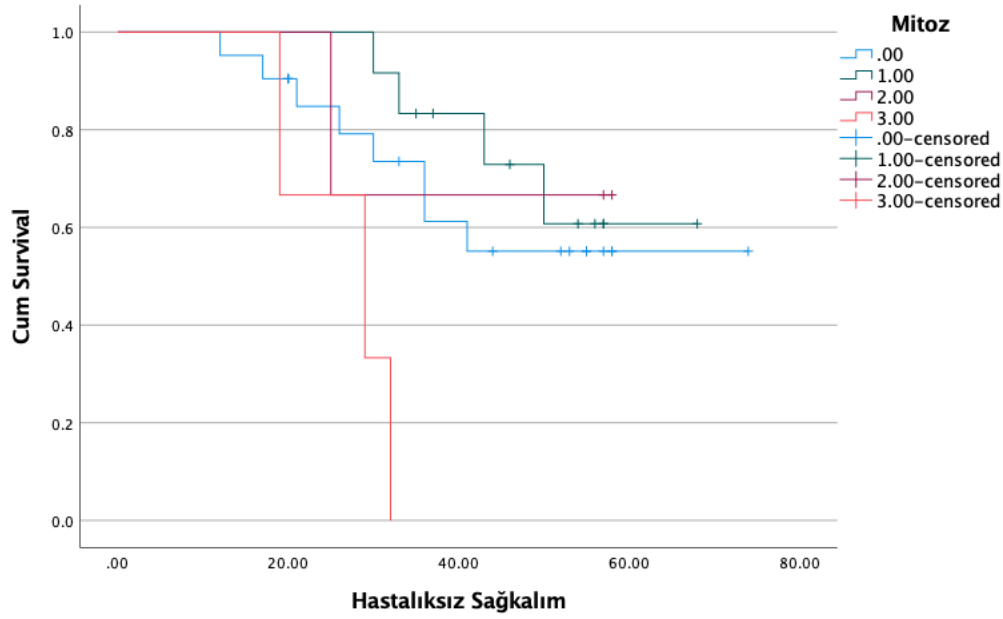


Resim 6: A. 2019 yılında opere olan hasta grad 3 astrositom tanısı almıştı (siyah oklar hapsolmuş nöronları göstermektedir) (HEEx400, İTF Patoloji Arşivi: 33563-19) B. Hastanın 2020 yılında nüks sebebiyle yapılan operasyon materyaline ait kesitlerde yaygın mikrovasküler proliferasyon odakları izlenmiş olup, grad 4 astrositom tanısı almıştır (HEEx200, İTF Patoloji Arşivi: 14347-20) C. Bu tümörde anti İDH-1 antikoruna ile izlenen reaksiyon (x200, İTF Patoloji Arşivi: 14347-20).

Tümörlerde 10 BBA'ya ($2,37 \text{ mm}^2$) düşen mitoz sayısı ile genel sağkalım arasındaki ilişki değerlendirildiğinde anlamlı istatistiksel fark bulunmadı ($p=0,748$). Aynı şekilde 10 BBA'ya ($2,37 \text{ mm}^2$) düşen mitoz sayısının hastalısız sağkalımla olan ilişkisi değerlendirildiğinde anlamlı istatistiksel fark görülmedi ($p=0,157$).



Şekil 3: Mitoz sayısı ile genel sağkalım arasındaki ilişki



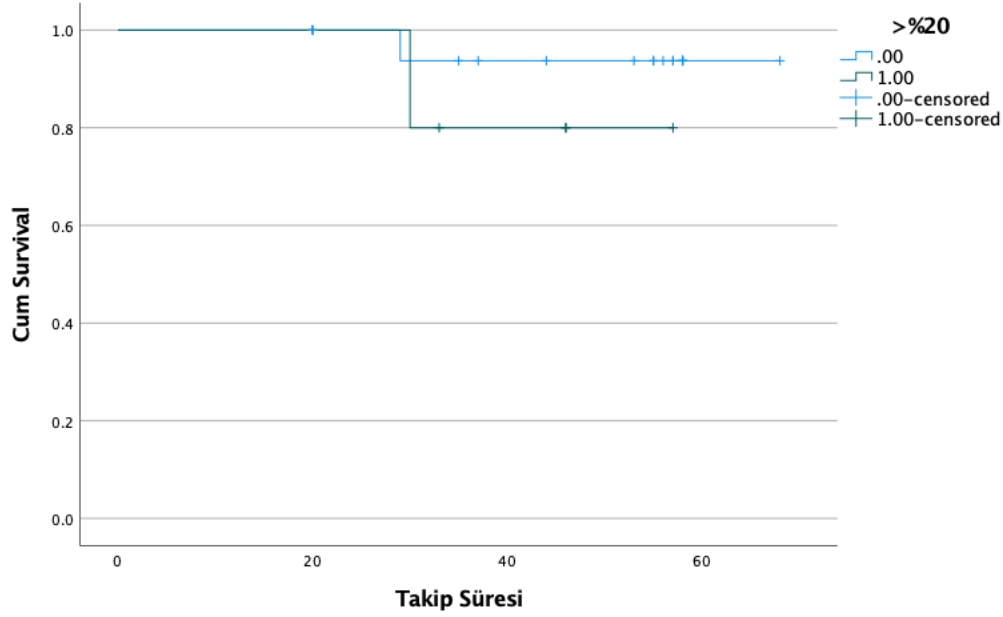
Şekil 4: Mitoz sayısı ile hastalıksız sağkalım arasındaki ilişki

III. FİSH İnceleme Bulguları

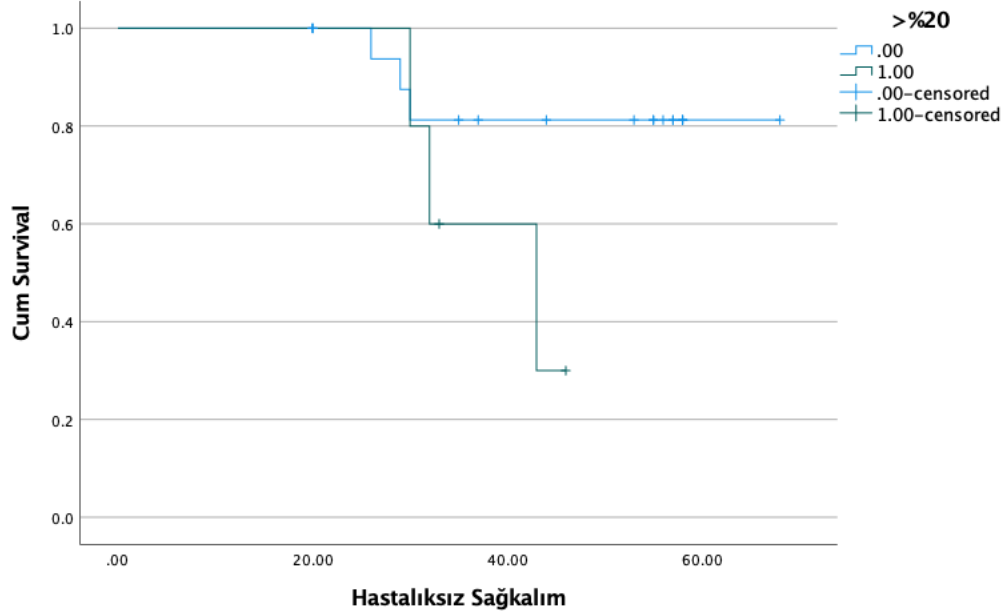
Tüm olgular CDKN2A/B ve EGFR gen bölgelerine delesyon/amplifikasyon açısından FİSH yöntemiyle incelendi.

III.A. CDKN2A/B FİSH İnceleme Bulguları

Toplam 39 adet olgu içerisinde 24'ünde (%61,53) değerlendirilebilir seviyede anlamlı sinyal elde edildi. Bu 24 vakanın 17'sinde (%70,83) %1,25 ile %31 oranında değişen düzeyde heterozigot delesyon saptandı. Kalan 7 vakada ise %2 ile %70 oranında değişen düzeyde homozigot delesyonlar belirlendi. Heterozigot delesyon gösteren vakaların hiçbirinde kırmızı sinyallerin yeşil sinyallere oranı (kırmızı sinyaller CDKN2A/B gen bölgesini, yeşil sinyaller kromozom 9'un sentromerik bölgesini temsil etmektedir) 0,8'in altında değildi. %20 ve üzerinde heterozigot delesyon gösteren vakaların genel sağkalım ve hastalıksız sağkalım ile ilişkisi değerlendirildiğinde istatistiksel anlamlı fark görülmedi (sırasıyla $p=0,399$ ve $p=0,118$).



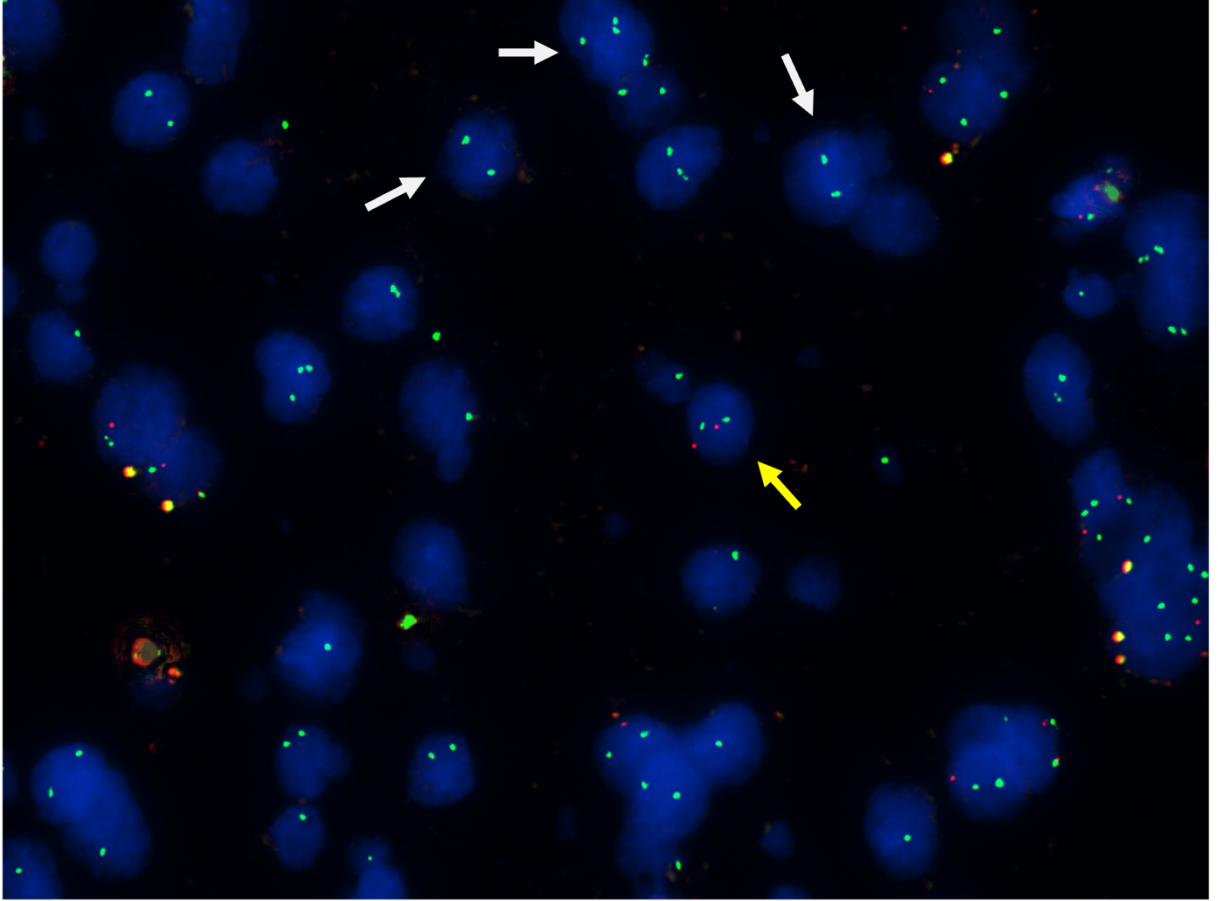
Şekil 5: %20 ve üzerinde heterozigot delesyon varlığının genel sağkalım ile ilişkisi



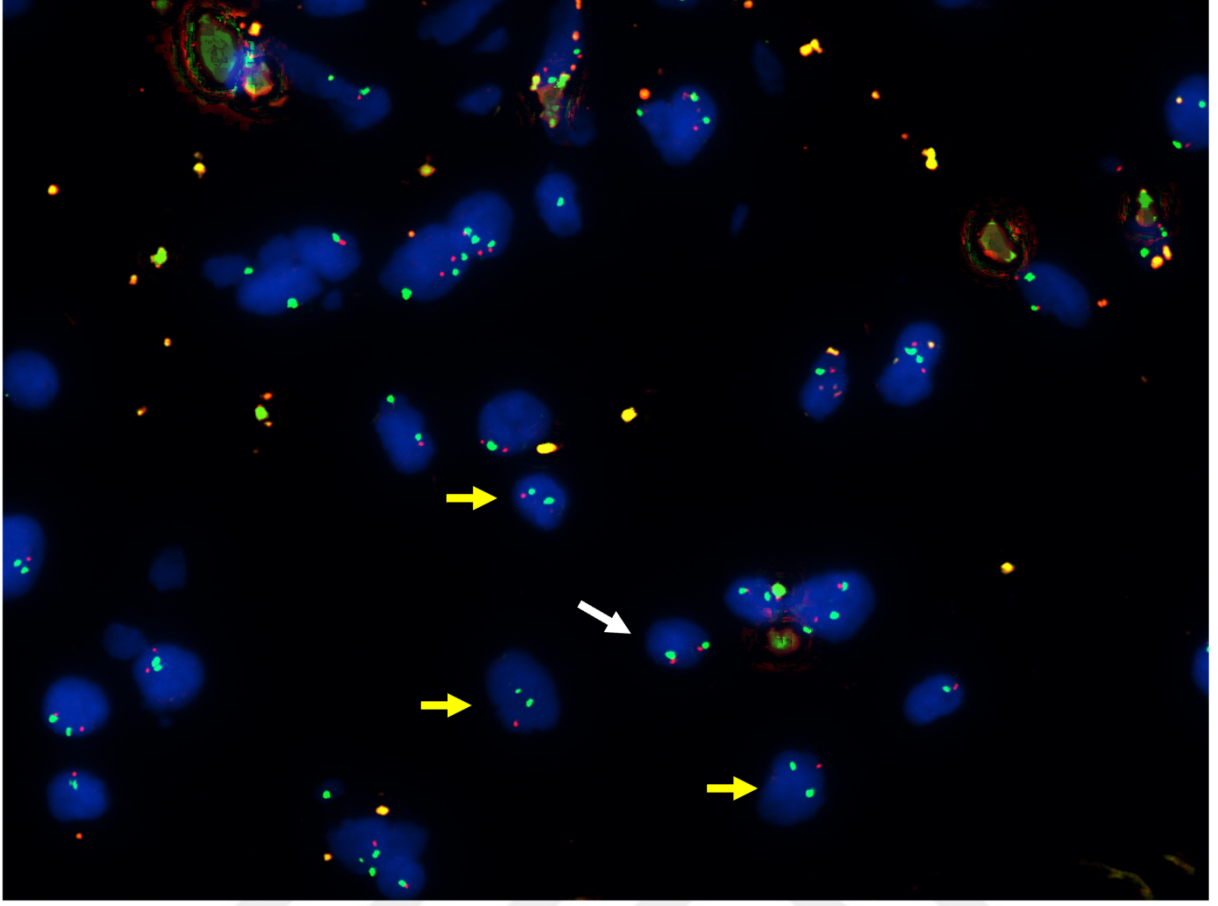
Şekil 6: %20 ve üzerinde heterozigot delesyon varlığının hastalıksız sağkalım ile ilişkisi

İki hastada sırasıyla %30 ve %76 olmak üzere yüksek oranda homozigot delesyon belirlendi. Ancak bu sadece 2 hasta ile sınırlı olduğundan sağlıklı sağkalım analizi yapılamadı. DSÖ 2021 yılı sınıflamasına göre bu iki hastanın grad 4 astrositom olarak sınıflanması gerektiği önerilmektedir. %30 oranında homozigot delesyon izlenen hasta daha önce grad 2 astrositom tanısı almış olan 44 yaşında bir kadın hasta olup, çalışma anında sağ olduğu belirlendi. İlk tanı

anından itibaren 58 ay geçen hastada 30'uncu ayda nüks saptanmış ve opere edilmiştir. Operasyon sonucunda grad 2 astrositom tanısı almıştır. Yüksek oranda homozigot delesyon saptanan diğer hasta (%76 oranında) 35 yaşında bir kadın hastadır. Takip süresi 20 ay olan bu hasta sağ olup, nüks yönünde radyolojik ya da klinik bulgusu yoktur. Grad 4 astrositoma progresyon olduğunu belirlediğimiz iki hastanın primer tümörlerine yönelik yapılan incelemede ise güvenilir sinyal saptanmadı.



Resim 7: Beyaz oklar: Homozigot delesyon, Sarı ok: Normal sinyaller (İTF Patoloji Arşivi: 28030-20)



Resim 8: Sarı oklar: Heterozigot delesyon Beyaz ok: Normal sinyaller (İTF Patoloji Arşivi: 32884-18)

III.B. EGFR FISH İnceleme Bulguları

Toplam 39 adet olgu içerisinde 27'sinde (%69,23) değerlendirilebilir seviyede anlamlı sinyal elde edildi. Bu 27 vakanın hiçbirinde tümör hücrelerindeki kırmızı sinyallerin yeşil sinyallere oranı 2'nin üzerinde değildi. Hiçbir vakada en az 4 sinyalden oluşan kırmızı sinyal kümeleri elde edilemedi. Bu sebeple olguların hiçbirinde EGFR genine yönelik amplifikasyon olmadığı saptandı.

BÖLÜM V

TARTIŞMA

Son yıllarda beyin tümörlerinin sınıflandırılmasında ve hastaların sağkalımlarını öngörmede histopatolojik özelliklerin yanısıra genetik özelliklerin de oldukça etkili olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. 2021 yılında yayımlanan MSS tümörleri DSÖ sınıflamasında bazı genetik özelliklerin (örneğin İDH mutant astrositomlarda saptanabilen CDKN2A/B geninde homozigot delesyon gibi) histopatolojik özelliklerden bağımsız olarak kötü klinik seyirle ilişkili olduğu belirtilmiştir(104).

Bu çalışmada merkezimizde 2016-2020 yılları arasında İDH mutant astrositom grad 2 ve grad 3 tanısı almış toplam 39 vakayı tümör gradı, 10 BBA'ya (2,37 mm²) düşen mitoz sayısı, CDKN2A/B delesyonları ve EGFR gen amplifikasyonlarının sağkalıma olan etkisi ve tümör gradını belirlemede bize sunabileceği objektif kriterler açısından değerlendirdik. Grad 2 ve grad 3 tümörleri sağkalıma istatistiksel anlamlı biçimde etki edecek şekilde mitoz sayısı, CDKN2A/B gen delesyonları ve EGFR amplifikasyonlarını kullanarak yeniden sınıflandırmayı hedefledik.

Astrositomların grad 2 veya grad 3 olarak ayırımında nükleer anaplazi varlığı, mitoz, artmış proliferatif kapasite gibi histopatolojik kriterler belirlenmesine rağmen her iki tümör grubu arasında sağkalıma yönelik anlamlı fark bulunmadığı ve her iki tümör grubunun benzer yaş aralığında görüldüğü birçok çalışmada tespit edilmiştir(5,92,96,97,105). Serimizde grad 2 ve grad 3 tümörler arasında genel ve hastalıksız sağkalım açısından anlamlı fark olmadığını (sırasıyla $p=0,218$ ve $p=0,495$) ve her iki tümör grubunun benzer yaştaki hastalarda görüldüğünü (sırasıyla ortalama $35,57\pm10,3$ ve $38,36\pm8,45$) belirledik. Bulgularımız literatürdeki verilerle uyumluluk göstermektedir.

Daha önce biri grad 2 diğeri grad 3 astrositom sebebiyle opere olmuş iki hastanın takiplerinde grad 4 astrositoma progresyon belirlenmiştir. DSÖ'nün 2016 yılı sınıflamasında eski ismiyle "sekonder glioblastom" olarak adlandırılan ancak yeni sınıflama ile grad 4

astrositom olarak isimlendirilen bu tümörlerin daha düşük gradlı bir tümör zemininden progrese olabildiğini göstermiş olduk. Korshunov ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada glioblastomlar (çalışmaya 2456 vaka dahil edilmiş) içinde İDH mutasyonu gösterenlerin oranı %4 düzeyinde -ki bu tümörler artık astrositom grad 4 olarak tanımlanmaktadır- olup, 29 tanesinin daha önce grad 2 veya grad 3 tümörler zemininden geliştiği gösterilmiştir(106). Ancak serimizde grad 4 tümöre progresyonu öngörmemizi sağlayacak histopatolojik ya da genetik bir bulgu belirleyemedik.

Yukarıda belirtilen bulguların yanında 10 BBA'daki (2,37 mm²) mitoz sayısının genel ve hastalıksız sağkalıma istatistiksel olarak anlamlı etki göstermediğini saptadık. Bu durum mitoz sayısının hesaplanırken apoptoz gibi süreçlerin mitozla karışmasından kaynaklanıyor olabilir. Bu durumu ortadan kaldıracı ve mitotik aktiviteyi daha objektif bir biçimde ortaya koyabilecek anti-fosfohiston 3 antikorunu kullanarak yapılan çalışmalarda da mitoz sayısının İDH mutant astrositomlarda sağkalıma etkisinin anlamlı olmadığı belirtilmiştir(5). Benzer şekilde mitotik aktivitenin sağkalıma etkisinin araştırıldığı birçok çalışmada sağkalım açısından anlamlı istatistiksel fark bulunmamıştır. Bulgularımız literatürdeki veriler ile uyumluluk göstermektedir.

ATRX immünohistokimyasal incelemesinde 29 (%74,35) vakada nükleer ekspresyon kaybı görülmüştür. Bu oran literatürdeki verilerle uyumludur(107).

Tüm olgular CDKN2A/B gen bölgesindeki delesyonlar açısından FISH yöntemiyle değerlendirilmiştir. Olguların 24 tanesinde (%61,53) değerlendirilebilir sinyal elde edilmiştir. Bu oran literatürdeki diğer çalışmalarla kıyaslandığı zaman düşük bulunmuştur(8,108). Bu durum materyallerin ameliyat sonrası fiksatif içine alınma süresi, fiksasyon süresi, parafin bloklar içerisinde saklama koşulları-süresi veya laboratuvar optimizasyonu ile ilişkili olabilir.

FISH inceleme sonuçları değerlendirildiğinde 17 (%70,83) vakada %1,25 ile %31 oranında değişen düzeyde heterozigot delesyon saptadık. Kalan 7 vakada ise %2 ile %70 oranında değişen düzeyde homozigot delesyonlar belirledik. Heterozigot delesyonların genel ve hastalıksız sağkalıma yönelik anlamlı bir fark oluşturmadığını saptadık (sırasıyla $p=0,399$ ve $p=0,118$). Bu durum değerlendirdiğimiz vaka sayısının azlığı ile ilişkili olabilir. İki vakada yüksek oranda (sırasıyla %30 ve %70 oranında) homozigot delesyon varlığı saptadık. Daha önce yapılan birçok araştırmada CDKN2A/B gen bölgesindeki homozigot delesyonların sağkalıma anlamlı derecede kötü etki gösterdiği belirlenmiştir(6,60,93,94,108,109). Her iki hasta da çalışmamız sırasında sağ olup, agresif klinik seyri destekleyecek bulgular

göstermemiştir. Ancak her iki hastanın da takip süreleri kısadır ve güvenilir yorum yapmak için daha uzun takip sürelerinin gerektiği düşünülmüştür.

EGFR geninde amplifikasyona yönelik yapılan FISH incelemede 27 (%69,23) olguda değerlendirilebilir sinyal elde edilebilmiştir. Bu oran literatürdeki verilere kıyasla düşük bir orandır. Hiçbir olguda tümör hücrelerinde izlenen kırmızı sinyallerin yeşil sinyallere oranı 2'nin üzerinde bulunmamış olup, çalışma grubundaki vakalarımızda EGFR geninde amplifikasyon olmadığı sonucuna varılmıştır. EGFR gen amplifikasyonları IDH mutasyonu göstermeyen astrositer tümörlerde, glioblastomlarda TERT promotor bölge mutasyonları ve kombine kromozom +7/-10 gibi genetik özelliklere eşlik etmektedir(110–115). Tümü IDH mutasyonu gösteren vaka serimizde EGFR amplifikasyonu saptanmamış olması literatürdeki verilerle uyumlu olup, IDH mutant tümörler ile IDH mutasyonu göstermeyen astrositer tümörlerin farklı genetik mutasyonlar sonucu ortaya çıktığını destekler niteliktedir.

BÖLÜM VI

SONUÇLAR

- Çalışmamızda grad 2 veya grad 3 astrositom tanısı almış 39 vakaya yer verilmiştir.
- Grad 2 ve grad 3 astrositomların benzer yaş grubunda görüldüğü belirlenmiştir (sırasıyla ortalama $35,57 \pm 10,3$ ve $38,36 \pm 8,45$).
- Tüm vakalar supratentoryal yerleşimli olup en sık görülen lokalizasyon frontal lobdur (%48,71).
- ATRX immünohistokimyasal incelemesinde 29 (%74,35) vakada nükleer ekspresyon kaybı saptandı.
- Tümör gradının genel sağkalıma ve hastalıksız sağkalıma etkisi araştırıldığında istatistiksel anlamlı fark görülmemiştir (sırasıyla $p=0,218$ ve $p=0,495$).
- Biri grad 2 astrositom, diğeri grad 3 astrositom sebebiyle takip edilen iki (%5,12) hastada grad 4 astrositoma progresyon belirlenmiştir.
- 10 BBA'ya ($2,37 \text{ mm}^2$) düşen mitoz sayısının genel sağkalıma ve hastalıksız sağkalıma etkisi araştırıldığında anlamlı istatistiksel fark saptanmamıştır (sırasıyla $p=0,748$ ve $p=0,157$).
- CDKN2A/B FISH incelemelerinde vakaların %61,53'ünde değerlendirilebilir sinyal elde edilmiştir. Bu oran literatüre kıyasla düşük bulunmuştur.
- Heterozigot delesyonların genel sağkalıma ve hastalıksız sağkalıma olan etkileri araştırılmış, anlamlı istatistiksel fark saptanmamıştır (sırasıyla $p=0,399$ ve $p=0,118$). Ancak bu durumun daha çok vaka üzerinde değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.
- Yüksek oranda (%30 ve üzeri) homozigot delesyon varlığı iki vakada saptanmıştır. Bu tümörlerin DSÖ MSS tümörleri 2021 sınıflamasına göre grad 4 astrositom olarak sınıflanması önerilmektedir. Ancak bu iki hastanın sağkalım verilerine bakıldığında klinik seyirlerinde diğer grad 2 ya da grad 3 tümörlere benzer olduğu görülmüştür. Ancak hastaların takip sürelerinin kısıtlı olduğu akılda tutulmalıdır.
- EGFR FISH incelemelerinde 27 vakada (%69,23) değerlendirilebilir sinyal saptanmıştır. Bu oran literatürde bildirilen oranlara göre düşüktür. Değerlendirilen olguların hiçbirinde amplifikasyon saptanmamıştır. Bu değerlendirme yapılan vaka sayısının az olması ile ilişkili olabileceği gibi glioblastomlara kıyasla IDH mutant astrositomların etyopatogenezinde etken olmamasıyla ilişkili olabilir.

BÖLÜM VII

KAYNAKLAR

1. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Neuro Oncol.* Oxford University Press; 2021;23(8):1231-51. DOI: 10.1093/neuonc/noab106
2. Brat DJ, Aldape K, Colman H, Figarella-Branger D, Fuller GN, Giannini C, et al. cIMPACT-NOW update 5: recommended grading criteria and terminologies for IDH-mutant astrocytomas. *Acta Neuropathol.* Springer; 2020;139(3):603-8. DOI: 10.1007/s00401-020-02127-9
3. Cancer Genome Atlas Research Network, Brat DJ, Verhaak RGW, Aldape KD, Yung WKA, Salama SR, et al. Comprehensive, integrative genomic analysis of diffuse lower-grade gliomas. *N Engl J Med.* 2015;372(26):2481-98. DOI: 10.1056/NEJMoa1402121
4. Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, Walsh KM, Decker PA, Sicotte H, et al. Glioma groups based on 1p/19q, IDH, and TERT promoter mutations in tumors. *N Engl J Med.* 2015;372(26):2499-508. DOI: 10.1056/NEJMoa1407279
5. Olar A, Wani KM, Alfaro-Munoz KD, Heathcock LE, van Thuijl HF, Gilbert MR, et al. IDH mutation status and role of WHO grade and mitotic index in overall survival in grade II–III diffuse gliomas. *Acta Neuropathol.* Springer Verlag; 2015;129(4):585-96. DOI: 10.1007/s00401-015-1398-z
6. Reis GF, Pekmezci M, Hansen HM, Rice T, Marshall RE, Molinaro AM, et al. CDKN2A loss is associated with shortened overall survival in lower-grade (World Health Organization Grades II-III) astrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2015;74(5):442-52. DOI: 10.1097/NEN.0000000000000188
7. Reuss DE, Mamatjan Y, Schrimpf D, Capper D, Hovestadt V, Kratz A, et al. IDH mutant diffuse and anaplastic astrocytomas have similar age at presentation and little difference in survival: a grading problem for WHO. *Acta Neuropathol.* Springer Verlag; 2015;129(6):867-73. DOI: 10.1007/s00401-015-1438-8

8. Reis GF, Pekmezci M, Hansen HM, Rice T, Marshall RE, Molinaro AM, et al. CDKN2A loss is associated with shortened overall survival in lower-grade (World Health Organization Grades II-III) astrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2015;74(5):442-52. DOI: 10.1097/NEN.0000000000000188
9. Lai A, Kharbanda S, Pope WB, Tran A, Solis OE, Peale F, et al. Evidence for sequenced molecular evolution of IDH1 mutant glioblastoma from a distinct cell of origin. *J Clin Oncol*. 2011;29(34):4482-90. DOI: 10.1200/JCO.2010.33.8715
10. Stockhammer F, Misch M, Helms H-J, Lengler U, Prall F, von Deimling A, et al. IDH1/2 mutations in WHO grade II astrocytomas associated with localization and seizure as the initial symptom. *Seizure*. 2012;21(3):194-7. DOI: 10.1016/j.seizure.2011.12.007
11. Carrillo JA, Lai A, Nghiemphu PL, Kim HJ, Phillips HS, Kharbanda S, et al. Relationship between tumor enhancement, edema, IDH1 mutational status, MGMT promoter methylation, and survival in glioblastoma. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2012;33(7):1349-55. DOI: 10.3174/ajnr.A2950
12. Weller M, van den Bent M, Tonn JC, Stupp R, Preusser M, Cohen-Jonathan-Moyal E, et al. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Lancet Oncol*. 2017;18(6):e315-29. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30194-8
13. van den Bent MJ, Wefel JS, Schiff D, Taphoorn MJB, Jaeckle K, Junck L, et al. Response assessment in neuro-oncology (a report of the RANO group): assessment of outcome in trials of diffuse low-grade gliomas. *Lancet Oncol*. 2011;12(6):583-93. DOI: 10.1016/S1470-2045(11)70057-2
14. Patel SH, Poisson LM, Brat DJ, Zhou Y, Cooper L, Snuderl M, et al. T2-FLAIR mismatch, an imaging biomarker for IDH and 1p/19q status in lower-grade gliomas: A TCGA/TCIA project. *Clin Cancer Res*. 2017;23(20):6078-85. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0560
15. Juratli TA, Tummala SS, Riedl A, Daubner D, Hennig S, Penson T, et al. Radiographic assessment of contrast enhancement and T2/FLAIR mismatch sign in lower grade gliomas: correlation with molecular groups. *J Neurooncol*. 2019;141(2):327-35. DOI: 10.1007/s11060-018-03034-6

16. Zhao K, Sun G, Wang Q, Xue Z, Liu G, Xia Y, et al. The diagnostic value of conventional MRI and CT features in the identification of the IDH1-mutant and 1p/19q co-deletion in WHO grade II gliomas. *Acad Radiol.* 2021;28(7):e189-98. DOI: 10.1016/j.acra.2020.03.008
17. Jakola AS, Skjulsvik AJ, Myrnes KS, Sjøvik K, Unsgård G, Torp SH, et al. Surgical resection versus watchful waiting in low-grade gliomas. *Annals of Oncology.* Oxford University Press; 2017;28(8):1942. DOI: 10.1093/ANNONC/MDX230
18. Weller M, van den Bent M, Preusser M, Le Rhun E, Tonn JC, Minniti G, et al. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat Rev Clin Oncol.* 2021;18(3):170-86. DOI: 10.1038/s41571-020-00447-z
19. Ferris SP, Goode B, Joseph NM, Kline CN, Samuel D, Gupta N, et al. IDH1 mutation can be present in diffuse astrocytomas and giant cell glioblastomas of young children under 10 years of age. *Acta Neuropathol.* 2016;132(1):153-5. DOI: 10.1007/s00401-016-1579-4
20. Pollack IF, Hamilton RL, Sobol RW, Nikiforova MN, Lyons-Weiler MA, LaFramboise WA, et al. IDH1 mutations are common in malignant gliomas arising in adolescents: a report from the Children's Oncology Group. *Childs Nerv Syst.* 2011;27(1):87-94. DOI: 10.1007/s00381-010-1264-1
21. Robinson C, Kleinschmidt-DeMasters BK. IDH1-mutation in diffuse gliomas in persons age 55 years and over. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2017;76(2):151-4. DOI: 10.1093/jnen/nlw112
22. Barresi V, Eccher A, Simbolo M, Cappellini R, Ricciardi GK, Calabria F, et al. Diffuse gliomas in patients aged 55 years or over: A suggestion for IDH mutation testing. *Neuropathology.* 2020;40(1):68-74. DOI: 10.1111/neup.12608
23. Jenkins RB, Xiao Y, Sicotte H, Decker PA, Kollmeyer TM, Hansen HM, et al. A low-frequency variant at 8q24.21 is strongly associated with risk of oligodendroglial tumors and astrocytomas with IDH1 or IDH2 mutation. *Nat Genet.* 2012;44(10):1122-5. DOI: 10.1038/NG.2388
24. Eckel-Passow JE, Drucker KL, Kollmeyer TM, Kosel ML, Decker PA, Molinaro AM, et al. Adult diffuse glioma GWAS by molecular subtype identifies variants in D2HGDH and FAM20C. *Neuro Oncol.* 2020;22(11):1602-13. DOI: 10.1093/neuonc/noaa117

25. Melin BS, Barnholtz-Sloan JS, Wrensch MR, Johansen C, Il'yasova D, Kinnersley B, et al. Genome-wide association study of glioma subtypes identifies specific differences in genetic susceptibility to glioblastoma and non-glioblastoma tumors. *Nat Genet.* *Nat Genet*; 2017;49(5):789-94. DOI: 10.1038/NG.3823
26. Shete S, Hosking FJ, Robertson LB, Dobbins SE, Sanson M, Malmer B, et al. Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma. *Nat Genet.* *Nat Genet*; 2009;41(8):899-904. DOI: 10.1038/NG.407
27. Kleihues P, Schäuble B, zur Hausen A, Estève J, Ohgaki H. Tumors associated with p53 germline mutations: a synopsis of 91 families. *Am J Pathol.* 1997;150(1):1-13.
28. Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, Ohgaki H, Kleihues P, Hainaut P, et al. Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res.* 2003;63(20):6643-50.
29. Watanabe T, Vital A, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. Selective acquisition of IDH1 R132C mutations in astrocytomas associated with Li-Fraumeni syndrome. *Acta Neuropathol.* 2009;117(6):653-6. DOI: 10.1007/s00401-009-0528-x
30. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 2009;360(8):765-73. DOI: 10.1056/NEJMoa0808710
31. Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol.* 2009;174(4):1149-53. DOI: 10.2353/ajpath.2009.080958
32. Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, von Deimling A. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol.* 2008;116(6):597-602. DOI: 10.1007/s00401-008-0455-2
33. Tan CL, Vellayappan B, Wu B, Yeo TT, McLendon RE. Molecular profiling of different glioma specimens from an Ollier disease patient suggests a multifocal disease process in the setting of IDH mosaicism. *Brain Tumor Pathol.* 2018;35(4):202-8. DOI: 10.1007/s10014-018-0327-y
34. Hofman S, Heeg M, Klein JP, Krikke AP. Simultaneous occurrence of a supra- and an infratentorial glioma in a patient with Ollier's disease: more evidence for non-

- mesodermal tumor predisposition in multiple enchondromatosis. *Skeletal Radiol.* 1998;27(12):688-91. DOI: 10.1007/s002560050460
35. Frappaz D, Ricci AC, Kohler R, Bret P, Mottotese C. Diffuse brain stem tumor in an adolescent with multiple enchondromatosis (Ollier's disease). *Childs Nerv Syst.* 1999;15(5):222-5. DOI: 10.1007/s003810050377
 36. Bonnet C, Thomas L, Psimaras D, Bielle F, Vauléon E, Loiseau H, et al. Characteristics of gliomas in patients with somatic IDH mosaicism. 2016; DOI: 10.1186/s40478-016-0302-y
 37. Dodgshun AJ, Fukuoka K, Edwards M, Bianchi VJ, Das A, Sexton-Oates A, et al. Germline-driven replication repair-deficient high-grade gliomas exhibit unique hypomethylation patterns. *Acta Neuropathol.* Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2020;140(5):765-76. DOI: 10.1007/S00401-020-02209-8/FIGURES/4
 38. Bakry D, Aronson M, Durno C, Rimawi H, Farah R, Alharbi QK, et al. Genetic and clinical determinants of constitutional mismatch repair deficiency syndrome: report from the constitutional mismatch repair deficiency consortium. *Eur J Cancer.* 2014;50(5):987-96. DOI: 10.1016/j.ejca.2013.12.005
 39. Touat M, Li YY, Boynton AN, Spurr LF, Iorgulescu JB, Bohrsen CL, et al. Mechanisms and therapeutic implications of hypermutation in gliomas. *Nature.* NIH Public Access; 2020;580(7804):517. DOI: 10.1038/S41586-020-2209-9
 40. López GY, van Ziffle J, Onodera C, Grenert JP, Yeh I, Bastian BC, et al. The genetic landscape of gliomas arising after therapeutic radiation. *Acta Neuropathol.* NIH Public Access; 2019;137(1):139. DOI: 10.1007/S00401-018-1906-Z
 41. Rollison DEM, Utaipat U, Ryschkewitsch C, Hou J, Goldthwaite P, Daniel R, et al. Investigation of human brain tumors for the presence of polyomavirus genome sequences by two independent laboratories. *Int J Cancer.* John Wiley & Sons, Ltd; 2005;113(5):769-74. DOI: 10.1002/IJC.20641
 42. Venteicher AS, Tirosh I, Hebert C, Yizhak K, Neftel C, Filbin MG, et al. Decoupling genetics, lineages, and microenvironment in IDH-mutant gliomas by single-cell RNA-seq. *Science.* Science; 2017;355(6332). DOI: 10.1126/SCIENCE.AAI8478

43. Turcan S, Makarov V, Taranda J, Wang Y, Fabius AWM, Wu W, et al. Mutant-IDH1-dependent chromatin state reprogramming, reversibility, and persistence. *Nat Genet.* NIH Public Access; 2018;50(1):62. DOI: 10.1038/S41588-017-0001-Z
44. Zong H, Parada LF, Baker SJ. Cell of origin for malignant gliomas and its implication in therapeutic development. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015;7(5):1-13. DOI: 10.1101/CSHPERSPECT.A020610
45. Lindberg N, Jiang Y, Xie Y, Bolouri H, Kastemar M, Olofsson T, et al. Oncogenic signaling is dominant to cell of origin and dictates astrocytic or oligodendroglial tumor development from oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci.* J Neurosci; 2014;34(44):14644-51. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2977-14.2014
46. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res.* Clin Cancer Res; 2013;19(4):764-72. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3002
47. Chen R, Nishimura MC, Kharbanda S, Peale F, Deng Y, Daemen A, et al. Hominoid-specific enzyme GLUD2 promotes growth of IDH1R132H glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Proc Natl Acad Sci U S A; 2014;111(39):14217-22. DOI: 10.1073/PNAS.1409653111
48. Waitkus MS, Pirozzi CJ, Moure CJ, Diplas BH, Hansen LJ, Carpenter AB, et al. Adaptive evolution of the GDH2 allosteric domain promotes gliomagenesis by resolving IDH1R132H induced metabolic liabilities. *Cancer Res.* NIH Public Access; 2018;78(1):36. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1352
49. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JCH, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* (1979). 2008;321(5897):1807-12. DOI: 10.1126/SCIENCE.1164382
50. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* N Engl J Med; 2009;360(8):765-73. DOI: 10.1056/NEJMOA0808710
51. Xu X, Zhao J, Xu Z, Peng B, Huang Q, Arnold E, et al. Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity. *J Biol Chem.* J Biol Chem; 2004;279(32):33946-57. DOI: 10.1074/JBC.M404298200

52. Jiao Y, Killela PJ, Reitman ZJ, Rasheed BA, Heaphy CM, de Wilde RF, et al. Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget*. *Oncotarget*; 2012;3(7):709-22. DOI: 10.18632/ONCOTARGET.588
53. Kannan K, Inagaki A, Silber J, Gorovets D, Zhang J, Kastenhuber ER, et al. Whole-exome sequencing identifies ATRX mutation as a key molecular determinant in lower-grade glioma. *Oncotarget*. *Oncotarget*; 2012;3(10):1194-204. DOI: 10.18632/ONCOTARGET.689
54. Brat DJ, Verhaak RG, Aldape KD, Yung WK, Salama SR, Cooper LA, et al. Comprehensive, integrative genomic analysis of diffuse lower-grade gliomas. *N Engl J Med*. *N Engl J Med*; 2015;372(26):2481-98. DOI: 10.1056/NEJMOA1402121
55. Heaphy CM, de Wilde RF, Jiao Y, Klein AP, Edil BH, Shi C, et al. Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science*. NIH Public Access; 2011;333(6041):425. DOI: 10.1126/SCIENCE.1207313
56. Conte D, Huh M, Goodall E, Delorme M, Parks RJ, Picketts DJ. Loss of Atrx sensitizes cells to DNA damaging agents through p53-mediated death pathways. *PLoS One*. *PLoS One*; 2012;7(12). DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0052167
57. Ichimura K, Narita Y, Hawkins CE. Diffusely infiltrating astrocytomas: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol*. *Acta Neuropathol*; 2015;129(6):789-808. DOI: 10.1007/S00401-015-1439-7
58. Shirahata M, Ono T, Stichel D, Schrimpf D, Reuss DE, Sahm F, et al. Novel, improved grading system(s) for IDH-mutant astrocytic gliomas. *Acta Neuropathol*. *Acta Neuropathol*; 2018;136(1):153-66. DOI: 10.1007/S00401-018-1849-4
59. Appay R, Dehais C, Maurage CA, Alentorn A, Carpentier C, Colin C, et al. CDKN2A homozygous deletion is a strong adverse prognosis factor in diffuse malignant IDH-mutant gliomas. *Neuro Oncol*. Oxford University Press; 2019;21(12):1519-28. DOI: 10.1093/neuonc/noz124
60. Appay R, Dehais C, Maurage CA, Alentorn A, Carpentier C, Colin C, et al. CDKN2A homozygous deletion is a strong adverse prognosis factor in diffuse malignant IDH-mutant gliomas. *Neuro Oncol*. Oxford University Press; 2019;21(12):1519. DOI: 10.1093/NEUONC/NOZ124

61. Giannini C, Scheithauer BW, Burger PC, Christensen MR, Wollan PC, Sebo TJ, et al. Cellular proliferation in pilocytic and diffuse astrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. *J Neuropathol Exp Neurol*; 1999;58(1):46-53. DOI: 10.1097/00005072-199901000-00006
62. Coons SW, Pearl DK. Mitosis identification in diffuse gliomas: implications for tumor grading. *Cancer [En ligne]*. 1998 [cité le 26 juin 2022];82(8):1550-5. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9554533>
63. Korshunov A, Casalini B, Chavez L, Hielscher T, Sill M, Ryzhova M, et al. Integrated molecular characterization of IDH-mutant glioblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*. John Wiley & Sons, Ltd; 2019;45(2):108-18. DOI: 10.1111/NAN.12523
64. Kleihues P, Kiessling M, Janzer RC. Morphological markers in neuro-oncology. *Curr Top Pathol*. 1987;77:307-38. DOI: 10.1007/978-3-642-71356-9_13
65. Watanabe K, Tachibana O, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Role of gemistocytes in astrocytoma progression. *Lab Invest*. 1997;76(2):277-84.
66. Herpers MJ, Ramaekers FC, Aldeweireldt J, Moesker O, Slooff J. Co-expression of glial fibrillary acidic protein- and vimentin-type intermediate filaments in human astrocytomas. *Acta Neuropathol*. 1986;70(3-4):333-9. DOI: 10.1007/BF00686093
67. Ghimenti C, Fiano V, Chiadò-Piat L, Chì A, Cavalla P, Schiffer D. Deregulation of the p14 ARF ARF ARF /Mdm2/p53 pathway and G1/S transition in two glioblastoma sets. *J Neurooncol*. 2003;61:95-102.
68. Takami H, Yoshida A, Fukushima S, Arita H, Matsushita Y, Nakamura T, et al. Revisiting TP53 mutations and immunohistochemistry - A comparative study in 157 diffuse gliomas. *Brain Pathology*. Wiley-Blackwell; 2015;25(3):256-65. DOI: 10.1111/BPA.12173/SUPPINFO
69. Bleeker FE, Atai NA, Lamba S, Jonker A, Rijkeboer D, Bosch KS, et al. The prognostic IDH1R132 mutation is associated with reduced NADP+-dependent IDH activity in glioblastoma. *Acta Neuropathol*. Springer; 2010;119(4):487. DOI: 10.1007/S00401-010-0645-6
70. Lee SM, Koh HJ, Park DC, Song BJ, Huh TL, Park JW. Cytosolic NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells. *Free Radic Biol*

- Med. Free Radic Biol Med; 2002;32(11):1185-96. DOI: 10.1016/S0891-5849(02)00815-8
71. Kim SY, Park JW. Cellular defense against singlet oxygen-induced oxidative damage by cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. *Free Radic Res. Free Radic Res*; 2003;37(3):309-16. DOI: 10.1080/1071576021000050429
 72. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature. NIH Public Access*; 2009;462(7274):739. DOI: 10.1038/NATURE08617
 73. Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, Kim SH, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell. NIH Public Access*; 2011;19(1):17. DOI: 10.1016/J.CCR.2010.12.014
 74. Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, et al. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell. NIH Public Access*; 2010;17(5):510. DOI: 10.1016/J.CCR.2010.03.017
 75. Wiestler B, Capper D, Hovestadt V, Sill M, Jones DTW, Hartmann C, et al. Assessing CpG island methylator phenotype, 1p/19q codeletion, and MGMT promoter methylation from epigenome-wide data in the biomarker cohort of the NOA-04 trial. *Neuro Oncol. Oxford University Press*; 2014;16(12):1630. DOI: 10.1093/NEUONC/NOU138
 76. Wiestler B, Capper D, Sill M, Jones DTW, Hovestadt V, Sturm D, et al. Integrated DNA methylation and copy-number profiling identify three clinically and biologically relevant groups of anaplastic glioma. *Acta Neuropathol. Acta Neuropathol*; 2014;128(4):561-71. DOI: 10.1007/S00401-014-1315-X
 77. de Carvalho DD, You JS, Jones PA. DNA methylation and cellular reprogramming. *Trends Cell Biol. NIH Public Access*; 2010;20(10):609. DOI: 10.1016/J.TCB.2010.08.003
 78. Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet. Hum Mol Genet*; 2007;16 Spec No 1(R1). DOI: 10.1093/HMG/DDM018

79. Berdasco M, Esteller M. Aberrant epigenetic landscape in cancer: How cellular identity goes awry. *Dev Cell*. Elsevier; 2010;19(5):698-711. DOI: 10.1016/J.DEVCEL.2010.10.005
80. Capper D, Zentgraf H, Balss J, Hartmann C, von Deimling A. Monoclonal antibody specific for IDH1 R132H mutation. *Acta Neuropathol*. 2009;118(5):599-601. DOI: 10.1007/s00401-009-0595-z
81. Wong LH, McGhie JD, Sim M, Anderson MA, Ahn S, Hannan RD, et al. ATRX interacts with H3.3 in maintaining telomere structural integrity in pluripotent embryonic stem cells. *Genome Res*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2010;20(3):351. DOI: 10.1101/GR.101477.109
82. Liu XY, Gerges N, Korshunov A, Sabha N, Khuong-Quang DA, Fontebasso AM, et al. Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. *Acta Neuropathol*. Springer; 2012;124(5):615-25. DOI: 10.1007/S00401-012-1031-3/FIGURES/4
83. Schwartzenuber J, Korshunov A, Liu XY, Jones DTW, Pfaff E, Jacob K, et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* 2012 482:7384. Nature Publishing Group; 2012;482(7384):226-31. DOI: 10.1038/nature10833
84. Mangerel J, Price A, Castelo-Branco P, Brzezinski J, Buczkowicz P, Rakopoulos P, et al. Alternative lengthening of telomeres is enriched in, and impacts survival of TP53 mutant pediatric malignant brain tumors. *Acta Neuropathol*. Springer Verlag; 2014;128(6):853-62. DOI: 10.1007/S00401-014-1348-1/FIGURES/4
85. Lovejoy CA, Li W, Reisenweber S, Thongthip S, Bruno J, de Lange T, et al. Loss of ATRX, genome instability, and an altered DNA damage response are hallmarks of the alternative lengthening of telomeres pathway. *PLoS Genet*. Public Library of Science; 2012;8(7):1002772. DOI: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1002772
86. Cheung NK v., Zhang J, Lu C, Parker M, Bahrami A, Tickoo SK, et al. Association of age at diagnosis and denetic mutations in patients with neuroblastoma. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. NIH Public Access; 2012;307(10):1062. DOI: 10.1001/JAMA.2012.228

87. Brosnan-Cashman JA, Davis CM, Diplas BH, Meeker AK, Rodriguez FJ, Heaphy CM. SMARCA1 loss and alternative lengthening of telomeres (ALT) are enriched in giant cell glioblastoma. *Modern Pathology* 2021 34:10. Nature Publishing Group; 2021;34(10):1810-9. DOI: 10.1038/s41379-021-00841-7
88. Diplas BH, He X, Brosnan-Cashman JA, Liu H, Chen LH, Wang Z, et al. The genomic landscape of TERT promoter wildtype-IDH wildtype glioblastoma. *Nature Communications* 2018 9:1. Nature Publishing Group; 2018;9(1):1-11. DOI: 10.1038/s41467-018-04448-6
89. Simon M, Köster G, Menon AG, Schramm J. Functional evidence for a role of combined CDKN2A (p16-p14(ARF))/CDKN2B (p15) gene inactivation in malignant gliomas. *Acta Neuropathol.* *Acta Neuropathol*; 1999;98(5):444-52. DOI: 10.1007/S004010051107
90. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993 366:6456. Nature Publishing Group; 1993;366(6456):704-7. DOI: 10.1038/366704a0
91. Sherr CJ. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2001 2:10. Nature Publishing Group; 2001;2(10):731-7. DOI: 10.1038/35096061
92. Yoda RA, Marxen T, Longo L, Ene C, Wirsching HG, Keene CD, et al. Mitotic index thresholds do not predict clinical outcome for IDH-Mutant astrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol.* *J Neuropathol Exp Neurol*; 2019;78(11):1002-10. DOI: 10.1093/JNEN/NLZ082
93. Yang RR, Shi Z feng, Zhang Z yu, Chan AKY, Aibaidula A, Wang W wei, et al. IDH mutant lower grade (WHO Grades II/III) astrocytomas can be stratified for risk by CDKN2A, CDK4 and PDGFRA copy number alterations. *Brain Pathology.* Wiley-Blackwell; 2020;30(3):541. DOI: 10.1111/BPA.12801
94. Shirahata M, Ono T, Stichel D, Schrimpf D, Reuss DE, Sahm F, et al. Novel, improved grading system(s) for IDH-mutant astrocytic gliomas. *Acta Neuropathol.* *Acta Neuropathol*; 2018;136(1):153-66. DOI: 10.1007/S00401-018-1849-4

95. Korshunov A, Casalini B, Chavez L, Hielscher T, Sill M, Ryzhova M, et al. Integrated molecular characterization of IDH-mutant glioblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol.* *Neuropathol Appl Neurobiol*; 2019;45(2):108-18. DOI: 10.1111/NAN.12523
96. Cimino PJ, Zager M, McFerrin L, Wirsching HG, Bolouri H, Hentschel B, et al. Multidimensional scaling of diffuse gliomas: application to the 2016 World Health Organization classification system with prognostically relevant molecular subtype discovery. *Acta Neuropathol Commun.* *BioMed Central*; 2017;5(1):39. DOI: 10.1186/S40478-017-0443-7
97. Aoki K, Nakamura H, Suzuki H, Matsuo K, Kataoka K, Shimamura T, et al. Prognostic relevance of genetic alterations in diffuse lower-grade gliomas. *Neuro Oncol.* *Oxford University Press*; 2018;20(1):66. DOI: 10.1093/NEUONC/NOX132
98. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* *Cell*; 2000;103(2):211-25. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)00114-8
99. Hunter T. Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. *Curr Opin Cell Biol.* *NIH Public Access*; 2009;21(2):140. DOI: 10.1016/J.CEB.2009.01.028
100. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* *American Society for Investigative Pathology*; 2007;170(5):1445. DOI: 10.2353/AJPATH.2007.070011
101. Komori T. Grading of adult diffuse gliomas according to the 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System. Vol. 102, *Laboratory Investigation* Springer Nature; 2022. p. 126-33.
102. Wong QH-W, Kay •, Li K-W, Wang W-W, Malta TM, Noushmehr H, et al. Molecular landscape of IDH-mutant primary astrocytoma Grade IV/ glioblastomas. *Modern Pathology.* 2021;34:1245-60. DOI: 10.1038/s41379-021-00778-x
103. French PJ, Eoli M, Sepulveda JM, de Heer I, Kros JM, Walenkamp A, et al. European organisation for research and treatment of cancer (EORTC) headquarters. *Neuro Oncol.* *AbbVie*; 2019;21(10):1263-72. DOI: 10.1093/neuonc/noz096
104. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol.* *Oxford Academic*; 2021;23(8):1231-51. DOI: 10.1093/NEUONC/NOAB106

105. Reuss DE, Mamatjan Y, Schrimpf D, Capper D, Hovestadt V, Kratz A, et al. IDH mutant diffuse and anaplastic astrocytomas have similar age at presentation and little difference in survival: a grading problem for WHO. *Acta Neuropathol.* Springer Verlag; 2015;129(6):867-73. DOI: 10.1007/s00401-015-1438-8
106. Korshunov A, Casalini B, Chavez L, Hielscher T, Sill M, Ryzhova M, et al. Integrated molecular characterization of IDH-mutant glioblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2019;45(2):108-18. DOI: 10.1111/nan.12523
107. Pekmezci M, Rice T, Molinaro AM, Walsh KM, Decker PA, Hansen H, et al. Adult infiltrating gliomas with WHO 2016 integrated diagnosis: Additional prognostic roles of ATRX and TERT. *Acta Neuropathol.* NIH Public Access; 2017;133(6):1001. DOI: 10.1007/S00401-017-1690-1
108. Marker DF, Pearce TM. Homozygous deletion of CDKN2A by fluorescence in situ hybridization is prognostic in grade 4, but not grade 2 or 3, IDH-mutant astrocytomas. *Acta Neuropathol Commun.* BioMed Central Ltd; 2020;8(1). DOI: 10.1186/s40478-020-01044-y
109. Yoda RA, Marxen T, Longo L, Ene C, Wirsching HG, Keene CD, et al. Mitotic index thresholds do not predict clinical outcome for IDH-mutant astrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol.* Oxford Academic; 2019;78(11):1002-10. DOI: 10.1093/JNEN/NLZ082
110. Wijnenga MMJ, Dubbink HJ, French PJ, Synhaeve NE, Dinjens WNM, Atmodimedjo PN, et al. Molecular and clinical heterogeneity of adult diffuse low-grade IDH wild-type gliomas: assessment of TERT promoter mutation and chromosome 7 and 10 copy number status allows superior prognostic stratification. *Acta Neuropathol.* Springer Verlag; 2017;134(6):957-9. DOI: 10.1007/S00401-017-1781-Z
111. Weller M, Weber RG, Willscher E, Riehm V, Hentschel B, Kreuz M, et al. Molecular classification of diffuse cerebral WHO grade II/III gliomas using genome- and transcriptome-wide profiling improves stratification of prognostically distinct patient groups. *Acta Neuropathol.* Springer Verlag; 2015;129(5):679-93. DOI: 10.1007/S00401-015-1409-0
112. Stichel D, Ebrahimi A, Reuss D, Schrimpf D, Ono T, Shirahata M, et al. Distribution of EGFR amplification, combined chromosome 7 gain and chromosome 10 loss, and TERT promoter mutation in brain tumors and their potential for the reclassification of IDHwt

- astrocytoma to glioblastoma. *Acta Neuropathol.* Springer Verlag; 2018;136(5):793-803. DOI: 10.1007/S00401-018-1905-0
113. Reuss DE, Kratz A, Sahm F, Capper D, Schrimpf D, Koelsche C, et al. Adult IDH wild type astrocytomas biologically and clinically resolve into other tumor entities. *Acta Neuropathol.* Springer Verlag; 2015;130(3):407-17. DOI: 10.1007/S00401-015-1454-8
114. Aibaidula A, Chan AKY, Shi Z, Li Y, Zhang R, Yang R, et al. Adult IDH wild-type lower-grade gliomas should be further stratified. *Neuro Oncol.* Oxford University Press; 2017;19(10):1327. DOI: 10.1093/NEUONC/NOX078
115. Hirose Y, Sasaki H, Abe M, Hattori N, Adachi K, Nishiyama Y, et al. Subgrouping of gliomas on the basis of genetic profiles. *Brain Tumor Pathol.* 2013;30(4):203-8. DOI: 10.1007/S10014-013-0148-Y