

Integrovaná diagnostika difúzních gliomů

Integrated diagnostics of diffuse gliomas

Hendrych M.¹, Valeková H.², Kazda T.³, Lakomý R.⁴, Šána J.⁵, Jančálek R.², Slabý O.⁵, Hermanová M.¹

¹ I. ústav patologie, LF MU a FN u sv. Anny v Brně

² Neurochirurgická klinika LF MU a FN u sv. Anny v Brně

³ Klinika radiační onkologie LF MU a MOÚ Brno

⁴ Klinika komplexní onkologické péče LF MU a MOÚ Brno

⁵ CEITEC – Středoevropský technologický institut, MU Brno

Souhrn

Klasifikace nádorů centrálního nervového systému (CNS) Světové zdravotnické organizace (World Health Organization – WHO) zaznamenala v posledních letech zásadní změny. V současnosti platná revidovaná WHO klasifikace nádorů CNS z roku 2016 zavádí koncept tzv. integrované diagnostiky, inkorporující kromě histopatologického morfologického nálezu a imunofenotypu i molekulárně-genetické charakteristiky nádoru. Výsledná integrovaná diagnóza tedy zahrnuje jak tradiční morfologické a růstové charakteristiky nádoru vč. jeho histopatologického gradu, tak konkrétní molekulární biomarkery. Klasifikace nádorů založená na kombinaci fenotypu a genotypu nádorů umožňuje přesnější prognostickou stratifikaci, zvyšuje objektivitu diagnostiky a umožňuje lépe predikovat odpověď na protinádorovou léčbu. V roce 2017 bylo současně ustanoveno mezinárodní konsorcium (The Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy – not official WHO (cIMPACT-NOW)), které v obdobích mezi vydáním jednotlivých WHO klasifikací nádorů CNS tvoří a formuluje praktická doporučení pro integrovanou diagnostiku nádorů CNS a budoucí WHO klasifikaci. Začlenění molekulárních biomarkerů do integrované diagnostiky zásadním způsobem změnilo zejména klasifikaci difúzních gliomů, které v sobě zahrnují jednotky s odlišnými morfologickými charakteristikami, genetickými alteracemi a biologickým chováním. Přehledová práce shrnuje základní morfologické, imunofenotypické a molekulárně genetické charakteristiky difúzních gliomů v rámci integrované diagnostiky dle platné WHO klasifikace nádorů CNS 2016 a následných doporučení diagnostických postupů.

Klíčová slova

difúzní gliomy – integrovaná diagnóza – WHO 2016

Tato práce byla podpořena Ministerstvem zdravotnictví České republiky – Koncepční rozvoj výzkumné organizace (MMCI 00209805) a Grantovou agenturou Masarykovy univerzity (MUNI/A/1562/2018).

This work was supported by grant of the Ministry of Health of the Czech Republic – Conceptual Development of a Research Organization (MMCI 00209805) and Grant Agency of Masaryk University (MUNI/A/1562/2018).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



MUDr. Michal Hendrych

I. ústav patologie

FN u sv. Anny v Brně

Pekařská 53

656 91 Brno

e-mail: michal.hendrych@fnusa.cz

Obdrženo/Submitted: 3. 1. 2020

Přijato/Accepted: 2. 2. 2020

doi: 10.14735/amko2020248

Summary

Recently, the World Health Organization (WHO) classification of tumours of the central nervous system (CNS) has brought essential changes. The currently valid revised WHO 2016 classification of CNS tumours introduced the concept of integrated diagnostics, which incorporated not only histopathological morphological finding and immunophenotype but also molecular-genetic characteristics of the tumour. Thus, the final integrated diagnosis comprises the traditional morphological and growth pattern characteristics of a tumour including histopathological grade and also specific molecular biomarkers. The classification of tumour based on a combination of both tumour phenotype and genotype enables more precise prognostic stratification, increases the objectivity of diagnostics and prediction of response to treatment. In 2017, an international platform, The Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy – not official WHO (cIMPACT-NOW), was established to create and formulate practical recommendations for integrated diagnostics of CNS tumours and upcoming WHO classification. The incorporation of molecular biomarkers into the integrated diagnostics radically changed the classification of diffuse gliomas, which include entities with different morphological characteristics, genetic alterations and biological behaviour. This review article summarizes essential morphological, immunophenotypical and molecular genetic characteristics of diffuse gliomas within the scope of integrated diagnostics according to the valid WHO classification of tumours of the CNS and subsequent recommendations of diagnostic approaches.

Key words

diffuse gliomas – integrated diagnosis – WHO 2016

Úvod

Gliomy představují nejčastější primární nádory mozku, reprezentující až 75 % primárních malignit mozku, s nejvyšším zastoupením glioblastomu. Definujícím znakem difúzních astrocytárních a oligodendroglálních nádorů je difúzní infiltrativní charakter růstu v mozku či míše bez zřetelného ohraničení nádorového infiltrátu.

V rámci integrované diagnostiky dle revidované WHO klasifikace nádorů centrálního nervového systému (CNS) 2016 [1] jsou difúzní astrocytární a oligodendroglální nádory klasifikovány na základě mutačního statu IDH (izocitrátdehydrogenázy) jako IDH-mutované nebo IDH-wildtype difúzní gliomy (tab. 1). IDH-mutované nádory jsou dále členěny na IDH-mutované astrocytární nádory a oligodendroglomy, IDH-mutované, s kódelecí 1p/19q. IDH-mutované low grade difúzní gliomy (WHO grade (G) II) se vyznačují potenciálem progresu v high grade anaplastické gliomy (WHO G III). resp. u astrocytárně diferencovaných nádorů až v glioblastom (WHO G IV). Glioblastomy vznikající progresí z IDH-mutovaných astrocytomů nižšího gradu jsou označovány jako sekundární glioblastomy, na rozdíl od primárních *de novo* vznikajících, téměř výhradně IDH-wildtype glioblastomů. Samostatně definovanou jednotku představuje v rámci nové integrované diagnostiky difúzní středocharový gliom, s mutací K27M v genech pro histon 3 (H3) [2].

Integrovaná diagnostika gliomů samostatně vyčleňuje skupinu gliomů, pro

kteří je typický ohraničený typ růstu, postrádají mutace *IDH* genů a jsou často nositeli alterací genu *BRAF*. Jde o pilocytární astrocytom WHO G I, pleomorfní xantastrocytom WHO G II nebo III a subependymální obrovskobuněčný astrocytom WHO G I [2].

Integrovaná diagnostika vyžaduje aplikaci rozsáhlého spektra molekulárně-patologických a genetických vyšetření do rutinní diagnostické praxe. V současnosti jsou široce využívány zejména metodiky detekující alterace jednotlivých genů a jejich genových produktů (imunohistochemie, cytogenetické přístupy (např. fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), techniky polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction – PCR) a Sangerova metoda či pyrosequenování). Metody sekvenování nové generace (next generation sequencing, NGS) umožňují současné analýzy více genů, jak na přítomnost mutací a fúzí, tak na detekci změn počtu kopií příslušných genů. V současnosti jsou komerčně dostupné genové panely pro identifikaci genetických alterací v mozkových nádorech vč. gliomů, umožňující v rutinní diagnostické praxi vyšetření biomarkerů s významem nejen diagnostickým, ale i prognostickým a prediktivním.

Doporučené diagnostické postupy difúzních gliomů respektují platnou revidovanou WHO klasifikaci nádorů CNS 2016 a inkorporují recentní doporučení mezinárodního konsorcia neuropatologů a klinických neuroonkologů (The Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to

CNS Tumor Taxonomy – not official WHO (cIMPACT-NOW)), které prezentuje praktická doporučení pro tkáňovou diagnostiku mozkových nádorů na základě nových informací a recentních zjištění [3].

Histologická klasifikace a grading difúzních gliomů

Diagnostickou kaskádu zahajuje standardní histopatologické vyšetření a posouzení růstových charakteristik nádoru, jeho diferenciací a stanovení histopatologického gradu. Difúzní gliomy jsou charakterizovány infiltrativním typem růstu v mozkové tkáni, neostrým ohraničením nádorového infiltrátu, průkaznou přítomností reziduální tkáně CNS mezi buňkami nádorového infiltrátu, klesající denzitou nádorových buněk směrem od centra nádoru do periferie a přítomností vysoce specifických tzv. sekundárních struktur difúzně rostoucího gliomu v okraji invazivní fronty gliomu. Zde identifikujeme infiltraci nádorovými buňkami perineuronálně (obraz tzv. perineuronální satelitózy), perivaskulárně a subpialně. Imunohistochemický průkaz exprese neurofilament v reziduálních axonech mezi nádorovými buňkami podporuje průkaz infiltrativního charakteru růstu difúzních gliomů a jejich diferenciální diagnostiku vzhledem ke gliomům s ohraničeným typem růstu. Tato diferenciální diagnostika je komplikovaná zejména v případech, kdy je pro diagnostické účely k dispozici pouze centrum tumoru a posouzení okraje invazivní fronty difúzně rostoucího gliomu není možné [1].

Tab. 1. WHO 2016 klasifikace difúzních gliomů vč. recentních doporučení cIMPACT-NOW.

Difúzní infiltruující astrocytární a oligodendroglální nádory	ICD-O	WHO grade	Diagnostické biomarkery (WHO 2016 definující tučně vyznačeny)
difúzní astrocytom, IDH-mutovaný (mt)	9440/3	II	IDH1/2 mutace , ztráta exprese ATRX
gemistocytární astrocytom, IDH-mutovaný (varianta)	9411/3	II	
<i>difúzní astrocytom, IDH-wildtype (wt)*</i>	9400/3	(II)**	mutace promotoru <i>TERT</i> , amplifikace <i>EGFR</i> , +7/-10
difúzní astrocytom, NOS	9400/3	II	-
anaplastický astrocytom, IDH-mutovaný	9401/3	III	IDH1/2 mutace , ztráta exprese ATRX
<i>anaplastický astrocytom, IDH-wildtype*</i>	9401/3	(III)**	mutace promotoru <i>TERT</i> , amplifikace <i>EGFR</i> , +7/-10
anaplastický astrocytom, NOS	9401/3	III	-
glioblastom, IDH-wildtype	9440/3	IV	
obrovskobuněčný glioblastom (varianta)	9441/3	IV	mutace promotoru <i>TERT</i> , amplifikace <i>EGFR</i> , +7/-10, mutace H3-G34
gliosarkom (varianta)	9442/3	IV	
<i>epiteloidní glioblastom (provizorní varianta)*</i>	9440/3	IV	
glioblastom, IDH-mutovaný (sekundární glioblastom)	9445/3	IV	IDH1/2 mutace , ztráta exprese ATRX
glioblastom, NOS	9440/3	IV	-
difúzní středočarový gliom, H3 K27M-mutovaný	9385/3	IV	mutace H3-K27M
oligodendrogliom, IDH-mutovaný, s kodelecí 1p/19q	9450/3	II	IDH1/2 mutace, kodelece 1p/19q , mutace promotoru <i>TERT</i>
oligodendrogliom, NOS	9450/3	II	-
anaplastický oligodendrogliom, IDH-mutovaný, s kodelecí 1p/19q	9451/3	III	IDH1/2 mutace, kodelece 1p/19q , mutace promotoru <i>TERT</i>
anaplastický oligodendrogliom, NOS	9451/3	III	-
<i>oligoastrocytom, NOS*</i>	9382/3	II	-
<i>anaplastický oligoastrocytom, NOS*</i>	9382/3	III	-

*provizorní jednotka ve WHO 2016 klasifikaci nádorů CNS

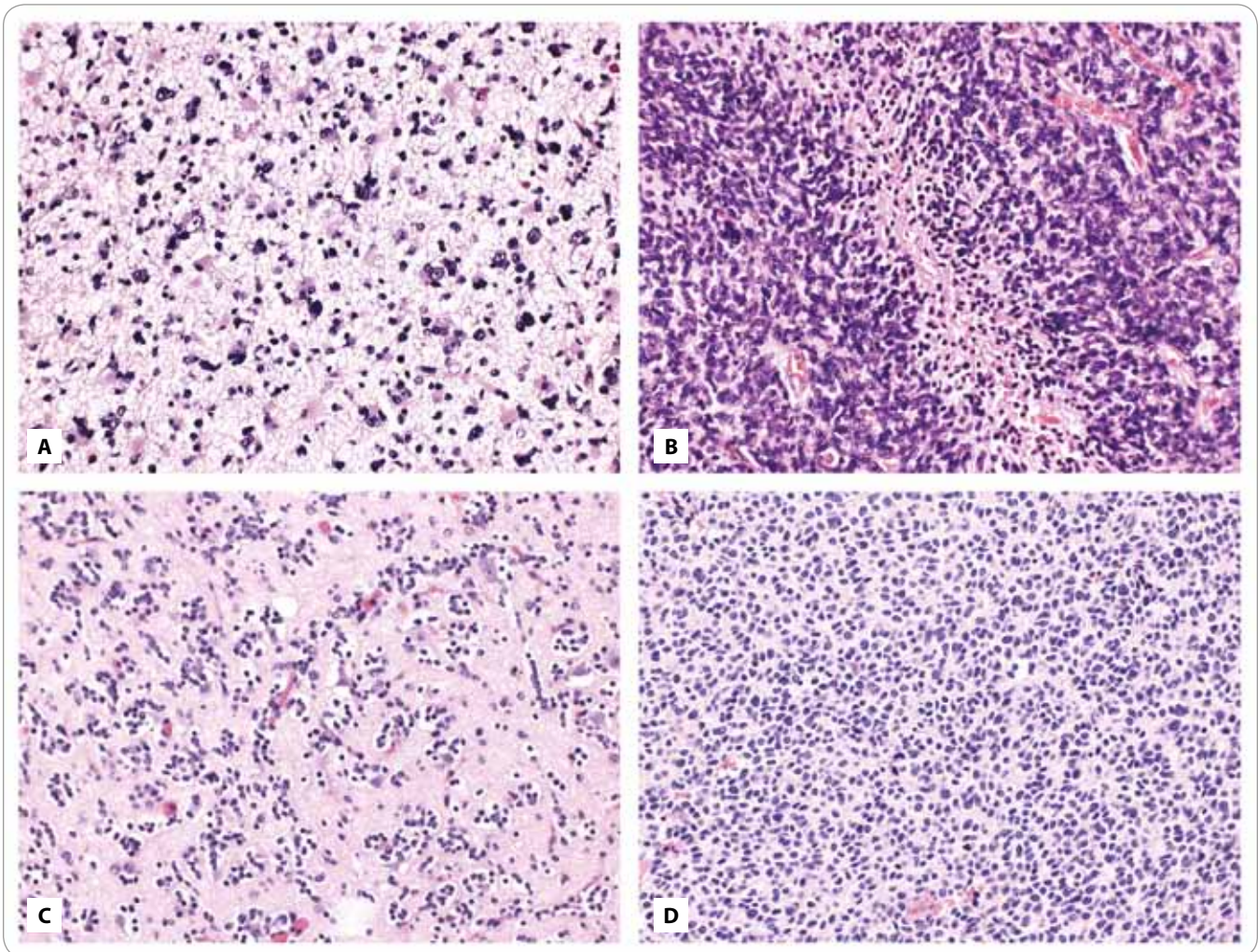
**dle doporučení cIMPACT-NOW difúzní a anaplastické astrocytomy, IDHwt, ve kterých byly identifikována amplifikace EGFR a/nebo kompletní ztráta chromozomu 10 v kombinaci se ziskem chromozomu 7 (-10/+7) a/nebo mutace v promotorové oblasti genu *TERT*, klasifikovat jako difúzní astrocytární gliomy, IDHwt, s molekulárními znaky glioblastomu, WHO grade IV

cIMPACT-NOW – mezinárodní konsorcium neuropatologů a neuroonkologů The Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy – not official WHO, ICD-O – mezinárodní klasifikace onemocnění pro onkologii, NOS – Not Otherwise Specified

Difúzní gliomy morfologicky vykazují známky astrocytární (fibrilární či méně často gemistocytární) nebo oligodendroglální diferenciace. Konvenční známky fibrilární astrocytární diferenciace nádorových buněk zahrnují přítomnost buněk s nenápadnou cytoplazmou, s protáhlými hyperchromními jádry, s jadernými atypiami a nepravidelnostmi jaderných kontur. Gemistocytárně diferencované buňky se vyzna-

čují objemnou eosinofilní cytoplazmou a krátkými větvíci se výběžky. Oligodendroglálně diferencované buňky jsou charakterizovány přítomností uniformních kulatých či oválných jader, ostrými jadernými hranicemi, jemně zrnitým chromatinem a perinukleárním projasněním cytoplazmy, s charakteristickou sítí jemných větvíci se kapilár na pozadí (obr. 1) [4,5]. U části difúzních gliomů lze morfologicky prokázat pří-

tomnost směsné populace nádorových buněk, oligo- a astrocytárně diferencovaných, či přechodných buněčných typů. Současná klasifikace nádorů CNS WHO 2016 jednotku oligoastrocytomu prakticky eliminovala, difúzní a anaplastický oligoastrocytom představují pouze provizorní jednotky, které jsou ve většině případů po provedení molekulárních testů a integrované diagnostiky re-klasifikovány jako astrocytomy (IDH-



Obr. 1. Typická morfologie infiltrujících gliomů.

A) Difúzní astrocytom, středně celulární nádorová proliferace tvořena atypickými fibrilárními astrocyty.

B) Glioblastom, hypercelulární tumor s palisádující nekrózou.

C) Oligodendrogliom, středně celulární proliferace oválných buněk s perinukleárním projasněním v síti bohatě větvených kapilár.

D) Anaplastický oligodendrogliom, hypercelulární proliferace s brskní mitotickou aktivitou.

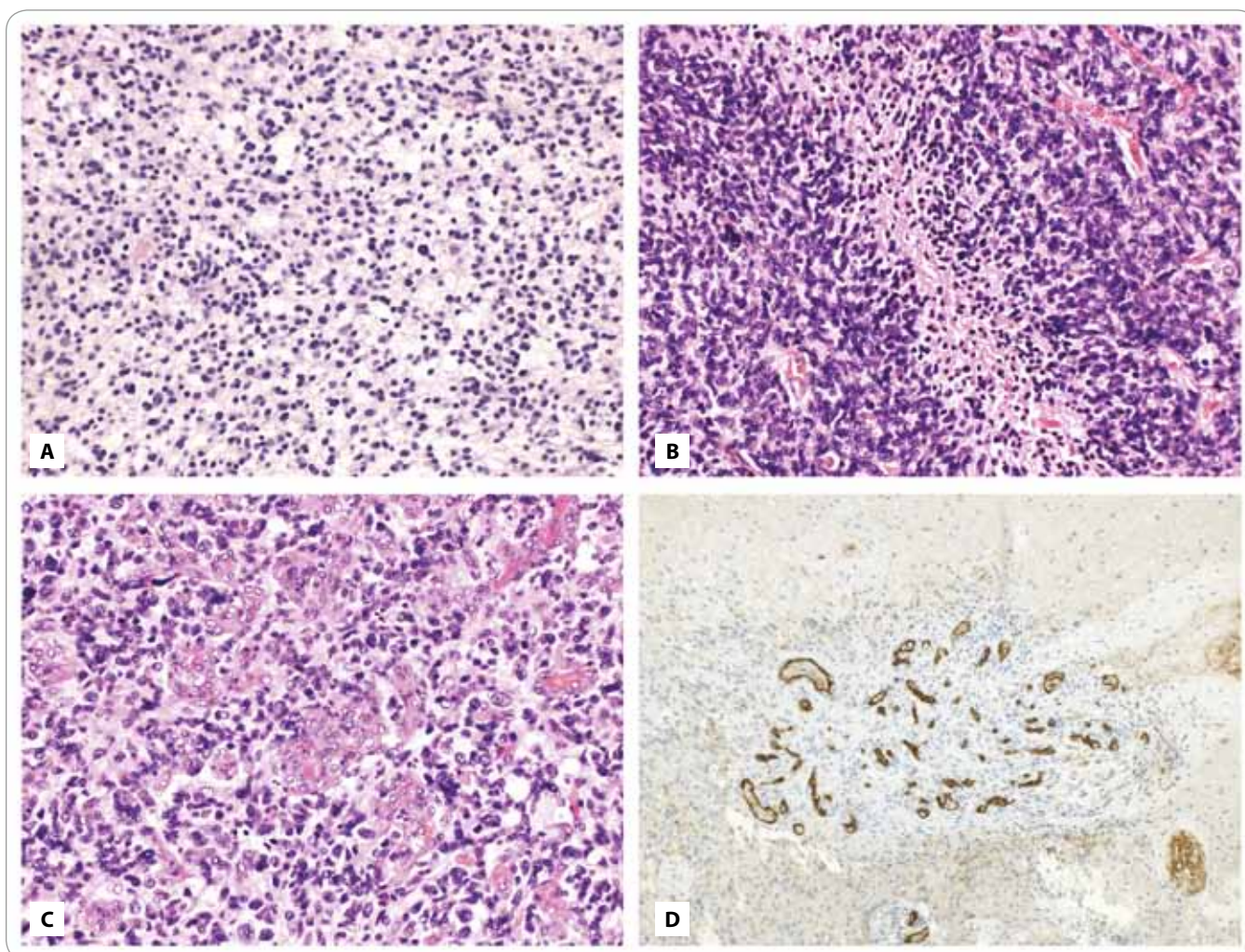
A–D) Hematoxylin-eozin, původní zvětšení 200×

-mutované nebo IDH-wildtype) či oligodendrogliomy (IDH-mutované, s kódelecí 1p/19q) příslušných gradů. Pouze v případě, že molekulární testy nemohou být provedeny či jejich výsledky jsou nekonkluzivní, je oprávněná diagnóza oligoastrocytomu resp. anaplastického oligoastrocytomu, NOS (Not Otherwise Specified) resp. NEC (Not Elsewhere Specified). Zcela raritně byly popsány případy difúzních gliomů s distinktními komponentami astrocytární a oligodendroglíální, morfologicky i molekulárně geneticky, které však v současném klasifikačním schématu nepředstavují samostatné definované jednotky [6].

Glioblastomy mohou vykazovat i morfologii sarkomatoidní, epiteloidní či obrovskobuněčnou, reflektovanou v platné WHO klasifikaci přítomností variantních jednotek této jednotky (tab. 1). Gliomatosis cerebri nepředstavuje v klasifikaci WHO 2016 distinktní jednotku, reprezentuje infiltrativní charakter růstu difúzních astrocytárních a oligodendroglíálních tumorů. Zrušení této jednotky je však kontroverzní [1].

Grading difúzních gliomů je v rámci WHO 2016 klasifikace nádorů CNS stále založen na histopatologickém morfologickém vyšetření, vychází z hodnocení celularity, přítomnost cytonukleárních

ních atypií (jaderné i buněčné variability, tvarové i velikostní, hyperchromazie jader), známek anaplazie (ztráty diferenciacie), signifikantní mitotické aktivity a přítomnosti mikrovaskulárních proliferátů a nekrotizace. WHO G II difúzních astrocytomů je definován přítomností jaderných atypií, WHO G III anaplastické astrocytomy jsou charakterizovány zvýšenou mitotickou aktivitou, obvykle provázenou i výraznějšími cytonukleárními atypiami a hypercelularitou, definujícím znakem WHO G IV glioblastomů je pak přítomnost mikrovaskulárních proliferátů a/nebo nekrotizace, geografických či často palisádujících. Konvenční oli-



Obr. 2. Grading.

A) Cytonukleární atypie a briskní mitotická aktivita u anaplastického astrocytomu.

B) Palisádující nekróza zachycena v glioblastomu.

C+D) Glomeruloidní vaskulární proliferát zastížen u glioblastomu.

D) Imunohistochemické vyšetření exprese CD31.

A–C) Hematoxylin-eozin, původní zvětšení 200×, D) Původní zvětšení 100×

godendrogliomy představují WHO G II difúzní gliomy, přičemž hypercelularita, přítomnost jaderných atypií, nekrotizace, mikrovaskulárních proliferátů a briskní mitotické aktivity podmiňuje diagnózu WHO G III anaplastického oligodendrogliomu (obr. 2) [1].

Výjimku z tohoto schématu představuje difúzní středočarový gliom, H3-K27-mutovaný, který je vzhledem ke své nepříznivé prognóze vždy klasifikován jako WHO G IV, bez ohledu na morfologicky stanovený grade. Obdobně by dle recentních doporučení mezinárodního konsorcia CIMPACT-NOW měly být klasifikovány gradem IV také difúzní astrocy-

tární gliomy, IDH-wildtype, s molekulárními znaky glioblastomu [7].

IDH mutační analýza a diferenciální diagnostika IDH-mutovaných difúzních gliomů

Součástí standardního diagnostického postupu je v rámci integrované diagnostiky stanovení mutačního statutu IDH (schéma 1). Mutace R132 genu *IDH1* nebo R172 genu *IDH2* byly prokázány v 80–90 % adultních WHO G II a GIII difúzních astrocytomů, oligodendrogliomů a sekundárních glioblastomů. Izocitrátdehydrogenáza představuje

enzym, který je zodpovědný za konverzi izocitrátu na α -ketoglutarát v citrátovém cyklu. Mutovaná forma IDH navíc získává schopnost katalyzovat redukci α -ketoglutarátu na D-2-hydroxyglutarát, onkometabolit, který interferuje s celou řadou buněčných procesů a nepřímo inhibuje transkripci důležitých tumor supresorových genů a přispívá ke vzniku IDH-mutovaného difúzního gliomu [8]. Mutace R132H genu *IDH1* vznikající substitucí c.395G>A a vedoucí k záměně argininu za histidin v polypeptidovém řetězci (mutace měnící smysl; missense mutation) představuje nejčastější mutaci a je detekovatelná imunohistochemicky vy-

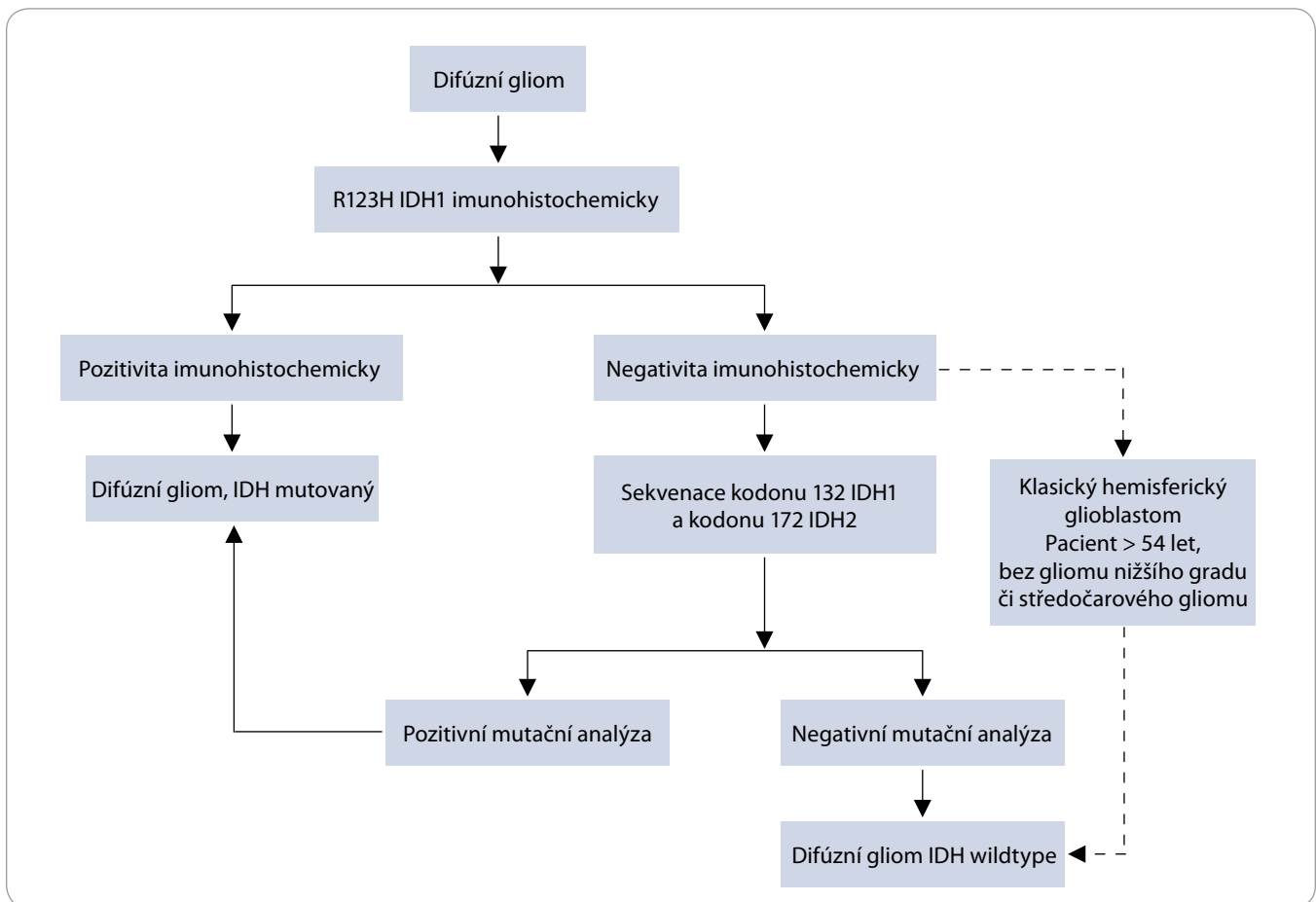


Schéma 1. Algoritmus pro vyšetření genů IDH. IDH – izocitrátdehydrogenáza

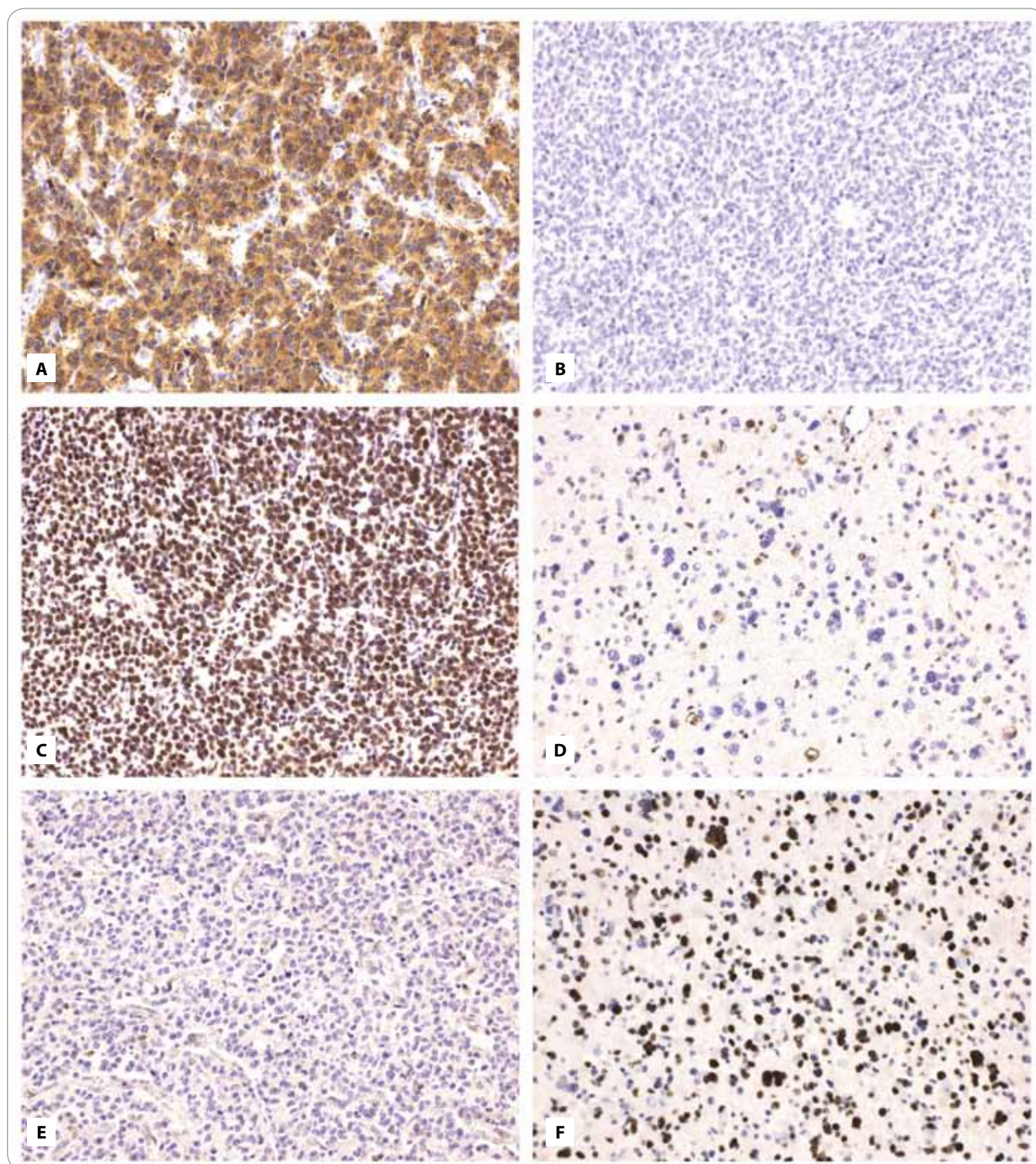
soce senzitivní a specifickou protilátkou proti takto mutovanému proteinu. Imunohistochemicky prokázaná pozitivita IDH1–R132H (obr. 3A) potvrzuje diagnózu IDH-mutovaného difúzního gliomu. U imunohistochemicky IDH1–R132H negativních nádorů (obr. 3B) je za účelem identifikace vzácnějších mutací *IDH* genů indikována sekvenace kodonu 132 genu *IDH1* a kodonu 172 genu *IDH2* [9]. Sekvenace genů *IDH* není v případě negativity imunohistochemického vyšetření indikována u pacientů starších 54 let, s histologicky klasickým glioblastomem v nestředočarové lokalizaci, bez gliomu nižšího gradu či gliomu ve středočarové lokalizaci v anamnéze. V těchto případech je pravděpodobnost výskytu mutace *IDH* zanedbatelná a pro průkaz statu IDH-wildtype je dostačující negativní imunohistochemické vyšetření exprese IDH1-R132H [10].

Integrovaná diagnostika difúzních gliomů definuje oligodendrogliomy

jako nádory IDH mutované, s kódelecí 1p/19q. Vyšetření kódelecí 1p/19q tedy stratifikuje IDH-mutované astrocytomy a IDH-mutované oligodendrogliomy s kódelecí 1p/19q. Genotyp je v rámci integrované diagnostiky nadřazen fenotypu difúzního gliomu. IDH-mutovaný difúzně rostoucí gliom je klasifikován jako oligodendrogliom i v případě astrocytární morfologie, pokud je prokázána kódelec 1p/19q. Pro diagnózu oligodendrogliomu je rozhodující pouze kompletní ztráta obou chromozomálních ramének asociována se signifikantně delším přežíváním pacientů. Inkompletní chromozomální ztráty v předmětných lokalizacích nejsou pro diagnózu oligodendrogliomu určující, a naopak jsou často identifikovány v astrocytárních tumorech [11]. Pro detekci delecí 1p/19q je v praxi nejčastěji využívána fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), která se však vyznačuje rizikem falešně pozitivního výsledku prů-

kazu kódelecí 1p/19q vzhledem k tomu, že nejčastěji využívané a komerčně dostupné proby se vází na distální konce ramének chromozomů 1 a 19, s čímž je spojeno riziko průkazu pouze fokální delecí. Doporučené postupy molekulárního testování kódelecí 1p/19q tedy zahrnují metodiky umožňující identifikaci kompletních ztrát chromozomálních ramének (např. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), array CGH (comparative genomic hybridization) nebo analýza variability počtu kopií vybraných sekvencí (copy number variation; CNV) pomocí NGS). Možné a v budoucnu žádoucí je využití FISH s komerčně dostupnými probami detekujícími proximálnější úseky sledovaných chromozomálních ramének.

V IDH-mutovaných astrocytomech je častá alterace genu *ATRX* (a-thalassemia mental retardation syndrom X-linked), obvykle provázená i mutacemi v tumor supresorového genu *TP53*. *ATRX*



Obr. 3. Imunohistochemické vyšetření exprese IDH1-R132H, ATRX a p53.

A) Pozitivní reakce prokazující mutaci R132H genu *IDH1*.

B) Negativní reakce vylučující mutaci R132H genu *IDH1*.

C) Wildtype nukleární exprese ATRX.

D) Ztráta nukleární exprese ATRX v jádrech nádorových buněk při zachované nukleární expresi v nenádorových buňkách – průkaz mutace genu *ATRX*.

E) Wildtype nukleární exprese p53.

F) Akumulace mutovaného proteinu p53 intranukleárně.

A–F) Původní zvětšení 200×

představuje protein hrající roli v zachování chromatinové struktury telomer. Inaktivační mutace *ATRX* je asociovaná s procesem alternativního prodlužování telomer, esenciálního procesu poskytující nádorové buňce schopnost se nekonečně množit [12]. Jaderná exprese *ATRX* je rutinně vyšetřována imunohistochemicky, mutace *ATRX* jsou obvykle asociovaný se ztrátou jaderné exprese *ATRX* (obr. 3C, D). Hodnocení imunohistochemických vyšetření exprese *ATRX* vyžaduje velkou pozornost, je citlivé na postupy v preanalytické fázi (např. fixaci) a pro průkaz ztráty jaderné exprese *ATRX* v nádorových buňkách indikující přítomnost mutovaného *ATRX* je nutná přítomnost interní pozitivní kontroly – průkazná exprese *ATRX* v buňkách nenádorového pozadí, endoteliálních, zánětlivých, atd. v hodnoceném úseku.

Interpretace výsledků imunohistochemického vyšetření exprese p53 vyžaduje rovněž velkou pozornost. Většina mutací *TP53* jsou tzv. „missense“ mutace, v důsledku kterých dochází k jaderné akumulaci proteinu. Imunohistochemické vyšetření není senzitivní ani specifické pro průkaz mutací *TP53* a musí být inter-

pretováno v kontextu s morfológií a dalšími imunohistochemickými a molekulárně genetickými nálezy. Pouze případy vykazující extenzivní a silnou jadernou pozitivitu p53 ve více než 10 % gliálních buněk mohou být s velkou pravděpodobností interpretovány jako p53 pozitivní/*TP53* mutované a současně absence jaderné positivity p53 nevylučuje mutovaný *TP53* (např. v důsledku delece *TP53*) (obr. 3E, F) [13].

Doporučení cIMPACT-NOW konsorcia umožňuje integrovanou diagnózu IDH-mutovaného astrocytomy pro případ difúzních gliomů histologicky s astrocytární morfológií, s imunohistochemicky prokázanou ztrátou jaderné exprese *ATRX* a/nebo silnou difúzní imunopozitivou p53 bez nutnosti dalšího testování na přítomnost kodelecí 1p/19q. Genotyp difúzního gliomu *IDH/ATRX* a/nebo *TP53* mutovaný je tedy konzistentní s diagnózu astrocytomy [7].

V diagnostickém algoritmu je nutné vzít v úvahu i skutečnost, že ne všechny mutace *ATRX* jsou asociovaný se ztrátou jaderné exprese *ATRX* a přítomnost jaderné exprese *ATRX* v IDH-mutovaném nádoru nevylučuje diagnózu astrocytomy. U IDH-mutovaných difúzních gliomů se zachovalou jadernou expresí *ATRX* a bez signifikantní imunopozitivity p53 je tedy indikováno vyšetření kodelecí 1p/19q pro vyloučení diagnózy oligodendrogliomu i v případech, kdy morfologický histopatologický nálezn není pro oligodendrogliom typický (schéma 2).

Telomerázová reverzní transkriptáza (*TERT*) představuje funkční jednotku enzymu telomerázy, která se uplatňuje v procesu zachování délky telomer při buněčném dělení, zamezující jejich zkracování. Mutace v promotorové oblasti genu *TERT* byly prokázány i v difúzních gliomech, v oligodendrogliomech a primárních glioblastomech. Mutace promotoru *TERT* se téměř nevyskytují v IDH-mutovaných astrocytomech, kde se preferenčně uplatňuje v procesu zachování délky telomer mutovaný *ATRX*, obvykle provázený i mutacemi *TP53*. Sekvence promotorové oblasti genu *TERT* představuje účinný nástroj pro detekci této alterace, imunohistochemický průkaz *TERT* nekoreluje s mutačním státem *TERT*. Amplifikace *TERT* či rearanže promotoru *TERT* představují alternativní mechanismy zachování délky telomer [12].

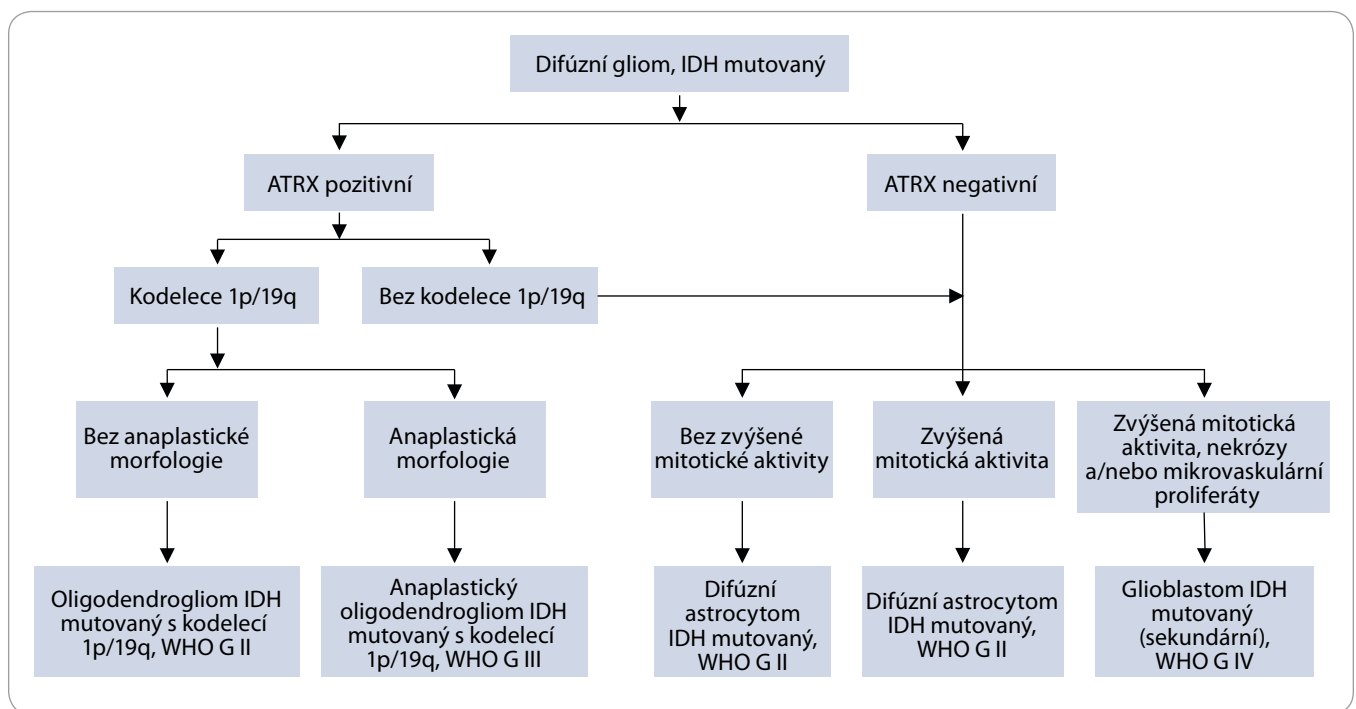


Schéma 2. Diagnostický algoritmus IDH-mutovaných difúzních gliomů. IDH – izocitrátdehydrogenáza

IDH-wildtype difúzní gliomy

Většina difúzně/infiltrativně rostoucích gliomů bez mutace v genech *IDH1/2* vykazuje morfologické charakteristiky glioblastomu a je takto klasifikována (glioblastom, IDH-wildtype, WHO G IV). Ztráta jaderné exprese *ATRX* v IDH-wildtype difúzních gliomech obvykle není vyjádřena.

IDH-wildtype difúzní astrocytomy (WHO G II) a anaplastické astrocytomy (WHO G III) představují v platné WHO 2016 klasifikaci nádorů CNS provizorní jednotky a zahrnují v sobě nádory s rozdílným biologickým chováním a prognózou [1].

U dospělých se IDH-wildtype difúzní a anaplastické astrocytomy vyskytují poměrně často, zejména ve vyšších věkových skupinách. Ve srovnání s hlavními onkologickými diagnózami jako jsou nádory prsu, plic nebo prostaty se však jedná o onemocnění vzácná. Přes absenci morfologických znaků WHO grade IV glioblastomu často vykazují molekulárně-patologické alterace typické pro IDH-wildtype glioblastomy, vyznačují se nepříznivou prognózou a predisponují k obdobnému biologickému chování jako primární glioblastom, přestože morfologicky nesplňují kritéria pro zařazení do WHO grade IV kategorie. cIMPACT-NOW konsorcium tedy doporučuje u wildtype difúzních a anaplastických astrocytomů vyšetření genetických alterací typických pro glioblastom a v případě prokázané amplifikace genu pro receptor epidermálního růstového faktoru (*EGFR*) na 7. chromozomu a/nebo mutace v promotoru *TERT* a/nebo kompletní ztráty chromozomu 10 v kombinaci se získáním chromozomu 7 (-10/+7), klasifikovat tyto nádory jako difúzní astrocytární gliomy, IDH-wildtype, s molekulárními znaky glioblastomu, WHO grade IV (schéma 3). Amplifikaci genu *EGFR* s následnou overexpresí *EGFR* receptorů vykazuje 40–50 % IDH-wildtype glioblastomů. U asi poloviny *EGFR* amplifikovaných primárních glioblastomů lze prokázat přítomnost intragenové delecce exonů 2–7 produkující trvale aktivní variantu *EGFR*, tzv. *EGFRvIII*. Přítomnost této delecční varianty *EGFR* lze prokázat imunohistochemicky, standardní průkaz amplifikace *EGFR* je metodou FISH [14].

Až 40 % IDH-wildtype glioblastomů vykazuje hypermetylaci promotoru genu *MGMT* (O-6-metylguanin-DNA metyltransferáza), což je asociováno s lepší odpovědí na terapii alkylačními agens vč. temozolomidu, nejčastěji používaného cytostatika v neuroonkologii. Vyšetření metylace promotoru *MGMT* u IDH-wildtype high grade gliomů tedy přináší důležité informace prediktivního charakteru, průkaz hypermetylace promotoru *MGMT* může identifikovat pacienty profitující z terapie alkylačními agens a ovlivnit klinický a terapeutický management pacienta [15]. Příkladem je léčba pacientů s glioblastomem, kteří jsou starší 70 let. Na základě výsledků německé studie NOA-08 a skandinávské studie Nordic trial byl stanoven nový léčebný postup, založený na testování metylace *MGMT* promotoru [16,17]. Obě dvě studie prospektivně srovnávaly samotnou pooperační radioterapii se samotnou pooperační chemoterapií temozolomidem. Na základě jejich výsledků je možné u této kohorty pacientů v případě prokázané metylace promotoru *MGMT* indikovat samotnou chemoterapii (podávanou v domácím prostředí, ve formě tablet) a tohoto staršího vulnerabilního pacienta nevystavovat náročnému ozařování, které je pro tyto pacienty často organizačně komplikované (každodenní cestování na pracoviště radiční onkologie). Vyšetření metylačního stavu promotoru pro *MGMT* se provádí nejčastěji metylačně specifickou PCR, MS-MLPA (methylation-specific multiplex ligation probe amplification) nebo analýzou teplot tání s vysokým rozlišením (high resolution melting analysis – HRM) po bisulfitové konverzi nemetylovaných cytosinů na uracil. Posledně zmiňovaná metoda je sice na zpracování více náročná, avšak oproti dvěma předchozím snižuje riziko falešně pozitivních výsledků [18].

Další terapeutické konsekvence výše diskutovaných biomarkerů přesahují rámec textu, proto odkazujeme čtenáře na práce zabývající se touto topikou [19–23].

Difúzní astrocytomy pediatrického typu

Přestože jsou pediatrické difúzní astrocytomy od svých adultních protějšků

morfologicky nerozlišitelné, liší se jak geneticky, tak prognosticky. Na rozdíl od adultních jsou pediatrické difúzní astrocytomy pouze vzácně nositeli mutace genů *IDH*, *ATRX*, *TP53* a zároveň se vyznačují výrazně nižším rizikem progresu do high grade gliomů, což je spojené s lepší prognózou. V pediatrických difúzních gliomech (IDH-wildtype a H3-wildtype) jsou časté alterace v genech *BRAF*, *FGFR1*, *MYB* či *MYBL1*, resp. jiné alterace MAPK signální dráhy.

Dle doporučení cIMPACT konsorcia [24] byla navržena klasifikace pediatrických difúzních astrocytomů, IDH-wildtype/H3-wildtype, WHO G II histologického gradu následovně:

- Difúzní gliom, MYB-alterovaný
- Difúzní gliom, MYBL-alterovaný
- Difúzní gliom, FGFR1 TKD duplikovaný
- Difúzní gliom, FGFR1-mutovaný
- Difúzní gliom, BRAF-mutovaný (bez delecce *CDKN2A/B*)
- Difúzní gliom, s jinými alteracemi MAPK signální dráhy

Pediatrické difúzní astrocytomy s IDH mutací se chovají obdobně jako adultní a vyskytují se výhradně u dětí starších 14 let [25].

Samostatnou, v rámci integrované diagnostiky definovanou, jednotku představuje dále blíže specifikovaný prognosticky nepříznivý difúzní středocharový gliom, H3-K27-mutovaný.

U adolescentů a mladých dospělých byly rovněž popsány difúzní gliomy postihující mozkové hemisféry, IDH-wildtype, s mutacemi v genu *H3F3A* v pozici G34 (H3 G34 mutované) a ve většině případů s prokázanou ztrátou jaderné exprese *ATRX* a/nebo signifikantní imunopozitivitou p53. Vyznačují se high grade biologickým chováním, s pouze mírně příznivější prognózou ve srovnání s ostatními subtype IDH-wildtype glioblastomů [25]. Hypermetylace promotoru *MGMT* byla popsána u většiny H3 G34-mutovaných nádorů, což pravděpodobně přispívá k lepší prognóze těchto nádorů. H3 G34-mutované nádory v současné integrované diagnostice nepředstavují definovanou jednotku, je doporučováno zařazení do kategorie „NEC“ (Not Elsewhere Classified) a popisná diagnóza zahrnující

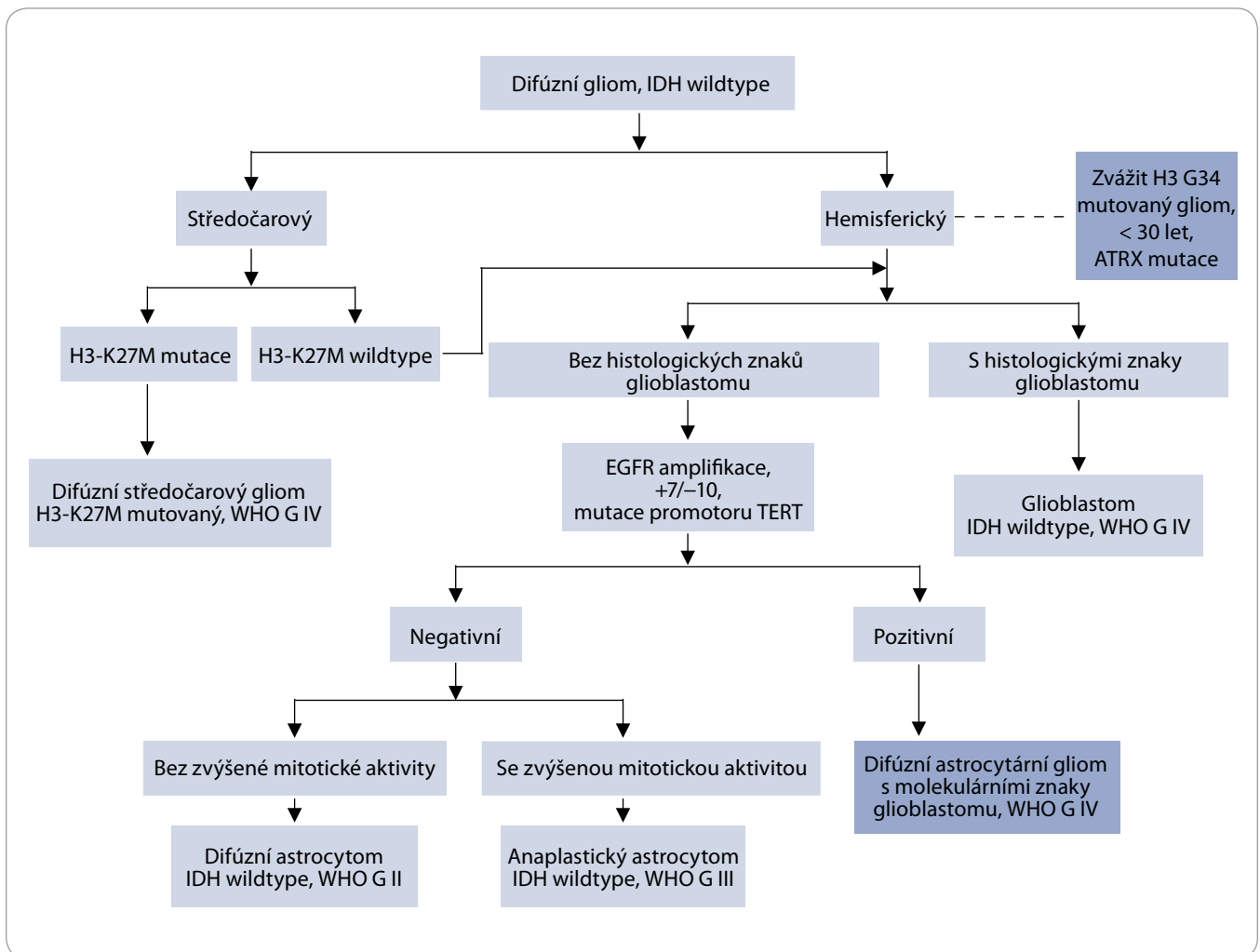


Schéma 3. Diagnostický algoritmus IDH-wildtype difúzních gliomů.

Tmavě modře podbarvené jednotky jsou součástí doporučení CIMPACT-NOW a nejsou specifikovány v platné WHO klasifikaci nádorů centrálního nervového systému 2016.

CIMPACT-NOW – mezinárodní konsorcium neuropatologů a klinických neuroonkologů, IDH – izocitrátdehydrogenáza

morfologii, grading a molekulární profil nádoru [26].

Difúzní středočarový gliom, H3-K27-mutovaný

Je definován jako infiltrující středočarový high grade gliom s dominující astrocytární diferenciací a mutací K27M v genech pro histon 3 (*H3F3A* nebo *HIST1H3B/C*). Vyskytuje se častěji v dětském věku, může však postihovat i dospělé. Typicky postihuje středočarové struktury, tj. mozkový kmen, thalamus nebo míchu, postižení mozečku je vzácné. Difúzní středočarové gliomy, H3 K27M-mutované se vyznačují nepříznivou prognózou a jsou klasifikovány jako WHO G IV gliomy bez ohledu na mor-

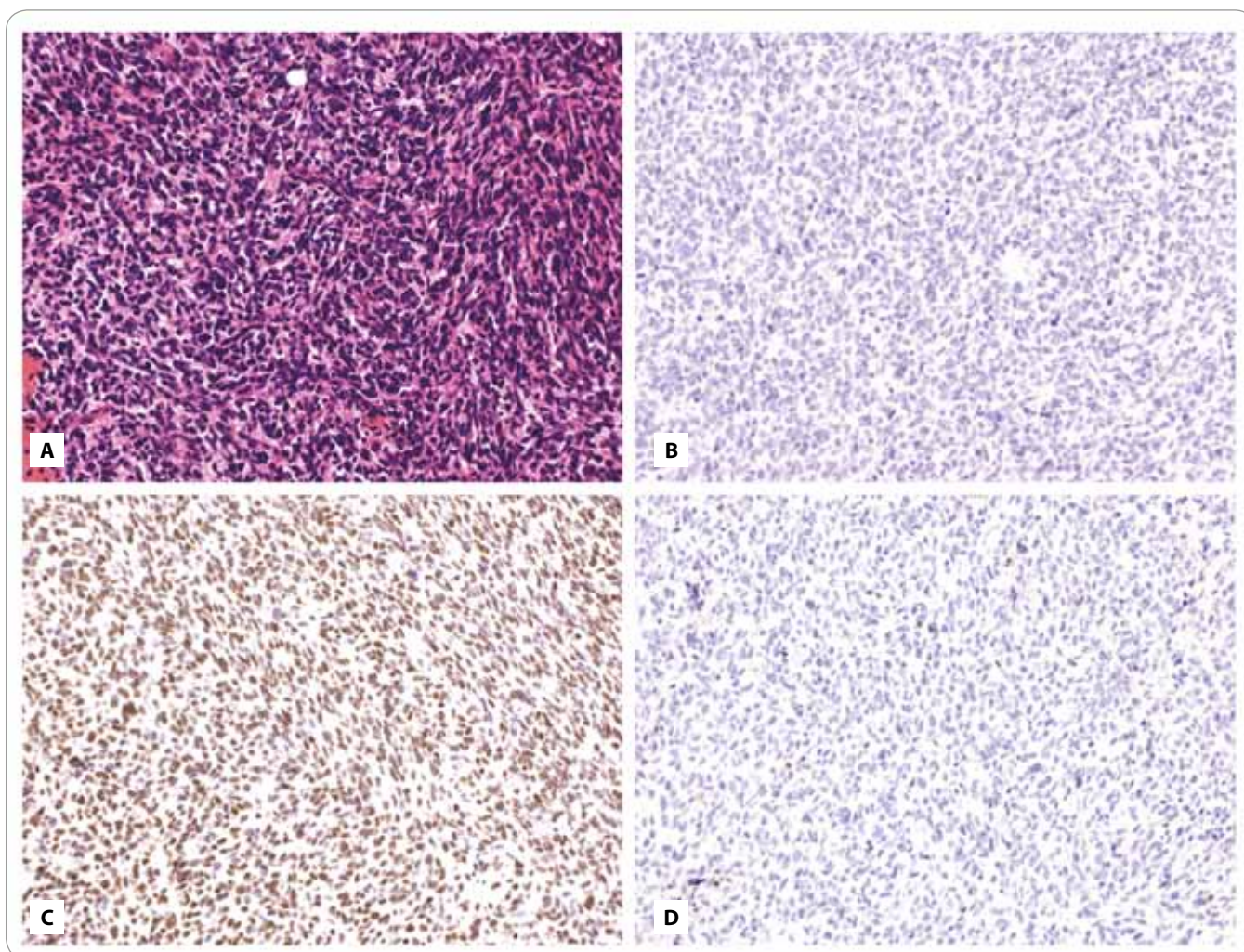
fologicky stanovený histopatologický grade (obr. 4) [7,26].

V diagnostice je využíván imunohistochemický průkaz mutace při použití mutačně-specifické a vysoce senzitivní protilátky proti K27M-mutovanému histonu 3 s průkaznou jadernou pozitivitou v K27M-mutovaných nádorech. V případě nejednoznačného výsledku imunohistochemického vyšetření předmětné mutace je pro průkaz mutace H3 K27M indikována sekvenace genu *H3F3A*, případně genů *HIST1H3B* nebo *HIST1H3C*, které jsou mutovány méně často [28].

Klasifikace nádorů CNS WHO 2016 nesprávně uvádí, že mutace H3 K27M se vyskytují výhradně v difúzních středo-

čarových gliomech, recentně však byly tyto mutace prokázány i v jiných typech mozkových nádorů, např. v ependymomu, gangliogliomu, pilocytárním astrocytomu či pediatrických difúzních astrocytomech. Klinický prognostický význam mutací v genech pro histon 3 není v těchto typech nádorů na rozdíl od difúzního středočarového gliomu H3 K27M-mutovaného znám [7,29,30].

Vzhledem k výše uvedeným recentním zjištěním je v souladu s doporučením CIMPACT-NOW diagnóza difúzního středočarového gliomu H3K27M-mutovaného vyhrazena pouze pro nádory ve středočarové lokalizaci, s difúzním infiltrativním typem růstu a mutacemi H3K27M a nelze ji aplikovat na jiné ná-



Obr. 4. Difúzní střeďočarový gliom, WHO G IV, H3-K27 mutovaný.

- A) Hypercelulární proliferace atypických gliálních buněk s brzkou mitotickou aktivitou.
 B) Imunohistochemické vyšetření IDH1-R132H s negativní reakcí vylučující mutaci R132 v genu *IDH1*.
 C) Imunohistochemické vyšetření ATRX s wildtype nukleární expresí ATRX.
 D) Imunohistochemické vyšetření p53 s wildtype nukleární expresí p53.
 A) Hematoxylin-eozin, A–D) původní zvětšení 200×.

dory, u nichž tato mutace byla rovněž identifikována [7].

Aplikace termínů „NOS“ a „NEC“ v integrované diagnostice difúzních gliomů

Klasifikace nádorů CNS WHO 2016 aplikuje diagnostické označení nádorové jednotky jako „NOS (Not Otherwise Specified)“ pro případy, kdy nebylo provedeno příslušné molekulárně genetické vyšetření umožňující zařazení jednotky do příslušné kategorie integrované diagnózy, i pro případy, kdy toto vyšetření provedeno bylo, získané výsledky však nebyly konkluzivní, diagnostické gene-

tické alterace nebyly prokázány a neumožnily zařazení do definované kategorie integrované diagnostiky [1].

Dle doporučení cIMPACT-NOW by označení „NOS“ mělo být vyhrazeno pouze pro případy, kdy diagnostické informace (morfologické či molekulární) nutné pro zařazení do příslušné definované kategorie integrované diagnostiky nejsou dostupné, a nově představuje kategorii „NEC (Not Elsewhere Classified)“ vyhrazenou pro nádory, u nichž komplexní histologické, imunohistochemické i genetické vyšetření bylo v souladu s guidelines provedeno, ale získané výsledky neumožňují přesné zařazení

do akceptované a definované jednotky dle platné klasifikace nádorů CNS WHO 2016. V těchto případech je nutné využít popisné diagnózy, specifikující morfolologii, histopatologický grade a prokázaný molekulární profil nádoru [27].

Závěr

Revidovaná WHO klasifikace nádorů CNS 2016 zásadním způsobem restrukturalizuje klasifikaci gliomů a jako první integruje molekulární znaky do diagnostiky difúzních gliomů definovaných nejen na základě konvenčních histopatologických nálezů a imunofenotypu, ale i příslušných molekulárních biomarkerů.

Nutnost podrobnější klasifikace difúzních gliomů vychází zejména ze skutečnosti, že nádory obdobné morfologie v sobě zahrnují heterogenní jednotky, které se významně liší svojí molekulární patogenezi, biologickým chováním, prognózou i odpovědí na terapii. Integrovaná diagnostika tedy nejen zpřesňuje diagnostiku, ale přináší i významné informace prognostického a prediktivního charakteru s využitím v klinickém managementu neuroonkologických pacientů a individualizované léčbě nádorů CNS.

Literatura

- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD et al. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. World Health Organization classification of tumours. Revised 4th edition. Lyon: International Agency for Research on Cancer 2016.
- Louis DN, von Deimling A, Cavenee WK. Diffuse astrocytic and oligodendroglia tumours – introduction. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD et al. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. World Health Organization classification of tumours. Revised 4th edition. Lyon: International Agency for Research on Cancer 2016: 16–17.
- Louis DN, Ellison DW, Brat DJ et al. cIMPACT-NOW: a practical summary of diagnostic points from Round 1 updates. *Brain Pathol* 2019; 29(4): 469–472. doi: 10.1111/bpa.12732.
- Perry A, Wesseling P. Histologic classification of gliomas. In: Berger MS, Weller M. Handbook of clinical neurology. Vol 134: Gliomas. Cambridge: Elsevier 2016: 71–95. doi: 10.1016/B978-0-12-802997-8.00005-0.
- Wesseling P, Capper D. WHO 2016 Classification of gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2018; 44(2): 139–150. doi: 10.1111/nan.12432.
- Barresi V, Lionti S, Valori L et al. Dual-genotype diffuse low-grade glioma: is it really time to abandon oligoastrocytoma as a distinct entity? *J Neurobiol Exp Neurol* 2017; 76(5): 342–346. doi: 10.1093/jnen/nlx024.
- Louis DN, Giannini C, Capper D 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(3): 481–484. doi: 10.1007/s00401-018-1826-y.
- Dang L, White DW, Gross S et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 2009; 462(7274): 739–744. doi: 10.1038/nature08617.
- Gondim DD, Curless KL, Cheng L et al. Determining IDH-mutational status in gliomas using IDH1-R132H antibody and polymerase chain reaction. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2019; 27(10): 722–725. doi: 10.1097/PAL.0000000000000702.
- Dewitt JC, Frosch MP, Samore WR et al. Cost-effectiveness of IDH testing in diffuse gliomas according to the 2016 WHO classification of tumors of the central nervous system recommendations. *Neuro Oncol* 2017; 19(12): 1640–1650. doi: 10.1093/neuonc/nox120.
- Vogazianou AP, Chan R, Pearson DM et al. Distinct patterns of 1p and 19q alterations identify subtypes of human gliomas that have different prognoses. *Neuro Oncol* 2010; 12(7): 664–678. doi: 10.1093/neuonc/nop075.
- Lee J, Solomon DA, Tihan T. The role of histone modifications and telomere alterations in the pathogenesis of diffuse gliomas in adults and children. *J Neurooncol* 2017; 132(1): 1–11. doi: 10.1007/s11060-016-2349-9.
- Takami H, Yoshida A, Fukushima S et al. Revisiting TP53 mutations and immunohistochemistry—a comparative study in 157 diffuse gliomas. *Brain Pathol* 2015; 25(3): 256–265. doi: 10.1111/bpa.12173.
- Brat DJ, Aldape K, Colman H 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): 805–810. doi: 10.1007/s00401-018-1913-0.
- Hegi ME, Diserens AC, Hamou MF et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352(10): 997–1003. doi: 10.1056/NEJMoa043331.
- Wick W, Platten M, Meisner C et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13(7): 707–715. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70164-X.
- Malmström A, Grønberg BH, Marosi C et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13(9): 916–926. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70265-6.
- Mansouri A, Hachem LD, Nassiri F et al. MGMT promoter methylation status testing to guide therapy for glioblastoma: Refining the approach based on emerging evidence and current challenges. *Neuro Oncol* 2019; 21(2): 167–178. doi: 10.1093/neuonc/nyy132.
- Lakomy R, Kazda T, Poprach A et al. The role of chemotherapy in the treatment of low-grade gliomas. *Klin Onkol* 2017; 30(5): 343–348. doi: 10.14735/amko2017343.
- Kazda T, Lakomy R, Poprach A et al. Controversy in the postoperative treatment of low-grade gliomas. *Klin Onkol* 2017; 30(5): 337–342. doi: 10.14735/amko2017337.
- Kazda T, Dziacky A, Burkon P et al. Radiotherapy of glioblastoma 15 years after the landmark Stupp’s trial: More controversies than standards? *Radiol Oncol* 2018; 52(2): 121–128. doi: 10.2478/raon-2018-0023.
- Weller M, van den Bent M, Tonn JC et al. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Lancet Oncol* 2017; 18(6): e315–e329. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30194-8.
- Berghoff A, van den Bent M. How I treat anaplastic glioma without 1p/19q codeletion. *ESMO Open* 2019; 4(Suppl 2): e000534. doi: 10.1136/esmoopen-2019-000534.
- Ellison DW, Hawkins C, Jones DTW et al. cIMPACT-NOW update 4: diffuse gliomas characterized by MYB, MYBL1, or FGFR1 alterations or BRAF(V600E) mutation. *Acta Neuropathol* 2019; 18(6): 683–687. doi: 10.1007/s00401-019-01987-0.
- Ryall S, Tabori U, Hawkins C. A comprehensive review of paediatric low-grade diffuse glioma: pathology, molecular genetics and treatment. *Brain Tumor Pathol* 2017; 34(2): 51–61. doi: 10.1007/s10014-017-0282-z.
- Sturm D, Witt H, Hovestadt V et al. Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell* 2012; 22(4): 425–437. doi: 10.1016/j.ccr.2012.08.024.
- Louis DN, Wesseling P, Paulus W et al. cIMPACT-NOW update 1: Not otherwise specified (NOS) and not elsewhere classified (NEC). *Acta Neuropathol* 2018; 135(3): 481–484. doi: 10.1007/s00401-018-1808-0.
- Huang T, Garcia R, Qi J et al. Detection of histone H3 K27M mutation and post-translational modifications in pediatric diffuse midline glioma via tissue immunohistochemistry informs diagnosis and clinical outcomes. *Oncotarget* 2018; 9(98): 37112–37124. doi: 10.18632/oncotarget.26430.
- Kleinschmidt-DeMasters BK, Donson A, Foreman NK et al. H3 K27M mutation in gangliogliomas can be associated with poor prognosis. *Brain Pathol* 2017; 27(6): 846–850. doi: 10.1111/bpa.12455.
- Orillac C, Thomas C, Dastagirzada Y et al. Pilocytic astrocytoma and glioneuronal tumor with histone H3 K27M mutation. *Acta Neuropathol Commun* 2016; 4(1): 84. doi: 10.1186/s40478-016-0361-0.