Arvīds Jakovļevs

Difūzo gliomu imūnhistokīmiskā klasifikācija

Promocijas darba kopsavilkums zinātniskā doktora grāda
“zinātnes doktors (*Ph.D.*)” iegūšanai

Nozare – medicīnas bāzes zinātnes, tai skaitā farmācija

Apakšnozare – patoloģija

Rīga, 2021

RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Arvīds Jakovļevs

ORCID 0000-0002-9703-4922

Difūzo gliomu imūnhistoķīmiskā klasifikācija

Promocijas darba kopsavilkums zinātniskā doktora grāda
“zinātnes doktors (*Ph.D.*)” iegūšanai

Nozare – medicīnas bāzes zinātnes, tai skaitā farmācija
Apakšnozare – patoloģija

Rīga, 2021

Promocijas darbs izstrādāts Rīgas Stradiņa universitātē, Latvijā

Promocijas darba vadītāji:

Dr. habil. med. profesors **Jānis Gardovskis,**

Rīgas Stradiņa universitātē, Latvija

Dr. med. profesore **Ilze Štrumfa,**

Rīgas Stradiņa universitātē, Latvija

Oficiālie recenzenti:

Dr. habil. med. profesore **Māra Pilmane,**

Rīgas Stradiņa universitātē, Latvija

Dr. med. profesore **Ave Minajeva,**

Tartu Universitātē, Igaunija

Dr. med. profesors **Arvydas Laurinavicius,**

Viļņas Universitātē, Lietuva

Promocijas darbs tiks aizstāvēts “Medicīnas bāzes zinātnes, tai skaitā farmācija” promocijas padomes atklātā sēdē 2021. gada 10. jūnijā plkst. 12.00, attālināti *Zoom* tiešsaistes platformā

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU tīmekļa vietnē:
<https://www.rsu.lv/promocijas-darbi>

Promocijas padomes sekretāre:

Dr. med. profesore **Juta Kroiča**

Satura rādītājs

Ievads.....	6
1. Materiāli un metodes	11
1.1. Pētījuma uzbūve.....	11
1.2. Pacientu atlase	11
1.3. Audu apstrāde un mikroskopiska izmeklēšana.....	12
1.4. Imūnhistoķīmiskā vizualizācija un izvērtēšana	13
1.5. Statistiska analīze.....	19
2. Rezultāti.....	21
2.1. Pētāmās grupas raksturojums.....	21
2.1.1. GBM raksturojums.....	21
2.1.2. DA raksturojums	22
2.2. Morfoloģiskais raksturojums	23
2.2.1. GBM raksturojums.....	23
2.2.2. DA raksturojums	25
2.3. GBM un DA imūnhistoķīmiskais profils.....	26
2.4. Asociācijas un korelācijas starp klīniskajiem un imūnhistoķīmiskajiem parametriem	33
2.4.1. GBM raksturojums.....	33
2.4.2. DA raksturojums	35
2.5. Asociācijas un korelācijas starp imūnhistoķīmiskajiem parametriem.....	36
2.5.1. GBM raksturojums.....	36
2.5.2. DA raksturojums	37
2.6. Izdzīvotība	39
2.6.1. GBM raksturojums	39
2.6.2. DA raksturojums	40
2.7. Asociācijas starp izdzīvotības laiku un klīniskajiem parametriem	41
2.7.1. GBM raksturojums	41
2.7.2. DA raksturojums	44
2.8. Asociācijas starp izdzīvotības laiku un imūnhistoķīmiskajiem parametriem.....	45
2.8.1. GBM imūnhistoķīmiskie prognostiskie marķieri	45
2.8.2. DA imūnhistoķīmiskie prognostiskie marķieri	48
2.9. Gliomu imūnhistoķīmiskie subtipi un izdzīvotības laiks.....	50

2.9.1. GBM imūnhistoķīmiskie subtipi	50
2.9.2. DA imūnhistoķīmiskie subtipi	54
3. Diskusija	55
3.1. Kopējā izdzīvotība	56
3.2. Klīniskie un morfoloģiskie parametri	57
3.3. Gliomu imūnhistoķīmiskais profils.....	60
3.4. Gliomu subtipi	72
Secinājumi	76
Praktiskās rekomendācijas.....	77
Literatūras saraksts	78

Darbā izmantotie saīsinājumi

Ag	antigēns
CD	<i>cluster</i> of differentiation
TI	ticamības intervāls
CNS	centrālā nervu sistēma
DA	difūza astrocitoma
GBM	glioblastoma
HE	hematoksilīna-eozīna krāsošanas metode
IDH	izocitrātdehidrogenāze
IHK	imūnhistoķīmija
IQR	starpkvartīļu diapazons (<i>interquartile range</i>)
MVB	mikrovaskularizācijas blīvums
NP	nav pielietojams
PDGFRA	trombocītu atbrīvotā augšanas faktora receptors alfa
PVO	Pasaules Veselības organizācija
SD	standarta novirze (<i>standart deviation</i>)
TCGA	<i>Vēža genoma atlase (The Cancer Genome Atlas)</i>
MR	magnētiskās rezonanses izmeklējums

Ievads

Glioblastoma (GBM) ir viens no biežāk sastopamajiem un agresīvākajiem centrālās nervus sistēmas (CNS) audzējiem, kas ir augstākās anaplāzijas pakāpes glioma (4. anaplāzijas pakāpe). Neskatoties uz standartterapiju, kas iekļauj maksimāli iespējamu audzēja rezekciju, kuru papildina ar adjuvantu ķīmijterapiju ar temozolamīdu un radioterapiju, prognoze pacientiem ar GBM ir ļoti slikta – mediānais izdzīvotības laiks ir 12 līdz 15 mēneši (Stupp *et al.*, 2005). Sakarā ar to, ka audzēja šūnas plaši infiltrē apkārtējos galvas smadzeņu audus, pilnīga ķirurģiska rezekcija GBM nav iespējama, un līdz ar to audzēja recidīvs ir neizbēgams (Roy *et al.*, 2015). Ķīmijterapijas un staru terapijas iespējas arī ir ierobežotas izteikto audzēju šūnu rezistences dēļ, kā arī ķīmijterapeitisko līdzekļu molekulām nozīmīgs šķērslis ir hematoencefāliskā barjera.

Jaunu potenciālu imūnhistoķīmisku un molekulāru marķieru atklāšanu un pētīšanu varētu uzlabot zināšanas par kritiskām molekulārām izmaiņām, kas veicina audzēja attīstību, un šādas zināšanas palielina iespēju izveidot efektīvu uz mērķa molekulu vērstu terapiju nākotnē. Jauni molekulāri un imūnhistoķīmiski prognostiski marķieri var uzlabot ārstēšanu un, iespējams, arī radītu iespēju dalīt pacientus vairākās prognostiskās grupās ar atšķirīgu ārstēšanas pieeju, kas padarītu terapiju personalizētāku.

GBM ir atklāts ļoti maznozīmīgu prognostisku marķieru, piemēram, 06-metilguanīn-DNS-metiltransferāzes (MGMT) gēna promotera metilācija un IDH1 gēna mutācijas ir pašlaik vienīgie labi zināmie, klīniski nozīmīgie prognostiskie un predikatīvie molekulārie faktori (Kaminska *et al.*, 2019; Kim and Liao, 2012). Visbiežāk sastopamā IDH1 gēna mutācija – IDH1 R132H – ir viegli nosakāma arī ar imūnhistoķīmijas metodi (IHĶ) pret gēna mutācijas ekspresijas produktu – mutantu IDH1 R132H proteīnu (Thota *et al.*, 2012).

Proteīni, kuru ekspresija ir saistīta ar audzēja pamatīpašībām (proliferāciju, invāziju, šūnas cikla regulāciju) varētu tikt izmantoti kā potenciālie audzēja prognostiskie vai predikatīvie marķieri. Šādi proteīni, kuri hipotētiski varētu būt iesaistīti gliomu patogēnēzē, ir proliferācijas marķieris – Ki-67, audzēja supresora proteīns – p53, šūnas cikla regulētāji – p21 un p27. Taču attiecībā uz šo proteīnu prognostisko lomu literatūrā ir ļoti pretrunīgi dati, tādēļ nepieciešami papildu pētījumi šajā jomā (Le Mercier *et al.*, 2012; Popova *et al.*, 2014). Literatūrā ir arī daudz diskusiju par gliomu cilmes šūnām un ar tām saistītiem marķieriem – CD133 un CD44 (Bhat *et al.*, 2013; Dong *et al.*, 2019; Ortensi *et al.*, 2013). Daudzi jaunākie pētījumi ir vērsti uz gliomu molekulāro un ģenētisko īpatnību izpēti, veicot apjomīgu audzēja šūnu genoma sekvenčēšanu, ekspresijas profilēšanu un epigēnētisko analīzi. Mūsdienās, pateicoties šiem apjomīgiem pētījumiem un balstoties uz iegūto datu plašu analīzi, ir pierādījumi par vairāku GBM subtipu eksistenci. Verhaak *et al.*, autoru kolektīvs, veicot plašu gēnu sekvenčēšanu un ekspresijas profilēšanu gliomās, aprakstīja četrus GBM molekulāros subtipus – klasisko, mezenhimālo, proneirālo un neirālo. Katram subtipam raksturīgas noteiktas ģenētiskas izmaiņas: IDH1 un TP53 gēnu mutācijas un PDGFRA gēna amplifikācija, raksturīga proneirālajam subtipam, kurš korelē ar labāku prognozi un mazāku vecumu, taču agresīva adjuvanta terapija šim subtipam nesniedz nekādu uzlabojumu. *EGFR* gēna amplifikācija bieži konstatēta klasiskajam subtipam, *NF1* gēna delēcija un mezenhimāliem audiem specifisku gēnu (*CD44*, *MET*, *YLK-40*) ekspresija raksturīga mezenhimālam subtipam, bet neironiem specifisku gēnu (*NELF*, *GABRA*) ekspresija norāda uz neironālu GBM subtipu (Verhaak *et al.*, 2010). Ir aprakstīti arī daudzi citi gliomu subtipēšanas mēģinājumi, kuros konstatēti līdzīgi molekulārie subtipi (Brennan *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2005; Phillips *et al.*, 2006; Teo *et al.*, 2019). Pagaidām tiek risināts jautājums, kā šos molekulāros datus padarīt izmantojamus rutīnas klīniskajā praksē. GBM molekulārā subtipēšana ir

iespējama un varētu būt daudzsološa, bet rutīnas praksē ir nepieciešama vienkārša un pieejama metode, imūnhistoķīmiska vizualizācija (IHĶ) varētu būt lētāks analogs, kas aizstātu sarežģītas un laikietilpīgas molekulārās analīzes metodes. Pasaulē pagaidām ir salīdzinoši maz pētījumu par IHĶ izmantošanu gliomu subtipēšanā. Piemēram, Le Mercier *et al.*, izmantojot minimālu IHĶ marķieru skaitu, – EGFR, PDGFRA un p53, veiksmīgi spēja izšķirt GBM proneirālo un klasisko subtipu. Šis autoru kolektīvs pierādīja labāku izdzīvotību pacientiem ar proneirālu GBM, savukārt pacienti ar klasisku GBM subtipu uzrādīja labāku reakciju, saņemot agresīvu adjuvantu terapiju (Le Mercier *et al.*, 2012). Lai spriestu par IHĶ praktisko nozīmi gliomu subtipēšanā, kā arī secinātu par atsevišķu IHĶ marķieru predikatīvu un prognostisko lomu, ir nepieciešami papildu pētījumi.

Šī pētījuma **mērķis** ir izvērtēt gliomu – glioblastomas (GBM) un difūzu astrocitomu (DA) morfoloģisko un imūnhistoķīmisko profilu, kā arī izvērtēt atsevišķu imūnhistoķīmisku marķieru prognostisko lomu.

Lai sasniegtu šo mērķi, ir izvirzīti šādi **uzdevumi**:

- 1) raksturot gliomu morfoloģisko struktūru;
- 2) izvērtēt angioģenēzi, nosakot mikrovaskularizācijas blīvumu (MVB) GBM un DA audos;
- 3) izvērtēt proliferācijas frakciju (Ki-67), kā arī šūnas cikla regulatoru (p21 un p27), aberanta p53 proteīna, PDGFRA un CD44 ekspresiju GBM un DA audos;
- 4) izvērtēt IDH1 R132H mutācijas biežumu ar IHĶ metodi GBM un DA audos;
- 5) izvērtēt jebkuras korelācijas un asociācijas starp klīniskajiem, morfoloģiskajiem un imūnhistoķīmiskajiem parametriem;
- 6) veikt GBM un DA pacientu izdzīvotības laika analīzi un faktorus, kas to ietekmē;

- 7) izvērtēt gliomu subtipēšanas iespējas ar IHĶ metodi un analizēt kopsakarības starp klīniskajiem, morfoloģiskajiem un imūnhistoķīmiskajiem parametriem.

Zinātniskie pieņēmumi jeb darba hipotēzes:

- 1) morfoloģiskajiem un imūnhistoķīmiskajiem parametriem ir prognostiska nozīme gliomās;
- 2) gliomu subtipēšana ir iespējama, izmantojot imūnhistoķīmijas metodi.

Zinātniskā novitāte:

- 1) šajā darbā tika pārbaudīta hipotēze par to, vai, izmantojot IHĶ metodi, ir iespējama gliomu subtipēšana;
- 2) reģionālā aspektā ir pirmais pētījums Latvijā, kurā plaši izvērtēts gliomu morfoloģiskais un imūnhistoķīmiskais raksturojums, kā arī veikta izdzīvotības laika analīze;
- 3) zinātniskā darba ietvaros izpētīti vairāki imūnhistoķīmiski marķieri, kuru agrākā diagnostiska un prognostiskā vērtība ir bijusi pretrunīga. Šādi rezultāti vairo pētījumu datus, kas balstīti uz pierādījumiem.

Personīgais ieguldījums

Autors ir veicis visas pētījuma stadijas, t. sk. pētījuma plānojumu un imūnhistoķīmisko marķieru izvēli, zinātnisko datu iegūvi un statistisko analīzi. Autors veica arī imūnhistoķīmisko vizualizāciju un ir darbā iekļauto makroskopisko un mikroskopisko attēlu autors.

Ētiskie apsvērumi

Pētījums ir veikts saskaņā ar Helsinku deklarāciju un Rīgas Stradiņa universitātes Ētikas komitejas atļauju.

1. Materiāli un metodes

1.1. Pētījuma uzbūve

Pētījums veikts kā retrospektīvs, uz pierādījumiem balstīts, gliālu audzēju morfoloģisks un imūnhistoķīmisks izvērtējums. Laika periodā no 2009. līdz 2014. gadam atlasīti secīgi, operēti 172 gliomu gadījumi – 146 glioblastomas (GBM) (4. anaplāzijas pakāpe) un 26 difūzas astroцитomas (DA) (2. anaplāzijas pakāpe). Anaplastiskas astroцитomas (3. anaplāzijas pakāpe) netika iekļautas pētījumā, jo tika izvērtētas gliomas ar divām krasi atšķirīgām anaplāzijas pakāpēm.

1.2. Pacientu atlase

Pētījumā tika iekļauti 172 gliomu gadījumi – 146 GBMs un 26 DAs, kas atlasīti laika periodā no 2009. līdz 2014. gadam no vienas universitātes slimnīcas (Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca). Audzēju diagnoze tika noteikta pēc Pasaules Veselības organizācijas (PVO) centrālās nervu sistēmas (CNS) audzēju klasifikācijas 2016. gada izdevuma. Pētījumā tika iekļauti pacienti ar GBM un DA diagnozi, atbilstoši šādiem ieslēgšanas kritērijiem:

- 1) pacienti ar histoloģiski pierādītu GBM un DA diagnozi, vadoties pēc PVO, CNS audzēju klasifikācijas, 2016.;
- 2) pietiekošs audu materiāla daudzums (tikai neiroķirurģiski rezecētu gliomu materiāls);
- 3) kvalitatīvs audzēja audu materiāls (vismaz 10 % no materiāla kopējā apjoma veido saglabāti audzēja audi bez nekrozēm);
- 4) pirmreizēji diagnosticēti gliomu gadījumi bez iepriekšējas adjuvantas terapijas.

Izslēgšanas kritēriji bija šādi:

- 1) cita histoloģiskā tipa gliāli audzēji, kā arī audzēji ar divdomīgu, šaubīgu morfoloģiju;
- 2) mazs materiāla apjoms vai materiāls, kurš iegūts galvas smadzeņu stereotaktiskās biopsijās;
- 3) stipri bojāts audu materiāls: ar plašām nekrozēm vai audu bojājuma artefaktiem, kas veido vairāk par 90 % no materiāla kopējā apjoma.

Pacientu demogrāfiskie dati (dzimums, vecums), kā arī dati par audzēja izmēriem, lokalizāciju un adjuvantas terapijas veidu (ķīmijterapija ar temozolamīdu vai/un radioterapija) tika iegūti no slimību vēsturēm un operācijas materiāla nosūtījuma pavadzīmēm. Radioloģiskie dati par audzēja izmēriem un lokalizāciju tika arī pārbaudīti pēc magnētiskās rezonanses (MR) izmeklējuma aprakstiem.

1.3. Audu apstrāde un mikroskopiska izmeklēšana

Neiroķirurģisku operāciju laikā iegūtais materiāls ir fiksēts formalīnā, un pilnīgi viss saņemtais materiāls ir ieguldīts parafīna blokos turpmākai apstrādei un histoloģisko griezumu sagatavošanai. Iegūtie gliomu audu paraugi ir fiksēti neitrālā buferētā 10 % formalīnā (*Sigma-Aldrich, Saint Louis, Amerikas Savienotās Valstis (ASV)*) un secīgi inkubēti pieaugošas koncentrācijas 2-propranololā (*Sigma-Aldrich*), Histograde ksilolā (*J. T. Baker, Deventer, Nīderlande*) un paraplastā (*Diapath S.r.l., Bergamo, Itālija*), veicot šo apstrādi vakuuma infiltrācijas procesorā *Tissue-Tek® VIP™ 5 (Sakura Seiki Co., Ltd., Nagano, Japāna)*. Apstrādātie audi tika ieguldīti paraplastā (*Diapath S.r.l.*), izmantojot ieguldīšanas sistēmu *TES 99 (Medite GmbH, Burgdorf, Vācija)*. Parafīna blokos ieguldītie audu paraugi tika sagriezti 4 mikronu biezos griezumos ar mikrotomu *Microm HM 360 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, ASV)* un uztverti uz priekšmetstikliem (*Menzel-Glaser,*

Braunschweig, Vācija). Griezumi tika krāsoti ar hematoksilīnu un eozīnu audu krāsojamā automātā *TST 44* (*Medite Medizintechnik*, *Burgdorf*, Vācija) un pārklāti ar segstikliņu (*Biosigma*, *Cona*, Itālija), izmantojot automatizētu segstikliņu pārklājēju (*Dako*, *Glostrup*, Dānija) un *Pertex* līmi (*Histolab*, *Gothenburg*, Zviedrija). Ar hematoksilīnu un eozīnu krāsotie mikropreparāti tika izvērtēti gaismas mikroskopā (*Zeiss Axiolab*, Vācija), iegūstot datus par audzēja histoloģisko tipu, atbilstoši PVO CNS audzēju klasifikācijai, 2016. Tika arī izvērtēta izmeklēšanai pieejamā materiāla kvantitāte un kvalitāte, un materiāls, kurš neatbilst ieslēgšanas kritērijiem, netika tālāk analizēts.

1.4. Imūnhistoķīmiskā vizualizācija un izvērtēšana

Pētāmo antigēnu imūnhistoķīmiskā vizualizācija (IHĶ) veikta formalīnā fiksētos, parafīnā ieguldītos audzēja audos un kontroles audos. Lai veiktu IHĶ, katrā gadījumā tika identificēts 1 audu bloks, kurā bija ietverti saglabāti audzēja audi (bez plašām nekrozēm). IHĶ dati netika interpretēti audu griezumos, kuros atklājās pilnīga nekroze vai audzēja izzudums.

IHĶ mērķiem ar elektronisko rotācijas mikrotomu *Microm HM 360* tika sagatavoti trīs mikrometru biezi griezumus uz elektrostatiski uzlādēta priekšmetstikla (*Histobond*, *Marienfeld*, Vācija), un audi tika pakļauti deparafinizācijai graduētā spirta šķīdumā (*Sigma-Aldrich*) un Histograde ksilolā (J.T. Baker). Termāla antigēna struktūras atjaunošana tika veikta mikroviļņu krāsnī (3×5 min), izmantojot bāzisku TEG (pH 9,0) buferi (DAKO). Pēc endogēnās peroksidāzes bloķēšanas (*Sigma-Aldrich*) griezumus tika inkubēti ar primāro antivielu istabas temperatūrā magnētiskā inkubatora kamerā. Katrai antivielai pirms izmantošanas veikta standartizācija, izmantojot kontroles audus atbilstoši ražotāja specififikācijas lapā minētajām instrukcijām. Kad bija atrasta antivielas optimāla koncentrācija, tā tika pārbaudīta ar gliomu audiem. Pielietotās primārās antivielas klonalitāte, sugas izcelsme, sugas specifiskums,

darba atšķaidījums un inkubācijas laiks minēti 1.1. tabulā. Piesaistītās primārās antivielas tika noteiktas ar polimēru vizualizācijas sistēmu *EnVision*, kas konjugēta ar peroksidāzi. Kā hromogēns tika izmantots 3,3'-diaminobenzidīns. Kodolu krāsojumam izmantots Meijera hematoksilīns.

1.1. tabula

Primāru antivienu paneļa raksturojums

Antigēns	Antivielas raksturojums	Klons	Atšķaidījums	Ražotājs
Ki-67	Monoklonāla peles Av pret cilvēka Ag	MIB-1	1:100	Dako
p53	Monoklonāla peles Av pret cilvēka Ag	DO-7	1:400	Dako
p21 ^{WAF1/Cip1} protein	Monoklonāla peles Av pret cilvēka Ag	SX118	1:25	Dako
p27 ^{Kip1} protein	Monoklonāla peles Av pret cilvēka Ag	SX53G8	1:50	Dako
Mutant IDH R132H	Monoklonāla peles Av pret cilvēka mutantu IDH1 R132H proteīnu	H09	1:50	Dianova
PDGFRA	Poliklonāla truša Av pret cilvēka Ag	Polyclonal	1:200	Abcam
CD44	Monoklonāla peles Av pret cilvēka Ag	DF1485	1:50	Dako
CD34	Monoklonāla peles Av pret cilvēka Ag	QBEnd10	1:50	Dako

Saīsinājumi tabulā: Av, antiViela; Ag, antiGēns.

Pēc vizualizācijas audu griezumā tika segti ar segstikliņu (Biosigma). Veiktas pozitīvas un negatīvas kvalitātes kontrolreakcijas, gūstot adekvātus rezultātus. Imūnhistoķīmisko marķieru ekspresija tika izvērtēta gaismas mikroskopā, izmantojot augsta palielinājuma redzes lauku 400× (t. i., 40× objektīvu un 10× okulārās lēcas; laukums 0,65 mm²). Imūnhistoķīmisko marķieru ekspresija tika izvērtēta atbilstoši intensitātei: zema, vidēja un augsta intensitāte. Marķieru ekspresija tika uzskatīta par pozitīvu, ja ekspresijas

intensitāte bija vidēja vai augsta (Ryu *et al.*, 2018; van Diest *et al.*, 1997). Ekspresijas intensitātes pakāpe (viegla, vidēja, augsta) ir redzama 1.1. attēlā uz CD44 ekspresijas piemēra.

Lielākajai daļai marķieru (Ki-67, p53, p21, p27, CD44, CD34) nukleāra, citoplazmatiska vai membranoza pozitivitāte ir vērtēta kvantitatīvi kā pozitīvās šūnas (%) no kopējā šūnu skaita.

PDGFRA ekspresijas vērtēšanā izmantota gan kvantitatīva, gan semi-kvantitatīva metode (0–9% imūnreaktīvo šūnu – negatīvs, 10–50% – fokāli pozitīvs, > 50% pozitīvs). IDH1 R132H mutanta proteīna ekspresija ir vērtēta tikai kā pozitīvs (+) vai negatīvs (–) rezultāts (1.2. attēls).

**1.1. attēls. CD44 ekspresijas intensitāte GBM:
A – nav ekspresijas; B – zema ekspresija; C – vidēja
ekspresija; D – augsta ekspresija, anti-CD44**

Attēla palielinājums 200×(B) un 400× (A,C,D)

1.2. attēls. **IDH1 R132H** mutanta proteīna ekspresija DA:

A, negatīvs; B, pozitīvs; anti-IDH1 R132H

Attēla palielinājums 200×

Mikrovaskularizācijas blīvuma noteikšanai (MVB) endoteliālā diferenciācija tika noteikta ar membranozu CD34 ekspresiju. MVB izvērtēts pēc Veidnera pieejas (Weidner *et al.*, 1991). Pirmais solis bija paaugstināta mikrovaskulārā blīvuma apvidus t.s. karstā punkta atrašana mērķa audos. Šie apvidi tika identificēti, pārskatot visu audu materiālu zemā mikroskopa palielinājumā 100× (t. i., 10× objektīva un 10x okulāra lēcas) (1.3. attēls). Individuālas vaskulārās struktūras tika skaitītas 400× laukā (t. i., 40× objektīva lēca un 10× okulāra lēca; 0,65 mm² laukumā). Bija vērtēti tikai sīkie asinsvadi, lielāki asinsvadi ar muskuļslāni sienīņā netika skaitīti.

1.3. attēls. **MVB vērtēšana GBM. “Karstais punkts”** parādīts dzeltenajā aplī. **Anti-CD34**

Attēla palielinājums 100×

1.4. attēls. **Mikroasinsvadi (bultiņas) GBM. Anti-CD34**
Attēla palielinājums 400×

Attiecībā uz katru imūnhistoķīmisko marķieri, lai rezultātu varētu uzskatīt par pozitīvu, imūnpozitīvo šūnu relatīvajam daudzumam bija jāsasniedz noteikta robežvērtība (*cut-off*). Pasaules literatūrā ir daudz domstarpību attiecībā uz pielietoto marķieru robežvērtībām gliālu audzēju audos, un dažādi autori bieži pielieto atšķirīgas robežvērtības. Tādēļ šajā pētījumā tika izmantotas divas robežvērtības – viena tika izvēlēta, vadoties pēc citu autoru izmantotajām robežvērtībām gliomu pētījumos starptautiskajā literatūrā, par otru robežvērtību tika pieņemts imūnhistoķīmiskā marķiera mediānas ekspresijas līmenis. Vērtējot MVB, par robežvērtību tika pieņemta tikai mediānas vērtība, jo pasaules literatūrā ir ļoti maz pētījumu ar MVB izvērtējumu gliālos audzējos.

Šajā pētījumā imūnhistoķīmisko marķieru ekspresijas vērtēšanā izmantotās robežvērtības gan GBM, gan DA parādītas 1.2. tabulā.

Imūnhistoķīmisko marķieru ekspresijas robežvērtības GBM un DA

Markieris	GBM	DA	Atsauces
Ki-67	25 % un 41 % (mediāna)	3 % un 5,5 % (mediāna)	(Jin <i>et al.</i> , 2011; Neder <i>et al.</i> , 2004)
p53	10 % un 15 % (mediāna)	10 % un 52 % (mediāna)	(Popova <i>et al.</i> , 2014; Wang <i>et al.</i> , 2014)
CD44	50 % un 86,5 % (mediāna)	50 % un 8,5 % (mediāna)	(Popova <i>et al.</i> , 2014)
PDGFRA	50 % un 1 % (mediāna)	50 % un 42 % (mediāna)	(Popova <i>et al.</i> , 2014)
p21	20 % un 19 % (mediāna)	20 % un 2,5 % (mediāna)	(Trabelsi <i>et al.</i> , 2016)
p27	70 % un 74 % (mediāna)	70 % un 92 % (mediāna)	(Faria <i>et al.</i> , 2007; Yang <i>et al.</i> , 2011)
MVB	35 % (mediāna)	13,0 % (mediāna)	NP

Sāsinājumi tabulā: NP, nav pielietojams, MVB, mikrovaskularizācijas blīvums, PDGFRA, trombocītu atbrīvotā augšanas faktora receptors alfa, GBM, glioblastoma, DA, difūza astrocitoma.

GBM subtipa noteikšanai (pēc Verhaak *et al.*, 2010), izmantoti dati par četrus proteīnu ekspresiju: p53, IDH1 R132H, PDGFRA un CD44, atbilstoši Verhaak *et al.*, 2010 pētījumā aprakstītajām molekulārām signatūrām. Balstoties uz šo proteīnu ekspresiju, pētījumā tika izšķirtas trīs GBM subtipu kategorijas: proneirāls, mezenhimāls un neklasificēts subtips.

Šo gliomas subtipu definējums pēc proteīnu ekspresijas signatūrām bija šāds: proneirālu subtipu raksturoja augsta p53 ekspresija un/vai augsta PDGFRA ekspresija, un/vai IDH1 R132H pozitivitāte; mezenhimālu subtipu raksturoja augsta CD44 ekspresija un zema proneirālo marķieru (p53, PDGFRA, IDH1 R132H) ekspresija. Visi pārējie audzēju gadījumi, kurus neizdevās iekļaut atbilstošā subtipa kategorijā, tika nosaukti par neklasificētu subtipu, apzīmēti ar "Cits". Imūnhistoķīmisko subtipu iedalīšanas algoritms ir parādīts 1.5 attēlā.

1.5. attēls. Gliomu imūnhistoķīmiska subtipēšana (algoritms)

Visi mikropreparāti tika izvērtēti gaismas mikroskopā (Zeiss Axiolab, Vācija). Morfoloģiskie un imūnhistoķīmiskie attēli uzņemti ar *Kappa Image Base* programmu (KAPPA opto-electronics Inc., ASV), izmantojot Axiolab (Zeiss, Oberkochen, Vācija) mikroskopu kā optisko sistēmu un *Kappa CF 11 DSP* kameru (KAPPA opto-electronics Inc., ASV).

1.5. Statistiska analīze

Statistiskā analīze tika veikta, izmantojot *IBM SPSS Statistics Version 20.0* statistikas programmatūras paketi (International Business Machines Corp., Armonk, New York, ASV). Ticamības intervāls (TI) tika noteikts, izmantojot *Confidence Interval Analysis* (CIA) programmatūru.

Uzsākot statistisko analīzi, datu normālsadalījums tika pārbaudīts, izmantojot *Shapiro-Wilk* testu. Aprakstošie dati tika izteikti kā vidējā vērtība $\pm$

standarta novirze (SD), mediāna ar starpkvartīļu diapazonu (IQR) vai relatīvās vērtības ar 95 % ticamības intervālu (TI).

No aprakstošās statistikas metodēm tika izmantoti šādi testi: aprakstošā un krusteniskās tabulas Pīrsona Hī-kvadrāta metode, divvariāciju korelācija kā Spīrmana rangu korelācijas koeficients, ne-parametriskās metodes kā Manna-Vitnija U-tests un Kruskala–Vallisa vienvirziena dispersijas rangu analīze. *Post-hoc* analīze Bonferoni modifikācijā tika izmantota, lai noteiktu atšķirības starp 3 vai vairāk grupām.

Izdzīvotības analīzei tika izmantota Kaplāna-Meijera analīze ar *log-rank* testu. Atšķirības tika uzskatītas par statistiski nozīmīgām, ja p vērtība $\leq 0,05$.

2. Rezultāti

2.1. Pētāmās grupas raksturojums

2.1.1. GBM raksturojums

Pētījumā tika iekļauti 146 pacienti ar GBM diagnozi, kas noteikta no 2009. līdz 2014. gadam. GBM bija diagnosticēta 75/146 (51,4 %; 95 % ticamības intervāls (TI) = 43,3–59,5) sievietēm un 71/146 (48,6 %; 95 % TI = 40,5–56,7) vīriešiem. Pacientu vecums bija no 34 līdz 89 gadiem. Vidējais pacientu vecums $\pm$ standarta novirze (SD) bija $62,0 \pm 11,2$ (95 % TI = 60,2–63,8) gadi, mediānā vērtība – 62,0 (starpkvartīļu diapazons, IQR = 18,0) gadi. Vīriešu vidējais vecums $\pm$ SD bija $60,8 \pm 11,5$ (95 % TI = 58,1–63,5) gadi; mediānais vecums bija 60,7 (IQR = 19,0) gadi. Sieviešu vidējais vecums $\pm$ SD bija $63,1 \pm 10,9$ (95 % TI = 60,7–65,7) gadi; mediānais vecums bija 65,0 (IQR = 17,0) gadi.

Visbiežāk sastopamā GBM lokalizācija bija pieres daiva ar 56/146 (38,4 %; 95 % TI = 30,5–46,3) gadījumiem, tad deniņu daiva – 41/146 (28,1 %; 95 % TI = 20,8–35,4) gadījumi, paura daiva – 21/146 (14,1%; 95% TI = 8,5–19,7) gadījumi un pakauša daiva – 2/146 (1,4 %; 95 % TI = 0–3,3) gadījumi. 26/146 (17,8 %; 95 % TI = 11,6–24,0) no GBM plaši infiltrēja vairākas daivas vienā smadzeņu puslodē. 78/146 (53,4 %; 95 % TI = 45,3–61,5) no GBM lokalizējās labajā galvas smadzeņu puslodē, bet 62/146 (42,5 %; 95 % TI = 34,5–50,5) kreisajā puslodē. 6/146 (4,1 %; 95 % TI = 0,9–7,3) no GBM bija bilaterālas ar abu pieres daivu iesaisti. Multifokālas GBM konstatēja 16/146 (11,0 %; 95 % TI = 5,9 – 16,1) gadījumos.

Audzēja maksimālais diametrs pēc magnētiskās rezonanses (MR) datiem bija no 1 līdz 9 cm; vidējais izmērs $\pm$ SD bija $5,1 \pm 1,4$ (95 % TI – 4,85–5,36) cm; mediānais izmērs bija 5,1 (IQR = 2,0) cm. 101/123 (29,5 %; 95 % TI = 21,4–37,6) gadījumos audzēja maksimālais diametrs bija lielāks par 4

cm, bet 22/123 (15,1 %; 95 % TI = 8,8–21,4) gadījumos mazāks par 4 cm. MR dati nebija pieejami 23/146 (15,7 %; 95 % TI = 9,8–21,6) GBM gadījumiem.

Visiem (146/146) GBM gadījumiem veikta audzēja ķirurģiska rezekcija, pēc kuras daudzi pacienti saņēma adjuvantu terapiju – ķīmijterapiju ar temozolamīdu (TMZ) un radioterapiju. Dati par saņemto adjuvantu terapiju nebija pieejami 11/146 (7,5 %; 95 % TI = 4,3–12,9) GBM gadījumiem. Pārējie 135 GBM pacienti visbiežāk saņēmuši maksimāli iespējamo standartterapiju pēc ķirurģiskas audzēja rezekcijas, t. i., ķīmijterapiju ar TMZ, ko papildināja ar radioterapiju – 56/135 (41,5 %; 95 % TI = 33,5–49,9) gadījumos. Ķirurģisku ārstēšanu, kura sekoja tikai radioterapija bija saņēmuši 50/135 (37,0 %; 95 % TI = 29,3–45,4) pacienti, savukārt 29/135 (21,4 %; 95 % TI = 15,3–29,1) pacientiem bija veikta tikai ķirurģiska ārstēšana bez adjuvantas terapijas. Pacienti, kuri bija saņēmuši maksimāli iespējamo standartterapiju ar TMZ, bija gados jaunāki, salīdzinot ar pacientiem, kuri saņēma tikai radioterapiju un ķirurģisku ārstēšanu (ANOVA, $p < 0,001$). Pacientu vidējais vecums dažādās ārstēšanas grupās bija šāds: ķirurģiska ārstēšana + standartterapija ar TMZ un radioterapiju – 55,0 (95 % TI = 52,5–57,5) gadi; ķirurģiska ārstēšana + radioterapija – 65,9 (95 % TI = 62,9–68,7) gadi; tikai ķirurģiska ārstēšana – 69,0 (95 % TI = 65,3–72,7) gadi. Pacientu ārstēšanas grupās nebija saistības ar saņemto terapijas veidu un audzēja izmēru (Kruskal-Wallis H; $p = 0,708$).

2.1.2. DA raksturojums

Pētījumā tika iekļauti 26 pacienti ar DA diagnozi, kas noteikta laika periodā no 2009. līdz 2014. gadam.

DA bija diagnosticēta 14/26 (53,8 %; 95% TI = 34,6–72,7) sievietēm un 12/26 (46,2 %; 95 % TI = 27,0–65,4) vīriešiem. Pacientu vecums bija no 21 līdz 67 gadiem. Vidējais pacientu vecums $\pm$ standarta novirze (SD) bija $37,5 \pm 11,2$ (95 % TI = 33,0–42,0) gadi, mediānā vērtība – 35,5 (IQR = 19,0) gadi. Vīriešu

vidējais vecums $\pm$ SD bija $37,6 \pm 12,3$ (95 % TI = 29,8–45,5) gadi; mediānais vecums bija 34,0 (IQR = 17,0) gadi. Sieviešu vidējais vecums $\pm$ SD bija $37,4 \pm 10,5$ (95 % TI = 31,3–43,4) gadi; mediānais vecums bija 36,0 (IQR = 20,0) gadi.

Visbiežāk sastopamā DA lokalizācija bija pieres daiva ar 13/26 (50 %; 95% TI = 30,8–69,2) gadījumiem, tad deniņu daiva – 6/26 (23,1 %; 95 % TI = 6,9–39,3) gadījumi. 7/26 (26,9 %; 95 % TI = 9,9–43,9) DA gadījumos bija iesaistītas vairākas daivas. 14/26 (53,8 %; 95 % TI = 34,6–72,0) no DA lokalizējās labajā galvas smadzeņu puslodē, bet 12/26 (46,2 %; 95 % TI = 27,0–65,4) kreisajā puslodē.

Visas DA bija lieli audzēji, maksimālais diametrs pēc magnētiskās rezonanses (MR) datiem bija no 4,7 līdz 9,0 cm; vidējais izmērs bija $6,1 \pm 0,9$ (95 % TI = 5,6–6,7) cm; mediānais izmērs 6,0 (IQR = 1,0) cm. MR dati nebija pieejami 13/26 (50,0 %; 95 % TI = 30,8–69,2) DA gadījumiem.

Visiem (26/26) DA gadījumiem veikta audzēja ķirurģiska rezekcija, pēc kuras visi pacienti saņēma adjuvantu radioterapiju.

2.2. Morfoloģiskais raksturojums

2.2.1. GBM raksturojums

Visām GBM diagnoze bija uzstādīta, vadoties pēc 2016 PVO CNS audzēju klasifikācijas, galvenie morfoloģiskie GBM kritēriji ir nekrožu klātbūtne (išēmiska un/vai pseidopalisadējoša tipa) un mikrovaskulāra proliferācija (skat. 2.1. attēlu). IDH1 mutācijas statuss tika noteikts imūnhistoķīmiski ar anti- IDH1 R132H.

16/146 (10,9 %; 95 % TI = 5,8–16,0) GBM gadījumos morfoloģiski konstatēja vieglu, iniciālu mikrovaskulāru proliferāciju, taču nekrozes un izteikta šūnu atipija nepārprotami liecināja par GBM diagnozi. 130/146 (89,0 %; 95 % TI = 83,9–94,1) GBM gadījumos mikrovaskulāra proliferācija bija izteikta, bieži

ar glomeruloīdu vaskulāru struktūru veidošanos. Lielākā daļa no GBM bija ar klasisku morfoloģiju – 141/146 (96,6 %; 95 % TI = 93,7–99,5). 2/146 (1,4 %; 95 % TI = 0–3,3) pacientiem bija arī gliosarkoma, kuru raksturo izteikta sarkomatoza morfoloģija ar vārpstveidīgām audzēja šūnām. 3/146 (2,1 %; 95 % TI = 0–4,4) pacientiem bija diagnosticēta gigantšūnu jeb milzšūnu GBM, kuru pārsvarā veido ļoti lielas, atipiskas audzēja šūnas. GBM morfoloģiskās īpatnības parādītas 2.1. attēlā.

2.1. attēls. GBM morfoloģija: A, pseidopalisadējoša nekroze. Pseidopalisāde parādīta ar zaļo bultiņu, nekroze ir centrā ar dzelteno zvaigznīti. B, izteikta glomeruloīda mikrovaskulāra proliferācija (bultiņa). C, izteikta šūnu atipija un gigantiskas atipiskas audzēja šūnas (bultiņa). D, iniciāla, viegla mikrovaskulāra proliferācija (bultiņa)

Hematoksilīna un eozīna krāsojums (HE),
attēla palielinājums 100× (A), 200×(B un D), 400× (C).

2.2.2. DA raksturojums

Visām DA diagnoze bija uzstādīta pēc raksturīgām morfoloģiskām īpatnībām, vadoties pēc 2016 PVO CNS audzēju klasifikācijas. Visas DA raksturoja viegla vai mērena celularitāte, lai gan 3/26 (11,5 %; 95 % TI = 0–23,7) konstatēja arī atsevišķus paaugstinātas celularitātes rajonus. Visos audžējos bija konstatētas retas mitozes – līdz 2 mitozēm uz 10 lielā palielinājuma redzes laukiem. Visās DA konstatēta viegla kodolu atipija, bet nebija konstatētas nekrozes vai mikrovaskulāra proliferācija. 2/26 (7,7 %; 95 % TI = 0–17,8) DA konstatēja izteikti palielinātu reaktīvu astrocītu – gemistocītu daudzumu. 12/26 (46,1 %; 95 % TI = 26,0–65,3) audžējiem konstatēja izteiktas mikrocistiskas izmaiņas. DA morfoloģiskās īpatnības parādītas 2.2. attēlā (A–D).

2.2. attēls. DA morfoloģija: A, mikrocistiskas izmaiņas (bultiņas) B, C, zema celularitāte, sīkas neoplastiskas šūnas, salīdzinoši monomorfiem kodoliem (zaļās bultiņas), asinsvads (dzeltens bultiņa). D, gemistocītiski astrocīti – lielas šūnas ar izteikti eozinofilu citoplazmu (zilās bultiņas)

Hematoksilīna un eozīna krāsojums (HE), attēla palielinājums 100× (A), 200× (B un C), 400× (D).

2.3. GBM un DA imūnhistoķīmiskais profils

GBM un DA audos tika pētīta šāda imūnhistoķīmisku marķieru ekspresija: Ki-67, p53, p21, p27, CD44, PDGFRA, IDH1 R132H, CD34. Imūnhistoķīmisku marķieru ekspresijas profils GBM un DA attēlots 2.1. tabulā. Imūnhistoķīmisko marķieru ekspresija vizuāli parādīta 2.3. attēlā.

Šūnas cikla marķieru izvērtējums uzsākts ar proliferācijas aktivitātes analīzi kā vienu no galvenajām audzēju pamatīpašībām. Proliferācijas frakcija GBM bija daudz augstāka, salīdzinot ar DA, – atbilstoši 44,4 % (95 % TI = 41,1–47,6) un 6,4 % [95 % TI = 4,7–8,0).

Aberanta p53 proteīna ekspresija bija ļoti variabla abās gliomu grupās, tā variēja no pilnīgas imunonegativitātes (0 %) līdz izteiktai ekspresijai gandrīz visās audzēja šūnās (99 %). Gadījumu skaits ar jebkuru p53 proteīna ekspresijas līmeni (>1 %) bija ļoti līdzīgs gan GBM, gan DA – atbilstoši 87,3 % (95 % TI = 81,5–93,1) un 87,5 % (95 % TI = 74,3–100). Savukārt augstu p53 ekspresijas līmeni (>50 %) procentuāli vairāk konstatēja DA – 50,0 % (95 % TI = 30,8–69,2), salīdzinot ar GBM – 31,7 % (95 % TI = 23,6–39,8). Salīdzinot vidējo p53 ekspresijas līmeni (2.1. tabula), nekonstatēja statistiski ticamu ekspresijas atšķirību starp GBM un DA ($p = 0,416$). Ņemot vērā ekspresijas robežvērtību (10 %), p53 ekspresija tika konstatēta 64,3 % (95 % TI = 55,6–72,1) GBM gadījumā, pretstatā 75,0 % (95 % TI = 55,1–88) DA gadījumā.

p21 ekspresija GBM audos bija statistiski ticami augstāka nekā DA, t. i., 21,2 % (95 % TI = 18,7–23,6) pret 6,9 % (95 % TI = 2,4–11,4). Ņemot vērā ekspresijas robežvērtību (20 %), augsta p21 ekspresija konstatēta 49,3 % (95 % TI = 41,3–57,4) GBM gadījumā un tikai 15 % (95 % TI = 5,2–36,0) DA gadījumā.

Proteīna p27 ekspresija tika novērota visos gadījumos, tomēr vidējais p27 pozitīvu šūnu skaits bija nozīmīgi zemāks GBM gadījumos (69,7 %; 95 %

TI = 65,8–73,7) nekā DA (86,6 %; 95 % TI = 81,6–91,7). Ņemot vērā ekspresijas robežvērtību (70 %), augsta p27 ekspresija konstatēta 60,1 % (95 % TI = 50,9–68,7) GBM gadījumā, salīdzinot ar 86,9 % (95 % TI = 67,8–95,4) DA.

CD44 proteīna ekspresija bija ievērojami augstāka GBM (74,1 %; 95 % TI = 69,6–78,7), salīdzinot ar DA (13,5 %; 95 % TI = 7,7–19,2). Augsts CD44 ekspresijas līmenis (>50 % neoplastisku šūnu) konstatēts 81,5 % (95 % TI = 74,6–87,4) GBM gadījumā, salīdzinot tikai ar vienu DA gadījumu, kuram CD44 ekspresija sasniedza šo līmeni. GBM galvenokārt dominēja intensīva, difūza, membranoza CD44 ekspresija. Savukārt CD44 ekspresija DA bija maz izteikta un lielākoties citoplazmiska rakstura, daudzajos sazarotajos astrocītu izaugumos, veidojot smalku, sazarotu, zemas intensitātes CD44 imūnreaktivitātes tīklojumu. Turklāt visās DA konstatēja arī atsevišķus augstākas intensitātes CD44 ekspresijas perēkļus ar vismaz vidēju CD44 ekspresijas intensitāti.

PDGFRA ekspresija bija ievērojami augstāka DA, salīdzinot ar GBM ($p < 0,001$). Tādējādi augstu PDGFRA ekspresiju (>50 %) konstatēja 6,2 % (95 % TI = 5,0–10,6) GBM gadījumā un 52,6 % (95 % TI = 30,1–75,0) DA gadījumā. Lielākajā daļā gadījumu novēroja citoplazmisku un membranozu PDGFRA ekspresiju neoplastiskajās šūnās, taču atsevišķos gadījumos novērota arī nukleāra ekspresija.

Mutanta IDH1 R132H proteīna ekspresija bija konstatēta 3,4 % (95 % TI = 0,5–6,3) GBM, salīdzinot ar 76,9 % (95 % TI = 60,7–93,1) DA. Visos gadījumos konstatēta intensīva nukleāra ekspresija. Starp IDH1 pozitīvajiem GBM gadījumiem tikai vienā gadījumā morfoloģiski konstatēts zemākas malignitātes pakāpes komponents, morfoloģiski apstiprinot sekundāru GBM, kas attīstījusies zemas anaplāzijas pakāpes gliomas malignas transformācijas rezultātā. Visos IDH1 R132H pozitīvu GBM ($n = 5$) gadījumos ne radioloģiski,

ne klīniski nebija atrodama informācija, kas liecinātu par iepriekš eksistējošu zemas malignitātes pakāpes gliomu.

Mikrovaskularizācijas blīvums (MVB) tika izvērtēts, pielietojot imūnhistoķīmisko vizualizāciju ar CD34. GBM audos MVB diapazons bija no 6 līdz 130 vaskulārām struktūrām vienā augsta palielinājuma redzes laukā, vidējais MVB $\pm$ SD bija $40,7 \pm 25,4$ (95 % TI = 35,8–45,6) un mediānā vērtība – 35,0 (IQR = 29,0). DA audos MVB diapazons bija no 4 līdz 49 vaskulārām struktūrām vienā augsta palielinājuma redzes laukā, vidējais MVB $\pm$ SD bija $18,1 \pm 12,1$ (95% TI = 12,9–23,3) un mediānā vērtība – 13,0 (IQR = 16,0). Tādā veidā GBM audos MVB bija statistiski ticami lielāks salīdzinot ar DA ($p < 0,001$).

2.1. tabula

Imūnhistoķīmisko marķieru ekspresijas raksturojums GBM un DA

Parametrs	GBM	DA
Ki-67		
Izmeklēto gadījumu skaits	126	24
Vidējais daudzums $\pm$ SD; 95 % TI	$44,4 \% \pm 18,5$; 41,1–47,6	$6,4 \% \pm 3,9$; 4,7– 8,0
Mediānais daudzums; IQR	41,0; 24	5,5; 6
Augsta Ki-67 ekspresija; Nr; %; 95 % TI (ekspresijas robežvērtība 25 %)	111; 88,1 81,2–92,6	0; 0 0–10,3
Augsta Ki-67 ekspresija; Nr; %; 95 % TI (ekspresijas robežvērtība 41 %)	61; 48,4 39,8–57,0	0; 0 0,0–13,8
Augsta Ki-67 ekspresija; Nr; %; 95 % TI (ekspresijas robežvērtība 3 %)	126; 100% 97,0–100	16; 66,7 46,7–82,0
Augsta Ki-67 ekspresija; Nr; %; 95 % TI (ekspresijas robežvērtība 5 %)	126; 100 % 97,0–100	12; 50,0 31,4–68,5
p53		
Izmeklēto gadījumu skaits	126	24
Vidējais daudzums $\pm$ SD; 95 % TI	$35,3 \pm 37,6$ 28,7–42,0	$43,4 \pm 31,7$ 30,0–56,8

2.1. tabulas turpinājums

Parametrs	GBM	DA
Mediānais daudzums; IQR	15,0; 71	52,0; 63
0–5 % p53 pozitīvo šūnu; Nr; %; 95% TI	30; 23,8 17,2–31,9	6; 25,0 12,0–44,9
6–10% p53 pozitīvo šūnu; Nr; %; 95% TI	25;19,8 13,8–27,6	0; 0 0–13,8
11–50 % p53 pozitīvo šūnu; Nr; %; 95 % TI	31; 24,6 17,9–33,2	6; 25,0 12,0–44,9
>50 % p53 pozitīvo šūnu; Nr; %; 95 % TI	40; 31,7 24,2–40,3	12; 50,0 31,4–68,6
Augsta p53 ekspresija; Nr; %; 95 % TI (ekspresijas robežvērtība 10 %)	81; 64,3 55,6–72,1	18; 75 55,1– 88,0
p53		
Augsta p53 ekspresija; Nr; %; 95 % TI (ekspresijas robežvērtība 15 %)	67; 53,2 44,5–53,2	17; 70,8 50,8–85,1
Augsta p53 ekspresija; Nr; %; 95 % TI (ekspresijas robežvērtība 52 %)	39; 30,9 23,5–39,5	12; 50% 31,4–68,6
CD44		
Izmeklēto gadījumu skaits	146	26
Vidējais daudzums $\pm$ SD; 95 % TI	74,1 $\pm$ 27,8 69,6–78,7	13,5 $\pm$ 14,3 7,7–19,2
Mediānais daudzums; IQR	86,5; 36	8,5; 15
Augsta CD44 ekspresija; Nr; %; 95 % TI (ekspresijas robežvērtība 50 %)	119; 81,5 74,4–86,9	0; 0 0–12,0
Augsta CD44 ekspresija; Nr; %; 95% TI (ekspresijas robežvērtība 86%)	75; 51,4 43,3–59,3	0; 0 0–12,0
Augsta CD44 ekspresija; Nr; %; 95 % TI (ekspresijas robežvērtība 8 %)	144; 98,6 95,1–99,6	14; 53,8 35,4–71,2
p21		
Izmeklēto gadījumu skaits	146	20
Vidējais daudzums $\pm$ SD; 95 % TI	21,2 $\pm$ 15,0 18,7–23,6	6,9 $\pm$ 9,5 2,4–11,4
Mediānais daudzums; IQR	19,0; 19	2,5; 7
Augsta p21 ekspresija; Nr; %; 95 % TI (ekspresijas robežvērtība 20 %)	72; 49,3 41,3–57,4	3; 15 5,2–36,0
Augsta p21 ekspresija; Nr; %; 95 % TI (ekspresijas robežvērtība 2,5 %)	145; 99,3 96,2–99,9	12; 60 38,6–78,1
p27		
Izmeklēto gadījumu skaits	113	23

2.1. tabulas turpinājums

Parametrs	GBM	DA
Vidējais daudzums $\pm$ SD; 95 % TI	69,7 $\pm$ 21,2 65,8–73,7	86,6 $\pm$ 11,6 81,6–91,7
Mediānais daudzums; IQR	74; 31	92; 17
Augsta p27 ekspresija; Nr; %; 95 % TI (ekspresijas robežvērtība 70 %)	68; 60,1 50,9–68,7	20; 86,9 67,8–95,4
Augsta p27 ekspresija; Nr; %; 95 % TI (ekspresijas robežvērtība 92 %)	11; 9,7 5,2–17,1	12; 52,2 32,9–70,7
PDGFRA		
Izmeklēto gadījumu skaits	146	20
Vidējais daudzums $\pm$ SD; 95 % TI	7,9 $\pm$ 17,3 5,0–10,7	42,3 $\pm$ 35,5 25,7–59,0
Mediānais daudzums; IQR	1,0; 4	42,0; 68
0–10 % PDGFRA pozitīvo šūnu; Nr; %; 95 % TI	118; 80,8 74,4–87,2	5; 26,3 6,5–46,1
PDGFRA		
10–50 % PDGFRA pozitīvo šūnu; Nr; % 95 % TI	19; 13,0 7,5–18,5	4; 21,1 2,7–39,4
>50 % PDGFRA pozitīvo šūnu; Nr; % 95 % TI	9; 6,2 2,3–10,1	10; 52,6 30,1–75,0
Augsta PDGFRA ekspresija; Nr; %; 95 % TI (ekspresijas robežvērtība 50%)	9; 6,1 3,2–11,3	10; 50 29,9–70,1
Augsta PDGFRA ekspresija; Nr; %; 95 % TI (ekspresijas robežvērtība 1 %)	130; 89,0 82,9–93,1	20; 100 83,9–100
Augsta PDGFRA ekspresija; Nr; %; 95 % TI (ekspresijas robežvērtība 42 %)	9; 6,2 3,2–11,2	10; 50 29,9–70,1
IDH1 R132H		
Izmeklēto gadījumu skaits	146	26
Negatīvs (Nr; %; 95 % TI)	141; 96,6 93,7–99,5	6; 23,1 6,9–39,3
Pozitīvs (Nr; %; 95 % TI)	5; 3,4 0,5–6,3	20; 76,9 60,7–93,1
MVB (CD34)		
Izmeklēto gadījumu skaits	107	23
Vidējais daudzums $\pm$ SD; 95 % TI	40,7 $\pm$ 25,4 35,8–45,6	18,1 $\pm$ 12,1 12,9–23,3
Mediānais daudzums; IQR	35,0; 29	13,0; 16
Augsts MVB; Nr; %; 95 % TI (ekspresijas robežvērtība 35 %)	55,0; 51,4 42,0–60,7	3; 13,0 4,5–32,1

2.1. tabulas nobeigums

Parametrs	GBM	DA
Augsts MVB; Nr; %;	98; 91,6	13; 56,5
95 % TI (ekspresijas robežvērtība 13 %)	84,8–95,5	36,8–74,4

Saīsinājumi tabulā: GBM, glioblastoma; DA, difūza astrocitoma; MVB, mikrovaskularizācijas blīvums; Nr, skaits; TI, ticamības intervāls; SD, standarta novirze; IQR, starpkvartiļu intervāls.

2.3. attēla nobeigums

2.3. attēls. Imūnhistoķīmiska vizualizācija izmeklētajiem marķieriem GBM un DA

A un B, Ki-67 proliferācijas frakcija: izteikti paaugstināta proliferācija GBM (A) un zema proliferācija DA (B). C un D, p53 proteīna nukleāra ekspresija: C, GBM; D, DA.

E un F, p21 proteīna nukleāra ekspresija: E, GBM; F, DA. G un H, nukleāra p27 ekspresija: G, GBM; H, DA. I un J, citoplazmiska PDGFRA ekspresija: I, GBM; J, DA. K un L, CD44 ekspresija: K, GBM, intensīva membranoza ekspresija; L, DA, vāja, maz izteikta ekspresija neoplastisku šūnu fibrilārajos izaugumos, kā arī intensīvākas ekspresijas apvidus (bultiņa). M–P, IDH1 R132H mutācijas produkta ekspresija: M, IDH1 R132H negatīvs primārā GBM; O, IDH1 R132H pozitīva ekspresija sekundārā GBM; N, IDH1 R132H pozitīvs DA; P, IDH1 R132H negatīvs DA. K un S, MVB izvērtējums (CD34): K, GBM; S, DA.

2.4. Asociācijas un korelācijas starp klīniskajiem un imūnhistoķīmiskajiem parametriem

2.4.1. GBM raksturojums

Pētījumā netika konstatētas statistiski nozīmīgas atšķirības starp imūnhistoķīmisko marķieru ekspresiju un pacientu vecumu. Izmantojot Manna-Vitnija U testu, konstatēta tendence biežākai sekundāru GBM (IDH1 R132H pozitīvu) attīstībai gados jaunākiem pacientiem ($z = -1,632$; $p = 0,060$).

Statistiski ticama atšķirība konstatēta starp pacienta dzimumu un CD44 ekspresiju GBM, kas norāda, ka sieviešu grupā CD44 ekspresija ir augstāka (Manna-Vitnija U tests; $z = -2,224$; $p = 0,026$). Vāja, negatīva korelācija konstatēta starp CD44 un GBM izmēru ($r_s = -0,314$; $p < 0,001$).

Analizējot šo saistību starp GBM izmēru un CD44 ekspresiju, kurā izmantots Manna-Vitnija U tests, arī konstatē augstākus CD44 ekspresijas rādītājus mazāka izmēra audzējos (< 4 cm) ($z = -2,364$; $p = 0,018$). CD44 ekspresijas imūnhistoķīmiska vizualizācija parādīta 2.4. attēlā (A, B).

Izmantojot Manna-Vitnija U testu, konstatēta tendence nedaudz zemākiem Ki-67 proliferācijas indeksiem pacientiem vīriešu grupā ($z = -1,913$; $p = 0,056$). Konstatēta arī vāja, bet statistiski ticama pozitīva korelācija starp Ki-67 un audzēja maksimālo diametru ($r_s = 0,243$; $p = 0,013$).

Ki-67 proliferācijas imūnhistoķīmiska vizualizācija parādīta 2.5. attēlā.

Ļoti vāja, negatīva korelācija tika atrasta starp p21 ekspresiju un audzēja maksimālo diametru ($r_s = -0,181$; $p = 0,045$). Kā arī, izmantojot Manna-Vitnija U testu, konstatēja augstāku p21 ekspresiju mazāka izmēra audzējos (< 4 cm) ($z = -2,460$; $p = 0,014$).

Statistiski ticamas p27 proteīna ekspresija atšķirības konstatēja attiecībā uz dzimumu un multifokalitāti. Tādējādi augstāka p27 proteīna ekspresija konstatēta vīriešu grupā (Manna-Vitnija U testu; $z = -2,174$; $p = 0,030$) un

multifokālās GBM (Manna-Vitnija U testu; $z = -2,1$; $p = 0,037$). p27 proteīna ekspresijas imūnhistoķīmiska vizualizācija parādīta 2.6. attēlā.

PDGFRA ekspresijas vidējiem rangiem konstatēta tendence uz augstāku ekspresiju multifokālās GBM (Manna-Vitnija U tests; $z = -1,9$; $p = 0,049$). PDGFRA ekspresijas imūnhistoķīmiska vizualizācija parādīta 2.7. attēlā.

2.4. attēls. Intensīva membranoza CD44 ekspresija GBM. Izteikta mikrovaskulāra proliferācija, endotēlija šūnas negatīvas ar CD44 (iekšējā negatīvā kontrole) (bultiņas), anti-CD44

Attēla palielinājums 400×

2.5. attēls. Ki-67 proliferācijas frakcija GBM, MIB-1

Attēla palielinājums 200×

2.6. attēls. Nukleāra p27 ekspresija GBM, anti-p27

Attēla palielinājums 200×

2.7. attēls. **Membranoza un citoplazmiska PDGFRA ekspresija GBM, anti-PDGFRα**

Attēla palielinājums 400×

2.4.2. DA raksturojums

Izmantojot Manna-Vitnija U testu, tika konstatēta statistiski ticama Ki-67 ekspresijas atšķirība starp dzimumiem. Tādējādi Ki-67 ekspresijas vidējie rangi bija statistiski ticami augstāki vīriešu grupā ($z = -2,201$; $p = 0,010$).

Vidēji stipra korelācija tika konstatēta starp p27 ekspresiju un pacientu vecumu ($r_s = 0,519$; $p = 0,011$).

Ki-67 proliferācijas frakcijas un p27 ekspresijas imūnhistoķīmiska vizualizācija DA parādīta 2.8. un 2.9. attēlā.

2.8. attēls. **Ki-67 proliferācijas frakcija DA, MIB-1**
Attēla palielinājums 200×

2.9. attēls. **Nukleāra p27 ekspresija DA, anti-p27**
Attēla palielinājums 200×

2.5. Asociācijas un korelācijas starp imūnhistoķīmiskajiem parametriem

2.5.1. GBM raksturojums

p53 proteīna ekspresija uzrādīja ļoti vāju, bet statistiski ticamu, pozitīvu korelāciju ar Ki-67 proliferācijas frakciju ($r_s = 0,196$; $p = 0,027$), un arī PDGFRA ($r_s = 0,181$; $p = 0,043$). Vāja pozitīva korelācija konstatēta arī starp p53 un MVB ($r_s = 0,228$; $p = 0,031$). Ki-67 proliferācijas rādītājiem piemita tendence uz ļoti vāju, negatīvu korelāciju ar p27 ($r_s = 0,199$; $p = 0,055$).

Izmantojot Manna-Vitnija U testu, tika konstatēta ievērojami augstāka p53 proteīna ekspresija sekundārās GBM (IDH1 R132H pozitīvas) ($z = -3,555$; $p = 0,001$). Izvērstas asociāciju un korelāciju spektrs starp analizētajiem imūnhistoķīmisko marķieriem GBM ir apkopots 2.2. tabulā.

2.2. tabula

Savstarpējās korelācijas un asociācijas starp imūnhistoķīmiskajiem marķieriem GBM, izmantojot Spīrmana korelācijas analīzi un Manna-Vitnija U testu

Parametrs	Ki-67	p53	CD44	PDGFRA	P21	P27	MVD
Ki-67	NP	0,196 0,027	-0,162 0,070	0,098 0,274	-0,060 0,503	-0,199 0,055	-0,038 0,723
p53	0,196 0,027	NP	-0,073 0,414	0,181 0,043	0,019 0,829	0,037 0,725	0,228 0,031
CD44	-0,162 0,070	-0,073 0,414	NP	-0,141 0,090	0,037 0,659	-0,144 0,128	0,038 0,694
PDGFRA	0,098 0,274	0,181 0,043	-0,141 0,090	NP	-0,152 0,067	-0,056 0,555	0,132 0,176
p21	-0,060 0,503	0,019 0,829	0,037 0,659	-0,152 0,067	NP	0,119 0,211	-0,054 0,580
p27	-0,199 0,055	0,037 0,725	-0,144 0,128	-0,056 0,555	0,119 0,211	NP	-0,121 0,214
MVB	-0,038 0,723	-0,228 0,031	0,038 0,694	0,132 0,176	-0,054 0,580	-0,121 0,214	NP
IDH1 R132H	-0,656 0,512	-3,555 0,0001	-1,201 0,230	-0,449 0,654	-1,545 0,122	-1,632 0,103	-1,281 0,200

* z , r_s un p vērtības ir parādītas tabulā. **saiņinājumi tabulā: NP, nav pielietojams; MVB, mikrovascularizācijas blīvums; PDGFRA, trombocītu atbrīvotā augšanas faktora receptors alfa; IDH1, izocitrātdehidrogenāze 1.

2.5.2. DA raksturojums

PDGFRA proteīna ekspresija uzrādīja vidēji stipru, pozitīvu korelāciju ar p53 ($r_s = 0,544$; $p = 0,013$). Turpretim vidēji stipra, negatīva korelācija bija starp PDGFRA un CD44 ($r_s = -0,592$; $p = 0,006$).

Stipra, negatīva korelācija tika konstatēta starp PDGFRA un p21 ekspresiju ($r_s = -0,603$; $p = 0,008$). Vidēji stipra, negatīva korelācija konstatēta arī starp PDGFRA un MVB ($r_s = -0,501$; $p = 0,034$). p21 arī uzrādīja vidēji stipru, pozitīvu korelāciju ar MVB ($r_s = 0,458$; $p = 0,049$). Izvērstas asociācijas un korelācijas spektrs starp analizētajiem imūnhistoķīmisko marķieriem DA ir apkopots 2.3. tabulā.

CD44, PDGFRA ekspresija un MVB imūnhistoķīmiska vizualizācija DA parādīta 2.10., 2.11. un 2.12 attēlā.

2.3. tabula

Savstarpējās korelācijas un asociācijas starp imūnhistoķīmiskajiem marķieriem DA, izmantojot Spīrmana korelācijas analīzi un Manna-Vitnija U testu

Parametrs	Ki-67	p53	CD44	PDGFRA	p21	p27	MVD
Ki-67	NP	0,339 0,106	-0,130 0,544	-0,002 0,992	0,146 0,551	0,276 0,226	0,215 0,350
p53	0,339 0,106	NP	-0,382 0,066	0,544 0,013	-0,260 0,282	0,149 0,518	0,274 0,230
CD44	-0,130 0,544	-0,382 0,066	NP	-0,592 0,006	0,170 0,474	0,302 0,162	0,490 0,018
PDGFRA	-0,002 0,992	0,544 0,013	-0,592 0,006	NP	-0,603 0,008	0,149 0,555	-0,501 0,034
p21	0,146 0,551	-0,260 0,282	0,170 0,474	-0,603 0,008	NP	-0,290 0,229	0,458 0,049
p27	0,276 0,226	0,149 0,518	0,302 0,162	0,149 0,555	-0,290 0,229	NP	0,204 0,350
MVD	0,215 0,350	-0,274 0,230	0,490 0,018	-0,501 0,034	0,458 0,049	0,204 0,350	NP
IDH1 R132H	0,973 0,343	-0,234 0,815	-0,794 0,457	-0,568 0,612	1,284 0,230	-1,589 0,112	-0,122 0,907

* z , r_s un p vērtības ir parādītas tabulā. ** saīsinājumi tabulā: NP, nav pielietojams; MVB, mikrovaskularizācijas blīvums; PDGFRA, trombocītu atbrīvotā augšanas faktora receptors alfa; IDH1, izocitrātdehidrogenāze 1.

2.10. attēls. CD44 ekspresija DA. Redzama vāja, maz izteikta CD44 ekspresija astrocītu fibrilārajos citoplazmiskajos izaugumos, kā arī augstākas ekspresijas intensitātes apvidus (bultiņa), anti-CD44
Attēla palielinājums 200×

2.11. attēls. Citoplazmiska PDGFRA ekspresija DA, anti-PDGFRA
Attēla palielinājums 400×

2.12. attēls. Mikroasinsvadi DA, anti-CD34
Attēla palielinājums 400×

2.6. Izdzīvotība

2.6.1. GBM raksturojums

Izdzīvotības funkcijas analīze tika veikta 135 pacientiem. Starp izsekotajiem pacientiem 133/135 (98,5 %; 95 % TI = 94,8–99,6) nomira pētījuma laikā, bet 2/135 (1,5 %; 95% TI = 0–5,2) pacienti bija dzīvi. Mediānais izdzīvotības laiks bija 7,9 (95 % TI = 6,8–9,0) mēneši. Atbilstoša Kaplāna-Meijera līkne redzama 2.13 attēlā.

Pirmā mēneša laikā pēc operācijas nomira 6/135 (4,5 %; 95 % TI = 2,0–9,3), bet 129/135 (95,5 %; 95 % TI = 90,6–97,9) pacienti izdzīvoja. Sešus mēnešus pēc operācijas nomira 53/135 (39,3 %; 95 % TI = 31,4–47,7) pacienti. Gadu pēc operācijas nomira 86/135 (63,7 %; 95% TI = 55,3–71,3) pacienti. Divus gadus pēc operācijas nomira 122/135 (90,4 %; 95 % TI = 84,2–94,3) pacienti. Trīs gadus pēc operācijas nomira 133/135 (98,5 %; 95 % TI = 94,8–99,6) pacienti.

2.13. attēls. Kaplāna-Meijera kumulatīvās izdzīvotības līkne pacientiem ar GBM

2.6.2. DA raksturojums

Izdzīvotības funkcijas analīze tika veikta 25 pacientiem. Starp izsekotajiem pacientiem 11/25 (44,0 %; 95 % TI = 26,6–62,9) nomira pētījuma laikā, bet 14/25 (56,0 %; 95 % TI = 37,0–73,3) pacienti bija dzīvi. Sakarā ar mazu pētījuma un mirušu pacientu grupu statistiski aprēķini ir apgrūtināti, kā arī mediāno izdzīvotības laiku aprēķināt nav iespējams. Atbilstoša Kaplāna-Meijera līkne redzama 2.14 attēlā. Kā redzams līknē, pacientu izdzīvotības rādītāji nenokritās zem 0,5.

Gadu pēc operācijas nedomira neviens no izdzīvotības analīzē iekļautajiem pacientiem. Divus gadus pēc operācijas nomira 3/25 (12 %; 95 % TI = 4,2–29,9) pacienti. Trīs gadus pēc operācijas nomira 5/25 (20 %; 95 % TI = 8,8–39,1) pacienti.

2.14. attēls. Kaplāna-Meijera kumulatīvās izdzīvotības līkne pacientiem ar DA

2.7. Asociācijas starp izdzīvotības laiku un klīniskajiem parametriem

2.7.1. GBM raksturojums

Izdzīvotības laika analīzes rezultāti atklāja statistiski nozīmīgu atšķirību attiecībā uz pacientu vecumu (*log-rank*, $p < 0,001$). Mediānais izdzīvotības laiks pacientiem, kuri bija jaunāki par 65 gadiem bija 11,7 (95 % TI = 8,1–15,3) mēneši, turpretim tikai 5 (95 % TI = 3,2–6,8) mēneši pacientiem, kuri bija vecāki par 65 gadiem. Tādējādi gados jaunāki GBM pacienti zem 65 gadiem bija ar ilgākiem izdzīvotības rādītājiem (2.15. attēls).

2.15. attēls. **Kaplāna-Meijera kumulatīvās izdzīvotības līkne attiecībā uz GBM pacientu vecumu**

Statistiski nozīmīga mediānās izdzīvotības laika atšķirība tika konstatēta attiecībā uz audzēja lokalizāciju (*log-rank*, $p = 0,018$). Tendence uz augstākiem GBM pacientu izdzīvotības rādītājiem konstatēta paura daivās lokalizētiem audzējiem, salīdzinot ar lokalizāciju pieres daivā (*log-rank*, $p = 0,06$). Lielī audzēji, kuri infitrēja vairākas daivas, bija ar vissliktāko prognozi. Mediānais

izdzīvotības laiks pacientiem ar GBM lokalizāciju pieres, deniņu un paura daivās bija atbilstoši 8,3 (95 % TI = 6,7–9,8) mēneši, 7,7 (95 % TI = 4,0–11,4) mēneši, 12,6 (95 % TI = 10,4–14,8) mēneši. Salīdzinājumā, pacientiem ar audzējiem, kuri infiltrēja vairākas daivas mediānais izdzīvotības laiks bija 6,4 (95 % TI = 3,7–9,0) mēneši. Atbilstoša Kaplāna-Meijera līkne redzama 2.16 attēlā.

Analizējot izdzīvotības rādītājus attiecībā uz audzēja lokalizāciju, ņemot vērā pacientu vecumu, konstatēja, ka statistiski ticamas izdzīvotības rādītāju atšķirības ir tikai gados jaunākiem pacientiem (< 65 gadiem). Tādējādi pacientiem, kuri ir jaunāki par 65 gadiem, konstatēja statistiski ticamu atšķirību starp izdzīvotības rādītājiem paura un pieres daivās lokalizētiem audzējiem ($p = 0,018$).

2.16. attēls. Kaplāna-Meijera kumulatīvās izdzīvotības līkne attiecībā uz GBM lokalizāciju

Statistiski nozīmīga mediānās izdzīvotības laika atšķirība tika konstatēta arī attiecībā uz audzēja izmēru (*log-rank*, $p = 0,018$). Mediānais izdzīvotības laiks pacientiem ar audzējiem ar izmēru zem 4 cm bija 11,8 (95 % TI = 8,1–15,5)

mēneši, salīdzinot ar 6,8 (95 % TI = 4,7–8,8) mēnešiem audzējiem ar izmēru virs 4 cm. Atbilstoša Kaplāna-Meijera līkne redzama 2.17. attēlā.

Pacientiem ar multifokālām GBM izdzīvotības rādītāji bija daudz zemāki, salīdzinot ar solitāriem audzējiem (*log-rank*, $p = 0,002$). Mediānais izdzīvotības laiks pacientiem ar multifokālām GBM bija 3,4 (95 % TI = 0–6,9) mēneši, savukārt solitāriem audzējiem tas bija 8,7 (95 % TI = 6,8–10,6) mēneši. Atbilstoša Kaplāna-Meijera līkne redzama 2.18. attēlā.

2.17. attēls. Kaplāna-Meijera kumulatīvās izdzīvotības līkne pacientiem attiecībā uz GBM izmēru

2.18. attēls. Kaplāna-Meijera kumulatīvās izdzīvotības līkne pacientiem attiecībā uz GBM multifokālītāti

Statistiski nozīmīga mediānās izdzīvotības laika atšķirība tika konstatēta attiecībā uz saņemto ārstēšanas veidu GBM pacientiem (*log-rank*, $p < 0,001$). Tādējādi mediānās izdzīvotības laiks pacientiem, kuri saņēmuši maksimāli iespējamo standartterapiju, t. i., ķirurģisku ārstēšanu, kurai sekoja adjuvanta ķīmijterapija ar temozolamīdu un radioterapija, bija 12,1 (95 % TI = 11,2–13,0) mēneši. Savukārt pacientiem, kuriem ķirurģiska ārstēšana bija papildināta tikai ar radioterapiju vai, kuriem veikta tikai audzēja ķirurģiska rezekcija bez

adjuvantas terapijas, bija atbilstoši 7,5 (95 % TI – 5,4–9,6) mēneši un 2,9 (95 % TI = 1,4–4,4) mēneši. Atbilstoša Kaplāna-Meijera līkne redzama 2.19. attēlā.

Izdzīvotības laika analīzē netika konstatētas statistiski ticamas izdzīvotības atšķirības starp dzimumiem ($p = 0,560$).

2.19. attēls. Kaplāna-Meijera kumulatīvās izdzīvotības līkne GBM pacientiem attiecībā uz terapijas veidu

2.7.2. DA raksturojums

Statistiski nozīmīga mediānās izdzīvotības laika atšķirība tika konstatēta dažādu dzimumu pacientiem (*log-rank*, $p = 0,002$). Tādējādi sievietēm bija augstāki izdzīvotības laika rādītāji, salīdzinot ar vīriešiem (2.20. attēls). Pētījuma beigās izdzīvoja 11/13 (84,6 %; 95 % TI = 57,8 %–95,7 %) sieviešu un tikai 3/12 (25 %; 95 % TI = 8,9–57,2 %) vīriešu. Mediānais izdzīvotības laiks vīriešiem ar DA diagnozi bija 58,3 (95 % TI = 31,1–85,0) mēneši. Mediāno izdzīvotības laiku sievietēm nevar aprēķināt, ņemot vērā mazu pētījuma grupu, t. i., tikai divi nāves gadījumi.

2.20. attēls. **Kaplāna-Meijera kumulatīvās izdzīvotības līkne DA pacientiem pēc dzimuma**

Statistiski ticamas izdzīvotības laika atšķirības attiecībā uz audzēja lokalizāciju netika konstatētas ($p = 0,812$). Visas DA bija lieli audzēji virs 4 cm diametrā, tādēļ audzēja izmēru grupas netika iekļautas izdzīvotības laika analizē.

2.8. Asociācijas starp izdzīvotības laiku un imūnhistoķīmiskajiem parametriem

2.8.1. GBM imūnhistoķīmiskie prognostiskie marķieri

Statistiski ticamas GBM pacientu izdzīvotības laika rādītāju atšķirības konstatētas tikai attiecībā uz IDH1 R132H mutācijas produkta ekspresijas noteikšanu (*log-rank*, $p = 0,040$). Tādējādi mediānais izdzīvotības laiks pacientiem ar sekundāru GBM (IDH1 R132H pozitīva) bija 18,3 (95 % TI = 18,0–18,5) mēneši, savukārt pacientiem ar primāru GBM (IDH1 R132H negatīva) tas bija krietni īsāks – 7,7 (95 % TI = 6,3–9,0) mēneši. Atbilstoša Kaplāna-Meijera līkne redzama 2.21. attēlā.

2.21. attēls. Kaplāna-Meijera kumulatīvās izdzīvotības līkne GBM pacientiem attiecībā uz IDH1 R132H

Attiecībā uz PDGFRA ekspresiju, izmantojot ekspresijas robežvērtību 50 %, izdzīvotības laika rādītāju analīzē konstatēta tikai norāde uz tendenci par iespējamu rādītāju atšķirību, taču rezultāts nav statistiski ticams (*log-rank*, $p = 0,066$). Apskatot Kaplāna-Meijera kumulatīvās izdzīvotības līknes, var konstatēt vizuālu atšķirību starp līkni ar augstu un zemu PDGFRA ekspresiju. Taču pētījumā bija maz pacientu ar augstu PDGFRA ekspresiju, lai precizētu PDGFRA ietekmi uz izdzīvotības laiku. GBM pacientiem ir vēlama lielāka pacientu grupa ar augstu PDGFRA ekspresiju. Mediānais izdzīvotības laiks pacientiem ar augstu PDGFRA ekspresiju bija 6,4 (95 % TI = 2,8–9,9) mēneši, bet ar zemu ekspresiju – 8,3 (95 % TI = 6,4–10,1) mēneši. Atbilstoša Kaplāna-Meijera līkne redzama 2.22. attēlā.

Attiecībā uz Ki-67 proliferācijas frakciju statistiski ticama izdzīvotības laika atšķirība netika konstatēta (*log-rank*, $p = 0,252$). Toties, izmantojot ekspresijas robežvērtību 25 %, vizuāli ir redzamas augstas un zemas Ki-67 ekspresijas izdzīvotības laika līkņu nelielas atšķirības. Tādējādi līknes pārklājas

pirmajos 5 mēnešos, vēlāk attālinās viena no otras un krustojas atkal tikai pēc 20 mēnešu izsekošanas laika. Mediānais izdzīvotības laiks pacientiem ar augstu Ki-67 proliferāciju bija 7,4 (95 % TI = 5,7–9,1) mēneši, savukārt ar zemu proliferāciju – 13,5 (95% TI = 9,1–17,8) mēneši. Atbilstoša Kaplāna-Meijera līkne redzama 2.23. attēlā.

2.22. attēls. Kaplāna-Meijera kumulatīvās izdzīvotības līkne GBM pacientiem attiecībā PDGFRA (robežvērtība 50 %)

2.23. attēls. Kaplāna-Meijera kumulatīvās izdzīvotības līkne GBM pacientiem attiecībā Ki-67 (robežvērtība 25 %)

2.8.2. DA imūnhistoķīmiskie prognostiskie marķieri

Statistiski ticama izdzīvotības laika atšķirība tika konstatēta pacientiem ar DA attiecībā uz Ki-67 proliferācijas frakciju, izmantojot ekspresijas robežvērtību 5,5 % (*log-rank*, $p = 0,037$). Augsta Ki-67 proliferācijas frakcija (virs 5,5 %) konstatēta 12/23 (52,2 %; 95 % TI = 33,0–70,8) pacientiem, savukārt zema proliferācija bija 11/23 (47,8 %; 95 % TI = 29,2–67,0) pacientiem. Pētījuma beigās, audzēju grupā ar augstu proliferāciju nomira 7/12 (58,3 %; 95 % TI = 31,9–80,7) pacientu, salīdzinot ar 2/11 (18,2 %; 95 % TI = 5,1–47,7) pacientiem audzēju grupā ar zemu proliferāciju. Mediānais izdzīvotības laiks DA pacientiem ar augstu Ki-67 proliferāciju bija 60,6 (95 % TI = 35,3–85,9) mēneši. Mediāno izdzīvotības laiku zemas proliferācijas audzēju grupā nevarēja aprēķināt sakarā ar zemo nāves gadījumu skaitu. Atbilstoša Kaplāna-Meijera līkne redzama 2.24. attēlā.

Statistiski ticama izdzīvotības laika atšķirība tika konstatēta pacientiem ar DA attiecībā uz PDGFRA ekspresiju, izmantojot ekspresijas robežvērtību 50 % (*log-rank*, $p = 0,017$). Augsta PDGFRA ekspresija (virs 50 %) konstatēta 10/19 (52,6 %; 95 % TI = 31,7–72,6) pacientiem, savukārt zema ekspresija bija 9/19 (47,3 %; 95 % TI = 27,3–68,3) pacientiem. Pētījuma beigās audzēju grupā ar augstu PDGFRA ekspresiju nomira 1/10 (10 %; 95 % TI = 1,8–40,4) pacientu, salīdzinot ar 5/9 (55,6 %; 95 % TI = 26,7–81,1) pacientiem audzēju grupā ar zemu PDGFRA ekspresiju. Mediānais izdzīvotības laiks DA pacientiem ar zemu PDGFRA ekspresiju bija 61,4 (95 % TI = 9,9–112,0) mēneši. Mediāno izdzīvotības laiku augstas PDGFRA ekspresijas audzēju grupā nevarēja aprēķināt sakarā ar zemo nāves gadījumu skaitu pētāmā grupā. Atbilstoša Kaplāna-Meijera līkne redzama 2.25. attēlā.

Attiecībā uz pārējiem pētītajiem imūnhistoķīmiskajiem marķieriem statistiski nozīmīgas atšķirības, analizējot izdzīvotības laiku, nekonstatēja.

2.24. attēls. Kaplāna-Meijera kumulatīvās izdzīvotības līkne DA pacientiem attiecībā Ki-67 (robežvērtība 5,5 %)

2.25. attēls. Kaplāna-Meijera kumulatīvās izdzīvotības līkne DA pacientiem attiecībā PDGFRA (robežvērtība 50 %)

2.9. Gliomu imūnhistoķīmiskie subtipi un izdzīvotības laiks

Gliomu subtipu noteikšana veikta, analizējot šādu imūnhistoķīmisku marķieru ekspresiju – p53, IDH1 R132H, PDGFRA un CD44 (skat. Materiāli un metodes). Balstoties uz šo marķieru ekspresijas signatūrām, tika izšķirtas trīs GBM kategorijas: proneirāls, mezenhimāls un neklasificēts subtips, apzīmēts ar “Cits”. Gliomu subtipu noteikšana tika pārbaudīta ar divām dažādas imūnhistoķīmisko marķieru ekspresijas robežvērtībām, kuras tika izvēlētas gan pēc starptautiskajos pētījumos aprakstītajām robežvērtībām līdzīga rakstura pētījumos, gan balstoties uz mediāno marķiera ekspresijas vērtību šajā pētījumā.

2.9.1. GBM imūnhistoķīmiskie subtipi

Lielākā daļa no GBM gadījumiem piederēja pie proneirālā subtipa – 73/146 (50,0 %; 95 % TI = 42,0–58,0), tam neklasificēta subtipa gadījumi – 46/146 (31,5 %; 95 % TI = 24,5–39,4) un mezenhimāla subtipa gadījumi – 27/146 (18,5 %; 95 % TI = 13,0–25,6). Pētījumā netika konstatētas asociācijas starp GBM subtipiem un pārējo analizēto imūnhistoķīmisko marķieru ekspresiju (Ki-67, MVD, p21, p27). Izdzīvotības laika analīzes rezultāti neatklāja statistiski nozīmīgas atšķirības starp GBM subtipiem (*log-rank*, $p = 0,424$) (2.26.A attēls). Taču, kad tika analizēta pielietotās terapijas efektivitāte attiecībā uz katru subtipu, tika konstatētas statistiski ticamas mediānās izdzīvotības laika atšķirības starp GBM subtipiem. Atbilstoša Kaplāna-Meijera līkne apskatāmas 2.26. attēlā.

Proneirāla subtipa gadījumā tika novērota tendence mediānajam izdzīvotības laikam atšķirties (*log-rank*, $p = 0,061$) starp pacientiem, kuri saņēmuši standarta terapiju ar temozolamīdu un radioterapiju, salīdzinot ar pacientiem, kuri ir saņēmuši tikai radioterapiju. Veicot Kaplāna-Meijera kumulatīvās izdzīvotības līknes analīzi, iezīmējas arī izteikta vizuāla tendence uz atšķirīgiem līknes kritumiem (2.26.B attēls). Saņemot tikai radioterapiju, mediānais izdzīvotības laiks pacientiem ar proneirālu GBM subtipu ir statistiski

ticami lielāks (*log-rank*; $p = 0,008$), salīdzinot ar pacientiem, kuriem veikta tikai ķirurģiska audzēja rezekcija bez adjuvantas terapijas.

Mezenhimāla subtipa gadījumā pacientiem, kuri saņēmuši standarta adjuvantu terapiju ar temozolamīdu, novēroja statistiski ticami labākus (*log-rank*; $p = 0,002$) mediānās izdzīvotības rādītājus, salīdzinot ar pacientiem, kuri saņēmuši tikai radioterapiju. Savukārt, atšķirībā no proneirālā subtipa, pacientiem ar GBM mezenhimālo subtipu adjuvanta radioterapija nav uzlabojusi izdzīvotības laiku, salīdzinot ar tikai ķirurģisku ārstēšanu saņēmušajiem pacientiem (*log-rank*; $p = 0,857$) (2.26.C attēls). Tādējādi rezultāti parāda, ka adjuvantai radioterapijai nav labvēlīga terapeitiskā efekta un tā neietekmē pacientu izdzīvotības laiku, mezenhimālā GBM subtipa gadījumā.

Pārējiem GBM gadījumiem, kurus neizdevās iekļaut atbilstoša subtipa kategorijā, netika konstatētas statistiski ticamas atšķirības starp izdzīvotības rādītājiem šādās grupās: adjuvanta ķīmijterapija ar temozolamīdu kopā ar radioterapiju, salīdzinot ar tikai adjuvantu radioterapiju saņēmušajiem pacientiem ($p = 0,319$), kā arī starp tikai adjuvantu radioterapiju saņēmušajiem un tikai ķirurģisku ārstēšanu saņēmušajiem pacientiem (*log-rank*; $p = 0,080$) (2.26.D attēls). Atbilstošas Kaplāna-Meijera līknes apskatāmas 2.26. attēlā. Mediānās izdzīvotības laika rādītāji katram GBM subtipam atkarībā no saņemtas ārstēšanas kopā ar p-vērtībām ir apkopoti 2.4. tabulā.

Papildus iepriekš aprakstītajiem subtipiem ir izmēģināta subtipu noteikšana, izmantojot arī šajā pētījumā iegūtās marķieru robežvērtības, kuras balstītas uz marķiera mediāno ekspresijas daudzumu. Atbilstoši uz mediāno marķiera ekspresiju balstītām robežvērtībām, GBM subtipu sadalījums bija šāds: proneirāls subtips 95/146 (65,1 %; 95 % TI = 57,0–72,3), neklasificēts subtips – 32/146 (21,9 %; 95 % TI = 15,9–29,3), mezenhimāls subtips – 19/146 (13,0%; 95% TI = 8,5–19,4). Arī šajā gadījumā netika konstatētas asociācijas starp GBM subtipu un citiem pētītajiem imūnhistoķīmiskajiem marķieriem (Ki-67, MVD,

p21, p27). Izzdzīvotības laika analīzes rezultāti arī neatklāja statistiski nozīmīgas atšķirības starp GBM subtipiem (*log-rank*, $p = 0,511$). Analizējot šo GBM subtipu izdzīvotības laika atšķirības, atkarībā no saņemtajā terapijas veida, konstatē līdzīgus rezultātus, kā arī veicot Kaplāna-Meijera kumulatīvās izdzīvotības līknes analīzi, ir līdzīga vizuāla tendence uz atšķirīgiem līknes kritumiem, kā tas bija GBM subtipiem, kuri balstījās uz literatūrā aprakstītajām marķieru robežvērtībām.

2.4. tabula

Mediānās izdzīvotības laiki pacientiem ar dažādiem GBM subtipiem, atkarībā no saņemtās terapijas veida, kopā ar p vērtībām

Subtips (n=135*)	Saņemtā terapija (n =135*)	Mediānais izdzīvotības laiks	95 % TI	p vērtības		
Proneirāls (n=66)	TMZ + radioterapija (n=25)	12,3	8,4–16,2	0,061	0,008	<0,001
	Radioterapija (n=27)	7,6	7,1–8,1			
	Tikai ķirurģija (n=14)	2,4	1,1–3,6			
Mezenhimāls (n=26)	TMZ + radioterapija (n=11)	11,7	6,4–16,9	0,002	0,857	0,003
	Radioterapija (n=9)	2,7	0,3–5,0			
	Tikai ķirurģija (n=6)	2,7	2,0–3,3			
Cits (n=43)	TMZ + radioterapija (n=20)	12,2	6,7–17,6	0,319	0,080	0,031
	Radioterapija (n=14)	8,3	3,7–12,9			
	Tikai ķirurģija (n=9)	4,9	3,9–5,9			

* dati par saņemto terapiju bija pieejami 135 gadījumos;

** saīsinājumi tabulā: TMZ, temozolamīds; OS, TI, ticamības intervāls.

2.26. attēls. Kaplāna-Meijera kumulatīvās izdzīvotības līkne GBM pacientiem attiecībā uz GBM subtipu, ņemot vērā ārstēšanas veidu

2.9.2. DA imūnhistoķīmiskie subtipi

Izmantojot abas marķieru ekspresijas robežvērtības, lielākā daļa no DA iekļāvās proneirāla subtipa kategorijā – 24/26 (92,3 %; 95% TI = 75,8–97,9), atlikušie 2/26 (7,6 %; 95 % TI = 2,1–24,1%) gadījumi piederēja pie neklasificēta subtipa. CD44 ekspresija visās DA bija ļoti zema, izmantojot ekspresijas robežvērtību 50 %, tikai vienā gadījumā CD44 ekspresija sasniedza šo līmeni. Sakarā ar nelielu pētījuma grupu un proneirālas signatūras predominanci gandrīz visos DA gadījumos, izdzīvotības analīze pēc subtipa netika veikta.

3. Diskusija

Difūzas gliomas incidences ziņā nav vieni no biežāk sastopamajiem ļaundabīgajiem audzējiem, bet tās noteikti ir vieni no agresīvākajiem audzējiem ar ļoti ierobežotām ārstēšanas iespējām. Viena no agresīvākajām gliomām ir GBM, tādēļ daudzi starptautiski pētījumi ir veltīti šī audzēja izpētei. Ir svarīgi apzināties specifisku signālceļu, kā arī gliomu galveno pamatīpašību (piem., invāzija, proliferācija, rezistence pret terapiju) nosakošo specifisko molekulāru izmaiņu lomu, kas varētu sniegt cerību nākotnē uzlabot gliomu ārstēšanu un varbūt pat pavērt iespēju attīstīties personalizētai molekulārai mērķterapijai. Mūsdienās GBM standartterapija iekļauj maksimāli iespējamu audzēja ķirurģisku rezekciju, kuru papildina ar ķīmijterapiju ar temozolamīdu un radioterapiju, taču pat ar šādu ārstēšanu prognoze ir slikta (Stupp *et al.*, 2014; Stupp *et al.*, 2005). Tomēr pēdējās desmitgades laikā izpratne par gliomu molekulāro bioloģiju ir krietni uzlabojusies, lielā mērā, pateicoties daudziem apjomīgiem pētījumiem un jauniem tehnoloģiskiem sasniegumiem. Viens no šādiem milzīgiem sasniegumiem bija GBM šūnu pilna genoma sekvenčēšana, kas veikta lielai pacientu grupai TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) projekta ietvaros (Cancer Genome Atlas Research, 2008). Pateicoties šim projektam, un vēl vairākiem citiem plaša mēroga gliomu pētījumiem ir atklāti un raksturoti vairāki kritiski gliomu patoģenēzē iesaistīti gēni, piemēram, mutācijas IDH1, IDH2, EGFR, PDGFRA, ATRX u. c. gēnos ir bieži sastopamas gliālos audzējos (Brennan *et al.*, 2013; Parsons *et al.*, 2008; Verhaak *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2009).

Pētījumi parāda, ka GBM nav vienveidīgs audzējs, kā tika uzskatīts iepriekš, bet ir molekulāri un bioloģiski atšķirīgu audzēju grupa, pat ar identisku morfoloģiju. Pētījumos konstatēti vairāki gliomu subtipi, kurus raksturo atšķirīgas molekulāras un proteīnu ekspresijas signatūras (Motomura *et al.*, 2012; Parsons *et al.*, 2008; Verhaak *et al.*, 2010). Piemēram, Verhaak *et al.*, veicot plašu, lielapjoma gēnu ekspresijas profilēšanu, atklāja četrus bioloģiski

atšķirīgus GBM molekulāros subtipus – klasisko, proneirālo, mezenhimālo un neirālo subtipu (Verhaak *et al.*, 2010). Audzējus ar līdzīgām molekulārām signatūrām un gēnu ekspresijas profiliem, visticamāk, apvieno kopīga patoģenēze, un zināšanas par to potenciāli varētu tikt izmantotas jaunas mērķterapijas izstrādei, kā arī ieviestu jaunus prognostiskus un predikatīvus faktorus, padarot ārstēšanu vairāk personalizētu.

Gliomu molekulārā profilēšana ir ļoti laikietilpīgs un dārgs process, kas nav piemērojams ikdienas klīniskajā praksē. Praktiskiem mērķiem imūnhistoķīmija (IHĶ) joprojām paliek kā ērts un nozīmīgs līdzeklis prognostisko faktoru izvērtēšanā klīniskajā vidē, jo metode ir daudz lētāka un vieglāk veicama. Pēdējo gadu molekulārie atklājumi paver arī plašākas iespējas IHĶ izmantošanai, piemēram, imūnhistoķīmiska IDH1 R132H mutācijas noteikšana gliomās tagad ir plaši pieejama arī rutīnas praksē.

Vairāki autori ir veiksmīgi mēģinājuši veikt GBM subtipēšanu, izmantojot IHĶ metodi (Le Mercier *et al.*, 2012; Popova *et al.*, 2014; Trabelsi *et al.*, 2016).

Šajā pētījumā tika izmantota IHĶ, lai izvērtētu vairākas audzēja bioloģiskās pamatīpašības (invāzija, proliferācija, šūnas cikla regulācija) nosakošu proteīnu ekspresiju un savstarpējās korelācijas. Kā arī iedvesmojoties no Verhaak *et al.* aprakstītās gliomu klasifikācijas, tika mēģināts ar IHĶ palīdzību, izmantojot par pamatu jau aprakstītās molekulārās signatūras, atšķirt šīs gliomu grupas un raksturot to prognostisko vai prediktīvo nozīmi.

3.1. Kopējā izdzīvotība

Šajā pētījumā GBM pacientu mediānais izdzīvotības laiks bija 7,9 (95 % TI = 6,8 – 9,0) mēneši, kas kopumā ir nedaudz īsāks, salīdzinot ar vairāku citu autoru pētījumiem, kuros mediānais izdzīvotības laiks bija intervālā no 9,7 līdz 13,6 mēnešiem (Back *et al.*, 2007; Johnson and O'Neill, 2012; Kumar *et al.*, 2013; Ulutin *et al.*, 2006). Šajā pētījumā bija tikai divi (1,5 %; 95 % TI = 0–5,8)

GBM pacienti, kuri izdzīvoja ilgāk par trim gadiem. Visgarākais izdzīvotības laiks bija 56 mēneši jeb 4,6 gadi. Šajā pētījumā viena un divu gadu izdzīvotības rādītāji bija 36,3 % un 9,6 %, kas arī ir nedaudz mazāki, salīdzinot ar citām publikācijām (Ahmadloo *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2009; Paszat *et al.*, 2001; Scoccianti *et al.*, 2010).

Pacientiem ar DA bija daudz labāka prognoze, salīdzinot ar GBM. Šajā pētījumā divu un trīs gadu izdzīvotības rādītāji DA pacientiem bija 88 % un 80 %. Mediāno izdzīvotības laiku DA pacientiem nevarēja aprēķināt sakarā ar īso novērošanas laiku un mazu pētāmo grupu. Pētnieki no ASV (Mejo klīnikas; *Mayo Clinic*), veicot apjomīgu izdzīvotības laika analīzi pacientiem ar difūzām gliomām, kur mediānais novērošanas laiks bija 13,6 gadi, konstatēja, ka DA mediānais izdzīvotības laiks bija 6,9 gadi, kā arī 10 gadu dzīvildze bija 36 % (Schomas *et al.*, 2009). Šajā pētījumā mediānais novērošanas laiks gliomu pacientiem bija 60,2 mēneši jeb 5,0 gadi. Kas ir adekvāts novērošanas laiks GBM pacientiem, kuriem ir ļoti slikta prognoze. Taču pacientiem ar DA precīzākai izdzīvotības analīzei vēlams ilgāks novērošanas periods.

3.2. Klīniskie un morfoloģiskie parametri

Dzimums

Šis pētījums analogi citiem apstiprina, ka gan GBM, gan DA vienādi bieži attīstās vīriešiem un sievietēm. Dažos pētījumos ir aprakstīta nedaudz biežāka gliomu attīstība vīriešiem, tomēr lielākajā daļā pētījumu dzimumatšķirības ir niecīgas un vīriešu/sieviešu attiecība nepārsniedz 1,3 (Dobes *et al.*, 2011; Kushnir and Tzuk-Shina, 2011; Sun *et al.*, 2015). Arī izdzīvotības rādītāji starp dzimumiem neatšķiras, kas nav pretrunā ar citu autoru pētījumiem. Ir daži pētījumi, kuros konstatēta nedaudz labāka prognoze vīriešu pacientiem, tomēr

daudzfaktoru analīze parādīja, ka sievietes pētāmajā grupā bija vecākas, kas arī varētu izskaidrot šādas atšķirības (Tugcu *et al.*, 2010; Verger *et al.*, 2011).

Vecums

Šajā pētījumā GBM un DA pacientu vidējais vecums bija atbilstoši 62,0 un 37,5 gadi, kas atbilst citu autoru datiem (Osztvald *et al.*, 2012; Schomas *et al.*, 2009; Schwartzbaum *et al.*, 2006). Šajā pētījumā bija 5 pacienti ar sekundāru GBM, kuru vidējais vecums bija 50,6 gadi, kas ir nedaudz virs citos pētījumos aprakstītā vidējā vecuma sekundārām GBM, bet tajos pētījumos bija arī daudz lielāks pacientu skaits (Juratli *et al.*, 2013; Ohgaki and Kleihues, 2007).

Šajā pētījumā lielāks pacientu vecums bija saistīts ar sliktāku prognozi, ko arī apstiprina citi autori (Buckner, 2003; Scott *et al.*, 2012).

Audzēja lokalizācija

Šajā pētījumā biežāk sastopamā GBM lokalizācija bija pieres daiva ar 56/146 (38,4 %; 95 % TI = 30,5–46,3) gadījumiem, tad deniņu daiva – 41/146 (28,1 %; 95 % TI = 20,8–35,4). Šie dati ir līdzīgi citu pētījumu datiem, kur pieres daivā lokalizējās 40–43 % audzēju, bet deniņu daivās – 28–29% (Larjavaara *et al.*, 2007; Simpson *et al.*, 1993). Pacientiem ar DA visbiežāk sastopamā audzēja lokalizācija arī bija pieres un deniņu daivas, atbilstoši 13/26 (50 %; 95 % TI = 30,8–69,2) un 6/26 (23,1 %; 95 % TI = 6,9–39,3) gadījumu, kas konstatēts arī citu autoru darbos (Capelle *et al.*, 2013; Duffau and Capelle, 2004; Larjavaara *et al.*, 2007).

Šajā pētījumā multifokālas GBM tika konstatētas 11 % gadījumu, līdzīgi kā citos pētījumos, kuros biežums ir no 8 līdz 10 % (Barnard and Geddes, 1987; Djalilian *et al.*, 1999; Giannopoulos and Kyritsis, 2010).

Audzēja izmērs

Tā kā gliomas plaši infitrē galvas smadzeņu audus vēl pirms attīstās klīniskā simptomātika, lielākā daļa gliomu diagnozes atklāšanas brīdī ir liela izmēra audzēji. Šajā pētījumā lielākā daļa GBM un DA bija lieli audzēji ar izmēru virs 4 cm. Ir salīdzinoši maz pētījumu, kuros aprakstīta saistība starp audzēja izmēru un prognozi, dažās no šīm publikācijām liels audzēja izmērs bija saistīts ar sliktāku prognozi (Kashi *et al.*, 2015; Raysi Dehcordi *et al.*, 2012). Arī šajā pētījumā audzēji ar izmēru virs 4 cm bija ar sliktāku prognozi nekā mazāki audzēji.

Morfoloģija

Visas GBM šajā pētījumā bija diagnosticētas atbilstoši PVO CNS audzēju klasifikācijai, 2016. Morfoloģiski GBM raksturo nekroze (išēmiska vai/un pseidopalisadējoša) un mikrovaskulāra proliferācija. Lielākā daļa GBM šajā pētījumā bija ar klasisku morfoloģiju – 141/146 (96,6 %; 95 % TI = 93,7–99,5), bet tika konstatētas arī divas (1,4 %) gigantšūnu GBM un trīs (2,1 %) gliosarkomas. Šo reto GBM morfoloģisko tipu biežums ir atbilstošs citos pētījumos aprakstītajam, kur gigantšūnu GBM veidoja 2–8 %, un gliosarkomas 1–5 % no visiem gadījumiem (Castelli *et al.*, 2016; Kozak and Moody, 2009; Meis *et al.*, 1991; Valle-Folgueral *et al.*, 2008). Attiecībā uz pieciem pacientiem ar imūnhistoķīmiski apstiprinātu sekundāru GBM (IDH1 R132H pozitīva) tikai vienā GBM gadījumā konstatēja zemākas anaplāzijas pakāpes audzēja komponenti, tādējādi apstiprinot sekundāru izcelsmi arī morfoloģiski. Papildu tam vienā no IDH1 R132H pozitīvajiem GBM gadījumiem konstatēja fokāli palielinātu gemistocītisko astrocītu daudzumu. Atsevišķās publikācijās minēts, ka palielinātu gemistocītu daudzumu bieži konstatē sekundārās GBM, taču tā nav droša pazīme (Reis *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 1997).

Visi 26 DA gadījumi bija diagnosticēti morfoloģiski atbilstoši PVO CNS audzēju klasifikācijai, 2016. Visas DA šajā pētījumā bija ar zemu un vidēju celularitāti, atsevišķākas audzēja šūnas bija ar vieglām šūnu un kodolu atipijas pazīmēm, tika konstatētas retas mitozes – līdz 2 mitozēm uz 10 lielā palielinājuma redzes laukiem.

3.3. Gliomu imūnhistokīmiskais profils

Ki-67

Ki-67 proliferācijas frakcija tieši raksturo audzēju bioloģisko potenciālu, un palielināta proliferācija gliomas korelē ar augstāku gliomas malignitātes pakāpi (Arshad *et al.*, 2010; Johannessen and Torp, 2006; Skjulsvik *et al.*, 2014).

Šajā pētījumā Ki-67 proliferācijas frakcija ievērojami atšķīrās starp GBM un DA – 44,4 % (95 % TI = 41,1–47,6) un 6,4 % (95 % TI = 4,7–8,0). Vidējā Ki-67 proliferācijas vērtība – 44,4 %, GBM bija augstāka, salīdzinot ar citos pētījumos aprakstītajām – 12 % to 32 % (Kleinschmidt-DeMasters *et al.*, 2005; Shivaprasad *et al.*, 2016; Wakimoto *et al.*, 1996).

Ki-67 proliferācijas vidējā un mediānā vērtība DA šajā pētījumā bija 6,4 % (95 % TI = 4,7–8,0) un 5,5 (IQR = 6). Salīdzinājumam, norvēģu autoru pētījumā Ki-67 proliferācijas vidējās un mediānās vērtības DA bija līdzīgas – atbilstoši 5,2 % un 4,5 %, kā arī vērtību intervāls bija no 1 % līdz pat 16 % (Tove *et al.*, 2012).

Attiecībā uz Ki-67 prognostisko lomu GBM dati ir ļoti pretrunīgi – ir autori, kuri apraksta Ki-67 kā nozīmīgu prognostisku faktoru (Ho *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2011), un ir pētījumi, kur tam nekonstatē prognostisku nozīmi (Moskowitz *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2013). Daudzos pētījumos tika izmantotas arī ļoti atšķirīgas Ki-67 ekspresijas robežvērtības (piem., 12,5 %, 25 %, 35 % u.c.) GBM pacientu izdzīvotības laika analīzē (Ho *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2011; Moskowitz *et al.*, 2006). Šajā pētījumā, izmantojot abas robežvērtības (25 % un

41 %), netika konstatēta prognostiska nozīme Ki-67 proliferācijas frakcijai. Tomēr, izmantojot robežvērtību 25 %, vizuāli ir redzamas izdzīvotības laika līkņu atšķirības starp augstu un zemu Ki-67 proliferācijas frakciju, bet rezultāts nav statistiski ticams.

Tomēr attiecībā uz DA Ki-67 proliferācijas frakcijai ir prognostiska nozīme, kas pierādījās šajā pētījumā. Citi autori arī apstiprina Ki-67 prognostisko nozīmi zemas malignitātes gliomās, bet ne GBM (Johannessen and Torp, 2006; Tove *et al.*, 2012).

Šajā pētījumā GBM grupā novērota korelācija starp Ki-67 proliferācijas frakciju un p53 proteīna ekspresiju ($r_s = 0,196$; $p = 0,027$). Kā arī p27 proteīna ekspresijai bija tendence uz negatīvu korelāciju ar Ki-67. Tas varētu liecināt par to, ka p27 zudums un aberanta p53 proteīna uzkrāšanās audzēja šūnās varētu būt saistīta ar augstāku proliferatīvo potenciālu GBM šūnās.

Šajā pētījumā interesantas ir konstatētās dzimumatšķirības pacientiem ar DA – Ki-67 ekspresija bija statistiski ticami augstāka vīriešiem ($z = 2,563$; $p = 0,010$). Lai arī iemesls šādām dzimumatšķirībām nav īsti skaidrs, pašlaik strauji palielinās pētījumu daudzums, kuros aprakstīta dzimumhormonu loma gliomu patoģenēzē un konstatētas atšķirības gēnu ekspresijas profilos atšķirīga dzimuma pacientiem (Hartman *et al.*, 2009; Paruthiyil *et al.*, 2004; Sareddy *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2013). Atsevišķos pētījumos dzimumatšķirību pamatā ir uzsvērta iespējama estrogēna receptora beta (ER β) loma, kam pierādīta tumoru supresora aktivitāte, un šī receptora izzudums bieži ir saistīts ar daudzu audzēju, arī gliomu augstāku malignitātes pakāpi, un progresijas risku (Bardin *et al.*, 2004; Burns and Korach, 2012). Taču pēc pēdējo gadu pētījumiem ir pamats domāt, ka tam ir daudz sarežģītāka izcelsme, un gliomas starp dzimumiem var atšķirties pat pēc to molekulāriem, metilācijas un proteīnu ekspresijas profiliem (Johansen *et al.*, 2020; Kfoury *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2019).

p53

Normālās šūnās p53 proteīns ir sastopams nelielā daudzumā, jo tam ir ļoti īss pussabrukšanas periods, bet TP53 gēna mutācijas var izraisīt aberanta p53 proteīna uzkrāšanos, kurš ir daudz stabilāks (Ashcroft and Vousden, 1999). Aberanta p53 proteīna klātbūtni var pierādīt imūnhistoķīmiski kā intensīvu, nukleāru ekspresiju.

Šajā pētījumā GBM pacientiem p53 proteīna ekspresiju konstatēja 64,3 % (95 % TI = 55,6–72,1) gadījumos, izmantojot ekspresijas robežvērtību 10 %. Citu autoru pētījumos p53 pozitīva ekspresija, izmantojot identisku robežvērtību, variēja no 41 % līdz pat 75 % (Kawasoe *et al.*, 2015; Popova *et al.*, 2014; Takano *et al.*, 2012). Šajā pētījumā intensīvu p53 proteīna ekspresiju virs 50 % audzēja šūnu konstatēja 31,7 % (95 % TI = 24,2–40,3) gadījumos, kas atbilst arī Houillie *et al.* aprakstītajiem 37 % gadījumu ar robežvērtību 50 % (Houillier *et al.*, 2006).

Šajā pētījumā augstu p53 ekspresiju konstatēja visos sekundāru GBM gadījumos (IDH1 R132H pozitīvas), salīdzinot tikai ar pusi no pārējiem IDH1 R132H negatīviem GBM gadījumiem, un analizējot vidējo p53 ekspresijas līmeni, tas atbilstoši bija 98,6 % un 32,7 %. Šo novērojumu apstiprina arī citi pētījumi, kuros konstatē augstu TP53 gēna mutāciju biežumu un augstu p53 proteīna ekspresiju sekundārās GBM (Ohgaki and Kleihues, 2007; Takano *et al.*, 2012; Watanabe *et al.*, 1996).

Pacientiem ar DA augsta p53 proteīna ekspresija (robežvērtība 10 %), konstatēta 75,0 % (95 % TI = 55,1–88,0) gadījumu, kas sakrīt ar Gillet *et al.*, datiem – arī 75 % gadījumu (Gillet *et al.*, 2014).

Šajā pētījumā nekonstatēja p53 proteīna ekspresijas atšķirību starp GBM un DA ($p = 0,416$), kas atbilst arī citu autoru datiem (Ali and Jalal, 2013; Nayak *et al.*, 2004).

Ne GBM, ne DA netika arī konstatēta prognostiska nozīme p53 ekspresijai, kas nav pretrunā ar citiem pētījumiem (Houillier *et al.*, 2006; Simmons *et al.*, 2001; Takano *et al.*, 2012).

Šajā pētījumā GBM pacientiem p53 proteīna ekspresija uzrādīja pozitīvu korelāciju ar Ki-67 ($r_s = 0,196$; $p = 0,027$), PDGFRA ($r_s = 0,181$; $p = 0,043$) un MVB ($r_s = 0,228$; $p = 0,031$). Attiecībā uz korelāciju starp p53 un PDGFRA gan TP53, gan PDGFRA gēnu mutācijas ir biežāk sastopamas proneirāla subtipa GBM (Verhaak *et al.*, 2010).

p21

p21 proteīns ir svarīgs šūnas cikla inhibitors, kas iesaistīts šūnas cikla kontrolē (apoptoze, transkripcija, šūnas cikla progresija) gan normālās, gan audzēja šūnās (Coqueret, 2003). p21 proteīnam bieži var būt arī duāla loma, izraisot savstarpēji pretējus efektus, – papildus audzēju supresora efektam, tas var darboties arī kā onkoproteīns, nomācot apoptozi (De la Cueva *et al.*, 2006; Gartel, 2006).

Šajā pētījumā vidējā p21 proteīna ekspresija GBM bija 21,2 % (95 % TI = 18,7–23,6), kas ir ļoti līdzīgi citu autoru datiem (Kirla *et al.*, 2003).

Šajā pētījumā konstatēta palielināta p21 ekspresija GBM – 49,3 % (95 % TI = 41,3–57,4), salīdzinot ar DA – 15 % (95 % TI = 5,2–36,0), arī citos pētījumos apstiprinoši aprakstīta augstāka p21 ekspresija augstas malignitātes pakāpes gliomas (Zolota *et al.*, 2008). Paradoksāli, bet augstas malignitātes audzējos, kas ir proliferatīvi aktīvāki, ir arī augstāka p21 ekspresija, kas varētu liecināt par p21, kā onkoproteīna iesaisti, iespējams, saistībā ar apoptozes nomākšanu.

Šajā pētījumā konstatēta asociācija starp samazinātu p21 ekspresiju un lielāku GBM izmēru, kas pārsniedz 4 cm ($z = -2,460$; $p = 0,014$). Šo asociāciju arī papildina negatīva korelācija starp p21 ekspresiju un lielāko audzēja izmēru

($r_s = -0,181$; $p = 0,045$). Šie novērojumi liecina, ka samazināta p21 ekspresija var veicināt ātrāku audzēja augšanu, kas nav pretrunā ar p21 galveno funkciju, t.i., audzēju supresora proteīna efektu un spēju inhibēt šūnas ciklu (Abbas and Dutta, 2009; Warfel and El-Deiry, 2013).

Pacientiem ar DA tika konstatēta arī pozitīva korelācija starp p21 un MVB ($r_s = 0,448$; $p = 0,049$), kas varētu liecināt par p21 iesaisti arī angiogēnēzes procesā. Vairāku autoru pētījumos papildu anti-apoptotiskam efektam ir aprakstīts arī no p21 atkarīgs, angiogēnēzi veicinošs efekts audzēja šūnās, kas varētu būt kā loģisks pamatojums šādai korelācijai (Kuljaca *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010).

p27

p27 ir ciklīna-ciklīna atkarīgās kināzes inhibitors un audzēju supresors, kas spēj apturēt šūnas cikla progresiju (Moller, 2000). Audzēju šūnās p27 ekspresija parasti ir samazināta, kas ir saistīts ar tā modifikāciju postranslācijas līmenī un palielinātu p27 degradāciju proteosomās (Bloom and Pagano, 2003; Piva *et al.*, 1999).

Šajā pētījumā p27 proteīna ekspresija GBM bija konstatēta 60,1 % (95 % TI = 50,9–68,7) gadījumu, kas ir ļoti tuvs rezultāts cita pētnieka iegūtajiem 57,2 %, izmantojot analoģu robežvērtību (Yang *et al.*, 2011). Savukārt pacientiem ar DA p27 ekspresija bija ievērojami augstāka – 86,9 % (95 % TI = 67,8–95,4) gadījumu, un arī šis rezultāts ir līdzīgs divos citos pētījumos aprakstītajām p27 ekspresijas vērtībām DA – 92,8 % un 81,2 % (Faria *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011). Ņemot vērā iepriekš minēto, var secināt, ka p27 ekspresijas zudums ir saistīts ar augstāku audzēja malignitātes pakāpi, ko apstiprina arī liela daļa pētījumu (Faria *et al.*, 2007; Kirla *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2011; Zolota *et al.*, 2008). Turklāt šajā pētījumā tika konstatēta arī tendence uz negatīvu korelāciju ($r_s = -0,199$; $p = 0,055$) starp p27 un Ki-67 indeksu

pacientiem ar GBM, kas vēlreiz liecina par to, ka p27 ekspresijas zudums ir saistīts ar audzēja agresīvāku un proliferatīvi aktīvāku fenotipu. Negatīvu korelāciju starp p27 un Ki-67 gliomās apstiprina arī citi autori (Cavalla *et al.*, 1999; Fuse *et al.*, 2000; Kirla *et al.*, 2003).

p27 proteīna ekspresijā konstatēta arī interesanta asociācija ar pacienta dzimumu, tādējādi p27 ekspresija bija pārliecinoši zemāka sievietēm ($z = -2,174$; $p = 0,030$). Vērtējot šo asociāciju, daudzu citi autoru publicētajos pētījumos nav atrasta informācija attiecībā uz p27 ekspresijas dzimumatšķirībām gliomās, taču šis rezultāts nav pretrunā ar Huang *et al.* novērojumiem par to, ka estrogēni veicina, savukārt progesterons inhibē ubikvitīna-proteosomu sistēmas atkarīgu, nukleāra p27 proteīna destrukciju, kas pētīta endometrija vēža šūnās (Huang *et al.*, 2012).

CD44

CD44 ir transmembranozs glikoproteīns, kas piedalās adhēzijā starp šūnām, kā arī starp šūnām un ekstracelulāro matricu, piesaistot hialuronskābi (Dzwonek and Wilczynski, 2015; Naor *et al.*, 1997). CD44 membranozā lokalizācija un izteiktā afinitāte uz ekstracelulārā matricas komponentiem kā hialuronskābi veicina audzēja šūnu invāziju un migrāciju (Bradshaw *et al.*, 2016). CD44 piesaistīšanās hialuronskābei, iespējams, veicina audzēja progresiju arī saistībā ar citiem mehānismiem, tādiem kā tirozīnkināzes un specifisku intracelulāru signālceļu aktivācija (Mooney *et al.*, 2016; Shepard, 2015; Thapa and Wilson, 2016). CD44 molekulai ir atklātas vairākas izoformas, kas veidojas alternatīvā splaisinga un sekojošu posttranslācijas mehānismu rezultātā, līdz ar to šai molekulai raksturīga liela funkcionāla daudzveidība (Prochazka *et al.*, 2014). CD44 ir arī viens no vēža cilmes šūnu marķieriem dažādos audzējos, tai skaitā arī gliālajos. Attiecībā uz centrālo nervu sistēmu CD44 tiek aprakstīts kā marķieris neirālām cilmes šūnām, kā arī astrocītu un

oligodendrocītu priekštečiem (Liu *et al.*, 2004; Naruse *et al.*, 2013). Daži autori uzskata, ka CD44 ir neirālu cilmes šūnu marķieris, kas ekspresējas daļēji diferencētās, vēl nenobriedušās šūnās (Bradshaw *et al.*, 2016).

CD44 ir iesaistīts audzēja šūnu mezenhimālajā transformācijā, veicinot invāziju (Xu *et al.*, 2015). Gliomu molekulārajā klasifikācijā CD44 ir aprakstīts kā mezenhimāla GBM subtipa marķieris (Phillips *et al.*, 2006; Verhaak *et al.*, 2010). CD44 ekspresijas imūnhistoķīmiska noteikšana ir ieteikta vairāku autoru pētījumos, veicot gliomu molekulāru subtipēšanu, kā ērta un vienkārša metode mezenhimāla subtipa identifikācijai (Popova *et al.*, 2014).

Šajā pētījumā CD44 ekspresija bija ļoti atkarīga no audzēja malignitātes pakāpes, GBM tā bija daudz augstāka nekā DA – vidējā ekspresija GBM bija 74,1 % (95 % TI = 69,6–78,7), salīdzinot ar 13,5 % (95 % TI = 7,7–19,2) DA. Augsta CD44 ekspresija (virs 50 %) tika konstatēta lielākajai daļai GBM – 81,5 % (95 % TI = 74,4–86,9) gadījumos, savukārt šāds ekspresijas līmenis bija sasniegts, bet ne pārsniegts, tikai vienā no DA gadījumiem. Daudzi autori arī novēroja daudz augstāku CD44 ekspresiju augstas malignitātes pakāpes gliomās, piemēram, Popova *et al.*, konstatēja CD44 ekspresiju GBM un DA atbilstoši 42 % un 15 %, bet Ranuncolo *et al.* – 59 % un 9,5 % (Popova *et al.*, 2014; Ranuncolo *et al.*, 2002).

Ir maz pētījumu, kuros tiek aprakstīts CD44 ekspresijas raksturs. Šajā pētījumā visintensīvāko CD44 ekspresiju novēroja GBM, kur pārsvarā bija membranoza, difūza ekspresija. Līdzīgu membranozu ekspresiju novēroja tikai nelielā daļā DA, kur šāda ekspresija bija fokāla, sīkperēklaina un mazākas intensitātes, salīdzinot ar GBM. CD44 ekspresijas dominējošais raksturs DA pārsvarā bija citoplazmisks, mazintensīvs, lielākoties lokalizēts daudzajos sazarotajos astrocītu izaugumos, veidojot smalku, zemas intensitātes CD44 imūnreaktivitātes tīklojumu. Šī vājā fona imūnreaktivitāte astrocītu izaugumos šajā pētījumā netika ņemta vērā CD44 ekspresijas kvantitatīvai raksturošanai,

taču šādu specifisku ekspresijas raksturu ir vērts pieminēt kā atsevišķu DA raksturīgu ekspresiju. Vienā citā pētījumā arī ir aprakstīts līdzīgs ekspresijas raksturs: membranoza ekspresija GBM, bet vāja citoplazmiska ekspresija astrocītu izaugumos DA (Jijiwa *et al.*, 2011). Interesanti, bet daži autori konstatējuši analoga rakstura vāju CD44 ekspresiju dažu astrocītu fibrilārajos izaugumos arī normālos galvas smadzeņu audos (Kaaijk *et al.*, 1997; Sosunov *et al.*, 2014). Kaaijk *et al.* izvirzīja hipotēzi, ka CD44 ekspresija normālos astrocītos varētu veicināt reaktīvu astrocītu migrāciju iekaisuma vai cita galvas smadzeņu audu bojājuma gadījumā (Kaaijk *et al.*, 1997). Taču Lui *et al.* parādīja, ka CD44 ekspresija ļauj identificēt astrocītu cilmes šūnas (Liu *et al.*, 2004). Arī daudzos citos pētījumos CD44 ir aprakstīts kā astrocītu priekšteču šūnu marķieris (Cai *et al.*, 2012; Malik *et al.*, 2014; Naruse *et al.*, 2013).

Šajā pētījumā netika konstatēta prognostiska nozīme CD44 ekspresijai ne GBM, ne DA. Tomēr augsta CD44 ekspresija kopā ar zemu p53, PDGFRA un IDH1 ekspresiju tika izmantota kā mezenhimāla GBM subtipa marķieris, kur tika konstatēts, ka mezenhimālu GBM subtipu raksturo sliktā atbildes reakcija uz radioterapiju. Tādējādi, CD44 ekspresija kombinācijā ar proneirāla subtipa marķieriem (p53, PDGFRA, IDH1) var būt labs predikatīvs marķieris.

Šajā pētījumā augstāku CD44 ekspresiju konstatēja sievietēm ($z = -2,224$; $p = 0,026$), kas var liecināt, ka gliomas cilmes šūnu populāciju var ietekmēt no dzimuma atkarīgi faktori. Kā arī tika konstatēta vāja, bet statistiski ticama negatīva korelācija ar GBM izmēru ($r_s = -0,314$; $p < 0,001$). Šo korelāciju arī pastiprina asociācija, ka zemāku CD44 ekspresiju biežāk konstatē lielāka izmēra audzējos (virs 4 cm) ($z = -2,364$; $p = 0,018$). Un tas varētu liecināt, ka strauja audzēja augšana var izraisīt cilmes šūnu populācijas samazināšanos gliomās.

Šajā pētījumā DA grupā bija konstatēta vidēji stipra, negatīva korelācija starp CD44 un PDGFRA ($r_s = -0,592$; $p = 0,006$). Arī citi autori apstiprina šādu

saistību starp abiem marķieriem, Conroy *et al.* pētījumā konstatēts novērojums, ka augsti CD44 ekspresijas rādītāji reti tiek konstatēti gliomās ar augstu PDGFRA ekspresiju (Conroy *et al.*, 2014). Ņemot vērā to, ka dažādos pētījumos aprakstītais PDGFRA aktivācijas signālceļš ir saistīts ar GBM proneirāla subtipa attīstību, savukārt CD44 ekspresija raksturo mezenhimālu subtipu, kas ir cits gliomas tips, šāda negatīva korelācija ir loģiska.

DA grupā ir novērota arī pozitīva korelācija starp CD44 un MVB ($r_s = 0,490$; $p = 0,018$), kas var norādīt uz gliomas cilmes lomu vaskularizācijas veicināšanā, tādējādi uzlabojot audzēja asinsriti, kas nepieciešama gliomas augšanai un progresijai. Par labu šim pieņēmumam liecina arī citu autoru pētījumos konstatētie pierādījumi tam, ka gliomas cilmes šūnas patiešām sekretē vairākas angiogēnās vielas, veicinot jaunu asinsvadu veidošanos (Bao *et al.*, 2006; Hardee and Zagzag, 2012).

PDGFRA

Trombocītu atbrīvotā augšanas faktora receptors alfa (PDGFRA) ir šūnas virsmas tirozīnkināzes receptors trombocītu atbrīvotajiem augšanas faktoriem (PDGF). Daudzos pētījumos ir pierādīts, ka PDGFRA molekulai ir liela nozīme nobriedušu oligodendrocītu veidošanās procesā no mazāk diferencētām oligodendrocītu priekšteču šūnām vai pat multipotentām neirālām cilmes šūnām. Šo multipotentu cilmes šūnu stimulācija ar PDGF-alfa nosaka to diferenciācijas virzienu un nobriešanu par termināli diferencētiem oligodendrocītiem (Fruttiger *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2008).

PDGFRA signālceļam ir arī svarīga loma gliomu attīstībā. Palielināta PDGFA aktivitāte stimulē vēl nenobriedušu priekšteču šūnu proliferāciju un kavē to spēju nobriest un diferencēties par termināli diferencētām šūnām, turpinoties šo šūnu proliferācijai, var attīstīties gliomas (Jackson *et al.*, 2006).

Turklāt pēc Verhaak *et al.* aprakstītās gliomu molekulārās klasifikācijas PDGFRA gēna amplifikācija kopā ar IDH1 un TP53 gēnu mutācijām raksturo proneirālu GBM subtipu (Verhaak *et al.*, 2010).

Šajā pētījumā PDGFRA vidējā ekspresija DA bija daudz augstāka – 42,3 (95 % TI = 25,7–59,0) gadījumi, salīdzinot ar GBM – 7,9 (95 % TI = 5,0–10,7) gadījumi. Augsta PDGFRA ekspresija (robežvērtība 50 %) tika konstatēta 50 % (95 % TI = 30,1–75,0) DA gadījumu, salīdzinot ar 6,2 % (95 % TI = 3,2–11,3) GBM gadījumu. Iegūtie dati ir salīdzināmi ar citiem pētījumiem, kur arī PDGFRA ekspresija bija ievērojami augstāka DA, piemēram, Popova *et al.* pētījumā augsta ekspresija bija 23 % DA un tikai 4 % GBM (Popova *et al.*, 2014).

Šajā pētījumā PDGFRA ekspresija uzrādīja arī pozitīvu korelāciju ar p53 gan GBM ($r_s = 0,181$; $p = 0,043$), gan DA ($r_s = 0,544$; $p = 0,013$). Šāda korelācija starp PDGFRA un p53 bija aprakstīta arī Popova *et al.* publikācijā (Popova *et al.*, 2014). Kā jau bija minēts iepriekš, TP53 un PDGFRA gēnu mutācijas raksturīgas GBM proneirālajam subtipam (Verhaak *et al.*, 2010). Līdz ar to p53 un PDGFRA savstarpēja korelācija var norādīt uz šo abu proteīnu ciešu funkcionālu saikni gliomās, iespējams, TP53 un PDGFRA gēna mutācijas ir svarīgas noteikta tipa gliomu agrīnā attīstībā, bet precīzi mehānismi šādai korelācijai nav zināmi.

Šajā pētījumā ir novērota negatīva korelācija starp PDGFRA un CD44 ($r_s = -0,592$; $p = 0,006$), ņemot vērā to, ka katrs no šiem proteīniem raksturo atsevišķu gliomas subtipu (t. i., proneirālo un mezenhimālo) šāda korelācija ir loģiska, kas arī liecina par divu savstarpēji izslēdzošu gliomu subtipu eksistenci.

Papildu iepriekšminētajai korelācijai, konstatēja arī negatīvu korelāciju DA starp PDGFRA un MVB ($r_s = -0,501$; $p = 0,034$). Precīzs izskaidrojums šādai saistībai nav zināms, bet, atsaucoties uz vienu citu negatīvu korelāciju starp PDGFRA un CD44 ($r_s = -0,592$; $p = 0,006$), varētu hipotētiski secināt, ka palielināta PDGFRA ekspresija nomāc gliomas cilmes šūnu populāciju, kas

samazina šo pašu cilmes šūnu angiogēno faktoru sekrēciju, tādējādi ietekmējot vaskularizāciju.

IDH1 R132H

Izocitrātdehidrogenāze (IDH) ir metabols enzīms, kurš piedalās citronskābes ciklā. Šim enzīmam ir zināmas trīs izoformas: IDH1, IDH2 un IDH3. IDH1 gēna mutācijas gliomās ir visizplatītākās, no tām visbiežāk sastopamā ir IDH1 R132H mutācija, kas veicina enzīma – onkometabolīta-2-hidroksiglutarāta produkciju, veicinot gliomu attīstību (Garber, 2010; Ward *et al.*, 2012).

IDH1 gēna mutācijas ir ļoti agrīns parādība gliomu attīstības procesā, un tās raksturo lielāko daļu DA un sekundāru GBM. Imūnhistoķīmiska IDH1 R132H proteīna noteikšana mūsdienās ir kļuvusi par rutīnas praksi gliomu diagnostikā, tā klātbūtne ļauj arī atšķirt primāras (IDH1 negatīvas) no sekundārām (IDH1 pozitīvas) GBM. Kopumā sekundāras GBM veido 6–13 % no visām GBM (Ohgaki and Kleihues, 2013). Šajā pētījumā sekundāru GBM bija mazāk (3,4 %; 95 % TI = 0,5–6,3). Iespējams, tas varētu būt saistīts ar pētījuma dizainu, respektīvi, šajā pētījumā netika iekļauti recidivējoši audzēji, tādējādi visas GBM pēc klīniskās gaitas atgādināja primāras GBM. Pētījumā nebūtu loģiski iekļaut audzēju recidīvus, jo ir zināms, ka iepriekš saņemta terapija var būt jaucējfaktors, kas ietekmē gliomas molekulārās īpašības (Parsons *et al.*, 2008; Safa *et al.*, 2015; Shankar *et al.*, 2014). Arī citos pētījumos, kuros pētāmā grupa bija veidota tikai no pacientiem ar primāriem audzējiem, kas vēl nav saņēmuši terapiju, bija iegūts līdzīgs sekundāru GBM biežums – 3,7 % un 3 % (Le Mercier *et al.*, 2012; Nobusawa *et al.*, 2009).

IDH1 R132H klātbūtni DA konstatēja 76,9 % (95 % TI = 60,7–93,1) gadījumu. Šis rezultāts arī atbilst citu autoru pētījumiem, kuri apraksta, ka IDH1 mutāciju biežums DA ir 80 % un 87 % (Christensen *et al.*, 2011; Juratli *et al.*, 2012), turklāt visbiežāk sastopamo specifisko mutāciju – IDH1 R132H –

konstatē 57–80 % zemas malignitātes gliomu (Cai *et al.*, 2016; Popova *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016).

IDH1 gēna mutācijas klātbūtne gliomās ir pašlaik viens no vislabākajiem zināmajiem prognostiskajiem faktoriem, kas saistīts ar ievērojami labāku prognozi (Gravendeel *et al.*, 2010; Nobusawa *et al.*, 2009; Parsons *et al.*, 2008; Sanson *et al.*, 2009). Piemēram, mediānas izdzīvotības laiki pacientiem ar GBM, kas satur IDH1 gēna mutāciju un bez mutācijas, ir atbilstoši 3,8 un 1,1 gadi (Parsons *et al.*, 2008). Šajā pētījumā IDH1 R132H pozitīviem GBM pacientiem ar IDH1 R132H negatīviem, mediānās izdzīvotības laiki bija atbilstoši 18,3 (95 % TI = 18,0–18,5) un 7,7 (95 % TI = 6,3–9,0) mēneši ($p = 0,040$).

Šajā pētījumā, konstatēta arī asociācija starp IDH1 un p53 ($z = -3,555$; $p = 0,001$), tādējādi visās sekundārās GBM bija konstatēta ļoti augsta aberanta p53 proteīna ekspresija. Arī citi pētījumi apstiprina to, ka IDH1 gēna mutācijas bieži kombinējas ar citām ģenētiskām izmaiņām, īpaši TP53 gēna mutācijām (Huang, 2019). Turklāt gan IDH1, gan TP53 gēnu mutācijas raksturo vienu un to pašu GBM subtipu – proneirālo (Verhaak *et al.*, 2010).

MVB (CD34)

Pastiprināta angiogēnēze ir viena no galvenajām audzēju pamatīpašībām (Hanahan and Weinberg, 2000), un CD34 kā endotēlija šūnu marķieris angiogēnēzes pētījumos bieži tiek izmantots mikrovaskulārā blīvuma noteikšanai (Foote *et al.*, 2005; Weidner, 2008). Salīdzinoši viegla un efektīva kvantitatīva metode MVB noteikšanai audzējos (pēc Veidnera) bija ieviesta jau sen un līdz šim brīdim tiek plaši izmantota daudzos pētījumos (Weidner *et al.*, 1991).

Šajā pētījumā vidējās MVB vērtības GBM bija daudz augstākas, salīdzinot ar DA, atbilstoši 40,7 (95 % TI = 35,8–45,6) un 18,1 (95 % TI = 12,9–23,3). Šie rezultāti ir atbilstoši citos pētījumos aprakstītajiem, piemēram,

Zhang *et al.* konstatētais MVB bija $45 \pm 6,2$ – GBM un $28 \pm 7,2$ – DA (Zhang *et al.*, 2014).

MVB šajā pētījumā neietekmēja prognozi ne GBM, ne DA pacientiem. MVB nav bieži analizēts parametrs daudzajos gliomu pētījumos, daļa no autoriem apgalvo, ka MVB nav prognostiskas nozīmes gliomu pacientiem (Abdulrauf *et al.*, 1998; Leon *et al.*, 1996). Taču nesen veiktajā metaanalīzē, apkopojot vairākus pētījumus, konstatēts, ka MVB parametrs nav pietiekoši novērtēts un ka tam varētu būt prognostiska nozīme gliomās, līdz ar to ir nepieciešami tālāki pētījumi (Fan *et al.*, 2019).

3.4. Gliomu subtipi

Ilgi pirms tika aprakstīti gliomu molekulārie subtipi Verhaak *et al.* pētījumā, bija zināms par divu atšķirīgu GBM veidu eksistenci, kas atspoguļo arī atšķirīgus gliomu attīstības patoģenētiskos mehānismus, t. i., primārās GBM, kuras attīstās *de novo*, savukārt sekundārās GBM attīstās no zemākas malignitātes pakāpes gliomas tās malignas transformācijas rezultātā (Kleihues and Ohgaki, 1999). Abi GBM subtipi ir morfoloģiski identiski, mūsdienās IDH mutāciju testēšana ļauj atšķirt šos subtipus. Tādējādi GBM ar vienādu morfoloģiju nav viendabīga audzēju grupa, bet ir atšķirīgas pēc to molekulārajiem parametriem un arī prognozes.

Izpratne par gliomu molekulārajām īpatnībām mūsdienās ir uzlabojusies, pateicoties vairākiem apjomīgiem pētījumiem, īpaši daudz datu par molekulārajām izmaiņām gliomās iegūts Vēža genoma atlanta (TCGA) projekta ietvaros. TCGA projektā ir iegūta visaptveroša informācija par apmēram 33 dažādu ļaundabīgu audzēju veidu genomiskajām izmaiņām, šajā pētījumā ir iekļauta arī liela GBM pacientu grupa, kur šī audzēja šūnās veica plašu molekulāru testēšanu, piemēram, visa genoma sekvenčēšanu, transkriptoma un metiloma analīzi, tādējādi iegūstot apjomīgu informāciju par molekulārajām

izmaiņām gliomās. Verhaak *et al.*, analizējot TCGA projekta ietvaros iegūtos datus, atklāja, ka GBM var iedalīt 4 molekulārajos subtipos pēc to molekulārajām izmaiņām un gēnu ekspresijas signatūrām – klasiskais, mezenhimālais, proneirālais un neirālais subtips (Verhaak *et al.*, 2010).

Klīniskā praksē visērtāk būtu veikt molekulāro subtipēšanu, izmantojot pieejamu un lētāku metodi, piemēram, imūnhistoķīmiju. Balstoties uz Verhaak *et al.* aprakstītajām molekulārām signatūrām, vairāki pētnieku kolektīvi ir veiksmīgi izmantojoši IHĶ metodi gliomu molekulārajā subtipēšanā (Conroy *et al.*, 2014; Le Mercier *et al.*, 2012; Motomura *et al.*, 2012; Popova *et al.*, 2014).

Vienā no imūnhistoķīmiskiem gliomu pētījumiem, kuru veica Le Mercier *et al.*, klasiskais un proneirālais GBM subtips bija noteikts, izmantojot minimālu IHĶ marķieru paneli – p53, EGFR un PDGFRA, un visi audzēji, kas neieklāvās kādā no kategorijām, tika pieskaitīti pie neklasificēta subtipa (Le Mercier *et al.*, 2012). Šajā pētījumā tika izmantota līdzīga pieeja, balstoties uz Verhaak *et al.* GBM klasifikāciju, subtipēšanas nolūkos tika noteikta PDGFRA, IDH1 R132H, p53 un CD44 ekspresija, ar mērķi izšķirt proneirālo un mezenhimālo GBM subtipu. Mūsu pieeja bija balstīta uz to, ka TP53, IDH1 un PDGFRA gēnu mutācijas bieži atrod proneirālajā subtipā, bet ne mezenhimālajā, kuru savukārt raksturo augsta CD44 ekspresija (Verhaak *et al.*, 2010).

Šajā pētījumā 50 % (95 % TI = 42,0–58,0) no gadījumiem tika klasificēti kā proneirāls GBM, kas ir nedaudz mazāk nekā Le Mercier *et al.* IHĶ subtipēšanas mēģinājumā, kur proneirāls subtips bija konstatēts 60 % no GBM gadījumiem. Popova *et al.* pētījumā proneirāls subtips konstatēts tikai 29 % no GBM gadījumiem, bet šajā pētījumā bija izmantots cits proneirāla subtipa marķieris – OLIG2 kombinācijā ar p53 ekspresijas noteikšanu. Šajā pētījumā mezenhimāls GBM subtips bija konstatēts 18,5 % (95 % TI = 13,0–25,6) no GBM gadījumiem. Citos pētījumos mezenhimāla subtipa biežums bija no 12 līdz 29 %, kas bija noteikts, izmantojot

dažādus mezenhimāla tipa marķierus – CD44, MERTK, VIM, YKL40 (Conroy *et al.*, 2014; Popova *et al.*, 2014; Verhaak *et al.*, 2010).

Šajā pētījumā netika konstatētas statistiski ticamas asociācijas starp GBM subtipu un klīniskiem vai citiem pētītajiem imūnhistoķīmiskiem parametriem (t. i., MVB, Ki-67, p27, p21). Šajā pētījumā pacientiem ar dažādiem GBM subtipiem netika konstatētas statistiski ticamas izdzīvotības laika atšķirības. Savukārt citos pētījumos mezenhimālajam GBM subtipam bija sliktāka prognoze, salīdzinot ar proneirālo tipu (Lin *et al.*, 2014; Phillips *et al.*, 2006; Verhaak *et al.*, 2010).

Lai arī prognostiskā nozīme neapstiprinājās, tomēr šajā pētījumā tika konstatēts, ka pacienti ar proneirālo un mezenhimālo subtipu atšķirīgi reaģē uz adjuvantu terapiju. Tādējādi pacientiem ar proneirālo subtipu tika konstatēta tendence uz izdzīvotības laika uzlabošanos pēc adjuvantas ķīmijterapijas pievienošanas radioterapijai, salīdzinot tikai ar radioterapiju ($p = 0,061$). Proneirāla subtipa pacientiem, kuri saņēma tikai adjuvantu radioterapiju, bija statistiski ticama izdzīvotības laika uzlabošanās, salīdzinot tikai ar ķirurģisku ārstēšanu ($p = 0,008$). Mezenhimāla subtipa pacientiem adjuvantas ķīmijterapijas pievienošana statistiski ticami uzlaboja izdzīvotības laiku ($p = 0,002$), taču adjuvantas radioterapijas pievienošana ķirurģiskai ārstēšanai neuzlaboja pacientu prognozi, salīdzinot tikai ar ķirurģisku ārstēšanu ($p = 0,857$), kas varētu norādīt uz mezenhimāla subtipa radiorezistenci. GBM mezenhimāla subtipa radiorezistence ir apstiprināta arī dažu citu autoru pētījumos, piemēram, Brown *et al.* arī mezenhimāla subtipa GBM konstatēja izteiktu radiorezistenci, bet saglabātu jutību pret ķīmijterapiju (Brown *et al.*, 2015). Daži autori apraksta, ka GBM mezenhimālu subtipu raksturo cilmes šūnu fenotips, kurš ir bagātināts ar cilmes šūnu marķieri CD44 (Cheng *et al.*, 2012), bet savukārt mezenhimālas cilmes šūnas raksturo izteikta radiorezistence (Mao *et al.*, 2013; Nakano, 2015), kas arī varētu šajā pētījumā skaidrot radioterapeitiskā efekta izzudumu

mezenhimālā subtipa GBM. Vairākos citos pētījumos arī ir konstatēta mezenhimālā subtipa radiorezistence, vienā no pētījumiem, kas veikts izmantojot eksperimentālu gliomas modeli pelei, ir izdevies izdalīt un pat kultivēt mezenhimālā subtipa cilmes šūnas, kas arī uzrādīja izteiktu radiorezistenci (Mao *et al.*, 2013).

Attiecībā uz DA lielākā daļa no zemas malignitātes pakāpes gliomu ir bagātinātas ar proneirālam subtipam raksturīgiem marķieriem (Cooper *et al.*, 2010; Guan *et al.*, 2014). Kā arī augstais IDH1 mutāciju biežums DA norāda uz piederību proneirālam subtipam, kas DA ir dominējošais (Kim *et al.*, 2010). Arī šajā pētījumā lielākā daļa no DA – 24/26 (92,3 %; 95 % TI = 75,8–97,9) piederēja proneirālajam subtipam, atlikušos divus gadījumus neizdevās klasificēt.

Secinājumi

1. GBM pacientus pētāmajā grupā raksturo slikta prognoze ar mediāno izdzīvotības laiku 7,9 mēneši, kas ir nedaudz zem izdzīvotības rādītājiem, salīdzinot ar citām valstīm.
2. Pacienti ar sekundāru GBM (IDH1 R132H pozitīva) ir ar ievērojami labāku prognozi, nekā pacienti ar primāru GBM, tādējādi IDH1 R132H mutācijas klātbūtne ir viens no nozīmīgākajiem prognostiskajiem faktoriem.
3. Pacientiem ar DA augsta PDGFRA ekspresija ir saistīta ar labāku prognozi.
4. CD44, p21, p27, PDGFRA un proliferācijas frakcija (Ki-67) ir no audzēja malignitātes pakāpes atkarīgi parametri, tādējādi CD44, Ki-67 un p21 ekspresija ir paaugstināta, bet p27 un PDGFRA ekspresija ir samazināta GBM. Turklāt p53 ekspresija nav atkarīga no gliomas anaplāzijas pakāpes.
5. Gliomu imūnhistoķīmisko profilu saistībā ar p27, CD44, Ki-67 ietekmē no dzimuma atkarīgi specifiski faktori.
6. Samazināta p21 un CD44 ekspresija GBM ir saistīta ar lielāku audzēja izmēru. Savukārt multifokālās GBM biežāk konstatē p27 izzudumu un augstāku PDGFRA ekspresiju.
7. Ar šūnas cikla regulāciju saistītie proteīni (p53, p21, p27, Ki-67) ir iesaistīti molekulāros mehānismos, kas regulē proliferāciju un angiogēzi, par ko liecina attiecīgi konstatētās korelācijas ar Ki-67 un MVB.
8. PDGFRA ekspresija korelē p53 gan GBM, gan DA, norādot uz šo abu proteīnu funkcionālo saistību. Bet DA novēro PDGFRA negatīvu korelāciju ar CD44, p21 un MVB.
9. Gliomu subtipēšana ir iespējama ar imūnhistoķīmijas metodi, izmantojot nelielu skaitu marķieru – PDGFRA, p53, IDH1 R132H un CD44. Savukārt augsta CD44 ekspresija norāda uz mezenhimālu GBM subtipu, kuru raksturo slikta atbilde uz radioterapiju.

Praktiskās rekomendācijas

1. Imūnhistoķīmiska vizualizācija ir rekomendējama visam ķirurģiski rezecētam gliomu materiālam, prognostiskiem un predikatīviem mērķiem.
2. Imūnhistoķīmiska IDH1 R132H mutācijas noteikšana ir rekomendējama visām GBM, kur IDH1 R132H ir nozīmīgs prognostisks marķieris, kurš ļauj atšķirt primāras no sekundārām GBM. Ieteicams veikt imūnhistoķīmisku izmeklēšanu, izmantojot pētījuma gaitā izstrādātu protokolu.
3. Imūnhistoķīmiska IDH1 R132H mutācijas noteikšana ir rekomendējama arī DA, kur tas var kalpot arī kā jutīgs diagnostisks tests. Sakarā ar to, ka liela daļa DA ir IDH1 R132H pozitīvas, IDH1 R132H noteikšanai var palīdzēt precīzi uzstādīta DA diagnoze, kas īpaši svarīgi mazā, ierobežotā materiāla daudzumā, piemēram, stereotaktisku biopsiju materiālā.
4. Ņemot vērā PDGFRA ekspresijas saistību nozīmi ar pacientu izdzīvotību, ir ieteicams veikt imūnhistoķīmisku PDGFRA noteikšanu DA.
5. Gliomu imūnhistoķīmiskā subtipēšana ir iespējama un izmantojama ikdienas klīniskajā praksē. Īpaši liela loma varētu būt mezenhimāla GBM subtipa atšķiršanā, kuru raksturo izteikta radiorezistence.

Literatūras saraksts

1. Abbas, T. and Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*, 9, 400–414.
2. Abdulrauf, S. I., Edvardsen, K., Ho, K. L., et al. (1998). Vascular endothelial growth factor expression and vascular density as prognostic markers of survival in patients with low-grade astrocytoma. *J Neurosurg*, 88, 513–520.
3. Ahmadloo, N., Kani, A. A., Mohammadianpanah, M., et al. (2013). Treatment outcome and prognostic factors of adult glioblastoma multiforme. *J Egypt Natl Canc Inst*, 25, 21–30.
4. Ali, T. and Jalal, J. (2013). Immunohistochemical expression of p53 and p21 in gliomas: a clinicopathological study. *Zanco Journal of Medical Sciences*, 17, 435–442.
5. Arshad, H., Ahmad, Z. and Hasan, S. H. (2010). Gliomas: correlation of histologic grade, Ki67 and p53 expression with patient survival. *Asian Pac J Cancer Prev*, 11, 1637–1640.
6. Ashcroft, M. and Vousden, K. H. (1999). Regulation of p53 stability. *Oncogene*, 18, 7637–7643.
7. Back, M. F., Ang, E. L., Ng, W. H., et al. (2007). Improved median survival for glioblastoma multiforme following introduction of adjuvant temozolomide chemotherapy. *Ann Acad Med Singapore*, 36, 338–342.
8. Bao, S., Wu, Q., Sathornsumetee, S., et al. (2006). Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res*, 66, 7843–7848.
9. Bardin, A., Boulle, N., Lazennec, G., et al. (2004). Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocr Relat Cancer*, 11, 537–551.
10. Barnard, R. O. and Geddes, J. F. (1987). The incidence of multifocal cerebral gliomas. A histologic study of large hemisphere sections. *Cancer*, 60, 1519–1531.
11. Bhat, K. P., Balasubramanian, V., Vaillant, B., et al. (2013). Mesenchymal differentiation mediated by NF-kappaB promotes radiation resistance in glioblastoma. *Cancer Cell*, 24, 331–346.
12. Bloom, J. and Pagano, M. (2003). Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. *Semin Cancer Biol*, 13, 41–47.
13. Bradshaw, A., Wickremsekera, A., Tan, S. T., et al. (2016). Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme. *Front Surg*, 3, 21.
14. Brennan, C., Momota, H., Hambardzumyan, D., et al. (2009). Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations. *PLoS One*, 4, e7752.

15. Brennan, C. W., Verhaak, R. G. W., McKenna, A., et al. (2013). The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell*, 155, 462–477.
16. Brown, D. V., Daniel, P. M., D'Abaco, G. M., et al. (2015). Coexpression analysis of CD133 and CD44 identifies Proneural and Mesenchymal subtypes of glioblastoma multiforme. *Oncotarget*, 6, 6267–6280.
17. Buckner, J. C. (2003). Factors influencing survival in high-grade gliomas. *Semin Oncol*, 30, 10–14.
18. Burns, K. A. and Korach, K. S. (2012). Estrogen receptors and human disease: an update. *Arch Toxicol*, 86, 1491–1504.
19. Cai, J., Zhu, P., Zhang, C., et al. (2016). Detection of ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry in the progression of 211 paired gliomas. *Oncotarget*, 7, 16384–16395.
20. Cai, N., Kurachi, M., Shibasaki, K., et al. (2012). CD44-positive cells are candidates for astrocyte precursor cells in developing mouse cerebellum. *Cerebellum*, 11, 181–193.
21. Cancer Genome Atlas Research, N. (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 455, 1061–1068.
22. Capelle, L., Fontaine, D., Mandonnet, E., et al. (2013). Spontaneous and therapeutic prognostic factors in adult hemispheric World Health Organization Grade II gliomas: a series of 1097 cases: clinical article. *J Neurosurg*, 118, 1157–1168.
23. Castelli, J., Feuvret, L., Haoming, Q. C., et al. (2016). Prognostic and therapeutic factors of gliosarcoma from a multi-institutional series. *J Neurooncol*, 129, 85–92.
24. Cavalla, P., Piva, R., Bortolotto, S., et al. (1999). p27/kip1 expression in oligodendrogliomas and its possible prognostic role. *Acta Neuropathol*, 98, 629–634.
25. Cheng, W. Y., Kandel, J. J., Yamashiro, D. J., et al. (2012). A multi-cancer mesenchymal transition gene expression signature is associated with prolonged time to recurrence in glioblastoma. *PLoS One*, 7, e34705.
26. Christensen, B. C., Smith, A. A., Zheng, S., et al. (2011). DNA methylation, isocitrate dehydrogenase mutation, and survival in glioma. *J Natl Cancer Inst*, 103, 143–153.
27. Conroy, S., Kruyt, F. A., Joseph, J. V., et al. (2014). Subclassification of Newly Diagnosed Glioblastomas through an Immunohistochemical Approach. *PLoS One*, 9, e115687.
28. Cooper, L. A., Gutman, D. A., Long, Q., et al. (2010). The proneural molecular signature is enriched in oligodendrogliomas and predicts improved survival among diffuse gliomas. *PLoS One*, 5, e12548.

29. Coqueret, O. (2003). New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol*, 13, 65–70.
30. De la Cueva, E., Garcia-Cao, I., Herranz, M., et al. (2006). Tumorigenic activity of p21Waf1/Cip1 in thymic lymphoma. *Oncogene*, 25, 4128–4132.
31. Djalilian, H. R., Shah, M. V. and Hall, W. A. (1999). Radiographic incidence of multicentric malignant gliomas. *Surg Neurol*, 51, 554–557; discussion 557–558.
32. Dobes, M., Shadbolt, B., Khurana, V. G., et al. (2011). A multicenter study of primary brain tumor incidence in Australia (2000–2008). *Neuro Oncol*, 13, 783–790.
33. Dong, Q., Li, Q., Wang, M., et al. (2019). Elevated CD44 expression predicts poor prognosis in patients with low-grade glioma. *Oncol Lett*, 18, 3698–3704.
34. Duffau, H. and Capelle, L. (2004). Preferential brain locations of low-grade gliomas. *Cancer*, 100, 2622–2626.
35. Dzwonek, J. and Wilczynski, G. M. (2015). CD44: molecular interactions, signaling and functions in the nervous system. *Front Cell Neurosci*, 9, 175.
36. Fan, C., Zhang, J., Liu, Z., et al. (2019). Prognostic role of microvessel density in patients with glioma. *Medicine*, 98, e14695–e14695.
37. Faria, M. H., Patrocinio, R. M., Moraes Filho, M. O., et al. (2007). Immunoeexpression of tumor suppressor genes p53, p21 WAF1/CIP1 and p27 KIP1 in human astrocytic tumors. *Arq Neuropsiquiatr*, 65, 1114–1122.
38. Foote, R. L., Weidner, N., Harris, J., et al. (2005). Evaluation of tumor angiogenesis measured with microvessel density (MVD) as a prognostic indicator in nasopharyngeal carcinoma: Results of RTOG 9505. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, 61, 745–753.
39. Fruttiger, M., Karlsson, L., Hall, A. C., et al. (1999). Defective oligodendrocyte development and severe hypomyelination in PDGF-A knockout mice. *Development*, 126, 457–467.
40. Fuse, T., Tanikawa, M., Nakanishi, M., et al. (2000). p27Kip1 expression by contact inhibition as a prognostic index of human glioma. *J Neurochem*, 74, 1393–1399.
41. Garber, K. (2010). Oncometabolite? IDH1 discoveries raise possibility of new metabolism targets in brain cancers and leukemia. *J Natl Cancer Inst*, 102, 926–928.
42. Gartel, A. L. (2006). Is p21 an oncogene? *Mol Cancer Ther*, 5, 1385–1386.
43. Giannopoulos, S. and Kyritsis, A. P. (2010). Diagnosis and management of multifocal gliomas. *Oncology*, 79, 306–312.
44. Gillet, E., Alentorn, A., Doukoure, B., et al. (2014). TP53 and p53 statuses and their clinical impact in diffuse low grade gliomas. *J Neurooncol*, 118, 131–139.

45. Gravendeel, L. A., Kloosterhof, N. K., Bralten, L. B., et al. (2010). Segregation of non-p.R132H mutations in IDH1 in distinct molecular subtypes of glioma. *Hum Mutat*, 31, E1186–1199.
46. Guan, X., Vengoechea, J., Zheng, S., et al. (2014). Molecular subtypes of glioblastoma are relevant to lower grade glioma. *PLoS One*, 9, e91216.
47. Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57–70.
48. Hardee, M. E. and Zagzag, D. (2012). Mechanisms of Glioma-Associated Neovascularization. *Am J Pathol*, 181, 1126–1141.
49. Hartman, J., Edvardsson, K., Lindberg, K., et al. (2009). Tumor repressive functions of estrogen receptor beta in SW480 colon cancer cells. *Cancer Res*, 69, 6100–6106.
50. Ho, D. M., Hsu, C. Y., Ting, L. T., et al. (2003). MIB-1 and DNA topoisomerase II alpha could be helpful for predicting long-term survival of patients with glioblastoma. *Am J Clin Pathol*, 119, 715–722.
51. Houillier, C., Lejeune, J., Benouaich-Amiel, A., et al. (2006). Prognostic impact of molecular markers in a series of 220 primary glioblastomas. *Cancer*, 106, 2218–2223.
52. Hu, J. G., Fu, S. L., Wang, Y. X., et al. (2008). Platelet-derived growth factor-AA mediates oligodendrocyte lineage differentiation through activation of extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *Neuroscience*, 151, 138–147.
53. Huang, K.-T., Pavlides, S. C., Lecanda, J., et al. (2012). Estrogen and Progesterone Regulate p27kip1 Levels via the Ubiquitin-Proteasome System: Pathogenic and Therapeutic Implications for Endometrial Cancer. *PLoS One*, 7, e46072.
54. Huang, L. E. (2019). Friend or foe-IDH1 mutations in glioma 10 years on. *Carcinogenesis*, 40, 1299–1307.
55. Jackson, E. L., Garcia-Verdugo, J. M., Gil-Perotin, S., et al. (2006). PDGFR alpha-positive B cells are neural stem cells in the adult SVZ that form glioma-like growths in response to increased PDGF signaling. *Neuron*, 51, 187–199.
56. Jijiwa, M., Demir, H., Gupta, S., et al. (2011). CD44v6 regulates growth of brain tumor stem cells partially through the AKT-mediated pathway. *PLoS One*, 6, e24217.
57. Jin, Q., Zhang, W., Qiu, X. G., et al. (2011). Gene expression profiling reveals Ki-67 associated proliferation signature in human glioblastoma. *Chin Med J (Engl)*, 124, 2584–2588.
58. Johannessen, A. L. and Torp, S. H. (2006). The clinical value of Ki-67/MIB-1 labeling index in human astrocytomas. *Pathol Oncol Res*, 12, 143–147.

59. Johansen, M. L., Stetson, L. C., Vadmal, V., et al. (2020). Gliomas display distinct sex-based differential methylation patterns based on molecular subtype. *Neuro-Oncology Advances*, 2.
60. Johnson, D. R. and O'Neill, B. P. (2012). Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. *J Neurooncol*, 107, 359–364.
61. Juratli, T. A., Engellandt, K., Lautenschlaeger, T., et al. (2013). Is There Pseudoprogession in Secondary Glioblastomas? *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 87, 1094–1099.
62. Juratli, T. A., Kirsch, M., Robel, K., et al. (2012). IDH mutations as an early and consistent marker in low-grade astrocytomas WHO grade II and their consecutive secondary high-grade gliomas. *J Neurooncol*, 108, 403–410.
63. Kaaijk, P., Pals, S. T., Morsink, F., et al. (1997). Differential expression of CD44 splice variants in the normal human central nervous system. *J Neuroimmunol*, 73, 70–76.
64. Kaminska, B., Czapski, B., Guzik, R., et al. (2019). Consequences of IDH1/2 Mutations in Gliomas and an Assessment of Inhibitors Targeting Mutated IDH Proteins. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24, 968.
65. Kashi, A. S., Rakhsha, A. and Houshyari, M. (2015). Overall survival in adult patients with low-grade, supratentorial glioma: Ten years' follow up at a single institution. *Electron Physician*, 7, 1114–1120.
66. Kawasoe, T., Takeshima, H., Yamashita, S., et al. (2015). Detection of p53 mutations in proliferating vascular cells in glioblastoma multiforme. *J Neurosurg*, 122, 317–323.
67. Kfoury, N., Sun, T., Yu, K., et al. (2018). Cooperative p16 and p21 action protects female astrocytes from transformation. *Acta neuropathologica communications*, 6, 12.
68. Kim, W. and Liau, L. M. (2012). IDH mutations in human glioma. *Neurosurg Clin N Am*, 23, 471–480.
69. Kim, Y.-H., Nobusawa, S., Mittelbronn, M., et al. (2010). Molecular Classification of Low-Grade Diffuse Gliomas. *Am J Pathol*, 177, 2708–2714.
70. Kirla, R. M., Haapasalo, H. K., Kalimo, H., et al. (2003). Low expression of p27 indicates a poor prognosis in patients with high-grade astrocytomas. *Cancer*, 97, 644–648.
71. Kleihues, P. and Ohgaki, H. (1999). Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol*, 1, 44–51.
72. Kleinschmidt-DeMasters, B. K., Lillehei, K. O. and Varella-Garcia, M. (2005). Glioblastomas in the older old. *Arch Pathol Lab Med*, 129, 624–631.

73. Kozak, K. R. and Moody, J. S. (2009). Giant cell glioblastoma: a glioblastoma subtype with distinct epidemiology and superior prognosis. *Neuro Oncol*, 11, 833–841.
74. Kuljaca, S., Liu, T., Dwarte, T., et al. (2009). The cyclin-dependent kinase inhibitor, p21(WAF1), promotes angiogenesis by repressing gene transcription of thioredoxin-binding protein 2 in cancer cells. *Carcinogenesis*, 30, 1865–1871.
75. Kumar, N., Kumar, P., Angurana, S. L., et al. (2013). Evaluation of outcome and prognostic factors in patients of glioblastoma multiforme: A single institution experience. *Journal of Neurosciences in Rural Practice*, 4, S46–S55.
76. Kushnir, I. and Tzuk-Shina, T. (2011). Efficacy of treatment for glioblastoma multiforme in elderly patients (65+): a retrospective analysis. *Isr Med Assoc J*, 13, 290–294.
77. Larjavaara, S., Mäntylä, R., Salminen, T., et al. (2007). Incidence of gliomas by anatomic location. *Neuro Oncol*, 9, 319–325.
78. Le Mercier, M., Hastir, D., Moles Lopez, X., et al. (2012). A simplified approach for the molecular classification of glioblastomas. *PLoS One*, 7, e45475.
79. Lee, S., Bui Nguyen, T. M., Kovalenko, D., et al. (2010). Sprouty1 inhibits angiogenesis in association with up-regulation of p21 and p27. *Mol Cell Biochem*, 338, 255–261.
80. Leon, S. P., Folkerth, R. D. and Black, P. M. (1996). Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors. *Cancer*, 77, 362–372.
81. Liang, Y., Diehn, M., Watson, N., et al. (2005). Gene expression profiling reveals molecularly and clinically distinct subtypes of glioblastoma multiforme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 5814–5819.
82. Lin, N., Yan, W., Gao, K., et al. (2014). Prevalence and Clinicopathologic Characteristics of the Molecular Subtypes in Malignant Glioma: A Multi-Institutional Analysis of 941 Cases. *PLoS One*, 9, e94871.
83. Liu, Y., Han, S. S., Wu, Y., et al. (2004). CD44 expression identifies astrocyte-restricted precursor cells. *Dev Biol*, 276, 31–46.
84. Ma, X., Lv, Y., Liu, J., et al. (2009). Survival analysis of 205 patients with glioblastoma multiforme: clinical characteristics, treatment and prognosis in China. *J Clin Neurosci*, 16, 1595–1598.
85. Malik, N., Wang, X., Shah, S., et al. (2014). Comparison of the Gene Expression Profiles of Human Fetal Cortical Astrocytes with Pluripotent Stem Cell Derived Neural Stem Cells Identifies Human Astrocyte Markers and Signaling Pathways and Transcription Factors Active in Human Astrocytes. *PLoS One*, 9, e96139.
86. Mao, P., Joshi, K., Li, J., et al. (2013). Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 8644–8649.

87. Meis, J. M., Martz, K. L. and Nelson, J. S. (1991). Mixed glioblastoma multiforme and sarcoma. A clinicopathologic study of 26 radiation therapy oncology group cases. *Cancer*, 67, 2342–2349.
88. Moller, M. B. (2000). P27 in cell cycle control and cancer. *Leuk Lymphoma*, 39, 19–27.
89. Mooney, K. L., Choy, W., Sidhu, S., et al. (2016). The role of CD44 in glioblastoma multiforme. *J Clin Neurosci*, 34, 1–5.
90. Moskowitz, S. I., Jin, T. and Prayson, R. A. (2006). Role of MIB1 in predicting survival in patients with glioblastomas. *J Neurooncol*, 76, 193–200.
91. Motomura, K., Natsume, A., Watanabe, R., et al. (2012). Immunohistochemical analysis-based proteomic subclassification of newly diagnosed glioblastomas. *Cancer Sci*, 103, 1871–1879.
92. Nakano, I. (2015). Stem cell signature in glioblastoma: therapeutic development for a moving target. *J Neurosurg*, 122, 324–330.
93. Naor, D., Sionov, R. V. and Ish-Shalom, D. (1997). CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res*, 71, 241–319.
94. Naruse, M., Shibasaki, K., Yokoyama, S., et al. (2013). Dynamic changes of CD44 expression from progenitors to subpopulations of astrocytes and neurons in developing cerebellum. *PLoS One*, 8, e53109.
95. Nayak, A., Ralte, A. M., Sharma, M. C., et al. (2004). p53 protein alterations in adult astrocytic tumors and oligodendrogliomas. *Neurol India*, 52, 228–232.
96. Neder, L., Colli, B. O., Machado, H. R., et al. (2004). MIB-1 labeling index in astrocytic tumors a clinicopathologic study. *Clin Neuropathol*, 23, 262–270.
97. Nobusawa, S., Watanabe, T., Kleihues, P., et al. (2009). IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin Cancer Res*, 15, 6002–6007.
98. Ohgaki, H. and Kleihues, P. (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol*, 170, 1445–1453.
99. Ohgaki, H. and Kleihues, P. (2013). The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 19, 764–772.
100. Ortensi, B., Setti, M., Osti, D., et al. (2013). Cancer stem cell contribution to glioblastoma invasiveness. *Stem Cell Research & Therapy*, 4, 18.
101. Oszvald, A., Guresir, E., Setzer, M., et al. (2012). Glioblastoma therapy in the elderly and the importance of the extent of resection regardless of age. *J Neurosurg*, 116, 357–364.
102. Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., et al. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*, 321, 1807–1812.

103. Paruthiyil, S., Parmar, H., Kerekatte, V., et al. (2004). Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer Res*, 64, 423–428.
104. Paszat, L., Laperriere, N., Groome, P., et al. (2001). A population-based study of glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 51, 100–107.
105. Phillips, H. S., Kharbanda, S., Chen, R., et al. (2006). Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*, 9, 157–173.
106. Piva, R., Cancelli, I., Cavalla, P., et al. (1999). Proteasome-dependent degradation of p27/kip1 in gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 58, 691–696.
107. Popova, S. N., Bergqvist, M., Dimberg, A., et al. (2014). Subtyping of gliomas of various WHO grades by the application of immunohistochemistry. *Histopathology*, 64, 365–379.
108. Prochazka, L., Tesarik, R. and Turanek, J. (2014). Regulation of alternative splicing of CD44 in cancer. *Cell Signal*, 26, 2234–2239.
109. Ranuncolo, S. M., Ladeda, V., Specterman, S., et al. (2002). CD44 expression in human gliomas. *J Surg Oncol*, 79, 30–35; discussion 35–36.
110. Raysi Dehcordi, S., De Paulis, D., Marzi, S., et al. (2012). Survival prognostic factors in patients with glioblastoma: our experience. *J Neurosurg Sci*, 56, 239–245.
111. Reis, R. M., Hara, A., Kleihues, P., et al. (2001). Genetic evidence of the neoplastic nature of gemistocytes in astrocytomas. *Acta Neuropathol*, 102, 422–425.
112. Roy, S., Lahiri, D., Maji, T., et al. (2015). Recurrent Glioblastoma: Where we stand. *South Asian J Cancer*, 4, 163–173.
113. Ryu, M. S., Park, H. J., Moon, C. M., et al. (2018). Expression of CD44 according to Clinicopathologic Characteristics of Gastric Cancer. *emj*, 41, 63–74.
114. Safa, A. R., Saadatzaheh, M. R., Cohen-Gadol, A. A., et al. (2015). Glioblastoma stem cells (GSCs) epigenetic plasticity and interconversion between differentiated non-GSCs and GSCs. *Genes Dis*, 2, 152–163.
115. Sanson, M., Marie, Y., Paris, S., et al. (2009). Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol*, 27, 4150–4154.
116. Sareddy, G. R., Li, X., Liu, J., et al. (2016). Selective Estrogen Receptor beta Agonist LY500307 as a Novel Therapeutic Agent for Glioblastoma. *Sci Rep*, 6, 24185.
117. Schomas, D. A., Laack, N. N., Rao, R. D., et al. (2009). Intracranial low-grade gliomas in adults: 30-year experience with long-term follow-up at Mayo Clinic. *Neuro Oncol*, 11, 437–445.

118. Schwartzbaum, J. A., Fisher, J. L., Aldape, K. D., et al. (2006). Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol*, 2, 494-503; quiz 491 p following 516.
119. Scoccianti, S., Magrini, S. M., Ricardi, U., et al. (2010). Patterns of care and survival in a retrospective analysis of 1059 patients with glioblastoma multiforme treated between 2002 and 2007: a multicenter study by the Central Nervous System Study Group of Airo (italian Association of Radiation Oncology). *Neurosurgery*, 67, 446-458.
120. Scott, J. G., Bauchet, L., Fraum, T. J., et al. (2012). Recursive partitioning analysis of prognostic factors for glioblastoma patients aged 70 years or older. *Cancer*, 118, 5595-5600.
121. Shankar, A., Kumar, S., Iskander, A., et al. (2014). Subcurative radiation significantly increases cell proliferation, invasion, and migration of primary glioblastoma multiforme in vivo. *Chin J Cancer*, 33, 148-158.
122. Shepard, H. M. (2015). Breaching the Castle Walls: Hyaluronan Depletion as a Therapeutic Approach to Cancer Therapy. *Front Oncol*, 5, 192.
123. Shivaprasad, N. V., Satish, S., Ravishankar, S., et al. (2016). Ki-67 immunostaining in astrocytomas: Association with histopathological grade – A South Indian study. *Journal of Neurosciences in Rural Practice*, 7, 510-514.
124. Simmons, M. L., Lamborn, K. R., Takahashi, M., et al. (2001). Analysis of complex relationships between age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients. *Cancer Res*, 61, 1122-1128.
125. Simpson, J. R., Horton, J., Scott, C., et al. (1993). Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 26, 239-244.
126. Skjulsvik, A. J., Mørk, J. N., Torp, M. O., et al. (2014). Ki-67/MIB-1 immunostaining in a cohort of human gliomas. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7, 8905-8910.
127. Sosunov, A. A., Wu, X., Tsankova, N. M., et al. (2014). Phenotypic Heterogeneity and Plasticity of Isocortical and Hippocampal Astrocytes in the Human Brain. *The Journal of Neuroscience*, 34, 2285-2298.
128. Stupp, R., Brada, M., van den Bent, M. J., et al. (2014). High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 25 Suppl 3, iii93-101.
129. Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 352, 987-996.
130. Sun, T., Plutynski, A., Ward, S., et al. (2015). An integrative view on sex differences in brain tumors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72, 3323-3342.

131. Takano, S., Kato, Y., Yamamoto, T., et al. (2012). Immunohistochemical detection of IDH1 mutation, p53, and internexin as prognostic factors of glial tumors. *J Neurooncol*, 108, 361–373.
132. Teo, W. Y., Sekar, K., Seshachalam, P., et al. (2019). Relevance of a TCGA-derived Glioblastoma Subtype Gene-Classifer among Patient Populations. 9, 7442.
133. Thapa, R. and Wilson, G. D. (2016). The Importance of CD44 as a Stem Cell Biomarker and Therapeutic Target in Cancer. *Stem Cells Int*, 2016, 2087204.
134. Thota, B., Shukla, S. K., Srividya, M. R., et al. (2012). IDH1 mutations in diffusely infiltrating astrocytomas: grade specificity, association with protein expression, and clinical relevance. *Am J Clin Pathol*, 138, 177–184.
135. Tove, L.-L., Andreas Hanssøn, H., Stein, S., et al. (2012). Prognostic value of histological features in diffuse astrocytomas WHO grade II. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 5, 152–158.
136. Trabelsi, S., Chabchoub, I., Ksira, I., et al. (2016). Molecular Diagnostic and Prognostic Subtyping of Gliomas in Tunisian Population. *Mol Neurobiol*.
137. Tugcu, B., Postalci, L. S., Gunaldi, O., et al. (2010). Efficacy of clinical prognostic factors on survival in patients with glioblastoma. *Turk Neurosurg*, 20, 117–125.
138. Ulutin, C., Fayda, M., Aksu, G., et al. (2006). Primary glioblastoma multiforme in younger patients: a single-institution experience. *Tumori*, 92, 407–411.
139. Valle-Folgueral, J. M., Mascarenhas, L., Costa, J. A., et al. (2008). Giant cell glioblastoma: review of the literature and illustrated case. *Neurocirugia (Astur)*, 19, 343–349.
140. van Diest, P. J., van Dam, P., Henzen-Logmans, S. C., et al. (1997). A scoring system for immunohistochemical staining: consensus report of the task force for basic research of the EORTC-GCCG. European Organization for Research and Treatment of Cancer-Gynaecological Cancer Cooperative Group. *J Clin Pathol*, 50, 801–804.
141. Verger, E., Valduvico, I., Caral, L., et al. (2011). Does gender matter in glioblastoma? *Clin Transl Oncol*, 13, 737–741.
142. Verhaak, R. G., Hoadley, K. A., Purdom, E., et al. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 17, 98–110.
143. Wakimoto, H., Aoyagi, M., Nakayama, T., et al. (1996). Prognostic significance of Ki-67 labeling indices obtained using MIB-1 monoclonal antibody in patients with supratentorial astrocytomas. *Cancer*, 77, 373–380.
144. Wang, P.-f., Liu, N., Song, H.-w., et al. (2016). IDH-1(R132H) mutation status in diffuse glioma patients: implications for classification. *Oncotarget*, 7, 31393–31400.

145. Wang, X., Chen, J. X., Liu, J. P., et al. (2014). Gain of function of mutant TP53 in glioblastoma: prognosis and response to temozolomide. *Ann Surg Oncol*, 21, 1337–1344.
146. Ward, P. S., Cross, J. R., Lu, C., et al. (2012). Identification of additional IDH mutations associated with oncometabolite R(-)-2-hydroxyglutarate production. *Oncogene*, 31, 2491–2498.
147. Warfel, N. A. and El-Deiry, W. S. (2013). p21WAF1 and tumorigenesis: 20 years after. *Curr Opin Oncol*, 25, 52–58.
148. Watanabe, K., Tachibana, O., Sata, K., et al. (1996). Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol*, 6, 217–223; discussion 223–214.
149. Watanabe, K., Tachibana, O., Yonekawa, Y., et al. (1997). Role of gemistocytes in astrocytoma progression. *Lab Invest*, 76, 277–284.
150. Weidner, N. (2008). Chapter 14. Measuring intratumoral microvessel density. *Methods Enzymol*, 444, 305–323.
151. Weidner, N., Semple, J. P., Welch, W. R., et al. (1991). Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*, 324, 1–8.
152. Xu, H., Tian, Y., Yuan, X., et al. (2015). The role of CD44 in epithelial–mesenchymal transition and cancer development. *OncoTargets and therapy*, 8, 3783–3792.
153. Yan, H., Parsons, D. W., Jin, G., et al. (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*, 360, 765–773.
154. Yang, J., Liao, D., Wang, Z., et al. (2011). Mammalian target of rapamycin signaling pathway contributes to glioma progression and patients' prognosis. *J Surg Res*, 168, 97–102.
155. Yang, P., Wang, Y., Peng, X., et al. (2013). Management and survival rates in patients with glioma in China (2004–2010): a retrospective study from a single-institution. *J Neurooncol*, 113, 259–266.
156. Yang, W., Warrington, N. M., Taylor, S. J., et al. (2019). Sex differences in GBM revealed by analysis of patient imaging, transcriptome, and survival data. *Science translational medicine*, 11, eaao5253.
157. Yu, C. P., Ho, J. Y., Huang, Y. T., et al. (2013). Estrogen inhibits renal cell carcinoma progression through estrogen receptor-beta activation. *PLoS One*, 8, e56667.
158. Zhang, J., Yang, W. E. I., Zhao, D., et al. (2014). Correlation between TSP-1, TGF- β and PPAR- γ expression levels and glioma microvascular density. *Oncol Lett*, 7, 95–100.
159. Zolota, V., Tsamandas, A. C., Aroukatos, P., et al. (2008). Expression of cell cycle inhibitors p21, p27, p14 and p16 in gliomas. Correlation with classic prognostic factors and patients' outcome. *Neuropathology*, 28, 35–42.

Publikācijas par pētījuma tēmu

Zinātniskās publikācijas izdevumos, kas iekļauti starptautiskajās datu bāzēs (SCOPUS)

1. Molecular classification of diffuse gliomas. Jakovlevs A, Vanags A, Gardovskis J, Strumfa I. Polish Journal of Pathology. 2019;70(4):246-258. doi:10.5114/pjp.2019.93126. (ir pieejams Pubmed)
2. Jakovļevs, A., Vanags, A., Gardovskis, J., Štrumfa, I. (2020). Expression of CD44 and IDH1 R132H in Gliomas and their Prognostic Relevance, Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences. 74(5).
3. Biserova K, Jakovlevs A, Uljanovs R, Strumfa I. Cancer Stem Cells: Significance in Origin. Pathogenesis and Treatment of Glioblastoma. Cells. 2021; 10(3):621.

Zinātniski raksti ārvalstīs izdotos recenzējamās izdevumos

1. Glioblastoma – Current Concepts, Prognostic Markers And Molecular Classification / A.Jakovlevs, A.Vanags, D.Balodis, J.Gardovskis, I.Strumfa // Acta Chirurgica Latviensis. - No.13/1 (2013), p. 58–64.
2. Childhood medulloblastoma in Latvia: morphologic and molecular implications for diagnostics and personalised treatment / I.Franckevica, A.Jakovlevs, A.Abolins, A.Vanags, I.Strumfa ...[et al.] // Acta Chirurgica Latviensis. - No.16/1 (2016), p. 9–15.
3. Solitary and multiple meningiomas : an immunohistochemical comparison / B.Vikmane, A.Jakovlevs, A.Vanags, I.Strumfa // Acta Chirurgica Latviensis. - No.15/1 (2015), p. 23–28.

4. Prolonged survival after neurosurgical resection of lung cancer metastasis / A.Jakovlevs, A.Vanags, I.Strumfa ...[et al.] // Acta Chirurgica Latviensis. - No.14/1 (2014), p. 32–34.
5. Recurrent multiple atypical meningiomas despite neurosurgical resection / A.Jakovlevs, I.Strumfa, A.Vanags ...[et al.] // Acta Chirurgica Latviensis. - No. 14/2 (2014), p. 56–58.
6. Low-grade rhabdoid meningioma : unusual morphological characteristics / A.Jakovlevs, A.Vanags, J.Gardovskis, I.Strumfa // Acta Chirurgica Latviensis. - No. 13/1 (2013), p. 84–86.

Tēzes un uzstāšanās starptautiska mēroga konferencēs un kongresos

1. A. Jakovlevs, J. Gardovskis, I. Štrumfa. Ki-67 labeling index and CD44 expression in gliomas: does the gender matter? 10th Baltic Morphology Scientific Conference, 24.–25.10.2019, Kaunas, Lithuania. Abstract Book page 262.
2. A.Jakovlevs, J.Gardovskis, I.Štrumfa. Prognostic impact and correlations of Ki-67 labeling index and CD44 expression in gliomas. 10th Baltic Morphology Scientific Conference, 24.–25.10.2019, Kaunas, Lithuania. Abstract Book page 261.
3. Arvids Jakovlevs, Ilze Strumfa, Janis Gardovskis. Prognostic Role of Ki-67 Labeling Index in Diffuse Gliomas // Rīga Stradiņš University International Conference on Medical and Health Care Sciences Knowledge; 01.–03.04. 2019., Riga, Latvia; Tēžu grāmata 730 lpp.
4. Arvids Jakovlevs, Ilze Strumfa, Janis Gardovskis. Prognostic and Predictive Significance of Immunohistochemically Defined Molecular Subclasses in Glioblastoma // Rīga Stradiņš University International Conference on Medical

- and Health Care Sciences Knowledge, 01.–03.04. 2019., Riga, Latvia; Tēžu grāmata 729 lpp.
5. Ilze Strumfa, Dz. Mezale, Guntis Bahs, Andrejs Vanags, Dr. Ilze Fridrihsone, Dr. A. Jakovlevs. Digital Pathology in Education: Experience of Rīga Stradiņš University // Rīga Stradiņš University International Conference on Medical and Health Care Sciences Knowledge, 01.–03.04.2019, Riga, Latvia; Tēžu grāmata 741 lpp.
  6. Assessment of microvascular density in gliomas: diagnostic and prognostic significance / A. Jakovlevs, A. Vanags, J. Gardovskis, I. Strumfa // Baltic Morphology IX (Tartu, Estonia, Sept. 27–29, 2017): Conference Programme : Abstracts of Presentations / University of Tartu. - Tartu, 2017. - P. 34.
  7. Pleomorphic xanthoastrocytoma - a rare type of cerebral glioma / A. Jakovlevs, A. Vanags, J. Gardovskis, I. Strumfa // Baltic Morphology IX (Tartu, Estonia, Sept. 27–29, 2017): Conference Programme : Abstracts of Presentations / University of Tartu. - Tartu, 2017. - P. 35.
  8. Prognostic and predictive role of proneural and mesenchymal molecular signatures in glioblastoma / A. Jakovlevs, A. Vanags, J. Gardovskis, I. Strumfa // 8th Mildred Scheel Cancer Conference (Bonn, Germany, June 14–16, 2017) : Programme and Abstracts. - Bonn, 2017. - P.148.
  9. Expression of aberrant p53 protein in medulloblastoma [Elektroniskais resurss] / G. Kirsakmens, I. Franckevica, L. Kolomencikova, A. Jakovlevs, D. Balodis, I. Strumfa // International Symposium “Targets of immunotherapy of chronic viral infections and cancer” (Riga, Latvia, May 24–26, 2016)[Elektroniskais resurss] : Abstract Book. - Riga, 2016. - 1 p., on CD.
  10. p53 protein as a potential target of cancer vaccines in glioblastomas [Elektroniskais resurss] / A. Jakovlevs, A. Vanags, J. Gardovskis, I. Strumfa

// International Symposium “Targets of immunotherapy of chronic viral infections and cancer” (Riga, Latvia, May 24–26, 2016) [Elektroniskais resurss] : Abstract Book. - Riga, 2016. - 1 p., on CD.

11. Jakovļevs, Arvīds. IDH1-R132 immunohistochemistry in human gliomas: a way to improved diagnostics / A. Jakovļevs, A. Vanags, I. Strumfa // Eesti Arst. - Suppl.2 (2015, Sept.), p.68. - 8th Congress of the Baltic Association of Surgeons (Tallinn, Estonia, Sept.10–12, 2015): [Abstracts].
12. Jakovļevs, Arvīds. Immunohistochemical analysis of platelet-derived growth factor receptor-alpha (PDGFRA) expression in gliomas / A. Jakovļevs, A. Vanags, I. Strumfa // The 8th Baltic Morphology Scientific Conference “Interdisciplinary nature of contemporary morphology” (Vilnius, Lithuania, Nov. 12–14, 2015) : [Abstract Book] / Vilnius University. - Vilnius, 2015. - P. 90.
13. Jakovļevs, Arvīds. The spectrum of brain metastases / A. Jakovļevs, A. Vanags, I. Strumfa // The 8th Baltic Morphology Scientific Conference “Interdisciplinary nature of contemporary morphology” (Vilnius, Lithuania, Nov. 12–14, 2015) : [Abstract Book] / Vilnius University. - Vilnius, 2015. - P.91.
14. Heterogeneity of Ki-67 and p53 expression in glioblastomas : [abstract] / A. Jakovļevs, I. Strumfa, A. Vanags, J. Gardovskis // Virchows Archiv. - Vol.465, Suppl.1 (2014, Aug.), p.S352. - Starptautiski citējamā izdevumā. London. United Kingdom.
15. Lipoastrocytoma of the spinal cord mimicking lipoma : [abstract] / A. Jakovļevs, I. Strumfa, A. Vanags, J. Gardovskis // Virchows Archiv. - Vol.465, Suppl.1 (2014, Aug.), p.S353. - Starptautiski citējamā izdevumā. London. United Kingdom.

16. Low-grade rhabdoid meningioma - unusual morphological characteristics / A. Jakovļevs, L. Feldmane, I. Štrumfa, J. Gardovskis // Baltic Morphology VII Scientific Conference “Morphological sciences in the experimental and clinical medicine” (Rīga, Latvia, Nov.7-9, 2013) : Abstract Book / Riga Stradiņš University. - Riga, 2013. - P.85.

Tēzes un uzstāšanās Latvijas (vietējā) mēroga konferencēs un kongresos

1. Prognostic role of CD44 expression in diffuse gliomas / A. Jakovļevs, A. Vanags, J. Gardovskis, I. Štrumfa // 2018. gada Zinātniskās konferences tēzes (Rīga, 2018. g. 22.–23.martā) / Rīgas Stradiņa universitāte. - Rīga, 2018. - 165. lpp.
2. Survival analysis of patients with diffuse gliomas in Latvia / A. Jakovļevs, A. Vanags, J. Gardovskis, I. Štrumfa // 2018. gada Zinātniskās konferences tēzes (Rīga, 2018.g. 22.–23.martā) / Rīgas Stradiņa universitāte. - Rīga, 2018. - 164. lpp.
3. p27 and p21 protein expression in gliomas and their prognostic relevance / A. Jakovļevs, A. Vanags, J. Gardovskis, I. Štrumfa // 2017. gada Zinātniskās konferences tēzes (Rīga, 2017.g. 6.–7.aprīlī) / Rīgas Stradiņa universitāte. - Rīga, 2017. - 210. lpp.
4. Prognostic role of platelet derived growth factor receptor alpha expression in diffuse gliomas / A. Jakovļevs, A. Vanags, J. Gardovskis, I. Štrumfa // 2017. gada Zinātniskās konferences tēzes (Rīga, 2017.g. 6.–7.aprīlī) / Rīgas Stradiņa universitāte. - Rīga, 2017. - 209. lpp.
5. IDH1 R132H mutanta proteīna ekspresijas biežums difūzās astrocitomās / A. Jakovļevs, A. Vanags, J. Gardovskis, I. Štrumfa // 2016.gada Zinātniskās konferences tēzes (Rīga, 2016. g. 17.–18.martā) / Rīgas Stradiņa universitāte. - Rīga, 2016. - 191. lpp.

6. p21 un p53 proteīna ekspresija gliālos audzējos / A. Jakovļevs, A. Vanags, I. Štrumfa, J. Gardovskis // 2016. gada Zinātniskās konferences tēzes (Rīga, 2016. g. 17.–18.martā) / Rīgas Stradiņa universitāte. - Rīga, 2016. - 192. lpp.
7. CD44 proteīna ekspresija gliālos audzējos / A. Jakovļevs, A. Vanags, J. Gardovskis, I. Štrumfa // 2015. gada Zinātniskās konferences tēzes (Rīga, 2015.g. 26.–27.martā) / Rīgas Stradiņa universitāte. - Rīga, 2015. - 281. lpp.
8. Primārās un sekundārās glioblastomas operāciju materiālā pacientiem Latvijā / A. Jakovļevs, A. Vanags, J. Gardovskis, A. Āboliņš, I. Štrumfa // 2015. gada Zinātniskās konferences tēzes (Rīga, 2015. g. 26.–27.martā) / Rīgas Stradiņa universitāte. - Rīga, 2015. - 280. lpp.
9. Anaplastiska hemangiopericitoma – rets smadzeņu apvalku audzējs / A. Jakovļevs, A. Vanags, J. Gardovskis, I. Štrumfa ...[u. c.] // 2014. gada Zinātniskās konferences tēzes (Rīga, 2014.g. 10.–11. aprīlī) / Rīgas Stradiņa universitāte. - Rīga, 2014. - 294. lpp.
10. Gliosarkoma – rets gliāls audzējs bērnu vecumā / A. Jakovļevs, A. Vanags, J. Gardovskis, I. Štrumfa // 2014. gada Zinātniskās konferences tēzes (Rīga, 2014.g. 10.–11.aprīlī) / Rīgas Stradiņa universitāte. - Rīga, 2014. - 308. lpp.
11. Gliosarkomu diagnostiskie un prognostiskie marķieri / A. Jakovļevs, A. Vanags, J. Gardovskis, I. Štrumfa // 2014. gada Zinātniskās konferences tēzes (Rīga, 2014.g. 10.–11.aprīlī) / Rīgas Stradiņa universitāte. Rīga, 2014. - 293. lpp.
12. Ki-67 proliferācijas indeksa un p53 proteīna ekspresijas heterogenitāte glioblastomās / A. Jakovļevs, A. Vanags, J. Gardovskis, I. Štrumfa // 2014. gada Zinātniskās konferences tēzes (Rīga, 2014.g. 10.–11.aprīlī) / Rīgas Stradiņa universitāte. - Rīga, 2014. - 309. lpp.

13. CNS audzēju morfoloģiskais spektrs operāciju un stereotaktisku biopsiju materiālā / A. Jakovļevs, A. Vanags, J. Gardovskis, I. Štrumfa // 2013. gada Zinātniskās konferences tēzes (Rīga, 2013.g. 21.–22.martā) / Rīgas Stradiņa universitāte. - Rīga, 2013. - 267. lpp.