

Grade IV Glial Tümörlerde, Mitotik Aktivite, Ki-67 ve Platelet Volüm İndeksinin Prognostik Belirteç Olarak Karşılaştırılması

Comparasion Between Mitotic Activity, Ki-67 Index and Platelet Volume Index as a Prognostic Marker in Glioblastomas

© Tolga Turan Dündar

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Öz

Amaç: Tanı anında kayıt edilen platelet sayısındaki artış, glioblastoma ve diğer intrakraniyal patolojiler için bağımsız bir risk faktörüdür ve kötü prognoz göstergesidir. Tümör mikro-dolaşımı kaynaklı, birçok sitokin ve faktörlerin salınması sonucu plateletlerin aktive olması ve nöroenflamasyonda aktif rol oynaması bu hipotezin temelini oluşturur. Glial tümörlerde proliferasyon göstergesi olarak, Ki-67 indeksi ve mitotik aktivite sıklıkla kullanılmaktadır. Glial tümörlerde, yüksek Ki-67 indeks oranı ve mitotik aktivite agresif klinik progresyon, vasküler invazyon ve kötü prognoz ile karakterizedir. Ortalama platelet hacminin platelet sayısına oranı olan platelet volüm indeksini (PVI), birçok intrakraniyal patolojilerde prognostik faktör olarak kullanılmasını öneren çalışmalarda artış mevcuttur. Bu çalışma da ilk defa PVI, immün yanıt belirteci olarak, Ki-67 ve mitotik aktivite ile karşılaştırdık. Böylelikle, hızlı hesaplanabilen ve de düşük maliyetli yeni bir prognostik faktörü ortaya koymayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Girişimsel olmayan klinik çalışma için etik kurul onayı alındıktan sonra – son iki yıl içerisinde dahil edilme kriterlerini sağlayan glioblastom multiforme tanısı almış 65 hasta retrospektif olarak değerlendirildi. Rutin patolojik tanı süreçlerinden geçen hastaların Ki-67 indeksi ve mitoz sayısı kayıt edildi. PVI, ameliyat öncesi değerlendirme amacı ile yapılan tam kan sayımı testinden platelet sayısı ve hacmi kullanılarak hesaplandı. Çalışma retrospektif olduğu için hiçbir hastanın tedavi sürecini etkilemedi. PVI; Ortalama platelet hacmi (fL) x100/Platelet sayısı (per 1000) olarak tanımlandı.

Bulgular: PVI ile Ki-67 ve mitoz sayısı arasında; negatif yönde, zayıf derecede korelasyon bulundu.

Sonuç: Bu çalışma PVI azalırken, Ki-67 ve mitoz sayısının arttığı ortaya konuldu. Yüksek gradlı glial tümörlerde PVI, prognostik ve prediktif bir faktör olarak kullanılabilir. Fakat, yine de bu hipotezimizin, daha çok olgu sayısı ve tümör alt gruplarını da ortaya koyan çalışmalara ihtiyacı vardır.

Anahtar Kelimeler: Glioblastoma, GBM, Platelet, Ortalama Platelet Hacmi, Platelet Volüm İndeksi, PVI

Abstract

Objectives: An elevated platelet count is considered an independent prediction of survey in glioblastoma and various other intracranial entities. Activity of the tumor microcirculation resulting in platelet activation and release of several cytokines and factors from activated platelets has been suggested to play an active role in neuro-inflammation. Ki-67 index and mitotic activity are markers which could be showed proliferation in the glial tumor. High Ki-67 expression and mitosis rate of high grade glial tumors have been more aggressive clinical progression, poor prognosis, more vascular invasion than low. Recently, Mean Platelet Volume (MPV) to platelet count (PLT) ratio has become a trend indicator to anticipate the outcome of a patient suffering from intracranial pathologies. The study aims to determine first time whether the comparison of the Volume Index (PVI) as an immune response marker with the Ki-67 and mitotic activity could be used as a prognostic factor in glioblastoma (WHO Grade IV)

Materials and Methods: In the retrospective study, we studied 65 patients diagnosed with glioblastoma who had inclusion and exclusion criteria. The correlation between PVI, Ki-67 and mitotic activity was examined all cases after pathologically diagnosed, by the routine processes of the pathological preparates. PVI was calculated from pre-operative first complete blood count (CBC) and was defined as MPV value (fL)x100/PLT (per 1000). The Kolmogorov-Smirnov test and Spearman's correlation coefficient was used in the analysis of the interrelationship.

Results: The correlation between the PVI, Ki-67 and mitotic index was found to be leak statistically correlation.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Tolga Turan Dündar
Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi AnaBilim Dalı, İstanbul, Türkiye
Tel.: +90 505 331 92 29 E-posta: tdundar@bezmialem.edu.tr ORCID ID: orcid.org/0000-0003-0030-2618

Geliş Tarihi/Received: 11.03.2019 Kabul Tarihi/Accepted: 29.05.2019

©Telif Hakkı 2019 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.
Yayınlanan tüm içerik CC BY-NC-ND lisansı altındadır.



Conclusion: It was determined that PVI is decreased, Ki-67 immunoreactivity and mitotic index are increased. The PVI may be used as a prognostic, predictive factor for glioblastoma. Nevertheless, further studies concerning the prognosis of glioblastoma are needed to confirm this hypothesis.

Key Words: Glioblastoma, GBM, Platelets, Mean Platelet Volume, Platelet Volume Index, PVI

Giriş

Intrakraniyal primer maligne tümörler köken aldığı stromal hücre mimarisine göre adlandırılıp sınıflandırılırlar. Astrositlerden astrositomalar, oligodendrositlerden oligodendrogliomalar ve ependimal hücrelerden ise ependimomlar meydana gelir. Bunlar içinde en agresif olan ve en sık görüleni gliomalarlardır. Gliomalar, beynin primer maligne tümörlerinin yaklaşık %80'ini oluştururlar. Bu sistem histopatolojik görünümüne göre derecelendirmektedir (derece=grad) (1-3). Tümoral dokudaki mitoz oranı derecelendirmenin başlıca belirleyicisidir. Mitoz oranının artması, büyüme potansiyelinin artmasına ve dolayısı ile kötü prognoza işaret eder (4). Mitoz oranını göstermede proliferatif indeks (Ki-67) proliferasyon indeksi sıklıkla kullanılmaktadır. Ki-67, tümör içerisindeki proliferatif hücreleri gösteren antikordur. Ki-67 pozitif hücrelerinin oranı Ki-67 proliferasyon indeksini belirler. Literatürde, Ki-67 fraksiyonunun yüksek olduğu glial tümörlerin daha agresif seyrettiğine dair birçok çalışma mevcuttur (5,6). Diğer yandan, iskemik strok veya subaraknoid kanama gibi intrakraniyal patolojilerde platelet volüm indeksi (PVI) ve prognoz ile ilgili yayınlarda artış görülmektedir. PVI; ortalama platelet hacminin, platelet sayımına oranı olarak ifade edilir. Bu indeks, intrakraniyal patolojilere yanıt olarak ortaya çıkan nöroenflamasyon göstergesi olarak kullanılmıştır (7-9). Biz de çalışmamızda, tam kan sayımında rutin bulunan parametreler ile hesaplanan PVI'nin glioblastoma için bir prognostik faktör olup olmadığını araştırdık. Bu amaçla çalışmamızda, glioblastomalarda iyi bilinen bir prognostik faktör olan mitotik aktivite, Ki-67 indeksi ve PVI'yi karşılaştırdık.

Gereç ve Yöntem

Girişimsel olmayan klinik çalışma etik kurul onayı alındıktan sonra, Ocak 2016- Aralık 2018 tarihleri arasında glioblastoma nedeni ile tedavi gören hastalar listelendi (2018. 876). Bunların içinde hematolojik ve hepatik fonksiyonları yeterli olan hastalar değerlendirmeye alındı. (Hemoglobin>10g/dL, mutlak nötrofil sayısı>1500/mm³, platelet sayısı >100.000/mm³; total serum bilirubin < normalin 1,5 katı ve karaciğer fonksiyon değerleri < normalin 3 katı). Çalışmamızda, hematolojik ve hepatik fonksiyon yetersizliği, başka bir maligniteye sahip olunması, aktif enfeksiyon, kronik enfeksiyon veya herhangi bir immün yetmezlik sendromu (Edinsel bağışıklık yetmezliği sendromu, lösemi) bulunan hastalar ise değerlendirme dışına alındı. Çalışma, tedavi sürecini etkilemeden retrospektif dijital kart analizini içermektedir. Glioblastoma tanılı 65 hasta ile çalışıldı

(Tablo 1). Nöro-görüntüleme ve fizik muayene ile ameliyat endikasyonu konulan tüm hastalardan başvuru anında yapılan tam kan sayımı kayıtları listelendi. Sonrasında tüm hastalar beyin cerrahi kliniğinde tedavi altına alındı. Elde edilen patoloji preparatları tek patolojist tarafından Hemotoksilen-Eozin ve immünohistokimyasal boyamalar ile değerlendirildi. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflamasına göre primer tanıları konularak derecelendirildi.

Histopatolojik Değerlendirme

Tüm histopatolojik örneklerin primer tanıları tek patoloji uzmanı eşliğinde değerlendirilerek raporlandı. Bu amaçla, hemotoksilen ve eosin boyama ile immünohistokimyasal boyamalar, Dako Autostainer Link 48 (Dako/Agilent Technologies, CA, USA) ve sekonder antikoru kromojen (Dako/Agilent Technologies, CA, USA) kullanılarak yapıldı. Analiz için dijital taramalar Leica Aperio AT2 otomatik slayt tarayıcı (Leica Biosystems Inc., IL, USA) (original magnification of digital slides 400x) kullanılarak yapıldı. Ki-67 indeksi, streptoavidin-biotin ortamında primer antikolar ile immünreaktivitesi ışık mikroskobu ile değerlendirilmiştir. Ki-67 için 100 tümör hücresi sayılmış (10'luk büyütme alanında) ve nükleer boyanma gösteren hücreler oranlanmıştır (Şekil 1). On büyük büyütmede, hiperkromatik farklı büyüklüklerde nükleuslar, pembe sitoplazma ve multiple fibriler uzantılar içeren mitotik figürlerde sayılarak not edildi. Ki-67 ile yoğun boyanan en az üç alan seçildi. Ki-67 pozitif hücrelerin sayısı toplam hücre sayısına oranlandı ve

Tablo 1: Olguların yaş, cinsiyet ve tümör yerleşim yeri dağılımı

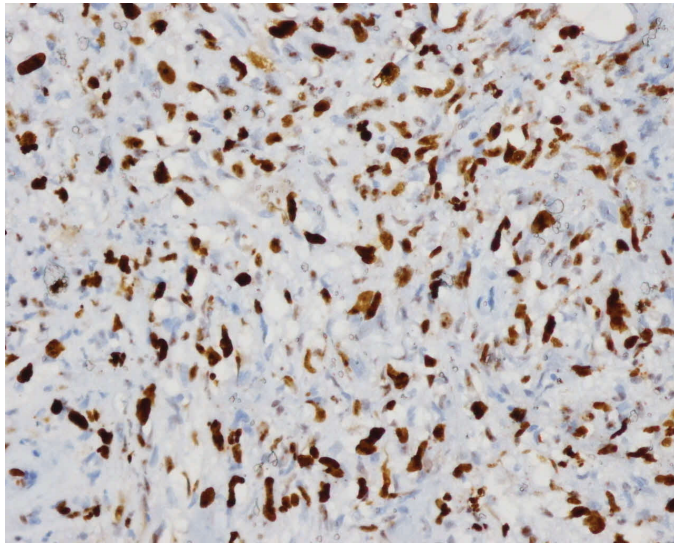
Yaş	57,82 (minimum=13, maksimum=78, SD ±14,38)		
Cinsiyet	Kadın	Erkek	
	30 (%46,2)	35 (%53,8)	
Tümör yerleşim lokalizasyonu	Dağılım (n=65)	Yüzde (%)	Stereotaktik biopsi sayısı (n=20)
Sağ frontal lob	2	3,1	-
Sağ temporal lob	7	10,8	1
Sol temporal lob	17	26,2	-
Sol frontal lob	9	13,8	2
Sağ pariyetal lob	9	13,8	2
Basal ganglia	3	4,6	3
Korpus kallozum	4	6,2	4
Sol frontopariyetal	2	3,1	2
Talamus	8	12,3	6
Sağ oksipital	2	3,1	-
Sol frontotemporal	2	3,1	-

SD: Standart deviasyon

üç alanın ortalaması alındı. Değerlendirmede sadece tümör hücrelerindeki nükleer boyanmalar kabul edildi. Nekroz çevresi alanlar ve vasküler endotel boyanmaları değerlendirmeye alınmadı. Bunlar heterojen yapıya sahip gliyal tümörlerde sonuç standartizasyonu içindir. Bu işlemler rutin patolojik tanı için kullanılan süreçlerdir. Veriler ilgili kayıtlardan retrospektif elde edildi.

Platelet Sayısı ve Hacmi

Çalışmaya dahil edilen olguların ameliyat öncesi en son kan sayımı hesaplamalar için kullanıldı. Bu kan sayımlarının tamamı ameliyat öncesi değerlendirme amacı ile alınan örneklerden oluşmaktadır.



Şekil 1: Olgu grubumuzun patolojik incelemelerinden elde edilen, 200 büyük büyütmede, Ki-67 antikor boyamaları ile elde edilen, orta yoğunlukta boyanan ve Ki-67 indeksi %30 olarak hesaplanan doku örneği



Şekil 2: Yüz büyük büyütmede elde edilen Ki-67 antikor boyaması

Platelet Volüm İndeksi Hesaplanması

PVI, $\times 100$ olarak tanımlandı. Tek araştırmacı tarafından, hastaların Ki-67 değerleri ve klinik durumları bilinmeden hesaplandı.

İstatiksel Analiz

SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) yazılımının 24.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) versiyonu ile veriler analiz edildi. Normalite analizi için Kolmogorov-Smirnov testi kullanıldı. Non-parametrik tüm verilerin (Ki-67 indeksi, mitoz sayısı ve PVI) Spearmans Correlation testi ile korelasyon analizleri yapıldı. P değeri $<0,05$ olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Son iki yıl içerisinde, histopatolojik incelemelerde glioblastom multiforme (WHO, Grade IV Glioma) tanısı konulan 65 hasta çalışmaya dahil edildi. Otuz kadın (%46,2), 35 erkek (%53,8) ve yaş ortalaması 57,82 [minimum=13, maksimum=78, standart deviasyon $\pm 14,38$] bulundu. Yerleşim yeri; 15 frontal lob, 24 temporal lob 9 parietal, üç basal ganglion, dört korpus kallosum, sekiz talamus, iki oksipital lob olarak tanımlandı. Kırk beş hastada eksizyonel, 20 hastada stereotaktik örnekleme yapıldı (Tablo 1). Platelet sayısı ortalaması $245,800 \pm 73,94301$ (min=125,000, maks=485,000), ortalama platelet hacmi $8,30015 \pm 1,847664$ (min=5,520, maks=12,900), platelet hacim indeksi ortalaması $3,64 \pm 1,22$ (min=1,280, maks=7,04), Ki-67 indeksi ortalaması $36,62 \pm 13,11$ (min=15, maks=70), on büyük büyütmede mitoz sayısı ortalaması $13,65 \pm 11,04$ (min=2, maks=45) bulunmuştur (Tablo 2).

Ki-67 indeksi ile mitoz sayısı arasında; pozitif yönde, orta derecede ve istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon (bağıntı) bulundu ($r_s=0,405$, $p=0,01$). PVI ile mitoz sayısı arasında; negatif yönde, zayıf derecede ve istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir korelasyon ortaya konuldu. ($r_s=0,063$, $p=0,619$). PVI ile Ki-67 indeksi arasında; negatif yönde, zayıf ve istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir ilişki bulundu ($r_s=0,170$, $p=0,175$).

Tablo 2: Olguların PLT, MPV, PVI, Ki-67 ve mitoz değerlerinin ortalama, ortanca değerleri

	PLT	MPV	PVI	Ki-67	Mitoz	
n	65	65	65	65	65	
Ortalama	245,8000	8,30015	3,64738	36,62	13,65	
Ortanca	229,0000	8,10000	3,60000	35,00	10,00	
SD	73,94301	1,847664	1,227435	13,113	11,049	
Minimum	125,00	5,520	1,280	15	2	
Maksimum	485,00	12,900	7,040	70	45	
Yüzdelerik	25	192,0000	6,80000	2,55000	30,00	5,00
	75	280,0000	9,35500	4,49000	40,00	20,00

PLT: Trombosit sayısı, MPV: Ortalama platelet volümü, PVI: Platelet volüm indeksi, SD: Standart deviasyon

Tartışma

İnsanın tümöral hastalıkları içinde maligne beyin tümörleri, yüksek ölüm oranına sahip ve sınırlı tedavi imkanları ile giden hastalık grubunu oluştururlar. Metastatik tümörler dışlandığında, yüksek dereceli glial tümörler bu grubun en sık ve agresif kısmını oluşturur. Dünya sağlık örgütünün sınıflama sistemine göre grad 4 glial tümörler glioblastoma multiforme (GBM) olarak adlandırılır. Ortalama görülme en sık 56-60 yaşlarında görülür (10). Bizim olgu grubumuzda da yaş ortalaması 57,82'dir. Erkek cinsiyette görülme sıklığı kadınlardan daha fazladır. Çalışmamızda da %53,8 ile erkek cinsiyet ağırlıktadır (11). GBM'ler hızlı çoğalma, anjiyogenez, mikrovasküler proliferasyon, beyin dokusuna invazyon ve nekroz ile karakterizedir. Glial tümörler histopatolojik olarak aynı olmasına karşın farklı proliferatif potansiyelleri olabilmektedir. Bu proliferatif potansiyeller için , mitotik indeks ve Ki-67 indeksi sıklıkla kullanılmaktadır. Mitotik indeks, hemotoksilen-eosin boyası ile mitotik figürlerin 10 büyüme alanında sayılabilen mitotik figür sayısının basitçe sayımına dayanır. Ki-67 tümör içerisindeki proliferatif hücreleri gösterebilen bir antikordur. Ki-67 ise hücre siklusunun G1, S, G2 ve M fazlarında bulunan non-histon nükleer proteinde lokalize bir epitopudur. Parafin kesitlerde monoklonal antikorlar ile Ki-67 indeksi pratik bakılabilmektedir. Hücre proliferasyon siklusunu tanımlayan G1, S, G2 ve özellikle de M fazlarında, Ki-67 fraksiyonları ortaya çıkar. Ekspresye olan bu proteinlerin antikor ile tayınerleri, tümörün proliferasyonu, invazyon ve vaskülarizasyonu hakkında anlamlı bilgiler verir. Böylelikle glial tümörlerin proliferasyon potansiyelleri ortaya konulur (12-14). Çalışmamız da mitoz sayısı ve Ki-67 indeksi arasında olumlu, orta derecede korelasyon bulduk. Bu bulgumuz literatür ile uyumludur (4,5). Palizatlaşan hücre nekrozu GBM'nin patolojik karakteristik özelliklerinden birisidir. Bu nekroza hipoksinin katkısı olduğu gibi tümöral dokunun mikroçevresinin de katkısı vardır. Makrofajlar, eosinofiller, nötrofiller ve T lenfosit gibi immün hücrelerin infiltrasyonu ve bunların salgıladıkları sitokinler tümör mikroçevresine ve nekroza katkı sağlar. Tümöral dokuyu yabancı cisim ve doku hasarı olarak algılayan immün sistem aktive olarak immün mediatörler salgılar. Bu mediatörler proliferasyona, anjiogenezise, invazyona ve hatta tümör hücrelerinde genetik ve epigenetik değişikliklere sebep olur (15-17). Enflamasyon, daha doğru ifade ile nöro-enflamasyon tüm tümöral süreç boyunca aktif rol oynar. Trombositler, GBM'lerde nöro-enflamasyonun ana hücrelerinden biridir. Daha önceki çalışmalarda, tanı anındaki trombositözün bağımsız bir risk faktörü olduğu ve beklenen yaşam süresini kısalttığı ortaya konulmuştur. Tümöral dokunun trombo-poetik faktörler üretmesinin platelet sayı ve fonksiyonlarındaki artışa anlamlı katkısı vardır. İnterlökin-6 (IL), megakaryositopoezis üzerinde

stimüle edici etkili bir sitokindir. Yapımı IL-1 tarafından aktive edilir. Hem IL-1, hemde IL-6 glioblastoma hücreleri tarafından sekrete edilir. Granülosit koloni stimüle edici faktör ve granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör benzer şekilde glioblastom hücrelerinden salınır. Bunlar otokrin olarak glioblastoma hücrelerini potansiyelize ettiği gibi trombopoezisi de destekler (18-20). Dolayısı ile trombosit sayısı ile tümöral hücre aktivitesi arasında bir korelasyon vardır. Fakat, megakaryositopoezisin de aktif olmasından dolayı dolaşımda plateletler tek formda bulunmazlar. Farklı hacim ve sayıda platelet alt grupları heterojen bir şekilde bulunur. Bu yüzden platelet ile ilgili trombo-nöro-enflamasyonu tahmin etmekte daha spesifik bir indeks olarak platelet volüm indeksi artan sıklıkta kullanılmaktadır.

Bizde çalışmamızda hem kolay ortaya konulabilen hem de maliyeti düşük PVI'yi bir nöro-enflamasyon belirteci olarak mitoz sayısı ve Ki-67 indeksi ile ilişkisini araştırdık. PVI ile mitoz sayısı ve Ki-67 arasında zayıf ve negatif yönde bir bağlantı bulduk. Yani mitoz sayısı veya Ki-67 arttıkça PVI azalma eğilimindedir. Bu durum öne sürdüğümüz nöro-enflamasyonun potansiyelize edildiği hipotezimize uyumlu olmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,619 ve p=0,175). Olgu sayısının sınırlı olması istatistiği etkilediğini düşünmekteyiz.

Bu çalışmada, yüksek gradlı glial tümörlerde PHI'nin bir prognostik faktör olabilirliğini araştırdık. Mitoz sayısı ve Ki-67 uzun yıllardır prognoz belirlemede güvenilir belirteçler olarak kullanılmıştır. PVI ise bu amaçla, literatürde ilk defa GBM'li hastalarda analiz edilmiştir.

Glial tümör hastalığının başlama zamanı belirsizdir. Alınan hematolojik incelemeler ameliyat öncesi alınan tetkiklerdir. Tüm olguların, tümör başlama zamanı farklı olabileceğinden nöro-enflamasyonun süresi de farklıdır. Heterojen bir grup oluşturmak oldukça zordur. Çalışma retrospektif ve sınırlı sayıda olgu ile yapıldığından GBM alt gruplarında inceleme yapılmaması diğer bir yetersizliktir. Mitotik indeks ve Ki-67 günlük pratikte sıklıkla kullanılmasına rağmen, zayıf prognostik faktör olarak gösteren az sayıda çalışmalar mevcuttur. Diğer yandan çalışmamızda mitoz sayısı, Ki-67 ve PVI arasında zayıf derecede korelasyon bulunmuştur. Mevcut kullanılan korelasyon analiz testleri verilerin uç değerlerinden ve olgu sayısından etkilenmektedir. Hem olgu sayısının az olması hem de GBM alt gruplarında farklı uç değerlerin görülmesi istatistik hesapları da etkilemektedir (21,22).

Sonuç

GBM'lerde genetik ve moleküler düzeyde birçok prognostik faktörlerin tanımlandığı günümüzde PVI, maliyet olarak ucuz ve kolay hesaplanan bir yöntemdir. Homojen olarak oluşturulmuş

ve subgrupları da içeren daha fazla örnekler ile güvenilirliğini arttıracak çalışmalara ihtiyaç vardır.

Teşekkür: Patolojik tanı ve verilerin elde edilmesinde, literatür taramasında büyük katkısı olan Bezmialem Vakıf Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı'ndan Uzm. Dr. Ganime Çoban'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Etik

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Klinik Olmayan Etik Kurul tarafından onaylanmıştır (2018.876).

Hasta Onayı: Retrospektif veri analiz çalışmasıdır. Hiçbir hastanın tanı ve tedavi sürecinde bir değişiklik yapmamıştır. Hasta onamları alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu ve editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Finansal Destek: Yazar finansal destek almadığını beyan eder.

Kaynak

1. Gusyatiner O, Hegi ME. Glioma epigenetics: From subclassification to novel treatment options. *Semin Cancer Biol.* 2018;51:50-58.
2. Mineo M, Ricklefs F, Rooj AK. The Long Non-coding RNA HIF1A-AS2 facilitates the maintenance of mesenchymal glioblastoma stem-like cells in hypoxic niches. *Cell Rep.* 2016;15:2500-2509.
3. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumours of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 2016;131:803-820.
4. Kaynar MY, Dündar TT. Düşük Dereceli Gliomalar ve Tedavileri, Ozyurt ME editör. *Beyin Tümörleri Kök Hücreli ve Tümörögenesi.* Cilt 1, Birinci Baskı, İstanbul: 2015;239-251.
5. Stoyanov GS, Dzhakov DL, Kitanova M, et al. Correlation Between Ki-67 Index, World Health Organization Grade and Patient Survival in Glial Tumors With Astrocytic Differentiation. *Cureus.* 2017;26;9:e1396.
6. Wong E, Nahar N, Hau E, et al. Cut-point for Ki-67 proliferation index as a prognostic marker for glioblastoma. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2019;15:5-9.
7. Hirashima Y, Hamada H, Kurimoto M, et al. Decrease in platelet count as an independent risk factor for symptomatic vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg.* 2005;102:882-887.
8. Zhou Y, Jiang Y, Peng Y, et al. The Quantitative and Functional Changes of Postoperative Peripheral Blood Immune Cell Subsets Relate to Prognosis of Patients with Subarachnoid Hemorrhage: A Preliminary Study. *World Neurosurgery.* 2017;206-215.
9. Ray B, Tinsley L, Ford L, et al. Trends of Platelet Volume Index Predicts Delayed Cerebral Ischemia after Subarachnoid Hemorrhage. *World Neurosurg.* 2018;624-631.
10. Alvarez de Eulate-Beramendi S, Alvarez-Vega MA, Balbin M, et al. Prognostic factors and survival study in high-grade glioma in the elderly. *Br J Neurosurg.* 2016;30:330-336.
11. Sarıca FB, Yademir F, Cekinmez M, et al. "Yeni Tanı Almış Glioblastoma Hastalarında Temozolomid ile Yapılan Konkoman Terapi ve Nüks Glioblastoma Olgularında Uygulanan Bevacizumab ve İrinotecan Antianjiyojenik Kombinasyon Terapisi Etkinliği: 10 Yıllık Tedavi Sonuçları". *Türk Nöroşirürji Derg.* 2015;1:19-30.
12. Chen WJ, He DS, Tang RX, et al. ChenKi-67 is a valuable prognostic factor in gliomas: evidence from a systematic review and meta-analysis *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;411-420.
13. Moskowitz SI, JinPrayson T. RA Role of MIB1 in predicting survival in patients with glioblastomas. *J Neurooncol.* 2006;76:193-200.
14. Kanyılmaz G, Önder H, Aktan M, et al. Prognostic Importance of Ki-67 Labeling Index in Grade II Glial Tumors. *Turk J Oncol.* 2018;33:48-53.
15. Lin Y, Zhou J, Xu J, et al. Effects of combined radiosurgery and temozolomide therapy on epidermal growth factor receptor and variant III in glioblastoma multiforme. *Oncol Lett.* 2018;15:5751-5759.
16. Charles N, Holland EC. The perivascular niche microenvironment in brain tumor progression. *Cell Cycle.* 2010; 9:3012-3021.
17. Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, et al. The brain tumor microenvironment. *Glia* 2012;60:502-514.
18. Marx S, Splittstöhser M, Kinnen F, et al. Platelet activation parameters and platelet-leucocyte-conjugate formation in glioblastoma multiforme patients. *Oncotarget.* 2018;25;9:25860-25876.
19. Brockmann MA, Bender B, Plaxina E, et al. Differential effects of tumor-platelet interaction in vitro and in vivo in glioblastoma. *J Neurooncol.* 2011;105:45-56.
20. Nolte I, Przibylla H, Bostel T, et al. Tumor-platelet interactions: glioblastoma growth is accompanied by increasing platelet counts. *Clin Neurol Neurosurg.* 2008;110:339-342.
21. Mills SJ, du Plessis D, Pal P, et al. Mitotic Activity in Glioblastoma Correlates with Estimated Extravascular Extracellular Space Derived from Dynamic Contrast-Enhanced MR Imaging. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2015;37:811-817.
22. Nielsen LAG, Bangsø JA, Lindahl KH, et al. Evaluation of the proliferation marker Ki-67 in gliomas: Interobserver variability and digital quantification. *Diagn Pathol.* 2018;13:38-46.