



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**ERİŞKİN TİPİ DİFFÜZ GLİOMLARIN TİPLENDİRİLMESİNDE
MOLEKÜLER YÖNTEMLERE ALTERNATİF OLARAK
İMMÜNHİSTOKİMYASAL BİYOBELİRTEÇLERİN KULLANIMI**

Dr. Fatma GÜNDOĞDU

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

ANKARA 2023



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**ERİŞKİN TİPİ DİFFÜZ GLİOMLARIN TİPLENDİRİLMESİNDE
MOLEKÜLER YÖNTEMLERE ALTERNATİF OLARAK
İMMÜNHİSTOKİMYASAL BİYOBELİRTEÇLERİN KULLANIMI**

Dr. Fatma GÜNDOĞDU

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Figen SÖYLEMEZOĞLU

ANKARA 2023

TEŞEKKÜR

Nöropatolojiye olan ilgi ve sevgimin gelişmesine neden olan, kendisinden çok şey öğrendiğim, çalışma sürecimin her aşamasında bana destek olan ve kıymetli bilgileriyle yol gösteren, danışmanlığında tezimi yaptığım değerli tez hocam Prof. Dr. Figen Söylemezoğlu'na,

FISH problemlerinin temini, teknik süreçlerin yürütülmesi ve sonuçların değerlendirilme aşamalarında çok değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan Prof. Dr. Ayşegül Üner'e,

Arşivden preparatların ve blokların teminini sağlayan Lokman Kale'ye, kesitleri yapan ve teknik destek sağlayan Ziya Birinci ve Orhan Başhan'a, FISH çalışmalarının uygulanmasında yardımcı olan Rahime Çiçek'e, immünohistokimyasal yöntemlerin uygulanmasında yardımcı olan Gökalp Işal'a, preparatların dijital ortama aktarılmasındaki yardımlarından dolayı Öğr. Gör. Sercan Çadircı ve Dr. Meral Üner'e, istatistiksel çalışmalarda destek olan Dr. Serhat Akay'a,

Asistanlığımın ilk gününden son gününe kadar yardım ve desteklerini eksik etmeyen HÜTF Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı teknik ekibi ve personeline,

Asistanlık yaptığım süre boyunca iyi bir patolog olmam için emek veren HÜTF Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nın saygıdeğer hocalarına,

Birlikte acı tatlı çok değerli anılar biriktirdiğimiz yol arkadaşlarım dediğim çok sevgili asistan arkadaşlarıma,

Eğitim hayatım boyunca beni her konuda destekleyen canım aileme,

İçtenlikle teşekkür ederim.

ÖZET

Gündoğdu F, Erişkin tipi difüz gliomların tiplendirilmesinde moleküler yöntemlere alternatif olarak immünohistokimyasal vekil biyobelirteçlerin kullanımı, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Tezi, Ankara, 2023. Erişkin tipi IDH (izositrat dehidrogenaz)-mutant difüz gliomlar, 1p/19q kodelesyonunun varlığı ya da yokluğuna göre astrositom, IDH-mutant ve oligodendrogliom, IDH-mutant ve 1p/19q kayıplı olarak iki gruba ayrılmaktadır. Astrositomların derecelendirmesinde 2021 Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflamasında yer alan değişikliğe göre CDKN2A/B homozigot delesyonu (HD) içeren tümörler, mikrovasküler proliferasyon ve/veya nekroz içermeseler dahi derece 4 olarak sınıflandırılmaktadır. Günümüzde IDH-mutant difüz gliomların tanısında ve derecelendirmesinde erişimi zor ve pahalı moleküler yöntemlerin kullanımı zorunlu hale gelmiştir. Biz bu çalışmada moleküler yöntemlere alternatif olabilecek erişimi daha kolay ve ucuz immünohistokimyasal (İHK) vekil biyobelirteçler bulmayı hedefledik. Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2014-2021 yılları arasında tanı almış 93 astrositom ve 73 oligodendrogliom vakası kullanılarak doku mikrodizini hazırlanmıştır. Bunlardan elde edilen kesitlere 1p/19q ve CDKN2A FISH çalışmaları ile H3K27me3 ve MTAP İHK çalışmaları yapılmıştır ve boyamalar iki gözlemci tarafından değerlendirilmiştir. CDKN2A HD ile MTAP ekspresyon kaybı arasındaki ilişki ve 1p/19q kodelesyonu ile H3K27me3 ekspresyon kaybı arasındaki ilişki incelenmiştir. CDKN2A HD bakılan 161 tümörün 25'inde (%15,1) delesyon saptanmışken, birinci gözlemci 164 tümörün 30'unda (%18,1), ikinci gözlemci 29'unda (%17,5) MTAP kaybı saptamıştır. CDKN2A FISH'e alternatif olarak MTAP'ın sensitivitesi %88, spesifisitesi %95,52-96,27 olarak hesaplanmıştır. Oligodendrogliomların %67,1-68,5'inde, astrositomların ise %21,1-22,6'sinde H3K27me3 ekspresyon kaybı görülmüştür. 1p/19q FISH'e alternatif olarak H3K27me3'ün sensitivitesi %77,42-76,34, spesifisitesi %65,75-67,12 olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak, MTAP İHK çalışması CDKN2A FISH için güvenilir bir vekil biyobelirteç iken; H3K27me3 İHK çalışması 1p/19q FISH çalışmasına alternatif olabilecek sensitif ve spesifik bir belirteç değildir.

Anahtar Kelimeler: IDH-mutant Difüz Gliom, Siklin Bağımlı Kinaz 2A, MTAP, H3K27me3, 1p/19q kaybı

ABSTRACT

Gundogdu F, Use of immunohistochemical surrogate biomarkers as an alternative to molecular methods in classifying adult-type diffuse gliomas, Hacettepe University Faculty of Medicine, Pathology Thesis, Ankara, 2023. Adult-type IDH (isocitrate dehydrogenase)-mutant diffuse gliomas are divided into two groups as astrocytoma, IDH-mutant and oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q codeleted, on the basis of 1p/19q status. According to the 2021 World Health Organization (WHO) classification; astrocytomas containing CDKN2A/B homozygous deletion (HD) are graded as grade 4 even in the absence of microvascular proliferation and/or necrosis. Nowadays, the use of difficult-to-access and expensive molecular methods has become mandatory in the diagnosis and grading of IDH-mutant diffuse gliomas. In this study, we aimed to find accessible and cheap immunohistochemical (IHC) surrogate biomarkers that could be an alternative to molecular methods. Tissue microarrays were prepared using 93 astrocytoma and 73 oligodendroglioma cases diagnosed between 2014-2021 in Hacettepe University Department of Medical Pathology. 1p/19q and CDKN2A FISH and H3K27me3 and MTAP IHC studies were performed and two observers evaluated the staining. The relationship between CDKN2A HD and loss of MTAP expression and the relationship between 1p/19q codeletion and loss of H3K27me3 expression were investigated. CDKN2A HD was detected in 25 (15.1%) of 161 diffuse gliomas, while the first observer detected MTAP loss in 30 (18.1%) out of 164, and the second observer in 29 (17.5%). As an alternative to CDKN2A FISH, the sensitivity and specificity of MTAP were calculated as 88% and 95.52-96.27%. Loss of H3K27me3 expression was observed in 67.1-68.5% of oligodendrogliomas, and 21.1-22.6% of astrocytomas. As an alternative to 1p/19q FISH, the sensitivity of H3K27me3 was 77.42-76.34% and the specificity as 65.75%-67.12%. In conclusion, MTAP IHC appears to be a reliable surrogate biomarker to CDKN2A FISH however loss of H3K27me3 expression is not sensitive and specific enough as an alternative to 1p/19q FISH.

Keywords: IDH-mutant diffuse glioma, Cyclin Dependant Kinase 2A, MTAP, H3K27me3, 1p/19q codeletion

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
RESİMLER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Erişkin Tipi Difüz Gliom.....	5
2.2. Astrositom, IDH-mutant.....	5
2.2.1. Epidemiyolojik, Klinik ve Radyolojik Özellikler.....	5
2.2.2. Etyoloji.....	6
2.2.3. Patogenez ve Genetik Profil.....	6
2.2.4. Histopatoloji.....	8
2.2.5. Tanısal Moleküler Patoloji.....	13
2.2.6. CDKN2A/B Homozigot Delesyonu.....	16
2.2.6. Prognoz.....	20
2.3. Oligodendrogliom, IDH-mutant ve 1p/19q kayıplı.....	20
2.3.1. Epidemiyolojik, Klinik ve Radyolojik Özellikler.....	20
2.3.2. Etyoloji ve Patogenez.....	22
2.3.3. Genetik Profil.....	22
2.3.4. Histopatoloji.....	24
2.3.5. Histon 3 Proteininin Lizin 27'sinin Trimetilasyonu (H3K27me3).....	28
2.3.5. Tanısal Moleküler Patoloji.....	30
2.3.6. Prognoz.....	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	34
3.1. Olguların Seçimi ve Histopatolojik Değerlendirmeler.....	34
3.2. Doku Mikrodizin (TMA) Oluşturma.....	34
3.3. Morfolojik Parametreler.....	34
3.4. Klinik Veriler.....	35
3.5. CDKN2A FISH Çalışmasının Değerlendirilmesi.....	35
3.6. 1p/19q FISH Çalışmasının Değerlendirilmesi.....	37
3.7. MTAP İmmünohistokimyasal İncelemesi.....	39
3.8. H3K27me3 İmmünohistokimyasal İncelemesi.....	41
3.8. İstatistik.....	43
4. BULGULAR.....	45
4.1. Epidemiyolojik ve Klinik Bulgular.....	45
4.2. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Bulgular.....	45
4.3. CDKN2A FISH Çalışmasının Sonuçları.....	47
4.4. MTAP İmmünohistokimyasal Çalışmasının Sonuçları.....	48

4.5. CDKN2A HD ile MTAP İmmünohistokimyasal Ekspresyon Kaybı Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi.....	49
≤ 35 yaş	54
4.6. 1p/19q FISH Çalışmasının Sonuçları.....	55
4.7 H3K27me3 İmmünohistokimyasal Çalışmasının Sonuçları	56
4.8. 1p/19q Kodelesyonu ile H3K27me3 İmmünohistokimyasal Kaybı Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi.....	59
5. TARTIŞMA	61
5.1. CDKN2A-MTAP	61
5.2. 1p/19q Kodelesyonu- H3K27me3 İlişkisi.....	65
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	69
7. KAYNAKLAR	70
8. EKLER.....	81

KISALTMALAR

ATRX: “*Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-linked*”

BBA: Büyük Büyütme Alanı

BT: Bilgisayarlı Tomografi

CDKN 2A/B: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A/B

CIC: “*Capicua*” Geni

DAPI: Diamidino-2-fenilindol

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

FISH: Floresan İn Situ Hibridizasyon

FUBP1: “*Far-upstream Element (FUSE) Binding Protein 1*”

GFAP: Glial Fibriler Asidik Protein

H&E: Hematoksilen ve Eosin

HD: Homozigot Delesyon

H3K27me3: Histon 3 Proteininin Lizin 27'sinin Trimetilasyonu

IDH: İzositrat Dehidrogenaz

IHK: İmmünohistokimya

MGMT: O6-metilguanin-DNA Metiltransferaz

MPNST: Malign Periferik Sinir Kılıfı Tümörü

MRG: Manyetik Rezonans Görüntüleme

MTA: Metiltiyoadenozinin Fosfat

MTAP: Metiltiyoadenozinin Fosfarilaz

MVP: Mikrovasküler Proliferasyon

NGS: Yeni Nesil Dizileme (“*Next generation sequencing*”)

PBS: Fosfat Tampon Solüsyonu

PRC2: “*The Polycomb Repressive Complex 2*”

PXA: Pleomorfik Ksantoastrositom

SSC: “*Saline Sodium Chloride*”

SSS: Santral Sinir Sistemi

TERT: “*Telomerase Reverse Transcriptase*”

TMA: Doku Mikrodizini (“*Tissue Microarray*”)

SNP: Tek nükleotid polimorfizmi

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
2.1. DSÖ 2021 sınıflamasına göre IDH mutant astrositom için derecelendirme kriterleri	12
4.1. DSÖ 2016 kriterlerine göre derecelendirilen astrositom ve oligodendrogliom gruplarında CDKN2A HD görülme sayıları ve yüzdeleri	47
4.2. CDKN2A HD ve MTAP kaybı görülme sıklıkları	49
4.3. FS ve FG gözlemcilerinde CDKN2A HD varlığı ile MTAP ekspresyonu kaybı arasındaki ilişki.	50
4.4. Tüm vakalarda FS ve FG gözlemcisinin CDKN2A HD FISH yöntemine alternatif olarak MTAP IHK boyanma kaybının değerlendirmeleri	50-51
4.5. Astrositomlarda FS ve FG gözlemcisinin CDKN2A HD FISH yöntemine alternatif olarak MTAP IHK boyanma kaybının değerlendirmeleri	51
4.6. Oligodendrogliomlarda FS ve FG gözlemcisinin CDKN2A HD FISH yöntemine alternatif olarak MTAP IHK boyanma kaybının değerlendirmeleri	52
4.7. CDKN2A HD ve MTAP kaybı ile tanı yaşı arasındaki ilişki	54
4.8. Cinsiyet ile CDKN2A HD ve MTAP kaybı arasındaki ilişkisinin incelenmesi	55
4.9. Tüm vakalar, oligodendrogliomlar ve astrositomlar için H3K27me3 kaybı olan ve olmayan olguların incelenmesi	56
4.10. FS ve FG gözlemcilerinde derece 2 ve 3 oligodendrogliom ile H3K27me3 ekspresyonu arasında ilişki	57
4.11. FS ve FG gözlemcilerinde H3K27me3 kaybı ile yaş kategorileri arasındaki ilişki	57
4.12. FS ve FG gözlemcilerinde H3K27me3 kaybı ile cinsiyet arasındaki ilişki	58
4.13. FS ve FG gözlemcilerinde H3K27me3 kaybı ile tümör lokalizasyonu arasındaki ilişki	58
4.14. H3K27m3 ekspresyonu ile IDH1 R132H mutant ve non-IDH1 R132H mutant olgular arasında ilişkinin incelenmesi	59
4.15. 1p/19q kodelesyonu varlığı ile H3K27me3 ekspresyon kaybı arasındaki ilişki.	59
4.16. Tüm vakalarda FS ve FG gözlemcisinin 1p/19q FISH yöntemine alternatif olarak H3K27me3 IHK boyanma kaybının değerlendirmeleri	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. 2021 DSÖ SSS sınıflamasında erişkin tipi diffüz gliomlar	5
2.2. Erişkin Tipi Difüz Gliomların Sınıflandırmasında Algoritmik Yaklaşım.	13
2.3. CDKN2A/B genlerinin hücre döngüsü üzerine etkisi	17
2.4. CDKN2A/B ve MTAP gen bölgelerinin 9. Kromozom üzerindeki yerleşimleri.	18
2.5. Metiyonin biosentez yolları	19
2.6. DSÖ 2021 sınıflamasına göre IDH mutant, 1p/19q kayıplı oligodendrogliomlar için dereceleme kriterleri	27
2.7. PRC2 şematik gösterimi ve embriyonik kök hücre ve somatik hücrelerde PRC2 hedef genlerindeki kromatin özellikleri	28
4.1. Astrositom ve oligodendrogliomların yerleşim yerleri	45
4.2. Tümörlerin tanı dağılımları	46
4.3. Astrositomlarda DSÖ 2016 ve 2021'e göre tümör derecesinin karşılaştırılması	48

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
2.1. DSÖ SSS derece 2 (2021) astrositom	9
2.2. DSÖ SSS derece 3 (2021) astrositom	10
2.3. DSÖ SSS derece 4 (2021) astrositom, mikrovasküler proliferasyon	11
2.4. DSÖ SSS derece 4 astrositom (2021), psödopalizatlanma nekrozu	11
2.5. Neoplastik astrositik hücrelerde sitoplazmik IDH1 R132H boyanması	14
2.6: Neoplastik astrositik hücrelerde immünhistokimyasal olarak nükleer p53 boyanması	15
2.7. Neoplastik astrositik hücrelerde immünhistokimyasal ATRX nükleer ekspresyon kaybı	16
2.8. DSÖ SSS derece 2 oligodendrogliom	25
2.9. DSÖ SSS derece 2 oligodendrogliom, perinöronal satellitoz	26
2.10. İmmünhistokimyasal IDH1 R132H boyaması gösteren difüz gliom	31
3.1. FISH çalışmasında CDKN2A HD içermeyen neoplastik hücreler.	36
3.2. FISH çalışmasında CDKN2A HD içeren neoplastik hücreler	37
3.3. 1p/19q FISH çalışmasının değerlendirilmesi	39
3.4. MTAP immünhistokimyasal çalışmasının skorlanması	41
3.5. H3K27me3 immünhistokimyasal çalışmasının skorlanması	43
4.1. MTAP-CDKN2A uyumsuz vaka örnekleri	53
4.2. MTAP boyamasında intratümöral heterojenite	54

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Erişkinlerin tipi difüz gliomlar primer malign intrakraniyal tümörlerin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. 2016 Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) santral sinir sistemi (SSS) tümörleri sınıflamasında difüz gliomlar yalnızca mitotik aktivite, mikrovasküler proliferasyon ve/veya nekroz gibi histolojik bulgulara göre derecelendirilmekteydi (1, 2). Bu sınıflamada prognozun daha doğru bir şekilde tahmin edilmesi ve uygun tedavi seçiminin sağlanması amacıyla histolojik özellikler ile genetik özelliklerin entegre edilmesi önerilmişti (2). Buna göre, erişkin tipi difüz gliomlar, izositrat dehidrogenaz (IDH) 1/2 mutasyonu (3) ve 1p/19q kodelesyonu (4) temelinde farklı kategorilere ayrılmıştı. Düşük dereceli difüz gliomlar 2016 DSÖ sınıflamasında IDH-mutant difüz astrositom, IDH-mutant olmayan difüz astrositom ve 1p/19q kayıplı, IDH-mutant oligodendrogliom olarak üç gruba ayrılmıştı (5). Glioblastomlar ise IDH-mutant olmayan ve IDH-mutant olarak kategorize edilmekteydi (2).

Ancak glioma biyolojisinde her geçen gün dağarcığımıza yenileri eklenen moleküler gelişmelerin 2016 DSÖ sınıflamasında karşılık bulamaması, cIMPACT-NOW olarak bilinen (SSS Tümör Taksonomisine Moleküler ve Pratik Yaklaşımları Bilgilendirme Konsorsiyumu – Resmi Olmayan DSÖ) bir inisiyatifin kurulmasına vesile oldu. Bu uzmanlar topluluğunun yayımladığı güncellemeler gerek rutin uygulamalarda yol gösterici olurken 2021 DSÖ SSS tümör sınıflamasının temellerini oluşturdu (6-10). 2021 DSÖ SSS tümörleri sınıflamasında difüz gliomlar erişkin ve pediatrik tip difüz gliomlar olarak ayrılmıştır. Erişkin tip difüz gliomlar ise IDH mutant astrositom, IDH mutant ve 1p/19q kayıplı oligodendrogliom ve IDH mutant olmayan glioblastom olmak üzere üç ayrı grup olarak sınıflandırılmıştır (11). 2021 DSÖ sınıflaması immünohistokimyasal (İHK), floresan in situ hibridizasyon (FISH) gibi doku temelli testlerle desteklenen histolojik bulgulara dayalı olmaktan öte moleküler bir sınıflama olarak patoloji pratiğine girmiştir (11-13).

Son dönemde IDH-mutant difüz astrositom olgularında, siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A ve B'yi (CDKN2A/B) kodlayan genlerin homozigot delesyonu (HD) kötü prognozu öngörmek için kullanılabilecek bir biyobelirteç olarak karşımıza çıkmıştır. CDKN2A/B HD'nin, IDH-mutant difüz astrositik gliomlarda kötü prognoz ve kısa

sağkalım süreleri ile ilişkili olduğu pek çok retrospektif çalışmada da gösterilmiştir (14-16). Ocak 2020 tarihinde yayınlanan “cIMPACT-NOW” 5. güncelleme makalesinde, CDKN2A/B HD içeren IDH-mutant astrositomların, mikrovasküler proliferasyon veya nekroz yokluğunda dahi, DSÖ derece IV (2016) astrositom olarak kabul edilmesi önerilmişti (6). 2021 yılında yayınlanan DSÖ SSS tümörleri sınıflamasında IDH-mutant astrositomların derecelendirmesinde yer alan değişikliğe göre; CDKN2A/CDKN2B HD içeren tümörler, mikrovasküler proliferasyon ve/veya nekroz içermeseler dahi derece 4 olarak sınıflandırılmaktadır (11). 2022 yılında “*Collage of American Pathologist*” (CAP) yayınladığı difüz gliomların tanısında moleküler belirteçlerin kullanımı ile ilgili rehberinde bu zamana kadar bu konuda yapılmış tüm prospektif ve retrospektif çalışmaları inceleyerek IDH-mutant astrositom vakalarında CDKN2A HD durumunun bakılmasını önermiş ve bu önerinin kanıt düzeyini “orta” olarak derecelendirmiştir (17). Oligodendrogliomlarda CDKN2A/B HD DSÖ SSS derece 3 tümörlerin bir kısmında (<%10) görülürken, DSÖ SSS derece 2 tümörlerde görülmemekte olup varlığı mikrovasküler proliferasyon ve nekroza bağımsız olarak kısa sağkalım süreleri ile ilişkili bulunmuştur (12).

Şu anda, CDKN2A HD genellikle FISH, karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH) veya multipleks ligasyona bağlı prob amplifikasyonu (MLPA) teknikleri kullanılarak ya da yeni nesil dizileme (NGS) ve DNA metilasyon bazlı profillemeye gibi daha yeni teknikler ile değerlendirilebilmektedir. Ancak yüksek maliyetleri, uzun raporlanma süreleri ve tüm merkezlerde bulunmaması nedeniyle bu moleküler yöntemlerin kullanımı sınırlıdır. Bu nedenle, immünohistokimya temelli yaklaşımlar gibi daha kolay ulaşılabilir ve düşük maliyetli yöntemlere ihtiyaç bulunmaktadır.

CDKN2A HD durumunu saptamak için; metiltioadenosin fosforilaz (MTAP) immünohistokimyasal ekspresyon kaybının moleküler yöntemlere alternatif olarak potansiyel bir vekil biyobelirteç olarak kullanılması amacıyla malign mezotelyoma, çeşitli epitelyal tümörler, meningiom ve pleomorfik ksantostrositom (PXA) vakaları üzerinde yapılmış çalışmalar mevcuttur (18-24). MTAP immünohistokimyasal boyamasının, malign mezotelyomayı reaktif mezotelyal hücre proliferasyonundan ayırtmak için CDKN2A HD'nin güvenilir bir vekil biyobelirteci olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (sensitivite: %78, spesifite: %96) (25). CDKN2A HD için MTAP immünohistokimyasının öngörücü rolü, difüz gliomlarda tam olarak bilinmemekle

birlikte 2020'de Satomi ve ark. IDH mutant astrositomlarda MTAP immünohistokimyasal ekspresyon kaybının CDKN2A HD'sini öngörmeye %88 sensitivite ve %98 spesifiteye sahip olduğu bildirmiştir ve hem CDKN2A HD hem de MTAP ekspresyon kaybı, IDH mutant astrositomlar için genel sağkalımda önemli kötü prognostik faktörler olarak saptanmıştır (26).

Astrositik ve oligodendroglial tümör tipleri arasındaki ayrım hem hasta tedavisi hem de klinik gidiş üzerinde yadsınamaz bir etkisi olduğundan oldukça önemlidir. IDH1 (R132H), ATRX ve p53 immünohistokimyasal çalışmaları, 1p/19q testi için vakaların triajına yardım amacıyla rutin olarak kullanılmaktadır (27). Şu anda, 1p/19q kodelesyonunun değerlendirilmesi için yaygın olarak FISH veya PCR tabanlı heterozigotluk kaybı analizlerinden faydalanılmaktadır. Yeni nesil dizileme ve DNA metilasyon bazlı profillemeye de kullanılabilecek oldukça güvenilir yeni teknikler arasındadır.

Feller ve ark. 2019 yılında yayınladıkları çalışmalarında yüksek oranda spesifik kütle spektrometri ölçümlerinde oligodendrogliomlarda H3K27me3 (histon 3 proteininin lizin 27'sinin trimetilasyonu) seviyelerinde azalma saptadıklarını ve histon metilasyonundaki alterasyonların difüz gliomların tiplendirmesinde kullanılabileceğini söylemişlerdir (28). Hemen ardından Filipiski ve ark. yaptığı çalışmada IDH mutant ve 1p/19q kodelesyonu içeren oligodendrogliomların büyük çoğunluğunda (%96,2) H3K27me3 nükleer ekspresyon kaybının görüldüğünü bildirmiş ve H3K27me3 kaybı olan, IDH1 (R132H) pozitif ve ATRX ekspresyonu korunmuş difüz gliomların 0.9678 tahmini olasılıkla oligodendrogliom olduğunu öne sürmüştür (29). Dolayısıyla H3K27me3 kaybının IDH-mutant difüz gliomların hücre tipine bağlı olarak sınıflamasında potansiyel ek bir immünohistokimyasal belirteç olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Yine yakın zamanda yapılan benzer bir çalışmada ise Pekmezci ve ark. IDH mutant ve 1p/19q kodelesyonu içeren oligodendrogliomlarda H3K27me3 nükleer ekspresyon kaybının sık görüldüğü (%75) ancak yeterince sensitif ve spesifik bir belirteç olmadığını söylemektedirler (30). Dolayısıyla 1p/19q kodelesyonu ile nükleer H3K27me3 ekspresyon kaybı arasındaki ilişki için daha fazla araştırmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

Özetle; moleküler bir sınıflama özelliğindeki 2021 DSÖ beyin tümörleri sınıflaması ile pahalı yöntemlerin sıkça kullanımı kaçınılmaz olmuştur. Dünyanın

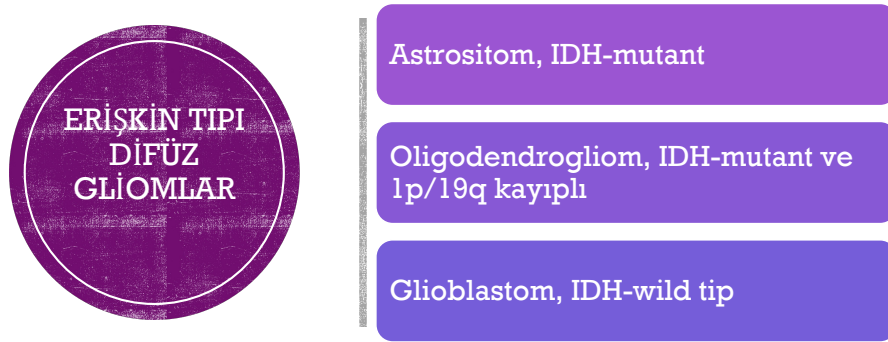
çeşitli bölgelerinde genomik ve proteomik özelliklerin incelenmesi mümkün olmayacağından immün vekil biyobelirteçlerin kullanılabileceği bir algoritmik yaklaşım ile bu tümörlerin sınıflanabilmesi alternatif stratejiler geliştirmemize olanak sağlayacaktır.

Bu çalışmada erişkin tip IDH mutant difüz gliomlarda 1p/19q kodelesyonu ile H3K27me3 ekspresyon kaybı arasındaki ilişki ve CDKN2A HD ile MTAP ekspresyon kaybı arasındaki ilişkinin incelenmesi, bu immünhistokimyasal yöntemlerin sensitivite ve spesifisitelerinin belirlenmesi ve immünhistokimyasal ve moleküler çalışma sonuçları ile histopatolojik ve klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erişkin Tipi Difüz Gliom

2021 DSÖ SSS tümörleri sınıflamasında difüz gliomlar erişkin ve pediatrik tip difüz gliomlar olarak ayrılmıştır. Erişkin tip difüz gliomlar IDH-mutant astrositom, IDH-mutant ve 1p/19q kayıplı oligodendrogliom ve IDH mutant olmayan glioblastom olmak üzere üç ayrı grup olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. 2021 DSÖ SSS sınıflamasında erişkin tipi difüz gliomlar

2.2. Astrositom, IDH-mutant

2.2.1. Epidemiyolojik, Klinik ve Radyolojik Özellikler

IDH-mutant astrositomların insidansı hakkında nüfusa dayalı kesin veriler mevcut değildir. Hastaların çoğu tanı anında 3-4. dekatta (ortalama yaş 38) olup DSÖ SSS derece 2 veya 3 tümöre sahiptir. Derece 4 tümörler daha ileri yaşlarda görülmektedir (31). Pediatrik yaş grubunda görülen gliomlarda IDH mutasyonları nadirdir; mevcut olduklarında genellikle adenömlerde görülürler (32). IDH-mutant astrositomlar, 55 yaş üstü hastalarda nadiren görülür (33).

IDH-mutant astrositomlar santral sinir sisteminin her bölgesinde görülebilmekle birlikte en sık supratentoriyal bölgede özellikle de frontal lobda yerleşim gösterirler (11). Yavaş büyüyen tümörler olduklarından, nöroplastisiteye olanak sağlamaları nedeniyle nörokognitif fonksiyonlarda bozulma IDH-mutant olmayan tümörlere göre daha azdır (34). En sık görülen klinik semptom nöbet

olmakla birlikte dil-konuşma bozuklukları ya da özellikle frontal lob yerleşimli tümörlerde davranış-kişilik değişiklikleri görülebilmektedir (11).

Radyolojik bulgular tümörün lokalizasyonuna, yayılımına ve derecesine göre değişmektedir. DSÖ derece 2 tümörler genellikle sınırları belirsiz, homojen, düşük dansiteli, kontrast tutmayan kitleler şeklinde prezente olur (11). MRG bulguları tipik olarak T1 hipodansitesi ve T2 hiperintensitesi ile tutulum gösteren bölgelerde genişleme ve distorsiyon ile karakterizedir. T2 hiperintensitesi sıklıkla FLAIR sekanslarında rölatif hipointensite ile eşleştirilir. Bu bulgu DSÖ SSS derece 2 ve derece 3 IDH-mutant astrositolar için yüksek oranda spesifik bir bulgudur (35). DSÖ derece 4 tümörlerde ise orta hat deviasyonu, belirgin ödem, kontrast tutulumu, nekroz nedeniyle santral hipodansite görülür (11).

2.2.2. Etyoloji

Çoğu IDH-mutant astrositom ailesel ya da herediter tümör yatkınlık sendromları ile ilişkili olmayıp sporadik olarak gelişir. Bazı genomik çalışmalarda 8q24.21 lokalizasyonunda düşük frekanslı bir tek nükleotid polimorfizm (SNP) varlığı IDH-mutant gliom gelişimi için artmış risk ile ilişkili olarak bulunmuştur (36). Li-Fraumeni sendromu gibi bazı nadir genetik tümör sendromları ve Ollier hastalığı gibi bazı kalıtsal hastalıklarda IDH-mutant astrositom görülme sıklığı artabilmektedir (11). Çocuklarda ve genç erişkinlerde IDH1-mutant astrositolar DNA hatalı eşleşme tamir genlerinde mutasyonlar içerebilir (37).

2.2.3. Patogenez ve Genetik Profil

Patogenez

IDH-mutant astrositoların köken aldığı hücrelerin belirlenmesi halen aktif bir araştırma alanıdır. Mevcut veriler IDH-mutant astrositoların astrositik ve oligodendroglial hücre dizileri ve nöral öncül hücrelerin bir karışımından geliştiği fikrini desteklemektedir. IDH-mutant gliomlar ile IDH-mutant olmayan glioblastomların farklı hücrelerden köken aldığı düşünülmektedir (11).

Genetik profil

IDH mutasyonları ilk olarak 2008 yılında 22 adet glioblastoma multiforme vakasının NGS ile incelenmesi sonucu vakaların %12'sinde IDH1 geninin 132.

kodonunda mutasyon saptanması ile tanınmıştır (38). Daha sonra 445 SSS ve 494 non-SSS tümöründe sekanslama ile IDH1 ve IDH2 mutasyonu bakıldığında DSÖ grade II ve III astrositom, oligodendrogliom ve daha düşük dereceli lezyonlardan gelişen sekonder glioblastomların %70'inde IDH1 geninin 132 kodonunu etkileyen mutasyonlar ve IDH1 mutasyonu içermeyen tümörlerin bir kısmında da IDH2 geninin 172. kodonunda mutasyon görülmüştür (3). IDH mutasyonları gliomagenezde erken dönemde görülen bir olay olup tümör progresyonu boyunca kalmaktadır. En sık görülen IDH1 mutasyonu olan IDH1:c.395G>A p.R132H mutasyonu IDH-mutant gliomların %83-91'inde görülmektedir. Daha nadir görülen diğer mutasyonlar IDH1:c.394C>T p.R132C, p.R132G, p.R132S ve p.R132L mutasyonlarıdır (39).

Gliomlardaki IDH2 mutasyonları, p.R172 bölgesinde yer alır ve p.R172K mutasyonu en sık görülenidir (3). IDH-mutant astrositomlarda IDH2 mutasyonları, IDH1 mutasyonlarından daha nadirdir.

IDH1 ve IDH2 mutasyonları, ilgili metabolik enzimler IDH1 ve IDH2 ile IDH enziminin onkometaboliti olan 2-hidroksiglutarat üzerinde fonksiyon kazanımına neden olur (40). 2 -hidroksiglutarat aşırı üretimi hücrel epigenomik durumlar ve gen regülasyonu üzerinde önemli etkilere sahiptir. Mutant IDH1 astrositlerde spesifik histon belirteçlerinde alterasyonlara ve yaygın DNA hipermetilasyonuna neden olur (41).

O6-metilguanine-DNA metiltransferaz (MGMT) promotör metilasyonu, IDH-mutant gliomlarda yaygın olarak gözlenir. MGMT, promutajenik alkil gruplarını DNA'daki guaninin O6 konumundan uzaklaştıran bir DNA onarım proteinini kodlar, bu sayede bazı alkilleyici ajanların tedavi etkilerini azaltır (42).

IDH-mutant astrositomlar TP53 ve ATRX (Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked) genlerinde fonksiyon kaybı mutasyonları da içerirler. ATRX geni telomer disfonksiyonunda ve epigenomik disregülasyonda görevli bir protein kodlar. ATRX mutasyonları telomerin alternatif yoldan uzamasına neden olur (43). ATRX mutasyonları bir başka alternatif telomer uzama mekanizması olan ve sıklıkla IDH-mutant oligodendrogliom ve IDH-mutant olmayan glioblastomlarda görülen TERT(“*telomerase reverse transcriptase*”) promoter mutasyonları ile birbirini dışlayan mutasyonlardır (44).

ATRX mutasyonları neden oldukları genomik instabilite nedeniyle p53-bağımlı hücre ölümünü ile ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, IDH-mutant astrositomlardaki TP53 mutasyonları, ATRX kaybı durumunda tümör hücrelerinin hayatta kalmasını sağlıyor olabileceği düşünülmektedir (45).

Tümör progresyonu ile ilişkili genetik alterasyonlar

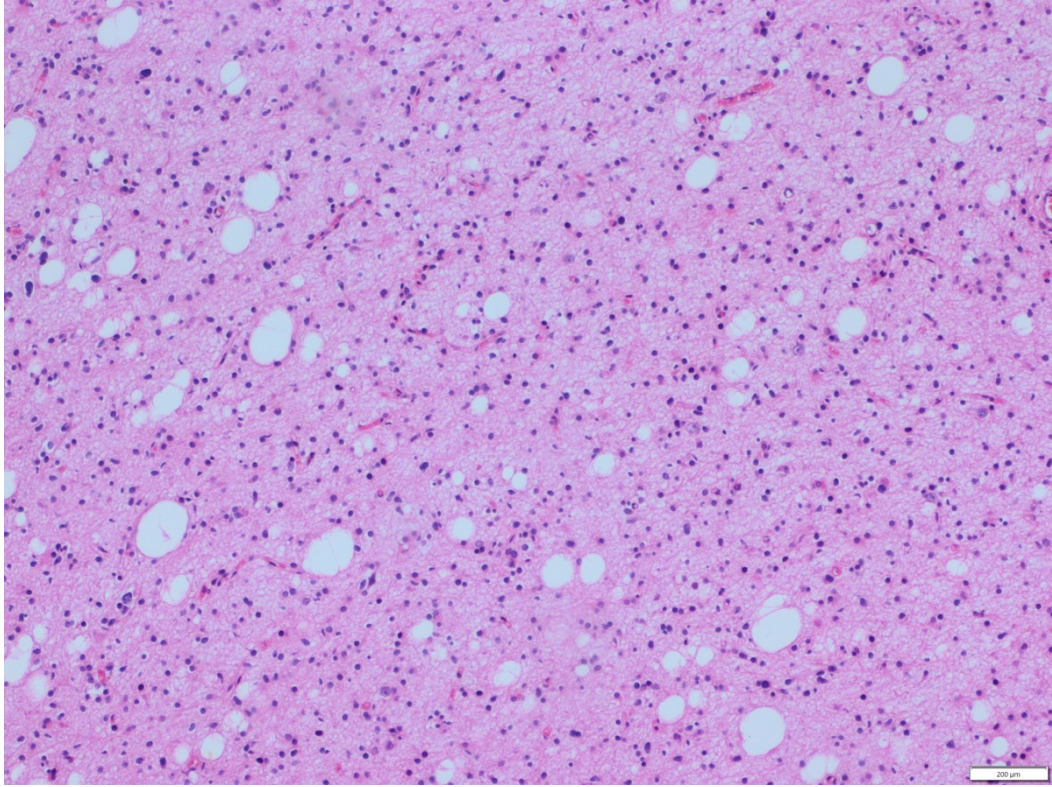
Yapılan çok sayıda retrospektif çalışma sonucunda CDKN2A/B HD'lerinin DSÖ SSS derece 2 ve 3 IDH mutant astrositomlarda, DSÖ SSS derece 4 tümörler ile benzer şekilde kısa sağkalım süreleri ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (6). Bunun yanında RB1 yolak alterasyonları, PDGFRA amplifikasyonları, MET alterasyonları, MYCN amplifikasyonları, PIK3R1 ve PIK3CA mutasyonları da kısa sağ kalım süreleri ve tümör progresyonu ile ilişkili diğer genetik değişikliklerdir (11).

2.2.4. Histopatoloji

Histolojik özellikler ve Dereceleme

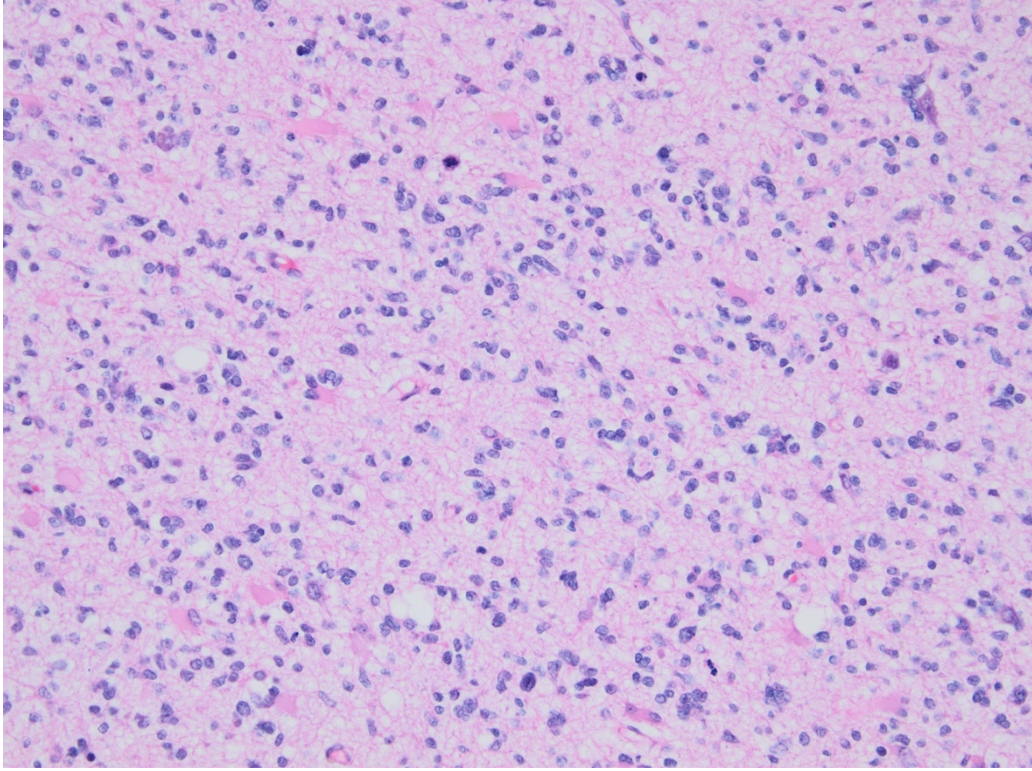
IDH-mutant astrositomlar iyi diferansiye, hiposelüler, yavaş büyüyen tümörlerden (DSÖ SSS derece 2), anaplastik/pleomorfik, hiperselüler, hızlı büyüyen tümörlere (DSÖ SSS derece 4) kadar geniş bir spektrumda karşımıza çıkabilmektedir (Tablo 2.1).

DSÖ SSS derece 2 tümörler; nöral parankimi diffüz olarak infiltre eden, genellikle gevşek mikrokistik bir zeminde dağılmış, hafif-orta derecede selülarite gösteren, iyi diferansiye fibriler glial hücrelerden oluşan tümörlerdir. Nükleer atipi minimaldir. Normal astrositler ile karşılaştırıldığında neoplastik astrositlerde nükleer irileşme, nükleer kontur düzensizlikleri, kromatin dağılımında bozulma ve hiperkromazi gibi bulgular görülmektedir. Nükleoller genellikle belirgin değildir. Mitotik aktivite yoktur ya da çok azdır (Resim 2.1).



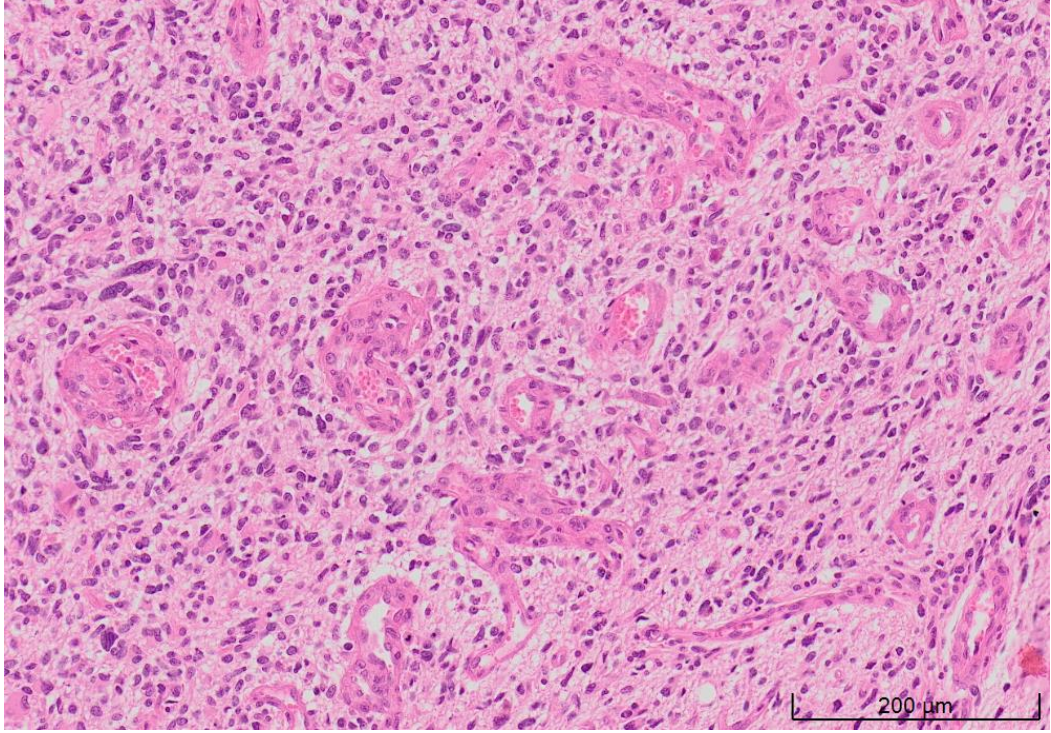
Resim 2.1. DSÖ SSS derece 2 (2021) astrositom (200x H&E)

DSÖ SSS derece 3 tümörlerin derece 2 tümörlerden temel farkı artmış mitotik aktivite ve hücre sel anaplazidir (11) (Resim 2.2). IDH-mutant astrositom kohortlarında mitoz için kesin bir eşik değeri belirlenememiş olmakla birlikte küçük stereotaksik kor biyopsilerde izlenen tek bir mitoz bile derece 3 tayini için yeterli iken, rezeksiyon materyallerinde daha çok mitoz görülmesi gereklidir (6). Benzer şekilde proliferasyon tayini açısından Ki67 proliferasyon indeksi için kabul gören bir eşik değeri mevcut değildir. DSÖ SSS derece 2 tümörlerde Ki67 proliferasyon indeksi genellikle $<4\%$ iken, DSÖ SSS derece 3 tümörlerde $4-10\%$ arasındadır. Derece 3 tümörlerde hücre sel selülarite ve atipi derece 2 tümörlere göre daha fazladır. Multinükleer tümör hücreleri ve anormal mitozlar görülebilir. Mikrovasküler proliferasyon ve nekroz görülmez (11).

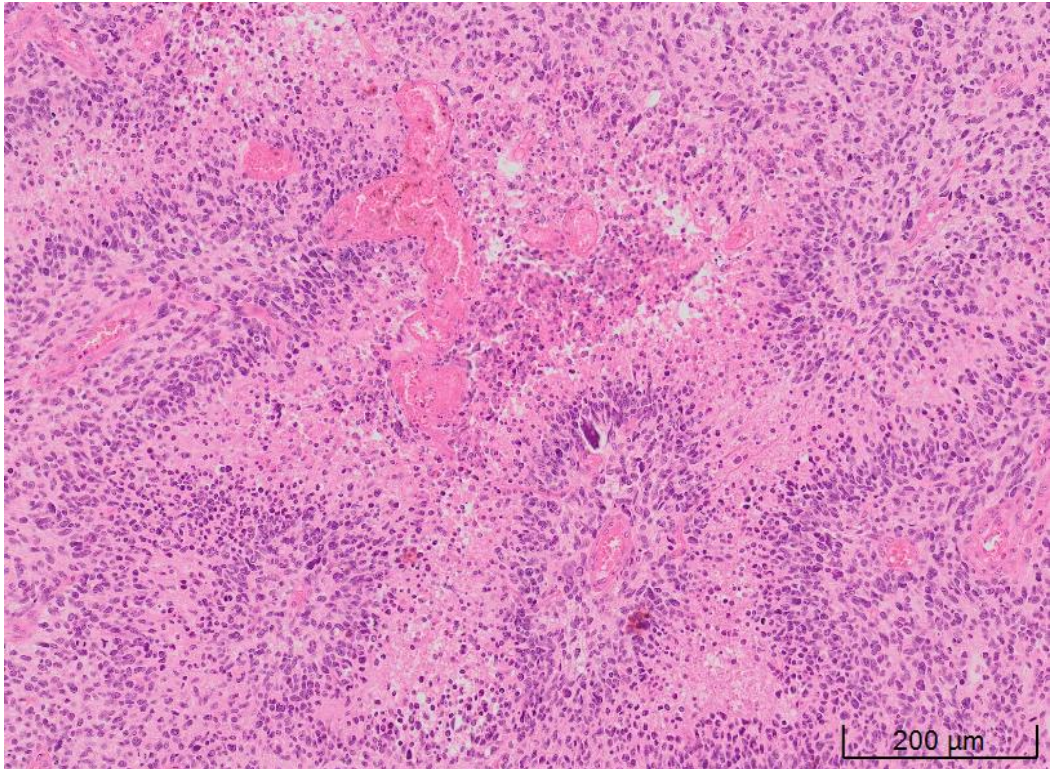


Resim 2.2. DSÖ SSS derece 3 (2021) astrositom (200x H&E)

DSÖ SSS derece 4 tümörler, derece 3 tümörlerde izlenen özelliklere ek olarak mikrovasküler proliferasyon (Resim 2.3) ve/veya nekroz (resim 2.4) içerirler. Aynı zamanda DSÖ SSS 2021 sınıflamasına göre CDKN2A ve/veya CDKN2B HD içeren tümörler, mikrovasküler proliferasyon ve/veya nekroz içermese dahi derece 4 olarak sınıflandırılırlar (11).



Resim 2.3. DSÖ SSS derece 4 (2021) astrositom, mikrovasküler proliferasyon (200x H&E)



Resim 2.4. DSÖ SSS derece 4 astrositom (2021), psödopalizatlanma nekrozu (100x H&E)

“Glioblastom” terimi son DSÖ sınıflaması ile artık DSÖ SSS derece 4 IDH-mutant astrositolar için kullanılmamaktadır. IDH-mutant olmayan glioblastomlar ile DSÖ SSS derece 4 IDH-mutant astrositolar histolojik olarak benzer özellikler gösterebildiğinden ayırım için IDH mutasyon testlerinin yapılması gereklidir (11). Ancak morfolojik olarak birtakım farklılıklardan da söz edilmektedir. Zonal iskemik alanlar, palizatlanma nekrozu DSÖ SSS derece 4 IDH-mutant astrositoların %50’sinde görülmekle birlikte IDH-mutant olmayan glioblastomların %90’ında görülür. Fokal oligodendrogliom benzeri alanlar DSÖ SSS derece 4 IDH-mutant astrositolarıda daha sık olarak görülür (46).

Gemistositik farklılaşma IDH-mutant astrositolarıda fokal ya da yaygın olarak görülebilir ancak IDH-mutant astrositolarıda spesifik değildir. Gemistositler geniş, camsı, eozinofilik sitoplazmalı, egzantrik yuvarlak/ovak nükleuslu, kapalı kromatinli, belirgin nükleollü hücrelerdir. Tüm tümör hücrelerinin %20’den daha fazlasını oluşturduğu zaman majör patern olarak düşünülebilir (47). Bu paternin klinik seyir ile bilinen bir ilişkisi mevcut değildir.

Tablo 2.1. DSÖ 2021 sınıflamasına göre IDH mutant astrositom için derecelendirme kriterleri

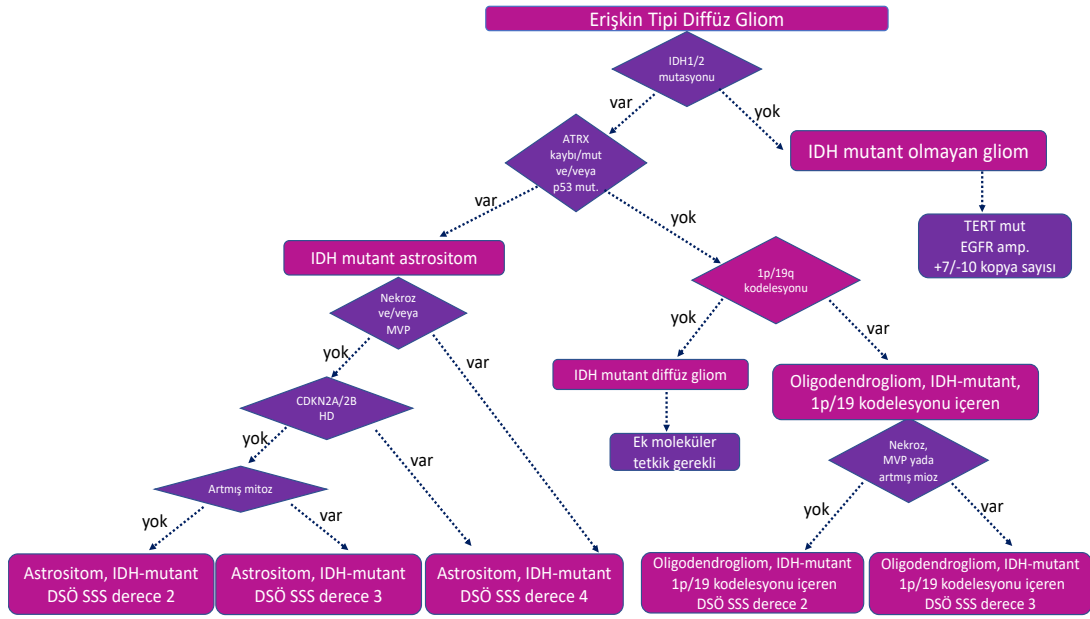
Derece	Kriter
SSS DSÖ derece 2	IDH1 ya da IDH2 mutasyonu gösteren iyi diferansiye, anaplazi göstermeyen difüz infiltratif astrositik gliom Mitotik aktivite yok ya da çok az Mikrovasküler proliferasyon, nekroz ve CDKN2A ve/veya CDKN2B homozigot delesyonu yok
SSS DSÖ derece 3	IDH1 ya da IDH2 mutasyonu gösteren, fokal ya da dağınık olarak anaplazi gösteren difüz infiltratif astrositik gliom Mitotik aktivite belirgin Mikrovasküler proliferasyon, nekroz ve CDKN2A ve/veya CDKN2B homozigot delesyonu yok
SSS DSÖ derece 4	IDH1 ya da IDH2 mutasyonu difüz infiltratif astrositik gliom Mikrovasküler proliferasyon veya nekroz veya CDKN2A ve/veya CDKN2B homozigot delesyonu ya da bunların herhangi bir kombinasyonu

İmmünofenotipik özellikler

IDH-mutant astrositomlara ait tümör hücreleri immünofenotipik olarak değişen oranlarda GFAP ve Vimentin eksprese ederler. Bir transkripsiyon faktörü olan Olig-2 ile güçlü nükleer boyanma gösterirler. Genetik alterasyonlar için kullanılan IDH1 (R132H), p53 ve ATRX gibi immünohistokimyasal belirteçlerden tanısal moleküler patoloji bölümünde detaylı olarak bahsedilecektir.

2.2.5. Tanısal Moleküler Patoloji

IDH-mutant astrositomların çoğu moleküler özellikleri immünohistokimyasal çalışmalar ile tespit edilebilmektedir. Erişkin tip difüz gliomların tiplendirilmesi amacıyla ilk olarak IDH1 p.R132H, p53 ve ATRX'ten oluşan bir immünohistokimyasal panel kullanılmaktadır (27) (Şekil 2.2).

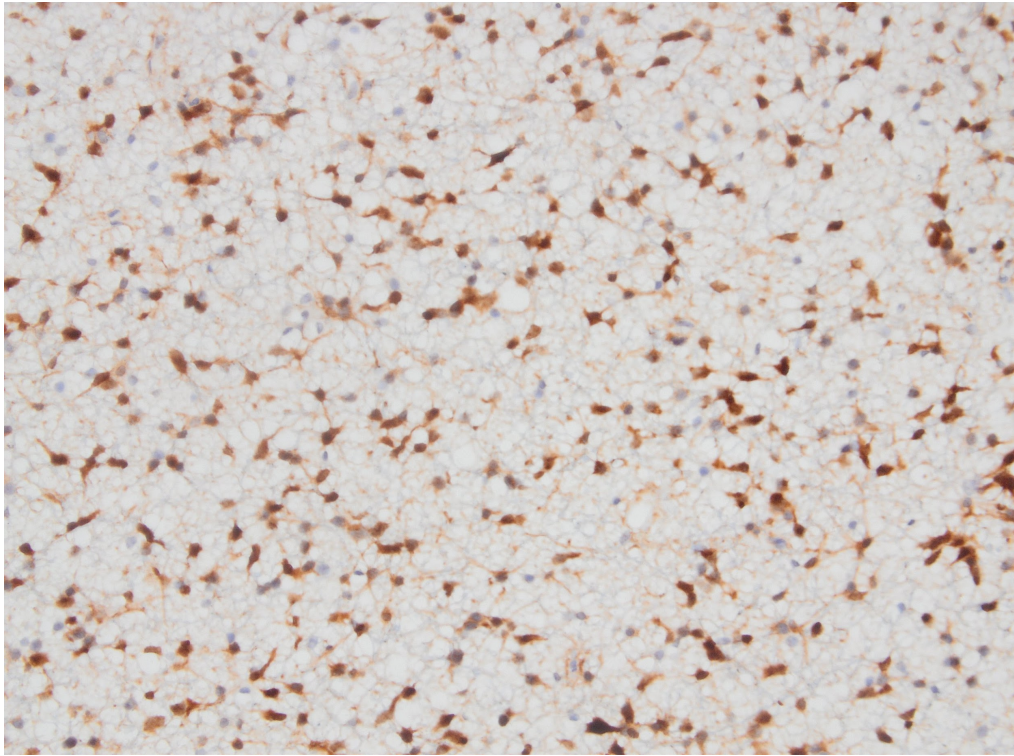


Şekil 2.2. Erişkin Tipi Difüz Gliomların Sınıflandırmasında Algoritmik Yaklaşım

İzositrat Dehidrogenaz (IDH) Mutasyonu

Gliomagenesis sırasında erken dönemlerden itibaren görülen ve tümör progresyonu boyunca kalıcı olan IDH mutasyonlarının tespiti amacıyla 2009 yılında tüm IDH mutasyonlarının %90'ını oluşturan IDH1 p.R132H mutasyonu için monoklonal antikor geliştirilmiştir. İmmünohistokimyasal IDH1 p.R132H boyaması (Resim 2.5) IDH1 p.R132H mutasyonu için yüksek oranda sensitif ve spesifik bir belirteçtir (48).

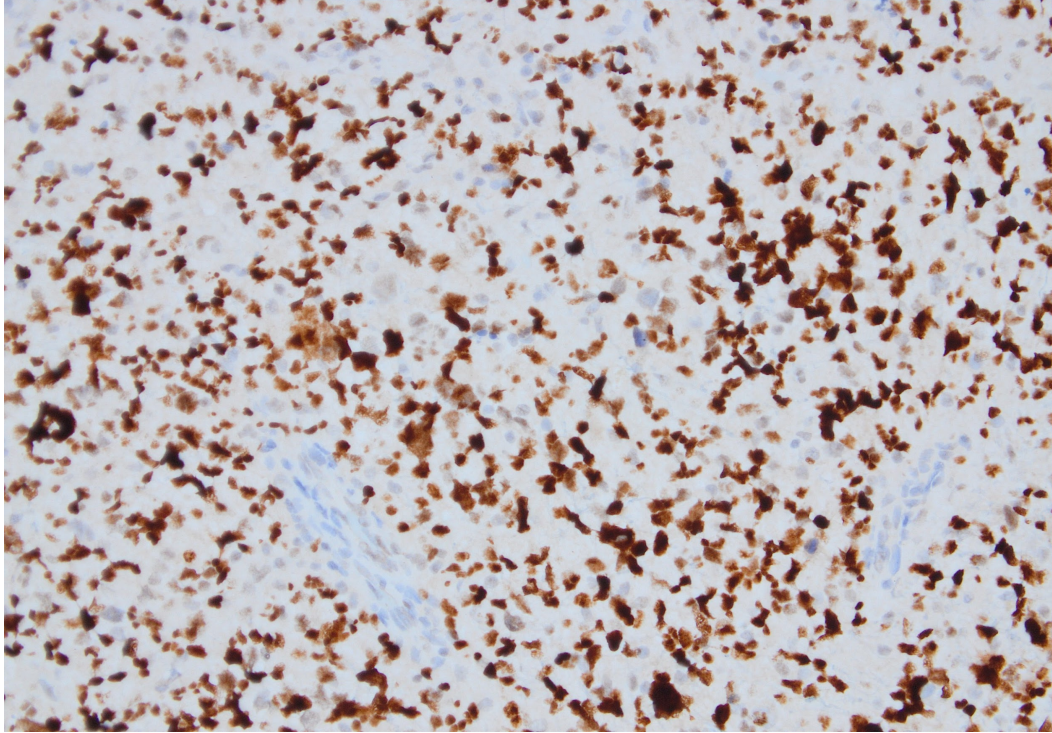
Dolayısıyla IDH1 p.R132H antikoruna difüz gliomların sınıflamasında ilk basamak olarak kritik bir öneme sahiptir (Şekil 2.2). Aynı zamanda neoplastik hücre infiltrasyonu ile reaktif gliosis ayrımında da yardımcıdır (49). Supratentorial yerleşimli astrositomların %90'ında IDH1 p.R132H mutasyonu görüldüğü için bu antikor ile supratentorial astrositelerde IDH mutasyonlarının %90'ı saptanabilmektedir. Daha nadir olarak görülen infratentorial yerleşimli astrositelerde ise %80 oranında p.R132H dışı IDH mutasyonları görülmektedir (50). 55 yaş ve altındaki hastalarda, IDH1 p.R132H immün negatif olduğu ya da boya ile suboptimal sonuç elde edildiği durumlarda, p.R132H dışı IDH mutasyonlarını dışlamak amacıyla IDH1 132. kodon ve IDH2 172. kodona yönelik gen sekanslama çalışmalarının yapılması önerilmektedir (3). 55 yaş üstü hastalarda görülen DSÖ SSS derece 4 gliomlarda IDH1 ve IDH2 mutasyon görülme sıklığının az olması nedeniyle IDH1 p.R132H immün negatif olduğu durumlarda gen sekanslaması yapılmasına gerek olmadığı bildirilmektedir (51).



Resim 2.5. Neoplastik astrositik hücrelerde sitoplazmik IDH1 R132H boyanması (200x)

TP53 Mutasyonu

IDH-mutant gliomlarda TP53 geninde fonksiyon kaybı mutasyonları görülmektedir. İmmünohistokimyasal p53 çalışması ile izlenen difüz ve kuvvetli nükleer pozitif boyanma (Resim 2.6) TP53 mutasyonları için vekil belirteç olarak kullanılmaktadır ve IDH mutant astrositom tanısını destekleyici bir bulgudur (27) (Şekil 2.2). TP53 mutasyonları protein degradasyonunun azalmasına ve yıkılmayan proteinin nükleusta birikmesine neden olur. IDH-mutant gliom vakalarında tümör hücrelerinin $>10\%$ 'unda kuvvetli nükleer p53 pozitifliği TP53 mutasyonları ile yüksek oranda korele olmakla beraber morfolojik bulgular ve ATRX gibi diğer immünohistokimyasal belirteçler ile değerlendirilmesi en doğru yaklaşımdır (52, 53). Genel olarak 10% eşik değer olarak kullanılmaktadır ancak aslında çoğu IDH-mutant astrositom vakasında $>50\%$ hücrede p53 ekspresyonu görüldüğü bilinmektedir (53).

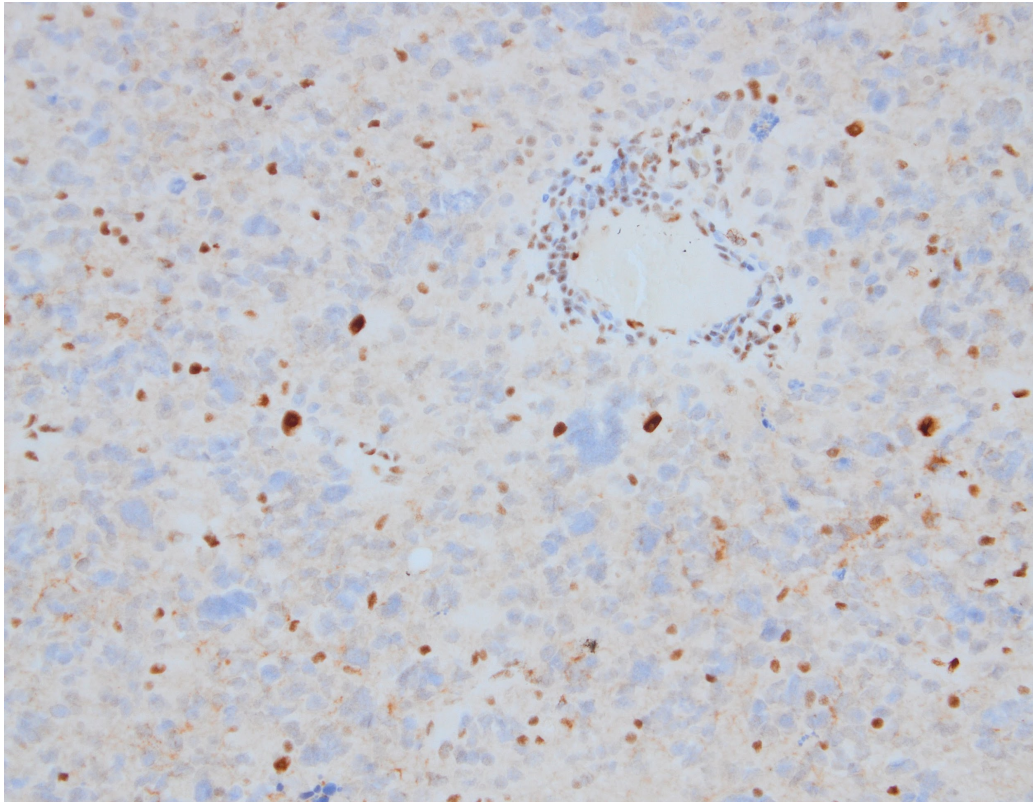


Resim 2.6. Neoplastik astrositik hücrelerde immünohistokimyasal olarak nükleer p53 boyanması (200x)

ATRX Alterasyonları

IDH-mutant astrositomlarda TP53 mutasyonları yanı sıra ATRX geninde fonksiyon kaybı mutasyonları görülmektedir. Bu inaktive edici mutasyonlar sonucunda nükleer ATRX ekspresyonunda kayıp görülür. Endotel hücrelerinde ve nöronlarda görülen nükleer ekspresyon ATRX immünohistokimyası için iç kontrol olarak kullanılmaktadır (27). İmmünohistokimyasal olarak nükleer ATRX

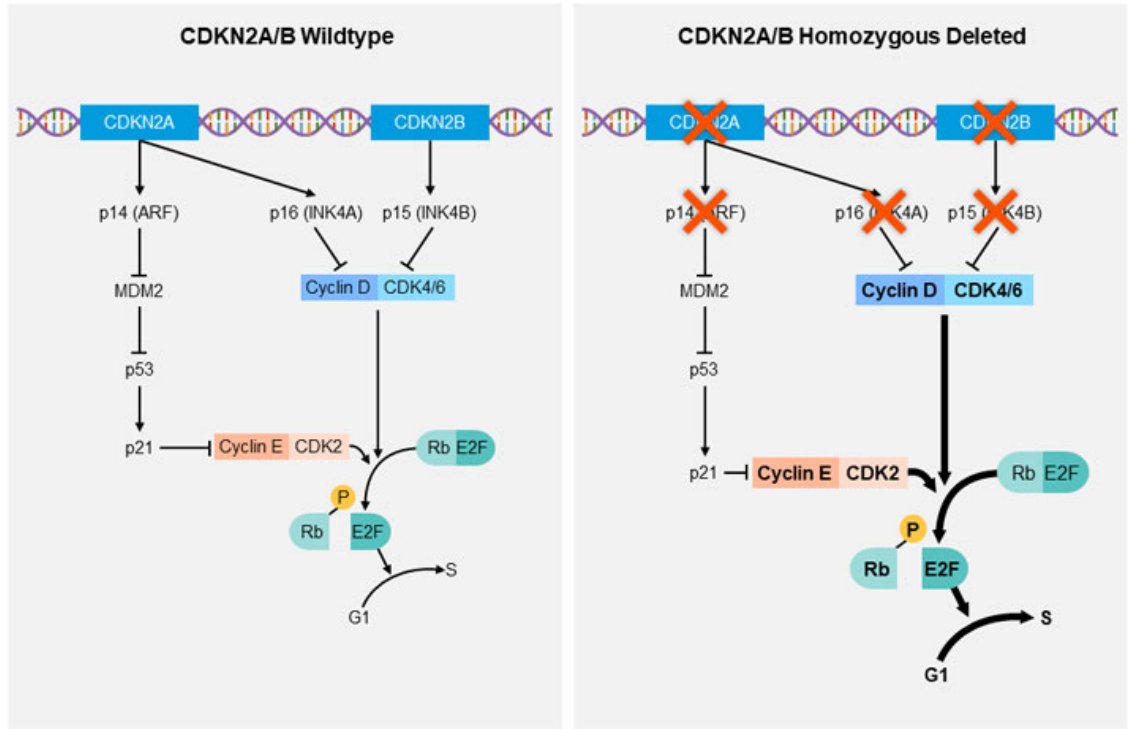
ekspresyonunun kaybı (Resim 2.7) IDH-mutant astrositom tanısı için güçlü bir destekleyici bulgudur (Şekil 2.2) ancak vekil belirteç değildir, çünkü H3 altere difüz gliomlarda ve bazı IDH-mutant olmayan gliomlarda da görülebilmektedir (54). Ek olarak ATRX ekspresyon kaybı supratentoriyal vakaların >%90'ında görülürken, infratentoriyal vakaların yaklaşık olarak %50'sinde görülmektedir (50). Difüz bir gliomda IDH1/IDH2 ve ATRX mutasyonların beraber görülmesi IDH-mutant astrositom tanısı için yeterli kabul edilmekte ve oligodendrogliom tanısını dışlamak için 1p/19q testi yapılmasına gerek olmadığı bildirilmektedir (11).



Resim 2.7. Neoplastik astrositik hücrelerde immünohistokimyasal ATRX nükleer ekspresyon kaybı (endotelial ve inflamatuvar hücrelerde ekspresyon korunmuş) (200x)

2.2.6. CDKN2A/B Homozigot Delesyonu

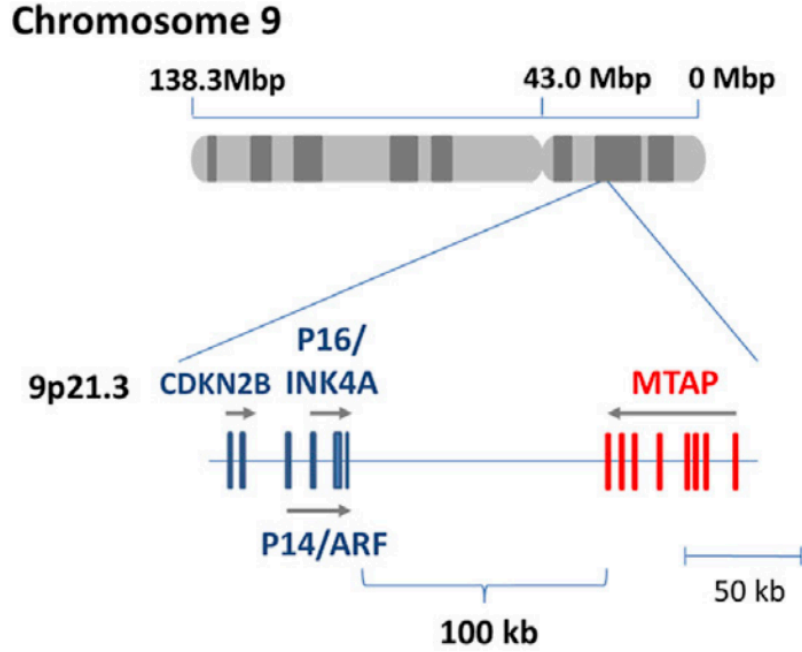
CDKN2A/B genleri kromozom 9p21.3'de lokalize olup CDKN2A; p16 (INK4A) ve p14 (ARF) tümör baskılayıcı proteinlerini, CDKN2B; p15 (INK4B) tümör baskılayıcı proteinini kodlamaktadır. Bu sayede hücrelerin G1'den S fazına geçişini inhibe etmektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. CDKN2A/B genlerinin hücre döngüsü üzerine etkisi (Görsel “Mayo Clinic’s Media Support Services”den (55) alınmıştır.)

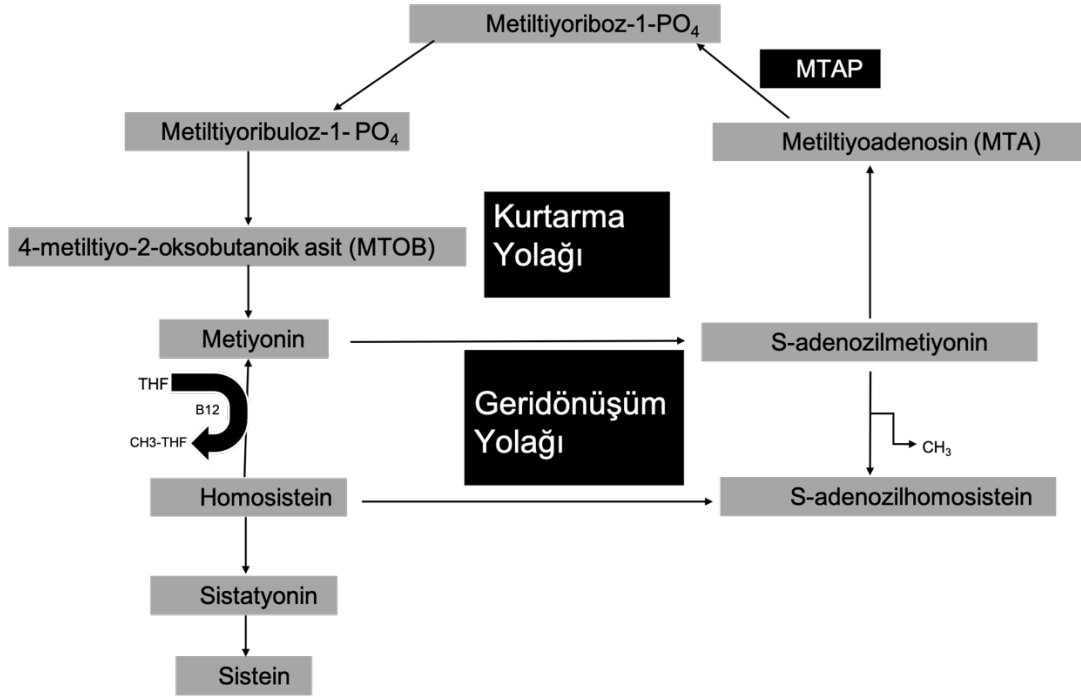
CDKN2A/B kodlayan genlerin homozigot delesyonlarının, IDH-mutant difüz astrositik gliomlarda kötü prognoz ve kısa sağkalım süreleri ile ilişkili olduğu pek çok retrospektif çalışmada gösterilmiştir (6). 2018 yılında yapılan bir çalışmada bütün IDH-mutant astrositomlarda (derece 2-4) CDKN2A/B HD’nun, tek değişkenli analizlerde kötü prognoz ile kuvvetle ilişkili olduğu ve CDKN2A/B HD içeren derece 3 IDH-mutant astrositomlarda derece 4 tümörlere benzer kısa sağkalım görüldüğü saptanmıştır (15). IDH-mutant astrositomlarda CDKN2A/B homozigot delesyonu görülme yüzdeleri derece II tümörlerde %0-12, derece III tümörlerde %6-20 ve derece IV tümörlerde %16-34 olarak saptanmıştır (12, 14). Beşinci cIMPACT-NOW güncelleme yazısında, CDKN2A/B HD içeren IDH-mutant astrositomların, mikrovasküler proliferasyon veya nekroz olmasa bile, DSÖ derece IV tümör olarak kabul edilmesi önerilmiştir (6). Bu doğrultuda 2021 yılında yayımlanan DSÖ SSS sınıflamasında CDKN2A/2B HD içeren tümörler, mikrovasküler proliferasyon ve/veya nekroz içermeseler de derece 4 olarak sınıflandırılmaktadır (11).

9p21 lokalizasyonundaki homozigot delesyon sadece CDKN2A/B lokusunu değil, MTAP ve FOCAD genleri ile “*arm level*” somatik kopya sayısı alterasyonlarını da etkilemektedir (56-58). MTAP geni 9p21 lokalizasyonunda CDKN2A’ya 100 kb telomerik olarak bulunur (59) (Şekil 2.4). CDKN2A HD görülen vakaların yaklaşık %80-90’ında MTAP HD da görülür (60).



Şekil 2.4. CDKN2A/B ve MTAP gen bölgelerinin 9. Kromozom üzerindeki yerleşimleri (Marjon ve ark. (59)’dan alınmıştır.)

Normal bir hücrede MTAP geni tarafından kodlanan MTAP proteini adenosin monofosfat ve metiyonin sentezinde “salvage” yolağında görevli kritik bir enzimdir. Metiltiyoadenosinin (MTA); adenin ve daha sonra metiyonine metabolize olacak metiltiyoriboz 1-PO₄’ a dönüşümünü katalizler (61, 62) (Şekil 2.5). Normal şartlar altında bütün hücrelerde MTAP protein ekspresyonu görülmektedir. Ancak MTAP HD sonucunda, MTAP protein sentezinde oluşan defekt nedeniyle hedef hücrelerde MTAP antikoruna ile immünohistokimyasal boyanma kaybı görülür.



Şekil 2. 5. Metiyonin biosentez yolları (Tang ve ark. (61)'dan Türkçeleştirilmiştir.)

MTAP antikoru ile immünohistokimyasal çalışmanın CDKN2A/B HD için güvenilir bir vekil biyobelirteç olarak kullanılabileceği mezotelyoma, pek çok epitelyal tümör, meningiom ve PXA vaka serilerinde gösterilmiştir (18-25). 2020 yılında Chapel ve ark. MTAP immünboyamasının CDKN2A HD'nin vekil biyobelirteci olarak malign mezotelyoma reaktif mezotelyal hücre proliferasyonu ayırımında %78 sensitivite ve %98 spesifisite ile oldukça güvenilir bir vekil biyobelirteç olduğunu göstermişlerdir. (25). Ayrıca MTAP antikoru ile immünreaksiyon değerlendirilmesinde gözlemciler arası uyumun çok iyi olduğu kaydedilmiştir (25). MTAP immünohistokimyasal boyamasının CDKN2A HD öngörmedeki rolü, difüz gliomlarda tam olarak bilinmemekle birlikte Satomi ve ark. IDH mutant astrositomlarda MTAP immünohistokimyasal ekspresyon kaybının CDKN2A HD'sini öngörmeye %88 sensitivite ve %98 spesifiteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Hem CDKN2A HD hem de MTAP ekspresyon kaybı, IDH mutant astrositomlar için genel sağkalımda önemli kötü prognostik faktörler olarak saptanmıştır. Düşük dereceli astrositomlarda CDKN2A HD ya da MTAP immünohistokimyasal ekspresyon kaybı IDH-mutant glioblastomlara benzer kötü prognoz ilişkili iken oligodendrogliom ve IDH-wild tip glioblastomlarda ise prognoz ile herhangi bir ilişki saptanmamıştır (26).

IDH mutant astrositomlarda MTAP immünohistokimyasal kaybının CDKN2A HD'sini öngörmeye yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip olduğu bildirilmekle birlikte MTAP boyanması ve CDKN2A HD durumu arasında uyumsuzluk gösteren olgular da mevcut olduğu bilinmektedir. Bir çalışmada CDKN2A HD olan 230 difüz gliomun %10'unda MTAP kopya sayısı korunmuş olarak saptanmıştır. Ancak CDKN2A HD olmadan MTAP HD'nin çok nadir (0.5%) görüldüğü kaydedilmiştir (63).

2.2.6.Prognoz

IDH-mutant astrositomlarda klinik olarak genç yaş ve daha uzun sağkalım ile ilişkilendirilmiştir (15). Rezeksiyon genişliği ve postoperatif rezidüel tümör varlığı da genel sağkalım ile koreledir (64, 65). Histopatolojik derecelendirmede kullanılan mitoz, nekroz ve mikrovasküler proliferasyon gibi özellikler prognoz ile ilişkilidir. IDH-mutant DSÖ SSS derece 2 tümörlerde ortalama sağkalım 10 yılın üzerinde iken; mitoz ve anaplazi içeren fakat nekroz ve mikrovasküler proliferasyon içermeyen derece 3 tümörlerde ortalama sağkalım 5-10 yıl arasındadır (15, 66). Nekroz, mikrovasküler proliferasyon ya da CDKN2A/B HD içeren derece 4 IDH-mutant astrositomlarda beklenen sağkalım süresi ise ortalama 3 yıldır (66). 2019 yılında yapılan bir çalışmada IDH mutant astrositomlarda ve 1p/19q kodelesyonu içeren IDH mutant derece 3 oligodendrogliomlarda CDKN2A HD kötü prognoz ile ilişkili ve her iki vaka grubunda da mikrovasküler proliferasyon ve/veya nekroz varlığı sadece CDKN2A HD yokluğunda prognostik olarak anlamlı bulunmuştur. Grade 2 gliomlarda ise CDKN2A HD saptanmamıştır (12).

CDKN2A/B HD yanı sıra RB1 HD (15), CDK4 amplifikasyonu (14), PDGFRA amplifikasyonu (14, 15), MET amplifikasyonu (67), MYC amplifikasyonu (15) ve kromozom 14q kaybı gibi diğer pek çok moleküler alterasyonun da kötü prognoz ile ilişkili olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur.

2.3. Oligodendrogliom, IDH-mutant ve 1p/19q kayıplı

2.3.1. Epidemiyolojik, Klinik ve Radyolojik Özellikler

Moleküler olarak tanımlanmış oligodendrogliom için net epidemiyolojik veriler henüz mevcut değildir. Histolojik olarak tanımlanmış oligodendrogliomların epidemiyolojik sınıflamasına bakıldığında DSÖ SSS derece 2 oligodendrogliomlar

tüm beyin tümörlerinin %0,9'unu oluştururken DSÖ SSS derece 3 oligodendrogliomlar %0,4'ünü oluşturmaktadır (68). Derece 2 tümörlerin ortalama görülme yaşı 43, derece 3 tümörlerin ortalama görülme yaşı 50'dir. Çok hafif kadın cinsiyet baskınlığı mevcuttur (K/E:1,2/1) (68). Oligodendrogliomlar çocuklarda nadiren görülür (69).

“*The Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS)*” veri tabanı (<https://cbtrus.org/>) ve “*French national POLA network*” veri tabanına (<https://epidemiologie-france.aviesan.fr/fr/content/view/full/87575>) göre oligodendrogliomların %59-62'si frontal lob, %14-16'sı temporal lob, %10-15'i parietal lob, %1-6'sı oksipital lob yerleşimlidir. Daha az sıklıkla posterior fossa, bazal ganglionlar ve beyin sapı yerleşimli olabilirler. Özellikle rekürren vakalarda leptomeningeal yayılım görülebilir (70). Nadiren gliomatosis serebri paterni ile karakterize yaygın intraserebral yayılım (71) veya multifokal tümörler (72) görülebileceği bilinmektedir.

Klinik bulgular genellikle spesifik olmayıp tümör lokalizasyonu ve tümörün büyüme hızı ile ilişkilidir. Hastaların yaklaşık 2/3'ü klinik olarak nöbet ile prezente olur. Baş ağrısı, intrakranial basınç artışı, fokal nörolojik bozukluklar ve kognitif fonksiyonlarda bozulma diğer sık görülen klinik semptomlardır (11). Görüntüleme yöntemlerinin gelişmesi nedeniyle bu tümörlerin rastlantısal olarak saptanma oranı son yıllarda artmış olup bir çalışmada bu oran %10 olarak bildirilmiştir (65).

Radyolojik olarak, IDH-mutant ve 1p/19q kayıplı oligodendrogliomlar BT görüntülemelerde kortikal ve subkortikal beyaz madde yerleşimli, hipointens ya da izointens kitle lezyonları olarak görülür (73). Kalsifikasyonlar çok sık görülür ancak tanısız değildir. Bazı tümörlerde intratümöral kanama veya kistik dejenerasyon görülebilmektedir (73). MRG'de T1'de hipointens ve T2'de hiperintens sınırları belirsiz kitle olarak görülürler. Mikrovasküler proliferasyon ve daha kötü prognoz ile ilişkili gadolinyum kontrast tutulumu; DSÖ SSS derece 2 oligodendrogliomların <%20'sinde saptanırken DSÖ SSS derece 3 oligodendrogliomların >%70'inde saptanmaktadır (74). MR spektroskopisi ile artmış 2-hidroksiglutarat seviyelerinin gösterilmesi IDH-mutant gliomların tanısında kullanılacak non-invaziv yöntemlerden biri olarak gelecek vadedilmektedir (75).

2.3.2. Etyoloji ve Patogenez

IDH-mutant ve 1p/19q kayıplı oligodendrogliomların etyolojisi net değildir. Çoğunlukla herhangi bir genetik zemin olmadan sporadik olarak gelişirler. Nadir olarak ailesel vakalar bildirilmiştir (76). Literatürde yer alan bazı çalışmalarda GLTSCR1 ve ERCC2 genlerinde görülen SNP'lerin artmış oligodendrogliom riskine yol açtığı gösterilmiştir (77). POT1 genindeki germline mutasyonlar ile ilişkili ailesel oligodendrogliom vakaları mevcuttur (78). Gliomların germline BRCA1 mutasyonları, yapısal “*missmatch repair deficiency*” sendromu, Lynch sendromu, herediter retinoblastom sendromu gibi ailesel kanser sendromları ile birlikte görülebileceği bilinmekte olup bu sendromlarda oligodendrogliom görülme olasılığı oldukça düşüktür (11). Etiyolojide viral ajanların rolü tartışmalıdır. Nadir olarak HIV enfeksiyonu, immünsüpresyon ve demyelinizan hastalık ilişkili oligodendrogliom vakaları bildirilmiştir (79, 80).

IDH-mutant ve 1p/19q kayıplı oligodendrogliomların hangi hücrelerden köken aldığı henüz net olarak bilinmemektedir. Mevcut veriler bu tümörlerin astrositik ve oligodendroglial hücre dizileri ve nöral prekürsör hücrelerin bir karışımından geliştiği fikrini desteklemektedir (11).

2.3.3. Genetik Profil

Oligodendrogliomlar moleküler olarak IDH1 kodon 132 ya da IDH2 kodon 172 “*missense*” mutasyonları ve 1p ve 19q “*whole arm*” delesyonlarının birlikteliği ile karakterizedir (11). Oligodendrogliomlarda görülen IDH mutasyonlarının >%90'ını IDH1 p.R132H mutasyonu oluşturmaktadır. Mutasyonların kalan kısmını ağırlıklı olarak IDH2 mutasyonları oluşturmaktadır. IDH2 mutasyonları astrositomlarla karşılaştırıldığında oligodendrogliomlarda daha sık olarak görülmektedir (81, 82). 1p/19q kodelesyonu kromozom 1 ve 19 arasındaki dengesiz translokasyon sonucu gelişir. Bu kodelesyonun altta yatan mekanizmasını aydınlatmak için yapılan metafaz FISH çalışmalarında kromozom 1 ve 19 arasındaki “*whole arm*” translokasyon oluşurken biri 1q ve 19p diğeri 1p ve 19q içeren iki adet türev (“*derivative*”) kromozomun oluştuğu kaydedilmiştir. Bu türev kromozomlardan der(1;19)(q10;p10) korunurken der(1;19)(p10;q10) kaybı 1p ve 19q'un eş zamanlı kaybına neden olmaktadır (83). Her iki kromozomda görülebilen tam olmayan ya da parsiyel delesyonlar IDH-mutant ve 1p/19q kayıplı oligodendrogliom tanısı için

yeterli değildir; çünkü IDH-mutant astrositom veya IDH-mutant olmayan glioblastomlarda da görülebilmektedir (84).

IDH-mutant ve 1p/19q kayıplı oligodendrogliomların büyük kısmında TERT promoter mutasyonları görülmektedir. TERT promoter mutasyonları 1p/19q kodelesyonu varlığı ile kuvvetle ilişkili iken ATRX mutasyonları ile birbirini dışlayan mutasyonlardır (44, 85, 86). TERT promoter mutasyonları oligodendrogliom gelişiminde erken dönemlerden itibaren görülürler (87) ve tümör progresyonu ve rekürrens durumlarında da görülmeye devam ederler (88). TERT geni telomeraz enziminin katalitik kısmını kodlar. TERT promoter mutasyonları TERT ekspresyonunun transkripsiyonel olarak artışına ve bunun sonucunda telomer stabilizasyonu, hücrel ölümsüzlük ve çoğalmaya yol açarlar (89).

IDH-mutant ve 1p/19q kodelesyonu gösteren oligodendrogliomların yaklaşık %70'inde kromozom 19q13.2 yerleşimli CIC (*“the human orthologue of the Drosophila melanogaster capicua gene”*) geninde mutasyonlar görülmektedir (90, 91). CIC, reseptör tirozin kinaz ve MAPK aracılığıyla hücrel büyüme, gelişme ve metabolizmada görev alan yapısal bir transkripsiyonel inhibitör gendir (92). Oligodendrogliomlarda görülen CIC mutasyonları *“nonsense/truncating”* mutasyonlar ya da rekürren *“missense”* mutasyonlar olarak karşımıza çıkmaktadır. Rekürren *“missense”* mutasyonlar oligodendrogliomlara spesifik olup diğer CIC-mutant tümörlerde görülmemektedir (93-95). CIC mutasyonları aynı zamanda IDH mutasyonlarına benzer şekilde 2-hidroksiglutarat üretimini de artırmaktadır (96).

IDH-mutant ve 1p/19q kayıplı oligodendrogliomların %20-30'unda kromozom 1p31.1 bölgesinde lokalize FUBP1 (*“far-upstream element (FUSE) binding protein 1”*) geninde somatik mutasyonlar mevcuttur (90). FUBP1 kök hücre yenilenmesinde ve tümör baskılayıcı gen ve onkogenlerin düzenlenmesinde görevli bir transkripsiyonel düzenleyicidir (97, 98). CIC ve FUBP1 *“nonsense/truncating”* mutasyonların vekil belirteci olan CIC ve FUBP1 protein ekspresyonlarının azalması/kaybı daha erken rekürrens ile ilişkili bulunmuştur (99).

IDH-mutant ve 1p/19q kayıplı oligodendrogliomların yaklaşık %15'inde kötü prognozla ilişkili olabileceği düşünülen NOTCH1 geninde mutasyonlar görülmektedir (5, 100). SETD2, PIK3CA ve SWI/SNF kromatin yeniden düzenleme

sistemine ait genlerde görülen mutasyonlar oligodendrogliomlarda daha nadir olarak görülen diğer mutasyonlardır (5).

Oligodendrogliomlarda görülen CDKN2A/B HD; DSÖ SSS derece 3 tümör, MRG’de artmış kontrast tutulumu ve daha kısa sağ kalım süreleri ile ilişkili, kötü prognoz göstergesi bir genetik alterasyondur (12). PIK3CA mutasyonu (101), TCF12 mutasyonu (102) ve MYC alterasyonları (103) tümör progresyonu ile ilişkili diğer genetik değişikliklerdir.

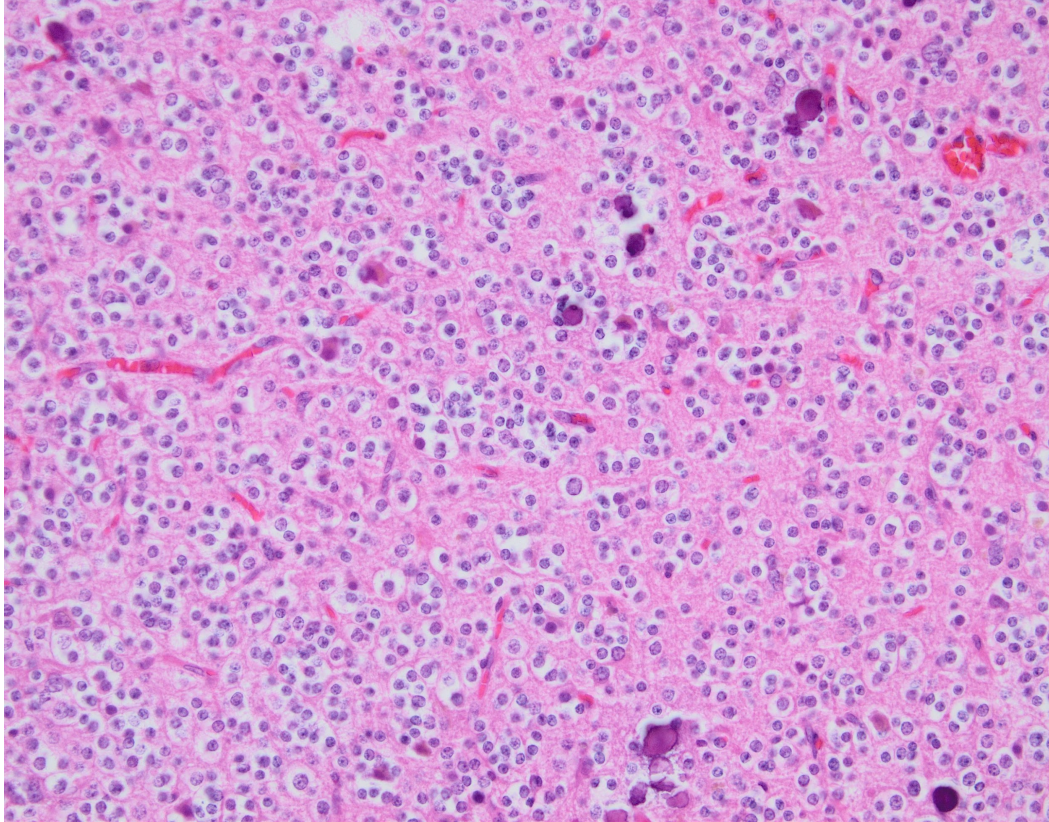
Oligodendrogliomlarda IDH mutasyonu, 1p/19q kodelesyonu ve TERT promoter mutasyonları erken dönemde görülen klonal alterasyonlar iken CIC, FUBP1, TCF12 vs. gibi mutasyonlar subklonal olup çoğunlukla tümör progresyonu ile ilişkilidir (87).

2.3.4. Histopatoloji

Histolojik özellikler

Oligodendrogliom hücreleri; histolojik olarak normal oligodendrogliyal hücrelerden daha büyük, uniform, yuvarlak, santral yerleşimli nükleusa ve sınırları belirgin, geniş, şeffaf sitoplazmaya sahip hücrelerdir. Bu karakteristik hücreler oligodendrogliomlar için tipik olan “bal peteği” ya da “sahanda yumurta” görünümünü oluşturur (Resim 2.8). Bu görünüm esas olarak takip-tespit artefaktı olduğu için yaymalarda, frozen kesitlerde ya da hızlı fiksasyon sonrası takibe alınan dokularda görülmez. Oligodendrogliomlarda yuvarlak egzantrik nükleuslu, geniş eozinofilik sitoplazmalı minigemistosit ya da mikrogemistosit olarak adlandırılan tümör hücreleri de görülür (11). Gliofibriler oligodendrositler tipik oligodendrogliyal hücreler gibi görünen, ancak GFAP ile ince perinükleer bir rim şeklinde boyanan tümör hücreleridir (104). Minigemistositler ve gliofibriler oligodendrositlerin DSÖ SSS derece 3 tümörlerde daha sık görüldüğü bilinmektedir. Özellikle DSÖ SSS derece 3 tümörlerde multinükleer hücreler bulunabilir (11). Tümör hücreleri arasında dağınık olarak reaktif astrositler bulunur. Mukositler, taşlı yüzük hücreleri (105), eozinofilik granüler hücreler (106) nadiren görülebilir. Yine nadir olarak nörositik (107) ya da gangliogliom benzeri (108) farklılaşma bildirilmiştir. Eğer tümör IDH mutasyonu ve 1p/19q kodelesyonu gösteriyorsa bu değişken morfolojik spektrumuna rağmen oligodendrogliom tanısı konulabilir. Oligodendrogliomlarda sarkomatöz alanlar izlenebilir. Literatürde sarkomatöz farklılaşma ve belirgin retikülojenz ile

karakterize, genellikle oligodendroglionlardan köken alan ya da de novo olarak gelişebilen ve “oligosarkom” olarak isimlendirilen nadir vakalar mevcuttur (109-111).

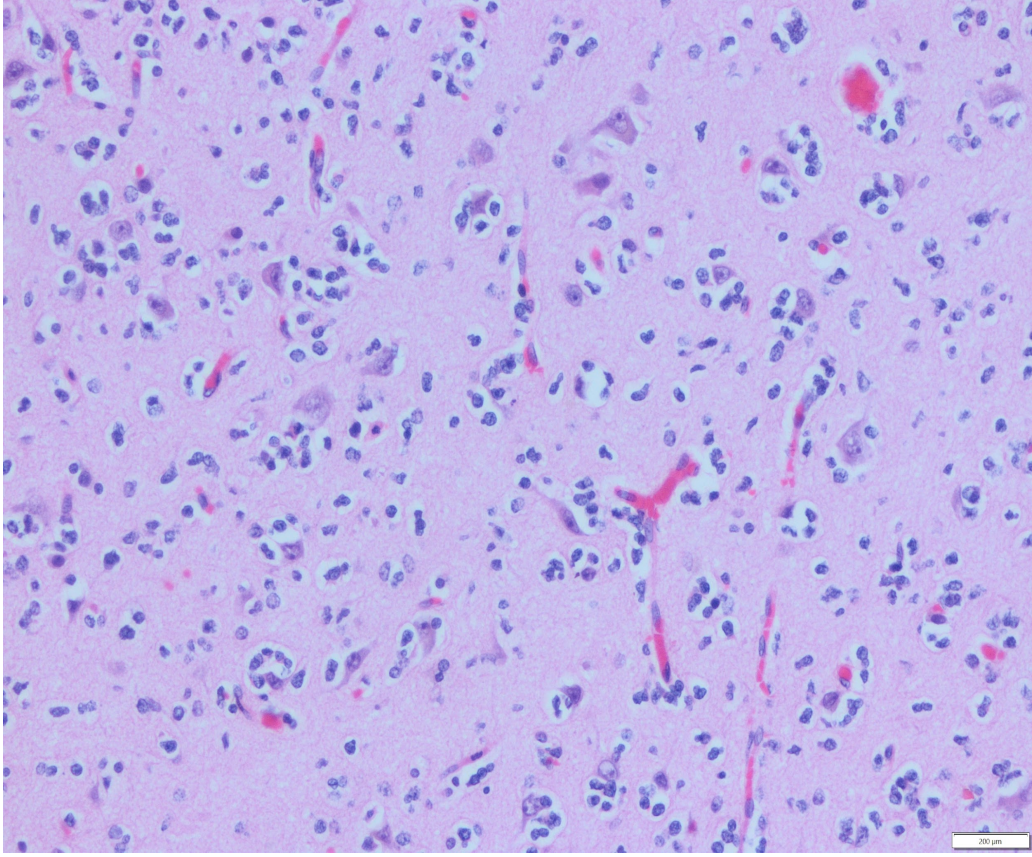


Resim 2.8. DSÖ SSS derece 2 oligodendrogliom (200x H&E)

Oligodendroglionlar tipik olarak “tavuk kümesi” benzeri ince, dallanan kapiller damar ağı içerirler (Resim 2.8). DSÖ SSS derece 3 tümörlerde fokal ya da yaygın olarak mikrovasküler proliferasyon görülür. Bazı tümörlerde intratümöral hemoraji izlenebilir (11).

Oligodendroglionlarda tümör içinde ya da infiltrasyon alanlarında mikrokalsifikasyonlar (Resim 2.8) oldukça sık olarak görülür. Zaman zaman ekstraselüler münin birikimi gösteren alanlar ve/veya mikrokistler izlenebilir (11).

Oligodendroglionlar korteks ve beyaz maddeyi diffüz olarak infiltre ederler. Bazen her iki beyin lobunu da infiltre ederek gliomatosis serebri benzeri bir tabloya neden olurlar. Kortekste sıklıkla perinöronal satellitoz (Resim 2.9), perivasküler agregatlanma ve subpial birikim gösterirler (11).



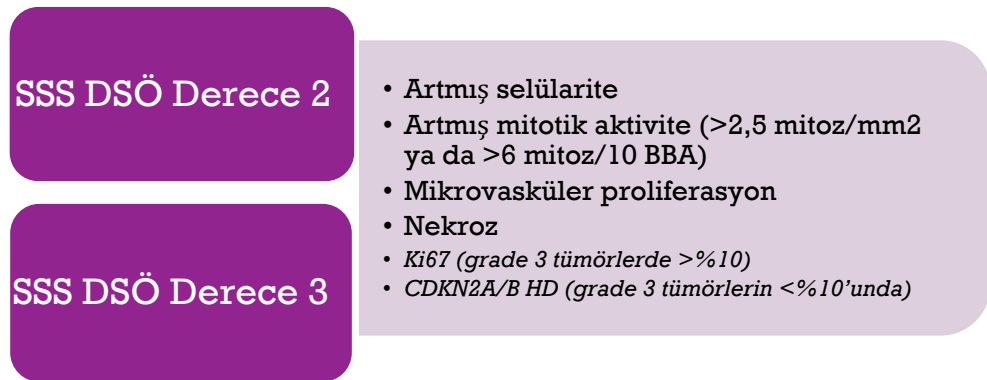
Resim 2.9. DSÖ SSS derece 2 oligodendrogliom, perinöronal satellitöz (200x H&E)

DSÖ SSS derece 3 tümörlerde mitotik aktivite çok az ya da hiç yoktur. DSÖ SSS derece 3 tümörlerde ise belirgin bir mitotik aktivite görülür. $\geq 2,5$ mitoz/mm² görülmesi daha kısa sağkalım süreleri ve DSÖ SSS derece 3 tümörler ile ilişkili bulunmuştur (112). Ki67 proliferasyon indeksi DSÖ SSS derece 2 tümörlerde genellikle $< 5\%$ iken, DSÖ SSS derece 3 tümörlerde $> 10\%$ 'dur (112, 113).

Dereceleme

Oligodendrogliomlar DSÖ sınıflamasında prognostik özelliklerine göre DSÖ SSS derece 2 ve derece 3 tümörler olarak iki gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.6). Ancak bu iki grup arasında ayırım için kullanılacak kriterler net değildir. Artmış selülarite, belirgin sitolojik atipi, artmış mitotik aktivite, mikrovasküler proliferasyon ve nekroz DSÖ SSS derece 3 tümörler ile ilişkilendirilen histopatolojik özelliklerdir (11). Mitotik aktivite için kesin bir eşik değer mevcut olmamakla birlikte $\geq 2,5$ mitoz/mm² (≥ 6 mitoz/10 BBA) artmış mitoz olarak kabul edilmekte olup daha kısa sağkalım süreleri ile ilişkili bulunmuştur (113, 114).

CDKN2A/B HD DSÖ SSS derece 3 tümörlerin bir kısmında (<%10) görülürken, DSÖ SSS derece 2 tümörlerde görülmemekte olup varlığı mikrovasküler proliferasyon ve nekrozdan bağımsız olarak kısa sağkalım süreleri ile ilişkili bulunmuştur (12). Dolayısıyla arada kalınan vakalarda CDKN2A/B HD derece tayini için moleküler bir yardımcı olarak kullanılabilir ve varlığı DSÖ SSS derece 3 tümörü destekler.



Şekil 2.6. DSÖ 2021 sınıflamasına göre IDH mutant, 1p/19q kayıplı oligodendrogliomlar için dereceleme kriterleri

İmmünofenotipik Özellikler

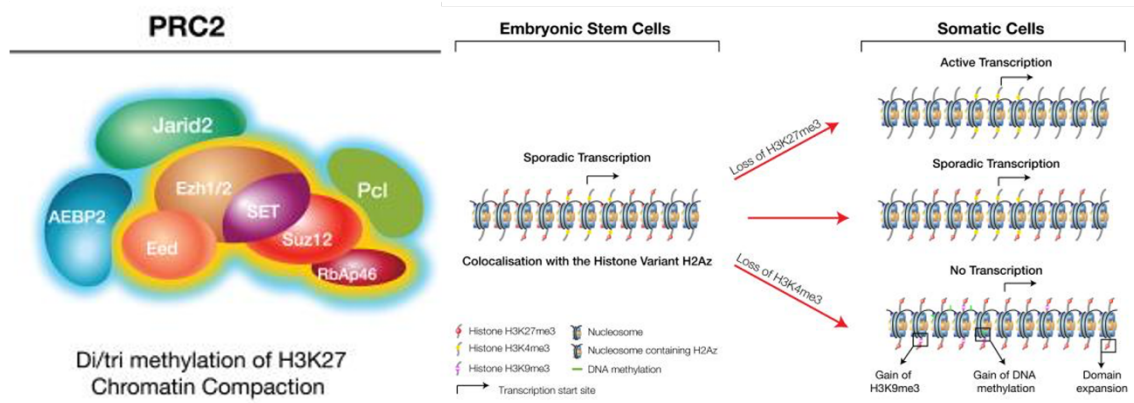
İmmünohistokimyasal olarak oligodendrogliomlar MAP2, S100, CD57, Olig1, Olig2 ve Sox10 pozitifdir. Ancak bu belirteçler astrositik gliomlarda da pozitif olup ayırıcı yardımcı değildir. GFAP ekspresyonu minigemistosit ve gliofibriler oligodendrositler gibi neoplastik hücrelerde ve reaktif astrositlerde görülür. Oligodendrogliomların büyük kısmı IDH1 p.R132H ile pozitif, nükleer ATRX ekspresyonu korunmuş ve p53 ile yaygın boyanma göstermeyen tümörlerdir (11).

Oligosarkomlar ise köken aldıkları oligodendrogliomlara benzer şekilde IDH mutasyonu içerirken; primer oligodendrogliomların aksine yaygın p53 pozitifliği, Olig2 ekspresyon kaybı, H3K27me3 ekspresyon kazanımı, YAP1 artmış ekspresyonu gösterebilmekte olup bazı vakalarda 1p/19q kodelesyonu saptanmamaktadır (111).

IDH-mutant, 1p/19q kayıplı oligodendrogliomlarda 1p/19q kodelesyonu için vekil immünohistokimyasal belirteç arayışları mevcuttur. Bir çalışmada 1p/19q kodelesyonu gösteren vakalarda “*a-internexin*” protein ekspresyonu olduğu görülmüş (115) ancak 1p/19q kodelesyonu için vekil belirteç olarak kullanılamayacağı sonucuna varılmıştır (116). NOGO-A ekspresyonu da benzer şekilde oligodendrogliomlarda yaygın olarak bulunmuştur ancak vekil belirteç olarak kullanılamayacağı gösterilmiştir (117). Son dönemde H3K27me3 nükleer ekspresyon kaybının 1p/19q kodelesyonu ile ilişkili olabileceği üzerine yayınlar mevcuttur.

2.3.5. Histon 3 Proteininin Lizin 27'sinin Trimetilasyonu (H3K27me3)

H3K27me3; gen ekspresyonlarının düzenlenmesinde görevli, histon metil transferaz aktivitesine sahip PRC2 (*the polycomb repressive complex 2*)'nin hedef moleküllerinden biridir. PRC2'nin enzimatik subunitlerinden olan EZH1 ve EZH2 H3K27'nin metilasyonunu katalizlerler. H3K27'nin metilasyonu gen ekspresyonlarının baskılanması ile ilişkilidir ve H3K27me3 gen transkripsiyon baskılayıcı olarak embriyogenez ve neoplastik süreçlerde rol oynamaktadır (118) (Şekil 2.7). PRC2 genlerinde görülen mutasyonlar sonucunda H3K27'nin metilasyonu sağlanamayacağından normal şartlar altında hücrelerde beklenen nükleer ekspresyonun kaybı görülür. Boyanma kaybı difüz ya da heterojen (mozaik) olabilir (119).



Şekil 2.7. PRC2 şematik gösterimi ve embriyonik kök hücre ve somatik hücrelerde PRC2 hedef genlerindeki kromatin özellikleri (Margueron ve ark (118)'dan alınmıştır.)

H3K27 trimetilasyonunun pediatrik tip yüksek dereceli düffüz gliomlar, PFA grubu posterior fossa ependimomları, meningiomlar ve malign periferik sinir kılıfı

tümörleri (MPNST) gibi tümörlerde rolü iyi bilinmektedir (119-123). Ancak oligodendrogliomlarda H3K27me3 ekspresyonu ve 1p/19q kodelesyonu ile nükleer H3K27me3 ekspresyon kaybı arasındaki ilişkiyi inceleyen sınırlı sayıda yayın mevcuttur.

Feller ve ark. 2019 yılında yaptıkları çalışmada H3K27 metilasyon durumunu belirlemek için yakın zamanda geliştirilmiş 'data-independent acquisition' (DIA) tabanlı kütle spektrometrisi yöntemi uygulanarak değerlendirilen 12 oligodendrogliom örneğinin H3K27me3 seviyelerini, 14 astrositom örneğine kıyasla ortalama olarak iki kat daha düşük saptamış ve histon metilasyonundaki alterasyonların difüz gliomların tiplendirmesinde kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir. DNA metilasyon profili bakılarak sınıflandırılmış 118 IDH mutant oligodendrogliom ve astrositomdan oluşan serilerinde 2 farklı H3K27me3 antikorumun ekspresyonu değerlendirmişlerdir. Poliklonal antikor (klon 07-449, Millipore) ile analiz edilen tüm örneklerde H3K27me3 ekspresyonunun korunmuş olduğunu (10/10 oligodendrogliom ve 10/10 astrositom) ve monoklonal antikor (klon C36B11) ile tüm oligodendrogliomlarda nükleer ekspresyon kaybı (74/76 kayıp, %97) saptanırken, astrositomların çoğunda nükleer ekspresyonun korunmuş (7/42 vakada kayıp, %17) olduğunu görmüşlerdir. (28).

Bunun hemen ardından Filipiski ve ark. IDH mutant ve 1p/19q kodelesyonu içeren oligodendrogliomların büyük çoğunluğunda (%96,2) H3K27me3 nükleer ekspresyon kaybının görüldüğünü bildirmiştir. H3K27me3 kaybı olan, IDH1 (R132H) pozitif ve ATRX ekspresyonu korunmuş difüz gliomların 0.9678 tahmini olasılıkla oligodendrogliom olduğu ve H3K27me3 immünekspresyon kaybının IDH-mutant difüz gliomların hücre tipine bağlı olarak sınıflamasında potansiyel ek bir immünhistokimyasal belirteç olarak kullanılabileceği sonucuna varmışlardır (29).

Pekmezci ve ark., 102 erişkin tipi gliom (28 oligodendrogliom, 34 IDH-mutant astrositom, 40 IDH mutant olmayan astrositom) olgusunda H3K27me3 (klon C36B11) ekspresyonunu değerlendirip oligodendrogliomların 21'inde (%75) H3K27me3 ile komplet nükleer ekspresyon kaybı saptarken, IDH mutant astrositomların 9'unda (%27) ve IDH mutant olmayan astrositomların sadece 1'inde komplet nükleer ekspresyon kaybı saptamışlardır (30). Bu çalışma sonucunda IDH mutant ve 1p/19q kodelesyonu içeren oligodendrogliomlarda H3K27me3 nükleer

ekspresyon kaybının sık görüldüğü (%75) ancak yeterince sensitif ve spesifik bir belirteç olmadığı bildirilmiştir (30).

Ammendola ve ark. kendi serilerinde yer alan 60 oligodendrogliom vakasının 58'inde H3K27me3 kaybı saptamışlar ve korunmuş ATRX ekspresyonu ile H3K27me3 kaybının beraber olduğu durumun oligodendrogliom tanısı koymak için %96 sensitif ve %100 spesifik olduğunu bildirmişlerdir (124).

145 gliom vakasının incelendiği bir başka çalışmada ise astrositik ve oligodendroglial tümörlerde ve IDH1 p.R132H ve “non-canonical” (non-R132H) IDH1/2 mutant oligodendrogliomlarda FISH ve DNA sekanslama sonuçları ile H3K27me3 immünohistokimyasal boyaması karşılaştırılmıştır. IDH1-R132H mutant oligodendrogliomların 36/40 (%90)'unda H3K27me3 kaybı görülürken IDH1-R132L ya da IDH2 mutant oligodendrogliomların (5 vaka) hiçbirinde H3K27me3 kaybı saptanmamıştır (125).

24 oligosarkom vakasının incelendiği bir çalışmada öncül oligodendrogliom vakalarında H3K27me3 ekspresyon kaybı mevcut iken ikincil olarak gelişen oligosarkomlarda H3K27me3 ekspresyonunun yeniden kazanımı dikkati çekmiştir (111).

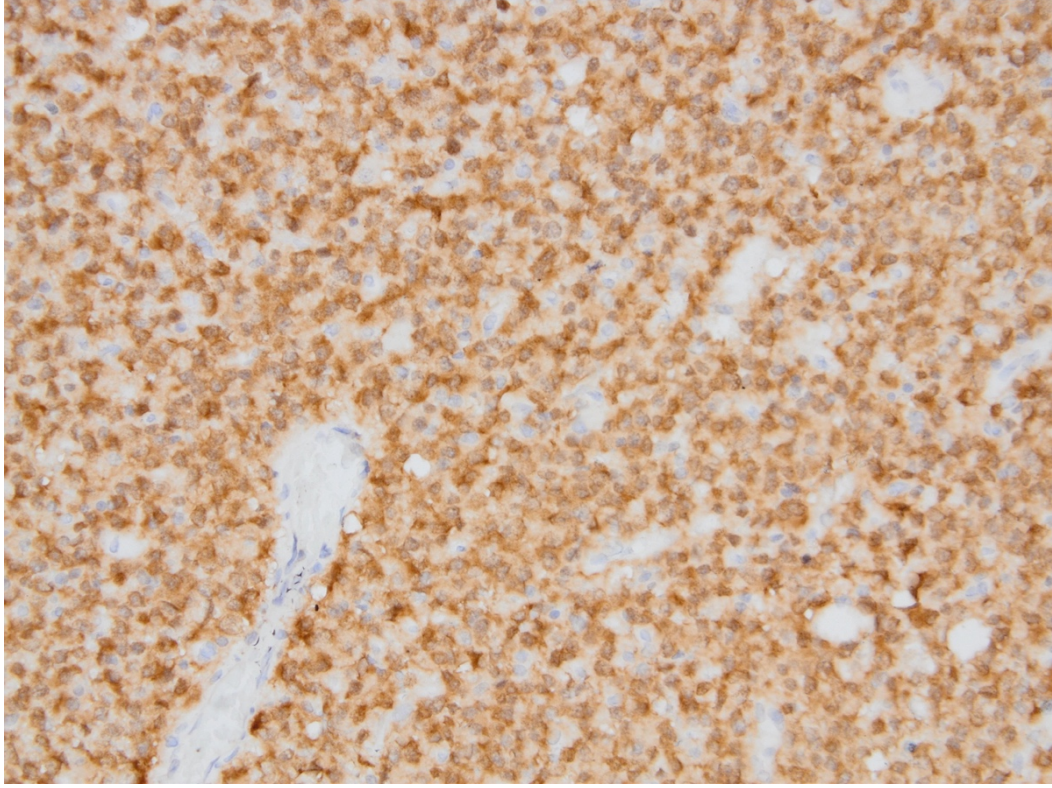
2.3.5. Tanısal Moleküler Patoloji

Oligodendrogliomlar moleküler olarak IDH1 veya IDH2 mutasyonları ve 1p/19q kodelasyonu ile tanımlanmaktadır. Tümörlerin çok büyük kısmında TERT promoter mutasyonu görülürken ATRX nükleer ekspresyon kaybı görülmez. TP53 mutasyonları ve p53'ün yaygın nükleer immünohistokimyasal ekspresyonunun görülmesi beklenmez (Şekil 2.2).

IDH Mutasyonu

Oligodendrogliom tanısı için IDH1 p.R132H immünohistokimyasal boyaması (Resim 2.10) ya da IDH1/IDH2 sekanslaması ile IDH mutasyonunun varlığı gösterilmelidir. Oligodendrogliomlarda görülen IDH mutasyonlarının >%90'ını IDH1 p.R132H mutasyonu oluşturmaktadır. Mutasyonların kalan kısmını ise ağırlıklı olarak IDH2 mutasyonları oluşturur (81). İmmünohistokimyasal olarak IDH1 p.R132H negatifliği durumunda p.R132H dışı IDH mutasyonlarını saptamak

amacıyla IDH1 132. kodon ve IDH2 172. kodona yönelik gen sekanslama çalışmaları yapılmalıdır (11).



Resim 2.10. İmmünohistokimyasal IDH1 R132H boyaması gösteren difüz gliom (200x)

1p/19q Kodelesyonu

Oligodendrogliom tanısı için FISH ya da moleküler genetik testler ile 1p/19q kodelesyonunun gösterilmesi gereklidir; IDH1 p.R132H pozitifliği ve nükleer ATRX ekspresyonunun varlığı tek başına yeterli değildir. 1p/19q kodelesyonunun saptanması için önerilen spesifik bir test mevcut değildir. FISH, PCR tabanlı heterozigotluk analizleri, NGS, DNA metilasyon bazlı profillemeye gibi yöntemler kullanılabilir. Kullanılan yöntemin “*whole arm*” kromozomal kayıpları gösterebilmesi gereklidir (11). Parsiyel delesyonlar ya da 1p veya 19q’da izole kayıplar IDH-mutant astrositom veya IDH-mutant olmayan glioblastomlarda da görülebileceği için IDH-mutant ve 1p/19q kodelesyonu gösteren oligodendrogliom tanısı için yeterli değildir (84). 1p/19q kodelesyonu gösteren oligodendrogliomların bir kısmında FISH analizinde tümör hücrelerinde 1q ve 19p’nin ikiden fazla olması ile karakterize polizomi saptanabilmektedir. Bu durumun erken rekürrens ve daha kısa sağkalım süreleri ile ilişkili olduğu bilinmektedir (126).

TERT Promoter Mutasyonu

IDH-mutant, 1p/19q kayıplı oligodendrogliomların çok büyük kısmında TERT promoter mutasyonları görülmektedir (85). Ancak IDH-mutant bir gliomda TERT promoter mutasyonlarının saptanması kesin olarak oligodendrogliom tanısı koydurmaz çünkü TERT promoter mutasyonları 1p/19q intakt, IDH-mutant astrositomların bir kısmında da görülebilir (127, 128). Aynı zamanda özellikle adolesanlarda görülen oligodendrogliomlarda TERT promoter mutasyonu görülmeyebilir (129).

2.3.6. Prognoz

IDH-mutant ve 1p/19 kodelesyonu gösteren oligodendrogliomlar genellikle tedavi yanıtı iyi olan nispeten iyi prognozlu tümörlerdir. Ortalama sağ kalım süresi >10 yıldır. Lokal rekürrens ya da leptomeningeal yayılım gösterebilirler. Rekürrens sırasında progresyon gösterebilirler (11).

Klinik olarak genç tanı yaşı, frontal lob yerleşimi, nöbet ile prezentasyon, postoperatif yüksek Karnofsky puanı ve tam cerrahi eksizyon iyi prognoz ile ilişkili faktörlerdir (130). Radyolojik görüntülemelerde kontrast tutulumu olması kötü prognoz göstergesidir (131).

Histolojik olarak nekroz, yüksek mitoz sayısı, artmış selülarite ve mikrovasküler proliferasyon kötü prognoz ile ilişkilidir. Ancak bu faktörlerin her biri tek başına prognozu öngörmeye yeterli değildir. Önceki bilgilere göre oligodendrogliom tümörlerinde derece, sağ kalımı öngörmeye bağımsız bir prediktör olarak değerlendirilmekteydi. Güncel literatürde ise DSÖ SSS derece 2 tümörlerin DSÖ SSS derece 3 tümörlere oranla daha iyi prognoza sahip olduğunu söyleyen yayınların (132-134) yanında DSÖ SSS derecesinin prognozu öngörmeye sınırlı rolü olduğunu (135) ya da rolü olmadığını (136) söyleyen yayınlar da mevcuttur.

Proliferatif faktörlerden Ki67 proliferasyon indeksinin >%15 ve mitoz sayısının $\geq 2,5$ mitoz/mm² (≥ 6 mitoz/10 BBA) olması kötü prognoz ile ilişkilidir (112).

Moleküler olarak FISH ile saptanan 1q ve 19p ko-polizomisi erken rekürrens ve kısa sağkalım süreleri ile ilişkilidir (126). DSÖ SSS derece 3 tümörlerin bir kısmında (<%10) görülebilen ancak DSÖ SSS derece 2 tümörlerde görülmeyen CDKN2A/B HD kötü prognoz ile ilişkili moleküler alterasyonlardan biridir (12).

PIK3CA mutasyonu (101), TCF12 mutasyonu (102) ve MYC alterasyonları (103) tümör progresyonu ile ilişkili diğer genetik alterasyonlardır. PTEN mutasyonu DSÖ SSS derece 2 oligodendrogliomlarda kısa sağ kalım süreleri ile ilişkili bulunmuştur (137).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olguların Seçimi ve Histopatolojik Değerlendirmeler

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan çalışma izni alındıktan sonra (karar no: 2021/17-08) Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından THD-2022-19901 numaralı bilimsel araştırma projesi olarak desteklenmiştir.

Hastane otomasyon sistemi (nucleus) kullanılarak yapılan taramalarda Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2014-2021 yılları arasında tanı almış 133 adet IDH mutant astrositom ile 100 adet IDH mutant- 1p/19q kayıplı oligodendrogliom vakası olduğu tespit edilmiştir. Yapılan arşiv taramalarında parafin bloklarına ulaşılabilen ve parafin bloklarında yeterli doku bulunan 158 hastaya ait 93 adet IDH-mutant astrositom ve 73 adet IDH-mutant, 1p/19q kayıplı oligodendrogliom vakası çalışmaya dahil edilmiştir. Bu vakalara ait H&E kesitler biri nöropatoloji alanında deneyimli olmak üzere 2 patoloğ tarafından yeniden değerlendirilip tanı teyidi yapılmıştır.

Hastalara ait yaş, cinsiyet, biyopsi ve dosya numaraları, ameliyat tarihleri, rekürrens ve ölüm durumları, varsa rekürrens ve ölüm tarihleri, tümör histopatolojik ve immünohistokimyasal özellikleri kaydedilmiştir.

3.2. Doku Mikrodizin (TMA) Oluşturma

Seçilen 168 olguya ait kesitlerin histopatolojik incelemeleri sırasında, TMA oluştururken kullanılacak olan tümörlü uygun alanlar H&E boyalı preparatlarda işaretlenmiştir. İşaretlenen alanlara karşılık gelen formalin fikse parafine gömülü bloklardan deri punch biyopsi setleri kullanılarak manuel olarak, her tümör için 3'er mm çaplı 2 kor halinde tümör dokuları alınarak 11 adet TMA bloğu hazırlanmıştır. Oluşturulan 11 adet TMA bloğundan pozitif yüklü lamlara 4 µm kalınlıkta alınan boyasız kesitlere ayrıca H&E boyama yapılarak doku özelliği değerlendirilmiştir.

3.3. Morfolojik Parametreler

Çalışmaya dahil edilen vakalara ait H&E boyalı preparatlar tekrar değerlendirilmiş olup morfolojik özellikler teyit edilmiştir. Mitoz, nekroz ve

mikrovasküler proliferasyon durumu kaydedilmiştir. Mitoz için astrositomlarda 10 BBA'da 2 mitoz, oligodendrogliomlarda 10 BBA'da 6 mitoz eşik değer olarak kabul edilmiştir. Morfolojik bulgular ile DSÖ SSS 2016'ya göre derecelendirme yapılmıştır.

3.4. Klinik Veriler

Hastalara ait klinik veriler Hacettepe Üniversitesi hastane otomasyon sisteminden (nucleus) ve T.C. Sağlık Bakanlığı e-nabız portalından elde edilmiştir. Hastaların yaşları, cinsiyetleri, tanı anındaki yaşları, mortalite olup olmadığı kaydedilmiştir. Hastalar tanı aldıkları yaşlara göre gerekli analizlerde kullanılmak üzere 35 yaş ve altı, 36-55 yaş ve 55 yaş üzeri olarak gruplandırılmıştır.

3.5. CDKN2A FISH Çalışmasının Değerlendirilmesi

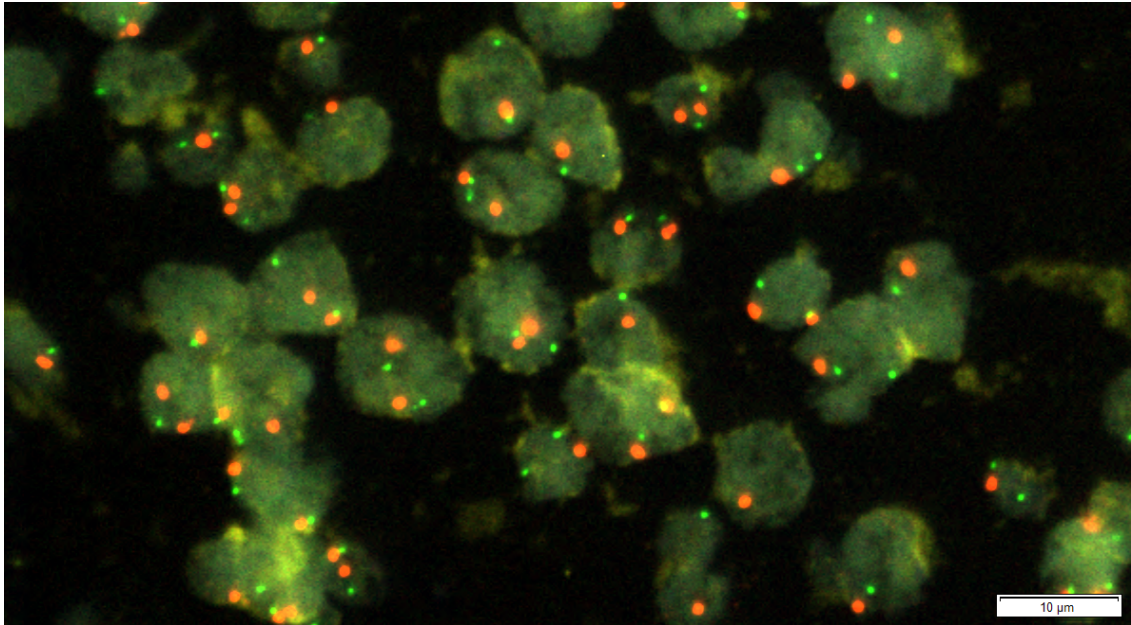
CDKN2A FISH uygulaması TMA blokları ile yapılmıştır. TMA bloklarından 4 µm kalınlıkta kesitler elde edilmiştir. Kesitler etüvde 75° C'de 2 saat bekletildikten sonra deparafinizasyon için ksilolde 2x5dk, alkolde 2x5 dk bekletilmiştir. Preparat çeşme suyunda yıkandıktan sonra %10'luk sitrat tampon solüsyonunda 3 dakika yüksek basınçta kaynatılmıştır. Tekrar çeşme suyunda yıkanan preparat 20 dakika süreyle 37° C'de pepsin 20 solüsyonunda bekletilip, takiben 2x5 dk süreyle PBS (fosfat tampon solüsyonu) ile yıkanıp havada kurutulmuştur. Tamponlu formalinde 10 dakika fikse edildikten sonra tekrar 2x5 dk süreyle PBS ile yıkanıp havada kurutulmuştur. Sonra uygun prob damlatılarak üzeri lamel ve "rubber cement" isimli yapıştırıcıyla kapatılmıştır. Bu aşamada ZYTOLIGHT SPEC CDKN2A/CEN 9 DUAL COLOR PROBE probu uygulanmıştır. Preparat Thermo Brite cihazında 80°C'de 5 dk, ardından 38°C'de 18 saat süreli programda bekletilmiş, program sonunda rubber cement ve lamel kaldırılmış, preparat 72°C'deki 2 dakika süreyle SSC (*Saline Sodium Chloride*) + %0,3 NP40 solüsyonunda yıkanmıştır. Preparat kuruduktan sonra DAPI (*diamidino-2-fenilindol*) damlatılmış, lamelle kapatıldıktan sonra değerlendirmeye kadar geçen sürede +4°C'de karanlık ortamda saklanmıştır. Hazırlanan preparatlar Olympus VS120 sanal slayt mikroskopi tarama sistemi ile taranmış ve dijital görüntüler elde edilmiştir.

CDKN2A FISH çalışmasının değerlendirmesinde hem karanlık alanda immünfloresan mikroskobu ile hem dijital slaytlarda üst üste olmayan en az 100 neoplastik hücre sayılmıştır. FISH çalışmasında CDKN2A probu (test prob) yeşil, CEN9 probu (referans prob) turuncu renk sinyal vermektedir. Delesyon içermeyen bir

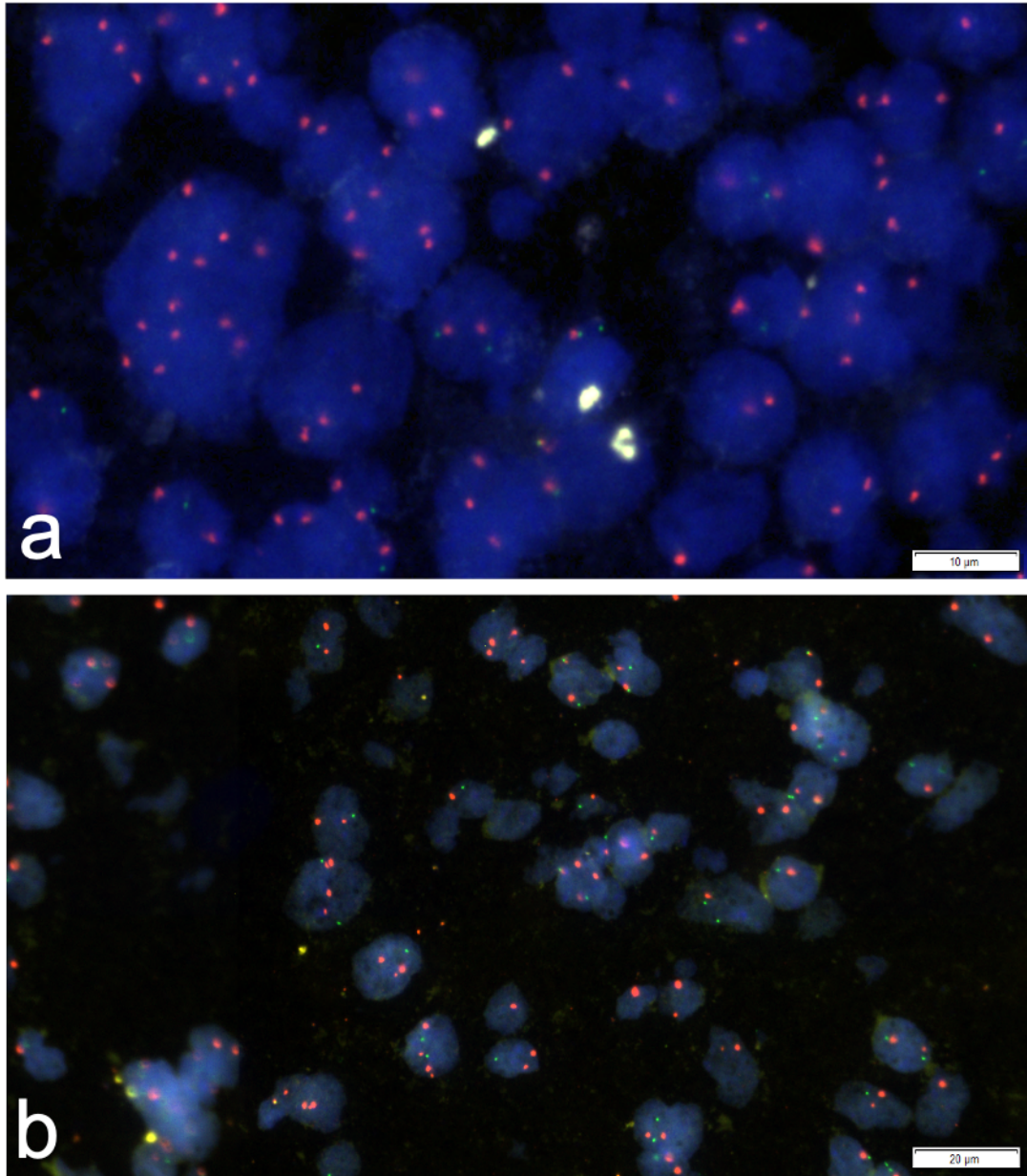
hücrede iki turuncu iki yeşil sinyal görülmesi beklenmektedir. İki CDKN2A ve iki CEN9 sinyali içeren endotelyal hücreler, lenfositler ve neoplastik olmayan glial hücreler iç kontrol olarak kullanılmıştır. CDKN2A FISH sonuçları aşağıdaki gibi yorumlanmıştır;

Delesyon yok: İki turuncu (CEN9) iki yeşil (CDKN2A) sinyal içeren neoplastik hücre sayısının $>90\%$ olduğu durum (Resim 3.1)

Delesyon var: En az bir turuncu sinyal (CEN9) içeren ve her iki yeşil sinyalde (CDKN2A) kayıp izlenen hücre sayısının $\geq 10\%$ olduğu durum (Resim 3.2)



Resim 3.1. FISH çalışmasında CDKN2A HD içermeyen neoplastik hücreler



Resim 3.2: FISH çalışmasında CDKN2A HD içeren neoplastik hücreler a) Neoplastik hücrelerin >%90'ında delesyon b) Neoplastik hücrelerin %30'unda delesyon

3.6. 1p/19q FISH Çalışmasının Değerlendirilmesi

Oligodendrogliom tanısı olan tümörlerin çok büyük bir kısmına (72/73) ve astrositom tanısı olan tümörlerin bir kısmına (13/93) tanı sırasında 1p/19q FISH çalışması uygulanmış olup bu vakalarda 1p/19q kodelesyonu durumu mevcut FISH raporlarından elde edilmiştir. Difüz bir gliomda IDH1/IDH2 ve ATRX mutasyonların beraber görülmesi IDH-mutant astrositom tanısı için yeterli kabul edilmekte olduğundan ve oligodendrogliom tanısını dışlamak için 1p/19q testi yapılmasına gerek olmadığı

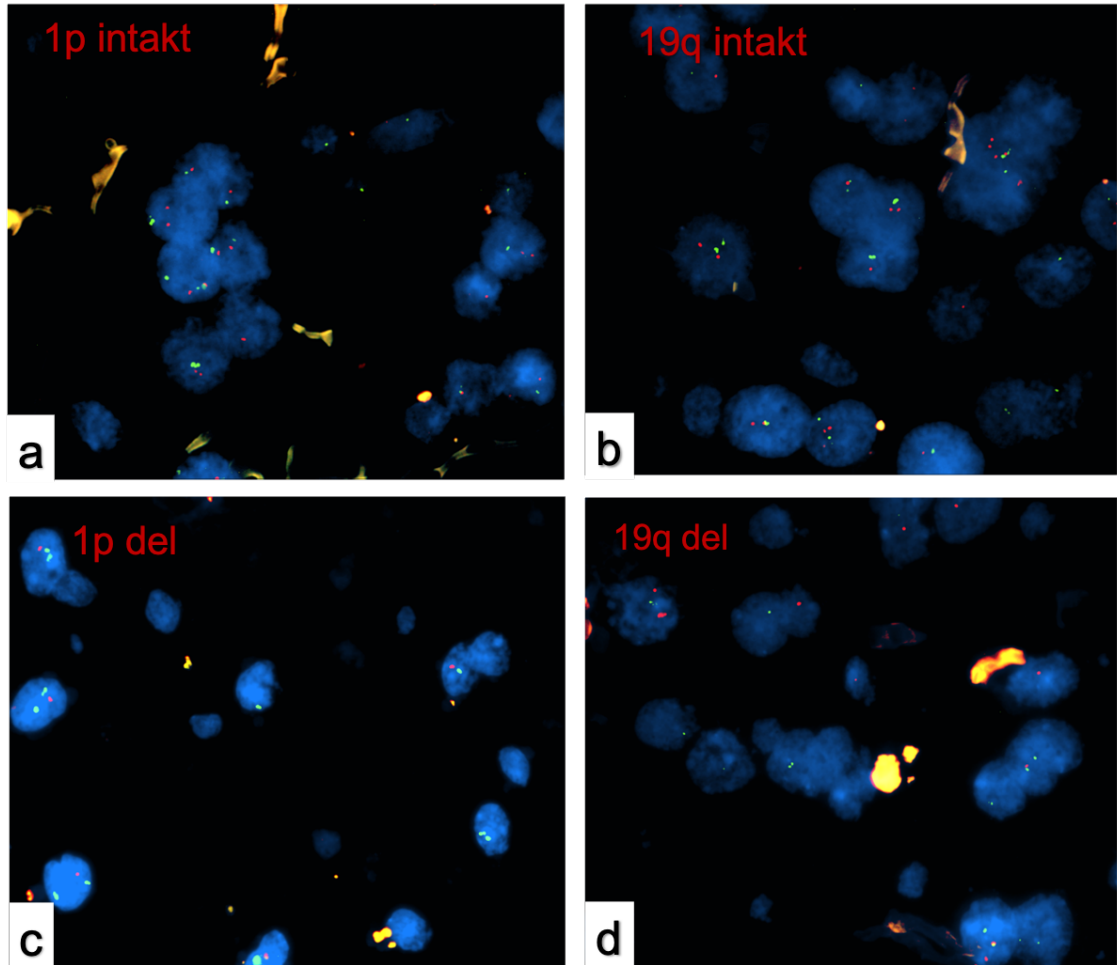
bilindiğinden bu grupta 1p/19q testi uygulanmamıştır. 1p/19q FISH uygulaması; daha önce 1p/19q kodelesyonu durumuna bakılmayan, IDH mutant, ATRX ekspresyonu korunmuş 5 vakaya uygulanmıştır.

Bu vakalara ait tümör içeren parafin bloklardan 4 µm kalınlıkta kesitler elde edilmiştir. Kesitler etüvde 75° C’de 2 saat bekletildikten sonra deparafinizasyon için ksilolde 2x5dk, alkolde 2x5 dk bekletilmiştir. Preparat çeşme suyunda yıkandıktan sonra %10’luk sitrat tampon solüsyonunda 3 dakika yüksek basınçta kaynatılmıştır. Tekrar çeşme suyunda yıkanan preparat 20 dakika süreyle 37° C’de pepsin 20 solüsyonunda bekletilip, takiben 2x5 dk süreyle PBS ile yıkanıp havada kurutulmuştur. Tamponlu formalinde 10 dakika fikse edildikten sonra tekrar 2x5 dk süreyle PBS ile yıkanıp havada kurutulmuştur. Sonra uygun prob damlatılarak üzeri lamel ve “*rubber cement*” isimli yapıştırıcıyla kapatılmıştır. Bu aşamada *ZYTOLIGHT GLIOMA 1P/19Q PROBE SET* problemleri uygulanmıştır. Preparat Thermo Brite cihazında 80°C’de 5 dk, ardından 38°C’de 18 saat süreli programda bekletilmiş, program sonunda *rubber cement* ve lamel kaldırılmış, preparat 72°C’deki 2 dakika süreyle SSC + %0,3 NP40 solüsyonunda yıkanmıştır. Preparat kuruduktan sonra DAPI damlatılmış, lamelle kapatıldıktan sonra değerlendirmeye kadar geçen sürede +4°C’de karanlık ortamda saklanmıştır.

1p/19q FISH çalışmasının değerlendirmesinde 1p36/1q25 ve 19q13/19p13 FISH problemleri ayrı ayrı değerlendirilmiştir. 1p FISH probu ile normal bir hücrede 1p36 gen bölgesine (test prob) ait iki turuncu sinyal ve 1q25 bölgesine (referans prob) ait iki yeşil sinyal görülmesi beklenmektedir. 19q FISH probu ile normal bir hücrede 19q13 gen bölgesine (test prob) ait iki turuncu sinyal ve 19p13 bölgesine (referans prob) ait iki yeşil sinyal görülmesi beklenmektedir. Her iki prop için karanlık alanda üst üste olmayan en az 100 neoplastik hücre sayılarak değerlendirme yapılmıştır. Turuncu ve yeşil sinyallerin toplam sayılarının birbirine oranları ve referans prob/test prob oranı 2 olan hücrelerin yüzdesi hesaplanmıştır ve aşağıdaki gibi yorumlanmıştır;

Delesyon yok: test prob/referans prob oranı >0.8 (Resim 3.3 a-b).

Delesyon var: test prob/referans prob oranı =<0.8 ve referans prob/test prob oranı 2 olan hücrelerin yüzdesi =>35 (Resim 3.3 c-d)



Resim 3.3: 1p/19q FISH çalışmasının değerlendirilmesi a) İntakt 1p36 gen bölgesi, b) İntakt 19q13 gen bölgesi, c) 1p36 gen bölgesinde delesyon, d) 19q13 gen bölgesinde delesyon.

3.7. MTAP İmmünohistokimyasal İncelemesi

MTAP IHK uygulaması TMA bloklarından elde edilen 4 µm kalınlıkta kesitler kullanılarak yapılmıştır. Her kesitte kontrol olarak kolon dokusu kullanılmıştır. Kesitler Leica Bond-Max immünohistokimya cihazı (Leica Microsystems, Wetzlar, Almanya) kullanılarak “*Methylthioadenosine phosphorylase (MTAP)* (1:1000 dilüsyon; rabbit monoklonal antikor, klon EPR6893; Targeted Retrieval Solution, pH 9.0, Abcam, Cambridge, UK) primer antikoruna ile immünohistokimyasal yöntemle boyanmıştır. Kesitler 75°C’de Bond Dewax çözeltisi (Leica Microsystems, Kat. No: AR9222) ile deparafinize edilmiştir. %96’lık alkol serisi ile muamelenin ardından EDTA (Leica Biosystems, Newcastle Ltd., Newcastle Upon Tyne; İngiltere, kat. no: AR9640) içinde 100°C’de 20 dakika süreyle antijen açığa çıkarma işlemi gerçekleştirilmiştir. Takiben

doku kesitleri oda sıcaklığında primer antikor ile 25 dakika inkübe edilmiştir. Adımlar arasında yıkama için Tris tamponlu salin (Leica Microsystems, Kat. No: AR9590) kullanılmıştır. Ardından proteinlerin gösterilmesi için “Bond Polymer Refine Detection” kiti (Leica 39 Microsystems, Newcastle Ltd., Newcastle Upon Tyne; İngiltere, Kat. No: DS9800) uygulanmıştır. Kit, sırasıyla endojen peroksidaz aktivitesini blokaj için %3-4'lük hidrojen peroksit (oda sıcaklığında 15 dakika), kullanıma hazır sekonder antikor (oda sıcaklığında 9 dakika), horse radish peroksidaz-IgG polimeri (oda sıcaklığında 9 dakika), 3'-3'- diaminobenzidin tetrahidroklorür (DAB) kromojen (oda sıcaklığında 7 dakika) ve karşıt boyama için hematoksilin (oda sıcaklığında 8 dakika) içermektedir.

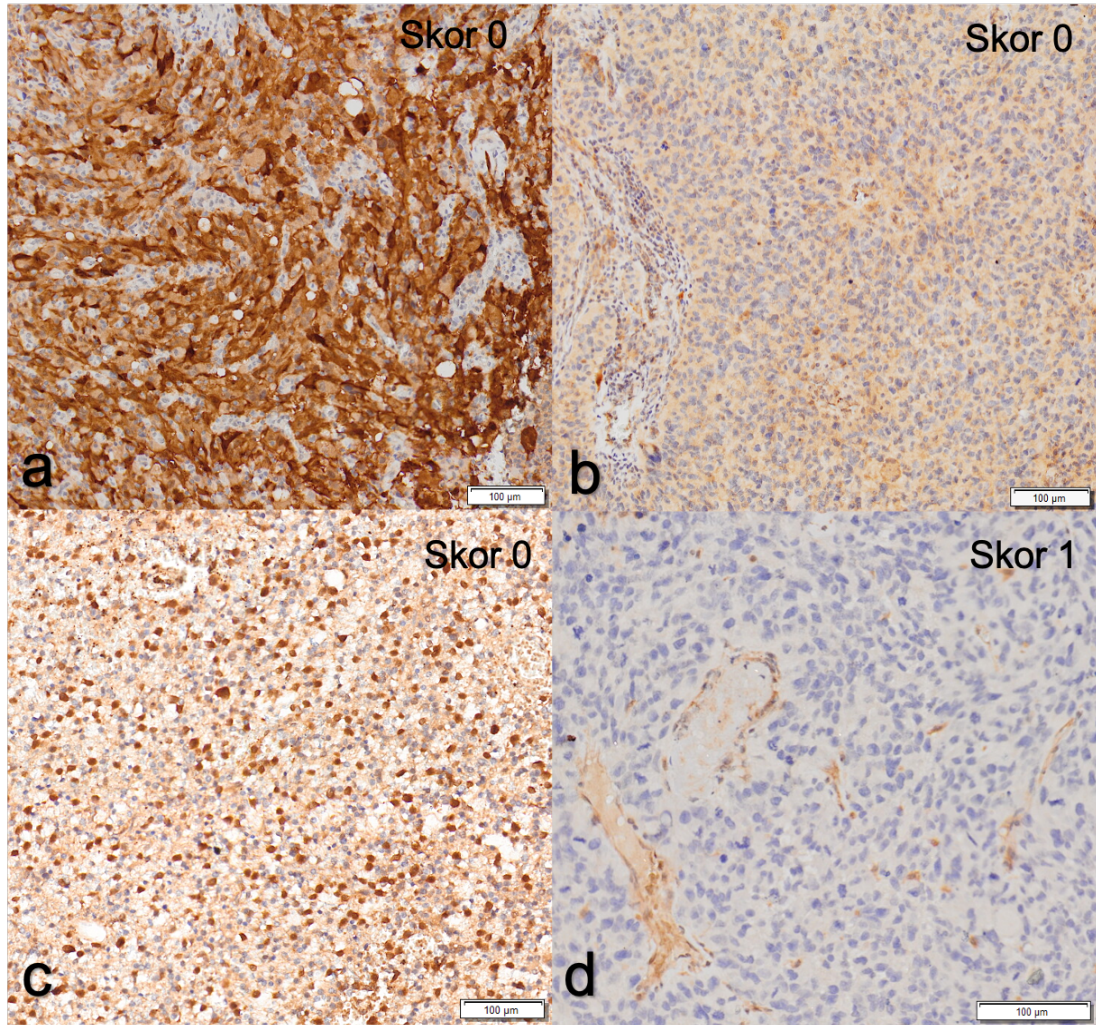
Hazırlanan preparatlar Olympus VS120 sanal slayt mikroskopi tarama sistemi ile taranmış ve dijital görüntüler elde edilmiştir. Değerlendirme aşamasında dijital slaytlar ve konvansiyonel ışık mikroskobu beraber kullanılmıştır. MTAP immünohistokimyasal çalışması için literatür bilgileri de göz önüne alınarak değerlendirme kriterleri oluşturulmuştur.

MTAP boyamasının değerlendirmesinde literatürde belirtildiği gibi MTAP antikoru ile sitoplazmik boyanma gösteren hücreler pozitif olarak kabul edilmiştir (21-26). Sitoplazmik boyanma bazı tümörlerde daha kuvvetli iken (Resim 3.4a), bazı tümörlerde daha zayıf olarak izlenmiştir (Resim 3.4b). Bazı hücrelerde sitoplazmik boyanmaya nükleer boyanmanın da eşlik ettiği kaydedilmiştir (Resim 3.4c). Sitoplazmik ekspresyonun görülmediği neoplastik hücreler MTAP ekspresyon kaybı olarak değerlendirilmiştir (Resim 3.4d) (21-26). Hedef dokular içinde MTAP ile sitoplazmik boyanma gösteren endotelial hücreler, lenfositler ve neoplastik olmayan glial hücreler iç kontrol olarak kullanılmıştır (Resim 3.4d) ve bu hücrelerde ekspresyon izlenmeyen vakalar MTAP değerlendirmesine dahil edilmemiştir.

Tüm TMA'lara uygulanan MTAP immünohistokimyasal boyaması iki patoloj tarafından birbirinden bağımsız olarak değerlendirilmiş olup MTAP ekspresyonu aşağıdaki gibi skorlanmıştır (Resim 3.4);

Skor 0: Kuvvetli veya zayıf sitoplazmik MTAP ekspresyonu mevcut

Skor 1: Sitoplazmik MTAP ekspresyon kaybı



Resim 3.4: MTAP immünohistokimyasal çalışmasının skorlanması a) Kuvvetli MTAP immünohistokimyasal boyanması (skor 0) (200x) b) Zayıf MTAP immünohistokimyasal boyanması (skor 0) (200x) c) Nükleer boyanmanın eşlik ettiği MTAP immünohistokimyasal boyanması (skor 0) (200x) d) MTAP immünohistokimyasal ekspresyon kaybı (skor 1) (200x)

3.8. H3K27me3 İmmünohistokimyasal İncelemesi

H3K27me3 IHC uygulaması TMA bloklarından elde edilen 4 µm kalınlıkta kesitler kullanılarak yapılmıştır. Her kesitte kontrol olarak kolon dokusu kullanılmıştır. Kesitler Leica Bond-Max immünohistokimya cihazı (Leica Microsystems, Wetzlar, Almanya) kullanılarak “H3K27 trimethylation (H3K27me3) (klon C36B11, 1:200 dilüsyon, Cell Signaling Technology, Danvers, MA)” primer antikoru ile immünohistokimyasal yöntemle boyanmıştır. Kesitler 75°C’de Bond Dewax çözeltisi (Leica Microsystems, Kat. No: AR9222) ile deparafinize edilmiştir. %96’lık alkol serisi

ile muamelenin ardından EDTA (Leica Biosystems, Newcastle Ltd., Newcastle Upon Tyne; İngiltere, kat. no: AR9640) içinde 100°C’de 20 dakika süreyle antiijen açığa çıkarma işlemi gerçekleştirilmiştir. Akabinde doku kesitleri oda sıcaklığında primer antikor ile 25 dakika inkübe edilmiştir. Adımlar arasında yıkama için Tris tamponlu salin (Leica Microsystems, Kat. No: AR9590) kullanılmıştır. Ardından proteinlerin gösterilmesi için “*Bond Polymer Refine Detection*” kiti (Leica 39 Microsystems, Newcastle Ltd., Newcastle Upon Tyne; İngiltere, Kat. No: DS9800) uygulanmıştır. Kit, sırasıyla endojen peroksidaz aktivitesini blokaj için %3-4’lük hidrojen peroksit (oda sıcaklığında 15 dakika), kullanıma hazır sekonder antikor (oda sıcaklığında 9 dakika), horse radish peroksidaz-IgG polimeri (oda sıcaklığında 9 dakika), 3'-3- diaminobenzidin tetrahidroklorür (DAB) kromojen (oda sıcaklığında 7 dakika) ve karşıt boyama için hematoksilin (oda sıcaklığında 8 dakika) içermektedir.

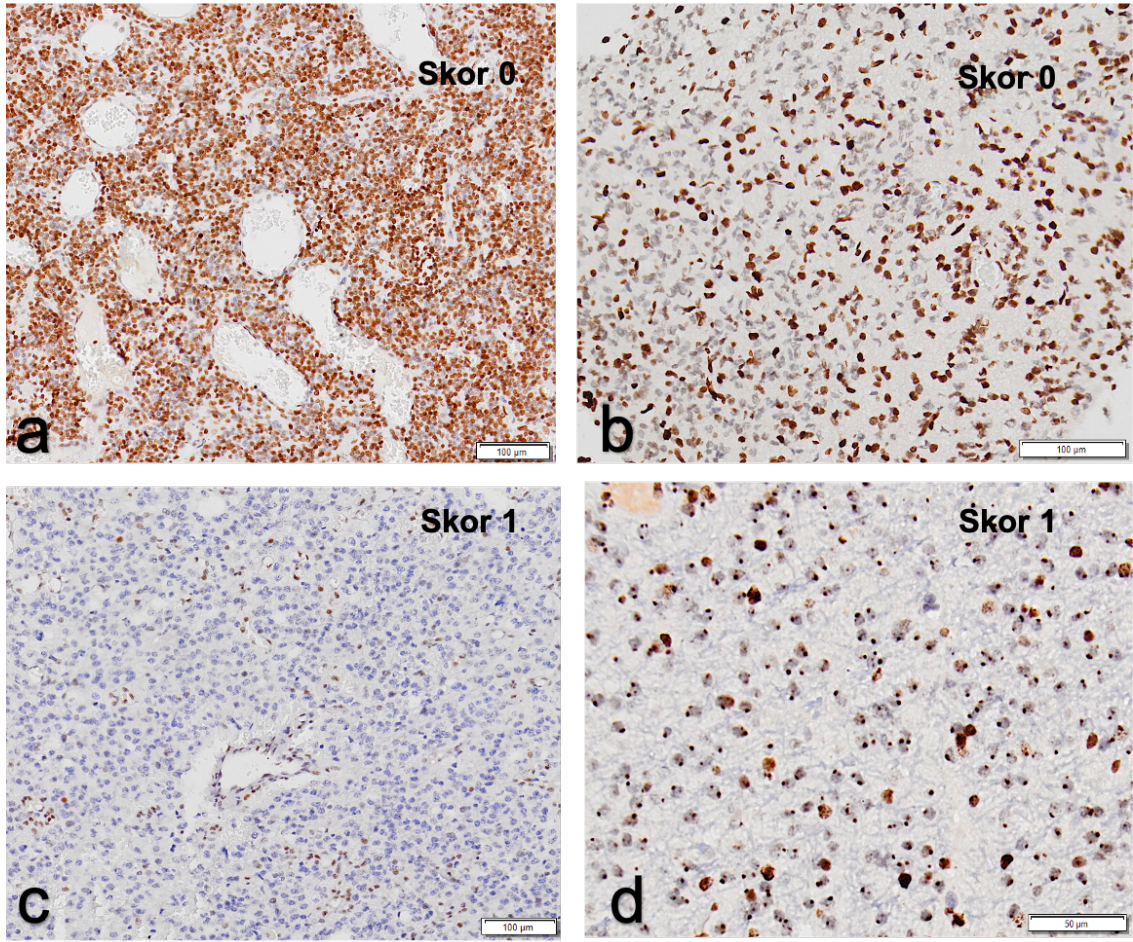
Hazırlanan preparatlar Olympus VS120 sanal slayt mikroskopi tarama sistemi ile taranmış ve dijital görüntüler elde edilmiştir. Değerlendirme aşamasında dijital slaytlar ve konvansiyonel ışık mikroskobu beraber kullanılmıştır. H3K27me3 immünohistokimyasal çalışması için literatür bilgileri de göz önüne alınarak değerlendirme kriterleri oluşturulmuştur (29, 30, 124).

H3K27me3 immünohistokimyasal boyamasının değerlendirilmesinde hücrelerde izlenen nükleer boyanma pozitif kabul edilmiştir. Nükleer ekspresyonun izlenmediği neoplastik hücreler H3K27me3 ekspresyon kaybı olarak değerlendirilmiştir. Hedef dokular içinde H3K27me3 ile nükleer boyanma gösteren endotelial hücreler, lenfositler ve neoplastik olmayan glial hücreler iç kontrol olarak kullanılmıştır ve bu hücrelerde ekspresyon izlenmeyen vakalar çalışmaya dahil edilmemiştir.

Tüm TMA’lara uygulanan H3K27me3 immünohistokimyasal boyaması iki patolog tarafından birbirinden bağımsız olarak değerlendirilmiş olup H3K27me3 ekspresyonu aşağıdaki gibi skorlanmıştır (Resim 3.5);

Skor 0: >%5 tümör hücresinde nükleer boyanma mevcut (H3K27me3 ekspresyonu korunmuş)

Skor 1: ≤%5 tümör hücresinde nükleer boyanma ve/veya paranükleer boyanma mevcut (H3K27me3 ekspresyon kaybı)



Resim 3.5. H3K27me3 immünohistokimyasal çalışmasının skorlanması; a) $> \%95$ tümör hücresinde nükleer ekspresyon (skor 0) b) $\%5-95$ tümör hücresinde nükleer ekspresyon (skor 0) c) $< \%5$ tümör hücresinde nükleer ekspresyon (skor 1) d) Paranükleer noktasal boyanma (skor 1)

3.8. İstatistik

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 25.0 (IBM, New York, ABD) programında yapılmış ve $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Sürekli verilerin normal dağılıp dağılmadığı histogramların görselleştirilmesi ve Shapiro-Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Normal dağılan sürekli veriler ortalama ve standard sapma ile, kategorik veriler sayı ve yüzde ile raporlanmıştır. Sürekli verilerden oluşan iki bağımsız grup arasında fark bağımsız t-testi ile değerlendirilmiştir. Kategorik değişkenler arasındaki ilişki Ki-Kare veya Fisher'in Kesin Testi ile araştırılmıştır. Testlerin tanınal kesinliğini değerlendirmekte sensitivite, spesifisite, pozitif ve negatif olasılık oranı, pozitif ve negatif öngörü oranı ve kesinlikleri $\%95$ güven aralıklarıyla değerlendirilmiştir. İki gözlemci arasındaki uyum Kappa katsayı ile değerlendirilmiştir

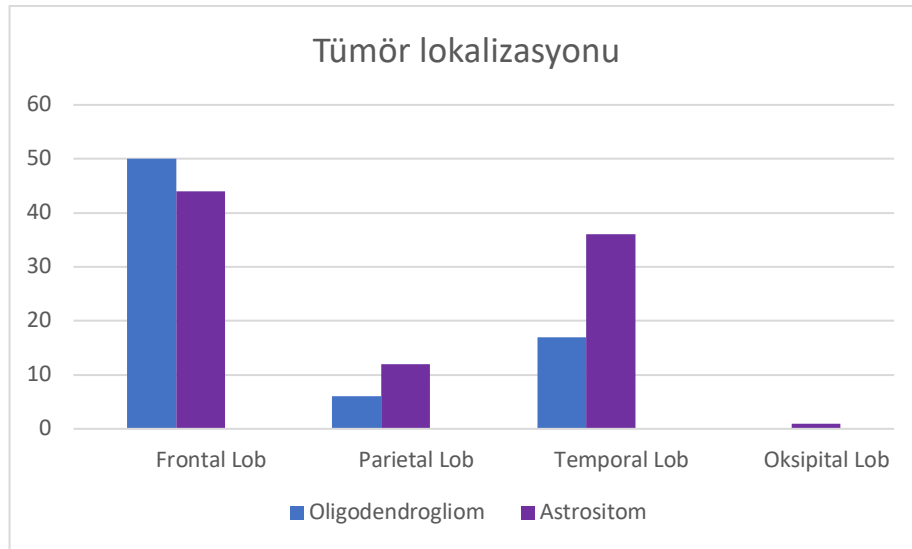
ve 0-0.2 arası yok, 0.2-0.4 arası minimal, 0.4-0.6 arası zayıf, 0.6-0.8 arası orta ve 0.8-1.0 arası neredeyse mükemmel olarak sınıflandırılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Epidemiyolojik ve Klinik Bulgular

Çalışmada 2014 -2021 tarihleri arasında erişkin tipi difüz gliom tanısı alan 158 hastaya ait 166 tümör incelenmiştir. Hastaların 56'sı (%33,7) kadın, 110'u (%66,3) erkektir. Ortalama tanı yaşı 34,7 (SS 12,2)'dir. Ortalama tanı yaşları tanı gruplarında incelendiğinde oligodendrogliom vakalarında ortalama tanı yaşı 44,3 (SS 12,5), astrositom vakalarında 34,9 (SS 9,7) olduğu görülmüştür.

Tümörlerin yerleşim yerleri incelendiğinde 94 (%56,0) tümörün frontal lob, 55 (%32,7) tümörün temporal lob, 18 (%10,7) tümörün parietal lob ve 1 (%0,6) tümörün oksipital lob yerleşimli olduğu görülmüştür (Şekil 4.1).

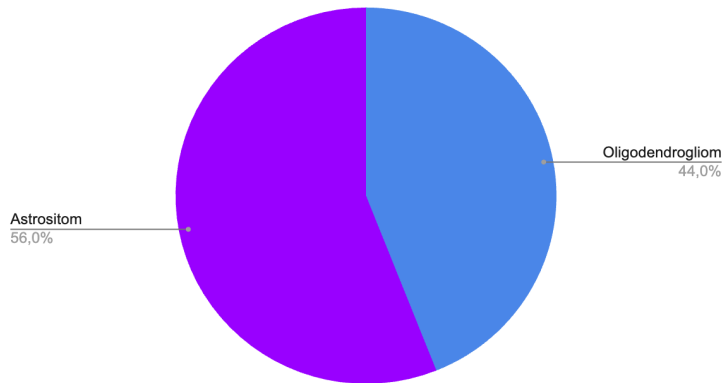


Şekil 4.1. Astrositom ve oligodendrogliomların yerleşim yerleri.

4.2. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Bulgular

Çalışmada yer alan 166 hastanın 73'ü (%43,9) oligodendrogliom, IDH-mutant ve 1p/19q kayıplı, 93'ü (%56,1) astrositom tanısı almıştır (Şekil 4.2).

Tümör dağılımı



Şekil 4.2. Tümörlerin tanı dağılımları

Astroцитom grubunda tanı anında DSÖ 2016 sınıflandırmasına göre 36 (%38,7) tümör DSÖ SSS derece II, 28 (%30,1) tümör DSÖ SSS derece III ve 29 (%31,2) tümör ise DSÖ SSS derece IV olarak derecelendirilmiştir. CDKN2A/B durumu değerlendirildikten sonra DSÖ 2021'e göre derece değişikliği olan tümörlerden bölüm "4.3"te bahsedilecektir. Oligodendrogliom grubunda hem DSÖ 2021'e göre 28 (%38,4) tümör DSÖ SSS derece 2, 45 (%61,5) tümör DSÖ SSS derece 3 olarak değerlendirilmiştir.

Astroцитom tanısı alan 93 tümörden 89'unda (%95,7) immünhistokimyasal olarak IDH1 (R132H) pozitifliği, 84'ünde (%90,3) ATRX ekspresyon kaybı (90 hastada bakılmış) ve 83'ünde (%89,2) p53 mutasyonu (92 hastada bakılmış) saptanmıştır. Oligodendrogliom tanısı alan 73 tümörden 71'inde (%97,3) immünhistokimyasal olarak IDH1 R132H pozitifliği, 68'inde (%100) ATRX ekspresyonun korunmuş olduğu, 65'inde (%89,0) ise p53 negatifliği saptanmıştır.

IDH-mutant difüz gliomların 6 tanesinde tanı sırasında IDH1(R132H) antikoru ile negatif sonuç alınmış olup IDH mutasyon varlığı yönünde mevcut olan şüpheler (hastanın <55 yaş olması, immünhistokimyasal ATRX ekspresyon kaybı, p53 immünhistokimyasasının mutant paternde boyanması) olması nedeniyle yapılan RT-PCR çalışmalarında oligodendrogliom tanısı verilen 2 vakada IDH2 geninde kodon 172'de, astroцитom tanısı verilen 4 vakada IDH1 geninde kodon 132'de nokta mutasyon (R132H ve R132C dışı) saptanmıştır.

4.3. CDKN2A FISH Çalışmasının Sonuçları

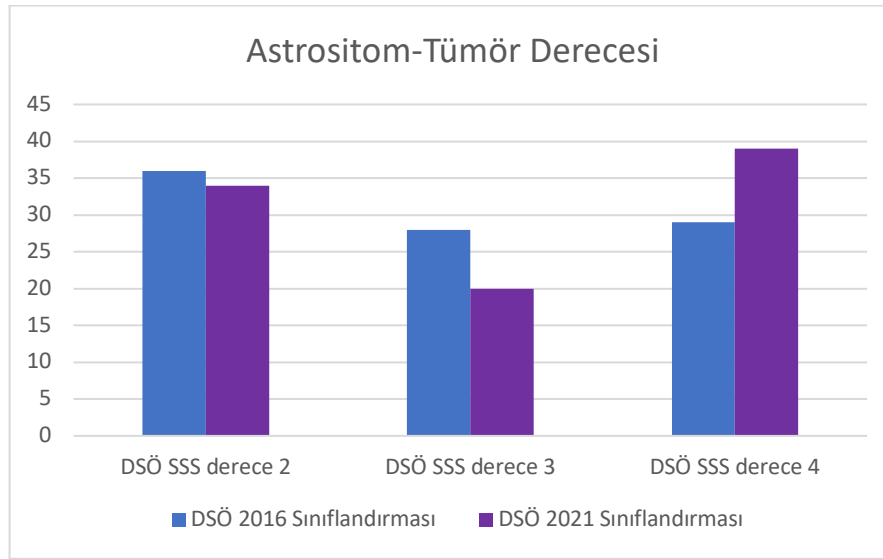
CDKN2A FISH çalışmada yer alan 166 tümörün 161'inde değerlendirilebilmiştir. 166 tümörün 5 tanesinde (3 astrositom, 2 oligodendrogliom) tespit takip artefaktı nedeniyle CDKN2A FISH çalışmasında sinyal elde edilememiştir. FISH ile CDKN2A HD bakılan 161 tümörün 25'inde (%15,1) delesyon saptanmıştır. Oligodendrogliom grubunda yer alan 73 tümörde CDKN2A HD bakılan 71 tümörün 5'inde (%6,8) delesyon saptanmışken; astrositom grubunda yer alan 93 tümörde CDKN2A HD bakılan 90 tümörün 20'sinde (%21,5) delesyon saptanmıştır.

Tanı anında DSÖ 2016'ya göre morfolojik olarak derece II, III veya IV olan astrositomlarda CDKN2A HD görülme yüzdeleri incelendiğinde derece II olarak değerlendirilen 35 tümörün 2'sinde (%5,7), derece III olarak değerlendirilen 27 tümörün 8'inde (%29,6), derece IV olarak değerlendirilen 28 tümörün 10'unda (%35,7) CDKN2A HD görülmüştür. Tanı anında morfolojik olarak derece 2 veya 3 olan oligodendrogliomlarda derece 2 olarak değerlendirilen 28 tümörün hiçbirinde CDKN2A HD görülmemişken derece 3 olarak değerlendirilen 43 tümörün 5'inde (%11,6) CDKN2A HD saptanmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. DSÖ 2016 kriterlerine göre derecelendirilen astrositom ve oligodendrogliom gruplarında CDKN2A HD görülme sayıları ve yüzdeleri.

Astrositom	Sayı (Toplam Sayı)	Yüzde (%)
DSÖ SSS derece II	2 (35)	5,7%
DSÖ SSS derece III	8 (27)	29,6%
DSÖ SSS derece IV	10 (28)	35,7%
Oligodendrogliom		
DSÖ SSS derece II	0 (28)	0,0%
DSÖ SSS derece III	5 (43)	11,6%

Astrositomlarda CDKN2A HD durumu değerlendirildikten sonra DSÖ SSS 2016 ve 2021 sınıflandırmaları karşılaştırıldığında 10 (%6,2) hastanın DSÖ SSS derecesi değişmiştir. 2 (%1,2) hastanın DSÖ 2016 sınıflandırmasına göre II olan DSÖ SSS derecesi, DSÖ 2021 kriterlerine göre 4; 8 (%4,9) hastanın ise DSÖ 2016 sınıflandırmasına göre DSÖ SSS derece III olan derecesi DSÖ 2021 kriterlerine göre 4 olarak güncellenmiştir (Şekil 4.3)



Şekil 4.3. Astrositomlarda DSÖ 2016 ve DSÖ 2021'e göre tümör derecesinin karşılaştırılması

4.4. MTAP İmmünohistokimyasal Çalışmasının Sonuçları

MTAP boyaması çalışmada yer alan 166 tümörün 164'ünde değerlendirilebilmiştir. 166 tümörün 2 tanesinde (2 astrositom) teknik nedenlerden dolayı sağlıklı sonuç alınamamıştır. 166 tümör içinde FS gözlemcisi tarafından MTAP boyaması değerlendirilen 164 tümörün 30'unda (%18,1), FG gözlemcisi tarafından ise 29'unda (%17,5) MTAP kaybı saptanmıştır. Oligodendrogliom grubunda her iki gözlemci MTAP boyaması değerlendirilen 73 tümörün 7'sinde (%9,6) MTAP kaybı saptanmıştır. Astrositom grubunda FS gözlemcisi tarafından MTAP boyaması değerlendirilen 91 tümörün 23'ünde (%24,7), FG gözlemcisi tarafından ise 91 tümörün 22'sinde (%23,7) MTAP kaybı saptanmıştır.

Vakaların büyük kısmında (160/164) MTAP boyaması homojen dağılım göstermekte olup 1 vakada belirgin intratümöral heterojenite saptanmıştır (Resim 4.2a). Diğer 3 vakada heterojenite belli belirsiz olmakla beraber gözlemciler arasında uyumsuz değerlendirmeye neden olmuştur.

MTAP ekspresyon kaybının tespiti için FS ve FG gözlemcileri arasındaki uyum Kappa katsayısı ile değerlendirildiğinde 0,938 ile neredeyse mükemmel uyum bulunmuştur.

4.5. CDKN2A HD ile MTAP İmmünohistokimyasal Ekspresyon Kaybı Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi

CDKN2A HD bakılan 161 tümörün 25'inde (%15,1) delesyon saptanmışken, FS gözlemcisi MTAP boyaması değerlendirilen 164 tümörün 30'unda (%18,1), FG gözlemcisi ise 29'unda (%17,5) MTAP kaybı saptamıştır. Oligodendrogliom grubunda CDKN2A HD bakılan 71 tümörün 5'inde (%6,8) delesyon saptanmışken, FS ve FG gözlemcisi MTAP boyaması değerlendirilen 73 tümörün 7'sinde (%9,6) MTAP kaybı saptamıştır. Astrositom grubunda CDKN2A HD bakılan 90 tümörün 20'sinde (%21,5) delesyon saptanmışken, FS gözlemcisi MTAP boyaması değerlendirilen 91 tümörün 23'ünde (%24,7), FG gözlemcisi ise 91 tümörün 22'sinde (%23,7) MTAP kaybı saptamıştır (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. CDKN2A HD ve MTAP kaybı görülme sıklıkları

	Sayı (Toplam Bakılan Sayı)	Yüzde
Tüm vakalar:		
CDKN2A HD	25 (161)	%15,1
MTAP Kaybı (FS)	30 (164)	%18,1
MTAP Kaybı (FG)	29 (164)	%17,5
Oligodendrogliom:		
CDKN2A HD	5 (71)	%6,8
MTAP Kaybı (FS)	7 (73)	%9,6
MTAP Kaybı (FG)	7 (73)	%9,6
Astrositom:		
CDKN2A HD	20 (90)	%21,5
MTAP Kaybı (FS)	23 (91)	%24,7
MTAP Kaybı (FG)	22 (91)	%23,7

CDKN2A HD varlığı ile FS ve FG gözlemcilerinde MTAP ekspresyonu kaybı arasındaki ilişki Fisher'in Kesin Testi ile değerlendirildiğinde CDKN2A HD varlığında MTAP ekspresyon kaybının daha fazla olduğu görülmüştür ($p < 0,001$).

Tablo 4.3. FS ve FG gözlemcilerinde CDKN2A HD varlığı ile MTAP ekspresyonu kaybı arasındaki ilişki.

	CKDN2A HD var	CKDN2A HD yok	p
FS gözlemcisi			
MTAP kaybı var	22 (%88,0)	6 (%4,5)	<0,001
MTAP kaybı yok	3 (%12,0)	128 (%95,5)	
FG gözlemcisi			
MTAP kaybı var	22 (%88,0)	5 (%3,7)	<0,001
MTAP kaybı yok	3 (%12,0)	129 (%96,3)	

Tüm vakalarda FS gözlemcisi için CDKN2A HD tespitinde kullanılan FISH yöntemine alternatif olarak MTAP immünohistokimyasal boyanma kaybının sensitivite ve spesifitesi hesaplandığında; sensitivite %88,00 (%95 GA %68,78 - %97,45), spesifite %95,52 (%95 GA %90,51 - %98,34), pozitif olasılık oranı 19,65 (%95 GA 8,87 – 43,54), negatif olasılık oranı 0,13 (%95 GA 0,04 – 0,36), pozitif öngörü oranı %78,54 (%95 GA %62,30 - %89,02), negatif öngörü oranı %97,71 (%95 GA %93,66 - %99,20) ve kesinlik %94,34 (%95 GA %89,53 - %97,38) olarak bulunmuştur (Tablo 4.4).

Tüm vakalarda FG gözlemcisi için CDKN2A HD tespitinde kullanılan FISH yöntemine alternatif olarak MTAP immünohistokimyasal boyanma kaybının sensitivite ve spesifitesi hesaplandığında; sensitivite %88,00 (%95 GA %68,78 - %97,45), spesifite %96,27 (%95 GA %91,51 - %98,78), pozitif olasılık oranı 23,58 (%95 GA 9,86 – 56,41), negatif olasılık oranı 0,12 (%95 GA 0,04 – 0,36), pozitif öngörü oranı %81,45 (%95 GA %64,74 - %91,31), negatif öngörü oranı %97,73 (%95 GA %93,71 - %99,20) ve kesinlik %94,97 (%95 GA %90,33 - %97,80) olarak bulunmuştur (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Tüm vakalarda FS ve FG gözlemcisinin CDKN2A HD FISH yöntemine alternatif olarak MTAP IHC boyanma kaybının değerlendirmeleri

	FS	FG
Sensitivite	%88,00	%88,00
Spesifite	%95,52	%96,27
Pozitif Olasılık Oranı	19,65	23,58

Negatif Olasılık Oranı	0,13	0,12
Pozitif Öngörü Oranı	%78,54	%81,45
Negatif Öngörü Oranı	%97,71	%97,73
Kesinlik	%94,34	%94,97

Sadece astrositom vakalarında FS gözlemcisi için CDKN2A HD tespitinde kullanılan FISH yöntemine alternatif olarak MTAP immünohistokimyasal boyanma kaybının sensitivite ve spesifisitesi hesaplandığında; sensitivite %90,00 (%95 GA %68,30 - %98,77), spesifisite %95,59 (%95 GA %87,64 - %99,08), pozitif olasılık oranı 0,05 (%95 GA 0,02 – 0,15), negatif olasılık oranı 9,56 (%95 GA 2,56 – 35,63), pozitif öngörü oranı %85,71 (%95 GA %66,28 - %94,82), negatif öngörü oranı %97,01 (%95 GA %89,71 - %99,18) ve kesinlik %94,32 (%95 GA %87,24 - %98,13) olarak bulunmuştur (Tablo 4.5).

Sadece astrositom tanımlı vakalarda FG gözlemcisi için CDKN2A HD tespitinde kullanılan FISH yöntemine alternatif olarak MTAP immünohistokimyasal boyanma kaybının sensitivite ve spesifisitesi hesaplandığında; sensitivite %85,00 (%95 GA %62,11 - %96,79), spesifisite %95,59 (%95 GA %87,64 - %99,08), pozitif olasılık oranı 0,05 (%95 GA 0,02 – 0,16), negatif olasılık oranı 6,37 (%95 GA 2,24 – 18,11), pozitif öngörü oranı %85,00 (%95 GA %64,86 - %94,56), negatif öngörü oranı %95,59 (%95 GA %88,40 - %98,40) ve kesinlik %93,18 (%95 GA %85,75 - %97,46) olarak bulunmuştur (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Astrositomlarda FS ve FG gözlemcisinin CDKN2A HD FISH yöntemine alternatif olarak MTAP IHK boyanma kaybının değerlendirmeleri

	FS	FG
Sensitivite	%90,00	%85,00
Spesifisite	%95,59	%95,59
Pozitif Olasılık Oranı	9,56	6,37
Negatif Olasılık Oranı	0,05	0,05
Pozitif Öngörü Oranı	%85,71	%95,59
Negatif Öngörü Oranı	%97,01	%93,18
Kesinlik	%94,32	%85,00

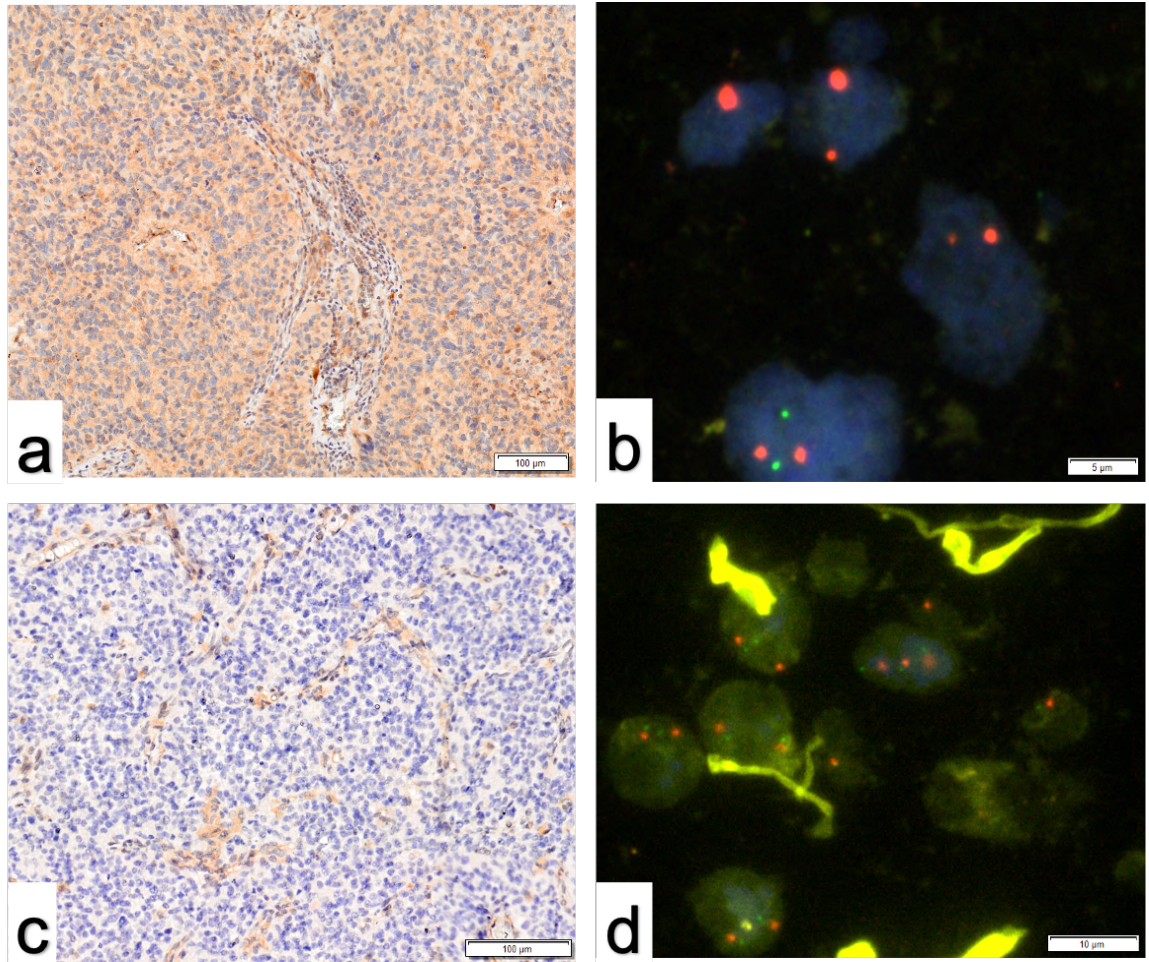
Sadece oligodendrogliom tanılı vakalarda FS gözlemcisi için CDKN2A HD tespitinde kullanılan FISH yöntemine alternatif olarak MTAP immünohistokimyasal boyanma kaybının sensitivite ve spesifisitesi hesaplandığında; sensitivite %80,00 (%95 GA %28,36 - %99,49), spesifisite %95,45 (%95 GA %87,29 - %99,05), pozitif olasılık oranı 4,77 (%95 GA 0,83– 27,57), negatif olasılık oranı 0,06 (%95 GA 0,02 – 0,19), pozitif öngörü oranı %57,14 (%95 GA %28,87 - %81,41), negatif öngörü oranı %98,44 (%95 GA %91,60 - %99,73) ve kesinlik %94,32 (%95 GA %86,20 - %98,44) olarak bulunmuştur (Tablo 4.6).

Sadece oligodendrogliom tanılı vakalarda FG gözlemcisi için CDKN2A HD tespitinde kullanılan FISH yöntemine alternatif olarak MTAP immünohistokimyasal boyanma kaybının sensitivite ve spesifisitesi hesaplandığında; sensitivite %100,00 (%95 GA %47,82 - %100,00), spesifisite %96,97 (%95 GA %89,48 - %99,63), negatif olasılık oranı 0,03 (%95 GA 0,01 – 0,12), pozitif öngörü oranı %71,43 (%95 GA %38,97 - %90,73), negatif öngörü oranı %100,00 ve kesinlik %97,18 (%95 GA %90,19 - %99,66) olarak bulunmuştur (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Oligodendrogliomlarda FS ve FG gözlemcisinin CDKN2A HD FISH yöntemine alternatif olarak MTAP IHK boyanma kaybının değerlendirmeleri

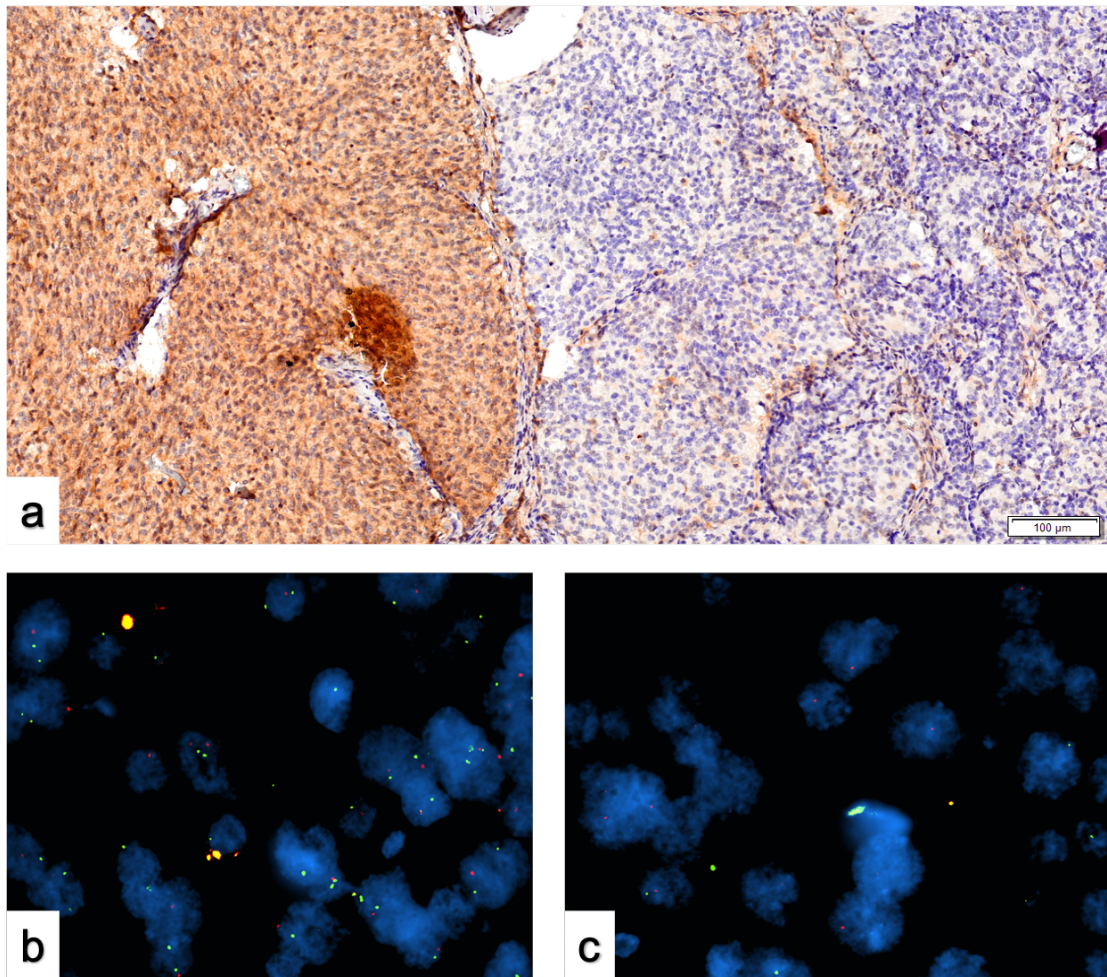
	FS	FG
Sensitivite	%80,00	%100,00
Spesifisite	%95,45	%96,97
Pozitif Olasılık Oranı	4,77	
Negatif Olasılık Oranı	0,06	0,03
Pozitif Öngörü Oranı	%57,14	%71,43
Negatif Öngörü Oranı	%98,44	%100,00
Kesinlik	%94,32	%97,18

CDKN2A durumu ve MTAP ekspresyonu arasında uyumsuzluk gösteren 8 adet vaka mevcuttur. Bu vakalardan 3 tanesinde CDKN2A HD mevcut olmasına rağmen MTAP kaybı izlenmezken (Resim 4.1 a-b), 5 tanesinde ise CDKN2A HD olmadan MTAP ekspresyon kaybı görülmüştür (Resim 4.1 c-d).



Resim 4.1: MTAP-CDKN2A uyumsuz vaka örnekleri. Birinci vaka; a) MTAP ekspresyonu korunmuş b) CDKN2A HD mevcut. İkinci vaka; c) MTAP ekspresyonu kayıp d) CDKN2A normal.

Vakalardan birinde MTAP boyamasında birbirinden keskin bir sınırla ayrılan belirgin intratümöral heterojenite görülmüş olup (Resim 4.2a), bu heterojenite CDKN2A FISH çalışması ile de desteklenmiştir. MTAP ekspresyonunun korunduğu tümör alanlarında CDKN2A HD görülmezken (Resim 4.2b), MTAP kaybı gösteren tümör hücrelerinde CDKN2A HD görülmüştür (Resim 4.2c).



Resim 4.2: MTAP boyamasında intratümöral heterojenite a) MTAP boyamasında birbirinde keskin sınırla ayrılan korunmuş ekspresyon (sol) ve ekspresyon kaybı (sağ) gösteren neoplazm b) CDKN2A HD içermeyen neoplastik hücreler c) CDKN2A HD içeren neoplastik hücreler

CDKN2A HD ve MTAP kaybı ile tanı yaşları arasındaki ilişki incelendiğinde anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,740$, $p=0,999$, $p=0,999$) (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. CDKN2A HD ve MTAP kaybı ile tanı yaşı arasındaki ilişki

		≤ 35 yaş	36-55 yaş	≥ 56 yaş	p
CDKN2A HD	Var	63 (%80,8)	60 (%85,7)	13 (%86,7)	0,740
	Yok	15 (%19,2)	10 (%14,3)	2 (%13,3)	
MTAP Kaybı (FS)	Var	62 (%80,5)	59 (%80,8)	13 (%81,3)	0,999
	Yok	15 (%19,5)	14 (%19,2)	3 (%18,8)	
MTAP Kaybı (FG)	Var	63 (%81,8)	59 (%80,8)	13 (%81,3)	0,999
	Yok	14 (%18,2)	14 (%19,2)	3 (%18,8)	

Cinsiyet ile CDKN2A HD kaybı arasındaki ilişki incelendiğinde erkek hastalar (CDKN2A HD görülme oranı %15,1) ve kadın hastalar (CDKN2A HD görülme oranı %16,4) arasında bir fark saptanmamıştır ($p=0,822$). MTAP kaybı ile cinsiyet arasındaki ilişki incelendiğinde FS gözlemcisinde MTAP kaybı açısından erkek hastalar (MTAP kaybı oranı %18,3) ve kadın hastalar (MTAP kaybı oranı %18,2) arasında bir fark saptanmamıştır ($p=0,999$). FG gözlemcisinde MTAP kaybı açısından erkek hastalar (MTAP kaybı oranı %17,4) ve kadın hastalar (MTAP kaybı oranı %18,2) arasında bir fark saptanmamıştır ($p=0,999$) (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. Cinsiyet ile CDKN2A HD ve MTAP kaybı arasındaki ilişkisinin incelenmesi.

	Erkek (Sayı (Yüzde))	Kadın (Sayı (Yüzde))	P
CDKN2A HD: Var	16 (%15,1)	9 (%16,4)	0,341
Yok	90 (%84,9)	46 (%83,6)	
FS-MTAP Kaybı: Var	20 (%18,3)	10 (%18,2)	0,813
Yok	89 (%81,7)	45 (%81,8)	
FG-MTAP Kaybı: Var	19 (%17,4)	10 (%18,2)	0,853
Yok	90 (%82,6)	45 (%81,8)	

Tümörlerin yerleşim yerleri ile CDKN2A HD varlığı arasındaki ilişki incelendiğinde frontal lob (CDKN2A HD oranı %14,0), oksipital lob (CDKN2A HD oranı %4,0), parietal lob (CDKN2A HD oranı %8,0), ve temporal lob (CDKN2A HD oranı %44,0) arasında bir fark saptanmamıştır ($p=0,101$). Tümörlerin yerleşim yerleri ile MTAP kaybı arasındaki ilişki incelendiğinde FS gözlemcisinde MTAP kaybı ile frontal lob (MTAP kaybı oranı %46,7), oksipital lob (MTAP kaybı oranı %3,3), parietal lob (MTAP kaybı oranı %10,0), ve temporal lob (MTAP kaybı oranı %40,0) yerleşimi arasında bir fark saptanmamıştır ($p=0,183$). FG gözlemcisinde ise MTAP kaybı ile frontal lob (MTAP kaybı oranı %48,3), oksipital lob (MTAP kaybı oranı %3,4), parietal lob (MTAP kaybı oranı %10,3), ve temporal lob (MTAP kaybı oranı %37,9) yerleşimi arasında bir fark saptanmamıştır ($p=0,217$).

4.6. 1p/19q FISH Çalışmasının Sonuçları

Oligodendrogliom tanısı olan 73 tümörün 72'sinde tanı anında 1p/19q kodelesyonu mevcut olduğu hastalara ait mevcut FISH raporlarından öğrenilmiştir. Tanı

anında 1p/19q kodelesyonu bakılmayan tek hastaya yapılan FISH çalışmasında 1p/19q kodelesyonu saptanmıştır. Astrositom grubunda yer alan 93 tümörden 13 tanesine tanı anında yapılan FISH çalışmasında 1p/19q kodelesyonu saptanmamıştır. Diğer 80 vaka içinde IDH1/IDH2 ve ATRX mutasyonların beraber görüldüğü 76 vakaya 1p/19q FISH çalışması yapılmamış olup 1p/19q kodelesyonu negatif kabul edilmiştir. IDH1/IDH2 mutant ancak ATRX ekspresyon kaybı göstermeyen 4 vakaya yapılan FISH çalışmasında vakaların hiçbirinde 1p/19q kodelesyonu saptanmamıştır.

4.7 H3K27me3 İmmünohistokimyasal Çalışmasının Sonuçları

Tüm vakalar içinde H3K27me3 ekspresyon kaybı olan ve olmayan olgular incelendiğinde FS gözlemcisi 69 (%41,6) tümörde H3K27me3 kaybı ve 97 (%58,4) tümörde korunmuş ekspresyon bildirirken, FG gözlemcisi ise H3K27me3 ekspresyonunu 71 (%42,8) tümörde kayıp, 95 (%57,2) tümörde korunmuş olarak değerlendirmiştir (Tablo 4.9). Oligodendrogliom olguları için H3K27me3 ekspresyon durumu incelendiğinde FS gözlemcisi 49 (%67,1) tümörde kayıp, 24 (%32,9) tümörde korunmuş; FG gözlemcisi ise 50 (%68,5) tümörde kayıp, 23 (%31,5) tümörde korunmuş olarak bulmuşlardır (Tablo 4.9). Astrositom olguları için H3K27me3 ekspresyon durumu incelendiğinde FS gözlemcisi 20 (%21,1) tümörde kayıp, 73 (%78,5) tümörde ise korunmuş; FG gözlemcisi ise 21(%22,6) tümörde kayıp, 72(%77,4) tümörde ise korunmuş olarak değerlendirmişlerdir (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. Tüm vakalar, oligodendrogliomlar ve astrositomlar için H3K27me3 kaybı olan ve olmayan olguların incelenmesi

	H3K27me3 kayıp (Sayı/Yüzde)	H3K27me3 korunmuş (Sayı/Yüzde)
Tüm vakalar		
FS gözlemcisi	69 (%41,6)	97 (%57,4)
FG gözlemcisi	71 (%42,8)	95 (%57,2)
Oligodendrogliom		
FS gözlemcisi	49 (%67,1)	24 (%32,9)
FG gözlemcisi	50 (%68,5)	23 (%31,5)
Astrositom		
FS gözlemcisi	20 (%21,1)	73 (%78,5)
FG gözlemcisi	21 (%22,6)	72 (%77,4)

H3K27me3 boyamasının değerlendirilmesinde için FS ve FG gözlemcileri arasındaki uyum Kappa katsayısı ile değerlendirildiğinde 0,951 ile neredeyse mükemmel uyum bulunmuştur.

H3K27me3 ile 35 (%21) tümörde parsiyel boyanma (%5-95 hücrede nükleer ekspresyon) izlenmiş olup bu vakalar H3K27 ekspresyonu korunmuş olarak değerlendirilmiştir.

DSÖ SSS derece 2 ve 3 oligodendrogliomlarda H3K27me3 ekspresyonu arasında fark olup olmadığı bakıldığında FG ve FS gözlemcilerinde derece 2 ve 3 oligodendrogliom ile H3K27me3 ekspresyonu arasında bir fark bulunmamıştır ($p=0,202$, $p=0,306$) (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. FS ve FG gözlemcilerinde derece 2 ve 3 oligodendrogliom ile H3K27me3 ekspresyonu arasında ilişki

	H3K27me3 kayıp (Sayı/Yüzde)	H3K27me3 korunmuş (Sayı/Yüzde)	P
FS Gözlemcisi: Derece 2	16 (%32,7)	12 (%50,0)	0,202
Derece 3	33 (%67,3)	12 (%50,0)	
FG Gözlemcisi: Derece 2	17 (%34,0)	11 (%47,8)	0,306
Derece 3	33 (%66,0)	12 (%52,2)	

Tanı yaşı 35 yaş ve altı, 36-55 yaş ve 55 yaş üzeri olarak gruplandırıldığında ve bu gruplar ile H3K27me3 kaybı arasındaki ilişki FS ve FG gözlemcilerinde ayrı ayrı incelendiğinde H3K27me3 kaybı ile yaş kategorileri arasında bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,240$, $p=0,252$) (Tablo 4.11).

Tablo 4.11. FS ve FG gözlemcilerinde H3K27me3 kaybı ile yaş kategorileri arasındaki ilişki

	H3K27me3 kayıp (Sayı/Yüzde)	H3K27me3 korunmuş (Sayı/Yüzde)	p
FS Gözlemcisi: <35 yaş	27 (%39,1)	51 (%52,6)	0,240
36 – 55 yaş	34 (%49,3)	38 (%39,2)	
>55 yaş	8 (%11,6)	8 (%8,2)	
FG Gözlemcisi: <35 yaş	28 (%39,4)	50 (%52,6)	0,252
36 – 55 yaş	35 (%49,3)	37 (%38,9)	
>55 yaş	8 (%11,3)	8 (%8,4)	

H3K27me3 kaybı ile cinsiyet arasındaki ilişki incelendiğinde FS gözlemcisinde cinsiyet grupları ile H3K27me3 ekspresyonu arasında bir ilişki bulunmamıştır ($p=0,069$). FG gözlemcisinde ise H3K27me3 kaybının kadınlarda (%42,3) erkeklere göre (27,4) daha fazla görüldüğü bulunmuştur ($p=0,049$) (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. FS ve FG gözlemcilerinde H3K27me3 kaybı ile cinsiyet arasındaki ilişki

	H3K27me3 kaybı (Sayı/Yüzde)	H3K27me3 korunmuş (Sayı/Yüzde)	p
FS Gözlemcisi: Erkek	40 (%58,0)	70 (%72,2)	0,069
Kadın	29 (%42,0)	27 (%27,8)	
FG Gözlemcisi: Erkek	41 (%57,7)	69 (%72,6)	0,049
Kadın	30 (%42,3)	26 (%27,4)	

Tümör lokalizasyonları ile H3K27me3 kaybı arasındaki ilişki FS ve FG gözlemcilerinde ayrı ayrı incelendiğinde H3K27me3 kaybı ile tümör lokalizasyonları arasında bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,651$, $p=0,452$). (Oksipital yerleşimli bir tümör olduğu için bu tümör analize dahil edilememiştir) (Tablo 4.13).

Tablo 4.13. FS ve FG gözlemcilerinde H3K27me3 kaybı ile tümör lokalizasyonu arasındaki ilişki

	H3K27me3 kaybı (Sayı/Yüzde)	H3K27me3 korunmuş (Sayı/Yüzde)	p
FS Gözlemcisi: Frontal Lob	41 (%59,4)	53 (%54,6)	0,651
Oksipital Lob	1 (%1,4)	0 (%0)	
Parietal Lob	7 (%10,1)	11 (%11,3)	
Temporal Lob	20 (%29,0)	33 (%34,0)	
FS Gözlemcisi: Frontal Lob	43 (%60,6)	51 (%53,7)	0,452
Oksipital Lob	1 (%1,4)	0 (%0)	
Parietal Lob	8 (%11,3)	10 (%10,5)	
Temporal Lob	19 (%26,8)	34 (%35,8)	

FS ve FG gözlemcilerinde IDH1 R132H mutant ve R132H-dışı IDH1 mutant olgular ile H3K27me3 ekspresyonu arasında ilişki incelendiğinde anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0,999$) (Tablo 4.14).

Tablo 4.14. H3K27m3 ekspresyonu ile IDH1 R132H mutant ve R132H-dışı IDH1 mutant olgular arasında ilişkinin incelenmesi

	IDH1 R132H mutasyonu var	IDH1 R132H mutasyonu yok	p
FS Gözlemcisi: H3K27me3 ekspresyon kaybı	67 (%97,1)	2 (%2,9)	0,999
H3K27me3 ekspresyonu korunmuş	93 (%95,9)	4 (%4,1)	
FG Gözlemcisi: H3K27me3 ekspresyon kaybı	69 (%97,2)	2 (%2,8)	0,999
H3K27me3 ekspresyonu korunmuş	91 (%95,8)	4 (%4,2)	

4.8. 1p/19q Kodelesyonu ile H3K27me3 İmmünohistokimyasal Kaybı Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi

FS gözlemcisinde 1p/19q kodelesyonu varlığı ile H3K27me3 ekspresyon kaybı arasındaki ilişki incelendiğinde H3K27me3 ekspresyon kaybı, 1p/19q kodelesyonu olan olgularda (%69,6), 1p/19q kodelesyonu olmayan olgulara göre (%30,4) daha yüksek bulunmuştur ($p < 0,001$). Benzer şekilde, FG gözlemcisinde de 1p/19q kodelesyonu varlığı ile H3K27me3 ekspresyon kaybı arasındaki ilişki incelendiğinde H3K27me3 ekspresyon kaybı, 1p/19q kodelesyonu olan olgularda (%69,0), 1p/19q kodelesyonu olmayan olgulara göre (%31,0) daha yüksek bulunmuştur ($p < 0,001$) (Tablo 4.15).

Tablo 4.15. 1p/19q kodelesyonu varlığı ile H3K27me3 ekspresyon kaybı arasındaki ilişki

	1p/19q kodelesyonu var	1p/19q kodelesyonu yok	p
FS Gözlemcisi: H3K27me3 ekspresyon kaybı	48 (%69,6)	21 (%30,4)	<0,001
H3K27me3 ekspresyonu korunmuş	25 (%25,8)	72 (%74,2)	
FG Gözlemcisi: H3K27me3 ekspresyon kaybı	49 (%69,0)	22 (%31,0)	<0,001
H3K27me3 ekspresyonu korunmuş	24 (%25,3)	71 (%74,7)	

Tüm vakalarda FS gözlemcisi için 1p/19q kodelesyonu tespitinde kullanılan FISH yöntemine alternatif olarak H3K27me3 immünohistokimyasal boyanma kaybının sensitivite ve spesifisitesi hesaplandığında; sensitivite %77,42 (%95 GA %67,58 – %85,45), spesifisite %65,75 (%95 GA %53,72 - %76,47), pozitif olasılık oranı 2,26 (%95 GA 1,62 – 3,16), negatif olasılık oranı 0,34 (%95 GA 0,23 – 0,52), pozitif öngörü oranı %74,23 (%95 GA %67,29 - %80,12), negatif öngörü oranı %69,57 (%95 GA %60,24 – %77,52) ve kesinlik %72,29 (%95 GA %64,82 - %78,94) olarak bulunmuştur (Tablo 4.16).

Tüm vakalarda FG gözlemcisi için 1p/19q kodelesyonu tespitinde kullanılan FISH yöntemine alternatif olarak H3K27me3 immünohistokimyasal boyanma kaybının sensitivite ve spesifisitesi hesaplandığında; sensitivite %76,34 (%95 GA %66,40 – %84,54), spesifisite %67,12 (%95 GA %55,13- %77,67), pozitif olasılık oranı 2,32 (%95 GA 1,64 – 3,28), negatif olasılık oranı 0,35 (%95 GA 0,24 – 0,53), pozitif öngörü oranı %74,74 (%95 GA %67,65 - %80,71), negatif öngörü oranı %69,01 (%95 GA %59,91 – %76,85) ve kesinlik %72,29 (%95 GA %64,82 - %78,94) olarak bulunmuştur (Tablo 4.16).

Tablo 4.16. Tüm vakalarda FS ve FG gözlemcisinin 1p/19q FISH yöntemine alternatif olarak H3K27me3 IHK boyanma kaybının değerlendirmeleri

	FS Gözlemcisi	FG Gözlemcisi
Sensitivite	%77,42	%76,34
Spesifisite	%65,75	%67,12
Pozitif Olasılık Oranı	2,26	2,32
Negatif Olasılık Oranı	0,34	0,35
Pozitif Öngörü Oranı	%74,23	%74,74
Negatif Öngörü Oranı	%79,99	%69,01
Kesinlik	%69,57	%69,57
Hastalık Prevelansı	%56,02	%56,02

5. TARTIŞMA

5.1. CDKN2A-MTAP İlişkisi

2009 yılında IDH1/2 mutasyonlarının keşfi (3) ile başlayan süreçte 2021 DSÖ SSS tümörleri sınıflamasına göre erişkin tipi gliomlar IDH1/2 mutasyonları ve 1p/19q kodelesyonu durumlarına göre sınıflandırılmaktadır (11). Erişkin tipi IDH-mutant gliomlar 1p/19q kodelesyonunun varlığı ya da yokluğuna göre astrositom, IDH-mutant ve oligodendrogliom, IDH-mutant ve 1p/19q kayıplı olarak iki majör gruba ayrılmaktadır. IDH-mutant astrositomların derecelendirmesinde 2021 DSÖ SSS tümörleri sınıflamasında yer alan değişikliğe göre CDKN2A/CDKN2B HD içeren tümörler, mikrovasküler proliferasyon ve/veya nekroz içermeseler dahi derece 4 olarak sınıflandırılmaktadır (11). Çünkü CDKN2A/B HD'nin derece 2 ve 3 IDH mutant difüz astrositik gliomlarda derece 4 tümörlere benzer şekilde kötü prognoz ve kısa sağkalım süreleri ile ilişkili olduğu pek çok retrospektif çalışmada gösterilmiştir (6, 14-17). Dolayısıyla IDH-mutant, ATRX ve/veya p53 mutasyonu içeren ve nekroz ve/veya mikrovasküler proliferasyon içermeyen difüz astrositik tümörlerin doğru bir şekilde derecelendirilebilmesi için CDKN2A/B HD durumunun belirlenmesi gereklidir. Yine oligodendrogliomlarda DSÖ SSS derece 2 tümörlerde görülmeyen ancak derece 3 tümörlerin bir kısmında görülebilen CDKN2A/B HD, mikrovasküler proliferasyon ve nekrozdan bağımsız olarak kısa sağkalım süreleri ile ilişkili bulunmuştur (12). Bu nedenle oligodendrogliom tümörlerde derecelendirmede arada kalınan vakalarda CDKN2A HD delesyonu bakılması yararlı olmaktadır.

Bu çalışmada astrositom ve oligodendrogliom tanısı verilen 166 IDH-mutant erişkin tipi difüz gliom vakasında CDKN2A HD durumu ve CDKN2A HD için vekil biyobelirteç olarak MTAP immünohistokimyasal boyamasının sensitivite ve spesifitesi incelenmiştir. 166 tümörden FISH ile CDKN2A HD bakılan 161 tümörün 25'inde (%15,1) delesyon saptanmıştır. Bu oran Appay ve ark. (12) yayınladığı “*French national POLA network*” kohortuna ait vakalar ile elde edilen sonuç (%13,9, 127/911) ile benzerdir. 93 astrositom vakasından CDKN2A HD bakılan 90 tümörün 20'sinde (%21,5) delesyon saptanmıştır. Bu oran literatürde yer alan Appay ve ark.(12) (%11, 47/428) ve Shirahata ve ark.(15) (%14, 31/224) kohortlarında elde edilen oranlardan daha yüksek olmakla birlikte Korshunov ve ark. (138) tarafından bildirilen kohorttan

(%43, 42/97) daha düşüktür. CDKN2A HD saptanan vakalardan 2 tanesi tanı anında DSÖ 2016'ya göre morfolojik olarak derece II, 8 tanesi derece III ve 10 tanesi derece IV (IDH mutant GBM) olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak 90 astrositom vakasından 10 tanesinin (%9) derecesi CDKN2A HD saptanması nedeniyle DSÖ 2021'e göre derece 4 IDH mutant astrositom olarak değişmiştir.

Oligodendrogliom grubunda yer alan 73 tümörde CDKN2A HD bakılan 71 tümörün 5'inde (%6,8) delesyon saptanmış olup bu tümörlerin tamamı DSÖ SSS derece 3 tümörlerdir. Derece 2 tümörlerin hiçbirinde CDKN2A HD saptanmamıştır. 2020 yılında Appay ve ark. yayınladığı geniş kohortta bizim sonucumuza benzer şekilde derece 3 oligodendrogliomlarda %7 (33/483) oranında CDKN2A HD görüldüğünü, derece 2 tümörlerde ise CDKN2A HD görmediklerini ve oligodendrogliom tümörlerde CDKN2A HD'nin nekroz ve mikrovasküler proliferasyon bağımsız olarak azalmış sağkalım ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (12). Dolayısıyla bu sonuçtan yola çıkarak IDH-mutant ve 1p/19q kayıplı oligodendrogliom tümörlerin derecelendirmesinde arada kalınan vakalarda CDKN2A testi yapılabileceği ve HD saptanması DSÖ SSS derece 3 lehine değerlendirileceği sonucuna ulaşabiliriz.

Literatürde CDKN2A HD saptanmasında moleküler yöntemlere alternatif olarak daha ucuz ve ulaşılabilir MTAP immünhistokimyasal boyamasının kullanılabileceğine dair öneriler mevcuttur. Ancak bu konuda difüz gliomlar üzerinde yapılmış sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmada vaka serimizde yer alan tümörlere ait MTAP immünhistokimyasal boyaması iki gözlemci tarafından bağımsız olarak değerlendirilmiştir. Gözlemcilerden biri MTAP boyaması değerlendirilebilen 164 tümörün 30'unda (%18,1), diğeri ise 29'unda (%17,5) MTAP ekspresyon kaybı saptamıştır. MTAP immünhistokimyasal boyanma kaybının sensitivite ve spesifitesi hesaplandığında; sensitivite her iki gözlemci için %88, spesifisite %95,52 ve %96,27 olarak hesaplanmıştır. Bu bulgu difüz gliomlarda yapılmış tek çalışma olan Satomi ve ark. bildirdiği %88 sensitivite ve %98 spesifisite ile oldukça benzerdir (26). Yine benzer şekilde yakın zamanda 23 PXA vakası ile yapılan bir çalışmada MTAP immünhistokimyasının sensitivitesi %86,7, spesifitesi %100 olarak bulunmuştur (18). Diğer tümörler için duruma baktığımızda Chapel ve ark. (25) yaptığı çalışmada mezotelyoma için MTAP immünhistokimyasının %87 sensitivite ve %98 spesifisite sahip olduğu kaydedilmiştir. Sasaki ve ark. ise 2022 yılında yayınlanan 30 meningiom

vakasının incelendiği çalışmalarında CDKN2A HD saptanan 5 vakanın tümünde MTAP kaybı saptanmış olup MTAP sensitivite ve spesifisitesini %100 olarak bildirmişlerdir (23). Bu bulgular ile MTAP immünohistokimyasal boyamasının CDKN2A HD için yüksek sensitivite ve spesifisiteye sahip güvenilir bir vekil biyobelirteç olduğu sonucuna ulaşabiliriz.

Bununla birlikte CDKN2A durumu ve MTAP ekspresyonu arasında uyumsuzluk gösteren vakalar da mevcuttur. Bizim çalışmamızda CDKN2A HD mevcut olan 25 vakadan 22'sinde MTAP kaybı izlenmiş olup 3 tanesinde MTAP kaybı saptanmamıştır. CDKN2A HD içermeyen 134 vakadan 5 tanesinde ise MTAP ekspresyon kaybı görülmüştür. Kromozom 9p21'de delesyon olduğu zaman CDKN2A ile beraber bu gene 100 kb telomerik olarak bulunan MTAP geninde de %80-90 oranında HD görüldüğü bilinmektedir (60). Ancak delesyonun büyüklüğüne göre bazen CDKN2A HD'ye MTAP HD eşlik etmeyebilir. 230 gliom vakasının dahil olduğu bir çalışmaya göre 9p21'de delesyon olduğu zaman %10 vakada MTAP delesyonu olmadan CDKN2A delesyonu olduğu bildirilmiştir (63). CDKN2A HD sık görüldüğü (%40) kanserlerden olan pankreas ve periampuller bölge kanserleri ile yapılan bir çalışmada ise vakaların yarısında MTAP HD olmadan CDKN2A HD görüldüğü bildirilmiştir (20). Dolayısıyla bazı vakalarda mevcut CDKN2A HD'ye MTAP HD eşlik etmediği için MTAP immünohistokimyasal kaybı görülmemektedir. Bu bulgulardan yola çıkılarak bizim serimizde yer alan CDKN2A HD içermesine rağmen MTAP kaybı göstermeyen 3 vaka için bu durumun geçerli olabileceği düşünülmüştür. Buradan çıkarılacak sonuç ise korunmuş MTAP ekspresyonunun her zaman CDKN2A HD'yi kesin olarak ekarte etmeyeceğidir.

Yine nadiren CDKN2A HD olmadan MTAP HD görülebilen vakaların (%0,5) mevcut olduğu bildirilmiştir (63). Bu durum bizim serimizde yer alan 5 vakaya benzer şekilde CDKN2A HD içermemesine rağmen immünohistokimyasal MTAP kaybı gösteren tümörler olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu tür vakalar için CDKN2A HD olmadan MTAP HD görülmesi bir neden olabileceği gibi bir başka olası açıklama ise MTAP protein inaktivasyonunun HD dışı mekanizmalarla olabileceği ihtimalidir (139).

MTAP immünohistokimyasal çalışması için en çok kullanılan 2 klon "EPR6893" ve "2G4" dir. Bu çalışmada EPR6893 klonu kullanılmış olup immünohistokimyasal boyamanın değerlendirilmesi mevcut vakalarda neoplastik hücrelerde ve iç kontrollerde

optimal düzeyde gerçekleştirilebilmiştir. Benzer şekilde Lou ve ark. PXA vakalarında EPR6893 klonu ile efektif bir boyanma elde ettiklerini bildirmişlerdir (18). Ancak Satomi ve ark. kendi difüz gliom serilerinde EPR6893 klonu ile vakaların %61'ini, 2G4 klonu ile ise %64'ünü kolaylıkla değerlendirebildiklerini ve 2G4 klonu ile daha kuvvetli bir boyanma görülmesine rağmen boyanmayı skorlarken her iki klon için benzer zorluklar ile karşılaştıklarını söylemişlerdir (26). MTAP immünohistokimyasının değerlendirilmesinde en büyük problem yetersiz fiksasyon ve boyama işlemi sırasındaki teknik nedenlerden dolayı boyanma olmamasını yanlış pozitif olarak yorumlamaktır. Bir vakayı MTAP kaybı olarak değerlendirmeden önce endotel hücreleri, inflamatuvar hücreler, neoplastik olmayan glial hücreler gibi iç kontrollerin boyandığından emin olmak son derece önemlidir. Arada kalınan vakaların CDKN2A FISH ile desteklenmesi faydalı olacaktır.

Bizim çalışmamızda MTAP ekspresyon kaybının tespiti için her iki gözlemci arasındaki uyum Kappa katsayısı ile değerlendirildiğinde 0,938 ile neredeyse mükemmel uyum bulunmuştur. Benzer şekilde Chapel ve ark. mezotelyoma vakalarında MTAP boyamasında 4 gözlemci (Kappa katsayısı 0,85) ve 2 laboratuvar (Kappa katsayısı 0,77) arasında mükemmel yakın bir uyum olduğunu göstermişlerdir (25). Dolayısıyla MTAP immünohistokimyası, değerlendirmesi kolay ve gözlemciler arası uyumun yüksek olduğu güvenilir bir vekil biyobelirteç olarak karşımıza çıkmaktadır.

Çalışmamızda MTAP immünohistokimyasal ekspresyonunda tümör içi heterojeniteyi gözlemleyebilmek için her bir tümör için farklı alanlardan 3'er mm çaplı 2 ayrı kor alınarak TMA blokları hazırlanmıştır. MTAP immünohistokimyasal boyamasının vakaların büyük çoğunluğunda her iki kor için homojen olduğu gözlenmiş olmakla birlikte 4 vakada tümör içi heterojenite görülmüştür. Vakaların birinde MTAP kaybı gösteren alan ile korunmuş MTAP ekspresyonu gösteren alanın keskin bir sınırla ayrıldığı görülmüş olup bu heterojenite CDKN2A FISH çalışması ile de desteklenmiştir; MTAP ekspresyonunun korunduğu tümör alanlarında CDKN2A HD görülmezken, MTAP kaybı gösteren tümör hücrelerinde CDKN2A HD görülmüştür (Resim 4.2). DNA metilasyon teknikleri kullanılarak yapılan bazı çalışmalarda difüz gliomlarda intratümöral heterojenitenin görülebildiğinden bahsedilmiştir (140, 141). CDKN2A/B HD için tümör içi heterojeniteden ise ilk olarak Vega ve ark. 39 gliom ve meningiom vakasında DNA metilasyon profili yardımıyla tümör içi heterojeniyi değerlendirdikleri

çalışmalarında bahsetmiş olup çalışmada yer alan 2 IDH-mutant astrositomdan birinde CDKN2A/B HD'de intratümöral heterojenite saptadıklarını ve bu durumun IDH-mutant astrositomların yanlış derecelendirmesine yol açabileceğini bildirmişlerdir (140). Dolayısıyla, bazı vakalarda MTAP boyamasında görülen intratümöral heterojenite CDKN2A HD'de görülen heterojenitenin bir yansıması olabilir. Bu nedenle MTAP immünohistokimyasını değerlendirirken intratümöral heterojenitenin görülebilme ihtimali mutlaka aklımızın bir köşesinde olmalıdır.

Hem CDKN2A HD hem de MTAP ekspresyon kaybı, IDH-mutant astrositomlar için genel sağkalımda önemli kötü prognostik faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır. Literatürde bildirildiği üzere CDKN2A HD ve MTAP ekspresyon kaybı hem astrositom hem oligodendrogliom grubunda kötü prognostik faktörlerdir. Çalışmamızda CDKN2A HD ve MTAP kaybı ile yaş, cinsiyet ve tümör yerleşimi gibi klinik parametreler arasında herhangi bir ilişki saptanmamıştır.

CDKN2A HD'ye eşlik etmesinin yanında MTAP inaktivasyonunun epigenetik mekanizmalar aracılığıyla özellikle glioblastom vakalarında gliomajeneze katkı sağladığı (56) ve tedavi açısından hedef bir molekül olabileceği (56, 142) ile ilgili yayınlar da mevcuttur. İlerleyen zamanlarda alta yatan mekanizmaların aydınlatılması ve yeni hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesi ile MTAP diagnostik ve prognostik özelliklerinin yanında teröpatik özellikleri ile de karşımıza çıkabilecek potansiye sahip bir belirteçtir.

5.2. 1p/19q Kodelesyonu - H3K27me3 İlişkisi

Oligodendrogliom tanısı için IDH mutasyonu ve 1p/19q kodelesyonunun beraber bulunması gerekmektedir. 1p/19q durumuna pek çok merkezde FISH ya da PCR temelli heterozigotluk analizleri ile bakılmaktadır. Ancak bu yöntemler nispeten pahalı ve ulaşılması zor testlerdir. Bu nedenle bu moleküler yöntemlere alternatif, erişimi kolay ve ucuz vekil biyobelirteç arayışı mevcuttur. Oligodendrogliomlarda H3K27me3 nükleer ekspresyon kaybı ile 1p/19q kodelesyonu arasında korelasyon olduğunu bildiren yayınlar mevcut olmakla birlikte 1p/19q kodelesyonu için vekil belirteç olarak H3K27me3 immünohistokimyasal boyamasının sensitivite ve spesifitesi ile ilgili farklı bulgular elde edilmiştir. Buradan yola çıkarak biz kendi vaka serimizde H3K27me3

kaybı ile 1p/19q kodelesyonu arasındaki ilişkiyi ve H3K27me3 boyamasının sensitivite ve spesifisitesini inceledik.

Serimizde yer alan tüm vakaların %41,6 (FS) / %42,8 (FG)'inde H3K27me3 ekspresyon kaybı saptanmış olup bu oran oligodendrogliomlar için %67,1 (FS-49/73) / %68,5 (FG-50/73) iken astrositomlar için %21,1 (FS-20/93) / %22,6 (FG-21/93) olarak bulunmuştur. Literatürdeki sonuçlara baktığımız zaman bizim serimizden farklı olarak Feller ve ark. oligodendrogliomların %97'sinde, astrositomların %17'sinde (28), Filipski ve ark. kendi serilerinde yer alan oligodendrogliomların %96,2'sinde, astrositomların %30,4'ünde (29), Ammendola ve ark. oligodendrogliomların %96,6'sında (58/60) (124), Habiba ve ark. IDH1-R132H mutant oligodendrogliomların %90'ında (36/40) (125) H3K27me3 nükleer ekspresyon kaybı görürken; Pekmezci ve ark. bizim sonuçlarımıza benzer şekilde oligodendrogliomların %75'inde, astrositomların %27'sinde (30) nükleer ekspresyon kaybı saptanmıştır.

Çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak (28-30, 124) difüz gliomlar içinde, 1p/19q kodelesyonu görülen vakalarda görülmeyenlere oranla H3K27me3 ekspresyon görülme olasılığı daha fazla bulunmuştur ($p < 0,001$). H3K27me3'ün sensitivite ve spesifisitesi hesapladığımızda ise sensitivite %77,42-76,34, spesifisite %65,75-67,12 olarak karşımıza çıkmıştır. Buradan yola çıkarak H3K27me3 ekspresyon kaybının oligodendrogliomlarda sık görüldüğünü ancak oligodendrogliom tanısı koymada 1p/19q FISH yöntemine alternatif olarak sensitivite ve spesifisitesinin düşük olduğu sonucuna ulaşılabilmektedir.

H3K27me3 kaybı gösteren difüz gliom vakalarının bir kısmında kadınlardaki kromatin yeniden düzenlenmesi nedeniyle görülen X kromozom inaktivasyonuna bağlı perinükleer noktasal boyanma görülebildiği bilinmektedir (29, 30, 124). Bizim serimizde yer alan vakaların %21'inde H3K27me3 ile noktasal boyanma görülmüştür.

Literatürde yer alan 145 gliom vakasının incelendiği bir çalışmada IDH1 p.R132H mutant tümörlerin aksine R132H dışı IDH1/2 mutant oligodendrogliomların (5 vaka) hiçbirinde H3K27me3 kaybı saptanmamıştır (125). Biz kendi serimizde yer alan 6 adet R132H dışı IDH1/2 mutant difüz gliom vakaları ile H3K27me3 ekspresyonu arasındaki ilişkiyi incelediğimizde anlamlı bir ilişki saptamadık ($p=0,999$).

Feller ve ark. yaptıkları çalışmada bizim de çalışmamızda kullandığımız monoklonal antikor (klon C36B11) ile piyasada yer alan poliklonal antikor (klon 07-

449) karşılaştırmış ve poliklonal antikor ile analiz edilen tüm örneklerde H3K27me3 ekspresyonunun korunmuş iken monoklonal antikor ile oligodendrogliomların büyük kısmında nükleer ekspresyon kaybı olduğunu göstermişlerdir (28). Dolayısıyla H3K27me3 boyaması için monoklonal antikorun (klon C36B11) kullanılması daha doğru olacaktır kanısındayız.

Ammendola ve ark.; Pekmezci ve ark. serisinde diğer çalışmalardan farklı olarak daha az oranda H3K27me3 kaybı görülmüş olmasını antikor dilüsyonu (1/50 vs 1/200) ile ilgili olabileceğini öne sürmüştür. Kitehama ve ark. difüz gliomlar ile MPNST'ler arasında H3K27me3 ekspresyonunu karşılaştırdıkları çalışmalarında; MPNST ile karşılaştırıldığında difüz gliomlarda H3K27me3 ekspresyonunun antikor dilüsyonundan daha fazla etkilendiğini ve difüz gliomlarda daha düşük konsantrasyonda (1/200) antikor kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir (143). Ancak biz çalışmamızda 1/200 antikor dilüsyonu kullanmamıza rağmen benzer bulgular elde edemedik. Bu nedenle kohortlar arasındaki farklı sonuçların antikor dilüsyonu yanı sıra pek çok başka faktörden kaynaklanıyor olabileceği sonucuna varılabilir.

H3K27me3 immünohistokimyasal boyanmasının değerlendirilmesinde boyanmanın heterojen olabildiği vakaların mevcut olması nedeniyle literatürde H3K27me3 kaybı için farklı eşik değerler kullanılmıştır. Özellikle difüz gliom ve meningiom serilerinde araştırmacılar %95 ve üzeri neoplastik hücrede nükleer ekspresyon kaybı varsa H3K27me3'ü kayıp olarak değerlendirirken (29, 30, 120, 121, 124), MPNST serilerinde ve birkaç gliom serisinde parsiyel kayıp gösteren vakaları da H3K27me3 kaybı olarak değerlendirmişlerdir (119, 144, 145). Bizim serimizde de parsiyel kayıp gösteren vakalar (%21) görülmüş olmakla birlikte bu vakalar korunmuş H3K27me3 ekspresyonu olarak değerlendirilmiştir. H3K27me3 ile heterojen boyanma daha önceki çalışmalarda da kaydedilmiş olup nedeni aydınlatılamamıştır. İntratümöral heterojeniteyi yansıtır olabileceği gibi bazı vakalarda tespit ve takibe bağlı veya doğrudan antikorun homojen yayılmaması nedeniyle heterojen bir boyanma görülüyor olabilir.

H3K27me3 boyamasını değerlendirmede güçlük yaratan önemli diğer durumlar infiltrasyon zonunu temsil eden örnekler ve küçük biyopsiler olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle infiltrasyon zonunu temsil eden örneklerde neoplastik hücrelerdeki ekspresyon kaybını ve kaybın yüzdesini değerlendirmek oldukça zordur.

Bu nedenle H3K27me3'ün değerlendirilmesinde bu örneklerin kullanılmaması faydalı olacaktır. Yine heterojen boyanmaların görülebilmesi nedeniyle küçük biyopsi örnekleri tümörün tamamını temsil edemeyeceğinden suboptimal sonuç elde edilebilir.

Pediyatrik ependimomlarda H3K27me3 kaybı gösteren PFA grubu posterior fossa ependimomlarının kötü prognoz gösterdiği bilinmektedir (122). Benzer şekilde derece 1 ve 2 meningiomlarda H3K27me3 kaybı daha yüksek rekürrens riski ile ilişkilidir (120, 121). Gliomlarda ise H3K27me3 kaybı gösteren olguların göstermeyenlere göre daha iyi prognoza sahip olduklarını gösteren çalışmalar mevcuttur (29, 124). Bizim çalışmamızda H3K27me3 kaybı ile cinsiyet, yaş ve tümör yerleşimi arasında da anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Difüz gliomlarda neden H3K27me3 ekspresyon kaybı görüldüğü net olarak bilinmemektedir. Feller ve ark. 2019 yılında yayınladıkları çalışmalarında yüksek oranda spesifik kütle spektrometri ölçümlerinde oligodendrogliomlarda H3K27me3 seviyelerinde azalma saptamışlar ve histon metilasyonundaki alterasyonların difüz gliomların tiplendirmesinde kullanılabileceğini söylemişlerdir (28). Filipski ve ark. kendi serilerinde yer alan vakaların hiçbirinde H3K27M mutasyonu saptamadıklarını bildirmişlerdir (29). Dolayısıyla H3K27 trimetilasyonun kaybı ilgili gendeki mutasyon sonucu değil epigenetik mekanizmalar nedeniyle gelişmekte gibi durmaktadır. Difüz gliomlarda IDH mutasyonu nedeniyle neoplastik hücrelerdeki artmış 2-hidroksigluterat seviyelerinin histon metilasyonunda artışa neden olduğu (146) ve bu durumun "*CpG island hypermethylation*" fenotipi ile ilişkili olduğu (41) düşünüldüğünde özellikle oligodendrogliomlarda görülen H3K27me3 ekspresyonunun kaybı düşündürücüdür. Altta yatan mekanizmaları aydınlatılabilmek için yeni ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1. IDH-mutant erişkin tipi difüz gliomlarda CDKN2A HD görülme yüzdesi %16,1'dir.
2. IDH-mutant astrositomlarda CDKN2A HD görülme yüzdesi %21,5'dir.
3. DSÖ SSS derece 3 oligodendrogliyal tümörlerde CDKN2A HD görülme yüzdesi %6,8 iken, derece 2 oligodendrogliomlarda CDKN2A HD izlenmemiştir.
4. CDKN2A HD için vekil biyobelirteç olarak MTAP immünohistokimyasının sensitivitesi %88, spesifisitesi %95,52-96,27 olarak hesaplanmıştır.
5. CDKN2A HD için MTAP immünohistokimyasal çalışması, değerlendirmesi kolay ve gözlemciler arası uyumun yüksek olduğu güvenilir bir vekil biyobelirteç olarak karşımıza çıkmaktadır.
6. Oligodendrogliomların %67,1-68,5'inde, astrositomların ise %21,1-22,6'sinde H3K27me3 ekspresyon kaybı görülmüştür.
7. 1p/19q kodelesyonu varlığı ile H3K27me3 ekspresyon kaybı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki mevcuttur ($p < 0,001$).
8. 1p/19q FISH testine alternatif olarak H3K27me3 antikorusunun sensitivitesi %77,42-76,34, spesifisitesi %65,75-67,12 olarak hesaplanmıştır.
9. IDH-mutant ve 1p/19q kayıplı oligodendrogliomlarda H3K27me3 nükleer ekspresyon kaybı sık görülmekle birlikte 1p/19q FISH çalışmasına alternatif olabilecek düzeyde sensitif ve spesifik bir belirteç değildir.

7. KAYNAKLAR

1. Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P. Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer*. 1988;62(10):2152-65.
2. Cavenee DNLHOODWWK. WHO Classification of Tumours of Central nervous system. 2016.
3. 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.
4. Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, James CD, Wechsler W, Collins VP. Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol*. 1994;145(5):1175-90.
5. Brat DJ, Verhaak RG, Aldape KD, Yung WK, Salama SR, Cooper LA, et al. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2481-98.
6. 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*. 2020;139(3):603-8.
7. Brat DJ, Aldape K, Colman H, Holland EC, Louis DN, Jenkins RB, et al. cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for "Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV". *Acta Neuropathol*. 2018;136(5):805-10.
8. Ellison DW, Hawkins C, Jones DTW, Onar-Thomas A, Pfister SM, Reifenberger G, et al. cIMPACT-NOW update 4: diffuse gliomas characterized by MYB, MYBL1, or FGFR1 alterations or BRAF(V600E) mutation. *Acta Neuropathol*. 2019;137(4):683-7.
9. Louis DN, Ellison DW, Brat DJ, Aldape K, Capper D, Hawkins C, et al. cIMPACT-NOW: a practical summary of diagnostic points from Round 1 updates. *Brain Pathol*. 2019;29(4):469-72.
10. Louis DN, Giannini C, Capper D, Paulus W, Figarella-Branger D, Lopes MB, et al. cIMPACT-NOW update 2: diagnostic clarifications for diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant and diffuse astrocytoma/anaplastic astrocytoma, IDH-mutant. *Acta Neuropathol*. 2018;135(4):639-42.
11. Board WCoTE. Central Nervous System Tumours. 2021;6.
12. Appay R, Dehais C, Maura 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*. 2019;21(12):1519-28.
13. 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*. 2021;23(8):1231-51.
14. Yang RR, Shi ZF, Zhang ZY, Chan AK, Aibaidula A, Wang WW, 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 Pathol*. 2020;30(3):541-53.

15. 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.* 2018;136(1):153-66.
16. 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.
17. Brat DJ, Aldape K, Bridge JA, Canoll P, Colman H, Hameed MR, et al. Molecular Biomarker Testing for the Diagnosis of Diffuse Gliomas. *Arch Pathol Lab Med.* 2022.
18. Lou L, Li J, Qin M, Tian X, Guo W, Li Y. Correlation of MTAP immunohistochemical deficiency with CDKN2A homozygous deletion and clinicopathological features in pleomorphic xanthoastrocytoma. *Brain Tumor Pathol.* 2023;40(1):15-25.
19. de Oliveira SF, Ganzinelli M, Chilà R, Serino L, Maciel ME, Urban Cde A, et al. Characterization of MTAP Gene Expression in Breast Cancer Patients and Cell Lines. *PLoS One.* 2016;11(1):e0145647.
20. Hustinx SR, Hruban RH, Leoni LM, Iacobuzio-Donahue C, Cameron JL, Yeo CJ, et al. Homozygous deletion of the MTAP gene in invasive adenocarcinoma of the pancreas and in periampullary cancer: a potential new target for therapy. *Cancer Biol Ther.* 2005;4(1):83-6.
21. Hustinx SR, Leoni LM, Yeo CJ, Brown PN, Goggins M, Kern SE, et al. Concordant loss of MTAP and p16/CDKN2A expression in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence of homozygous deletion in a noninvasive precursor lesion. *Mod Pathol.* 2005;18(7):959-63.
22. Powell EL, Leoni LM, Canto MI, Forastiere AA, Iacobuzio-Donahue CA, Wang JS, et al. Concordant loss of MTAP and p16/CDKN2A expression in gastroesophageal carcinogenesis: evidence of homozygous deletion in esophageal noninvasive precursor lesions and therapeutic implications. *Am J Surg Pathol.* 2005;29(11):1497-504.
23. Sasaki S, Takeda M, Hirose T, Fujii T, Itami H, Uchiyama T, et al. Correlation of MTAP Immunohistochemistry With CDKN2A Status Assessed by Fluorescence In Situ Hybridization and Clinicopathological Features in CNS WHO Grade 2 and 3 Meningiomas: A Single Center Cohort Study. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2022;81(2):117-26.
24. Su CY, Chang YC, Chan YC, Lin TC, Huang MS, Yang CJ, et al. MTAP is an independent prognosis marker and the concordant loss of MTAP and p16 expression predicts short survival in non-small cell lung cancer patients. *Eur J Surg Oncol.* 2014;40(9):1143-50.
25. Chapel DB, Schulte JJ, Berg K, Churg A, Dacic S, Fitzpatrick C, et al. MTAP immunohistochemistry is an accurate and reproducible surrogate for CDKN2A fluorescence in situ hybridization in diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Mod Pathol.* 2020;33(2):245-54.
26. Satomi K, Ohno M, Matsushita Y, Takahashi M, Miyakita Y, Narita Y, et al. Utility of methylthioadenosine phosphorylase immunohistochemical deficiency as a surrogate for CDKN2A homozygous deletion in the assessment of adult-type infiltrating astrocytoma. *Mod Pathol.* 2021;34(4):688-700.

27. Tanboon J, Williams EA, Louis DN. The Diagnostic Use of Immunohistochemical Surrogates for Signature Molecular Genetic Alterations in Gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2016;75(1):4-18.
28. Feller C, Felix M, Weiss T, Herold-Mende C, Zhang F, Kockmann T, et al. Histone epiproteomic profiling distinguishes oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q co-deleted from IDH-mutant astrocytoma and reveals less tri-methylation of H3K27 in oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol*. 2020;139(1):211-3.
29. Filipinski K, Braun Y, Zinke J, Roller B, Baumgarten P, Wagner M, et al. Lack of H3K27 trimethylation is associated with 1p/19q codeletion in diffuse gliomas. *Acta Neuropathol*. 2019;138(2):331-4.
30. Pekmezci M, Phillips JJ, Dirilenoglu F, Atasever-Rezanko T, Tihan T, Solomon D, et al. Loss of H3K27 trimethylation by immunohistochemistry is frequent in oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted, but is neither a sensitive nor a specific marker. *Acta Neuropathol*. 2020;139(3):597-600.
31. Reuss DE, Mamatjan Y, Schrimpf D, Capper D, Hovestadt V, Kratz A, et al. IDH mutant diffuse and anaplastic astrocytomas have similar age at presentation and little difference in survival: a grading problem for WHO. *Acta Neuropathol*. 2015;129(6):867-73.
32. 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.
33. 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.
34. Wefel JS, Noll KR, Rao G, Cahill DP. Neurocognitive function varies by IDH1 genetic mutation status in patients with malignant glioma prior to surgical resection. *Neuro Oncol*. 2016;18(12):1656-63.
35. 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.
36. 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.
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*. 2020;140(5):765-76.
38. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008;321(5897):1807-12.
39. 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.
40. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 2009;462(7274):739-44.

41. Turcan S, Rohle D, Goenka A, Walsh LA, Fang F, Yilmaz E, et al. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature*. 2012;483(7390):479-83.
42. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med*. 2000;343(19):1350-4.
43. 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*. 2011;333(6041):425.
44. Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz LA, Jr., et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(15):6021-6.
45. 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*. 2012;7(12):e52167.
46. Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin Cancer Res*. 2009;15(19):6002-7.
47. Tihan T, Vohra P, Berger MS, Keles GE. Definition and diagnostic implications of gemistocytic astrocytomas: a pathological perspective. *J Neurooncol*. 2006;76(2):175-83.
48. 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.
49. Camelo-Piragua S, Jansen M, Ganguly A, Kim JC, Cosper AK, Dias-Santagata D, et al. A sensitive and specific diagnostic panel to distinguish diffuse astrocytoma from astrocytosis: chromosome 7 gain with mutant isocitrate dehydrogenase 1 and p53. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2011;70(2):110-5.
50. Banan R, Stichel D, Bleck A, Hong B, Lehmann U, Suwala A, et al. Infratentorial IDH-mutant astrocytoma is a distinct subtype. *Acta Neuropathol*. 2020;140(4):569-81.
51. 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.
52. Gillet E, Alentorn A, Doukouré B, Mundwiller E, van Thuijl HF, Reijneveld JC, et al. TP53 and p53 statuses and their clinical impact in diffuse low grade gliomas. *J Neurooncol*. 2014;118(1):131-9.
53. Takami H, Yoshida A, Fukushima S, Arita H, Matsushita Y, Nakamura T, et al. Revisiting TP53 Mutations and Immunohistochemistry--A Comparative Study in 157 Diffuse Gliomas. *Brain Pathol*. 2015;25(3):256-65.
54. Reuss DE, Sahm F, Schrimpf D, Wiestler B, Capper D, Koelsche C, et al. ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry with subsequent copy number analysis and IDH sequencing as a basis for an "integrated" diagnostic approach for adult astrocytoma, oligodendroglioma and glioblastoma. *Acta Neuropathol*. 2015;129(1):133-46.
55. Kizilbash SH. What is the role of CDKN2A/B homozygous deletion in IDH-mutant astrocytoma? <https://dailynewsascopubsorg/do/role-cdkn2a-b-homozygous-deletion-idh-mutant-astrocytoma>. 2021.

56. Hansen LJ, Sun R, Yang R, Singh SX, Chen LH, Pirozzi CJ, et al. MTAP Loss Promotes Stemness in Glioblastoma and Confers Unique Susceptibility to Purine Starvation. *Cancer Res.* 2019;79(13):3383-94.
57. Roy DM, Walsh LA, Desrichard A, Huse JT, Wu W, Gao J, et al. Integrated Genomics for Pinpointing Survival Loci within Arm-Level Somatic Copy Number Alterations. *Cancer Cell.* 2016;29(5):737-50.
58. Brand F, Förster A, Christians A, Bucher M, Thomé CM, Raab MS, et al. FOCAD loss impacts microtubule assembly, G2/M progression and patient survival in astrocytic gliomas. *Acta Neuropathol.* 2020;139(1):175-92.
59. Marjon K, Cameron MJ, Quang P, Clasquin MF, Mandley E, Kunii K, et al. MTAP Deletions in Cancer Create Vulnerability to Targeting of the MAT2A/PRMT5/RIOK1 Axis. *Cell Rep.* 2016;15(3):574-87.
60. Zhang H, Chen ZH, Savarese TM. Codeletion of the genes for p16INK4, methylthioadenosine phosphorylase, interferon-alpha1, interferon-beta1, and other 9p21 markers in human malignant cell lines. *Cancer Genet Cytogenet.* 1996;86(1):22-8.
61. Tang B, Li YN, Kruger WD. Defects in methylthioadenosine phosphorylase are associated with but not responsible for methionine-dependent tumor cell growth. *Cancer Res.* 2000;60(19):5543-7.
62. Zappia V, Della Ragione F, Pontoni G, Gragnaniello V, Carteni-Farina M. Human 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine phosphorylase: kinetic studies and catalytic mechanism. *Adv Exp Med Biol.* 1988;250:165-77.
63. Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, Sabedot TS, Salama SR, Murray BA, et al. Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell.* 2016;164(3):550-63.
64. Beiko J, Suki D, Hess KR, Fox BD, Cheung V, Cabral M, et al. IDH1 mutant malignant astrocytomas are more amenable to surgical resection and have a survival benefit associated with maximal surgical resection. *Neuro Oncol.* 2014;16(1):81-91.
65. Wijnenga MMJ, French PJ, Dubbink HJ, Dinjens WNM, Atmodimedjo PN, Kros JM, et al. The impact of surgery in molecularly defined low-grade glioma: an integrated clinical, radiological, and molecular analysis. *Neuro Oncol.* 2018;20(1):103-12.
66. von Deimling A, Ono T, Shirahata M, Louis DN. Grading of Diffuse Astrocytic Gliomas: A Review of Studies Before and After the Advent of IDH Testing. *Semin Neurol.* 2018;38(1):19-23.
67. Li KK, Shi ZF, Malta TM, Chan AK, Cheng S, Kwan JSH, et al. Identification of subsets of IDH-mutant glioblastomas with distinct epigenetic and copy number alterations and stratified clinical risks. *Neurooncol Adv.* 2019;1(1):vdz015.
68. Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, Patil N, Waite K, Kruchko C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro Oncol.* 2019;21(Suppl 5):v1-v100.
69. Rodriguez FJ, Tihan T, Lin D, McDonald W, Nigro J, Feuerstein B, et al. Clinicopathologic features of pediatric oligodendrogliomas: a series of 50 patients. *Am J Surg Pathol.* 2014;38(8):1058-70.
70. Andersen BM, Miranda C, Hatzoglou V, DeAngelis LM, Miller AM. Leptomeningeal metastases in glioma: The Memorial Sloan Kettering Cancer Center experience. *Neurology.* 2019;92(21):e2483-e91.

71. Herrlinger U, Jones DTW, Glas M, Hattingen E, Gramatzki D, Stuplich M, et al. Gliomatosis cerebri: no evidence for a separate brain tumor entity. *Acta Neuropathol.* 2016;131(2):309-19.
72. Garcia Pulido P, Neal J, Halpin S, Hamandi K. Multicentric oligodendroglioma: case report and review of the literature. *Seizure.* 2013;22(6):480-2.
73. Smits M, van den Bent MJ. Imaging Correlates of Adult Glioma Genotypes. *Radiology.* 2017;284(2):316-31.
74. Khalid L, Carone M, Dumrongpisutikul N, Intrapromkul J, Bonekamp D, Barker PB, et al. Imaging characteristics of oligodendrogliomas that predict grade. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2012;33(5):852-7.
75. Choi C, Ganji SK, DeBerardinis RJ, Hatanpaa KJ, Rakheja D, Kovacs Z, et al. 2-hydroxyglutarate detection by magnetic resonance spectroscopy in IDH-mutated patients with gliomas. *Nat Med.* 2012;18(4):624-9.
76. Flannery T, Cawley D, Zulfiger A, Alderazi Y, Heffernan J, Brett F, et al. Familial occurrence of oligodendroglial tumours. *Br J Neurosurg.* 2008;22(3):436-8.
77. Yang P, Kollmeyer TM, Buckner K, Bamlet W, Ballman KV, Jenkins RB. Polymorphisms in GLTSCR1 and ERCC2 are associated with the development of oligodendrogliomas. *Cancer.* 2005;103(11):2363-72.
78. Bainbridge MN, Armstrong GN, Gramatges MM, Bertuch AA, Jhangiani SN, Doddapaneni H, et al. Germline mutations in shelterin complex genes are associated with familial glioma. *J Natl Cancer Inst.* 2015;107(1):384.
79. Corti ME, Yampolsky C, Metta H, Valerga M, Sevelev G, Capizzano A. Oligodendroglioma in a patient with AIDS: case report and review of the literature. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2004;46(4):195-7.
80. Schiff D, O'Neill B, Wijdicks E, Antin JH, Wen PY. Gliomas arising in organ transplant recipients: an unrecognized complication of transplantation? *Neurology.* 2001;57(8):1486-8.
81. Appay R, Tabouret E, Macagno N, Touat M, Carpentier C, Colin C, et al. IDH2 mutations are commonly associated with 1p/19q codeletion in diffuse adult gliomas. *Neuro Oncol.* 2018;20(5):716-8.
82. Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, et al. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol.* 2009;118(4):469-74.
83. Griffin CA, Burger P, Morsberger L, Yonescu R, Swierczynski S, Weingart JD, et al. Identification of der(1;19)(q10;p10) in five oligodendrogliomas suggests mechanism of concurrent 1p and 19q loss. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006;65(10):988-94.
84. Vogazianou AP, Chan R, Bäcklund LM, Pearson DM, Liu L, Langford CF, et al. Distinct patterns of 1p and 19q alterations identify subtypes of human gliomas that have different prognoses. *Neuro Oncol.* 2010;12(7):664-78.
85. Arita H, Narita Y, Fukushima S, Tateishi K, Matsushita Y, Yoshida A, et al. Upregulating mutations in the TERT promoter commonly occur in adult malignant gliomas and are strongly associated with total 1p19q loss. *Acta Neuropathol.* 2013;126(2):267-76.
86. Koelsche C, Sahm F, Capper D, Reuss D, Sturm D, Jones DT, et al. Distribution of TERT promoter mutations in pediatric and adult tumors of the nervous system. *Acta Neuropathol.* 2013;126(6):907-15.

87. Exner ND, Valenzuela JAC, Abou-El-Ardat K, Miletic H, Huszthy PC, Radehaus PM, et al. Deep sequencing of a recurrent oligodendroglioma and the derived xenografts reveals new insights into the evolution of human oligodendroglioma and candidate driver genes. *Oncotarget*. 2019;10(38):3641-53.
88. Aihara K, Mukasa A, Nagae G, Nomura M, Yamamoto S, Ueda H, et al. Genetic and epigenetic stability of oligodendrogliomas at recurrence. *Acta Neuropathol Commun*. 2017;5(1):18.
89. Hafezi F, Perez Bercoff D. The Solo Play of TERT Promoter Mutations. *Cells*. 2020;9(3).
90. Bettegowda C, Agrawal N, Jiao Y, Sausen M, Wood LD, Hruban RH, et al. Mutations in CIC and FUBP1 contribute to human oligodendroglioma. *Science*. 2011;333(6048):1453-5.
91. Yip S, Butterfield YS, Morozova O, Chittaranjan S, Blough MD, An J, et al. Concurrent CIC mutations, IDH mutations, and 1p/19q loss distinguish oligodendrogliomas from other cancers. *J Pathol*. 2012;226(1):7-16.
92. Wong D, Yip S. Making heads or tails - the emergence of capicua (CIC) as an important multifunctional tumour suppressor. *J Pathol*. 2020;250(5):532-40.
93. Sjöblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science*. 2006;314(5797):268-74.
94. LeBlanc VG, Firme M, Song J, Chan SY, Lee MH, Yip S, et al. Comparative transcriptome analysis of isogenic cell line models and primary cancers links capicua (CIC) loss to activation of the MAPK signalling cascade. *J Pathol*. 2017;242(2):206-20.
95. Okimoto RA, Breitenbuecher F, Olivas VR, Wu W, Gini B, Hofree M, et al. Inactivation of Capicua drives cancer metastasis. *Nat Genet*. 2017;49(1):87-96.
96. Chittaranjan S, Chan S, Yang C, Yang KC, Chen V, Moradian A, et al. Mutations in CIC and IDH1 cooperatively regulate 2-hydroxyglutarate levels and cell clonogenicity. *Oncotarget*. 2014;5(17):7960-79.
97. Elman JS, Ni TK, Mengwasser KE, Jin D, Wronski A, Elledge SJ, et al. Identification of FUBP1 as a Long Tail Cancer Driver and Widespread Regulator of Tumor Suppressor and Oncogene Alternative Splicing. *Cell Rep*. 2019;28(13):3435-49.e5.
98. Rabenhorst U, Thalheimer FB, Gerlach K, Kijonka M, Böhm S, Krause DS, et al. Single-Stranded DNA-Binding Transcriptional Regulator FUBP1 Is Essential for Fetal and Adult Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal. *Cell Rep*. 2015;11(12):1847-55.
99. Chan AK, Pang JC, Chung NY, Li KK, Poon WS, Chan DT, et al. Loss of CIC and FUBP1 expressions are potential markers of shorter time to recurrence in oligodendroglial tumors. *Mod Pathol*. 2014;27(3):332-42.
100. 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*. 2018;20(1):66-77.
101. Broderick DK, Di C, Parrett TJ, Samuels YR, Cummins JM, McLendon RE, et al. Mutations of PIK3CA in anaplastic oligodendrogliomas, high-grade astrocytomas, and medulloblastomas. *Cancer Res*. 2004;64(15):5048-50.
102. Labreche K, Simeonova I, Kamoun A, Gleize V, Chubb D, Letouzé E, et al. TCF12 is mutated in anaplastic oligodendroglioma. *Nat Commun*. 2015;6:7207.

103. Kamoun A, Idbaih A, Dehais C, Elarouci N, Carpentier C, Letouzé E, et al. Integrated multi-omics analysis of oligodendroglial tumours identifies three subgroups of 1p/19q co-deleted gliomas. *Nat Commun.* 2016;7:11263.
104. Herpers MJ, Budka H. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in oligodendroglial tumors: gliofibrillary oligodendroglioma and transitional oligoastrocytoma as subtypes of oligodendroglioma. *Acta Neuropathol.* 1984;64(4):265-72.
105. Kros JM, van den Brink WA, van Loon-van Luyt JJ, Stefanko SZ. Signet-ring cell oligodendroglioma--report of two cases and discussion of the differential diagnosis. *Acta Neuropathol.* 1997;93(6):638-43.
106. Takei Y, Mirra SS, Miles ML. Eosinophilic granular cells in oligodendrogliomas. An ultrastructural study. *Cancer.* 1976;38(5):1968-76.
107. Perry A, Scheithauer BW, Macaulay RJ, Raffel C, Roth KA, Kros JM. Oligodendrogliomas with neurocytic differentiation. A report of 4 cases with diagnostic and histogenetic implications. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002;61(11):947-55.
108. Perry A, Burton SS, Fuller GN, Robinson CA, Palmer CA, Resch L, et al. Oligodendroglial neoplasms with ganglioglioma-like maturation: a diagnostic pitfall. *Acta Neuropathol.* 2010;120(2):237-52.
109. Hiniker A, Hagenkord JM, Powers MP, Aghi MK, Prados MD, Perry A. Gliosarcoma arising from an oligodendroglioma (oligosarcoma). *Clin Neuropathol.* 2013;32(3):165-70.
110. Rodriguez FJ, Scheithauer BW, Jenkins R, Burger PC, Rudzinskiy P, Vlodaysky E, et al. Gliosarcoma arising in oligodendroglial tumors ("oligosarcoma"): a clinicopathologic study. *Am J Surg Pathol.* 2007;31(3):351-62.
111. Suwala AK, Felix M, Friedel D, Stichel D, Schrimpf D, Hinz F, et al. Oligosarcomas, IDH-mutant are distinct and aggressive. *Acta Neuropathol.* 2022;143(2):263-81.
112. Pouget C, Hergalant S, Lardenois E, Lacomme S, Houlgatte R, Carpentier C, et al. Ki-67 and MCM6 labeling indices are correlated with overall survival in anaplastic oligodendroglioma, IDH1-mutant and 1p/19q-codeleted: a multicenter study from the French POLA network. *Brain Pathol.* 2020;30(3):465-78.
113. Figarella-Branger D, Mokhtari K, Dehais C, Jouvét A, Uro-Coste E, Colin C, et al. Mitotic index, microvascular proliferation, and necrosis define 3 groups of 1p/19q codeleted anaplastic oligodendrogliomas associated with different genomic alterations. *Neuro Oncol.* 2014;16(9):1244-54.
114. Giannini C, Scheithauer BW, Weaver AL, Burger PC, Kros JM, Mork S, et al. Oligodendrogliomas: reproducibility and prognostic value of histologic diagnosis and grading. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001;60(3):248-62.
115. Ducray F, Crinière E, Idbaih A, Mokhtari K, Marie Y, Paris S, et al. alpha-Internexin expression identifies 1p19q codeleted gliomas. *Neurology.* 2009;72(2):156-61.
116. Eigenbrod S, Roeber S, Thon N, Giese A, Krieger A, Grasbon-Frodl E, et al. α -Internexin in the diagnosis of oligodendroglial tumors and association with 1p/19q status. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2011;70(11):970-8.
117. Marucci G, Di Oto E, Farnedi A, Panzacchi R, Ligorio C, Foschini MP. Nogo-A: a useful marker for the diagnosis of oligodendroglioma and for identifying 1p19q codeletion. *Hum Pathol.* 2012;43(3):374-80.
118. Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature.* 2011;469(7330):343-9.

119. Prieto-Granada CN, Wiesner T, Messina JL, Jungbluth AA, Chi P, Antonescu CR. Loss of H3K27me3 Expression Is a Highly Sensitive Marker for Sporadic and Radiation-induced MPNST. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(4):479-89.
120. Nassiri F, Wang JZ, Singh O, Karimi S, Dalcourt T, Ijad N, et al. Loss of H3K27me3 in meningiomas. *Neuro Oncol*. 2021;23(8):1282-91.
121. Katz LM, Hielscher T, Liechty B, Silverman J, Zagzag D, Sen R, et al. Loss of histone H3K27me3 identifies a subset of meningiomas with increased risk of recurrence. *Acta Neuropathol*. 2018;135(6):955-63.
122. Panwalkar P, Clark J, Ramaswamy V, Hawes D, Yang F, Dunham C, et al. Immunohistochemical analysis of H3K27me3 demonstrates global reduction in group-A childhood posterior fossa ependymoma and is a powerful predictor of outcome. *Acta Neuropathol*. 2017;134(5):705-14.
123. Bender S, Tang Y, Lindroth AM, Hovestadt V, Jones DT, Kool M, et al. Reduced H3K27me3 and DNA hypomethylation are major drivers of gene expression in K27M mutant pediatric high-grade gliomas. *Cancer Cell*. 2013;24(5):660-72.
124. Ammendola S, Caldonazzi N, Simbolo M, Piredda ML, Brunelli M, Poliani PL, et al. H3K27me3 immunostaining is diagnostic and prognostic in diffuse gliomas with oligodendroglial or mixed oligoastrocytic morphology. *Virchows Arch*. 2021;479(5):987-96.
125. Habiba U, Sugino H, Yordanova R, Ise K, Tanei ZI, Ishida Y, et al. Loss of H3K27 trimethylation is frequent in IDH1-R132H but not in non-canonical IDH1/2 mutated and 1p/19q codeleted oligodendroglioma: a Japanese cohort study. *Acta Neuropathol Commun*. 2021;9(1):95.
126. Chen H, Thomas C, Munoz FA, Alexandrescu S, Horbinski CM, Olar A, et al. Polysomy is associated with poor outcome in 1p/19q codeleted oligodendroglial tumors. *Neuro Oncol*. 2019;21(9):1164-74.
127. Nonoguchi N, Ohta T, Oh JE, Kim YH, Kleihues P, Ohgaki H. TERT promoter mutations in primary and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol*. 2013;126(6):931-7.
128. 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*. 2017;133(6):1001-16.
129. Lee J, Putnam AR, Chesier SH, Banerjee A, Raffel C, Van Ziffle J, et al. Oligodendrogliomas, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted, arising during teenage years often lack TERT promoter mutation that is typical of their adult counterparts. *Acta Neuropathol Commun*. 2018;6(1):95.
130. Van den Bent MJ, Reni M, Gatta G, Vecht C. Oligodendroglioma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008;66(3):262-72.
131. Suchorska B, Schüller U, Biczok A, Lenski M, Albert NL, Giese A, et al. Contrast enhancement is a prognostic factor in IDH1/2 mutant, but not in wild-type WHO grade II/III glioma as confirmed by machine learning. *Eur J Cancer*. 2019;107:15-27.
132. 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*. 2017;5(1):39.

133. Franceschi E, Tosoni A, Bartolini S, Minichillo S, Mura A, Asioli S, et al. Histopathological grading affects survival in patients with IDH-mutant grade II and grade III diffuse gliomas. *Eur J Cancer*. 2020;137:10-7.
134. Killela PJ, Pirozzi CJ, Healy P, Reitman ZJ, Lipp E, Rasheed BA, et al. Mutations in IDH1, IDH2, and in the TERT promoter define clinically distinct subgroups of adult malignant gliomas. *Oncotarget*. 2014;5(6):1515-25.
135. Suzuki H, Aoki K, Chiba K, Sato Y, Shiozawa Y, Shiraishi Y, et al. Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. *Nat Genet*. 2015;47(5):458-68.
136. Olar A, Wani KM, Alfaro-Munoz KD, Heathcock LE, van Thuijl HF, Gilbert MR, et al. IDH mutation status and role of WHO grade and mitotic index in overall survival in grade II-III diffuse gliomas. *Acta Neuropathol*. 2015;129(4):585-96.
137. Wijnenga MMJ, French PJ, Dubbink HJ, Dinjens WNM, Atmodimedjo PN, Kros JM, et al. Prognostic relevance of mutations and copy number alterations assessed with targeted next generation sequencing in IDH mutant grade II glioma. *J Neurooncol*. 2018;139(2):349-57.
138. 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.
139. Schmid M, Malicki D, Nobori T, Rosenbach MD, Campbell K, Carson DA, et al. Homozygous deletions of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) are more frequent than p16INK4A (CDKN2) homozygous deletions in primary non-small cell lung cancers (NSCLC). *Oncogene*. 1998;17(20):2669-75.
140. Ferreyra Vega S, Wenger A, Kling T, Olsson Bontell T, Jakola AS, Carén H. Spatial heterogeneity in DNA methylation and chromosomal alterations in diffuse gliomas and meningiomas. *Mod Pathol*. 2022;35(11):1551-61.
141. Verburg N, Barthel FP, Anderson KJ, Johnson KC, Koopman T, Yaqub MM, et al. Spatial concordance of DNA methylation classification in diffuse glioma. *Neuro Oncol*. 2021;23(12):2054-65.
142. Kindler HL, Burris HA, 3rd, Sandler AB, Oliff IA. A phase II multicenter study of L-alanosine, a potent inhibitor of adenine biosynthesis, in patients with MTAP-deficient cancer. *Invest New Drugs*. 2009;27(1):75-81.
143. Kitahama K, Iijima S, Sumiishi A, Hayashi A, Nagahama K, Saito K, et al. Reduced H3K27me3 levels in diffuse gliomas: association with 1p/19q codeletion and difference from H3K27me3 loss in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Brain Tumor Pathol*. 2021;38(1):23-9.
144. Sugita S, Aoyama T, Emori M, Kido T, Takenami T, Sakuraba K, et al. Assessment of H3K27me3 immunohistochemistry and combination of NF1 and p16 deletions by fluorescence in situ hybridization in the differential diagnosis of malignant peripheral nerve sheath tumor and its histological mimics. *Diagn Pathol*. 2021;16(1):79.
145. Ito Y, Kohashi K, Endo M, Yoshimoto M, Ishihara S, Toda Y, et al. Clinicopathological and prognostic significance of H3K27 methylation status in malignant peripheral nerve sheath tumor: correlation with skeletal muscle differentiation. *Virchows Arch*. 2021;479(6):1233-44.
146. Lu C, Ward PS, Kapoor GS, Rohle D, Turcan S, Abdel-Wahab O, et al. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature*. 2012;483(7390):474-8.

8. EKLER

Ek1. Etik Kurul Onay Belgesi