

Универзитет „Свети Кирил и Методиј” – Скопје



Медицински факултет

Институт за патологија



Панче Здравковски

**Дијагностичка, прогностичка и предиктивна
вредност на имунохистохемиските маркери
IDH1/2, OLIG2, ATRX, H3K27me и MGMT кај
адултни глијални неоплазми од 4. степен
според СЗО**

- Докторски труд -

Ментор: проф. д-р Гордана Петрушевска

Скопје, 2026 година

Универзитет „Свети Кирил и Методиј“ – Скопје



Медицински факултет

Институт за патологија



Панче Здравковски

**Дијагностичка, прогностичка и предиктивна
вредност на имунохистохемиските маркери
IDH1/2, OLIG2, ATRX, H3K27me и MGMT кај
адултни глијални неоплазми од 4. степен
според СЗО**

- Докторски труд -

Ментор: проф. д-р Гордана Петрушевска

Скопје, 2026 година

Ментор: проф. д-р Гордана Петрушевска, Институт за патологија, Медицински факултет, Скопје

Членови на комисија:

1. проф. д-р Славица Костадинова - Куновска (претседател)
2. проф. д-р Гордана Петрушевска (ментор)
3. проф. д-р Рубенс Јовановиќ (член)
4. проф. д-р Игор Стојковски (член)
5. проф. д-р Александар Чапароски (член)

ИЗЈАВИ НА БЛАГОДАРНОСТ

Упатувам најголема благодарност до мојот ментор, **проф. д-р Гордана Петрушевска** чие стручно знаење, професионално водење и поддршка во текот на целиот процес беа од клучна важност за обликувањето на оваа дисертација. Благодарен сум за нејзиното трпение и високите академски стандарди со кои ме насочуваше во научноистражувачката работа.

Посебна благодарност му упатувам на **прим. д-р Боро Илиевски**, кој е мој учител по невропатологија, како и драг колега и пријател. Неговото долгогодишно искуство, дијагностички суптилности и несебично споделување на знаењето беа основа за мојот професионален развој во оваа специфична област.

Упатувам голема благодарност до **проф. д-р Славица Костадинова-Куновска** и **проф. д-р Рубенс Јовановиќ** за нивните корисни совети, насоки и стручни сугестии во текот на подготовката и реализацијата на оваа докторска дисертација.

Изразувам благодарност до сите колеги и целиот колектив на **Институтот за патологија** за колегијалноста, професионалната соработка и заедничката атмосфера, кои беа значаен поттик во секојдневната работа.

Искрена благодарност упатувам и до моето најблиско опкружување, чие тивко присуство, трпение и стабилност ми беа непроценлив поттик и рамнотежа во текот на целиот овој пат.

На крајот, упатувам длабока и искрена благодарност до моето семејство за нивната постојана поддршка. На мојот покоен татко, **Мице**, чиј личен пример, мудрост и животни поуки остануваат мој траен патоказ, инспирација и морален столб низ целиот мој живот. На мојата мајка, **Мирјана**, за нејзината безрезервна љубов, секојдневна грижа, трпение и неизмерна жртва во сите фази од моето школување и професионално изградување. Голема благодарност и до мојот брат **Методија** и неговата сопруга **Теа** за нивното драгоцено присуство и поддршка.

Ви благодарам на сите!

СОДРЖИНА

страница

Извадок.....	7-8 стр.
Abstract.....	9-10 стр.
Листа на скратеници.....	11 стр.
1. Вовед.....	12 стр.
1.1 Класификација на туморите на централниот нервен систем според Светската Здравствена Организација.....	12-13 стр.
1.2 Хистолошки степен кај глијалните тумори.....	13-14 стр.
1.3 Дефиниција и класификација на адултни глијални тумори од 4. степен според класификацијата на СЗО за тумори на централниот нервен систем.....	15-17 стр.
1.4 Астроцитом, <i>IDH</i> -мутиран.....	17-22 стр.
1.5 Глиобластом, <i>IDH</i> -див тип.....	22-26 стр.
1.6 Имунохистохемиски маркери во дијагностиката и класификацијата на адултни глијални неоплазми од 4. степен според СЗО.....	26-31 стр.
1.7 Терапевтски пристапи кај пациенти со глијални неоплазми од 4. степен според СЗО.....	32 стр.
2. Цели.....	33 стр.
3. Материјали и методи.....	34 стр.
3.1 Избор на случаи и клинички материјал.....	34 стр.
3.2 Хистолошка обработка на ткивен материјал.....	34-35 стр.
3.3 Имунохистохемиска метода.....	35-36 стр.
3.4 Имунохистохемиски маркери.....	36-37 стр.
3.5 Мултиплекс лигациско-зависна амплификација на проби - MLPA.....	38 стр.
3.6 Статистичка анализа.....	38-40 стр.
4. Резултати.....	41 стр.
4.1 Демографски и клинички статистички карактеристики на кохортата.....	41 стр.
4.1.1 Полова и возрасна распределба.....	41 стр.
4.1.2 Поттипови на глиоми според класификацијата на СЗО за ЦНС-тумори 2021 година.....	42-43 стр.
4.1.3 Анализа на туморска локализација.....	43-44 стр.
4.1.4 Анализа на рецидиви.....	44-45 стр.

4.1.5 Дистрибуција според бројот на неврохируршки интервенции.....	45 стр.
4.1.6 Дистрибуција на пациентите според примен онколошки третман...	45-50 стр.
4.2 Имунохистохемиски и молекуларни анализи.....	50 стр.
4.2.1 Имунохистохемиска експресија на IDH1 и IDH2.....	50-53 стр.
4.2.2 Имунохистохемиска експресија на OLIG2.....	53-55 стр.
4.2.3 Имунохистохемиска експресија на ATRX.....	55-58 стр.
4.2.4 Имунохистохемиска експресија на H3K27me.....	58-61 стр.
4.2.5 Имунохистохемиска експресија на MGMT.....	62 стр.
4.2.6 Молекуларно тестирање на IDH1/2 и MGMT метилациски статус...	63-65 стр.
4.3 Компаративна анализа според тип на тумор.....	66 стр.
4.3.1 Полови и возрасни разлики помеѓу астроцитом и глиобластом.....	66-68 стр.
4.3.2 Стапка на рецидив и број на операции според типот на тумор.....	69-70 стр.
4.3.3 Онколошки третман според типот на тумор.....	71-73 стр.
4.3.4 Локализација според тип на глиом и полови разлики во локализацијата на туморот.....	74-76 стр.
4.3.5 Корелација на возраста на пациентите со туморските рецидиви.....	77-79 стр.
4.4 Анализа на средното време на преживување.....	80 стр.
4.4.1 Вкупна стапка на преживување и медијана на следење.....	80-81 стр.
4.4.2 Преживување според пол.....	81-82 стр.
4.4.3 Преживување според возраст.....	83-84 стр.
4.4.4 Преживување според тип на тумор (астроцитом vs глиобластом)....	85-86 стр.
4.4.5 Преживување во однос на имунохистохемиската експресија на OLIG2.....	86-88 стр.
4.4.6 Преживување во однос на имунохистохемиската експресија на ATR.....	89-90 стр.
4.4.7 Преживување во однос на имунохистохемиската експресија на H3K27me.....	91-92 стр.
4.4.8 Прогностички фактори за исходот кај пациенти со глијални неоплазми од 4. степен.....	93-95 стр.
5. Дискусија.....	96-102 стр.
6. Заклучоци.....	103-106 стр.
7. Литература.....	107-124 стр.

Извадок

Вовед

Класификацијата на туморите на ЦНС на Светската здравствена организација (СЗО), ажурирана во 2021 година, означува промена на парадигмата во дијагнозата, категоризацијата и номенклатурата на мозочните тумори, при што глиомите со мутации на *IDH* и хистолошки карактеристики од 4. степен на тумор според СЗО се класифицираат како астроцитомите, додека туморите без *IDH* мутација се означуваат како глиобластомите.

Цели

Имплементација и стандардизација на имунохистохемски панел сочинет од антителата *IDH1*, *IDH2*, *OLIG2*, *ATRX*, *H3K27me* и *MGMT* и одредување на нивната дијагностичка, прогностичка и предиктивна вредност кај адултни глијални неоплазми од 4. степен според СЗО.

Материјали и методи

Ретроспективна пресечна студија спроведена на Институтот за патологија при Медицински факултетот – УКИМ на ткивен материјал фиксиран во формалин и вклопен во парафин од 77 пациенти со хистолошки дијагностициран глијален тумор од 4. степен според СЗО. Изведена е светлосно-микроскопска анализа на Н&Е обоени стакла и имунохистохемска анализа на гореспоменатиот панел.

Резултати

Адултните глијални тумори од 4. степен според СЗО се јавуваат почесто кај мажите (1,5:1), со највисока инциденца кај пациентите од возрасната група 60-69 години, а најниска кај возрасната група 30-39 години. Во кохортата, 62% припадна на глиобластом, *IDH*-див тип, а 38% на астроцитом, *IDH*-мутиран. Кај глиобластомот, пациентите на возраст < 55 години преживуваа просечно 24,9 месеци, возрасната група 55 – 65 години преживуваа 15,7 месеци, а пациентите ≥ 65 години преживуваа 7,7 месеци. Слично, астроцитомите имаа двојно подолго просечно преживување од глиобластомите (23,4 наспроти 10,0 месеци), со 24-

месечно преживување од 27% кај астроцитомите наспроти 7% кај глиобластомите. Средното време на преживување кај испитаниците е 10,5 месеци, во најголем дел зависно од возраста на пациентот и типот на тумор. Покрај имунохистохемиските маркери IDH1 и IDH2, маркерот ATRX покажа прогностичка вредност, додека маркерот H3K27me не покажа статистички значајна прогностичка вредност, а маркерот OLIG2 покажа само дијагностичка вредност. Во студијата се потврди предиктивната вредност на маркерот MGMT.

Дискусија

Евалуацијата на специфичниот имунохистохемиски панел јасно ја потврдува неговата поврзаност со молекуларниот статус и биологијата на глијалните неоплазми од 4. степен според СЗО. Добиените податоци нудат попрецизен модел за диференцирање на туморските ентитети во рамките на актуелните глобални патолошки класификации. Ваквите согледувања укажуваат на потребата од редовна примена на овој имунохистохемиски панел со цел постигнување на висок степен на стандардизација при секојдневната патохистолошка проценка.

Заклучок

Во услови на недостаток и неможност за изведување на молекуларни испитувања, предложениот имунохистохемиски панел би можел да ги задоволи дијагностичките и прогностичките параметри, а може да донесе и предиктивни, индивидуализирани заклучоци за секој пациент дијагностициран со оваа болест.

Клучни зборови

Астроцитом, глиобластом, имунохистохемија, антитела, невропатологија.

Abstract

Introduction

The World Health Organization (WHO) Classification of CNS Tumors, updated in 2021, marks a paradigm shift in the diagnosis, categorization and nomenclature of brain tumors, whereby gliomas with *IDH* mutations and histological features of WHO grade 4 tumors are classified as Astrocytoma, while tumors without an *IDH* mutation are referred to as Glioblastomas.

Objectives

Implementation and standardization of an immunohistochemical panel comprising IDH1, IDH2, OLIG2, ATRX, H3K27me and MGMT antibodies and determination of their diagnostic, prognostic and predictive value in adult glial WHO grade 4 neoplasms.

Materials and methods

A retrospective cross-sectional study conducted at the Institute of Pathology at the Faculty of Medicine - UKIM of tissue material fixed in formalin and embedded in paraffin from 77 patients with histologically diagnosed WHO grade 4 glial tumors. Light microscopic analysis of H&E-stained slides and immunohistochemical analysis of the aforementioned panel were performed.

Results

Adult WHO grade 4 glial tumors are more common in men (1.5:1), with the highest incidence in the 60–69 age group and the lowest in the 30–39 age group. In the cohort, 62% belonged to glioblastoma, *IDH*-wild type, and 38% to astrocytoma, *IDH*-mutated. Patients with glioblastoma aged < 55 years had a median survival of an average of 24.9 months, adults aged 55–65 years survived 15.7 months, and patients ≥ age 65 years survived 7.7 months. Similarly, astrocytomas had twice the average survival of glioblastomas (23.4 versus 10.0 months), with a 24-month survival rate of 27% for astrocytomas versus 7% for glioblastomas. The median survival time for patients was 10.5 months, largely depending on the patient's age and tumor type. In addition to the immunohistochemical markers IDH1 and IDH2, the ATRX marker showed prognostic

value, while the H3K27me marker did not show statistically significant prognostic value, and the OLIG2 marker showed only diagnostic value. The study confirmed the predictive value of the MGMT marker.

Discussion

Evaluation of the specific immunohistochemical panel clearly confirms its association with molecular status and biology of WHO grade 4 glial neoplasms. The data obtained offer a more exquisite model for differentiating tumor entities within current global pathological classifications. Such observations indicate the need for regular application of this immunohistochemical panel in order to achieve a high degree of standardization in daily pathohistological assessment.

Conclusion

In settings where molecular testing is unavailable or unfeasible, the proposed immunohistochemical panel could satisfy the diagnostic and prognostic parameters, and could also bring predictive, individualized conclusions for each patient diagnosed with this disease.

Keywords

Astrocytoma, glioblastoma, immunohistochemistry, antibodies, neuropathology.

Листа на скратеници

- СЗО** – Светска здравствена организација
- ЦНС** – Централен нервен систем
- IDH** – Исоцитрат дехидрогеназа
- OLIG2** – Oligodendrocyte Transcription Factor 2
- ATRX** – Alpha-Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-linked
- H3K27me3** – Trimethylation of Histone H3 Lysine 27
- MGMT** – O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
- GDH2** – Глутамат дехидрогеназа 2
- cIMPACT-NOW** – Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy – Not Official WHO
- TERT** – Telomerase Reverse Transcriptase
- EGFR** – Epidermal Growth Factor Receptor
- CDKN2A** – Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A
- CDKN2B** – Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2B
- GFAP** – Glial Fibrillary Acidic Protein
- MLPA** – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
- STUPP** – стандарден онколошки протокол за третман на високостепени глијални тумори (д-р Роџер Ступ – d-r Roger Stupp)
- R132H** – *IDH1* генска мутација; замена на аргинин со хистидин на позиција 132
- R132C** – *IDH1* генска мутација; замена на аргинин со цистеин на позиција 132
- R132G** – *IDH1* генска мутација; замена на аргинин со глицин на позиција 132
- R132S** – *IDH1* генска мутација; замена на аргинин со серин на позиција 132
- R132L** – *IDH1* генска мутација; замена на аргинин со леуцин на позиција 132
- R132Q** – *IDH1* генска мутација; замена на аргинин со глутамин на позиција 132
- R172K** – *IDH2* генска мутација; замена на аргинин со лизин на позиција 172

1. Вовед

1.1 Класификација на туморите на централниот нервен систем според Светската здравствена организација

Класификацијата на тумори на ЦНС на СЗО претставува меѓународен стандард за патохистолошка дијагностика и категоризирање на мозочните тумори. Оваа класификација е од клучно значење за патолозите и за останатите медицински специјалисти, бидејќи овозможува заеднички јазик и унифициран пристап во разбирањето, третманот и проучувањето на туморите на ЦНС. Класификацијата претрпе значајна еволуција од нејзиното прво објавување до денес, како одраз на напредокот во молекуларната биологија и морфолошката дијагностика обогатена со нови техники. Досега се објавени вкупно пет изданија, од 1979 до 2021 година. [1, 2, 23, 50, 60, 62, 63, 79]

Класификацијата на мозочните тумори од 2016 година претставува ревидирано четврто издание во кое, за првпат, молекуларните анализи станаа клучна алатка во нивната дијагностика и класификација. Значаен чекор во тој поглед беше воведувањето на мутацискиот статус на *IDH* во класификацијата на глиомите, со што започна примената на концептот на интегрирана дијагноза. [2, 23, 50, 62]

Во 2021 година беше објавено петтото издание на Класификацијата на тумори на ЦНС на СЗО, кое е резултат на континуираната работа на експерти од целиот свет и е силно обликувано од препораките на cIMPACT-NOW (Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy – Not Official WHO). Со ова дополнително се нагласи и продлабочи потребата од молекуларна дијагностика, со што туморските ентитети беа редефинирани врз основа на нивните специфични генетски промени. [3, 4]

Една од главните промени во делот на глијалните тумори во новата класификација е модификацијата на нозологијата на одредени ентитети во зависност од нивниот молекуларен профил, мутацискиот статус на *IDH* и прогнозата на болеста. Притоа, терминот глиобластом се употребува исклучиво за глијални неоплазми кои немаат мутација на генот *IDH* ниту епигенетски мутации

во хистоните (*IDH-wildtype*), а поседуваат една или повеќе од следните хистолошки или генетски карактеристики: микроваскуларна пролиферација, некроза, мутација на промотерот на *TERT*, генска амплификација на *EGFR*, или комбинирана добивка на хромозомот 7 и губење на хромозомот 10 (+7/-10) (4. степен според СЗО). Од друга страна, глиомите кои поседуваат мутација на генот *IDH* и хистолошки белези на тумор од 4. степен според СЗО (микроваскуларна пролиферација, некроза и/или повисок митотски индекс) се класифицираат како астроцитом, *IDH*-мутиран (4. степен според СЗО). [1, 4, 50, 62, 63, 79]

Имунохистохемиската анализа, како значаен дијагностички модалитет, добива уште поголема важност во петтото издание на Класификацијата на тумори на ЦНС на СЗО. Притоа, одредувањето на мутацискиот статус на *IDH* со употреба на имунохистохемискиот маркер *IDH1* (R132H) е клучно за прецизно категоризирање на адултните глијални неоплазми од 4. степен според СЗО. Останатите имунохистохемиски маркери, како OLIG2, ATRX, H3K27me3 и MGMT, и во ова издание ја задржуваат својата веќе етаблирана примена во невропатолошкиот дијагностички процес. [45, 46, 101, 102, 105, 106, 107, 109, 111, 114, 115, 116, 123, 125, 127, 128, 154, 155, 175]

1.2 Хистолошки степен кај глијалните тумори

За разлика од туморите на другите локации, органи и органски системи, глијалните тумори во централниот нервен систем не се класифицираат според општоприфатените термини “бенигни”, “малигни” и тумори со неодреден степен на малигнитет, туку нивното биолошко однесување се изразува исклучиво преку хистолошкиот степен на диференцијација, кој е резултат на севкупните хистоморфолошки карактеристики. [3, 4, 16, 23, 50, 79, 104, 135]

Системот за степенување на мозочните тумори вклучува 4 хистолошки степени: Туморите од **1. степен** според СЗО се добродиференцирани неоплазми со бавен раст, бенигно биолошко однесување, неинвазивни, релативно јасно ограничени од околното здраво мозочно ткиво. Поради тоа, овие тумори се релативно полесни за комплетно хируршко отстранување, и со тоа излекување на пациентот. Во оваа

група од глијалните тумори припаѓаат пилоцитичниот астроцитом, ангиоцентричен глиом, ганглиоглиом и други. [68, 108]

Туморите од **2. степен** според СЗО се неоплазми со низок степен на малигнитет, но со потенцијал за повторна појава, односно рецидивирање или прогресија кон повисок степен. Овие тумори имаат поголема пролиферативна стапка, помалку јасни граници, инфилтративен раст и потенцијал за повторно појавување, но со повисок степен и тука се класифицирани *IDH*-мутираните астроцитоми од 2. степен според СЗО и олигодендроглиомите од 2. степен според СЗО. [16, 68, 74, 81]

Туморите од **3. степен** според СЗО се неоплазми со висок степен на малигнитет, висока пролиферативна стапка, инфилтративен начин на раст и анаплазија, зголемена атипичност и присуство на атипични митотски фигури. Можноста за прогресија во 4. степен според СЗО тумори е повисока во споредба со неоплазмите од 2. степен, а во оваа група припаѓаат *IDH*-мутиран астроцитом од 3. степен според СЗО и олигодендроглиом од 3. степен според СЗО. [16, 48, 49, 104, 135]

Туморите од **4. степен** според СЗО се неоплазми со највисок степен на малигнитет и најагресивно биолошко однесување. Висока пролиферативна стапка и изразена инфилтрација во околното мозочно ткиво. Туморските клетки покажуваат назначена анаплазија, хиперцелуларност, туморска некроза и абнормална пролиферација на крвни садови, наречена микроваскуларна пролиферација. Овие тумори имаат најлоша прогноза и најмало преживување. Во оваа група спаѓаат *IDH*-мутиран астроцитом од 4. степен според СЗО и *IDH*-див тип глиобластом од 4. степен според КТ за ЦНС на СЗО. [1, 3, 4, 23, 26, 49, 50, 104, 119, 120, 135]

Една од препораките во последната класификација на туморите на ЦНС е обележувањето на степенот на секоја неоплазма со арапски цифри, во следнава форма: 1., 2., 3. или 4. степен според СЗО. [1, 3, 4, 50, 79]

1.3 Дефиниција и класификација на адултни глијални тумори од 4. степен според класификацијата на СЗО за тумори на централниот нервен систем

Петтото издание на Класификацијата на туморите на централниот нервен систем (ЦНС) на Светската здравствена организација (СЗО), објавено во 2021 година, претставува суштински пресврт во разбирањето на патогенезата и дијагностиката на глијалните неоплазми. Традиционалниот начин на дијагностицирање, кој се засноваше првенствено врз морфолошките карактеристики, во новата класификација е надополнет со молекуларните профили на неоплазмите на ЦНС, кои сега претставуваат клучен елемент при дефинирањето на типот на туморот и неговиот степен на малигнитет. Овој пристап, покрај унифицираното и прецизно поставување на дијагнозата, овозможува и добивање значајни прогностички податоци кои директно корелираат со клиничкиот тек на болеста. [1, 50, 60, 62, 63, 79]

За разлика од традиционалното класифицирање кое се ослонуваше исклучиво на возраста на пациентите, во новата класификација поделбата на глијалните тумори на педијатриски и адултни глиоми се темели пред сè врз нивните молекуларни карактеристики и специфичната туморска биологија. [1, 50, 60, 62, 63, 79]

Кај пациентите постари од 18 години, глијалните неоплазми се класифицираат според мутацискиот статус на *IDH*, кој претставува клучен таксономски критериум и дефинирачки маркер. Во групата неоплазми од 4. степен според Класификацијата на тумори на ЦНС на СЗО спаѓаат два ентитета: астроцитом, *IDH*-мутиран и глиобластом, *IDH*-див тип. Дијагнозата за *IDH*-мутиран астроцитом од 4. степен според СЗО може да се постави на два различни начина. Првиот начин се заснова врз присуството на хистоморфолошки белези карактеристични за малигна трансформација, како што се некрозата и/или микроваскуларната пролиферација. Вториот начин е преку молекуларна детекција на хомозиготна делеција на гените *CDKN2A/B*, која, дури и во отсуство на јасно изразени морфолошки белези, се смета за доволна за дефинирање на туморот како астроцитом од 4. степен. Со ова, терминот „глиобластом, *IDH*-мутиран“ од класификацијата од 2016 година е

повлечен од употреба, а сите *IDH*-мутирани тумори се сместени во континуумот на астроцитомии — од 2. до 4. степен, во зависност од нивната морфологија и молекуларен профил. Оваа концептуална ревизија ја нагласува биолошката поврзаност на *IDH*-мутираните тумори, кои, иако можат да имаат агресивен клинички тек, генерално се одликуваат со различно патогенетско потекло, различен метаболен профил и подобра прогноза во споредба со неоплазмите без мутации на *IDH*. [1, 4, 50, 104, 119, 120, 135]

Од друга страна, глиобластомот, *IDH*-див тип останува еден од најчестите и најагресивни примарни тумори на мозокот во адултната популација. Овој тумор најчесто се јавува спорадично, без постоење на понискостепен прекурсор, и се карактеризира со брз раст, изразена инфилтрација и неповолна прогноза. Статусот на *IDH*-див тип глиобластом укажува на туморска биологија која е геномски нестабилна, со чести промени во гените *TERT*, *EGFR* и хромозомите 7 и 10, што ја одразува неговата висока малигност и отпорност на терапија. [6, 11, 52, 97, 113, 119, 120, 121, 145]

Преминот од ревидираното четврто издание на Класификацијата на СЗО од 2016 година кон петтото издание од 2021 година претставува трансформација од исклучиво морфолошки систем во интегрирана дијагностичка архитектура, која рамноправно ги инкорпорира и молекуларните белези на глијалните тумори. Додека порано дефинирањето на 4. степен се темелеше исклучиво врз присуството на некроза и микроваскуларна пролиферација, денес се потенцира значењето на молекуларните промени, кои можат независно да го одредат малигниот потенцијал на туморот. Овој нов пристап носи неколку важни клинички и дијагностички придобивки. Прво, се овозможува рано препознавање на биолошки агресивните тумори, дури и кога хистолошките промени се минимални или отсутни во доставениот ткивен примерок. Второ, се обезбедува поголема прецизност во прогнозата и насочувањето на терапијата, особено во контекст на современата персонализирана онкологија. Трето, класификацијата станува универзално применлива и репродукцибилна, што е од суштинско значење за клиничките испитувања и споредбените научни анализи. [2, 23, 50, 62]

Во суштина, адултните глијални неоплазми од 4. степен според КТ на ЦНС на СЗО денес не се само морфолошка категорија, туку интегриран биолошки ентитет дефиниран преку комбинација на хистолошки карактеристики и клучни генетски настани. Во овој контекст, *IDH* мутацискиот статус претставува основен патоказ во дијагностичката логика, а неговото точно определување е од суштинско значење за соодветна класификација, прогноза и терапевтска стратегија. [1, 50, 60, 62, 63, 79]

1.4 Астроцитом, *IDH*-мутиран

Последната класификација на глијалните тумори го рedefинира патолошкиот ентитет за адултни астроцитни глијални неоплазми, при што астроцитомите се дефинирани како дифузно-инфилтративни тумори кај кои е мутиран генот за *IDH1* и/или *IDH2*, што влијае на хистолошкиот степен на диференцијација, и според тоа класификацијата препознава три поттипови, и тоа астроцитом од 2, 3 и 4. степен според СЗО. [2, 3, 16, 23, 49, 50, 104, 135]

Астроцитомите се глијални неоплазми кои ја сочинуваат најголемата група дијагностицирани мозочни тумори. Се смета дека нивната хистогенеза потекнува од мешана популација на астроцитни и олигодендроглијални клеточни лози и/или неурални прекурсорски клетки. Овие тумори најчесто се јавуваат во супратенторијалниот регион на големиот мозок (над тенториумот на церебелумот), каде што растат дифузно-инфилтративно во околотото паренхимско ткиво, со посебна предилекција за фронталните лобуси. [17, 18, 19, 20, 21, 22, 25, 43]

Клиничката манифестација на астроцитомите обично е постапна, освен во случаите кога болеста иницијално се презентира со епилептични напади. Туморите што се развиваат во функционално помалку критичните (неелоквентни) региони на мозокот на почетокот често немаат изразени симптоми, при што неврокогнитивната функција на пациентите е релативно сочувана. Ова се должи на побавниот туморски раст кој овозможува развој на компензаторен невропластичитет. Најчестата клиничка презентација на овие неоплазми се токму епилептичните напади, кои можат да бидат фокални (со или без нарушување на

свеста) или фокални напади со секундарна генерализација во генерализирани тонично-клонички напади. [27, 51, 75, 79, 199]

Повеќето пациенти со дијагностициран астроцитом од 2. и 3. степен според Класификацијата на СЗО се на возраст меѓу 30 и 40 години. Овие два степена поседуваат слична возрасна дистрибуција, додека астроцитомите од 4. степен покажуваат тенденција за појава во поодмината возраст. Притоа, *IDH*-мутираните астроцитомите се ретки кај пациенти постари од 55 години. Студиите укажуваат дека *IDH*-мутираните астроцитни тумори од 2. и 3. степен се почести кај машкиот пол. Поголемиот дел од *IDH*-мутираните астроцитомите од 4. степен се развиваат *de novo*, односно без претходна историја на анамнеза за понискостепен глиом. Конечно, дифузните астроцитомите можат да се појават и како секундарни неоплазми по терапевтска ирадијација на мозокот, најчесто при третман на метастатски депозити, но овие радијациски индуцирани глиомите не поседуваат мутации на генот *IDH*. [9, 13, 14, 15, 192, 193, 200, 201]

Истражувањата покажуваат дека *IDH*-мутираните астроцитомите произлегуваат од мешавина на различни клеточни линии, како што се астроцитни, олигодендроглијални и нервни прекурсорни клетки. [17, 18, 19, 20, 21, 22, 25, 43, 112, 151, 161]

Постојат значајни разлики меѓу туморите со и без мутација на *IDH*. Овие разлики се рефлектираат во возрасната дистрибуција на пациентите, половата застапеност и крајниот исход на болеста, што укажува на тоа дека овие неоплазми потекнуваат од различни клеточни лози и се развиваат преку различни патогенетски механизми. Вреди да се истакне дека *IDH*-мутираните глиомите имаат изразена анатомска предилекција за фронталните лобуси на мозокот. Оваа локализација може да биде поврзана со зголемената активност во овие региони на митохондријалниот ензим глутамат дехидрогеназа 2 (GDH2), кој ја катализира реверзибилната оксидативна дезаминација на глутаматот во алфа-кетоглутарат и амонијак. Ензимот GDH2 учествува во метаболизмот на глутаматот и може делумно да ги компензира метаболните промени предизвикани од мутацијата на *IDH*, со што го поддржува растот на туморот во раните фази од неговиот развој. [5, 47]

Макроскопски, понискостепените *IDH*-мутирани астроцитомы (2. и 3. степен според C3O) обично се презентираат како белузлави, нејасно ограничени туморски маси со мека конзистенција. Во нив често се присутни цистични подрачја, понекогаш со поголеми цисти исполнети со желатиозна содржина, или пак единечна циста исполнета со бистра или заматена течност. Од друга страна, високостепените астроцитомы (4. степен) можат да имаат сличен макроскопски изглед, но кај нив дополнително се забележуваат фокални жолтеникави подрачја, кои се последица на коагулациона некроза и/или интратуморска хеморагија. [63, 137, 138, 139, 140, 144, 148, 166, 169, 170, 172]

IDH-мутираните астроцитомы покажуваат широк спектар на хистолошка диференцијација и клиничко однесување — почнувајќи од добродиференцирани, хипоцелуларни и бавнорастечки неоплазми (2. степен според C3O), па сè до изразено анапластични, хиперцелуларни и брзопрогресивни тумори (4. степен според C3O). [17, 19, 20, 26, 43, 99, 101, 125, 151, 155]

Туморите од 2. степен според C3O се изградени од добродиференцирани, некохезивни, фибрилари астроцити кои дифузно-инфилтративно пролиферираат во мозочниот паренхим, при што клетките се вклопени во растресит, често микроцистичен, глијален фибриларен матрикс. Клетките покажуваат дискретна (лесна) нуклеарна атипичност, а нивната густина и морфологија варираат во однос на клеточната големина, цитоплазматските карактеристики и проминентноста на клеточните продолжетоци. [16, 68, 74, 81]

За поставување дијагноза на астроцитом од 3. степен според C3O во биоптичен материјал со мал волумен, доволна е верификација на само една патолошка митоза, придружена со останатите хистолошки знаци на анаплазија. Притоа, од суштинско дијагностичко значење е отсуството на микроваскуларна пролиферација и некроза кај овие неоплазми. [16, 48, 49, 104, 135]

За дијагностицирање на астроцитом од 4. степен според C3O, покрај горенаведените хистолошки карактеристики, мора да се потврди присуство на туморска некроза и микроваскуларна пролиферација. [1, 3, 4, 23, 26, 49, 50, 104, 119, 120, 135]

Терминот „глиобластом“ повеќе не се употребува универзално за сите глијални неоплазми со морфолошки одлики на тумор од 4. степен според СЗО. И покрај новата нозолошка класификација, постои изразено морфолошко преклопување во однос на цитолошките и хистолошките карактеристики меѓу *IDH*-мутираните и *IDH*-див тип глијални неоплазми од 4. степен според СЗО. Сепак, бројни студии укажуваат на постоење квантитативни разлики во застапеноста на туморската некроза меѓу овие два нозолошки ентитета. Помалиот опсег на некроза, присутна кај приближно половина од случаите, е почест наод кај *IDH*-мутираните астроцитомите од 4. степен според СЗО. Спротивно на тоа, висок процент на некроза — која во одделни случаи може да зафаќа и до 90% од туморската маса — е карактеристична за *IDH*-див тип неоплазмите од 4. степен, односно глиобластомите. [23, 26, 49, 50, 104, 119, 120, 135]

Изоцитрат дехидрогеназата (*IDH*) е ензим кој игра клучна улога во клеточниот метаболизам, односно го катализира процесот на оксидативна декарбоксилација на изоцитратот до алфа-кетоглутарат. Овој ензим има три изоформи - *IDH1*, *IDH2* и *IDH3*, кои учествуваат во неколку важни метаболни процеси, како што се Кребсовиот циклус, глутамински метаболизам, липогенеза и редокс-регулацијата. *IDH1* е лоциран во цитоплазмата, додека *IDH2* е лоциран во митохондриите. [5, 45, 46, 47, 74, 102, 105, 115, 122, 129]

Алтерациите во гените *IDH* претставуваат точкести мутации (point mutations) кои засегаат специфични аминокиселински остатоци во самиот ензим. Мутациите претежно се јавуваат во гените *IDH1* и *IDH2*, додека третата изоформа, *IDH3*, исклучително ретко се поврзува со онкогенезата. Поточно, се работи за мисенс мутации (missense mutations), каде што една нуклеотидна база во ДНК-секвенцата е заменета со друга, што резултира со супституција на поединечна аминокиселина во полипептидниот синџир на ензимот. Кај *IDH1*, најчестата мутација се јавува на аргининскиот остаток на позиција 132 (R132), при што најзастапена е супституцијата на аргининот со хистидин, од каде што произлегува доминантната варијанта *IDH1* R132H. Поретко се идентификуваат и други аминокиселински замени на истата позиција, како што се R132C, R132G, R132L, R132S и R132Q. [5, 7, 11, 16, 25, 45, 46, 47, 48, 49, 52, 53, 58, 74, 92, 97, 98, 102, 105, 115, 121, 122, 129, 136, 139, 142, 159, 161, 167, 170]

Кај генот *IDH2*, мутациите примарно се лоцирани на аргининскиот остаток на позиција 172 (R172), каде што најчесто се детектира варијантата R172K (супституција на аргининот со лизин). Значително поретко, алтерациите засегаат и позиција 140 (R140), со супституција R140Q (замена со глутамин). [5, 50, 122]

Мутациите во гените *IDH* се застапени кај повеќе од 80% од понискостепените и високостепените астроцитомы (2., 3. и 4. степен според СЗО), додека по дефиниција се отсутни кај глиобластомот. [5, 7, 16, 45, 74, 121]

Стекнувањето на мутации во гените *IDH* индуцира значително репрограмирање на клеточниот метаболизам во насока на редукција на гликолизата — која поинаку претставува клучна метаболна карактеристика на високопролиферативните малигни неоплазми. Оваа метаболна адаптација резултира со забавена туморска пролиферација и значително подобра прогноза во споредба со *IDH*-див тип неоплазмите. [5, 47, 53, 74, 129, 136, 174]

Присуството на мутации во генот *IDH* е значаен предиктор за подобра прогноза и пролонгирано преживување кај пациентите со дијагностициран астроцитом од 4. степен според СЗО, каде што медијаната на преживување изнесува од 31 до 34 месеци. Спротивно на тоа, кај *IDH*-див тип неоплазмите од 4. степен според СЗО (глиобластомы), медијаната на преживување е значително пократка и се движи од 14 до 16 месеци. [7, 16, 74, 92, 104, 116, 121, 135, 136]

Кај *IDH*-мутираните астроцитомы често се детектираат инактивиращки алтерации на генот *ATRX*, кој е локализиран на X-хромозомот (Xq21.1). Неговиот протеински продукт учествува во хроматинското ремоделирање, со посебен афинитет за теломерните и перицентромерните региони. Овие мутации најчесто резултираат со скратен протеински синџир и спречена протеинска експресија, што доведува до губење на нуклеарната *ATRX* имунореактивност. Губитокот на нуклеарната експресија на *ATRX* во неопластичните клетки претставува силен патогномоничен белег кој ја поддржува дијагнозата на *IDH*-мутиран астроцитом. [11, 37, 49, 56, 57, 58, 61, 65, 66, 98, 104, 113, 116, 123, 136]

Еден од особено важните прогностички фактори што влијаат врз преживувањето кај пациентите со високостепени глијални тумори е обемот на

туморската ресекција. Пациентите кај кои е изведена тотална или субтотално неврохируршко отстранување на туморската маса имаат значително подолго преживување во споредба со оние кај кои е извршена само биопсија за земање ткивен фрагмент со цел поставување патохистолошка дијагноза и започнување адјувантна онколошка терапија. [67, 68, 69, 77, 78, 80, 90, 91, 94, 95, 96]

Како еден од најрелевантните прогностички фактори се издвојува самиот хистолошки степен на диференцијација на глијалната неоплазма, кој се одредува врз основа на утврдените хистопатолошки критериуми, како што се митотската активност, микроваскуларната пролиферација и некрозата. Пациентите со дијагностициран *IDH*-мутиран астроцитом од 2. степен според *C3O* имаат медијана на вкупно преживување над 10 години. кај *IDH*-мутираните астроцитомите од 3. степен според *C3O*, медијаната на вкупно преживување типично изнесува од 5 до 10 години, додека кај астроцитомите од 4. степен според *C3O* очекуваната медијана на вкупно преживување достигне до 3 години. [16, 23, 49, 104, 135, 187]

1.5 Глиобластом, *IDH*-див тип

Глиобластомот е најчесто дијагностицираниот глијален тумор од 4. степен според *C3O* кај возрасната популација, кој зафаќа околу 15% од сите дијагностицирани интракранијални неоплазми и 45–50% од сите примарни, високостепени мозочни тумори. Иако може да се јави во која било животна возраст, тој претежно ја погодува постарата популација, со пик на инциденција на возраст меѓу 55 и 85 години, додека во детската возраст учествува со само 3% од сите неоплазми на централниот нервен систем. Американските епидемиолошки студии покажуваат однос меѓу машкиот и женскиот пол од 1,60:1, додека во швајцарските студии тој однос изнесува 1,28:1. [1, 50, 62, 63, 79]

Епидемиолошките извештаи од Соединетите Американски Држави, Канада, Обединетото Кралство и Австралија укажуваат на тоа дека во последните неколку децении возрасно-стандардизираната годишна стапка на инциденција на глиобластом бележи пораст од 3 на 6 случаи на 100.000 жители. Како потенцијални причини за овој зголемен тренд се наведуваат значајниот напредок и подобрената

пристапност до радиолошките имиџинг-дијагностички методи, како и одредени промени во животниот стил и факторите од животната средина. Од друга страна, статистичките податоци покажуваат пониска инциденција на глиобластом во азиските и африканските земји, што главно се претпоставува дека произлегува од разликите во возрасната структура на населението, но и од ограничените дијагностички ресурси во овие региони. [9, 13, 14, 15, 192, 193, 196, 200, 201]

Етиологијата на поголемиот дел од случаите на глиобластом сè уште останува непозната. Сосем мал процент од неоплазмите имаат фамилијарна застапеност и/или се наследуваат во рамките на наследни туморски синдроми, како што се Линчевиот синдром (Lynch syndrome), вродениот синдром на дефицит во механизмите за поправка на грешки во ДНК-спарувањето (constitutional mismatch repair deficiency syndrome), синдромот на Ли-Фраумени (Li-Fraumeni syndrome) и неврофиброматозата тип 1. Досега, како единствен цврсто потврден надворешен фактор на ризик за појава на глиобластом се издвојува изложеноста на јонизирачко зрачење во пределот на главата и вратот — било да се работи за јатрогено (терапевтско) или нејатрогено зрачење. [18, 26, 29, 32, 52, 119, 120]

Експерименталните модели на лабораториски глувци покажуваат дека глиобластомот може да потекнува од неколку клеточни типови — вклучително и олигодендроглијални клетки, неврални прекурсорни клетки, астроцити и неврони подложни на трансформација — кои подлежат на малигна трансформација и развиваат хистолошки карактеристики типични за овој тумор. Студиите за длабинско генетско секвенционирање овозможуваат уште попрецизен увид во патогенезата, сугерирајќи дека клетките од кои примарно се развива глиобластомот претставуваат неврални прекурсори локализирани во субвентрикуларната зона. Оваа мозочна регија е сместена непосредно до сидовите на латералните комори и претставува едно од ретките анатомски подрачја во кои е зачувана физиолошката неврогенеза (формирањето нови нервни клетки). [18, 19, 22, 25, 42, 151, 161]

Она што особено го издвојува глиобластомот од останатите мозочни тумори е неговата изразена способност за инвазија во соседните мозочни структури. Оваа инфилтрација најчесто се одвива по должината на сноповите од белата маса — вклучително и *capsula interna*, форниксот, предната комисура и оптичката

радијација — но исто така може директно да ги инфилтрира кортексот и длабоките структури на сивата маса. Во случаите кога туморот се шири во контралатералната хемисфера преку *corpus callosum*, се формира билатерална симетрична лезија позната како „глиом со изглед на пеперутка“ (butterfly glioma). Дополнително, одделни тумори можат да се манифестираат како *gliomatosis cerebri* — фенотип кој се одликува со екстензивно дифузно зафаќање на повеќе анатомски региони на централниот нервен систем. [13, 63, 137, 140]

Начинот на кој глиобластомот се шири и „метастазира“ во подалечните структури на централниот нервен систем е резултат на специфични патохистолошки обрасци на инвазија — како што се периневралната сателитоза, периваскуларното кумулирање и субпијалното ширење — кои резултираат со формирање на таканаречените „секундарни структури на Шерер“ (Scherer's secondary structures). Тие претставуваат поединечни клетки или мали групи неопластични астроцити кои хистолошки можат да се детектираат на неколку сантиметри оддалеченост од примарниот туморски епицентар, иако се радиолошки и неврохируршки „невидливи“. Тие претставуваат главен извор за локално рецидивирање по иницијалниот третман, бидејќи ја избегнуваат хируршката ресекција, не ја примаат максималната доза на радиотерапија и населуваат региони со зачувана крвно-мозочна бариера, каде што биорасположливоста на хемотерапевтикот е значително снижена. [44]

Како и кај останатите неоплазми со малигно биолошко однесување, неконтролираната туморска клеточна пролиферација претставува еден од централните патохистолошки белези на глиобластомот. Во најголем дел од случаите, на ткивните пресеци од овој тумор се идентификуваат атипични (патолошки) митози. Оттука, поради нагласената интратуморска хетерогеност, вредностите на пролиферативниот индекс одредени преку имунохистохемиската анализа со Ki-67 во рамките на еден и ист глиобластом можат значително да варираат, односно да се движат во опсег од 5% до 50%. [42, 99, 107, 125, 154]

Агресивното биолошко однесување на глиобластомот е директно детерминирано од микроваскуларната пролиферација, која се одликува со брза неоваскуларизација и формирање на абнормални, повеќеслојни крвни садови со

карактеристичен гломерулоиден облик — феномен кој е последица на изразената хиперплазија на ендотелните клетки и перипитите. [86, 87, 88, 177, 178]

Главната дијагностичка патохистолошка карактеристика на глиобластомот е туморската псевдопалисадна некроза која настанува како последица на брзата неоваскуларизација и формирањето абнормални крвни садови, кои одликувајќи се со тромбогенични, дефектни и нестабилни луминални површини, се подложни на акутна оклузија. Дополнително, појавата на некроза е поттикната од секрецијата на прокоагулантни молекули, како што е ткивниот фактор (tissue factor — TF), кој туморските клетки го ослободуваат во локалната микросредина и циркулацијата. Ваквата тромбоза на неоваскулатурата создава неповолна, хипоксична и кисела микросредина скратена од кислород и глукоза, што ги стимулира туморските клетки активно да мигрираат периферно од исхемичното јадро. Оваа миграција ги формира таканаречените псевдопалисади — густо поставени перинекротични низи од туморски клетки, кои се одликуваат со привремено намалена пролиферативна активност и остра индукција на хипоксија-индуцираниот фактор 1-алфа (HIF-1 α). [10, 26, 27, 40, 41]

Микроскопската анализа на ткивен примерок од *IDH*-див тип глиобластом покажува дифузно-инфилтративна, хиперцелуларна туморска неоплазма составена од слабо диференцирани астроцити со изразена нуклеарна атипичност, нагласен плеоморфизам и, во најголем дел од случаите, висока митотска активност. Клучните дијагностички хистоморфолошки критериуми го опфаќаат присуството на гореописаната микроваскуларна пролиферација и туморска некроза (со или без перинекротично псевдопалисадење). За поставување дефинитивна патохистолошка дијагноза на глиобластом, доволна е микроскопска верификација на барем еден од овие два белега. [17, 19, 20, 26, 27, 101, 125, 151, 155]

Дистрибуцијата на хистоморфолошките карактеристики во рамки на глиобластомот покажуваат изразена варијабилност. Микроваскуларната пролиферација може да биде дифузно застапена низ целата туморска маса, но нејзината експресија е најизразена во перинекротичните фокуси и на периферијата, во самата зона на туморска инфилтрација. Во однос на клеточноста, глиобластомот може да биде доминантно изграден од слабо диференцирани, вретеновидни или

плеоморфни клетки, иако неретко се идентификуваат и жаришта со подобро диференцирани астроцити. Кај гемистоцитните варијанти, анапластичните клетки се интимно измешани со диференцирани гемистоцити. Ваквата нагла морфолошка транзиција во рамките на еден тумор може да укажува на појава на нов неопластичен клон како резултат на интратуморска молекуларна диверзификација. [17, 19, 20, 26, 27, 101, 125, 151, 155]

1.6 Имунохистохемиски маркери во дијагностиката и класификацијата на адултни глијални неоплазми од 4. степен според СЗО

Еден од најважните и најчесто применуваните имунохистохемиски маркери во невропатологијата е GFAP (glial fibrillary acidic protein — глијален фибриларен киселински протеин). Овој протеин претставува главна структурна компонента на интермедиерните филаменти кај астроцитите и епендимските клетки во централниот нервен систем. Примарната дијагностичка улога на GFAP е да го потврди глијалното потекло на неоплазмата и да овозможи диференцијална дијагноза кај морфолошки нејасните случаи. Покрај него, за одредување на пролиферативниот капацитет на туморот, рутински се користи имунохистохемискиот маркер Ki-67 (клонот MIB-1). Неговата нуклеарна имунореактивност е исклучиво присутна во јадрата на сите клетки кои се наоѓаат во активните фази од клеточниот циклус (G1, S, G2 и митоза), додека комплетно отсуствува во фазата на мирување (G0). [8, 99, 101, 107, 125, 154]

Новите критериуми во невропатолошката пракса наметнуваат примена на проширен панел од имунохистохемиски и молекуларни анализи со цел дефинирање интегрирана дијагноза, која покрај патохистоморфолошкиот профил, ги инкорпорира и имунофенотипските и молекуларно-генетичките одлика на секоја неоплазма. Согласно препораките од актуелната Класификација на СЗО за туморите на ЦНС (2021), имунохистохемискиот панел за проценка на дифузните глијални неоплазми кај возрасни од 4. степен ги опфаќа следниве клучни маркери: IDH1, IDH2, OLIG2, ATRX, H3K27me3 и MGMT [1, 50, 60, 62, 63, 79]

Изоцитрат дехидрогеназата (IDH) е ензим од суштинско значење за клеточниот метаболизам и редокс-регулацијата. Гените кои ги кодираат различните изоформи на овој ензим се локализирани на различни хромозомски локуси во човечкиот геном: генот *IDH1* е сместен на долгиот крак од хромозомот 2 (регион 2q34), додека *IDH2* е локализиран на долгиот крак од хромозомот 15 (регион 15q26.1). Во изминатите две децении, мутацискиот статус на овие гени се етаблира како еден од најважните дијагностички и прогностички биомаркери кај глијалните неоплазми. Според актуелната Класификација на СЗО за туморите на ЦНС (2021), неоплазмите со хистоморфолошки одлики на високостепен глиом (4. степен според СЗО), кај кои се присутни мисенс (missense) мутации во гените *IDH1* или *IDH2*, повеќе не се класифицираат како глиобластоми, туку ја добиваат нозолошката дијагноза астроцитом, *IDH*-мутиран, 4. степен според СЗО. Пациентите со оваа дијагноза остваруваат значително подобра медијана на преживување во споредба со оние чиј тумор не поседува *IDH*-мутација, а кој формално се дефинира како глиобластом, *IDH*-див тип, 4. степен според СЗО. Во патохистолошката рутина, за детекција на најчестата *IDH1* мутација се користи специфичниот имунохистохемиски маркер *IDH1* p.R132H, кој дава интензивна цитоплазматска имунореактивност кај мутираните туморски клетки. Како внатрешна негативна контрола при ова имунохистохемиско боење служат ендотелните клетки од васкулатурата и резидентите ненеопластични глијални клетки. Поради високата сензитивност и специфичност, цитоплазматската експресија за *IDH1* p.R132H претставува цврст доказ за постоење на *IDH*-мутиран глиом. [1, 5, 45, 46, 50, 102, 105, 115, 122]

Изоцитрат дехидрогеназата 2 (*IDH2*) е митохондријален ензим кој игра клучна улога во Кребсовиот циклус (циклусот на лимонската киселина). Во физиолошки услови, примарната метаболна функција на овој ензим е генерирањето на редуциран никотинамид аденин динуклеотид фосфат (NADPH), кој е од суштинско значење за одбраната на клетката од оксидативен стрес и за де ново синтезата на липиди. Соматските мутации во генот *IDH2* се значително поретки во споредба со мутациите во генот *IDH1*, а се јавуваат таргетирано на специфични аминокиселински остатоци — првенствено на кодоните R140 и R172. Најчестата мисенс мутација е *IDH2* p.R172K, која може рутински да се детектира преку имунохистохемиска анализа со користење на мутација-специфично моноклонално

антитело. При присуство на оваа мутација, имунохистохемскиот препарат се одликува со диференцијална, интензивна цитоплазматска имунореактивност во неопластичните клетки. [1, 5, 50, 122]

Имунохистохемската анализа за маркерите IDH1 и IDH2 се класифицира како неконклузивна доколку методолошките варијации ја компромитираат вистинската идентификација на мутацијата во однос на артефактите [102], кога позитивниот сигнал се гледа исклучиво во нетуморските стромални и воспалителни клетки, или пак кога наместо изразена цитоплазматска експресија во неопластичните клетки, се воочува само слаб, дифузен сигнал и во невропилот што најверојатно е резултат на несоодветна или задоцнета фиксација на ткивниот примерок [105]

Генот *OLIG2* (oligodendrocyte transcription factor 2 — олигодендроцитен транскрипциски фактор 2), сместен на хромозомот 21 (локус 21q22.11), ја промовира детерминацијата и диференцијацијата на невралните прогениторни клетки во олигодендрцити — глијални клетки одговорни за миелинизација во централниот нервен систем. Неговиот протеински продукт, OLIG2, претставува нуклеарен транскрипциски фактор кој ја регулира експресијата на низа целни гени. Имунохистохемската анализа со антитело против OLIG2 има високо дијагностичко значење за потврдување на глијалната припадност на туморите. Во физиолошки услови, овој маркер се карактеризира со исклучиво нуклеарна имунореактивност во глијалните клетки на нормалното мозочно паренхимско ткиво. Кај глиобластомите, OLIG2 покажува варијабилна имунореактивност, со доминантно маркирање на неопластичните астроцити, особено во подрачјата со зачувана пронеурална молекуларна фенотипизација. Дијагностичката вредност на OLIG2 се состои во неговата способност да ја потврди глијалната природа на клетките и ефективно да ги диференцира дифузните глиоми од неглијалните ЦНС неоплазми — како што се секундарните (метастатски) карциноми, примарните ЦНС лимфоми и менингиомите — кои по правило се OLIG2-негативни. Кај глиобластомот, OLIG2-позитивноста е типично хетерогена, што директно ја рефлектира интратуморската фенотипска диверзификација: одделни региони покажат силна нуклеарна позитивност, додека анапластичните и недиференцираните фокуси можат целосно да ја изгубат имунореактивноста. Детекцијата на OLIG2 рутински се интегрира во панел заедно со GFAP, IDH1,

ATRX и Ki-67 со цел дефинирање интегрирана патохистолошка и молекуларна дијагноза, во согласност со препораките на актуелната Класификација на СЗО за туморите на ЦНС (2021). [42, 43, 44, 99, 101, 107, 112, 114, 125, 154]

Генот *ATRX* (alpha-thalassemia/mental retardation, X-linked — алфа-таласемија/ментален дефицит поврзан со X-хромозомот) е локализиран на X-хромозомот (локус Xq21.1) и го кодира истоимениот протеин ATRX. Овој протеин е суштински одговорен за одржување на хроматинскиот интегритет и геномската стабилност, а неговата централна патофизиолошка улога се состои во специфично вградување (депонирање) на хистонската варијанта H3.3 во геномот. Преку овој механизам, *ATRX* врши епигенетичка регулација на генската експресија и го одржува хетерохроматинскиот склоп во перичентромерните и субтеломерните региони на ДНК. [37, 38, 39, 56, 57, 61, 64, 65, 66, 98, 108, 123, 128, 164]

Кај дифузните глијални неоплазми кај возрасни од 4. степен според СЗО, губењето на имунохистохемиската експресија на маркерот ATRX силно ја поддржува дијагнозата на *IDH*-мутиран астроцитом од 4. степен. За разлика од нив, глиобластомот (*IDH*-див тип) и олигодендроглиомите по правило ја зачувуваат имунохистохемиската експресија на ATRX. Во случаите каде што нема соматска инактивација, имунохистохемискиот маркер ATRX се манифестира со силна нуклеарна имунореактивност во неопластичните клетки, при што јадрата на ендотелните клетки од васкулатурата, зачуваните неврони и ненеопластичните глијални клетки служат како задолжителна внатрешна позитивна контрола. [11, 37, 56, 57, 58, 61, 65, 66, 98, 104, 113, 116, 123, 136]

Постојат повеќе фамилии на хистонски протеини, од кои хистонот H3 има централна улога во хроматинската регулација преку специфични пост-транслационски епигенетички модификации. Една од најзначајните репресивни форми е триметилацијата на лизинскиот остаток 27 на хистонот H3 (H3K27me3), која е директно асоцирана со формирање на транскрипциски неактивен хетерохроматин и одржување на таргетираните гени во репресирана состојба. Губењето на оваа епигенетичка модификација доведува до абнормална дерепресија на онкогени или индиректна инактивација на клучни тумор-супресорни механизми, со што се поттикнува туморигенезата. Аберациите во метилацискиот статус на

H3K27 се препознаваат како клучни патогенетски настани кај повеќе типови неоплазми на централниот нервен систем, особено кај педијатриските и адултните дифузни глиоми. [38, 40, 41, 103, 128, 164, 174]

Имунохистохемискиот маркер H3K27me3 специфично ја детектира триметилираната форма на хистонот H3 на лизинскиот остаток 27. Хистолошки, овој епигенетички маркер се одликува со интензивна, дифузна нуклеарна имунореактивност во физиолошките клетки од мозочниот паренхим, како и кај најголемиот дел неоплазми на централниот нервен систем. Комплетното или парцијалното губење на нуклеарната експресија на H3K27me3 укажува на присуство на соматски H3 K27 мутации (најчесто H3F3A p.K27M), кои претставуваат патогномонична молекуларна одлика за дифузните глиоми на средишната линија (diffuse midline glioma, H3 K27-altered). [38, 40, 41, 103, 128, 164, 174]

Од дијагностичка перспектива, евалуацијата на имунохистохемиската експресија на H3K27me3 е клучна во диференцијацијата на глиобластомите од останатите високостепени дифузни глиоми — особено од дифузните глиоми на средишната линија со H3 K27-аберација, кои се одликуваат со карактеристичен глобален губиток на нуклеарната имунореактивност за H3K27me3. [1, 40, 50, 128, 164]

Кај дифузните глијални неоплазми кај возрасни од 4. степен според C3O, зачувувањето на нуклеарната експресија на H3K27me ја поддржува дијагнозата за *IDH*-див тип глиобластом, исклучувајќи го дифузниот глиом на средишната линија со H3 K27-аберација или некој друг молекуларен подтип. [40, 128, 164]

Генот *MGMT* (O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase) го кодира истоимениот ензим O⁶-метилгванин-ДНК метилтрансфераза, кој е одговорен за ДНК-поправка преку специфично отстранување на промутагените алкилни групи од O⁶-позицијата на гванинот. Транскрипцијата на овој ген е редуцирана или потполно инактивирана преку епигенетичка промоторска хиперметилација во 40–50% од сите случаи на глиобластом. Во патохистолошката анализа, губењето на нуклеарната имунореактивност за протеинскиот продукт на генот *MGMT* силно корелира со епигенетичката промоторска метилација, односно со функционалната

инактивација на генот. [30, 33, 34, 35, 36, 54, 89, 93, 100, 106, 109, 110, 111, 114, 124, 127, 132, 136, 143, 148, 168, 169, 173, 190]

Според актуелната Класификација на СЗО за туморите на ЦНС (2021), отсуството на имунореактивност за IDH1 (клонот p.R132H) или IDH2 претставува доволен дијагностички критериум за дефинирање глиобластом, *IDH*-див тип, 4. степен според СЗО кај пациенти постари од 55 години, под услов да немаат анамнеза за претходен глиом од понизок степен, доколку неоплазмата манифестира карактеристична патохистоморфолошка слика за 4. степен според СЗО и не е анатомски лоцирана по средишната линија. [1, 5, 45, 46, 50, 122]

За случаите кај пациенти помлади од 55 години, кај кои туморското ткиво покажува губење на нуклеарната имунореактивност за ATRX, односно неконклузивна или негативна имунохистохемиска експресија за IDH1 и IDH2, неопходно е спроведување дополнителна молекуларно-генетичка анализа преку методот на мултиплекс лигациско-зависна амплификација на проби — MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). [45, 46, 115, 122, 123, 125, 126, 133, 145]

Глиобластомот, *IDH*-див тип е исклучително агресивна примарна ЦНС неоплазма, кај која мнозинството пациенти имаат медијана на преживување од 15 до 18 месеци по спроведена стандардна радиохемотерапија (по протоколот на Stupp). Стапката на општо преживување е исклучително ниска, при што 5-годишното преживување во САД изнесува едвај околу 6,8% (според епидемиолошките податоци на CBTRUS за периодот 2012–2016 година). Иако одредени прогностички варијабли — како што се помладата возраст (<50 години), постигнувањето тотална/суптотална ресекција и епигенетичката промоторска метилација на генот *MGMT* — се асоцирани со нешто подолг интервал на преживување, сепак пациентите со глиобластом демонстрираат значајно поинфериорно преживување во споредба со оние кај кои е дијагностициран *IDH*-мутиран астроцитом од 4. степен според СЗО со идентични хистоморфолошки одлики. [7, 26, 28, 54, 55, 67, 80, 86, 87, 89, 100, 106, 187, 190, 193, 196, 200]

1.7 Терапевтски пристапи кај пациенти со глијални неоплазми од 4. степен според СЗО

Хируршката ресекција има централна улога во мултимодалниот третман на неоплазмите на ЦНС и го детерминира подобрувањето на онколошкиот исход, преживувањето и квалитетот на животот кај овие пациенти. Максималната безбедна ресекција со зачувување на есенцијалните невролошки функции е силно асоцирана со подобри параметри на општото преживување и преживувањето без прогресија на болеста кај пациентите дијагностицирани со оваа група неоплазми. [67, 68, 69, 77, 78, 80, 90, 91, 94, 95, 96]

Третманот со конкурентна и адјувантна хемотерапија претставува златен стандард кај високостепените дифузни глиоми. Стандардниот протокол по Stupp вклучува истовремена апликација на орален алкилирачки цитостатик — темозоломид (TMZ) во дневна доза од 75 mg/m^2 телесна површина, за време на фракционирана зрачна терапија со вкупна фокална доза од 60 Gy (аплицирана во 30 фракции од по 2 Gy). По завршувањето на оваа конкомитантна радиохемотерапевтска фаза, следува адјувантна терапија со темозоломид во доза од 150 до 200 mg/m^2 дневно во времетраење од 5 последователни дена, на секои 28 дена (вкупно 6 циклуси). Во пионерските клинички студии е проспективно докажано дека пациентите кои го примаат овој комбиниран режим постигнуваат медијана на преживување од 14,6 месеци, во споредба со 12,1 месеци кај оние третирани единствено со зрачна терапија. Дополнително, двегодишната стапка на општо преживување покажува значајно зголемување од 10,4% со моно-радиотерапија на 26,5% со инкорпорирањето на темозоломид. [28, 51, 54, 55, 71, 72, 73, 76, 79, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90, 91, 92, 93, 177, 178, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 188, 190, 191, 197, 199]

Терапевтскиот ефект на темозоломидот се базира на метилација на ДНК на O^6 -позицијата на гванинот, што индуцира апоптоза кај неопластичните клетки. Поради намалениот капацитет за ДНК-поправка, туморите со епигенетичка промоторска метилација на генот *MGMT* се значајно посензитивни на оваа цитотоксичност, што го прави овој статус суштински предиктивен и прогностички биомаркер. [28, 30, 54, 55, 71, 72, 83, 85, 89, 93, 100, 143, 178, 180, 186, 195, 196]

2. Цели

Целите на оваа студија се насочени кон воведување и стандардизација на дијагностички протокол за дијагностика, класификација и прогностичка евалуација на адултните глијални неоплазми од 4. степен според СЗО согласно последната интегрирана класификација од 2021 година, како што следи:

- Биостатистичка евалуација (дистрибуција според пол и возраст, хистолошка дијагноза и локализација, инциденца, средно време на преживување) на адултни глијални тумори од 4. степен според СЗО во период од 24 месеци (2021-2022 година) ретроспективно во Лабораторијата за приготвување на стандардни обоени препарати, во Лабораторијата за имунохистохемија и во Лабораторијата за молекуларна патологија на Институтот за патологија при Медицински факултет, УКИМ во Скопје, Р. С. Македонија.
- Имунофенотипизација на хистоморфолошки дијагностицирани глијални тумори од 4. степен според СЗО со основен имунохистохемиски панел кој се состои од IDH1, IDH2, OLIG2, ATRX, H3K27me и MGMT.
- Евалуација на имунохистохемиската експресија на IDH1 и IDH2 и детерминирање на имунохистохемиски неодредливи случаи.
- Молекуларна анализа за одредување на IDH-мутациски статус кај имунохистохемиски неодредливите резултати.
- Рекласификација на дијагностицираните глиобластоми според критериуми од Класификацијата на СЗО за туморите на ЦНС од 2016, според новата Класификација на СЗО за тумори на ЦНС од 2021 година, согласно добиените резултати.
- Одредување на средното време на преживување според полот, возраста, имунофенотипските и молекуларните карактеристики на туморот и проценка на стапката на рецидивирање кај астроцитомите споредено со глиобластомите, како индиректен индикатор за преживување и терапевтски потенцијал кај кохортата.
- Идентификација и стратификација на имунохистохемиските маркери од предложениот имунохистохемиски панел врз основа на нивната дијагностичка, прогностичка и предиктивна вредност.

3. Материјали и методи

Ова е ретроспективна пресечна студија која е спроведена на Институтот за патологија при Медицинскиот факултет – УКИМ во Скопје, во соработка со ЈЗУ Универзитетската клиника за неврохирургија и ЈЗУ Универзитетската клиника за радиотерапија и онкологија.

3.1 Избор на случаи и клинички материјал

Првиот дел од истражувањето се состои од собирање ткивен материјал добиен со неврохируршка ресекција на туморско ткиво од централниот нервен систем. Во оваа студија се вклучени 77 возрасни пациенти со хистолошки дијагностициран глиобластом според критериумите на Класификацијата на туморите на централниот нервен систем на Светската здравствена организација од 2016 година, во периодот од 2021 до 2022 година. Критериуми за вклучување во студијата беа: возраст на пациентите над 18 години, хистопатолошки наод за глиобластом и постоперативно преживување од најмалку еден месец. Критериуми за исклучување беа: возраст под 18 години, постоење друг примарен малигнитет или метастатска болест во моментот на дијагностицирањето, како и анамнеза за други малигни неоплазми во претходните пет години. За да се обезбеди методолошка униформност и да се овозможи валидна статистичка евалуација на времето до појава на прогресија, рецидив и вкупното преживување, беше направена детална анализа на применетите онколошки терапевтски протоколи кај сите испитаници.

3.2 Хистолошка обработка на ткивен материјал

Процедурата за обработка на туморското ткиво започна со фиксација, дехидрација, бистрење и вкалапување во парафински блок, кој потоа беше поставен на ладна плоча. Со помош на микротом беа направени пресеци со дебелина од 3 до 5 μm . Пресеците беа поставени во водена бања, од каде што беа пренесени на предметни стакла. Предметните стакла со ткивните пресеци беа поставени во термостат на температура од 56 °C до 60 °C за да се депарафинираат.

Процесот на боење на депарафинираните пресеци започна со нивно поставување на соодветен носач во автоматскиот бојач Leica, кој беше програмиран за боење во времетраење од 30 до 40 минути. Процесот на боење опфати потопување на носачот со стакла во серија контејнери со соодветни реагенси: депарафинизација и рехидрација низ опадни концентрации на алкохол, боење со хематоксилин и еозин, како и дехидрација низ растечки концентрации на алкохол. На крајот, пресеците беа избистрени во ксилол. По боењето, врз ткивните пресеци беше нанесено покровно средство (Entellan) и беше поставено покровно стакло.

3.3 Имунохистохемиска метода

За секој пациент беше внимателно селектиран по еден репрезентативен парафински блок во кој вклопениот ткивен примерок имаше најголема застапеност на витално туморско ткиво. Со имунохистохемиска метода беше изработен панел составен од следниве маркери: IDH1, IDH2, OLIG2, ATRX, H3K27me и MGMT.

Имунохистохемиската метода користена во ова истражување претставува комбинација од автоматизиран предтретман на апаратот Dako PT Link и мануелно имунохистохемиско боење со помош на визуелизацискиот кит EnVision Flex. Ова е метода за *in vitro* боење што користи примарно антители (добиео од глушец или зајак), а реакцијата се визуелизира со системот за детекција Dako EnVision Flex. Реагенсите EnVision Flex+ Mouse или EnVision Flex+ Rabbit беа употребени за амплификација на сигналот од примарното антители, со цел подобрување на крајниот резултат од боењето со хромогенот.

Ткивниот пресек со дебелина од 5 μm , исечен на микротом, беше поставен на полилизинско предметно стакло (SuperFrost Plus). Потоа стаклото беше внесено во апаратот Dako PT Link, кој е одговорен за автоматизираниот предтретман што опфаќа сушење, депарафинизација, рехидратација и топлински индуцирано разоткривање на епитопите (HIER) во ткивниот пресек. Потоа продолжува постапката за мануелно имунохистохемиско боење, при што најпрво се аплицира блокирачки реагенс (EnVision Flex Peroxidase-Blocking Reagent) во волумен од 100 μL . По плакнењето на пресеците со пуфер, се аплицираат примарните антители кои се разредуваат со соодветни разредувачи (EnVision Flex Antibody Diluent или

Antibody Diluent Background Reducing) со цел да се спречи појавата на позадинско пребојување. По повторното испирање со пуфер, се нанесува секундарното антитело / засилувач (Linker), а на крајот ткивните пресеци се визуелизираат со хромогенот 3,3'-диаминобензидин (DAB) и контрастно се добојуваат со хематоксилин. Потоа, ткивните пресеци се дехидрираат низ серија со опадни/растечки концентрации на алкохол до ксилол, за на крајот врз обоениот ткивен пресек да се нанесе покровен медиум (Neo-Mount) и да се постави покровно стакло.

3.4 Имунохистохемиски маркери

Во оваа студија се користени следните имунохистохемиски маркери:

Антите ло	Цел/марк ер	Целосно име	Вид на антитело	Домаќи н	Клон	Производит ел	Разредува ње
IDH1	IDH1	Recombina nt Anti- IDH1 antibody	Моноклонал но, рекомбинант но	Зајак	EPR1229 6	Abcam	1:200
IDH2	IDH2	Recombina nt Anti- IDH2 antibody	Моноклонал но, рекомбинант но	Зајак	EPR7577	Abcam	1:200
OLIG2	OLIG2	Recombina nt Anti- OLIG2 antibody	Моноклонал но, рекомбинант но	Зајак	EPR2673	Abcam	1:100
ATRX	ATRX	Recombina nt Anti- ATRX antibody	Моноклонал но, рекомбинант но	Глувче	AMab-6	Abcam	1:10 000

H3K27me	Histone H3 trimethyl K27	Recombinant Anti-Histone H3 trimethyl K27 antibody	Моноклонално, рекомбинантно	Зајак	EPR18607	Abcam	1:300
MGMT	MGMT	Recombinant Anti-MGMT antibody	Моноклонално, рекомбинантно	Глувче	MT3.1	Abcam	1:100

Имунохистохемиските маркери беа анализирани на светлосен микроскоп (Leitz Wetzlar Orthoplan микроскоп, 1966). Имунохистохемиската експресија се визуелизира како цитоплазматско бојење за маркерите IDH1 и IDH2 и јадрена експресија за маркерите OLIG2, ATRX, H3K27me и MGMT. Резултатите од имунохистохемиската анализа беа изразени семиквалитативно, како позитивна и негативна цитоплазматска или јадрена експресија за маркерите IDH1 и IDH2, додека позитивната експресија за имунохистохемиските маркери OLIG2, ATRX, H3K27me и MGMT беше изразена семиквантитативно преку процент на позитивни клетки на целиот ткивен исечок.

Процентот на позитивна јадрена експресија на маркерите OLIG2, ATRX, H3K27me беше искористен за првична категоризација на кохортата во 10 групи со опсег од по 10%, почнувајќи од најниска експресија (0–10%), па сè до максимална експресија (91–100%).

За натамошна статистичка обработка и клиничка корелација, беше извршена дополнителна класификација на пациентите според степенот на експресија на маркерите OLIG2, ATRX, H3K27me и MGMT. Врз основа на оваа дистрибуција, испитаниците беа поделени во три репрезентативни групи:

- Низок степен на експресија: 0–39% позитивни јадра
- Среден степен на експресија: 40–69% позитивни јадра
- Висок степен на експресија: 70–100% позитивни јадра

3.5 Мултиплекс лигациско-зависна амплификација на проби - MLPA

За случаите од пациенти каде што туморот покажа неконклузивна IDH1/2 имунохистохемиска експресија, изведена е молекуларна ПЦР-анализа — MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) со последвателна анализа на фрагменти со капиларна електрофореза во две независни реакции. Овие реакции заедно содржат 89 сонди специфични за глијални тумори, кои, меѓу другото, ги покриваат точкестите мутации: IDH1 p.R132H (c.395G>A), IDH1 p.R132C (c.394C>T), IDH2 p.R172K (c.515G>A) и IDH2 p.R172M (c.515G>T). За оваа анализа беше изолирана ДНК од ткивен материјал вклопен во парафин (FFPE), а потоа изолатот беше внесен во реакциони туби за хибридизација. Се изврши хибридизациона реакција во која беа додадени MLPA-микс и MLPA-пуфер. Миксот содржи околу 89 различни MLPA-сонди, од кои секоја таргетира специфична ДНК-секвенца. Потоа беше додаден лигазен мастермикс, по што следеа полимеразна верижна реакција и амплификација на MLPA-ампликоните. Последната фаза е фрагментна анализа со капиларна електрофореза на апаратот ABI 310 Genetic Analyzer, која овозможува сепарација на ампликоните врз основа на нивната должина. Резултатите од добиените ПЦР-продукти беа анализирани со помош на софтверот GeneMapper v4.1, а потоа и на платформата Coffalyzer.Net.

3.6 Статистичка анализа

Сите податоци добиени од истражувањето беа внесени во база на податоци и подложени на сеопфатна статистичка обработка со користење на софтверскиот пакетот **SPSS (Statistical Package for the Social Sciences)** за Windows, верзија 25.0. Изборот на статистичките методи беше детерминиран од природата на варијаблите и поставените цели на трудот, движејќи се од дескриптивна карактеризација на примерокот до комплексни модели за предикција на исходот.

Дескриптивна статистика и дистрибуција

За почетна анализа и систематизација на карактеристиките на испитаниците, беше применета дескриптивна статистика. Притоа, податоците беа анализирани според нивната природа:

- **Квалитативните (категоријални) белези**, како што се полот, типот на туморот и степенот на диференцијација според СЗО, се прикажани преку апсолутни фреквенции (N) и релативни пропорции (проценти,%).
- **Квантитативните (нумерички) белези**, вклучувајќи ја возраста и димензиите на туморот, беа првично тестирани за нормалност на дистрибуцијата. Кај променливите со симетрична дистрибуција, централната тенденција и дисперзијата беа изразени преку **аритметичка средина (M)** и **стандардна девијација (SD)**.

Биваријантна анализа и компарација на групи

Со цел да се евалуираат статистички значајните разлики помеѓу различните типови на глијални тумори, беа имплементирани следниве компаративни тестови:

- **Chi-square (χ^2) тест**: користен за споредба на фреквенциите на категоријалните варијабли помеѓу независни групи (на пр. дистрибуција на типови тумори според пол).
- **Fisher-ов exact тест**: применет како алтернатива во случаите каде очекуваните фреквенции во контингенциските табели беа помали од 5.
- **Student-ов t -тест**: за независни примероци, користен за споредба на средните вредности на континуираните варијабли помеѓу две дефинирани групи.

Анализа на преживување

Централниот дел од аналитичкиот процес беше насочен кон следење на времето од моментот на дијагностицирање до дефинираниот настан (смртен исход):

- **Kaplan-Meier-ова метода:** беше искористена за проценка на кумулативната веројатност за преживување во временски интервал од 24 месеци. Преку оваа метода беше пресметано **медијалното преживување (Median Survival)**, кое го претставува временскиот праг во кој 50% од пациентите сè уште се живи.
- **Log-Rank (Mantel-Cox) тест:** беше применет за компаративна анализа на кривите на преживување помеѓу различни хистопатолошки и клинички групи, со цел да се утврди дали постојат статистички значајни разлики во долговечноста помеѓу нив.

Регресиона анализа и предикција на ризик

За идентификување на клучните детерминанти кои влијаат врз морталитетот, беше конструиран хиерархиски модел:

- **Униваријантна Коксова (Cox) регресија:** за изолирана проценка на влијанието на секој поединечен фактор врз стапката на преживување.
- **Мултиваријантна Коксова (Cox) регресија:** во која беа вклучени сите значајни варијабли за да се дефинираат независните предиктори на исходот, елиминирајќи ги конфундирачките влијанија.
- **Интерпретација на ризикот:** Ефектот на предикторите беше изразен преку **Hazard Ratio (HR) (сооднос на ризик)** со соодветен **95% интервал на доверба (CI)**. Вредности на $HR > 1$ беа интерпретирани како фактори кои го зголемуваат ризикот, додека $HR < 1$ како фактори кои го намалуваат ризикот.

Статистичка значајност и визуализација

Нивото на статистичка значајност беше претходно дефинирано на $p < 0,05$. Сите резултати се систематизирани во табеларни прикази за максимална прецизност, додека клучните трендови и веројатностите за преживување се визуелизирани преку графикони (Kaplan-Meier криви), овозможувајќи јасна интерпретација на добиените научни сознанија.

4. Резултати

Во истражувањето беа анализирани ткивни примероци од туморско ткиво од 77 пациенти со хистолошки дијагностициран глиобластом според Класификацијата на СЗО за туморите на ЦНС, издадена во 2016 година, во периодот 2021-2022 година.

4.1 Демографски и клинички статистички карактеристики на кохортата

4.1.1 Полова и возрастна распределба

Половата структура на пациентите ја сочинуваа 30 (38,96%) женски пациенти и 47 (61,04%) пациенти од машки пол (Табела 1).

Пациентите беа на возраст од 35,6 до 81,8 години, со просечна возраст од 60,20 $\pm$ 10,2 години; доминираа пациенти на возраст од 65 години и постари – 29 (37,66%) (Табела 1).

Табела 1. Карактеристики на пациенти – пол и возраст.

Варијабла	
Пол n (%)	
женски	30 (38,96)
машки	47 (61,04)
Возраст (години) (mean $\pm$ SD) (min – max)	(60,20 $\pm$ 10,2) (35,6 – 81,8)
Возрасни групи (години) n (%)	
< 55	23 (29,87)
55 – 65	25 (32,47)
$\geq$ 65	29 (37,66)

4.1.2 Поттипови на глиоми според класификацијата на СЗО за тумори на ЦНС од 2021 година

По направените имунохистохемиски и молекуларни анализи на ткивни примероци од сите 77 пациенти, рекласифицирани се 33 (42,86%) астроцитом, *IDH*-мутирани (4. степен според СЗО) и 44 (57,14%) глиобластом, *IDH*-див тип (4. степен според СЗО), од кои 38 (49,35%) припаднаа на конвенционален глиобластом, 4 (5,19%) на глиосарком, 1 (1,3%) на гигантоклеточен и 1 (1,3%) ситноклеточен глиобластом (Табела 2, Слика 1).

Табела 2. Дистрибуција на пациентите според тип на глиом.

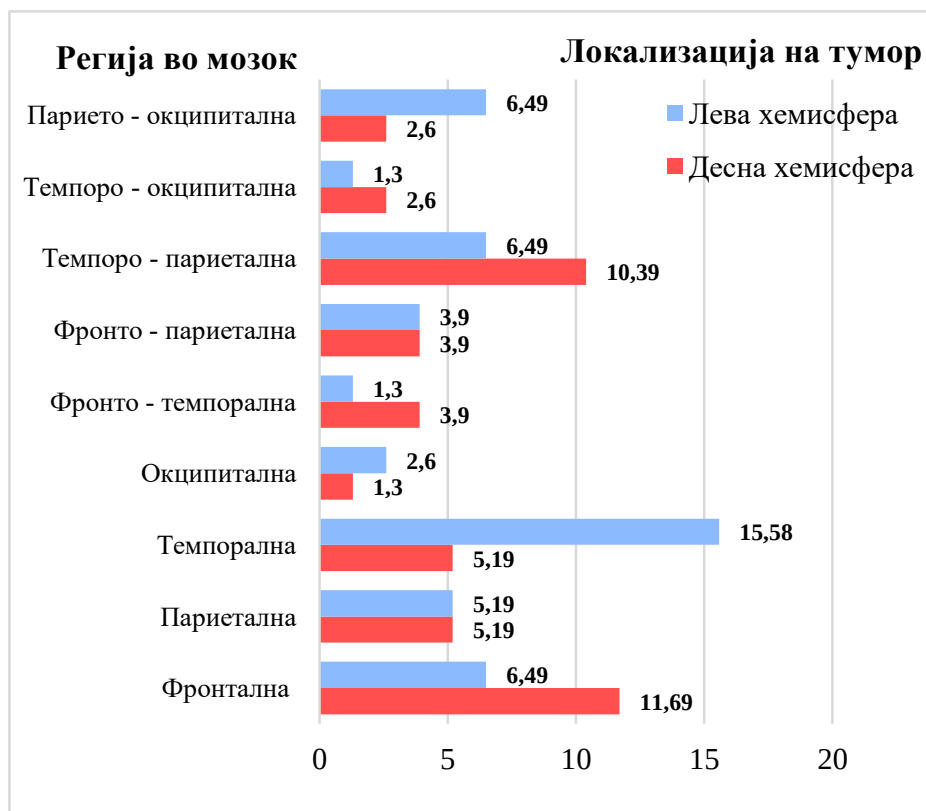
Тип на неоплазма од 4. степен според СЗО	n (%)
Астроцитом, <i>IDH</i> -мутиран	33 (42,86)
Глиобластом, <i>IDH</i> -див тип	44 (57,14)
Глиобластом, <i>IDH</i> -див тип (конвенционален)	38 (49,35)
Глиосарком, <i>IDH</i> -див тип	4 (5,19)
Гигантоклеточен глиобластом, <i>IDH</i> -див тип	1 (1,3)
Ситно-клеточен глиобластом, <i>IDH</i> -див тип	1 (1,3)



Слика 1. Графички приказ на дистрибуција на пациентите според тип на глиом.

4.1.3 Анализа на туморска локализација

Според локализацијата, кај 36 (46,75%) пациенти, туморот беше локализиран во десната хемисфера, кај 38 (49,35%) пациенти во левата хемисфера, кај 1 (1,3%) пациент во таламус, кај 1 (1,3%) пациент во *corpus callosum* и кај 1 (1,3%) пациент во мал мозок (Слика 2).



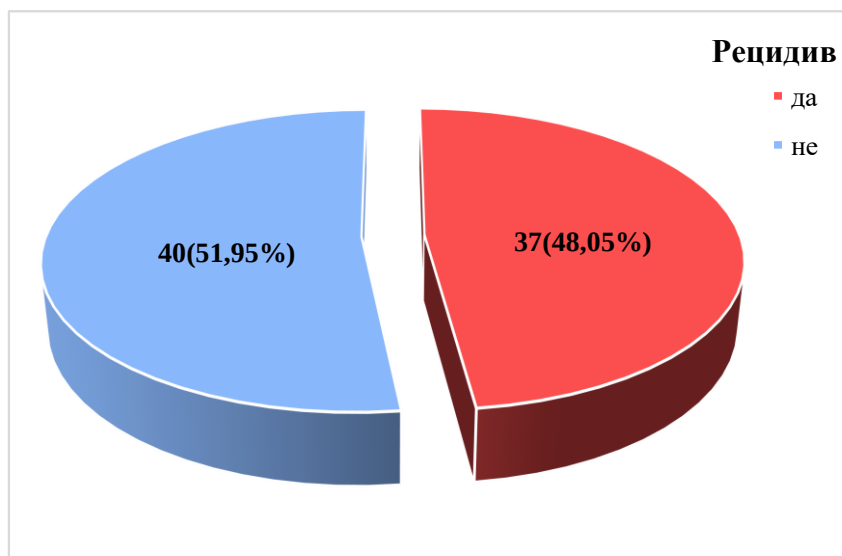
Слика 2. Графички приказ на дистрибуција на пациенти според локализација на тумор.

4.1.4 Анализа на рецидиви

Туморот беше рецидивирачки кај 37 (48,05%) пациенти, односно тие биле неврохируршки оперирани повеќе од еднаш (Табела 3, Слика 3).

Табела 3. Дистрибуција на пациенти според зачестеност на рецидив.

Рецидив	n (%)
Да	37 (48,05)
Не	40 (51,95)



Слика 3. Графички приказ на дистрибуција на пациенти со/без рецидив.

4.1.5 Дистрибуција според бројот на неврохируршки интервенции

Две неврохируршки операции имаа 35 (45,45%) пациенти, а кај 2 (2,6%) пациенти беа извршени 4 неврохируршки операции (Табела 4).

Табела 4. Дистрибуција на пациенти според број на интервенции.

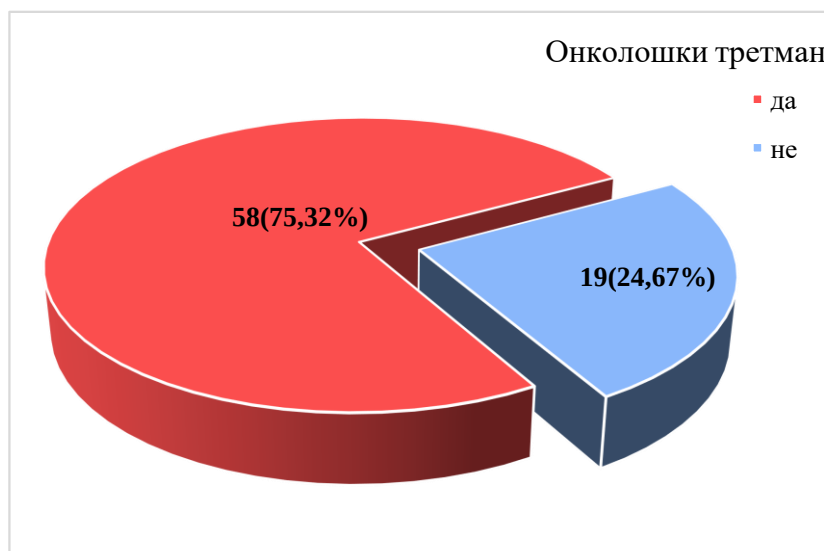
Број на неврохируршки операции	n (%)
1	40 (51,95)
2	35 (45,45)
4	2 (2,6)

4.1.6 Дистрибуција на пациентите според примен онколошки третман

Онколошки третман (радиотерапија, конкурентна радиохемотерапија, адјувантна хемотерапија, антиангиогена, второлиниска хемотерапија) примиле 58 (75,32%) пациенти (Табела 5, Слика 4).

Табела 5. Дистрибуција на пациенти со/без онколошки третман.

Онколошки третман	n (%)
Да	58 (75,32)
Не	19 (24,67)



Слика 4. Графички приказ на дистрибуција на пациенти со/без онколошки третман.

Кај 19 испитаници не беше спроведен онколошки третман поради напреднат стадиум на болеста, компромитирана општа здравствена состојба или лична одлука на пациентите.

Адјувантна хемотерапија со темозоломид (примен орално, во форма на таблети, во доза од 150 mg/m² телесна површина, во времетраење од пет дена во рамките на 28-дневен циклус) примија 49 (63,38%) пациенти (Слика 5).



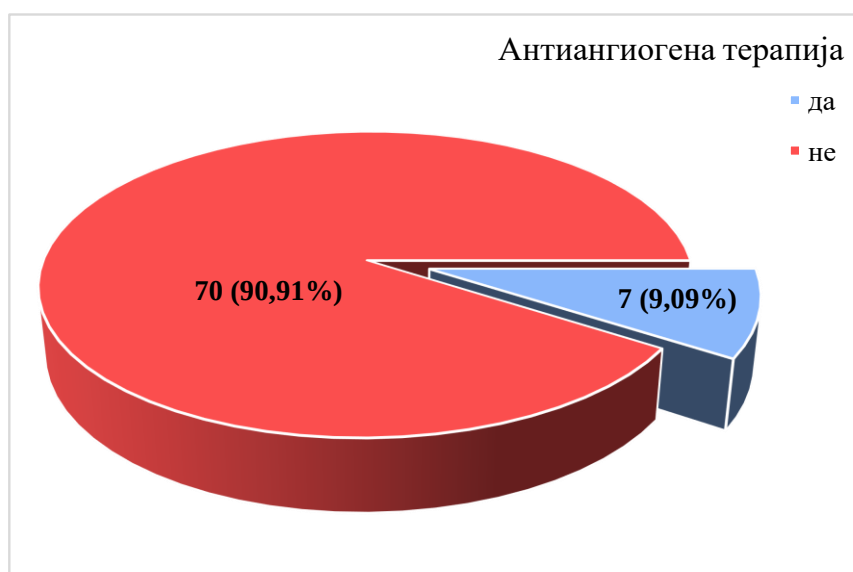
Слика 5. Графички приказ на дистрибуција на пациенти со/без третман со адјувантна хемотерапија со темозоломид.

На Слика 6 е прикажана дистрибуцијата на бројот на циклуси на примена адјувантна хемотерапија со темозоломид примена орално (во форма на таблети) во доза од 150 mg/m^2 телесна површина во времетраење од 5 дена во рамките на 28-дневен циклус. Бројот на циклуси се движи од 1 до 21, а пациентите оваа терапија ја примале најчесто во 6 циклуси – 7 (9,09%) (Слика 6).



Слика 6. Графички приказ на дистрибуција на пациенти според број на циклуси адјувантна хемотерапија со темозоломид.

Антиангиогена терапија примале 7 (9,09%) пациенти (Слика 7).

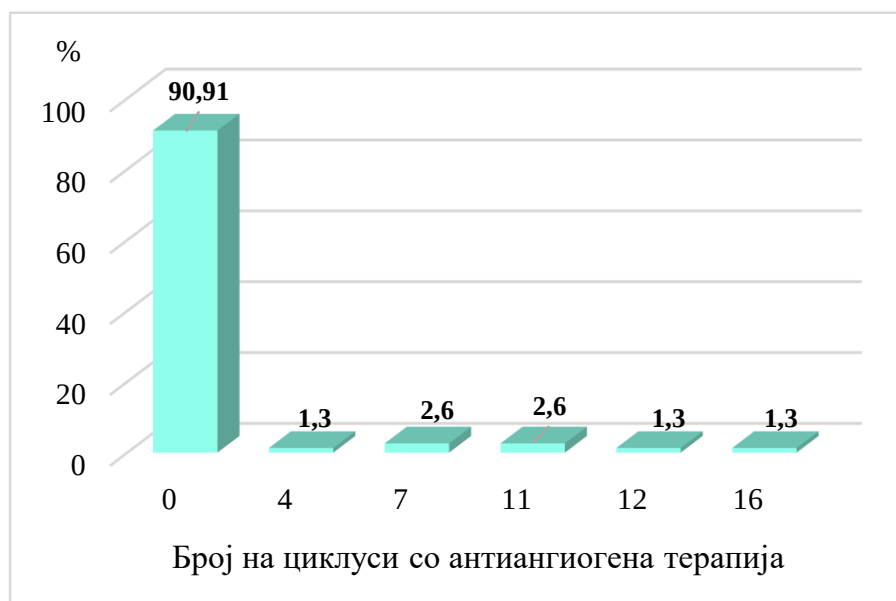


Слика 7. Графички приказ на дистрибуција на пациенти со/без антиангиогена терапија.

Во Табела 6 и Слика 8 е прикажана дистрибуцијата на бројот на циклуси на примена антиангиогена терапија, кој се движи од 1 до 16 циклуси, администрирани поединечно кај 1 (1, 3%) пациенти.

Табела 6. Дистрибуција на пациенти според број на циклуси со антиангиогена терапија.

Број на циклуси со антиангиогена терапија	n (%)
0	70 (90,91)
4	1 (1,3)
7	2 (2,6)
11	2 (2,6)
12	1 (1,3)
16	1 (1,3)



Слика 8. Графички приказ на дистрибуција на пациенти според број на циклуси со антиангиогена терапија.

Еден пациент примал второлиниска хемотерапија со иринотекан во тек на 12 циклуси (Слика 9).



Слика 9. Графички приказ на дистрибуција на пациенти со/без второлиниска терапија.

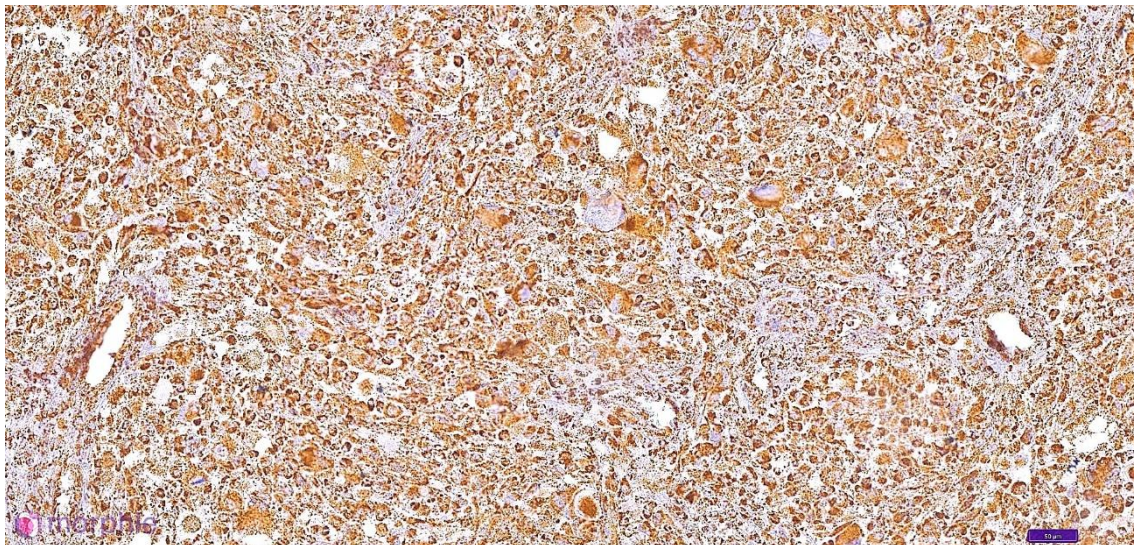
4.2 Имунохистохемиски и молекуларни анализи

4.2.1 Имунохистохемиска експресија на IDH1 и IDH2

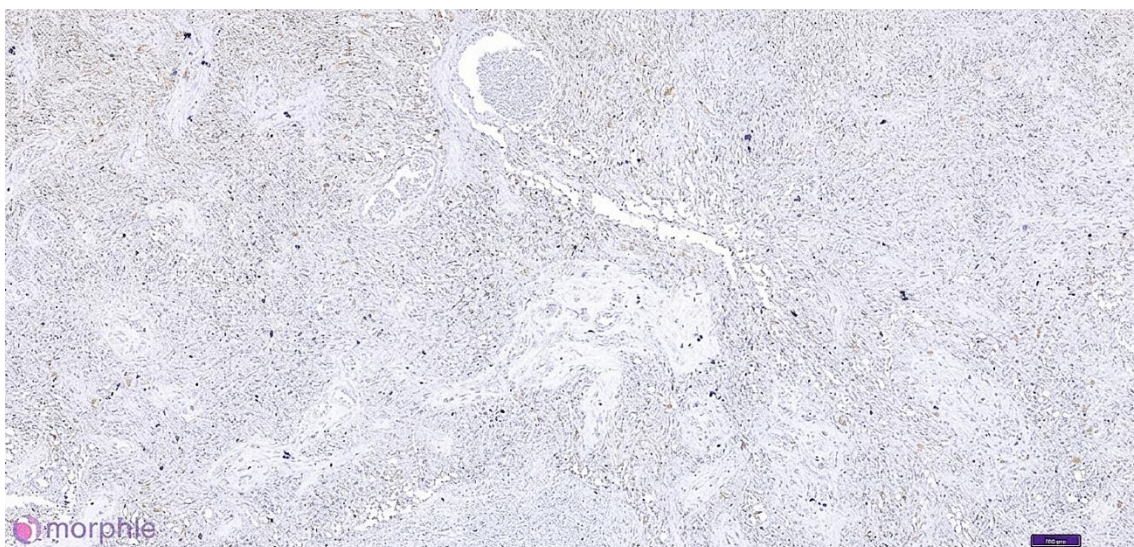
Согласно добиените резултати од имунохистохемиската анализа со имунохистохемискиот маркер IDH1, позитивен цитоплазматски сигнал презентираа 27 (35,06%) пациенти (Табела 7).

Табела 7. Дистрибуција на пациенти според експресија на IDH1

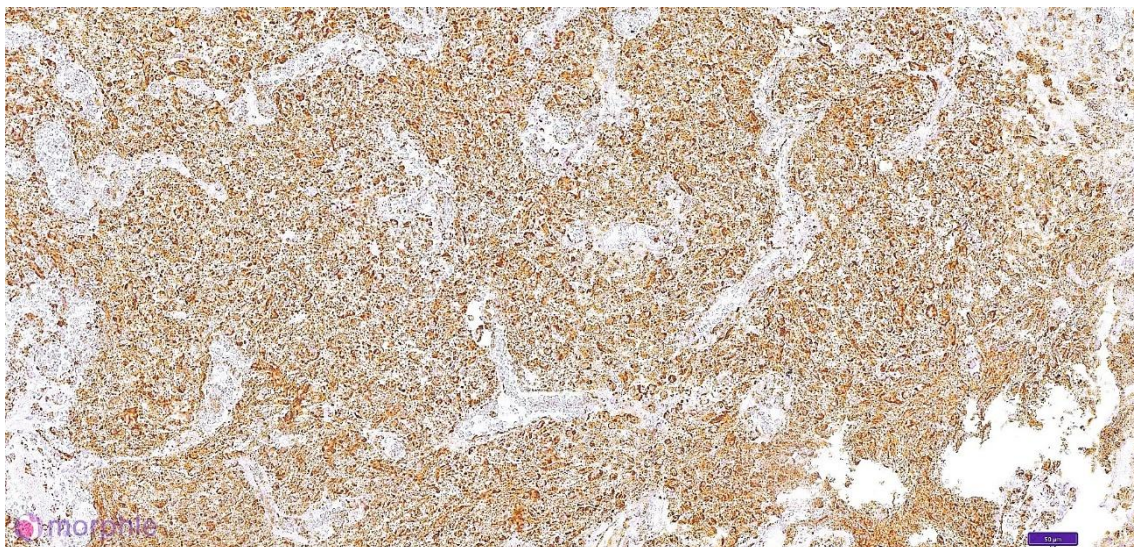
IDH1 – имунохистохемиски маркер (цитоплазматски сигнал)	n (%)
Неконклузивен	22 (28,57)
Позитивен	27 (35,06)
Негативен	28 (36,36)



IDH1 позитивна цитоплазматска експресија
(дигитална микрографија)

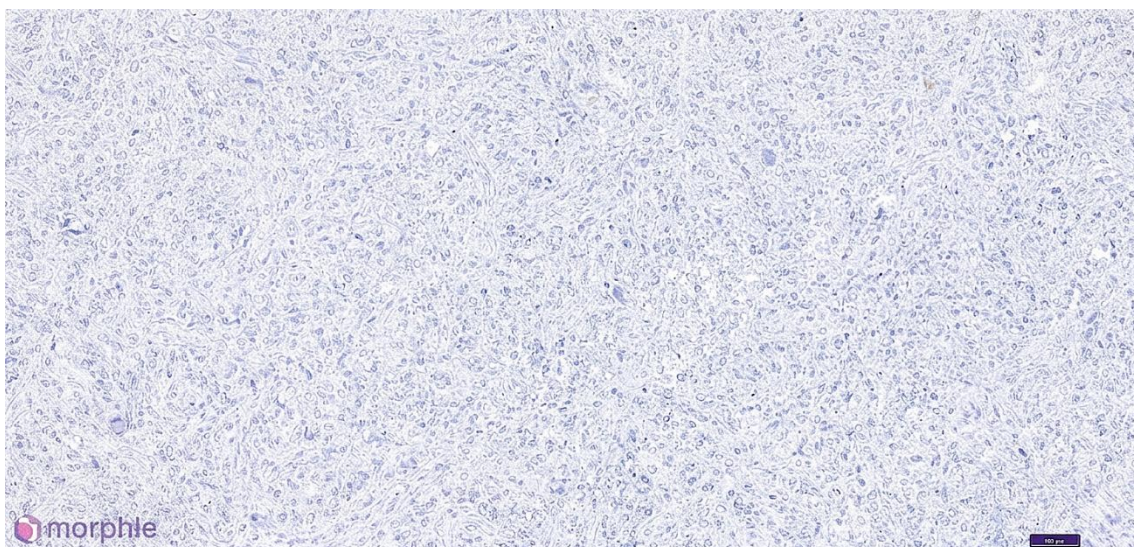


IDH1 негативна цитоплазматска експресија
(дигитална микрографија)



IDH2 позитивна цитоплазматска експресија

(дигитална микрографија)



IDH2 негативна цитоплазматска експресија

Позитивна цитоплазматска имунохистохемиска експресија за имунохистохемскиот маркер IDH2 беше верифицирана кај 2 (2,6%) пациенти (Табела 8).

Кај 22 (28,57%) пациенти, резултатот од имунохистохемиската анализа за маркерите IDH1 и IDH2 беше неконклузивен (Табела 8).

Табела 8. Дистрибуција на пациенти според експресија на IDH2

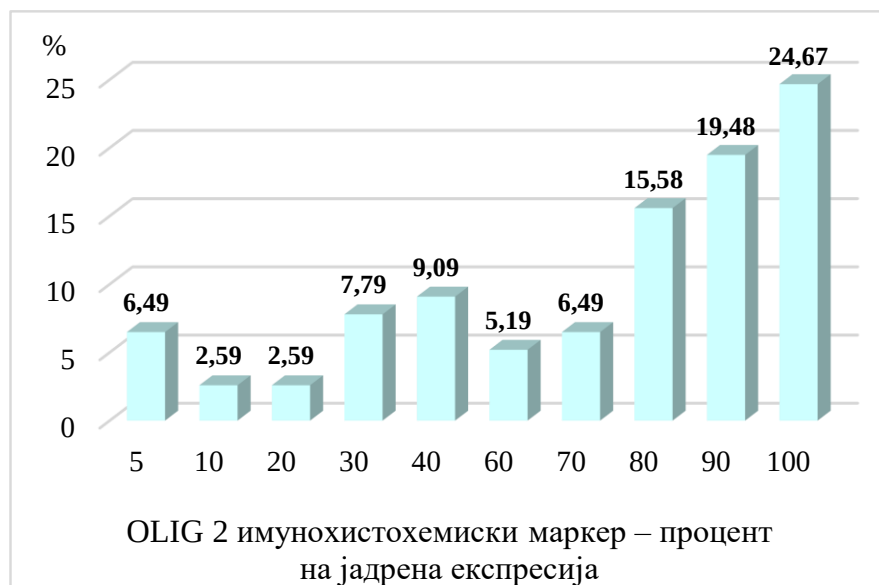
IDH2 – имунохистохемиски маркер (цитоплазматски сигнал)	n (%)
Неконклузивен	22 (28,57)
Позитивен	2 (2,6)
Негативен	53 (68,83)

4.2.2 Имунохистохемиска експресија на OLIG2

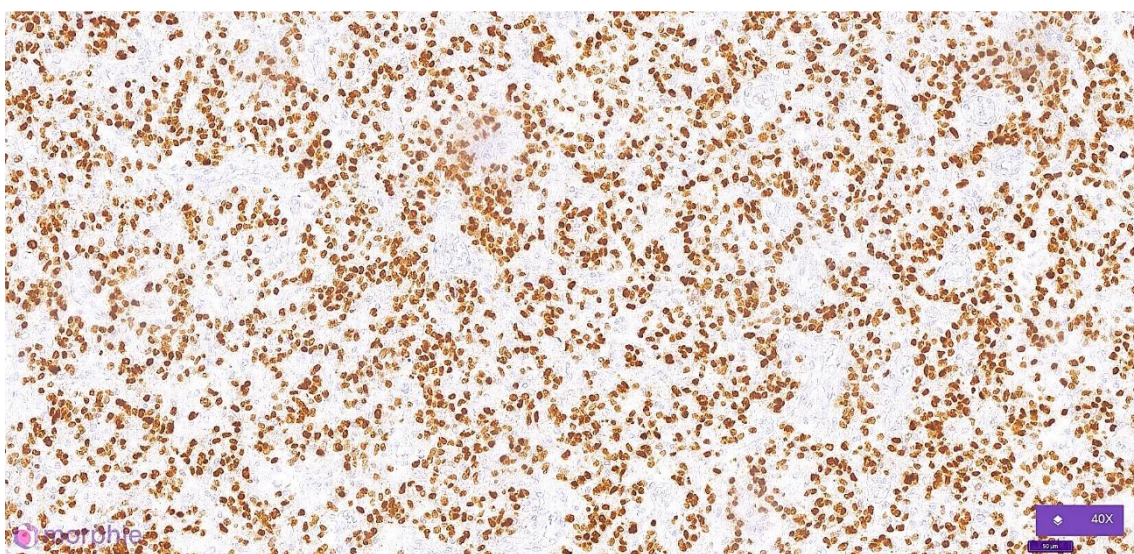
Во Табела 9 и Слика 10 е прикажана дистрибуцијата на процентот на јадрена имунохистохемиска експресија на имунохистохемискиот маркер OLIG2.

Табела 9. Дистрибуција на пациенти според процент на експресија на OLIG2

OLIG2 имунохистохемиски маркер (процент на јадрена експресија)	n (%)
5	5 (6,49)
10	2 (2,59)
20	2 (2,59)
30	6 (7,79)
40	7 (9,09)
60	4 (5,19)
70	5 (6,49)
80	12 (15,58)
90	15 (19,48)
100	19 (24,67)



Слика 10. Графички приказ на дистрибуција на пациенти според процент на експресија на OLIG2.



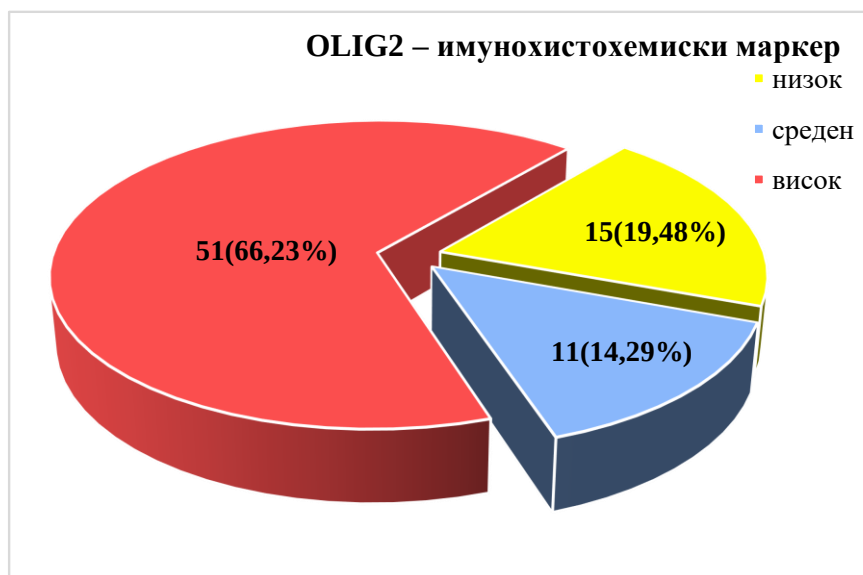
OLIG2 позитивна јадрена експресија (100% од туморски клетки)

(дигитална микрографија)

Јадрената експресија на имунохистохемискиот маркер OLIG2 најчесто беше висока и беше детектирана кај 51 (66,23%) од случаите, следена од ниска експресија кај 15 (19,48%) и средна експресија кај 11 (14,29%) од случаите (Табела 10, Слика 11).

Табела 10. Дистрибуција на пациенти според експресија на OLIG2.

OLIG2 – имунохистохемиски маркер (семиквантитативно одреден процент на јадрена експресија на репрезентативен ткивен пресек)	n (%)
Низок (0-39%)	15 (19,48)
Среден (40-69%)	11 (14,29)
Висок (70-100%)	51 (66,23)



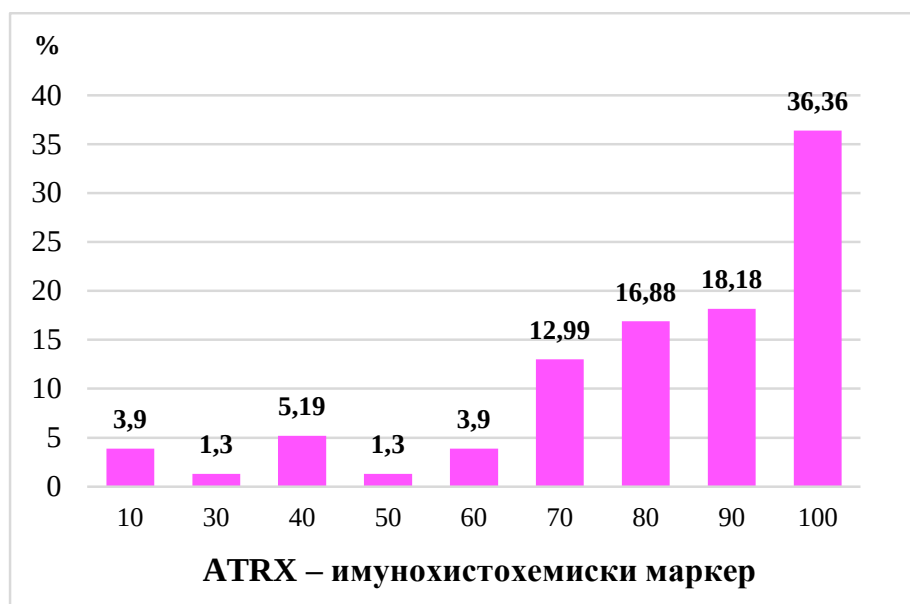
Слика 11. Графички приказ на дистрибуција на пациенти според експресија на OLIG2.

4.2.3 Имунохистохемиска експресија на ATRX

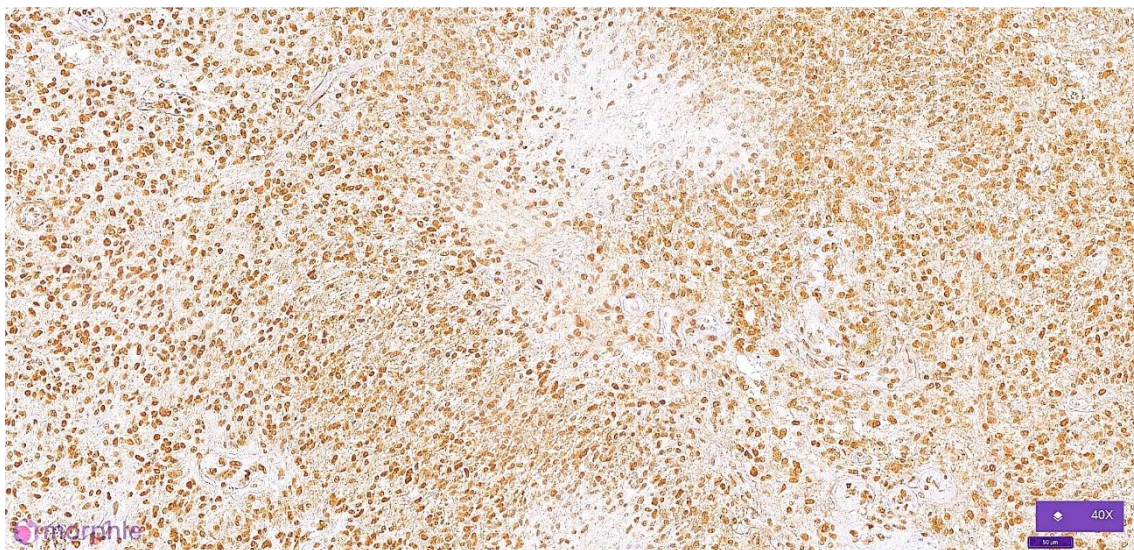
Во Табела 11 и Слика 12 е прикажана дистрибуцијата на процентот на јадрениот позитивен сигнал на имунохистохемискиот маркер ATRX.

Табела 11. Дистрибуција на пациенти според процент на експресија на ATRX.

ATRX – имунохистохемиски маркер (семиквантитативно одреден процент на јадрена експресија на репрезентативен ткивен пресек)	n (%)
10	3 (3,9)
30	1 (1,3)
40	4 (5,19)
50	1 (1,3)
60	3 (3,9)
70	10 (12,99)
80	13 (16,88)
90	14 (18,18)
100	28 (36,36)

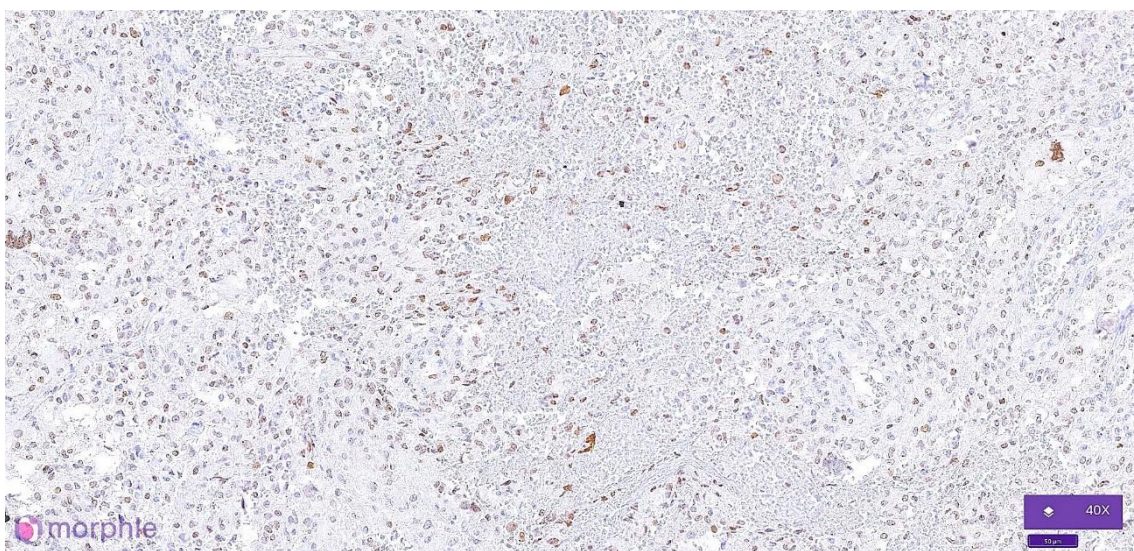


Слика 12. Графички приказ на дистрибуција на пациенти според процент на експресија на ATRX.



ATRX позитивна јадрена експресија (100% од туморски клетки)

(дигитална микрографија)



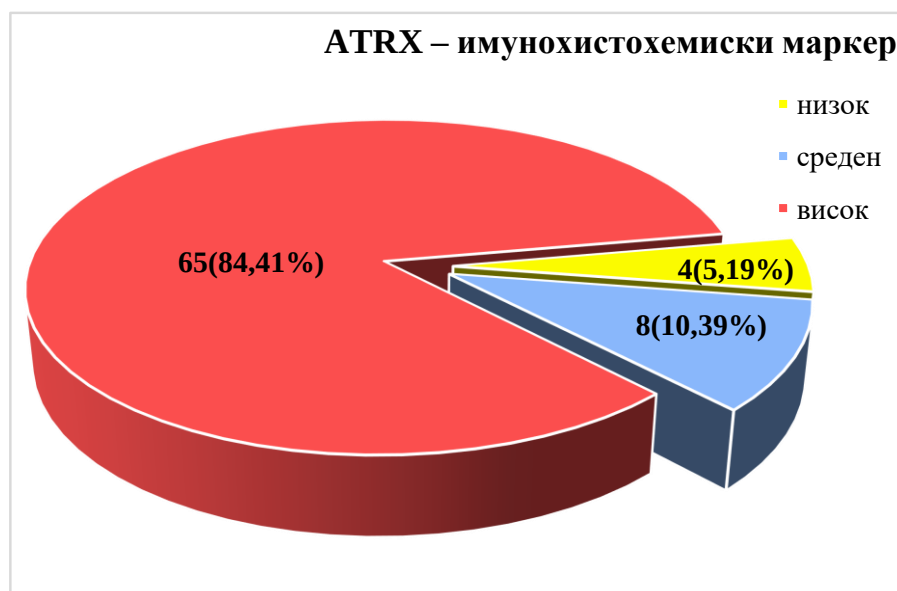
ATRX позитивна јадрена експресија (10% од туморски клетки)

(дигитална микрографија)

Кај мнозинството пациенти беше детектиран висок процент на јадрена експресија на имунохистохемскиот маркер ATRX – 65 (84,41%) пациенти. Низок процент на јадрена експресија на овој маркер имаа 4 (5,19%) пациенти, додека среден процент презентираа 8 (10,39%) пациенти (Табела 12, Слика 13).

Табела 12. Дистрибуција на пациенти според експресија на ATRX.

ATRX – имунохистохемиски маркер (семиквантитативно одреден процент на јадрена експресија на репрезентативен ткивен пресек)	n (%)
Низок (0-39%)	4 (5,19)
Среден (40-69%)	8 (10,39)
Висок (70-100%)	65 (84,41)



Слика 13. Графички приказ на дистрибуција на пациенти според експресија на ATRX.

4.2.4 Имунохистохемиска експресија на H3K27me

На Слика 14 е прикажана дистрибуцијата на процентот на јадрениот позитивен сигнал на имунохистохемискиот маркер H3K27me.

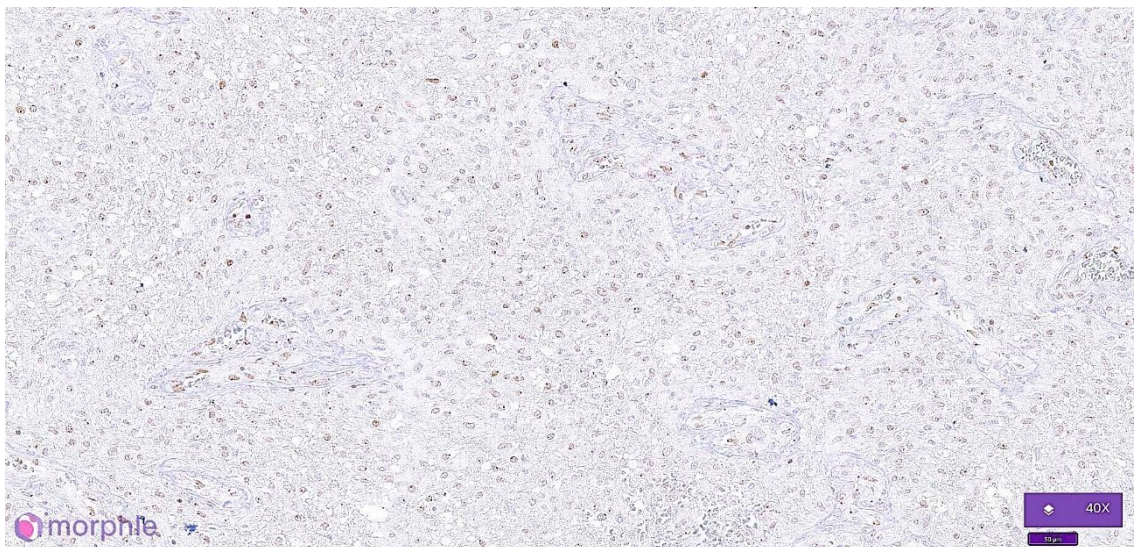


Слика 14. Графички приказ на дистрибуцијата на пациентите според процентот на експресија на H3K27me.

Застапеноста на низок, среден и висок процент на јадрена експресија на имунохистохемискиот маркер H3K27me беше 29 (37,66%), 22 (28,57%) и 26 (33,77%), соодветно (Табела 13, Слика 15).

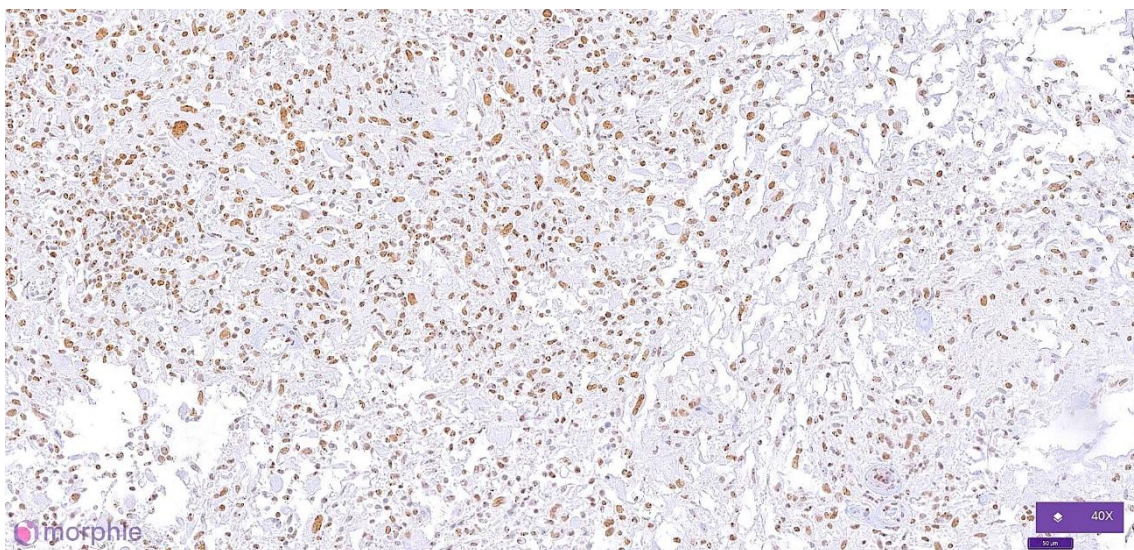
Табела 13. Дистрибуција на пациенти според експресија на H3K27me.

H3K27me – имунохистохемиски маркер (семиквантитативно одреден процент на јадрена експресија на репрезентативен ткивен пресек)	n (%)
Низок (0-39%)	29 (37,66)
Среден (40-69%)	22 (28,57)
Висок (70-100%)	26 (33,77)



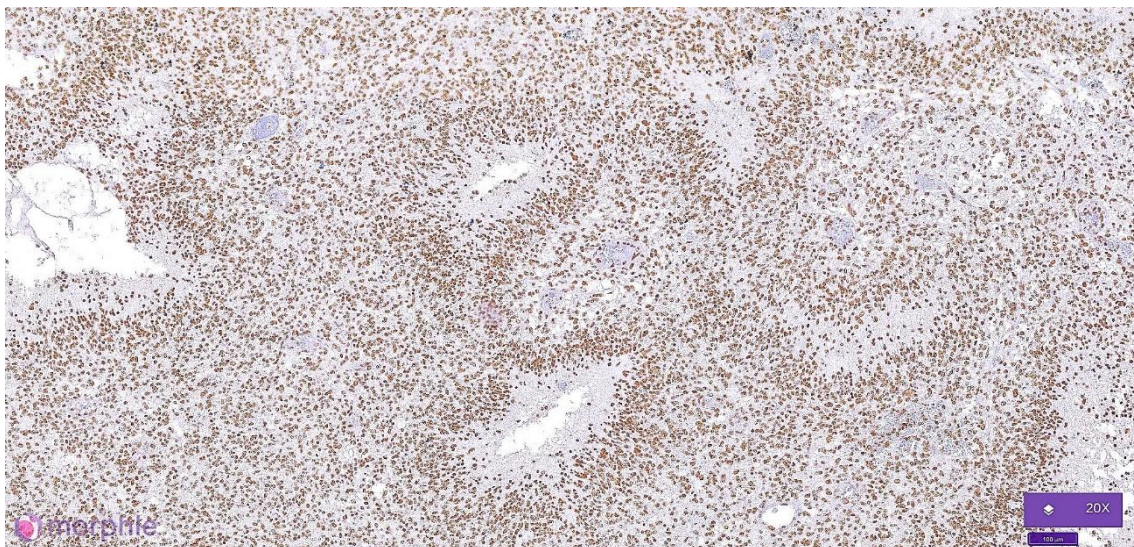
H3K27me позитивна јадрена експресија (5% од туморски клетки)

(дигитална микрографија)



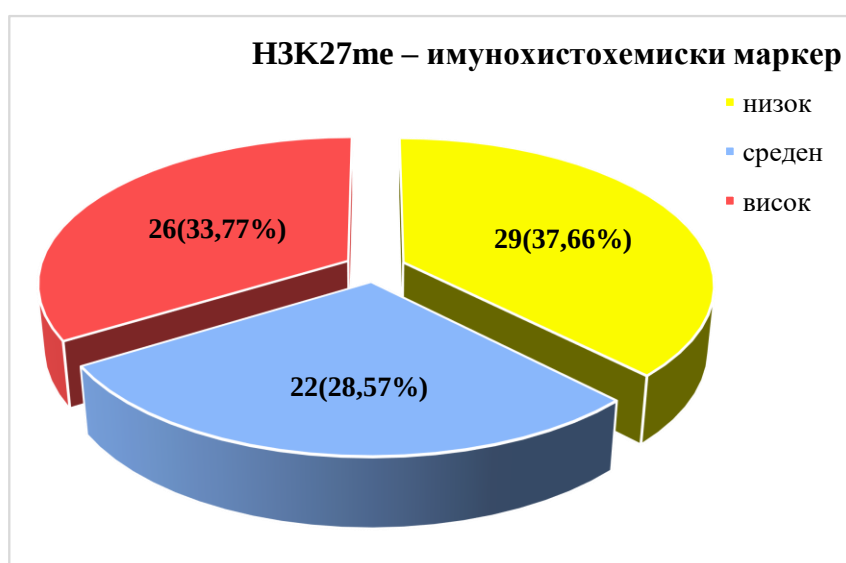
H3K27me позитивна јадрена експресија (60% од туморски клетки)

(дигитална микрографија)



H3K27me позитивна јадрена експресија (100% од туморски клетки)

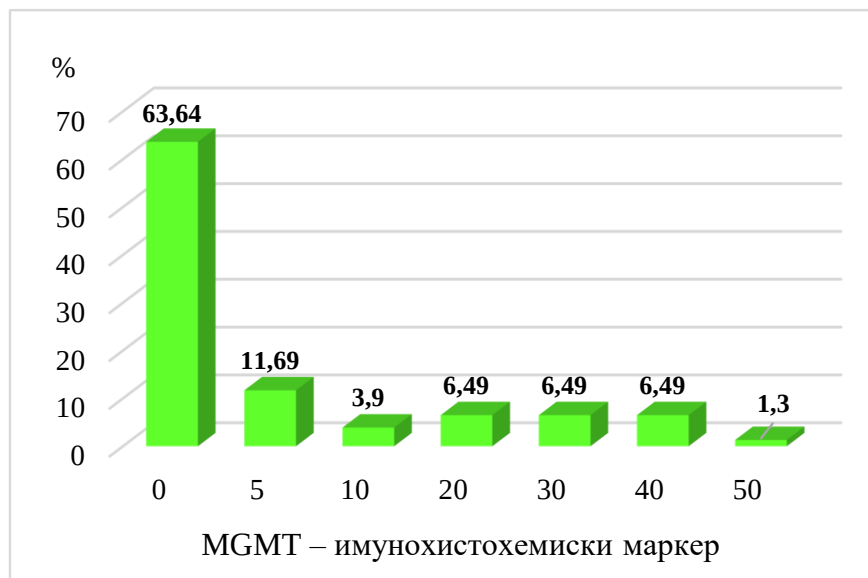
(дигитална микрографија)



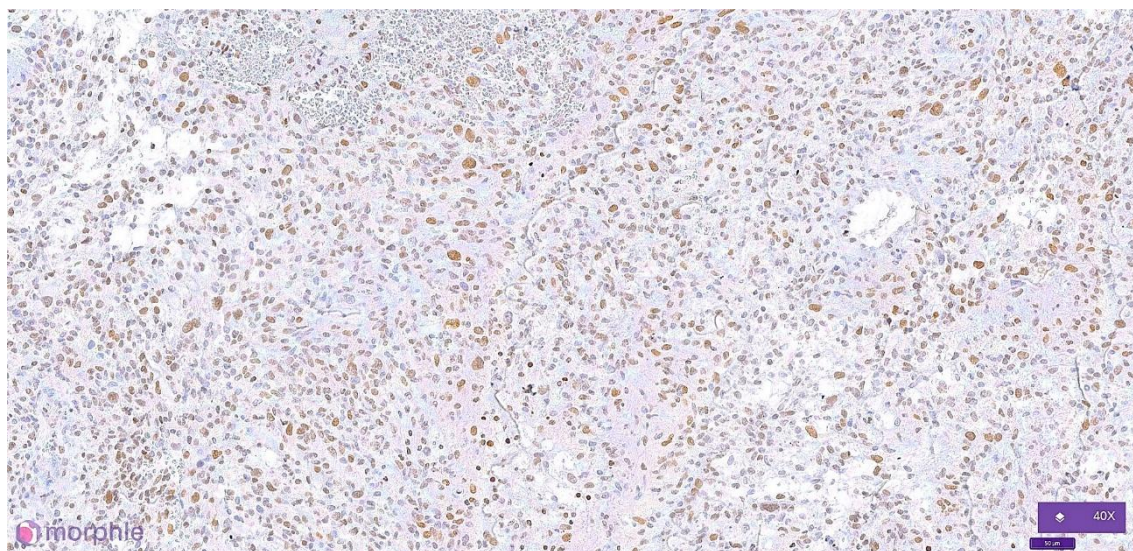
Слика 15. Графички приказ на дистрибуција на пациенти според експресија на H3K27me.

4.2.5 Имунохистохемиска експресија на MGMT

На Слика 16 е прикажана дистрибуцијата на процентот на јадрениот имунохистохемски позитивен сигнал на имунохистохемскиот маркер MGMT.



Слика 16. Графички приказ на дистрибуција на пациенти според процент на експресија на MGMT.

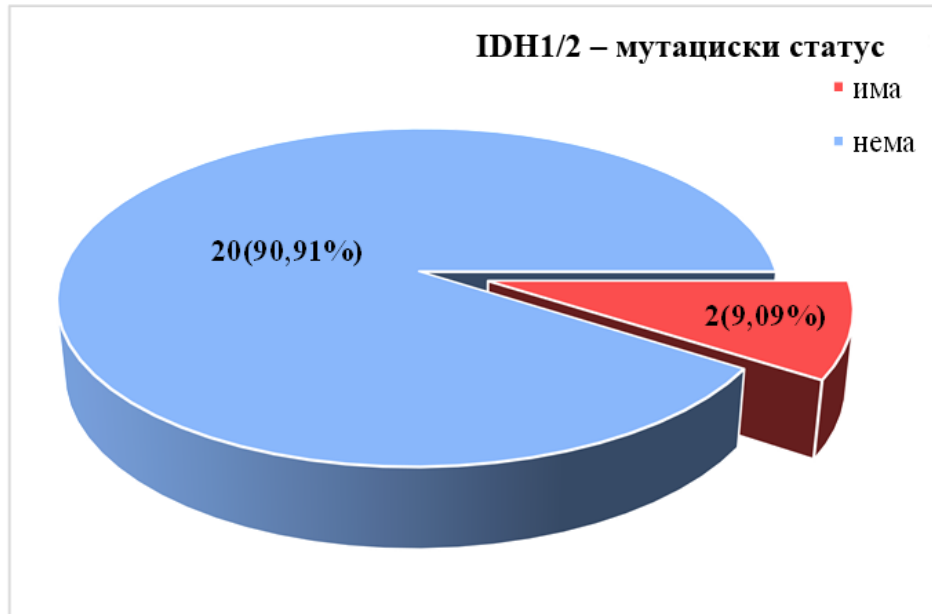


MGMT позитивна јадрена експресија (50% од туморски клетки)

(дигитална микрографија)

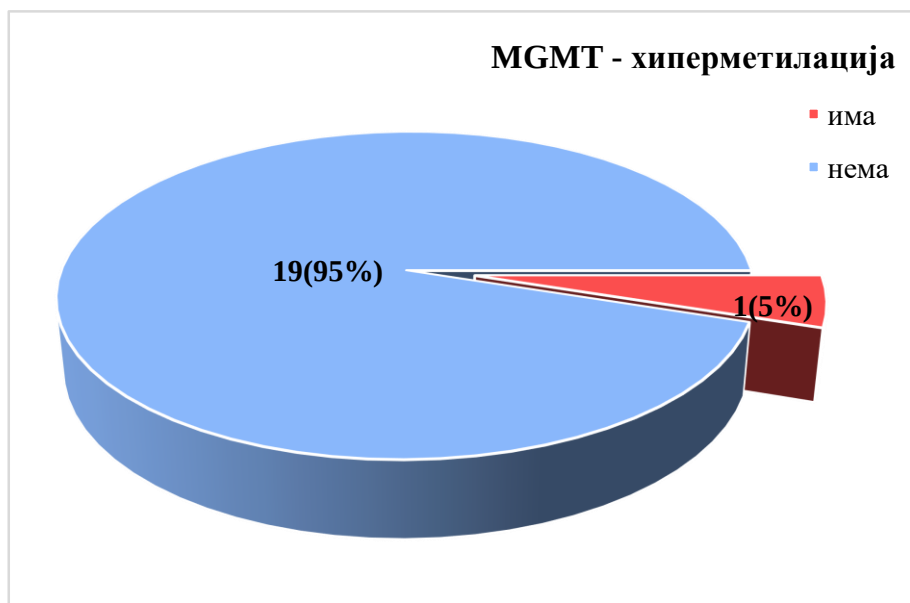
4.2.6 Молекуларно тестирање на IDH1/2 и MGMT метилациски статус

Молекуларна генетска анализа беше направена кај 22 (28,57%) случаи со неконклузивна IDH1/2 имунохистохемиска експресија која покажа мутација на генот кај 2 (9,09%) случаи (Слика 17).

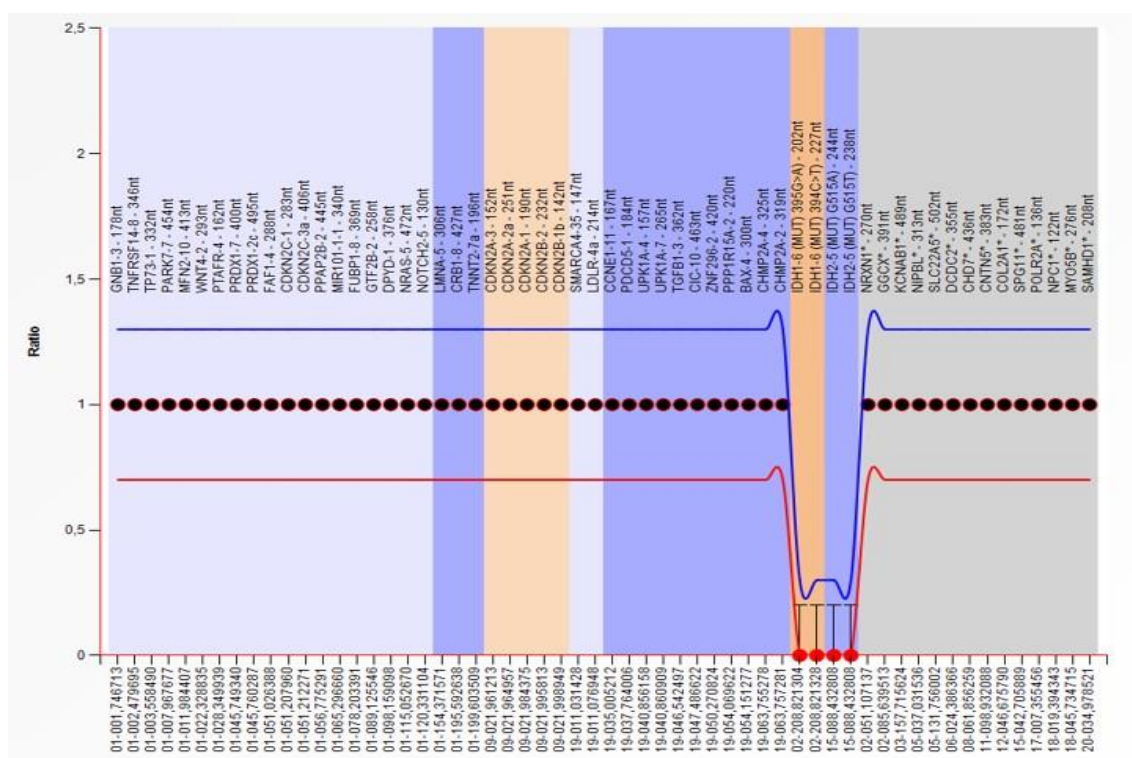


Слика 17. Графички приказ на дистрибуција на пациенти според IDH1/2-мутациски статус.

MGMT-метилацискиот статус беше одреден со молекуларна анализа кај 20 (25,97%) пациенти, а хиперметилација беше детектирана само кај 1 (5%) пациент (Слика 18).



Слика 18. Графички приказ на дистрибуција на пациенти со/без MGMT-хиперметилицаја.



Приказ на нормализираните релативни вредности (ratio) за секоја MLPA сонда. Испрекинатата линија на ratio = 1,0 означува нормален број на копии; вредности под долниот праг укажуваат на делеција, а над горниот праг на зголемување на бројто на копии/амплификација. Засенчените региони ги означуваат клучните хромозомски локуси релевантни за глиоми.

		Probe target info	T 285 N MLPA DUPLIKAT PCR								
			Height	Area	Intra_	Pre r_	Final_	Stdev	Sam_	d(nt)	Width
01p (n=19)	GNB1-3	01-001.746713	4991	24327	0.99	1	1	0	Equal	-0.14	45
	TNFRSF14-8	01-002.479695	3965	44347	1.08	1	1	0	Equal	0.07	65
	TP73-1	01-003.558490	2224	23287	1.09	1	1	0	Equal	0.02	44
	PARK7-7	01-007.967677	1603	20250	0.93	1	1	0	Equal	0.04	46
	MFN2-10	01-011.984407	1287	15119	1.02	1	1	0	Equal	-0.1	28
	WNT4-2	01-022.328835	3615	33298	1.08	1	1	0	Equal	-0.05	31
	PTAFR-4	01-028.349939	5714	25385	0.97	1	1	0	Equal	-0.24	34
	PRDX1-7	01-045.749340	2412	28470	1.04	1	1	0	Decrease	-0.21	48
	PRDX1-2c	01-045.760287	2172	29876	0.79	1	1	0	Equal	0.05	34
	FAF1-4	01-051.026388	3882	34986	1.08	1	1	0	Equal	-0.06	47
	CDKN2C-1	01-051.207960	2542	21670	1.08	1	1	0	Equal	-0.02	32
	CDKN2C-3a	01-051.212271	2249	27174	1.03	1	1	0	Equal	-0.22	51
	PPAP2B-2	01-056.775291	2422	31062	0.95	1	1	0	Equal	0.13	63
	MIR101-1-1	01-065.296660	2988	33219	1.09	1	1	0	Decrease	0	49
	FUBP1-8	01-078.203391	1737	20293	1.07	1	1	0	Decrease	0.15	56
	GTF2B-2	01-089.125546	3878	28954	1.06	1	1	0	Equal	0.08	29
	DPYD-1	01-098.159098	2121	24273	1.07	1	1	0	Equal	0.1	48
	NRAS-5	01-115.052670	3318	44927	0.87	1	1	0	Equal	0	51
	NOTCH2-5	01-120.331104	5143	22622	0.92	1	1	0	Equal	-0.06	37
01q (n=3)	LMNA-5	01-154.371571	2094	19605	1.09	1	1	0	Equal	0	30
	CRB1-8	01-195.592638	1711	21163	0.99	1	1	0	Equal	0.02	60
	TNNT2-7a	01-199.603509	3678	18754	1.01	1	1	0	Equal	0.25	39
09p (n=5)	CDKN2A-3	09-021.961213	7791	34925	0.95	1	1	0	Increase	0.39	37
	CDKN2A-2a	09-021.964957	3552	24960	1.06	1	1	0	Equal	0.14	27
	CDKN2A-1	09-021.984375	3508	17338	1	1	1	0	Equal	-0.51	34
	CDKN2B-2	09-021.995813	2884	20126	1.04	1	1	0	Equal	0.3	32
	CDKN2B-1b	09-021.998949	3951	17423	0.94	1	1	0	Equal	-0.1	25
19p (n=2)	SMARCA4-35	19-011.031428	6786	29889	0.95	1	1	0	Equal	0.17	29
	LDLR-4a	19-011.076948	5470	32160	1.03	1	1	0	Equal	0.34	29
19q (n=11)	CCNE1-11	19-035.005212	4501	20465	0.97	1	1	0	Equal	-0.49	29
	PDCD5-1	19-037.764006	5046	23540	0.99	1	1	0	Equal	-0.22	33
	UPK1A-4	19-040.856158	4897	22375	0.96	1	1	0	Equal	0.14	43
	UPK1A-7	19-040.860909	3347	27940	1.07	1	1	0	Equal	0.1	47
	TGFB1-3	19-046.542497	1522	17393	1.08	1	1	0	Equal	0.11	54
	CIC-10	19-047.486622	1446	18839	0.9	1	1	0	Equal	0.15	38
	ZNF296-2	19-050.270824	1078	13181	1.01	1	1	0	Equal	-0.11	39
	PPP1R15A-2	19-054.069622	3569	23624	1.03	1	1	0	Equal	0.44	52
	BAX-4	19-054.151277	3079	30100	1.09	1	1	0	Equal	-0.05	56
	CHMP2A-4	19-063.755278	3421	35385	1.09	1	1	0	Equal	0.07	51
	CHMP2A-2	19-063.757281	3072	30825	1.09	1	1	0	Equal	0.09	36
02q (n=2)	IDH1-6 (MUT)	02-208.821304	0	0	0	0	0	0	<<<	0	0
	IDH1-6 (MUT)	02-208.821328	0	0	0	0	0	0	<<<	0	0
15q (n=2)	IDH2-5 (MUT)	15-088.432808	0	0	0	0	0	0	<<<	0	0
	IDH2-5 (MUT)	15-088.432808	0	0	0	0	0	0	<<<	0	0
References...	NRXN1*	02-051.107137	6107	50805	1.07	1	1	0	Increase	0.04	37
	GGCX*	02-085.639513	2063	23076	1.05	1	1	0	Equal	0.02	43
	KCNAB1*	03-157.715624	1514	20152	0.81	1	1	0	Equal	0.18	30
	NIPBL*	05-037.031536	2270	21912	1.09	1	1	0	Decrease	0.09	43
	SLC22A5*	05-131.756002	2566	37490	0.75	1	1	0	Increase	0	60
	DCDC2*	06-024.386366	1466	15601	1.08	1	1	0	Equal	0.13	29
	CHD7*	08-061.856259	2261	26736	0.97	1	1	0	Equal	0.05	38
	CNTN5*	11-098.932088	1516	17284	1.06	1	1	0	Increase	-0.09	40
	COL2A1*	12-046.675790	4678	21774	0.98	1	1	0	Increase	-0.1	40
	SPG11*	15-042.705889	2892	41526	0.84	1	1	0	Equal	0.12	63
	POLR2A*	17-007.355456	5225	24647	0.93	1	1	0	Decrease	-0.01	40
	NPC1*	18-019.394343	7736	34372	0.91	1	1	0	Equal	-0.09	33
	MYO5B*	18-045.734715	3029	28331	1.08	1	1	0	Equal	0.01	54
	SAMHD1*	20-034.978521	4233	22702	1.02	1	1	0	Equal	0.24	27

Приказ на квантитативни резултати по сонда (висина на пик, ratio и интерпретација). Ознаките Equal, Desc и Incr означуваат нормален број на копии, делеција или амплификација. Овие податоци овозможуваат проценка на статусот на важни гени (на пр. *1p/19q*, *CDKN2A/B*, *EGFR*, *PTEN*, *IDH1/2*) за молекуларна класификација на дифузни глиоми.

4.3 Компаративна анализа според тип на тумор

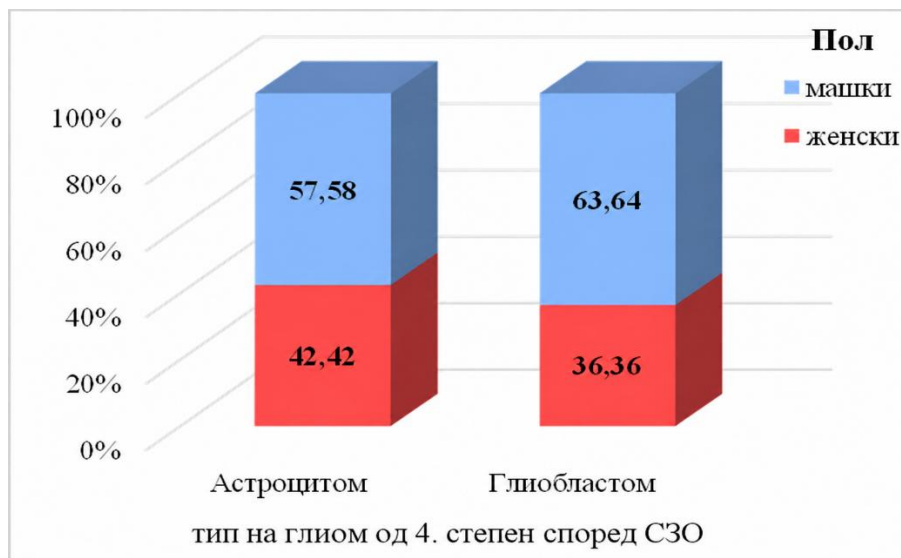
4.3.1 Полови и возрасни разлики помеѓу астроцитом и глиобластом

Типот на глијален тумор од 4. степен според СЗО не беше значајно асоциран со полот на пациентите ($p = 0,59$). Пациентите од машки пол почесто од оние од женски пол имаа астроцитом и глиобластом (57,58% и 63,64%, соодветно) (Табела 14, Слика 19).

Табела 14. Полова дистрибуција на пациенти според тип на глиом од 4. степен според СЗО

Пол	Тип на глиом од 4. степен според СЗО			p-level
	n	Астроцитом n (%)	Глиобластом n (%)	
Женски	30	14 (42,42)	16 (36,36)	$X^2 = 0.3$ $p = 0,59$
Машки	47	19 (57,58)	28 (63,64)	

X^2 (Chi-square test)



Слика 19. Графички приказ на полова дистрибуција на пациенти според тип на глијален тумор.

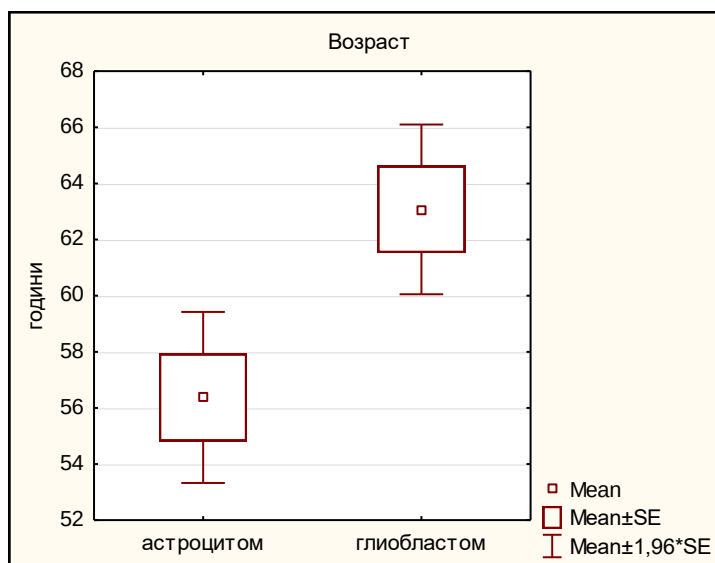
Пациентите кај кои беше дијагностициран астроцитом, *IDH*-мутиран (4. степен според СЗО) беа на просечна возраст од $56,4 \pm 8,9$ години и беа значајно помлади од пациентите со глиобластом, чијашто просечна возраст беше $63,1 \pm 9,2$ години ($p = 0,0037$) (Табела 15, Слика 20).

Табела 15. Возраст на пациенти според тип на глиом од 4. степен според СЗО.

Тип на глиом од 4. степен според СЗО	Возраст (години)			p-level
	n	mean $\pm$ SD	min – max	
Астроцитом	33	$56,4 \pm 8,9$	35,6 – 70,7	t = 3.0 **p = 0,0037
Глиобластом	44	$63,1 \pm 9,2$	37,7 – 81,8	

t (Student t-test)

**sig p<0.001



Слика 20. Графички приказ на просечна возраст на пациенти според тип на глијален тумор.

Пациентите помлади од 55 години, оние на возраст од 55–65 години и пациентите на 65 години и постари беа значајно различно застапени кај двата типа глиоми од 4. степен според СЗО ($p = 0,024$) (Табела 16).

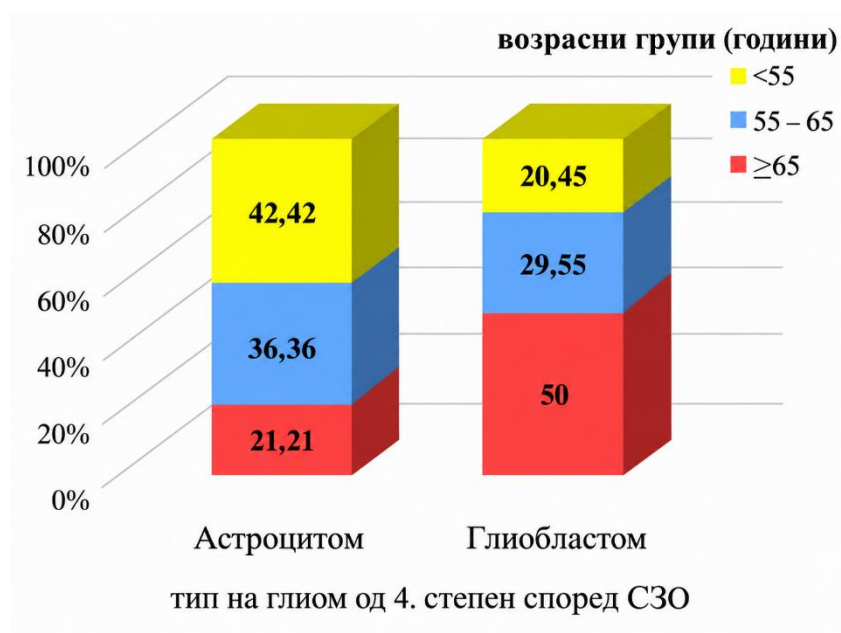
Најголем дел од пациентите со астроцитом беа на возраст под 55 години (42,42%), додека кај пациентите со глиобластом дури 50% беа на возраст од 65 години и постари (Табела 16, Слика 21).

Табела 16. Возрасна дистрибуција на пациенти според тип на глијален тумор.

Возрасни групи (години)	Тип на глиом од 4. степен според СЗО			p-level
	n	Астроцитом n (%)	Глиобластом n (%)	
<55	23	14 (42,42)	9 (20,45)	$X^2 = 7.47$ *p = 0,024
55 – 65	25	12 (36,36)	13 (29,55)	
≥65	29	7 (21,21)	22 (50)	

X^2 (Chi-square test)

*sig p<0.05



Слика 21. Графички приказ на возрасна дистрибуција на пациенти според тип на глијален тумор.

4.3.2 Стапка на рецидив и број на операции според типот на тумор

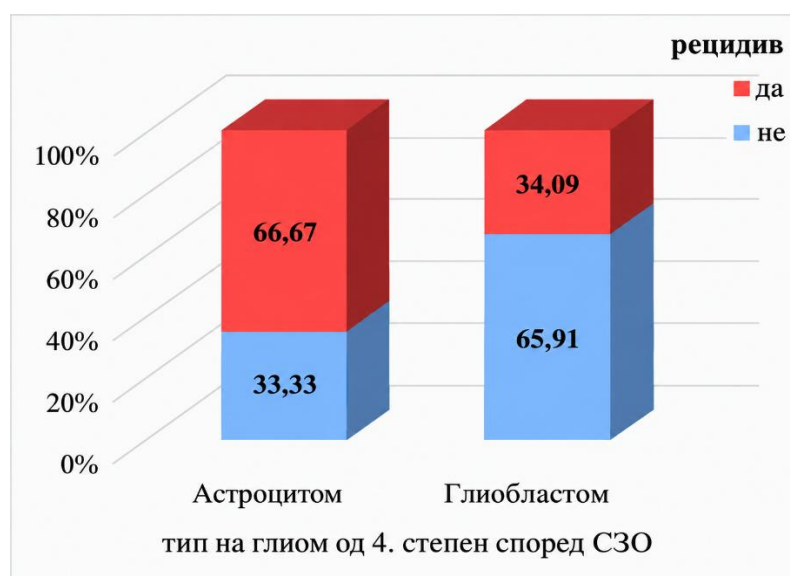
Појавата на рецидив беше статистички значајно почеста кај пациентите со астроцитом во споредба со оние со глиобластом (66,67% наспроти 34,09%; $p = 0,0046$) (Табела 17, Слика 22).

Табела 17. Зачестеност на рецидив според тип на глиом од 4. степен според СЗО.

Рецидив	Тип на глиом од 4. степен според СЗО			p-level
	n	Астроцитом n (%)	Глиобластом n (%)	
Да	37	22 (66,67)	15 (34,09)	$X^2 = 8,02$ **p = 0,0046
Не	40	11 (33,33)	29 (65,91)	

X^2 (Chi-square test)

**sig $p < 0.001$



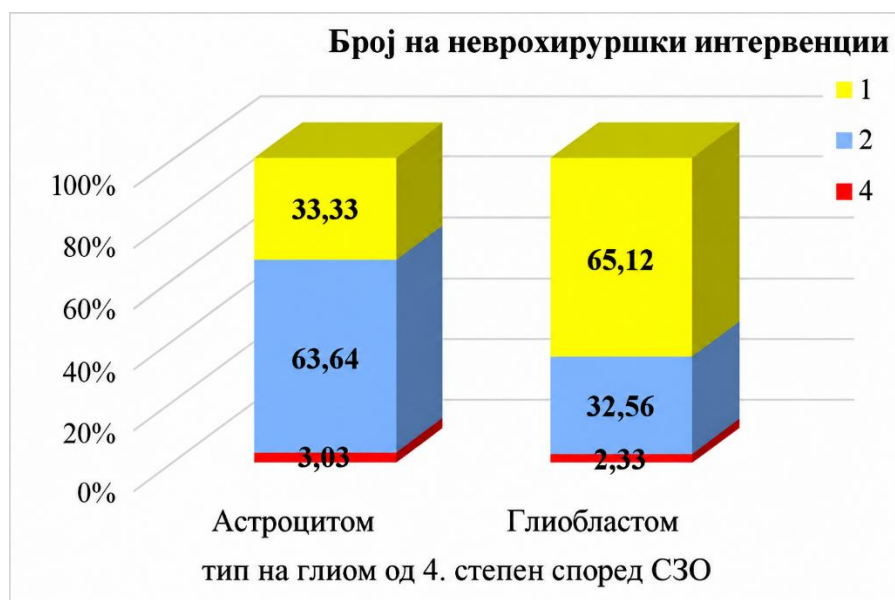
Слика 22. Графички приказ на дистрибуција на пациенти со/без рецидив според тип на глиом од 4. степен според СЗО.

Пациентите со астроцитом имаа статистички значајно поголем број рецидиви (односно повторни неврохируршки интервенции) во споредба со оние со глиобластом ($p = 0,011$). Две неврохируршки операции беа извршени кај 63,64% од пациентите со астроцитом наспроти 32,56% од пациентите со глиобластом, додека четири операции беа забележани кај 3,03% од пациентите со астроцитом и 2,33% од пациентите со глиобластом (Табела 18, Слика 23).

Табела 18. Број на неврохируршки интервенции според тип на глиом од 4. степен според СЗО.

Број на неврохируршки интервенции (рецидиви)	Тип на глиом од 4. степен според СЗО			p-level
	n	Астроцитом n (%)	Глиобластом n (%)	
1	39	11 (33,33)	28 (65,12)	Fisher's exact * $p = 0,011$
2	35	21 (63,64)	14 (32,56)	
4	2	1 (3,03)	1 (2,33)	
вкупно	76	33	43	

*sig $p < 0.05$



Слика 23. Графички приказ на дистрибуција на број на неврохируршки интервенции според тип на глиом од 4. степен според СЗО.

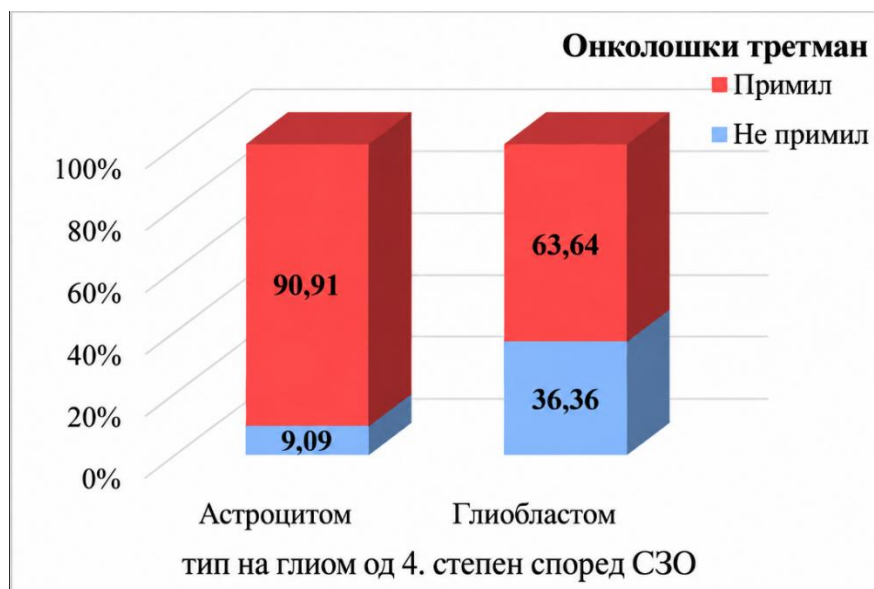
4.3.3 Онколошки третман според типот на тумор

Пациентите со астроцитом статистички значајно почесто примале онколошки третман во споредба со пациентите со глиобластом (90,91% наспроти 63,64%; $p = 0,007$) (Табела 19, Слика 24).

Табела 19. Дистрибуција на пациенти со/без онколошки третман според тип на глиом.

Онколошки третман (радиотерапија, конкурентна радиохемотерапија, адјувантна хемотерапија, антиангиогена, второлиниска хемотерапија)	Тип на глиом од 4. степен според СЗО			p-level
	n	Астроцитом n (%)	Глиобластом n (%)	
Примил	58	30 (90,91)	28 (63,64)	Fisher's exact ** $p=0.007$
Не примил	19	3 (9,09)	16 (36,36)	

**sig $p<0.01$



Слика 24. Графички приказ на дистрибуција на пациенти со/без онколошки третман според тип на глиом.

Пациентите со глиобластом статистички значајно почесто примале адјувантна хемотерапија со темозоломид (во доза од 150 mg/m² телесна површина, 5 дена на секои 28 дена) во споредба со пациентите со астроцитом (52,27% наспроти 15,15%; p = 0,0008) (Табела 20, Слика 25).

Табела 20. Дистрибуција на пациенти со/без адјувантна хемотерапија со темозоломид според тип на глиом.

Онколошки третман со адјувантна хемотерапија со темозоломид приман орално таблетарно во доза од 150 mg/m ² телесна површина 5 дена во циклус од 28 дена	Тип на глиом од 4. степен според СЗО			p-level
	n	Астроцитом n (%)	Глиобластом n (%)	
Примил	49	28 (84,85)	21 (47,73)	X ² =11.23 ***p=0.0008
Не примил	28	5 (15,15)	23 (52,27)	

X²(Chi-square test)
***sig <0.0001



Слика 25. Графички приказ на дистрибуција на пациенти со/без онколошки третман со темозоломид според тип на глиом.

Антиангиогена терапија примале незначајно почесто пациентите од групата со астроцитом (15,15% наспроти 4,55%, $p = 0,13$) (Табела 21).

Табела 21. Дистрибуција на пациенти со/без антиангиогена терапија според тип на глиом.

Антиангиогена терапија	Тип на глиом од 4. степен според СЗО			p-level
	n	Астроцитом n (%)	Глиобластом n (%)	
Примил	7	5 (15,15)	2 (4,55)	Fisher's exact $p = 0.13$
Не примил	70	28 (84,85)	42 (95,45)	

Второлиниска хемотерапија со иринотекан примил само 1 пациент од групата со астроцитом (Табела 22).

Табела 22. Дистрибуција на пациенти со/без второлиниска хемотерапија според тип на глиом.

Второлиниска хемотерапија	Тип на глиом од 4. степен според СЗО			p-level
	n	Астроцитом n (%)	Глиобластом n (%)	
Примил	76	32 (96,97)	44 (100)	Fisher's exact $p = 1.0$
Не примил	1	1 (3,03)	0	

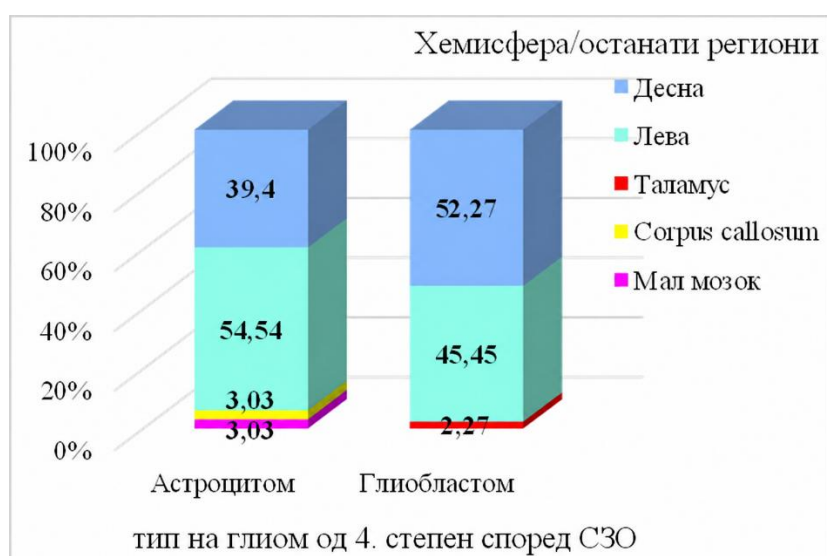
Не беше најдена статистички значајна разлика во однос на локализацијата на астроцитомите и глиобластомите ($p > 0,05$).

4.3.4 Локализација според тип на глиом и полови разлики во локализацијата на туморот

Не беше утврдена статистички значајна разлика во латерализацијата: астроцитомите нешто почесто беа локализирани во левата хемисфера (54,54% наспроти 45,45%; $p = 0,43$), додека глиобластомите во десната хемисфера (52,27% наспроти 39,40%; $p = 0,26$). Покрај ова, по еден астроцитом беше локализиран во corpus callosum и во малиот мозок, а еден глиобластом во таламусот (Табела 23, Слика 26).

Табела 23. Дистрибуција на локализација според тип на глиом

Хемисфера/ останати региони	Тип на глиом од 4. степен според СЗО		p-level difference test
	Астроцитом n (%)	Глиобластом n (%)	
Десна	13 (39,4)	23 (52,27)	$p = 0,26$
Лева	18 (54,54)	20 (45,45)	$p = 0,43$
Таламус	0	1 (2,27)	$p = 0,38$
<i>Corpus callosum</i>	1 (3,03)	0	$p = 0,31$
Мал мозок	1 (3,03)	0	$p = 0,31$
Вкупно	33	44	



Слика 26. Графички приказ на дистрибуција на локализација според тип на глиом.

Фронтно-париеталната локализација на астроцитомите во десната хемисфера беше значајно почеста во споредба со глиобластомите (23,08% наспроти 0%, $p = 0,016$) (Табела 24).

Останатите локализации во десната хемисфера беа незначајно различни за двата типа глиоми: астроцитомите незначајно почесто од глиобластомите во десната хемисфера беа локализирани фронтално (30,77% наспроти 21,74%, $p = 0,55$) и париетално (23,08% наспроти 4,35%, $p = 0,086$), незначајно поретко темпорално (17,39% наспроти 0, $p = 0,11$), окципитално (4,35% наспроти 0, $p = 0,45$), темпоро-париетално (15,38% наспроти 26,09%, $p = 0,46$), темпоро-окципитално и парието-окципитално (8,69% наспроти 0, $p = 0,27$); фронтно-темпоралната локализација во десната хемисфера беше слична за двата типа на глиоми (7,69% наспроти 8,69%, $p = 0,92$) (Табела 24).

Табела 24. Дистрибуција на локализација на туморот во десна хемисфера според тип на глиом.

Десна хемисфера			
Локализација на тумор според регија во голем мозок	Тип на глиом 4. степен според СЗО		p-level difference test
	Астроцитом n (%)	Глиобластом n (%)	
Фронтална	4 (30,77)	5 (21,74)	$p = 0,55$
Париетална	3 (23,08)	1 (4,35)	$p = 0,086$
Темпорална	4 (17,39)	0	$p = 0,11$
Окципитална	0	1 (4,35)	$p = 0,45$
Фронтно-темпорална	1 (7,69)	2 (8,69)	$p = 0,92$
Фронтно-париетална	3 (23,08)	0	* $p = 0,016$
Темпоро-париетална	2 (15,38)	6 (26,09)	$p = 0,46$
Темпоро-окципитална	0	2 (8,69)	$p = 0,27$
Парието-окципитална	0	2 (8,69)	$p = 0,27$
Вкупно	13	23	

*sig $p < 0.05$

Во левата хемисфера, астроцитомите беа значајно почесто локализирани во париеталната регија во споредба со глиобластомите (22,22% наспроти 0%; $p = 0,026$), а незначајно почесто во темпоралната (33,33% наспроти 30%; $p = 0,83$), окципиталната (5,55% наспроти 5%; $p = 0,94$) и фронтотемпоралната регија (5,55% наспроти 0%; $p = 0,29$). Додека пак, нивната локализација беше незначајно поретка во фронталната (11,11% наспроти 15%; $p = 0,72$), фронтотемпоралната (0% наспроти 15%; $p = 0,087$), темпоротемпоралната (11,11% наспроти 15%; $p = 0,72$), темпоротемпоралната (0% наспроти 5%; $p = 0,34$) и париетоокципиталната регија (11,11% наспроти 15%; $p = 0,72$) (Табела 25).

Табела 25. Дистрибуција на локализација на туморот во лева хемисфера според тип на глиом.

Лева хемисфера			
Локализација на тумор според регија во голем мозок	Тип на глиом од 4. степен според СЗО		p-level difference test
	Астроцитом n (%)	Глиобластом n (%)	
Фронтална	2 (11,11)	3 (15)	$p = 0,72$
Париетална	4 (22,22)	0	$p = 0,026$
Темпорална	6 (33,33)	6 (30)	$p = 0,83$
Окципитална	1 (5,55)	1 (5)	$p = 0,94$
Фронтотемпорална	1 (5,55)	0	$p = 0,29$
Фронтотемпорална	0	3 (15)	$p = 0,087$
Темпоротемпорална	2 (11,11)	3 (15)	$p = 0,72$
Темпоротемпорална окципитална	0	1 (5)	$p = 0,34$
Париетоокципитална	2 (11,11)	3 (15)	$p = 0,72$
Вкупно	18	20	

*sig $p < 0.05$

4.3.5 Корелација на возраста на пациентите со туморските рецидиви

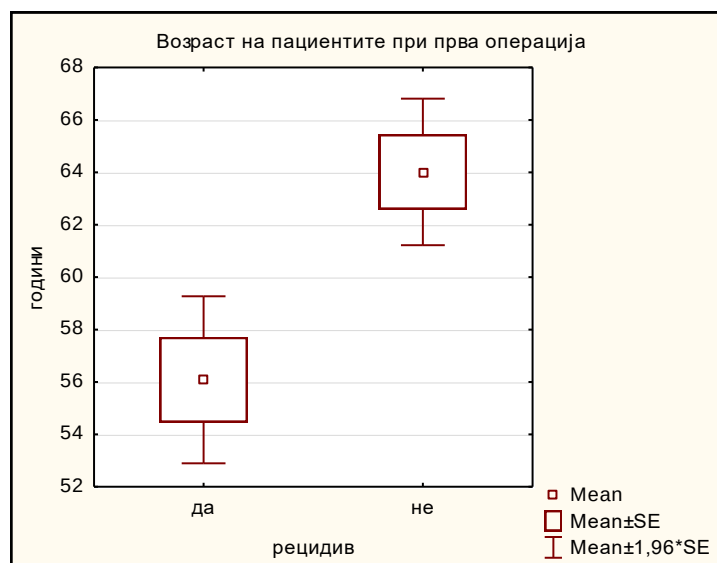
Просечната возраст на пациентите со рецидив беше $56,1 \pm 9,9$ години, додека кај пациентите без рецидив изнесуваше $64,0 \pm 9,0$ години. Разликата од 7,9 години беше статистички значајна ($p = 0,0004$), односно рецидивирање на болеста беше регистрирано кај значајно помлади пациенти (Табела 26, Слика 27).

Табела 26. Возраст на пациентите со/без рецидив

Рецидив	Возраст / години при прва операција			p-level
	N	mean $\pm$ SD	min – max	
Да	37	$56,08 \pm 9,9$	35,6 – 71,3	t = 3,68 **p = 0,000435
Не	40	$64,02 \pm 9,0$	48 – 81,8	

t (Student t-test)

**sig p<0.001



Слика 27. Графички приказ на просечна возраст на пациентите со/без рецидив.

Рецидивирање на болеста беше најзастапено кај пациентите помлади од 55 години (69,57%), следено од групата на возраст од 55 до 65 години (48,00%), додека најниска честота беше забележана кај пациентите на возраст од 65 години и постари (31,03%) (Табела 27, Слика 28).

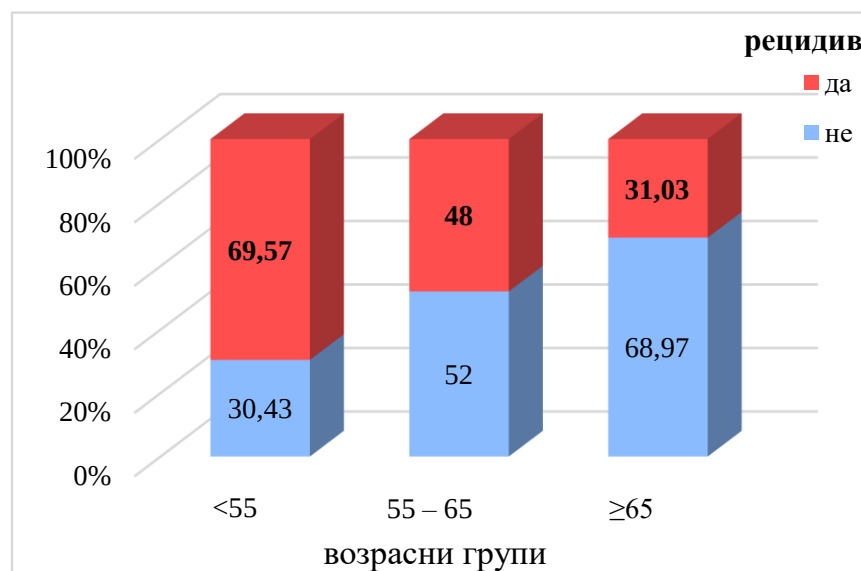
Беше утврдена статистички значајна разлика во возрасната дистрибуција (< 55, 55–65 и ≥ 65 години) помеѓу пациентите со и без рецидив на болеста ($p = 0,022$) (Табела 27).

Табела 27. Возрасни групи на пациентите со/без рецидив

Возрасни групи (години)	Рецидив			p-level
	n	Да n (%)	Не n (%)	
<55	23	16 (69,57)	7 (30,43)	$X^2=7.63$ * $p = 0,022$
55 – 65	25	1 (48)	13 (52)	
≥65	29	9 (31,03)	20 (68,97)	

X^2 (Chi-square test)

*sig $p < 0.05$

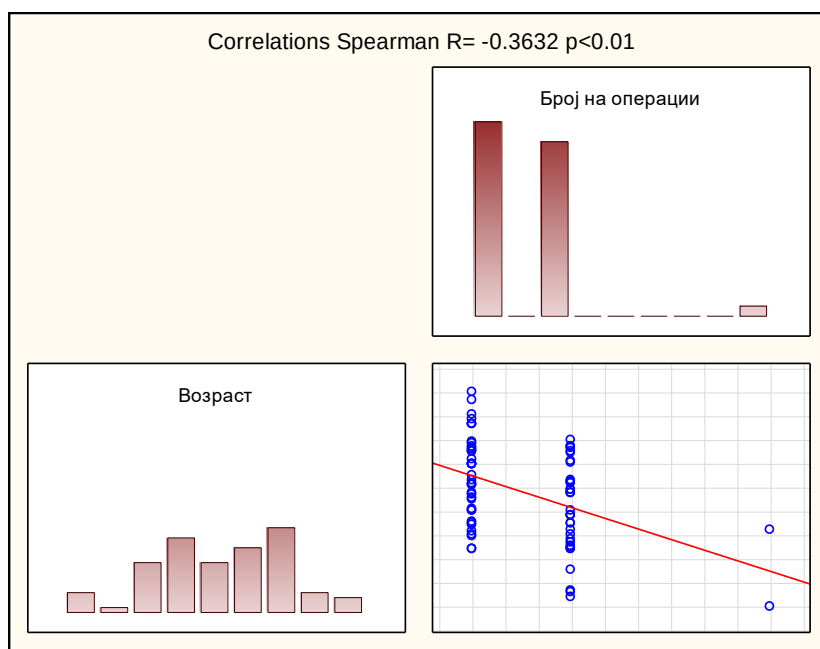


Слика 28. Графички приказ на возрасна дистрибуција на пациентите со/без рецидив.

Се потврди статистички значајна негативна корелација помеѓу возраста на пациентите и бројот на извршени неврохируршки операции ($p = 0,001$). Според Спирмановиот коефициент на ранг-корелација ($R = -0,3632$), зголемувањето на возраста на пациентите е поврзано со намалување на бројот на неврохируршки интервенции (Табела 28, Слика 29).

Табела 28. Корелација помеѓу возраста на пациентите и бројот на неврохируршки интервенции

Корелација			
	Spearman R	t	p-level
Возраст на пациент при прва операција & број на неврохируршки операции	-0,3632	-3,3537	0,00126



Слика 29. Графички приказ на корелација на возраст и број на неврохируршки интервенции.

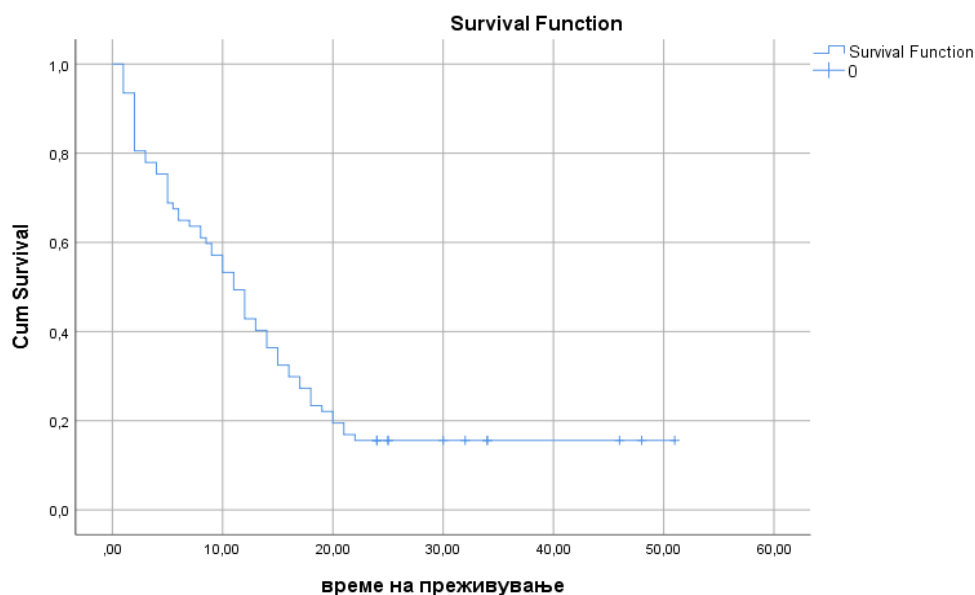
4.4 Анализа на средното време на преживување

4.4.1 Вкупна стапка на преживување и медијана на следење

Во анализата на преживување беа вклучени сите 77 пациенти, од кои починаа 65 (84,42%). Медијаната на времето на следење изнесуваше 11 (5–18) месеци. Стапката на 24-месечно вкупно преживување изнесуваше 15,60% (SE = 0,041). Просечното вкупно време на преживување во оваа кохорта на пациенти со глијални неоплазми од 4. степен според СЗО изнесуваше 15,87 (95% CI = 12,26–19,48) месеци. Медијаната на вкупното преживување беше 11 месеци, при што кај 75% од пациентите преживувањето било подолго од 5 месеци (Табела 29 и Слика 30).

Табела 29. Вкупно време на преживување на пациенти со глијални неоплазми од 4. степен според СЗО.

Mean and Medians for Survival time												
	Mean				25.0% percentiles		Median				75.0% percentiles	
	Estimate	Std. Error	95% CI		Estimate	Std. Error	Estimate	Std. Error	95% CI		Estimate	Std. Error
			Lower Bound	Upper Bound					Lower Bound	Upper Bound		
	15.870	1.842	12.259	19.481	18.0	1.857	11.0	1.196	8.655	13.345	5.0	1.355



Слика 30. Kaplan-Meier крива на вкупно преживување на пациенти со глијални неоплазми од 4. степен според СЗО.

4.4.2 Преживување според пол

Во групата од 30 пациенти од женски пол починаа 26 (86,67%), а во групата од 47 пациенти од машки пол починаа 39 (82,98%). Стапката на 24-месечно преживување кај женските пациенти изнесуваше 13,3%, а кај машките 17,0%. Не беше потврдена статистички значајна разлика во времето на преживување во зависност од полот на пациентите ($p = 0,65$) (Табела 30).

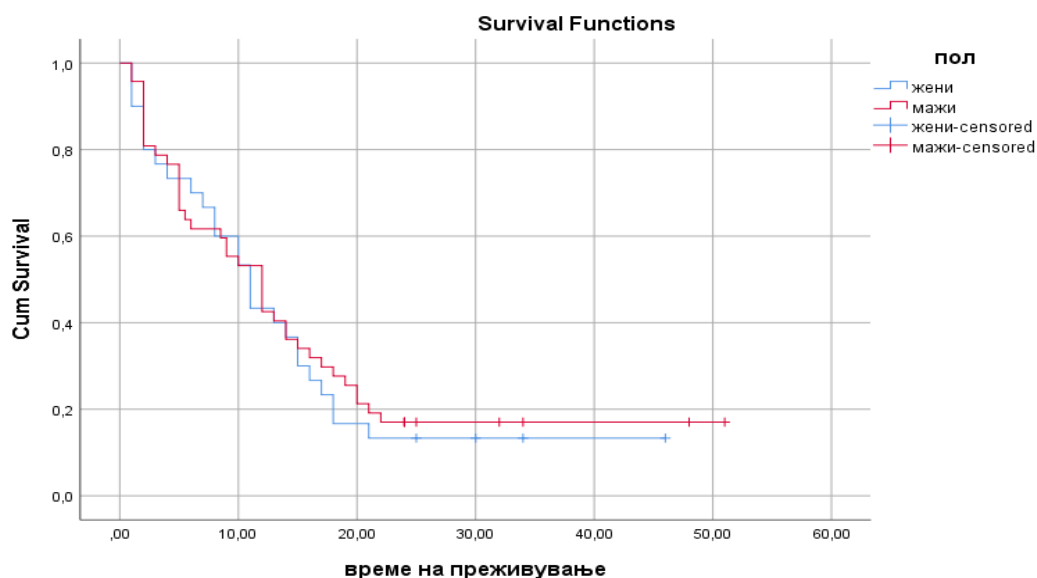
Табела 30. Вкупно време на преживување на пациенти со глијални неоплазми од 4. степен според СЗО според пол

Пол	Вкупно (N)	Починати N (%)	Вкупно време на преживување 24 месеци	
			%	std.Error
Жени	30	26 (86,67%)	13,3	(0,062)
Мажи	47	39 (82,98%)	17,0	(0,055)
N = број на случаи				
LogRank (Mantel-Cox) = 0.206 $p = 0.65$				

Просечното време на преживување во групата пациенти од женски пол изнесуваше 14,30 месеци (95% CI = 9,41–19,19), а во групата пациенти од машки пол 16,45 месеци (95% CI = 11,67–21,23). Медијаната на времето на вкупно преживување кај женските и кај машките пациенти беше 11 и 12 месеци, соодветно (Табела 31, Слика 31).

Табела 31. Просечно и медијално време на преживување на пациенти со глијални неоплазми од 4. степен според СЗО според пол.

Mean and Medians for Survival time												
Пол	Mean				25.0% percentiles		Median				75.0% percentiles	
	Estimate	Std. Error	95% CI		Estimate	Std. Error	Estimate	Std. Error	95% CI		Estimate	Std. Error
			Lower Bound	Upper Bound					Lower Bound	Upper Bound		
жени	14.300	2.493	9.413	19.187	17.0	1.737	11.0	1.628	7.808	14.192	4.0	3.229
мажи	16.447	2.439	11.667	21.226	20.0	2.338	12.0	1.695	8.678	15.322	5.0	1.392



Слика 31. Kaplan-Meier криви на преживување на пациенти со глијални од 4. степен според СЗО во зависност од полот.

4.4.3 Преживување според возраст

Во групата пациенти помлади од 55 години ($n = 23$) беа регистрирани 16 смртни исходи (69,57%), во групата од 55–65 години ($n = 25$) починаа 21 пациент (84,00%), додека кај пациентите на возраст од 65 години и постари ($n = 29$) починаа 28 пациенти (96,55%).

Стапката на 24-месечно преживување изнесуваше 30,4%, 16,0% и 3,4%, соодветно по возрастни групи (< 55 , 55–65 и ≥ 65 години), при што беше утврдена статистички значајна разлика во преживувањето во зависност од возраста ($p < 0,0001$) (Табела 32).

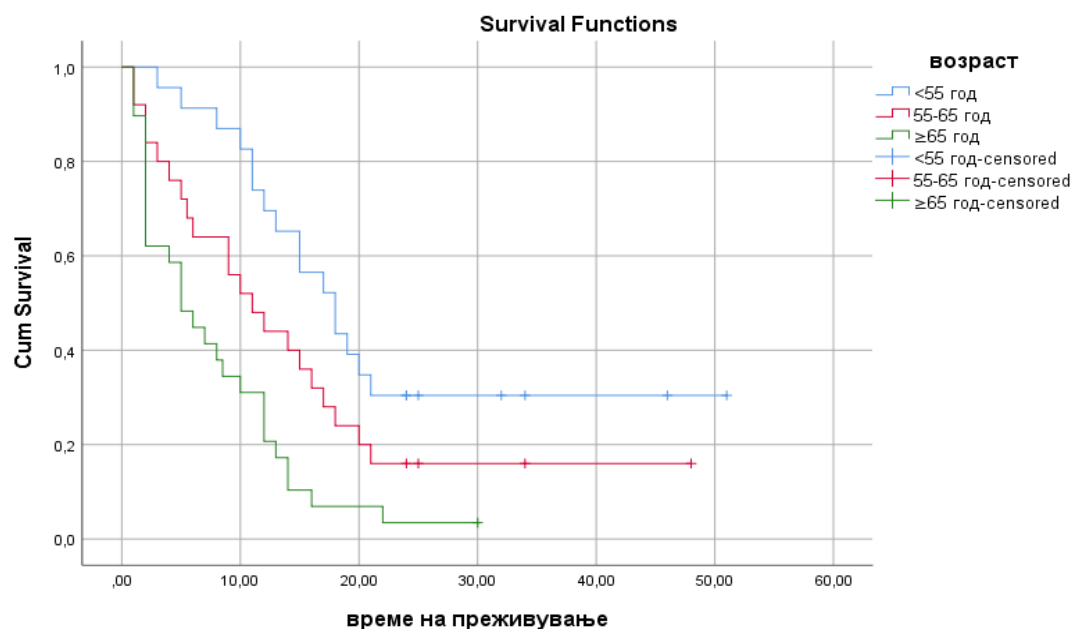
Табела 32. Вкупно време на преживување на пациенти со глијални неоплазми од 4. степен според СЗО според возраст

Возраст/ години	Вкупно (N)	Починати N (%)	Вкупно време на преживување 24 месеци	
			%	std.Error
< 55	23	16 (69,56)	30,4	0,096
55 – 65	25	21 (84)	16	0,073
≥ 65	29	28 (96,55)	3,4	0,034
N = број на случаи				
LogRank (Mantel-Cox) = 17,128 $p < 0,0001$				

Просечното време на преживување во групата пациенти помлади од 55 години изнесуваше 24,91 месеци (95% CI = 17,65–32,18), во групата пациенти на возраст од 55–65 години изнесуваше 15,74 месеци (95% CI = 9,77–21,71), а во групата пациенти на возраст од 65 години и постари изнесуваше 7,67 месеци (95% CI = 5,17–10,18). Медијаната на времето на преживување изнесуваше 18, 11 и 5 месеци, соодветно од најмладата до најстарата возрастна група (Табела 33, Слика 32).

Табела 33. Просечно и медијално време на преживување на пациенти со глијални неоплазми од 4. степен според СЗО според возраст.

Mean and Medians for Survival time												
Возраст (години)	Mean				25.0% percentiles		Median				75.0% percentiles	
	Estimate	Std. Error	95% CI		Estimate	Std. Error	Estimate	Std. Error	95% CI		Estimate	Std. Error
			Lower Bound	Upper Bound					Lower Bound	Upper Bound		
<55	24.913	3.708	17.645	32.181			18	2.377	13.34	22.66	11	1.404
55-65	15.740	3.048	9.766	21.714	18	2.847	11	2.498	6.104	15.896	5	1.871
≥65	7.672	1.278	5.168	10.177	12	1.636	5	1.345	2.363	7.637	2	0.327



Слика 32. Kaplan-Meier криви на преживување на пациенти со глијални неоплазми од 4. степен според СЗО во зависност од возраста.

4.4.4 Преживување според тип на тумор (астроцитом наспроти глиобластом)

Во групата од 33 пациенти со астроцитом починаа 24 (72,73%), а во групата од 44 пациенти со глиобластом починаа 41 (93,18%).

Стапката на 24-месечно преживување во групата пациенти со астроцитом изнесуваше 27,3%, а во групата со глиобластом изнесуваше 6,8%. Беше потврдена статистички значајна разлика во времето на преживување во зависност од типот на глиомот од 4. степен според СЗО, при што пациентите со глиобластом имаа значајно пократко време на преживување ($p < 0,0001$) (Табела 34).

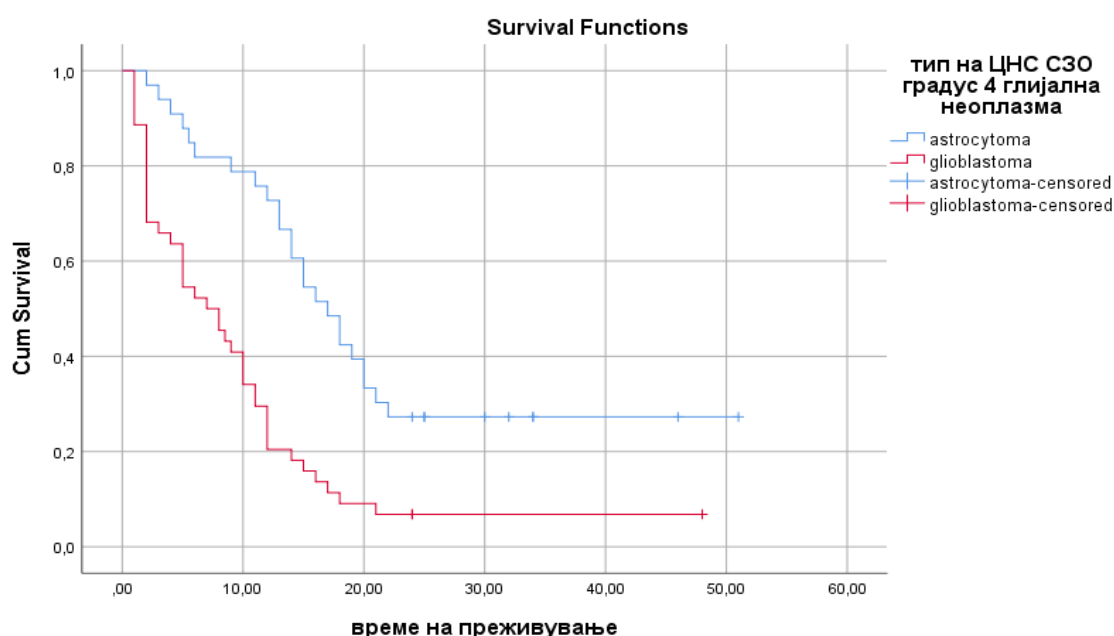
Табела 34. Вкупно време на преживување на пациенти со глијални неоплазми од 4. степен според СЗО според тип.

Тип на глијална неоплазма од 4. степен според СЗО	Вкупно (N)	Починати N (%)	Вкупно време на преживување 24 месеци	
			%	std.Error
Астроцитом	33	24 (72,73)	27,3	0,078
Глиобластом	44	41 (93,18)	6,8	0,038
N = број на случаи LogRank (Mantel-Cox)=15.895 $p<0.0001$				

Просечното време на преживување во групата пациенти со астроцитом изнесуваше 23,38 месеци (95% CI = 17,35–29,41), а во групата пациенти со глиобластом 10,03 месеци (95% CI = 6,62–13,45). Медијаната на времето на преживување кај пациентите со астроцитом и со глиобластом изнесуваше 17 и 7 месеци, соодветно (Табела 35, Слика 33).

Табела 35. Просечно и медијално време на преживување на пациенти со глијални неоплазми од 4. степен според СЗО според тип.

Mean and Medians for Survival time												
Тип	Mean				25.0% percentiles		Median				75.0% percentiles	
	Estimate	Std. Error	95% CI		Estimate	Std. Error	Estimate	Std. Error	95% CI		Estimate	Std. Error
			Lower Bound	Upper Bound					Lower Bound	Upper Bound		
Астроцитом	23.379	3.075	17.352	29.406			17.0	1.914	13.249	20.751	12.0	3.582
Глиобластом	10.034	1.740	6.623	13.445	12.0	1.529	7.0	1.658	3.750	10.250	2.0	0.343



Слика 33. Kaplan-Meier криви на преживување на пациенти со глијални неоплазми од 4. степен според СЗО во зависност од типот на глиом.

4.4.5 Преживување во однос на имунохистохемиската експресија на OLIG2

Во групата од 15 пациенти со ниска експресија на имунохистохемискиот маркер OLIG2 починаа 11 (73,33%), во групата од 11 пациенти со средна експресија починаа 10 (90,91%), а во групата од 51 пациент со висока експресија починаа 44 (86,27%).

Стапката на 24-месечно преживување изнесуваше 26,7% кај пациентите со ниска, 9,1% кај оние со средна и 13,7% кај групата со висока јадрена експресија на маркерот OLIG2. Не беше утврдена статистички значајна разлика во преживувањето во зависност од нивото на експресија на OLIG2 ($p = 0,205$) (Табела 36).

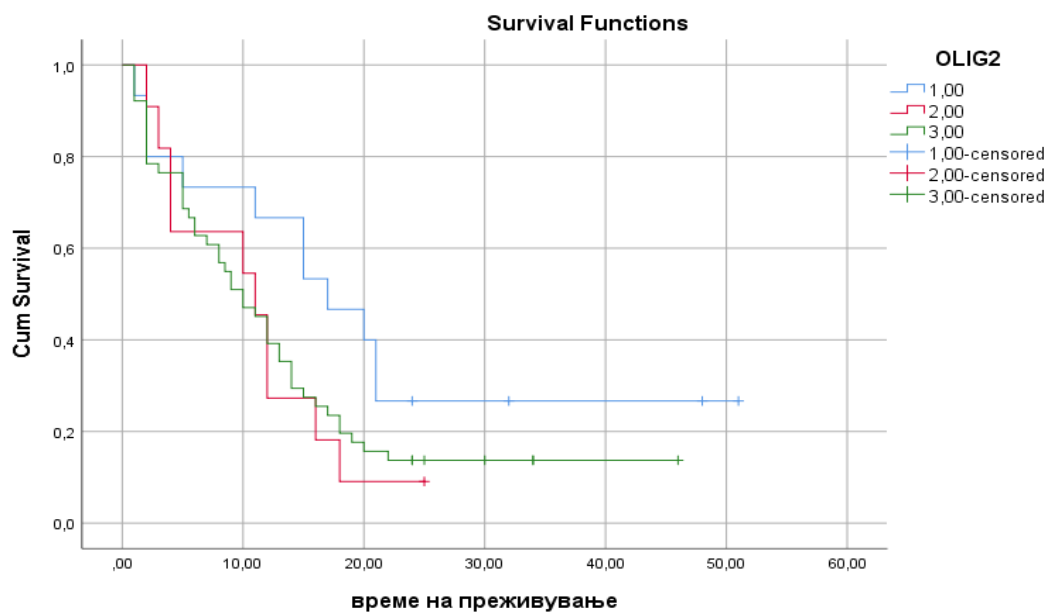
Табела 36. Вкупно време на преживување на пациенти со глијални неоплазми од 4. степен според СЗО според експресија на имунохистохемискиот маркер OLIG2.

Процент на јадрена експресија	Вкупно (N)	Починати N (%)	Вкупно време на преживување 24 месеци	
			%	std.Error
Низок	15	11 (73,33)	26,7	0,114
Среден	11	10 (90,9)	9,1	0,087
Висок	51	44 (86,27)	13,7	0,048
N = број на случаи				
LogRank (Mantel-Cox) = 3,17 $p = 0,205$				

Просечното време на преживување во групата пациенти со низок процент на експресија на маркерот OLIG2 изнесуваше 22,30 месеци (95% CI = 12,90–31,64), во групата со среден процент изнесуваше 10,64 месеци (95% CI = 6,60–14,68), а во групата со висок процент 13,92 месеци (95% CI = 10,09–17,75). Медијаната на времето на преживување кај пациентите со низок, среден и висок процент на експресија на маркерот OLIG2 изнесуваше 17, 11 и 10 месеци, соодветно (Табела 37, Слика 34).

Табела 37. Просечно и медијално време на преживување на пациенти со глијални неоплазми од 4. степен според СЗО според експресијата на имунохистохемискиот маркер OLIG2.

Mean and Medians for Survival time												
% на јадрена експресија	Mean				25.0% percentiles		Median				75.0% percentiles	
	Estimate	Std. Error	95% CI		Estimate	Std. Error	Estimate	Std. Error	95% CI		Estimate	Std. Error
			Lower Bound	Upper Bound					Lower Bound	Upper Bound		
низок	22.297	4.781	12.896	31.637			17.0	4.347	8.479	25.521	5.0	7.707
среден	10.636	2.062	6.595	14.678	16.0	2.132	11.0	3.303	4.526	17.474	4.0	0.798
висок	13.922	1.953	10.093	17.750	17.0	1.893	10.0	1.584	6.895	13.105	5.0	1.105



Слика 34. Kaplan-Meier криви на преживување на пациенти со глијални неоплазми од 4. степен според СЗО во однос на експресијата на имунохистохемискиот маркер OLIG2.

4.4.6 Преживување во однос на имунохистохемиската експресија на ATRX

Сите 4 пациенти со ниска (100,00%) и сите 8 пациенти со средна експресија (100,00%) на маркерот ATRX починаа, додека во групата од 65 пациенти со висока експресија починаа 53 (81,54%).

Стапката на 24-месечно преживување изнесуваше 0,0%, 0,0% и 18,5%, соодветно во групите со ниска, средна и висока јадрена експресија на ATRX. Разликата во времето на преживување во зависност од процентот на експресија на овој маркер не беше статистички значајна ($p = 0,052$) (Табела 38).

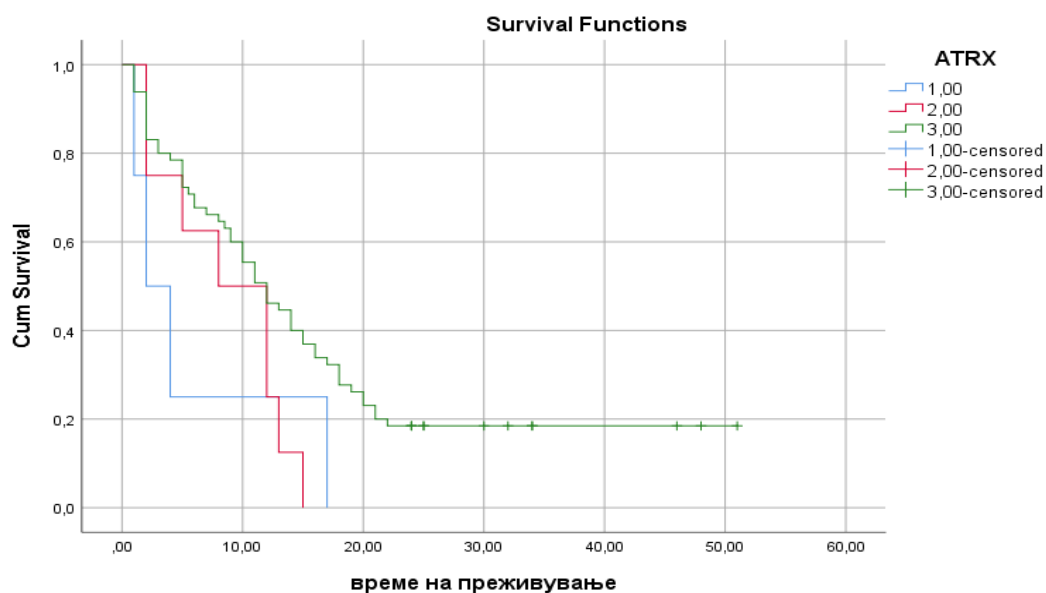
Табела 38. Вкупно време на преживување на пациенти со глијални неоплазми од 4. степен според СЗО според експресија на имунохистохемиски маркер ATRX.

Процент на јадрена експресија	Вкупно (N)	Починати N (%)	Вкупно време на преживување 24 месеци	
			%	std.Error
Низок	4	4 (100)	0	
Среден	8	8 (100)	0	
Висок	65	53 (81,54)	18,5	0,048
N = број на случаи				
LogRank (Mantel-Cox) = 5,918 $p = 0,052$				

Просечното време на преживување во групата пациенти со низок процент на експресија на маркерот ATRX изнесуваше 6,00 месеци (95% CI = 0,00–13,29), во групата со среден процент изнесуваше 8,63 месеци (95% CI = 5,07–12,18), а во групата со висок процент 17,37 месеци (95% CI = 13,23–21,51). Медијаната на времето на преживување кај пациентите со низок, среден и висок процент на експресија на маркерот ATRX изнесуваше 2, 8 и 12 месеци, соодветно (Табела 39, Слика 35).

Табела 39. Просечно и медијално време на преживување на пациенти со глијални неоплазми од 4. степен според C3O според експресија на имунохистохемискиот маркер ATRX.

Mean and Medians for Survival time												
% на јадрена експрес ија	Mean				25.0% percentiles		Median				75.0% percentiles	
	Estimate	Std. Error	95% CI		Estimate	Std. Error	Estimate	Std. Error	95% CI		Estimate	Std. Error
			Lower Bound	Upper Bound					Lower Bound	Upper Bound		
низок	6.0	3.719	0.0	13.290	4.0	6.495	2.0	1.50	0.0	4.940		1.0
среден	8.625	1.812	5.073	12.177	12.0	2.041	8.0	3.30	1.532	14.468		2.0
висок	17.369	2.111	13.233	21.506	20.0	1.698	12.0	1.723	8.624	15.376		5.0



Слика 35. Kaplan-Meier криви на преживување на пациенти со глијални неоплазми од 4. степен според C3O во зависност од експресијата на имунохистохемиското маркер ATRX.

4.4.7 Преживување во однос на имунохистохемиската експресија на H3K27me

Во групата од 29 пациенти со ниска експресија на маркерот H3K27me починаа 24 (82,76%), во групата од 22 пациенти со средна експресија починаа 16 (72,73%), а во групата од 26 пациенти со висока експресија починаа 25 (96,15%).

Стапката на 24-месечно преживување изнесуваше 17,2%, 27,3% и 3,8%, соодветно во групите со ниска, средна и висока јадрена експресија на H3K27me. Разликата во времето на преживување во зависност од процентот на експресија на имунохистохемискиот маркер H3K27me не беше статистички значајна ($p = 0,25$) (Табела 40).

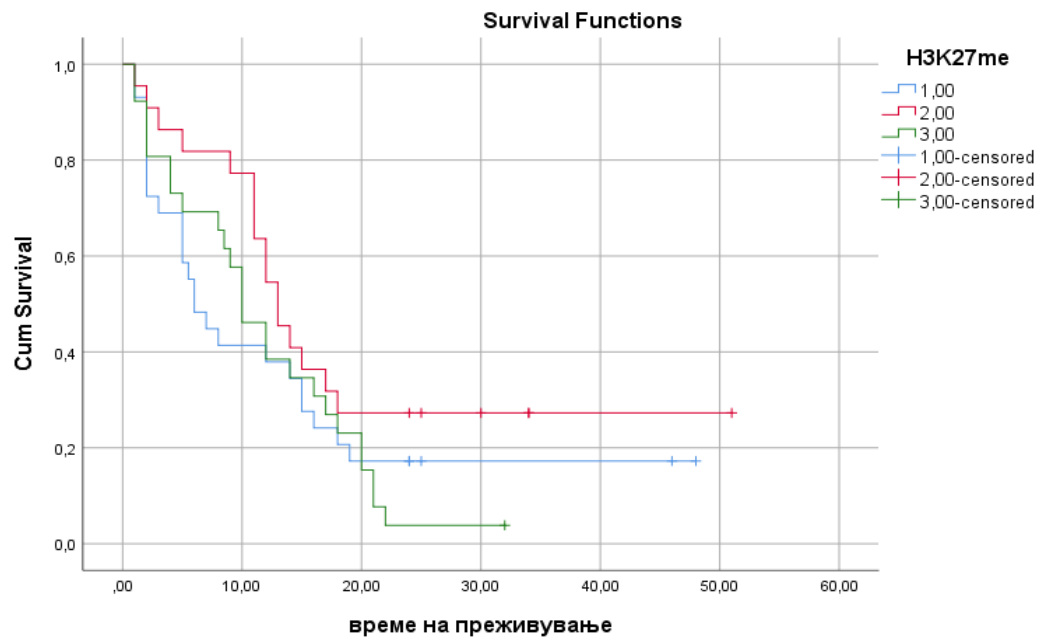
Табела 40. Вкупно време на преживување на пациенти со глијални неоплазми од 4. степен според СЗО според експресија на имунохистохемиски маркер H3K27me.

Процент на јадрена експресија	Вкупно (n)	Починати n (%)	Вкупно време на преживување 24 месеци	
			%	std.Error
Низок	29	24 (82,76)	17,2	0,07
Среден	22	16 (72,73)	27,3	0,095
Висок	26	25 (96,15)	3,8	0,038
N = број на случаи				
LogRank (Mantel-Cox) = 2,769 $p = 0,25$				

Просечното време на преживување во групата пациенти со низок процент на експресија на маркерот H3K27me изнесуваше 14,26 месеци (95% CI = 8,34–20,18), во групата со среден процент изнесуваше 21,05 месеци (95% CI = 13,74–29,26), а во групата со висок процент 11,60 месеци (95% CI = 8,55–14,64). Медијаната на времето на преживување кај пациентите со низок, среден и висок процент на експресија на маркерот H3K27me изнесуваше 6, 13 и 10 месеци, соодветно (Табела 41, Слика 36).

Табела 41. Просечно и медијално време на преживување на пациенти со глијални неоплазми од 4. степен според C3O според експресија на имунохистохемискиот маркер H3K27me.

Mean and Medians for Survival time												
% на јадрена експрес ија	Mean				25.0% percentiles		Median				75.0% percentiles	
	Estimate	Std. Error	95% CI		Estimate	Std. Error	Estimate	Std. Error	95% CI		Estimate	Std. Error
			Lower Bound	Upper Bound					Lower Bound	Upper Bound		
1	14.259	3.022	8.336	20.182	16.0	2.304	6.0	1.345	3.363	8.637	2.0	0.688
2	21.050	3.957	13.744	29.256			13.0	1.401	10.253	15.747	11.0	3.384
3	11.596	1.555	8.548	14.644	18.0	2.148	10.0	1.525	7.011	12.989	4.0	2.262



Слика 36. Kaplan-Meier криви на преживување на пациенти со глијални неоплазми од 4. степен според C3O во зависност од експресијата на имунохистохемискиот маркер H3K27me.

4.4.8 Прогностички фактори за исходот кај пациенти со глијални неоплазми од 4. степен

Со цел да се идентификуваат независните статистички значајни предиктори за исходот кај пациентите со глијални неоплазми од 4. степен според СЗО, беше спроведена Коксова пропорционална регресиона анализа. Анализата ги детерминираше возраста ($p = 0,001$), типот на глиом ($p = 0,002$) и имунохистохемиската експресија на маркерот ATRX ($p = 0,023$) како независни предиктори за преживување. Вредноста на односот на ризик ($HR = 1,059$; 95% CI = 1,025–1,093) за возраста укажува дека со секоја измината година возраст, ризикот од смртен исход се зголемува за 5,9%. Во однос на хистолошкиот тип, пациентите со глиобластом имаат 2,44 пати повисок ризик за смртен исход во споредба со пациентите со астроцитом ($HR = 2,444$; 95% CI = 1,434–4,166). Напроти тоа, експресијата на маркерот ATRX покажа заштитен ефект ($HR = 0,984$; 95% CI = 0,970–0,998), односно секое зголемување на експресијата за 1% е поврзано со намалување на ризикот од смртен исход за 1,6% (Табела 42).

Табела 42. Сох-ова регресиона анализа за преживување на пациенти со глијални неоплазми од 4. степен според СЗО.

	Униварјантна				Мултиварјантна			
Варијабла	Sig.	Exp(B)	95% CI		Sig.	Exp(B)	95% CI	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
Пол	референтна категорија жени							
мажи	0.661	0.895	0.544	1.471				
возраст	0.000	1.072	1.041	1.103	**0.001	1.059	1.025	1.093
Тип	референтна категорија астроцитом							
глиобластом	0.000	2.680	1.597	4.500	**0.002	2.458	1.381	4.375
Волумен	референтна категорија мал							
среден	0.322	0.704	0.352	1.409				
голем	0.980	1.008	0.537	1.894				
OLIG2	0.278	1.004	0.996	1.012				
ATRX	0.014	0.983	0.969	0.996	*0.023	0.984	0.970	0.998
H3K27me	0.893	1.001	0.992	1.01				
MGMT	0.115	0.984	0.964	1.004				

*sig $p < 0.05$; **sig $p < 0.01$

Како независни статистички значајни предиктори за преживувањето кај пациентите со астроцитом од 4. степен според СЗО, Коксовата регресиона анализа ги детерминираше возраста ($p = 0,010$) и експресијата на маркерот ATRX ($p = 0,027$). Вредноста на односот на ризик за возраста ($HR = 1,108$; 95% CI = 1,025–1,199) укажува дека секоја дополнителна година возраст го зголемува ризикот од смртен исход за 10,8%. Од друга страна, маркерот ATRX покажа заштитен ефект ($HR = 0,976$; 95% CI = 0,955–0,997), при што секое зголемување на неговата експресија за 1% е асоцирано со намалување на ризикот од смртен исход за 2,4% (Табела 43).

Табела 43. Сох-ова регресиона анализа за преживување на пациенти со астроцитом од 4. степен според СЗО.

	Униварјантна				Мултиварјантна			
Варијабла	Sig.	Exp(B)	95% CI		Sig.	Exp(B)	95% CI	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
Пол	референтна категорија жени							
мажи	0.878	0.916	0.297	2.823				
возраст	0.007	1.130	1.034	1.236	0.01	1.108	1.025	1.199
OLIG2	0.667	1.005	0.983	1.028				
ATRX	0.015	0.970	0.947	0.994	0.027	0.976	0.955	0.997
H3K27 me	0.217	0.987	0.967	1.008				
MGMT	0.207	1.029	0.984	1.076				

Со Коксовата регресиона анализа беа детерминирани возраста ($p = 0,024$), како и експресијата на маркерите OLIG2 ($p = 0,014$) и ATRX ($p = 0,010$) како статистички значајни предиктори за преживување кај пациентите со глиобластом од 4. степен според СЗО. Секоја измината година возраст е поврзана со зголемување на ризикот од смртен исход за 4,6% ($HR = 1,046$; 95% CI = 1,006–1,087). Повисоката експресија на OLIG2 се покажа како неповолен фактор, каде што секое зголемување од 1% го зголемува ризикот од смртен исход за 2,0% ($HR = 1,020$; 95% CI = 1,004–1,036). Спротивно на тоа, експресијата на ATRX има заштитна улога ($HR = 0,965$; 95% CI = 0,939–0,992), односно со секое зголемување на експресијата за 1%, ризикот од смртен исход се намалува за 3,5% (Табела 44).

Табела 44. Сох-ова регресиона анализа за преживување на пациенти со глиобластом од 4. степен според СЗО.

	Униварјантна				Мултиварјантна			
Варијабла	Sig.	Exp(B)	95% CI		Sig.	Exp(B)	95% CI	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
Пол	референтна категорија жени							
мажи	0.642	1.181	0.586	2.381				
возраст	0.019	1.048	1.008	1.090	0.024	1.046	1.006	1.087
OLIG2	0.011	1.021	1.005	1.037	0.014	1.020	1.004	1.036
ATRX	0.005	0.963	0.937	0.988	0.010	0.965	0.939	0.992
H3K27me	0.631	0.997	0.986	1.008				
MGMT	0.432	0.990	0.964	1.016				

5. Дискусија

Во ова ретроспективно истражување беа анализирани ткивни примероци од 77 адултни пациенти со глијална неоплазма од 4. степен според СЗО, хистоморфолошки дијагностицирани во периодот 2021–2022 година.

Во испитаната кохорта доминираа пациенти од машки пол (61%), со вкупен сооднос мажи : жени од 1,5:1. Поконкретно, глиомите од 4. степен покажаа поголема зачестеност кај мажите со сооднос 2,3:1 во споредба со жените, што целосно се совпаѓа со глобалните епидемиолошки податоци. Највисока инциденца беше регистрирана во возрасната група од 60–69 години, а најниска во групата од 30–39 години, со што се потврдува предилекцијата на високостепените глиоми кон постарата популација. Во согласност со официјалните податоци на **CBTRUS** [192] и сознанијата на **Fan et al. (2022)** [14] за поврзаноста на IDH-див тип глиобластомите со постарата возраст, нашето истражување покажа идентична дистрибуција, при што 50% од пациентите беа постари од 65 години. Спротивно на ова, научната литература и клиничката пракса потврдуваат дека IDH-мутираните астроцитомите се карактеристични за значително помлада популација [26, 74].

Анализата на анатомската дистрибуција во нашата серија случаи укажа на примарно супратенторијална локализација, со речиси рамномерна застапеност меѓу левата и десната церебрална хемисфера. И покрај тоа, беа регистрирани благи регионални варијации, изразени преку деснострани фронтална доминација и левострана темпорална предилекција. Овие резултати се во согласност со наодите на **Ceccarelli et al. (2016)** [118], кои преку панглиомско профилирање на податоците од TCGA [118, 120] покажаа дека дифузните глиоми немаат апсолутна анатомска рестрикција, туку манифестираат суптилни топографски афинитети поврзани со специфични прогениторни клеточни ниши уште од ембрионалниот развој. Совпаѓањето на нашите резултати со податоците од литературата ја потврдува хипотезата дека лобарната локализација на овие тумори не е случајна, туку е детерминирана од биолошките карактеристики и развојниот профил на мозочниот паренхим.

Класификацијата на нашата кохорта според IDH-мутацискиот статус покажа дека 62% од случаите припаѓаат во групата со глиобластом, IDH-див тип, додека останатите 38% се во групата со астроцитом, IDH-мутиран. Овој процес на молекуларно прецизирање и рекласификација на кохортата е во целосен консензус со насоките поставени во препораките на **cIMPACT-NOW (Update 5 и Update 6)** [3, 4], предводени од **Louis, Brat и соработниците**, кои нагласуваат дека потпирањето исклучиво на хистоморфологијата, без молекуларно профилирање на туморот, носи ризик од погрешна дијагноза и неоправдано спојување на два биолошки и клинички различни ентитета [4, 50].

Во однос на демографските и клиничките карактеристики, пациентите со астроцитом покажаа значително пониска просечна возраст ($56,4 \pm 8,9$ години) во споредба со пациентите со глиобластом ($63,1 \pm 9,2$ години), како и речиси двојно повисока фреквенција на рецидиви и последователни реоперации (67% во споредба со 34%). Ваквиот наод е директна последица на подолгото преживување карактеристично за IDH-мутираните неоплазми, што овозможува подолг временски прозорец за сукцесивни неврохируршки интервенции. Рекурентните манифестации беа најзастапени во петтата животна деценија, при што беше утврдена обратно пропорционална корелација меѓу фреквенцијата на хируршките интервенции и возраста на пациентите. Овие резултати во целост се совпаѓаат со податоците од литературата, потврдувајќи дека помладата возраст и подобриот перформанс-статус се клучни детерминанти кои овозможуваат поагресивен хируршки третман и реоперативен менаџмент кај високостепените глиоми.

Иако имунохистохемската анализа во нашето истражување беше основниот начин за одредување на IDH1 и IDH2 мутациите, кај 28,57% од случаите ($n = 22$) се соочивме со нејасна и двосмислена експресија на имунохистохемскиот сигнал. Ваквата стапка на дијагностичка несигурност ја потврдува тезата дека визуелизацијата на антигенот бара критичка проценка. Како што аргументираат **Appin и Brat (2014)**, ефикасноста на имунохистохемскиот маркер за IDH1 може да биде компромитирана од различни фактори, како што се обработката на ткивото, дебелината на ткивните пресеци или туморската некроза, што автоматски го наметнува молекуларното тестирање како следен логичен чекор [29, 45]. За да се надмине ова ограничување, во ова истражување беа имплементирани препораките

на **Mirchia и Richardson (2020)** [6] за задолжително молекуларно тестирање на секој случај со неодредливи имунохистохемиски резултати. Овој пристап во нашата студија се покажа како целосно оправдан и во согласност со светската литература, акцентирајќи го фактот дека суптилните и технички несовршените ИНС боења мора рутински да се верификуваат со помош на молекуларни методи за да се обезбеди апсолутна дијагностичка прецизност.

Имунохистохемискиот профил заедно со молекуларните анализи открија неколку клучни наоди:

- Униформно низок или отсутен MGMT протеин корелира со подобра чувствителност на алкилирачкиот агенс темозоломид. MGMT метилациски статус со молекуларна анализа MLPA беше изработен за случаите со неодредливи IDH1/2 имунохистохемиски резултат, односно кај 26% од случаите, додека хиперметилација на генот беше потврдена кај 5% од пациентите.
- Имунохистохемискиот маркер ATRX покажа загуба на јадрена имунохистохемиска експресија во мал процент од случаите, но токму овој параметар се потврди како независен заштитен фактор; секое зголемување на експресијата за 1% го намали ризикот за смрт за 1,6–3,5%. Кога овие податоци ги вкрстивме во мултиваријантниот математички модел на Cox, имунохистохемиската експресија на ATRX се покажа како еден од најсилните независни заштитни фактори за преживување на целата кохорта. Од биолошка гледна точка, ова ја поддржува тезата на **Han et al. (2020)** [5] дека дефектите во продолжувањето на теломерите (ALT-фенотип; ALT-alternative of lengthening telomeres) кои се директна последица на губењето на ATRX, доведуваат до поагресивен клеточен циклус само доколку се во комбинација со други специфички ко-мутации. [98, 136]
- Имунохистохемискиот маркер H3K27me имаше варијабилна позитивна имунохистохемиска експресија, без значајна прогностичка вредност. Иако студиите на **Mirchia и Richardson** [6] сугерираат дека епигенетското репрограмирање преку триметилацијата на хистоните е клучен настан кај педијатриските и некои адултни дифузни глиоми, во нашата студија овој маркер веројатно останува под влијание на доминантните генетски патишта.

Во однос на применетиот онколошки третман, вкупно 75% од пациентите беа третирани со некаква онколошка модалитетна терапија. Стандардниот адјувантен протокол со темозоломид (150 mg/m^2 за време од 5 дена во 28-дневен циклус) беше аплициран кај 64% од сите испитаници, при што беше застапен со поголема фреквенција кај пациентите со глиобластом отколку кај оние со астроцитом (52% наспроти 15%). Бројот на спроведени циклуси (опсег: 1–21; медијана = 6 циклуси) покажа правопрпорционална корелација со должината на преживувањето, потврдувајќи го суштинското значење на континуираниот терапевтски континуитет. Антиангиоген третман беше применет кај 9% од пациентите, а хемотерапевтски протокол од втора линија беше администриран единствено кај еден пациент ($n = 1$).

Кумулативните податоци од кривите на преживување го нагласуваат силното влијание на возраста и специфичниот туморски тип според класификацијата на СЗО. Пациентите на возраст < 55 години остварија медијално преживување од 24,9 месеци, возрасната група од 55 до 65 години имаше медијално преживување од 15,7 месеци, додека пациентите ≥ 65 години преживуваа медијално 7,7 месеци. Слично на ова, астроцитомите покажаа повеќе од двојно подолго медијално преживување во споредба со глиобластомите (23,4 наспроти 10,0 месеци), со стапка на 24-месечно преживување од 27% кај астроцитомите наспроти само 7% кај глиобластомите.

При споредба на нашите резултати со релевантните глобални податоци, се евидентира значителна дивергенција во стапката на преживување кај испитаниците со глиобластом, чиеш медијално време отстапува од етаблираниот стандард од 14,60 месеци дефиниран од страна на **Stupp et al. (2005)** [55]. Ваквата дискрепанца наоѓа цврсто научно и клиничко оправдување преку неколку клучни фактори во оваа студија. Првенствено, наместо строго контролиран и идеализиран примерок својствен за клиничките испитувања, нашата кохорта ја рефлектира автентичната клиничка пракса во која дури 48,05% од пациентите ($n = 37$) беа третирани во фаза на рекурентна болест, често со историја на повеќекратни хируршки ресекции (при што кај одредени пациенти беа изведени и до четири неврохируршки интервенции). Од друга страна, онколошките податоци покажаа дека 49 од вкупно 77 пациенти (63,64%) ја примиле предвидената адјувантна хемотерапија со темозоломид, додека

кај де ново дијагностицираните глиобластоми тој удел изнесуваше 52,27%. Овој дефицит во онколошкиот протокол, кој вообичаено е последица на нискиот перформанс-статус или присуството на коморбидитети, е примарна детерминанта за понеповолните исходи кај пациентите од ова истражување. Оваа констатација кореспондира со заклучоците на **Johnson и O'Neill (2012)** [196], кои преку анализа на реални популациски регистри надвор од клинички студии, забележуваат драстичен пад на преживувањето кај високостепените глиоми во околности каде што комплетниот хеморадиотерапевтски режим е оневозможен поради брза прогресија или напредната возраст на пациентите [72].

Прогностичката вредност на испитуваните параметри беше дефинитивно евалуирана со помош на Коксовиот модел на пропорционални ризици, кој овозможи детерминирање на независните предиктори за преживување. Во овој контекст, возраста се потврди како конзистентен негативен прогностички показател, со сооднос на ризикот (HR) од 1,059 за целата кохорта, што означува зголемување на ризикот од смртен исход за 5,9% за секоја дополнителна година од животот. Овој негативен тренд беше уште поизразен кај пациентите со *IDH*-мутиран астроцитом, каде што годишното зголемување на ризикот изнесуваше 10,8%. Овие резултати се во целосна согласност со валидираните прогностички модели на **EORTC/NCIC** [54, 55], кои ја дефинираат возраста како најсилен клинички прогностички биомаркер во невроонкологијата. Сепак, најголема прогностичка тежина во мултиваријантниот модел покажа самиот хистолошки ентитет: дијагнозата глиобластом беше асоцирана со 2,444 пати повисок ризик од смрт во споредба со астроцитомите од соодветен степен. Овој наод претставува значајна потврда на актуелните препораки на **EANO** [51, 73, 79] и водичот **SEOM-GEINO** (2023) [197], кои истакнуваат дека молекуларниот профил диктиран од *IDH*-статусот го детерминира агресивниот биолошки фенотип, надминувајќи ги традиционалните морфолошки параметри како митотската активност и микроваскуларната пролиферација. На крајот, кај групата со *IDH*-мутиран астроцитом од висок степен, беше забележано дека секое зголемување на експресијата на OLIG2 за 1% резултира со зголемување на ризикот за 2% (HR = 1,020). Иако OLIG2 традиционално се смета за олигодендроглијален маркер на подобра диференцијација, современите податоци од дигиталната клеточна

фенотипизација укажуваат дека неговата висока експресија во слабо диференцирани ниши — особено кај гигантскоклеточните варијанти — одразува присуство на резистентни субклонови на туморски матични клетки [42, 43, 44].

Нашите наоди го поткрепуваат актуелниот консензус дека интегрираниот дијагностички пристап — кој ги комбинира хистоморфологијата, имунохистохемскиот профил и молекуларните анализи — е незаменлив за прецизна стратификација на пациентите. Во овој контекст, ATRX се издвојува како пристапен, репродукцибилен и високоинформативен биомаркер чија имплементација во рутинскиот имунохистохемски панел е од суштинско значење. Со оглед на тоа што протеинот ATRX е подложен на брза ткивна деградација под влијание на исхемичен/хипоксичен стрес, неговата интерпретација бара анализа на добро фиксирани регии со сочувана туморска виталност и отсуство на опсежна некроза. Загубата на нуклеарната експресија на ATRX поседува висока дијагностичка специфичност за IDH-мутираните астроцитомите, иако во литературата е опишан и низок процент на аберантно губење на овој маркер кај глиобластомите од IDH-див тип, каде што истото се интерпретира како негативен прогностички показател [11, 37, 56].

Дополнително, високата фреквенција на неконклузивен IDH1 имунохистохемски статус (28%) ја нагласува потребата од рутинско и систематско молекуларно профилирање (секвенционирање), со цел да се избегне погрешна класификација согласно актуелната класификација на СЗО за тумори на централниот нервен систем од 2021 година. За неврохирурзите и невроонколозите, податоците кои укажуваат на поповолна прогноза кај помладите пациенти и кај оние со IDH-мутиран астроцитом од 4. степен според СЗО, можат да оправдаат имплементација на поагресивни и мултимодални терапевтски стратегии, вклучувајќи и повторни хируршки ресекции. Наспроти ова, кај повозрасната популација акцентот треба да биде ставен врз зачувување на квалитетот на животот и внимателно балансирање на терапевтската токсичност.

Интерпретацијата на презентираниите резултати налага нивно согледување низ призмата на специфичните биолошки и технички ограничувања што ја карактеризираат невроонколошката пракса. Првенствено, астроцитомите од СЗО

степен 2 и 3 често се дијагностицираат во понапредна фаза поради нивната индолентна почетна симптоматологија, додека нивниот дифузно-инфилтративен раст ретко дозволува радикална хируршка ресекција. Од патохистолошки аспект, дополнителен лимитирачки фактор претставува оскудноста на туморскиот биоптичен материјал и присуството на екстензивни некротични зони, кои покрај микроскопската дијагностика, можат значајно да ја компромитираат и антигенската зачуваност на ткивото. Ваквите услови наметнаа ригорозна тријажа на парафинските блокови со цел елиминација на технички некондеktivни или лажно негативни имунохистохемиски и молекуларни анализи. Ваквите биолошки предизвици имаа директен одраз и врз клиничкото водење на пациентите; оттука, одреден удел од испитаниците со глиобластом не беа во можност да примат адјувантен онколошки третман поради брза постоперативна прогресија или рана смртност. Оваа реална клиничка слика беше евидентирана и кај три случаи со IDH-мутиран астроцитом од СЗО 4. степен, кај кои онколошкиот третман беше изоставен поради критично влошен перформанс-статус, тежок постоперативен невролошки дефицит или одлука на пациентите за исклучив палијативен третман.

Конечно, возраста се издвојува како критичен прогностички модератор во клиничкиот тек на болеста. Кај испитаниците над 50-годишна возраст, каде што се бележи и највисока инциденца, присуството на пратечки коморбидитети значајно ги ограничува функционалните компензаторни капацитети на организмот. Со цел редукција на терапевтската токсичност кај оваа фрагилна категорија пациенти, клиничарите често подразбираат апликација на прилагодени, хипофракционирани зрачни протоколи. Ваквиот деескалиран терапевтски пристап е одраз на намалената соматска толеранција на геријатриската популација, што дополнително ја објаснува асоцијацијата помеѓу напреднатата возраст и попонеповолните стапки на вкупно преживување.

6. Заклучоци

1. Анализата на епидемиолошките и биостатистичките параметри кај испитаниците во двегодишниот период (2021 и 2022 година) покажа хетероген демографски профил на пациентите. Глијалните тумори од 4. степен според СЗО се јавуваа почесто кај мажите, додека дистрибуцијата според возрасната граница покажа дека овие тумори се почести кај лицата во напредна и повозрасна животна доба. Во однос на анатомската позиција, туморите речиси подеднакво се јавуваат во двете церебрални хемисфери, додека зафаќањето на инфратенторијалниот простор или на длабоките мозочни структури претставува редок наод во клиничката пракса. Првичните согледувања за кохортата јасно го потенцираа суровиот клинички развој на болеста, чии главни одлики се намалениот просечен животен век и нискиот процент на пациенти со долгорочен поволен исход, што ја наметнува потребата од брза и точна дијагностичка селекција.

2. Воведувањето на имунохистохемскиот панел од маркерите IDH1, IDH2, OLIG2, ATRX, H3K27me и MGMT се покажа како супериорен метод за надминување на дијагностичките празнини кои ги остава класичната хистоморфолошка анализа на ткивата. Преку визуелизација на цитоплазматскиот и јадрениот сигнал на овие маркери се овозможи успешно разграничување на специфичните клеточни линии кај високостепените глиоми. Имплементацијата на ваквата прволиниска имунохистохемска скрининг-селекција се наметнува како задолжителен стандард во современата невропатологија, бидејќи претставува брз, репродуцибилен и економски оправдан модел за класифицирање.

3. Процената на мутацискиот статус на IDH1 и IDH2 откри дека иако најголемиот дел од ткивата покажаа недвосмислена позитивна имунохистохемска цитоплазматска експресија, кај одреден број случаи имунохистохемскиот профил остана неодреден, технички нејасен или двосмислен. Ваквите наоди ги потврдуваат лимитите на имунохистохемијата, чија прецизност често зависи од фиксацијата на

материјалот или видот на мутацијата. Ова јасно укажува во кои случаи е задолжително да се премине кон молекуларно тестирање.

4. Со користење на молекуларната метода MLPA успешно се надминаа дијагностичките сомнежи кај случаите со неконклузивна имунохистохемиска експресија, со што се дефинираше *IDH*-мутацискиот статус на испитуваните неоплазми. Анализата на метилацискиот статус овозможи длабок преглед на клучните епигенетски алтерации кои дадоа одговори за начинот на кој туморот реагира на применетите онколошки протоколи. Овие согледувања недвосмислено ја потврдуваат потребата од надградба на стандардниот скрининг со *IDH1* и *IDH2* маркерите преку рутинско и рефлексно молекуларно тестирање на *IDH*-мутацискиот статус, што се наметнува како клучен услов за постигнување на дефинитивна интегрирана дијагноза усогласена со препораките на СЗО од 2021 година.

5. Преку интегрирање на податоците добиени од микроскопската, имунохистохемиската и молекуларната анализа, извршена е рекласификација на туморите, која е надвор од дотогашните класификациски рамки. Првично воспоставената хистоморфолошка дијагноза на глиобластом беше поделена на два автономни биолошки ентитета: астроцитом со *IDH* мутација и глиобластом без *IDH* мутација, односно див тип и двата со 4. степен според СЗО. Ова откривање покажува дека голем дел од возрасните пациенти со глијален тумор од 4. степен всушност имаат секундарни астроцитоми, кои имаат значително подобра прогноза, што го менува начинот на кој лекарите во нашата средина го планираат онколошкиот третман и ја проценуваат прогнозата на пациентот.

6. Компаративната анализа на добиените резултати откри статистички значајни отстапувања кои во целост ја потврдуваат оправданоста на ваквата биолошка сегрегација на туморите. Во однос на возрасната граница, евидентно е дека пациентите кај кои е дијагностициран астроцитом се карактеризираат со значително помлада животна доба, додека глиобластомот почесто се јавува кај

највозрасните категории, при што студијата ја потврди клучната улога на границата од 55 години како статистички релевантен фактор за должината на преживувањето. Понатаму, беше забележан и специфичен анатомски афинитет на неоплазмите, при што одредени мозочни региони, пред сè фронтотопариеталните и изолираните париеални регии се покажаа како значајно поподложни за развој на астроцитомите. Овие два туморски ентитета покажуваат драстични разлики и во поглед на нивната клиничка еволуција. Стапката на рецидиви е повисока кај астроцитомите, а интересен е наодот што оваа стапка покажува негативна корелација со возраста на испитаниците, што јасно укажува дека помладите пациенти всушност се соочуваат со рекурентна болест. Ваквите разлики директно се рефлектираат и врз онколошкиот третман, со што кај пациентите со астроцитом постои далеку поголема веројатност за спроведување на сеопфатен онколошки третман кој вклучува и антиангиогена терапија. И покрај големите разлики, напредната старост на пациентот сепак се потврди како универзален и неповолен детерминант за должината на животот кај двете испитувани групи на тумори.

7. Преку завршната статистичка анализа (мултиваријантно моделирање), точно го утврдивме значењето на секој фактор поединечно за прогнозата на болеста кај сите пациенти. Главните наоди покажаа дека имунохистохемискиот маркер ATRX има најмоќна улога и најдобро помага да се предвиди текот на болеста и одговорот на терапијата во овој панел. Од аспект на целата кохорта, напредната возраст на пациентот и дијагнозата на глиобластом се покажаа како двата најсилни фактори кои драстично го зголемуваат ризикот од смртен исход. Спротивно на нив, кога одредени супресорски маркери, како H3K27me ја имаат зачувано јадрената експресија, тие делуваат заштитнички, односно колку е повисок процентот на експресија, толку повеќе се намалува ризикот од фатален исход. Кај групата со астроцитомите, возраста и зачуваниот јадрен позитивен сигнал H3K27me се единствените два независни фактори кои го предвидуваат исходот. Од друга страна, кај глиобластомите, покрај возраста и заштитниот маркер H3K27me, беа детектирани и специфични линеарни параметри како MGMT, каде со секое зголемување на неговата експресија, правопрпорционално и прогресивно расте ризикот од смрт кај пациентите.

Како генерален заклучок, оваа докторска дисертација поставува нови стандарди во менаџментот на најагресивните глијални неоплазми кај возрасната популација во нашата земја, со тоа што ја издигнува дијагностиката од класична хистоморфолошка во молекуларно-патолошка класификација. Имплементацијата на дефинираниот алгоритам на имунохистохемиски маркери овозможува супериорна точност во работата, дури и во средини со ограничен буџет. Овој пристап овозможува брзо и сигурно класифицирање на пациентите, со што се овозможува онколошкиот третман да биде приспособен и персонализиран за секој пациент поединечно во современата невроонкологија.

7. Литература

1. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Central nervous system tumours. 5th ed. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2021. Available from: <https://publications.iarc.fr/601>
2. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, editors. WHO classification of tumours of the central nervous system. Revised 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2016.
3. Brat DJ, Aldape K, Colman H, Figarella-Branger D, Fuller GN, Giannini C, et al. cIMPACT-NOW update 5: recommended grading criteria and terminologies for *IDH*-mutant astrocytomas. *Acta Neuropathol*. 2020;139(3):603–8.
4. Louis DN, Wesseling P, Aldape K, Brat DJ, Capper D, Cree IA, et al. cIMPACT-NOW update 6: new entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading. *Brain Pathol*. 2020;30(6):844–56.
5. Han S, Liu Y, Cai JS, Qian M, Ding J, Larion M, et al. *IDH* mutation in glioma: molecular mechanism and potential therapeutic targets. *Br J Cancer*. 2020;122:1580–9.
6. Mirchia K, Richardson ET. Beyond *IDH*-mutation: Emerging molecular diagnostic and prognostic features in adult diffuse gliomas. *Cancers (Basel)*. 2020;12(7):1817.
7. Hartmann C, Hentschel B, Simon M, et al. Long-term survival in primary glioblastoma with versus without isocitrate dehydrogenase mutations. *Clin Cancer Res*. 2013;19(18):5146–57.
8. Hol ME, Pekny M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr Opin Cell Biol*. 2015;32:121–30.
9. Ostrom QT, Gittleman H, Stetson L, Virk SM, Barnholtz-Sloan JS. Epidemiology of gliomas. *Cancer Treatment and Research [Internet]*. 2015;163:1–14.
10. de Vries NA, Hulsman D, Akhtar W, et al. Prolonged Ezh2 depletion in glioblastoma causes a robust switch in cell fate resulting in tumor progression. *Cell Rep*. 2015;10(3):383–97.

11. Ohba S, Kuwahara K, Yamada S, Abe M, Hirose Y. Correlation between *IDH*, *ATRX*, and *TERT* promoter mutation in glioma. *Brain Tumor Pathol.* 2020.
12. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.* 2010;28(10):1057–68.
13. Bell JS, Koffie RM, Rattani A, Dewan MC, Baticulon RE, Qureshi MM, et al. Global incidence of brain and spinal tumours by geographic region and income level based on cancer registry data. *J Clin Neurosci.* 2019;66:121–7.
14. Fan Y, Zhang X, Gao C, Jiang S, Wu H, Liu Z, et al. Burden and trends of brain and central nervous system cancer from 1990 to 2019 at the global, regional, and country levels. *Arch Public Health.* 2022;80(1):209.
15. Salari N, Ghasemi H, Fatahian R, Mansouri K, Dokaneheifard S, Shiri MH, et al. The global prevalence of primary central nervous system tumours: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Med Res.* 2023;28(1):39.
16. Olar A, Wani KM, Alfaro-Munoz KD, Heathcock LE, van Thuijl HF, Gilbert MR, et al. *IDH* mutation status and role of WHO grade and mitotic index in overall survival in grade II–III diffuse gliomas. *Acta Neuropathol.* 2015;129(4):585–96.
17. Sipe JC, Herman MM, Rubinstein LJ. Electron microscopic observations on human glioblastomas and astrocytomas maintained in organ culture systems. *Am J Pathol.* 1973;73(3):589–606.
18. Chen J, McKay RM, Parada LF. Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models, and stem cells. *Cell.* 2012;149(1):36–47.
19. Rubinstein LJ, Herman MM, Foley VL. In vitro characteristics of human glioblastomas maintained in organ culture. *Am J Pathol.* 1973;71:61–80
20. Gullotta F, Flidner E. Glioblastomas, astrocytomas: ultrastructural, tissue culture and enzyme histochemical investigations. *Acta Neuropathol.* 1972;22:68–78.
21. Peters A, Palay SL, Webster HD. The fine structure of the nervous system. New York: Harper and Row, Publishers, Inc; 1970.
22. Ponten J, Macintyre EH. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1968;74:465–8.
23. Komori T. Updating the grading criteria for adult diffuse gliomas: beyond the WHO2016 CNS classification. *Brain Tumor Pathol.* 2020;37:1–4.

24. Shapiro WR, Ausman JI, Rall DP. Studies on the chemotherapy of experimental brain tumors: evaluation of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, cyclophosphamide, mithramycin, and methotrexate. *Cancer Res.* 1970;30:2401–13.
25. Venteicher AS, Tirosh I, Hebert C, Yizhak K, Neftel C, Filbin MG, et al. Decoupling genetics, lineages, and microenvironment in *IDH*-mutant gliomas by single-cell RNA-seq. *Science.* 2017;355(6332).
26. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2013;19(4):764–72.
27. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med.* 2008;359(5):492–507.
28. Gilbert MR, Wang M, Aldape KD, Stupp R, Hegi ME. Current treatment paradigms for glioblastoma. *Annu Rev Med.* 2013;64:135–52.
29. Appin CL, Brat DJ. Molecular genetics of gliomas. *Cancer J.* 2014;20(1):66–72
30. Wick W, Weller M, van den Bent M, Sanson M, Weiler M, von Deimling A, et al. MGMT testing—the challenges for biomarker-based glioma treatment. *Nat Rev Neurol.* 2017;13(6):372–85.
31. Han SJ, Yang I, Tihan T, Chang SM, Parsa AT. Secondary glioblastomas: molecular insights and clinical perspectives. *Neurosurgery.* 2010;66(1):121–30.
32. Nakada M, Kita D, Watanabe T, Hayashi Y, Teng L, Pyko IV, et al. Aberrant signaling pathways in glioma. *Cancers (Basel).* 2011;3(3):3242–78.
33. Smith JA, Johnson LE. The role of MGMT antibodies in predicting therapeutic response to alkylating agents. *J Mol Oncol.* 2020;15(3):127–42.
34. Brown MS, Anderson RK, Williams CJ. Monoclonal MGMT antibodies for targeted therapy in glioblastoma multiforme. *Cancer Immunother Rep.* 2018;6(2):78–92.
35. Patel SV, Miller AB, Garcia FJ. Advancements in MGMT antibody conjugates for improved drug delivery in chemotherapy. *Biochem Pharmacol Insights.* 2017;10:35–48.
36. Thompson LK, Martinez PQ, Collins RW. Diagnostic applications of MGMT antibodies in personalized cancer medicine. *Clin Biomark Oncol.* 2021;8(4):211–25.
37. Haberler C, Wöhrer A. Clinical neuropathology practice news 2-2014: ATRX, a new candidate biomarker in gliomas. *Clin Neuropathol.* 2014;33(2):108–11.

38. Noh KM, Maze I, Zhao D, Xiang B, Wenderski W, Lewis PW, et al. ATRX tolerates activity-dependent histone H3 methyl/phos switching to maintain repetitive element silencing in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(22):6820–7.
39. De La Fuente R, Viveiros MM, Wigglesworth K, Eppig JJ. ATRX, a member of the SNF2 family of helicase/ATPases, is required for chromosome alignment and meiotic spindle organization in metaphase II stage mouse oocytes. *Dev Biol*. 2004;272(1):1–14
40. Day CA, Hinchcliffe EH, Robinson JP. H3K27me3 in diffuse midline glioma and epithelial ovarian cancer: opposing epigenetic changes leading to the same poor outcomes. *Cells*. 2022;11(21):3376.
41. Mai J, Gu J, Liu Y, Liu X, Sai K, Chen Z, et al. Negative regulation of miR-1275 by H3K27me3 is critical for glial induction of glioblastoma cells. *Mol Oncol*. 2019;13(7):1589–604.
42. Bouchart C, Trépant AL, Hein M, Van Gestel D, Demetter P. Prognostic impact of glioblastoma stem cell markers OLIG2 and CCND2. *Cancer Med*. 2020;9(3):1069–78.
43. Ohnishi A, Sawa H, Tsuda M, Sawamura Y, Itoh T, Iwasaki Y, et al. Expression of the oligodendroglial lineage-associated markers Olig1 and Olig2 in different types of human gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003;62(10):1052–9.
44. Singh SK, Fiorelli R, Kupp R, Rajan S, Szeto E, Lo Cascio C, et al. Post-translational modifications of OLIG2 regulate glioma invasion through the TGF- β pathway. *Cell Rep*. 2016;16(4):950–66.
45. Gondim DD, Gener MA, Curless KL, Cohen-Gadol AA, Hattab EM, Cheng L. Determining *IDH*-mutational status in gliomas using *IDH1*-R132H antibody and polymerase chain reaction. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2019;27(10):722–5.
46. Capper D, Sahm F, Hartmann C, Meyermann R, von Deimling A, Schittenhelm J. Application of mutant IDH1 antibody to differentiate diffuse glioma from nonneoplastic central nervous system lesions and therapy-induced changes. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(8):1199–204.

47. Radoul M, Hong D, Gillespie AM, Najac C, Viswanath P, Pieper RO, et al. Early noninvasive metabolic biomarkers of mutant *IDH* inhibition in glioma. *Metabolites*. 2021;11(2):109.
48. Röhrich M, Loktev A, Wefers AK, Altmann A, Paech D, Adeberg S, et al. *IDH*-wildtype glioblastomas and grade III/IV *IDH*-mutant gliomas show elevated tracer uptake in fibroblast activation protein-specific PET/CT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2019;46(12):2569–80.
49. Wong QH, Li KK, Wang WW, Malta TM, Noushmehr H, Grabovska Y, et al. Molecular landscape of *IDH*-mutant primary astrocytoma Grade IV/glioblastomas. *Mod Pathol*. 2021;34(7):1245–60
50. Louis DN, Perry A, Wesseling P, et al. The 2021 WHO classification of tumours of the central nervous system: a summary. *Neuro-Oncology*. 2021;23(8):1231–51.
51. Weller M, van den Bent MJ, Hopkins K, et al. EANO guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Lancet Oncol*. 2021;22(10):e395–e408.
52. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in *PDGFRA*, *IDH1*, *EGFR*, and *NF1*. *Cancer Cell*. 2010;17(1):98–110.
53. Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, et al. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell*. 2010;17(5):510–22.
54. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):997–1003.
55. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):987–96.
56. Patel A, Priester M, Reeves C, et al. ATRX mutations in glioma: clinical prognostic implications. *J Neurol Sci*. 2019;400:18–24.
57. Bedics G, Szőke P, Bátaí B, et al. Novel, clinically relevant genomic patterns identified by comprehensive genomic profiling in ATRX-deficient *IDH*-wildtype adult high-grade gliomas. *Sci Rep*. 2023;13:18436

58. Chung CYC, Pigott LE. Predicting *IDH* and *ATRX* mutations in gliomas from radiomic features: systematic review and meta-analysis. *Front Radiol.* 2024;4:1493824.
59. Rodriguez FA, Demirezen A, Erbaş O. Glioblastoma multiforme: subtypes based on *IDH*, *ATRX*, *H3F3A*, *MGMT* and *p53* mutations. *D J Med Sci.* 2024;10(1):34–41.
60. Rodriguez DB, d’Amati A, Bargiacchi L, et al. Pediatric CNS tumors and 2021 WHO classification: what do oncologists need from pathologists? *Front Mol Neurosci.* 2024;17:1268038
61. Yu R, Huang K, He X, Zhang J, Ma Y, Liu H. *ATRX* mutation modifies the DNA damage response in glioblastoma multiforme tumor cells and enhances patient prognosis. *Medicine.* 2025 Jan 10;104(2):e41180–0
62. Van, Ramos RC, Mason WP, Andreas von Deimling, Maas N. Opinion & Special Article: Glioma Classification. *Neurology.* 2022 Nov 15;99(20):903–8.
63. Osborn AG, Louis DN, Poussaint TY, Linscott LL, Salzman KL. The 2021 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: What Neuroradiologists Need to Know. *American Journal of Neuroradiology.* 2022 Jun 16;
64. Comino-Méndez I, Tejera ÁM, Currás-Freixes M, Remacha L, Gonzalvo P, Tonda R, et al. *ATRX* driver mutation in a composite malignant pheochromocytoma. *Cancer genetics [Internet].* 2016 Jun;209(6):272–7
65. Haase S, Garcia-Fabiani MB, Carney S, Altshuler D, Núñez FJ, Méndez FM, et al. Mutant *ATRX*: uncovering a new therapeutic target for glioma. Expert opinion on therapeutic targets [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2022 Apr 25];22(7):599–613
66. Asmae Squalli Houssaini, Salma Lamrabet, Senhaji N, Sekal M, Nshizirungu JP, Hajar Mahfoudi, et al. Prognostic Value of *ATRX* and *p53* Status in High-Grade Glioma Patients in Morocco. *Cureus.* 2024 Mar 18
67. Sanai N, Polley MY, McDermott MW, Berger MS. An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas. *J Neurosurg.* 2011;115(1):3–8. This study showed that $\geq 78\%$ resection correlated with survival benefit.
68. Duffau H. Maximal safe resection of diffuse low-grade gliomas: the value of intraoperative electrical mapping. *Acta Neurochir (Wien).* 2012;154(4):569–79.

69. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, et al; ALA-Glioma Study Group. Fluorescence-guided surgery with 5-ALA for resection of malignant glioma: a randomized controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol*. 2006;7(5):392–401.
70. Johnson DR, Galanis E. Incorporation of molecular profiling into glioma clinical trials. *Curr Oncol Rep*. 2013;15(1):59–66.
71. Gilbert MR, Wang M, Aldape KD, et al. Dose-dense temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: a phase III trial of RTOG 0525. *J Clin Oncol*. 2013;31(32):4085–91.
72. Minniti G, Amelio D, Amichetti M. Radiotherapy plus temozolomide for high-grade glioma in the elderly. *Curr Oncol Rep*. 2011;13(4):306–12.
73. Weller M, van den Bent MJ, Preusser M, et al. EANO guidelines on glioma: diagnosis and treatment. *Lancet Oncol*. 2014;15(9):e395–408.
74. Miller JJ, Shih HA, Andronesi OC, Cahill DP. Isocitrate dehydrogenase-mutant glioma: evolving clinical and therapeutic implications. *Cancer*. 2017;123(23):4535–46.
75. Lapointe S, Perry A, Butowski NA. Primary brain tumours in adults. *Lancet*. 2018;392(10145):432–46.
76. Weller M, Cloughesy T, Perry JR, Wick W. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma – are we there yet? *Neuro Oncol*. 2013;15(1):4–27
77. Sanai N, Berger MS. Surgical oncology for gliomas: the state of the art. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(2):112–25.
78. Carpentier A, McNichols RJ, Stafford RJ, et al. Laser thermal therapy: real-time MRI-guided surgery for brain tumors. *Neuro Oncol*. 2012;14(3):346–55.
79. Weller M, van den Bent MJ, Tonn JC, et al. EANO guideline on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Lancet Oncol*. 2021;22(12):e166–e180.
80. Lacroix M, Abi-Sadat H, Viens L, et al. Extent of surgical resection influences outcome in patients with glioblastoma: survival analysis of 270 consecutive patients. *J Neurosurg*. 2001;95(2):190–8.
81. Lutterbach J, Nagele T, Rossner M, et al. Oligodendrogliomas: long-term experience in 70 adult patients—prognostic factors and survival analysis. *J Neurosurg*. 2002;97(5):949–58.

82. Ramakrishna R, Stewart DJ, Magliocco AM, et al. Early postoperative radiation therapy improves survival compared with delayed irradiation after biopsy in glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001;51(4):998–1003.
83. Perry JR, Laperriere N, O’Callaghan CJ, et al. Short-course radiotherapy plus temozolomide in elderly patients with glioblastoma (NOA-08): a randomised, open-label, phase III trial. *Lancet Oncol*. 2012;13(6):733–42.
84. Roa W, Kepka L, Kumar N, et al. International Atomic Energy Agency randomized study of the hypofractionated radiation regimen in elderly patients with glioblastoma. *J Clin Oncol*. 2015;33(35):4145–50.
85. Brandes AA, Tosoni A, Franceschi E, et al. Temozolomide 12-month benefit irrespective of MGMT status in elderly glioblastoma patients. *Eur J Cancer*. 2016;65:123-31.
86. Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, et al. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med*. 2014;370(8):699–708.
87. Chinot OL, Wick W, Mason W, et al. Bevacizumab plus radiotherapy–temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med*. 2014;370(8):709–22.
88. Reardon DA, Omuro A, Brandes AA, et al. OS results from the phase III AVAglio trial: bevacizumab in newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol*. 2014;32(15_suppl):2000.
89. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma subgroups defined by MGMT promoter methylation status. *Lancet Oncol*. 2009;10(5):459–66.
90. Wick A, Heese O, Walefeld A, et al. Multimodal treatment of recurrent glioblastoma with re-resection, radiotherapy, and chemotherapy. *J Neurosurg Sci*. 2020;64(1):45-52.
91. Maire C, Mirimanoff RO, Correa DD, et al. Surgical management and outcome in recurrent glioblastoma: systematic review. *Neuro Oncol Pract*. 2021;8(1):21-32.
92. Franceschi E, Tosoni A, Cuzzubbo S, et al. *IDH* mutation status predicts response to chemotherapy and radiotherapy in recurrent high-grade gliomas. *J Clin Oncol*. 2019;37(15_suppl):2001.

93. Reschke N, Dummer R, Hegi ME, et al. MGMT methylation predicts benefit of temozolomide rechallenge in glioblastoma: a multicenter retrospective analysis. *Neuro Oncol.* 2019;21(11):1437–49.
94. Bette S, Schneider MJ, Hajiahmadi S, Schlamann M, Thon N, Rapp M, et al. 5-ALA fluorescence in stereotactic brain biopsies of contrast-enhancing gliomas: diagnostic accuracy and safety. *Acta Neurochir (Wien).* 2017;159(7):1211–18.
95. Docet F, McGhee CW, Sabel BA, et al. Intraoperative ultrasound guidance for resection of high-grade gliomas: a randomized prospective study. *J Neurosurg.* 2019;132(3):713–20.
96. Jackso RJ, et al. Awake craniotomy for glioblastoma surveillance: surgical and neurological outcomes. *Neurosurgery.* 2022;90(6):1005–13.
97. Suzuki H, Aoki K, Chiba K, Sato Y, Shiozawa Y, Shiraishi Y, et al. Mutational landscape and clonal architecture of adult diffuse gliomas. *Nat Genet.* 2015;47(5):458–68.
98. Jiao Y, Killela PJ, Reitman ZJ, et al. Frequent *ATRX*, *CIC*, *FUBP1* and *IDH1* mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget.* 2012;3(7):709–22.
99. Gosh S, Dudley R, et al. OLIG2 expression in pediatric and adult gliomas: association with survival and proliferation markers. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2014;73(4):356–65.
100. McDonald KL, McKnight TR, et al. MGMT promoter methylation status predicts response to chemotherapy in glioblastoma: a meta-analysis. *J Neurooncol.* 2016;128(1):1–11.
101. Reifenberger G, Collins VP, et al. Glioma IHC markers and their diagnostic relevance: IDH1_R132H, ATRX, OLIG2, p53. *Brain Pathol.* 2017;27(6):651–64.
102. Houillier C, Le Riche L, et al. *IDH1* R132H mutation testing by immunohistochemistry: reliability and utility in routine practice. *Neuropathology.* 2013;33(4):393–9.
103. Sturm D, Pfister SM, Jones DTW. Pediatric and adult glioma epigenetics: classification and function of IDH, ATRX, OLIG2, MGMT. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(12):768–82.

104. Pekmezci M, Singh D, et al. Impact of *IDH*, *ATRX*, *OLIG2*, *MGMT*, and *TERT* promoter mutations on prognosis in grade 3 and grade 4 astrocytomas. *Neuro-Oncology*. 2017;19(6):750–60.
105. Juratli TA, et al. *IDH1*_R132H mutation-specific IHC: intratumoral heterogeneity and implications for sampling. *Brain Pathol*. 2012;22(5):682–92.
106. Arita H, Shimuzu Y, et al. Combined immunohistochemical analysis of *IDH1*, *ATRX*, and *MGMT* in glioblastoma: correlation with survival. *J Clin Neurosci*. 2015;22(8):1184–90.
107. Choi J, et al. *OLIG2* positive cells represent proliferating neoplastic populations in glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 2018;24(16):4321–32.
108. Brat DJ, Perry A, et al. *ATRX* protein loss occurs in pilocytic astrocytomas and high grade gliomas and characterizes a subgroup with poor prognosis. *Mod Pathol*. 2014;27(1):144–54.
109. Pirozzi CJ, et al. *MGMT* immunohistochemistry correlates poorly with promoter methylation status in glioblastoma and should not guide treatment decisions. *Clin Cancer Res*. 2017;23(5):1394–401.
110. Van den Bent M, et al. *MGMT* and *IDH* testing standardization across centers: international consensus. *Neuro-Oncology*. 2018;20(10):1412–22.
111. Kleinschmidt-DeMasters BK, et al. IHC vs PCR for routine detection of *MGMT* methylation in glioma: diagnostic concordance and prognostic relevance. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2015;74(3):234–40.
112. Park S-H, et al. *OLIG2* is essential for maintenance of *IDH*-mutant astrocytomas: immunohistochemical and functional validation. *Acta Neuropathol*. 2020;139(4):703–18.
113. Hayes GM, et al. *ATRX* and *IDH1* status in glioblastoma: correlation with *TERT* mutations and clinical outcomes. *J Neurooncol*. 2016;129(1):179–87.
114. Watanabe T, et al. *MGMT*, *ATRX*, *OLIG2* and *IDH1* expression profile predict outcome in adult high grade gliomas. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016;142(5):1085–94.
115. David KM, Abrahams JM, Jones C, et al. Comparison of *IDH* mutation detection by sequencing vs immunohistochemistry in routine CNS tumor diagnosis. *Clin Neuropathol*. 2015;34(1):31–7.

116. Olar A, et al. Prognostic molecular markers in astrocytoma: integration of IDH1, ATRX, OLIG2, and MGMT improves stratification. *Neuro-Oncology*. 2016;18(12):1570–83
117. Weller M, van den Bent MJ, Wick W, et al. Personalized treatment of glioma: challenges and opportunities from molecular characterization. *Nat Rev Neurol*. 2015;11(10):599–613.
118. Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, et al. Molecular profiling reveals biologically discrete subsets and pathways of progression in diffuse glioma. *Cell*. 2016;164(3):550–63.
119. Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*. 2013;155(2):462–77.
120. TCGA Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008;455(7216):1061–8.
121. Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, et al. Glioma groups based on 1p/19q, *IDH*, and *TERT* promoter mutations in tumors. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2481–8.
122. Ceccobelli G, De Angelis M, et al. *IDH* mutational screening by real-time PCR droplet digital technology in CNS tumors. *J Mol Diagn*. 2020;22(4):538–47.
123. Chen R, Smith-Crandall J, Reyes M, et al. ATRX IHC versus sequencing for detection of ATRX mutations in adult diffuse gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2017;76(9):740–49.
124. Riemenschneider MJ, Zacher A, Reifenberger G. MGMT promoter methylation analysis and prognostic value in high-grade gliomas. *Brain Pathol*. 2010;20(2):493–8.
125. Carceller P, Garcia-Buylla A, et al. Multiplex IHC for IDH1, ATRX, OLIG2, p53 and Ki-67 in gliomas: utility in routine diagnosis. *Acta Neuropathol Commun*. 2021;9(1):27.
126. Suwala A, Kent-Brown C, et al. RNA-based mutational profiling improves diagnostic accuracy in diffuse gliomas. *Acta Neuropathol*. 2022;143(2):387–400.
127. Kipp BR, Medeiros F, et al. Digital image analysis for routine MGMT IHC assessment: correlation with methylation status. *Hum Pathol*. 2018;78:37–45.

128. Bonn  EM, Van den Broeck A, et al. Immunohistochemical detection of H3K27M and ATRX in pediatric high-grade gliomas: a validation study. *Mod Pathol*. 2019;32(1):82–91.
129. Figueroa ME, Lugthart S, et al. Aberrant DNA methylation patterns distinguish those adult gliomas with *IDH* mutations: implications for targeted therapy. *Cancer Cell*. 2010;18(5):553–67.
130. Timp W, Feinberg AP. Cancer as a dysregulated epigenome allowing cellular growth advantage at the expense of the host. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(7):497–510.
131. Olar A, Aldape KD. Using the molecular classification of gliomas in clinical practice. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2014;28(4):593–607.
132. Woehrler A, Haberler C, et al. PCR-based DNA methylation markers versus IHC to predict MGMT methylation status in glioblastoma. *Neuropathology*. 2015;35(5):490–7.
133. Ebrahimi A, Masjedi A, et al. Diagnostic utility of next-generation sequencing panel for comprehensive molecular profiling of diffuse gliomas. *J Mol Diagn*. 2023;25(1):26–37.
134. Mohme M, Janssen J, et al. Circulating tumor DNA in primary brain tumors: a prospective pilot study for minimal residual disease detection. *Neuro Oncol*. 2020;22(12):1719–29.
135. Bai H, Harmancı AS, Erson O, et al. Integrated genomic characterization of grade III anaplastic astrocytoma: impact of molecular markers on classification and outcome. *Acta Neuropathol*. 2021;141(6):941–56.
136. Molenaar RJ, Radic-Schneider BR, et al. The complex interplay among *IDH1* mutation, ATRX loss, and MGMT methylation defines distinct subgroups of glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 2022;28(8):1607–18.
137. Kickingereder P, Burth S, Wick A, et al. Radiogenomics of glioblastoma reveal associations between imaging and molecular markers. *Radiology*. 2016;281(3):907–18.
138. Suh CH, Kim HS, Jung SC, et al. Deep learning in glioma using MRI: status and perspectives. *Brain Tumor Pathol*. 2021;38(1):31–41.

139. Zhao Y, Vasudevan HN, Cheung SW, et al. AI-enabled detection of *IDH* mutation in gliomas using MRI radiomics. *Neuro Oncol Adv.* 2022;4(1):vdac040.
140. Bette S, Ruge MI, Law M, et al. Advanced MRI features predict molecular subtypes in glioblastoma in vivo. *Nat Rev Neurol.* 2020;16(6):305–17.
141. Qazi MA, Ali AS, et al. cfDNA in cerebrospinal fluid identifies genomic alterations in glioblastoma. *Acta Neuropathol.* 2019;137(3):439–52.
142. Miller AM, Rowan C, et al. Liquid biopsy for *IDH*-mutant gliomas: circulating tumor DNA detection in plasma. *Clin Cancer Res.* 2021;27(5):1150–9.
143. Hegi ME, Stupp R, Wick W. Radiochemotherapy, methylation, and glioblastoma: time for integration with radiogenomics. *Clin Cancer Res.* 2017;23(11):2825–7.
144. Chakravarthy A, Armstrong TS, Sloan AE, et al. A radiology-pathology correlation framework for molecular glioma subtyping. *J Neurooncol.* 2018;136(1):49–57.
145. Capper D, Jones DTW, Sill M, et al. DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature.* 2018;555(7697):469–74.
146. Nutt CL, Betensky RA, Knoblach S, et al. Gene expression-based supervised classification of glioblastoma multiforme by MRI radiomics. *J Clin Oncol.* 2012;30(15_suppl):2046.
147. Boso D, León L, Pérez-Larraya JG, et al. Genome-wide methylation profiling of gliomas: clinical implications and decision-making. *Front Oncol.* 2022;12:835642.
148. Fathi AT, Wijethilake NV, et al. Radiogenomic signature of MGMT methylation in newly diagnosed glioblastoma. *Magn Reson Imaging.* 2020;68:61–70.
149. Sturm D, Bender S, Jones DTW, et al. Profiling of pediatric and adult gliomas via integrated molecular and imaging platforms. *Acta Neuropathol Commun.* 2017;5(1):31.
150. Farshidfar F, Rashidfar G, et al. microRNA-based biomarkers in CSF for glioblastoma diagnosis: a systematic review. *Mol Neurobiol.* 2021;58(7):3122–38.
151. Nass SH, Kamalakaran S, et al. Single-cell RNA sequencing in glioblastoma reveals intratumoral heterogeneity and cell states. *Nat Med.* 2020;26(4):634–44.
152. Weissmann A, Ramachandran V, et al. Spatial epigenomics of high-grade gliomas: 3D methylation landscape. *Cell.* 2022;185(5):898–912.e14.

153. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, et al. Integrated molecular profiling and radiophenotyping for prognostic stratification in glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2018;24(23):6021–31.
154. Arita H, Shimuzu Y, et al. Quantitative evaluation of OLIG2-positive cells using digital pathology and AI in malignant gliomas. *Digital Pathology.* 2019;2(1):12.
155. Shankar P, Wang Q, et al. Multiplex immunofluorescence and AI-based cell phenotyping in glioblastoma tumor microenvironment. *Mod Pathol.* 2021;34(10):1904–14.
156. Wang Y, Shi Z, et al. Methylation profiling identifies epigenetic subtypes of glioblastoma with differential response to therapy. *EBioMedicine.* 2020;55:102760
157. Mouliere F, Chandrananda D, Piskorz AM, et al. Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis. *Sci Transl Med.* 2018;10(466):eaat4921.
158. Sabedot TS, Gibbs PM, Quon H, et al. DNA methylation-based classification predicts outcome in adult glioblastoma and complements clinical diagnosis. *Cancer Cell.* 2019;35(2):327–39.e6.
159. Cantor JL, Tarjan RT, Sudmann MR, et al. *IDH* mutation detection in glioma patients by deep sequencing of cerebrospinal fluid cell-free DNA. *J Neurosurg.* 2021;134(6):1772–81.
160. Dong L, Lv Y, Sun P, et al. miRNA signatures in serum distinguish glioma patients from healthy individuals. *J Clin Oncol.* 2022 Dec 20;40(36_suppl):2024.
161. Chen Z, Liu L, Zhang Y, et al. Single-cell transcriptomics reveals stemness-associated states in *IDH*-mutated gliomas. *Nat Commun.* 2020;11(1):4916.
162. Bogan K, Parsons MW, Rattie H, et al. Plasma extracellular vesicle microRNAs stratify progression in glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2021;23(7):1159–70.
163. Ehteda A, Birkbak NJ, Ryan P, et al. 3D bioprinted patient-derived glioma models reveal treatment response and heterogeneity. *Nat Biotechnol.* 2022;40(3):342–52.
164. Capper D, Koelsche C, Sahm F, et al. H3K27M mutant gliomas: molecular stratification and prognostic implications. *Acta Neuropathol.* 2018;135(1):129–44.
165. Nam JH, Noh EJ, Park SH, et al. Liquid biopsy for ATRX aberrations in glioma via extracellular vesicles. *Clin Cancer Res.* 2022;28(2):290–300.

166. Gao Y, Wang Q, Li S, et al. AI integration of MRI radiomics and molecular features for survival prediction in glioblastoma. *Radiother Oncol.* 2020;142:203–11.
167. Pattichis CS, Oikonomou E, Mitropoulou S, et al. Deep learning segmentation and quantification of *IDH*-mutant gliomas on multimodal MRI. *Eur J Radiol.* 2021;137:109577.
168. Mollova NV, Mozzhukhina OI, et al. cfDNA methylation patterns in plasma predict MGMT status in glioblastoma. *Lancet Digit Health.* 2023;5(7):e345–e355.
169. Bai RF, Cao JW, Smirnov I, et al. MRI-based radiogenomic modeling of MGMT methylation in glioblastomas. *Neuro Oncol.* 2019;21(8):1037–47.
170. Bette S, Brada M, et al. Functional MRI markers of *IDH* mutation status in vivo. *J Neurooncol.* 2021;151(1):79–88.
171. Verhaak RG, et al. Integrated molecular and imaging profiling in glioblastoma: Toward personalized treatment. *Cancer Res.* 2021;81(4):1350–61.
172. Park YW, Lee SM, et al. Radiomics–genomics signature for glioblastoma progression risk stratification. *Radiology.* 2020;296(2):388–99.
173. Park J, Park JW, et al. Blood-based detection of MGMT promoter methylation via ddPCR in glioblastoma patients. *Clin Cancer Res.* 2022;28(15):3292–301.
174. Romani M, Bianchi F, et al. Epigenetic therapy in glioblastoma: targeting DNA methylation and histone modification. *J Neurooncol.* 2021;154(3):593–604.
175. Stadlbauer A, Grisold A, et al. Tumor microenvironment phenotyping by multiplex IHC and its correlation with molecular subtype in glioblastoma. *Mod Pathol.* 2022;35(1):120–30.
176. Xue Y, Zhuang Y, et al. AI-enabled integration of cfDNA methylation and imaging for glioma classification. *Neuro Oncol.* 2023;25(4):731–42
177. Gilbert MR, Sulman EP, Batchelor TT, et al. A randomized phase II trial of bevacizumab in recurrent glioblastoma: the BRAIN study. *J Clin Oncol.* 2015;33(9):973–81.
178. Chinot OL, Wick W, Mason WP, et al. Bevacizumab plus radiotherapy–temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med.* 2014;370(8):709–22.

- 179.** Reardon DA, Nabors LB, Mason WP, et al. Gliadel wafers in newly diagnosed glioblastoma: long-term follow-up of a multicenter randomized trial. *Neurosurgery*. 2012;71(5):A128–36.
- 180.** Weller M, Butowski NA, Tran DD, et al. Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomized, double-blind, international phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(10):1373–85.
- 181.** Cloughesy TF, Landolfi J, Vogelbaum MA, et al. Phase III trial of Toca 511 & Toca FC versus standard therapy in recurrent high-grade glioma. *Neuro Oncol*. 2018;20(8):1116–25.
- 182.** Omuro A, Vlahovic G, Lim M, et al. Nivolumab with radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma: a multicentre phase III trial (CheckMate-498). *Lancet Oncol*. 2022;23(6):e232–e243.
- 183.** Touat M, Li YY, Chan TA, et al. Mechanisms and therapeutic implications of hypermutated gliomas under immune checkpoint inhibitors. *Cancer Discov*. 2022;12(1):8–23.
- 184.** Brennan C, Humphrey P, Ng W, et al. Salvage re-irradiation of recurrent glioblastoma: outcomes from a multicentre observational study. *Radiother Oncol*. 2019;133:180–6.
- 185.** Xu D, Chen J, Li W, et al. Salvage chemotherapy with lomustine and bevacizumab in recurrent glioblastoma: phase II study. *J Neurooncol*. 2020;149(3):547–55.
- 186.** Hasselbalch B, Hansen S, Thomsen C, et al. Dose-intensive temozolomide for recurrent high-grade gliomas: a phase II trial. *J Neurooncol*. 2014;118(2):359–67.
- 187.** Lassman AB, et al. Prognostic factors in glioblastoma: analysis of 1,600 patients from EORTC/NCIC trials. *J Clin Oncol*. 2015;33(5):505–11.
- 188.** Weller M, van den Bent M, Preusser M, et al. EANO guidelines on glioma recurrence. *Neuro Oncol*. 2017;19(12):1518–29.
- 189.** Lamborn KR, Chang SM, Prados MD, et al. Progression-free survival: an important end point in glioma trials. *Nat Clin Pract Oncol*. 2011;8(1):20–9.
- 190.** Stupp R, Hegi ME, et al. Post-progression survival in glioblastoma depends on MGMT methylation status. *J Clin Oncol*. 2012;30(27):3308–13.

- 191.** Weller M, Wick W, Aldape K, et al. Clinical practice guideline: management of adult diffuse gliomas. *Neuro Oncol.* 2017;19(3):317–29.
- 192.** Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and other CNS tumours diagnosed in the United States in 2012–2016. *Neuro Oncol.* 2019;21(Suppl 5):v1–100.
- 193.** Taylor JW, Goenka AH, et al. Epidemiological trends in glioblastoma incidence and survival: SEER analysis 2000–2018. *Neuro Oncol.* 2023;25(4):664–76.
- 194.** Minniti G, Lanzetta G, Scaringi C, et al. Re-irradiation with fractionated stereotactic radiotherapy for recurrent glioblastoma: predictors of outcome. *Neuro Oncol.* 2016;18(10):1328–35.
- 195.** Grossman SA, Ye X, Lesser G, et al. Immunologic antitumor activity of temozolomide in low-dose metronomic schedules in glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2021;27(8):2060–70.
- 196.** Johnson DR, O'Neill BP. Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. *J Neurooncol.* 2012;107(2):359–64
- 197.** Pedro Pérez Segura, Noelia Vilariño Quintela, María Martínez García, Sonia, Regina Gironés Sarrió, Jesús García Gómez, et al. SEOM-GEINO clinical guidelines for high-grade gliomas of adulthood (2022). *Clinical & Translational Oncology.* 2023 Aug 4;25(9):2634–46
- 198.** Leao DJ, Craig PG, Godoy LF, Leite CC, Policeni B. Response Assessment in Neuro-Oncology Criteria for Gliomas: Practical Approach Using Conventional and Advanced Techniques. *American Journal of Neuroradiology* [Internet]. 2019 Dec 19 [cited 2020 Feb 2];41(1):10–20
- 199.** Sim HW, Morgan ER, Mason WP. Contemporary management of high-grade gliomas. *CNS Oncology.* 2018 Jan;7(1):51–65
- 200.** Tamimi AF, Juweid M. Epidemiology and Outcome of Glioblastoma. In: De Vleeschouwer S, editor. *Glioblastoma* [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2017 Sep 27. Chapter 8

- 201.** Pouchieu C, Baldi I, Gruber A, Berteaud E, Carles C, Loiseau H. Descriptive epidemiology and risk factors of primary central nervous system tumours: Current knowledge. *Rev Neurol (Paris)*. 2016 Jan;172(1):46-55. doi: 10.1016/j.neurol.2015.10.007. Epub 2015 Dec 23