

# Klinička važnost otkrivanja proliferacijskih i antiproliferacijskih pokazatelja ljudskih meningeoma

---

Forempoher, Gea

Doctoral thesis / Disertacija

2005

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:080283>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)





## **Središnja medicinska knjižnica**

Forempoher, Gea (2005) *Klinička važnost otkrivanja proliferacijskih i antiproliferacijskih pokazatelja ljudskih meningeoma*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/168>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

Gea Forempoher

KLINIČKA VAŽNOST OTKRIVANJA  
PROLIFERACIJSKIH I ANTIPROLIFERACIJSKIH  
POKAZATELJA LJUDSKIH MENINGEOMA

Doktorska disertacija

Zagreb, 2004.

Mojim roditeljima

Ljudima je dao znanost  
da uzmognu slaviti snagu djela  
njegovih

Knjiga Sirahova, izr. 38,6

Obrada metodom protočne citometrije izrađena je u Zavodu za imunologiju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb. Imunohistokemijsko bojanje izrađeno je u Zavodu za patologiju KB Firule-Split.

Voditelj rada:

prof. dr. sci Drago Batinić

## Zahvale

Iskreno zahvaljujem voditelju prof.dr.sci Dragi Batiniću za stručnu i prijateljsku pomoć pri izradi ovog rada.

Zahvaljujem prof.dr.sci Matku Marušiću rukovoditelju Zavoda za imunologiju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb kao i ostalom osoblju, posebno laborantici gospođi Žaklini Čavar za nesebičnu pomoć.

Zahvaljujem se prof.dr.sci Vladimiru Hlavki na bezrezervnoj podršci i povjerenju koje mi je ukazao. Zahvaljujem prof.dr.sci Kameliji Žarković za pomoć pri ustupanju i korištenju arhivskog materijala. Zahvaljujem i ostalom osoblju Zavoda za neuropatologiju KBC Rebro-Zagreb.

Zahvaljujem ing Vesni Čapkun za stručne savjete u statističkoj obradi podataka.

Zahvaljujem svojim dragim kolegama i osoblju Odjela za patologiju KB Firule u Splitu na razumijevanju i podršci. Posebno se zahvaljujem lab. tehničarki gospođi Aniti Mateljan za izradu imunohistokemijski obojenih preparata.

Zahvaljujem svom prijatelju ing. Rolandu Šuša za kojega nije postojao nerješivi kompjuterski problem.

Zahvaljujem doc.dr.sci Branki Užarević za svesrdnu pomoć tijekom obrade laboratorijskih uzoraka protočnim citometrom. Bila je divan suradnik niz godina. Nažalost, nje više nema među živima.

# SADRŽAJ

---

## POPIS OZNAKA I KRATICA

1. UVOD .....	1
1.1. Povijesni osvrt i definicija .....	1
1.2. Pojavnost meningeoma .....	2
1.3. Etiologija i patogeneza .....	3
1.4. Histopatološke odlike meningeoma .....	5
1.5. Imunohistokemija i elektronska mikroskopija .....	11
1.6. Klinička slika .....	12
1.7. Liječenje i prognoza .....	13
1.8. Analiza stanične DNA tumorskog tkiva .....	19
1.9. Molekularne osobitosti meningeoma .....	22
2. SVRHA I CILJ RADA .....	33
2.1. Svrha rada .....	33
2.2. Cilj rada .....	34
3. MATERIJAL I METODE RADA .....	35
3.1. Bolesnici .....	35
3.2. Patohistološka analiza .....	35
3.3. Imunohistokemijsko bojanje .....	42
3.4. Analiza staničnog ciklusa rasta s pomoću protočnog citometra .....	46
3.5. Statistička obrada podataka ... ..	49
4. REZULTATI .....	50
4.1. Bolesnici .....	50
4.2. Kliničkopatološke grupe bolesnika sa meningeomom .....	51
4.3. Analiza recidivnih meningeoma iz prvog operacijskog zahvata .....	56
4.4. Analiza recidivnih meningeoma iz drugog operacijskog zahvata .....	58

4.5. Klasifikacija meningeoma (WHO) .....	68
4.6. Histološki stupnj meningeoma .....	69
4.7. Broj mitoza .....	71
4.8. Izražaj PCNA .....	73
4.9. Izražaj p53 .....	75
5. RASPRAVA .....	77
5.1. Značajnost histoloških parametara pri stupnjevanju meningeoma .....	77
5.2. Histološko stupnjevanje meningeoma .....	82
5.3. Kinetika rasta tumora .....	89
5.4. Protočna citometrija .....	95
5.5. Genetika .....	103
6. ZAKLJUČCI .....	110
7. SAŽETAK .....	113
8. SUMMARY .....	115
9. LITERATURA .....	117
10. POPIS SLIKA I TABLICA .....	128
10.1. Popis slika .....	128
10.2. Popis tablica .....	128
11. ŽIVOTOPIS .....	131



## POPIS OZNAKA I KRATICA

---

Ag NOR	- <i>nucleolar organizer regions</i> (argirofilna metoda)
BrdU	bromdeoksiuridin
Cdk	- <i>cyclins and cyclin dependent kinases</i> (ciklini i ciklin ovisne kinaze)
CEA	karcinoembrionalni antigen
c-oncs	stanični onkogeni
CT	kompjuterizirana tomografija
CV	koeficijent varijacije
DI	DNA indeks
DNA	dezoksiribonukleinska kiselina
EMA	antigen epitelijske membrane
EMR	elektromagnetska rezonanca
GADD45	- <i>growth arrest and DNA damage</i> (zastoj rasta i oštećenje DNA)
G0, G1, S, G2	faze staničnog rasta
GDP	gvanin difosfat
GTP	gvanin trifosfat
H&E	hemalaun i eozin
HPF	- <i>high power field</i> (veliko polje vidnog povećanja)
LI	indeks označavanja s pomoću radioaktivnog timidina
2N	oznaka za diploidni broj kromosoma
4N	oznaka za tetraploidni broj kromosoma
NF1	neurofibromatoza tip 1 ili von-Reclinghausenova bolest
NF2	neurofibromatoza tipa 2
PAS	perjodna kiselina i Schiffov reagens
PBS	fiziološka otopina puferirana fosforom
PCNA	- <i>proliferating cell nuclear antigen</i> (jezgrin antigen proliferirajućih stanica)
PCR	- <i>polymerase chain reaction</i>

(lančana reakcija polimeraze)

PI	proliferacijski indeks
PJ	propidijev jodid
Rb	retinoblastom
RS	Reed-Sternbergova stanica
SSCP	- <i>single-strand conformational polymorphism</i> (jednolančani konformacijski polimorfizam)
SŽS	središnji živčani sustav
v-oncs	virusni onkogeni
WHO	- <i>World Health Organization</i> ( Svjetska zdravstvena organizacija)



## 1. UVOD

---

### 1.1. Povijesni osvrt i definicija

Meninge su tek tanke prozirne ovojnice jednog veličanstvenog organa, pa se mogu doimati dosta beznačajanim. Međutim, one imaju svoje osobitosti i osnova su za nastanak posebnih, patološki važnih tumora (1). Moguće je da su meningeomi najduže poznati moždani tumori. I prije pojave klasične patologije privukli su pažnju liječnika i laika zato što ponekad proizvedu groteskne deformitete lubanje. Prvi zabilježeni opis meningeoma objavio je A. Louis 1774. godine kao "*les tumeurs fongueuses de la dure mère*" (2). Slijede ga Cruveilhier (1829), Lebert (1851) i Rokitsansky (1855). Virchow (1863) daje prve precizne opise sarkoma i epitelioma dure i psamoma. Golgijevim konceptom endotelioma započeta je polemika o podrijetlu meningeoma iz epitela dure. To pitanje je izgleda dobilo odgovor otkrićem M.B. Schmidta (1902) i Fernera (1940) da ovi tumori potječu iz arahnoidnih granulacija. Međutim, tek velika zbirka ovih tumora iz klinika Južne Amerike omogućila je konačnu klasifikaciju prema tipu tkiva, lokalizaciji i kliničkoj simptomatologiji. To je bio rezultat istraživanja Mallorya (1920) te Bileya i Eisenhardta (1938) (3).

Meningeomi su građeni od neoplastičnih meningotelijskih (arahnoidalnih) stanica i česti su intrakranijski tumori. Prema biološkim karakteristikama razlikuju se od većine ostalih intrakranijskih novotvorina po sporom rastu i obično ne infiltriraju mozak. Ako su povoljno smješteni, mogu se izliječiti ekscizijom. Histološki su heterogeni, iako posjeduju jasne zajedničke morfološke značajke. Kad se i manje varijacije uključe u subklasifikaciju, skupina meningeoma postaje velika. U klasičnoj monografiji Cushinga i Eisenhardta (1938) nabrojeno je devet glavnih tipova i dvadeset podtipova meningeoma, što je međutim više od akademskog značenja, jer većina njih

nema prognostički značaj (4). Jednostavnija klasifikacija razlikuje četiri tipa meningeoma: sincicijski, fibroblastni, tranzicijski i angioplastni, ali se nalaze i mješoviti tumori. Skoriji dodaci ovoj obitelji tumora priključuju mikrocističnu, sekrecijsku i papilarnu varijantu (1). Danas je u upotrebi sustav histološke podjele prema WHO (engl. World Health Organization) iz 1993. godine, koji ujedno omogućuje stupnjevanje meningeoma u klasične (I. stupnja), atipične (II. stupnja) i anaplastične ili maligne (III. stupnja). Međutim, kriteriji upotrebljeni za definiciju atipičnog i anaplastičnog oblika su još proturječni. Štoviše, definicija atipije i anaplazije u meningeoma je subjektivna i neujednačena, što dovodi do značajnih razlika između autora (5).

Iako se generalno smatraju benignim tumorima, meningeomi mogu prouzročiti ozbiljnu bolest zbog recidiva tumora. Objavljeno je mnogo radova u kojima je obrađen široki spektar kliničkih prognostičkih značajki. Iz njih proizlazi da anatomsko sjedište tumora (npr. baza lubanje), *en plaque* rast, invazija kostiju, mekog tkiva ili sinusa dure onemogućuju totalnu kiruršku resekciju koja je inače ključan faktor za prognozu bolesti. Većina autora slaže se da histološko stupnjevanje ipak pruža dodatne prognostičke podatke, a u nekim slučajevima daje smjernice za dodatnu terapiju (6).

## 1.2. Pojavnost meningeoma

Ustanovljeno je da meningeomi predstavljaju 13% do 26% primarnih intrakranijskih tumora, sa stopom godišnje incidencije 6/100 000 stanovnika (7). Mnogi meningeomi se ne otkriju za života jer su mali, a nađu se na autopsiji kao uzgredan nalaz u 1.4% slučajeva. Ovi slučajni meningeomi danas se češće otkrivaju za života zbog uvođenja kompjuterizirane tomografije (CT) i elektromagnetske rezonance (EMR) u rutinsku dijagnostičku upotrebu. Meningeomi su često multipli u pacijenata s

neurofibromatozom tipa 2 (NF2) i u nekim obiteljima s nasljednom sklonošću za meningeome, bez povezanosti s NF2. Sporadični meningeomi također mogu biti multipli, a javljaju se u manje od 10% slučajeva. Atipični meningeomi čine 4.7%-7.3% meningeoma, dok su anaplastični (maligni) meningeomi manje česti i čine 1%-2.8% svih meningeoma (5). Meningeomi su najčešći u osoba srednje i starije dobi, s vrškom pojavljivanja za vrijeme šeste i sedme dekade života. No, mogu se pojaviti i u dječjoj dobi, i u dubokoj starosti. U djece postoji tendencija ka mnogo agresivnijim oblicima meningeoma. U srednjoj dobnoj skupini češći su u žena, a odnos žena prema muškarcima je 1:1 ili čak 2:1. Od meningeoma u području leđne moždine značajnije češće oboljevaju žene. Meningeomi udruženi s nasljednim tumorskim sindromima općenito se javljaju u mlađih bolesnika i to podjednako u žena i muškaraca. Suprotno tome, atipični i anaplastični meningeomi mogu pokazivati značajnu predominaciju u muškaraca (8). Proliferativni indeksi meningeoma koji nastaju u muškaraca pokazuju tendenciju viših vrijednosti (5).

### 1.3. Etiologija i patogeneza

Najvažnija epidemiološka zapažanja o mehanizmu nastanka meningeoma uključuju povezanost s obiteljskim sindromom NF2, s prethodnim izlaganjem rendgenskom zračenju i drugim čimbenicima.

#### *Genetski čimbenici*

Meningeomi su uglavnom sporadični i solitarni tumori, no brojni nalazi ukazuju da postoji genetska predispozicija za nastanak meningeoma. Opisane su brojne obitelji s agregacijom meningeoma te dva monozigotna blizanca s multiplim meningeomima. Nadalje, opisan je mlađi muškarac s multiplim meningeomima koji su imali prstenasti kromosom 22. Također postoje uvjerljivi dokazi da pacijenti sa bilateralnim akustičkim neurinomima (sindrom NF 2) imaju znatno veću učestalost meningeoma. Postoje dva

glavna klinička oblika neurofibromatoze (NF). Periferni oblik je onaj u kojem nastaju brojni neurofibromi perifernog živčanog sustava (NF1 ili von-Reclinghausenova bolest). U centralnom obliku nastaju bilateralni neurinomi slušnog živca (NF2). Oba oblika pokazuju autosomno dominantni način nasljeđivanja (2). Incidencija bolesti je 1/40000 novorođenčadi. Oko 50% bolesnika nema prethodnu obiteljsku anamnezu za NF2, pa su ti meningeomi posljedica novonastalih mutacija. U bolesnika sa NF2, meningeomi nastaju u ranijoj dobi nego u bolesnika sa sporadičnim meningeomima. Ovi su tumori obično klasificirani u gradus I prema WHO. Svi histološki podtipovi klasičnog meningeoma mogu nastati u NF2, a atipični i maligni meningeomi nisu češći u tih bolesnika (9).

#### *Rendgensko zračenje*

Prvi opis meningeoma kao posljedice rendgenskog zračenja potječe iz 1953. godine. U njemu Mann i sur. opisuju četvorogodišnju djevojčicu kojoj je nakon resekcije glioma optičkog živca ozračena orbita sa 65 Gy (6500 rad) (10). Nakon latencije od četiri godine, u orbiti se razvio meningeom. Više od dvadeset godina kasnije Modan i sur. izvješćuju o meningeomima nastalim nakon zračenja kapilicija niskim dozama zbog *tineae capitis* (manje od 10 Gy ili 1000 rada), a nalazili su se pretežno na svodu lubanje (11). Na osnovu epidemiološke ankete na području Los Angelesa, Preston-Martin i sur. (1980, 1983) nalaze povezanost pojave meningeoma sa izlaganjem glave X-zrakama u djetinjstvu iz medicinskih i stomatoloških razloga (12,13). Meningeomi uzrokovani radioaktivnim zračenjem su najčešće atipični ili agresivni i multifokalni, pokazuju veće proliferativne indekse i općenito se pojavljuju u mlađoj dobnoj grupi (14). Meningeomi nastali pod utjecajem X-zračenja mogu se kategorizirati u tri skupine prema primljenoj dozi: inducirani niskim (<1000 rada), srednjim i mješovitim (1000-2000 rada) te visokim dozama zračenja (>2000 rada). U najvećeg broja pacijenata ozračen je kapilicij niskim dozama zračenja (800 rada)

zbog *tineae capitis*. Druga po veličini je grupa bolesnika koja je primala visoke doze zračenja zbog primarnih tumora mozga (>2000 rad), a vremenski raspon od trenutka zračenja do pojave tumora bio je 35.2 godine za prvu grupu, 26.1 godina za srednju, i 19.5 za grupu koja je primila visoke doze zračenja (15).

#### *Drugi čimbenici*

Uloga spolnih hormona u patogenezi meningeoma nije sasvim jasna (5). Pretežna zastupljenost žena među bolesnicima s meningeomom i brži rast tumora u trudnoći, kao i moguća povezanost meningeoma i raka dojke, ukazala je na ulogu spolnih hormona u etiopatogenezi ovih tumora (16,17). Dok je ekspresija estrogenih receptora veoma niska ili nedetektabilna u većine meningeoma, otprilike dvije trećine meningeoma izražava progesteronske receptore, s posebice višom frakcijom u meningeoma u žena (16-18). Izgleda da je prisustnost progesteronskih receptora u meningeomima povoljan prognostički čimbenik (17). Svakako ostaje utvrditi da li je ekspresija ovih receptora vezana za nastanak i rast meningeoma i da li se ona može primjeniti u odabiru hormonske terapije (19).

Ostali mogući uzročni čimbenici meningeoma, kao što su trauma i virusi, nisu dokazani (5).

#### 1.4. Histopatološke odlike meningeoma

Makroskopski su meningeomi dobro ograničeni okruglasti ili reznjasti tumori, čvrste konzistencije i jasno odijeljeni od mozga. Meningeomi pokazuju široki raspon histološkog izgleda (20-26). Klasifikacija kojom se služilo pri izradi ovog rada slijedi WHO sustav iz 1993. godine, a prikazan je u tablici 1. (27). Većina podtipova ima sličnu kliničku sliku, uz nekoliko izuzetaka koji će biti spomenuti. Pleomorfne jezgre i pokoja mitozu mogu se zapaziti u bilo kojem od podtipova, a da nužno ne podrazumijevaju agresivno ponašanje tumora. Naime kriterij za dijagnozu atipičnog



meningeoma ne zavisi isključivo od histološkog oblika. Od različitih podtipova meningeoma su daleko najčešći meningotelijski, fibrozni i tranzicijski. Mikroskopska klasifikacija koja slijedi citološke značajke predložena je od Helsinške grupe, ali ona nikada nije bila općenito prihvaćena. Helsinška klasifikacija razvrstava meningeome u četiri prognostička stupnja i zaslužuje pažnju jer daje smjernice za liječenje (14).

---

Tablica 1. Podjela meningeoma prema WHO (27)

---

Tumori meningotelijskih stanica

Meningeomi

Podtipovi: Meningotelijski  
 Fibrozni  
 Tranzicijski (mješoviti)  
 Psamomski  
 Angiomatozni  
 Mikrocistični  
 Sekretorni  
 Svijetlih stanica  
 Hordoidni  
 Bogat limfocitima i plazma stanicama  
 Metaplastični  
 Atipični meningeom  
 Papilarni meningeom  
 Anaplastični (maligni) meningeom

---

#### 1.4.1. Meningotelijski meningeom

U ovoj klasičnoj i čestoj varijanti meningeoma tumorske stanice stvaraju nakupine okružene kolagenim septama. Veće nakupine ne smiju se zamijeniti sa tzv. "stvaranjem polja" (engl. *sheeting*) i gubitkom strukture, odnosno izgledom tumora kakav se vidi u atipičnom meningeomu (6). Tumorske stanice unutar lobula stvaraju sincicij od nježnih zamršenih i fino isprepletenih staničnih produljaka, što se svjetlosnim mikroskopom ne može razlučiti. Tumorske stanice nalikuju stanicama arahnoidee, pa floridna arahnoidalna hiperplazija u malom bioptičkom uzorku može imitirati meningeom. Ova pojava često se vidi uz gliome optičkog živca. Ovalne jezgre i nježni izgled kromatina normalne arahnoidalne stanice značajka su i

meningotelijske tumorske stanice. Unutar jezgri ponekad se uočavaju okruglasti eozinofilni citoplazmatski produljci. Pojedine jezgre imaju centralna prosvjetljenja, vjerojatno kao posljedica odlaganja glikogena. U meningotelijskom meningeomu nisu česte vrtložne nakupine stanica u obliku lukovica niti psamomska tjelešca. Ako su prisutne, tada su slabije formirane nego u ostalim podtipovima meningeoma.

#### 1.4.2. Fibrozni (fibroblastni) meningeom

U fibroznom meningeomu tumorske su stanice pretežno vretenaste poput fibroblasta. Unatoč tomu, nalaze se stanice s izgledom jezgre karakterističnim za meningotelijski meningeom, što pomaže da se fibrozni meningeom razluči od ostalih tumora vretenastih stanica (npr. schwannoma) (28,29). U fibroznom meningeomu tumorske stanice stvaraju snopove s različitim sadržajem kolagena i retikulina oko i unutar njih. U nekim slučajevima sadržaj kolagena je izrazit. Unatoč tomu, ni u ovom obliku nisu česte vrtložne nakupine stanica u obliku lukovica, kao ni psamomska tjelešca.

#### 1.4.3. Tranzicijski meningeom

Ovi tumori imaju značajke i meningotelijskih i fibroznih meningeoma, pa otuda i potječe naziv "tranzicijski" ili "mješoviti". Prisutna je lobularna ili fascikularna građa, a područja citološki tipičnih meningotelijskih stanica su brojna. Obično su uočljive i brojne gusto porazmještene vrtložne nakupine stanica u obliku lukovica. U centrima lukovičastih tvorbi obično se nalaze psamomska tjelešca.

#### 1.4.4. Psamomski meningeom

Naziv se može upotrijebiti za meningeome s brojnim psamomskim tjelešcima, iako nije definiran broj psamomskih promjena dostatnih za dijagnozu te vrste tumora. Neoplastične stanice imaju tranzicijski izgled uz stvaranje lukovica, a neki od tumora

toliko su ispunjeni psamomskim tjelešcima da se samo pažljivim traženjem uočavaju meningotelijske stanice. Osobito često nastaju u spinalnom području torakalne regije, posebice u žena srednje životne dobi.

#### 1.4.5. Angiomatozni meningeom

U ovom obliku, histološkom slikom dominiraju brojne krvne žile koje prožimaju meningeom. Vaskularni kanali mogu biti mali ili srednje veliki, mogu imati tanke ili zadebljale hijalinizirane stijenke. Zavisno o veličini krvnih žila, diferencijalno dijagnostički u obzir dolaze vaskularne malformacije i kapilarni hemangioblastom (28).

#### 1.4.6. Mikrocistični meningeom

Za ovaj tip tumora karakteristične su stanice s izduženim produljcima i rahlom sluzavom podležećom stromom što daje izgled mnogih malih cističnih prostora. Mogu biti prisutne i brojne stanice pleomorfnog izgleda (20).

#### 1.4.7. Sekretorni meningeom

Značajka ovog meningeoma je diferencijacija epitela u intracelularne lumene koji sadrže PAS-pozitivni eozinofilni materijal. Ovi lumeni, poznati kao "pseudopsamomska tjelešca", boje se imunohistokemijski na karcinoembrionalni antigen (CEA) i ostale epitelne i sekretorne markere, dok su okolne stanice pozitivne na citokeratin. Ovi tumori mogu se javiti s povišenom razinom CEA u krvi (30,31), što može biti klinički značajno u pacijentica koje imaju i karcinom dojke. Sekretorni meningeomi mogu biti popraćeni značajnim peritumorskim edemom mozga (30).

#### 1.4.8. Meningeom svijetlih stanica

U ovim tumorima postoji značajna vakuolizacija citoplazmi koje su svijetle i PAS-pozitivne. Značajki klasičnih meningeoma može biti malo. Pokazuju sklonost nastanku u području pontocerebelarnog ugla i području caude equine. Izgleda da intrakranijski meningeomi svijetlih stanica mogu imati agresivnije ponašanje (23).

#### 1.4.9. Hordoidni meningeom

Ovi meningeomi sadrže područja koja su histološki jednaka hordomu s trabekulama eozinofilnih, vakuoliziranih stanica u podležućoj miksoidnoj stromi. Ova hordoidna područja izmiješana su s tipičnim meningeomskim područjima. Može biti uočljiv kronični upalni stanični infiltrat, a u nekih se pacijenata nalaze hematološke promjene koje odgovaraju Castlemanovoj bolesti (32).

#### 1.4.10. Meningeom bogat limfocitima

Kronični upalni infiltrat potiskuje u pozadinu meningotelijsku komponentu. Pri dijagnostici te vrste tumora mora se paziti da se ne zamijeni s drugim hematološkim stanjima, tim više što ovaj podtip može biti udružen s hematološkim poremećajima (32,33).

#### 1.4.11. Metaplastični meningeom

Mezenhimska diferencijacija je rijetka, ali je izrazita značajka nekih meningeoma. Meningotelijski, fibrozni ili tranzicijski tumori mogu pokazivati koštanu, hrskavičnu, lipomatoznu, miksoidnu ili ksantomsku promjenu. Klinički značaj ovih promjena nije jasan, ali se moraju histološki razlikovati od meningeoma s invazijom kosti.

#### 1.4.12. Atipični meningeom (II stupanj prema WHO)

Taj je meningeom definiran kao tumor u kojem se vide neke od sljedećih značajki:

- česte mitoze
- povećana celularnost
- male stanice sa visokim odnosom jezgra/citoplazma i/ili uočljivi nukleoli
- područja gubitka strukture, odnosno pločastog rasta (engl. *sheet-like*)
- žarišta "spontane" ili "geografske" nekroze.

Ovaj opis sadrži sve važne značajke, ali ostaje subjektivan. Ostale definicije atipičnog meningeoma nude egzaktne kriterije, kao na primjer povećanu celularnost i najmanje pet mitozu po polju velikog vidnog povećanja (5).

Teško se precizno izjasniti o stopi recidiva atipičnih meningeoma. To dijelom proizlazi iz varijabilne definicije "atipičnog" u nekim objavljenim studijama, kao i zbog uključenja hemangiopericitoma (angioplastnih meningeoma) u drugima. Prema jednoj studiji, stopa recidiva tumora u petogodišnjem razdoblju nakon prve resekcije tumora iznosila je 3% za klasične dobro diferencirane meningeome, 38% za atipične tumore i 78% za anaplastične (34). Prema drugoj studiji, u kirurški potpuno reseciranih tumora stopa recidiva za 5, 10 i 15-godišnje razdoblje bila je 33% za klasične, 67% za atipične i 100% za maligne meningeome (35,36).

#### 1.4.13. Anaplastični ili maligni meningeom (III stupanj prema WHO)

Kriteriji za dijagnozu anaplastičnog (malignog) meningeoma također su subjektivni (8,35-37). Prema WHO je definiran kao meningeom koji pokazuje histološke značajke jasne malignosti, odnosno abnormalnosti u mnogo većem obimu nego što se vidi u atipičnom meningeomu. Ovo uključuje očitu malignu citologiju, visoki mitotički iznos i jasne nekroze. Nadalje, dok neki invaziju mozga smatraju znakom anaplastičnog meningeoma, ona se može naći i kod inače klasičnih tumora (5).

Invazija mozga je, po definiciji, prije znak malignog nego atipičnog meningeoma, iako su atipični tumori obično široko pričvršćeni za površinu *pie mater*. Ne postoji jasna razlika između površinskog perivaskularnog širenja i duboke ekspanzivne penetracije perivaskularnih prostora bez proboja pialne barijere, tj. tako duboke infiltracije da predstavlja *de facto* invaziju (35).

#### 1.4.14. Papilarni meningeom

Nekoliko histoloških tipova meningeoma bilo je povezano s češćim recidivom i/ili agresivnijim ponašanjem. Od njih je najbolje opisan papilarni meningeom, rijedak tumor definiran perivaskularnim pseudopapilarnim tvorbama barem u dijelu tumora (38). Jezgre su jednolične, nalik na meningotelijske, posebno u područjima gdje izgledaju kao obični meningeomi. Stanice koje završavaju na krvnim žilama papila imaju vitke nastavke slične pseudorozetama u ependimoma. Može se naći međustanični retikulin. Vrtlozi i psamomska tjelešca obično se ne vide u papilarnim područjima. Mitoze su prisutne, ali njihov broj varira. Papilarni meningeomi se najčešće javljaju u mladih pacijenata (38,39). Lokalna invazija i invazija mozga su zamijećene u 75% ovih tumora, recidiv u 55%, a metastaze u 20%. Zbog njihovog agresivnog kliničkog ponašanja oni se razvrstavaju u tumore II. i III. stupnja prema WHO.

#### 1.5. Imunohistokemija i elektronska mikroskopija

Većina meningeoma se oboji na antigen epitelijske membrane (EMA), iako je bojenje na EMA slabije izraženo u atipičnim i malignim tumorima (40,41,42). Ne iznenađuje što je pozitivni nalaz više izražen u meningotelijskim i tranzicijskim tumorima, koji na ultrastrukturnom nivou pokazuju veću epitelnu diferencijaciju nego fibrozni oblik. Bojenje je često fokalno, najviše u hordoidnom tipu. Nažalost, u brojnim

meningeomima se gubi membransko bojenje, a reakcija se vidi samo u citoplazmi. Reakcija na citokeratin tipično je prisutna u sekretornom meningeomu, a u mnogo manjem udjelu u uobičajenom meningotelijskom i tranzicijskom tipu (35). Pozitivnost na vimentin je nađena u svim meningeomima. Imunohistokemijske studije s proteinom S-100 pokazale su različiti broj pozitivnih tumora, ali ovo bojenje obično nije znatno izraženo. Sekretorni meningeom karakteristično se boji na CEA u pseudopsamomskim tjelešcima, a na citokeratin u stanicama koje ih okružuju (22,29,30). Papilarni meningeomi poput većine ostalih pokazuju imunoreaktivnost na EMA i mogu jednako tako pokazivati reaktivnost na citokeratin i S-100. Stupanj reakcije obično opada s porastom anaplazije (27). Dijagnostičke ultrastrukturne značajke meningeoma uključuju brojne izdužene intermedijarne filamente (vimentin), kompleks interdigitirajućih staničnih produžetaka posebno u meningotelijskom obliku i dezmozomske međustanične spojeve (22,23,39).

#### 1.6. Klinička slika

I povijest bolesti i postmortalni nalazi malih slučajnih meningeoma ukazuju na spor rast ovih tumora. Dosta opsežna serija Frazier-Grantove zbirke analizirana od Earla i Richanya pokazuje da je prosječno trajanje od najranijih simptoma bolesti do dijagnoze, bilo dvije i pol godine, s malim brojem pacijenata koji su imali simptome više od šest godina prije nego je tumor bio dijagnosticiran. Najčešće teškoće bile su glavobolja, poremećaji vida i žarišni epileptički napadi. Epileptički napadi obično su prvi simptom meningeoma na području površina konveksiteta obje hemisfere velikog mozga (43).

Meningeomi su najčešće smješteni na moždanim ovojnica parasagitalnih regija, zatim na lateralnim cerebralnim konveksitetima. Značajni broj izrasta iz falksa cerebri i često strši s obje strane dure u obliku kruškolikih masa koje potiskuju frontalne

režnjave. Grupa meningeoma koja nastaje na bazi mozga, posebno na sfenoidnom rubu i na tuberkulum sellae, može predstavljati znatan kirurški problem. Ostala sjedišta uključuju olfaktorne brazde, pontocerebelarni ugao i petrozni rub temporalne kosti; u posljednjem slučaju tumor je pričvršćen za tentorium cerebelli. Sljedeće mjesto nastanka tumora je foramen magnum u stražnjoj lubanjskoj jami, ali je ta lokacija ipak rijetka. U sva tri slučaja tumor tendira biti povezan s glavnim venskim sinusima dure. Rast na konveksitetima uključuje sagitalni sinus u oko 50% slučajeva, a većina tumora obuhvaća srednju trećinu sinusa. Općenito govoreći, prednja polovica lubanjske šupljine je mnogo češće zahvaćena od stražnje.

U kralježničnom kanalu najčešće je zahvaćena torakalna regija. Kao i u lubanjskoj šupljini, mnogi meningeomi su čvrsto pričvršćeni za duru. Oni su obično u bliskom odnosu i čak pričvršćeni za korijene živaca na mjestu gdje oni izlaze iz subarahnoidalnog prostora, pa u tom slučaju meningeomi mogu imitirati tumore živčanih ovojnica. Meningeomi se rijetko u cjelosti nalaze ekstraduralno. Intraventrikularni meningeomi su dobro poznati i nastaju kako iz tele chorioideae, tako i iz strome horioidalnog pleksusa. Postoji jasna predilekcija za lijevu stranu iako su, ali rjeđe, nađeni u trećoj i četvrtoj komori. Ostala rijetka primarna sjela meningeoma uključuju orbitu, gdje ove neoplazme nastaju iz ovojnice optičkog živca, petrozni dio temporalne kosti, ekstrakalvarijalni plato i ekstrakranijalna područja koja obično uključuju glabelu fossae pterigopalatine. Pretpostavlja se da na tim mjestima nastaju od arahnoidalnih ektopija (43).

### 1.7. Liječenje i prognoza

Odstranjenje meningeoma mora biti toliko radikalno koliko je to sigurno za pacijenta. Neki meningeomi moraju se proglasiti neizlječivima, a operacija se mora predložiti samo ako postoje dobri izgledi da će bolesnik biti bolje ili barem ništa gore nego prije



operacije. Simpson je 1957. godine predložio da se operacije meningeoma dijele u pet različitih stupnjeva (44). *Prvi stupanj*: potpuno makroskopsko odstranjenje tumora sa ekscizijom hvatišta na duri i svake abnormalne kosti. *Drugi stupanj*: potpuno makroskopsko odstranjenje tumora i svih vidljivih izdanaka sa koagulacijom hvatišta na duri. *Treći stupanj*: potpuno makroskopsko odstranjenje intraduralnog tumora bez resekcije ili koagulacije hvatišta na duri. *Četvrti stupanj*: djelimično odstranjenje. *Peti stupanj*: jednostavna dekompresija i biopsija tumora. Za očekivati je da je radikalnija operacija praćena manjim stupnjem relapsa tumora (45).

Simpson je utvrdio da je stopa recidiva nakon operacija I. stupnja 9%, a poslije operacija II. stupnja čak 19%. Nakon operacija tumora višeg stupnja, stopa recidiva je mnogo veća. Iz njegovih studija proizlazi da su četiri čimbenika povezana s recidivom meningeoma: subduralno resičasto zadebljana dura u okolici tumora, infiltracija dure, invazija venskih sinusa i širenje tumora po duralnom septumu. Njegova zapažanja ukazuju da postoji veza s durom koja omogućuje ponovni rast tumora. Moguće je da se radi o novim meningeomima koji su izrasli iz okolne bliske dure (46).

Borovich i sur. (1986) su mikroskopski analizirali reseciranu duru 14 bolesnika s meningeomom i usporedili nalaze s kontrolnom skupinom od 10 neurokirurških bolesnika koji su bili operirani iz drugih razloga. Oko meningeoma dura je bila resecirana u širini od najmanje 3 cm. Kontrolnoj skupini neurokirurških pacijenata uzeti su uzorci dure sa konveksiteta. Meningotelijske nakupine stanica nađene su u svim uzorcima bolesnika s meningeomom, ili u obliku intraduralnih nakupina ili u obliku čvorića koji su se nalazili na unutrašnjoj površini dure. Benigni izgled stanica i prevaga benignih tipova meningeoma u ovoj studiji izgleda da isključuju malignost. Kontrolni uzorci s konveksiteta dure mater neurokirurških bolesnika bez meningeoma nisu pokazivali nakupine meningotelijskih stanica. Ovo ukazuje da solitarni globularni

meningeom predstavlja samo vidljivi rast u sredini neoplastično promijenjenog polja koje se proteže u širokom području dure mater. Autori vjeruju da to može objasniti neke od kasnih neočekivanih recidiva i preporučuju što širu eksciziju dure kad god je to moguće. Međutim, ostaje za utvrditi što uzrokuje ubrzani rast ovih staničnih nakupina nakon odstranjenja dominantnog tumora (47).

Jaaskelainen i sur. (1986) analizirali su grupu od 657 bolesnika s benignim meningeomima, od kojih se u 59 tumor ponovo javio. Multivarijatna analiza pokazala je da su koagulacija dure u odnosu na potpuno odstranjenje, invazija kosti tumorom i mekana konzistencija tumora faktori rizika za recidiv meningeoma ( $p < 0.01$ ) (46).

U narednoj studiji Jaaskelainen i sur. (1986) proučavali su 936 primarnih intrakranijalnih meningeoma, od kojih je bilo 115 recidivnih tumora. Razvrstali su ih u četiri stupnja, bodovanjem histoloških značajki od 0 do 18, i usporedili kliničko ponašanje atipičnih (II) i anaplastičnih (III) u odnosu na benigne meningeome (I) (34). Pet godina nakon potpunog odstranjenja stopa recidiva iznosila je 3% za benigne meningeome, 38% za atipične i 78% za anaplastične. Atipični i anaplastični meningeomi rastu u sličnom omjeru, mjereno vremenom do pojave recidiva nakon potpunog odstranjenja, ali mnogo brže od benignih. Nemoguće je predvidjeti koji će se benigni meningeom ponovno javiti nakon potpunog odstranjenja. U meningeoma s ograničenim znakovima histološke anaplazije, ovdje nazvanih atipičnima, fokalne nekroze bile su češće u meningeomima koji su se ponovno javili. U istoj seriji tumora radioterapija nije spriječila ponovni rast tumora nakon potpunog odstranjenja anaplastičnih meningeoma (34).

Wilson (1994) drži da kirurški zahvat nije nedovoljan tretman za maligne meningeome (14). Od 60 pacijenata s malignim meningeomima, njih 24 je bilo liječeno samo kirurški, bez dodatne terapije. Srednje vrijeme preživljenja bolesnika iznosilo je 2 godine. Od preostalih bolesnika, 26 je bilo zračeno nakon operacije, a 10

je liječeno zračenjem i kemoterapijom koja je sastojala od kombinacije ciklofosfamida, doksorubicin-hidroklorida i vinkristina. Kemoterapija je dala razočaravajuće rezultate u malignih meningeoma, ali je radioterapija bila dosta učinkovita. Postoperativno zračenje dozama većim od 52 Gy uspješno je za prevenciju ponovnog rasta subtotalno operiranih benignih meningeoma i svih malignih meningeoma (14).

Iako je upotreba zračenja kontroverzna, Carella i sur. (1982) smatraju da je postoperativno zračenje indicirano u svim slučajevima malignih meningeoma, pa čak i kad je resekcija potpuna (48). Bolesnici s nepotpunom resekcijom meningeoma općenito moraju biti postoperativno ozračeni. U slučajevima rekurentnih meningeoma, posebno u mlađih pacijenata, radioterapija se mora primijeniti bilo preoperativno bilo postoperativno (48).

Mahmood i sur. (1993) smatraju da zračenje ne prevenira niti odgađa ponovnu pojavu tumora, pa stoga ne primjenjuju postoperativno zračenje nakon potpunog odstranjenja malignog meningeoma zbog mogućih komplikacija od zračenja (36).

Yunis i sur. (1995) podupiru ovo stajalište smatrajući da radioterapija nije pokazala učinkovitost u malignim meningeomima, kao što je to pokazala za benigne. Iako je korist od postoperativne radioterapije upitna, ona se još uvijek preporučuje. Tradicionalna kemoterapija pokazala se neučinkovitom, pa je stoga potrebno otkriti nova kemoterapijska sredstva (8).

S obzirom da meningeomi vrlo rijetko metastaziraju, konačna prognoza nakon ekscizije najviše ovisi o potpunosti lokalne resekcije. Većina meningeoma prikladna je za totalnu resekciju pa kirurgija ostaje primarnim terapijskim čimbenikom. On je određen odnosom tumora prema okolnim strukturama, kao što su moždani živci, krvne žile, kost i meka tkiva. Za ostatne tumorske stanice može se očekivati da se umnožavaju, kao što je ilustrirano za Cushingovog i Eisenhardtovog pacijenta

Timothy Donovana, koji je u razdoblju od deset godina podvrgnut brojnim operacijama, a ukupna odstranjena masa primarnog i rekurentnih tumora iznosila je 1350 g. Ponovni rast može započeti iz sitnih kolonija stanica koje nisu zamijećene prilikom operacije, a također može nastati od malenih satelitskih područja multicentričnih tumora. Među meningeomima koji su potpuno odstranjeni, ponovni rast se javlja u oko 10%-15% bolesnika, iako ovaj broj varira u ovisnosti o lokalizaciji tumora. Obaveza je patologa da, uočavajući makroskopske i mikroskopske značajke tumora, odredi što god je više moguće potpunost ekscizije, moguću vjerojatnost i brzinu recidiva tumora kao i moguću agresivnost tumora. Nažalost, mnogi meningeomi moraju se odstranjivati u komadićima, pa je invaziju mozga ili okolnih struktura, kostiju i kranijalnih živaca teško vrednovati. Rubovi se mogu točno procijeniti samo kada je tumor sa okolnim strukturama odstranjen *en bloc*. Kada je prisutna kortikalna invazija, ona je obično udružena sa velikom celularnošću i povećanom mitotičkom aktivnosti tumorskih stanica. U prisutnosti ovakvih pokazatelja, agresivno ponašanje se može predvidjeti (1).

Histološke značajke koje služe kao pokazatelji agresivnog ponašanja ili predskazatelji ponovnog brzog rasta tumora uključuju veliku celularnost, žarišta nekroze, uočljive nukleole, povećani broj mitoz, invaziju mozga i pojavu "brisanja strukture". Postoji opće slaganje oko toga da histološki tip meningeoma, sa iznimkom papilarne ili "angioblastne" varijante, ima malo veze s pojavom i brzinom recidiva tumora (43).

Poznat je slučaj pacijentice Doroty May Rusell, koja je 17 puta podvrgnuta operativnom zahvatu zbog meningeoma i naknadnih recidiva, a uzorci tumorskog tkiva na početku bolesti nisu pokazivali papilarnih struktura. One su bile vidljive tek u recidivu tumora i u plućnim metastazama. Da li su malignost i njen tok određeni papilarnošću ili drugim faktorima? Kepes preporučuje da buduće studije ne isključuju

papilarni meningeom i da definiraju žarišta papilarnosti kao loš prognostički znak u bilo kojem meningeomu i s istim prognostičkim značajem kao nalaz velikog broja mitozna ili područja nekroze tumora (49).

Prognostička vrijednost histoloških značajki vezanih za recidiv meningeoma bila je predmetom mnogih studija. Iako se prisustnost brojnih "zloslutnih" histopatoloških značajki meningeoma smatra pokazateljem malignosti ili progresivnog rasta, pojedini autori našli su da histološki kriteriji imaju slab prognostički značaj. Ponovni rast tumora nije ograničen samo na meningeome s malignim histološkim značajkama, već se javlja i u benignim meningeoma (50). Zato se biološko ponašanje meningeoma i rizik recidiva u pojedinog bolesnika ne može predvidjeti samo na osnovu histologije. Iako se širina kirurške ekscizije smatra važnim faktorom u predviđanju recidiva tumora, 2.3% do 30% histološki benignih meningeoma ponovno se javlja nakon makroskopski kompletne kirurške resekcije. Stopa recidiva za atipične i maligne meningeome još je veća. U pokušaju da se identificiraju tumori sa agresivnijim kliničkim ponašanjem, brojni su autori pokazali povezanost između recidiva meningeoma i pojedinih histoloških značajki tumora, nalaza protočno-citometrijske analize, *in situ* ugradnje bromodeoksiuridina ili imunohistokemijskog bojenja na Ki-67. Visoki mitotički indeks općenito je smatran važnim pokazateljem recidiva tumora, ali čak je i to dovedeno u pitanje. Zbog toga ostaje utvrditi jasne i reproducibilne kriterije za sklonost menigeoma recidiviranju (51).

U ovom radu istražen je sadržaj DNA (ploidnost), parametri rasta (proliferacije) i oštećenje antiproliferacijskog gena u vidu ekspresije proteina p53 na operativnim uzorcima 130 meningeoma.

### 1.8. Analiza stanične DNA tumorskog tkiva

Dezoksiribonukleinska kiselina (DNA, od engl. *deoxyribonucleic acid*) sadržana u kromosomima eukariota, osnovna je molekula genetičke informacije. Sadržaj DNA, kao pokazatelj staničnog ciklusa, može se odrediti na nekoliko načina: metodama molekularne biologije, citogenetike, citofotometrije i protočne citometrije. Analizom ukupnog sadržaja DNA pojedinačnih stanica suvremenom tehnologijom dobivene su nove spoznaje o biološkim osobitostima i kliničkom ponašanju tumora u ljudi (52).

Normalne somatske stanice imaju vrlo očuvanu genetsku stabilnost te, ovisno o tipu tkiva, očekivanu razinu proliferacije. Kada je broj kromosoma normalan za određenu vrstu, govori se o euploidiji. U čovjeka euploidija predstavlja haploidni (N) i diploidni (2N) broj kromosoma, od kojih je haploidni broj vezan jedino za zrele gamete, dok ostale tjelesne stanice imaju diploidni broj kromosoma.

Protočnom citometrijom mogu se dobiti vrlo vrijedni podaci u odnosu na kromosomski sadržaj, jer kvantitativna analiza DNA odražava ukupni kromosomski sadržaj stanica. Međutim, protočnom citometrijom nije moguće otkriti kvalitativne promjene kromosoma (nepravilnosti građe kromosoma) kao što su delecije, adicije i recipročne translokacije, niti višak ili manjak 2-5% ukupnog sadržaja DNA, što odgovara višku ili manjku jednog do tri ljudska kromosoma (53).

Osnovna načela analize sadržaja DNA protočnom citometrijom su slijedeća:

1. u različitim fazama životnog ciklusa normalne stanice imaju različit, ali poznati sadržaj DNA;
2. fluorokromi se vežu za DNA u stehiometrijskom odnosu, tako da je intenzitet obojenosti izravno razmjern sadržaju DNA; i
3. normalne stanice su euploidne, dok su zloćudno promijenjene stanice sklone aneuploidiji.

U staničnom ciklusu razlikujemo slijedeće faze (54):

1. G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>- postmitotska faza u kojoj se stvaraju bjelančevine. G<sub>0</sub> faza je faza mirovanja stanica. Normalne diploidne stanice u toj fazi imaju isti broj kromosoma (46 kromosoma; 2N), a to znači i isti sadržaj DNA (2C). Stanice u G<sub>1</sub>-fazi (presintetska faza) stvaraju RNA i bjelančevine potrebne za sintezu DNA. Vrijeme trajanja te faze različito je za različite vrste stanica i uglavnom iznosi oko 10 sati;
2. tijekom S-faze (faza sinteze DNA) postupno se povećava sadržaj DNA (od 2C do 4C), a broj kromosoma se udvostručuje (od 2N do 4N). Ova faza traje oko 8 sati;
3. G<sub>2</sub>/M-faza jest faza staničnog ciklusa u kojoj sadržaj DNA iznosi 4C. U premitotskoj fazi G<sub>2</sub> (traje 2-5 sati) stanica se priprema za dijeljenje. U mitozu (traje oko 11 sati) nastaju dvije nove stanice s 2C sadržajem DNA, odnosno novonastale stanice imaju isti broj kromosoma kao i početna stanica.

Analiza sadržaja DNA na protočnom citometru obuhvaća (55):

1. Analizu ploidnosti vrška u G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-fazi staničnog ciklusa, gdje se sadržaj DNA izražava kao relativna vrijednost u odnosu na stanice standarda i izražava kao DNA indeks (DI). Za diploidni uzorak DI iznosi 1.0. Diploidno tkivo ima nazočan jedan G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-vršak na histogramu DNA;
2. Analizu pojedinih faza staničnog ciklusa izraženu u relativnom postotku (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-, S- i G<sub>2</sub>/M-faza).

Materijal za analizu mogu biti: stanice periferne krvi, koštane srži, limfnog čvora, izljevi, svježe nefiksirano tumorsko tkivo, svježe smrznuto tkivo te tkivo fiksirano u formalinu ili uklopljeno u parafin. Kod solidnih tumora izuzetno je važno poznavati staničnu strukturu ispitivanog tkiva, pa je za analizu potrebno uzeti najreprezentativniji dio tumora s najmanje 30% tumorskih stanica. Iz uzorka treba

eliminirati upalne ili nekrotične stanice. Zbog heterogenosti tumorskog tkiva preporuka je da se analizira više uzoraka istog tumora. Debljina parafinskih rezova i vremensko razdoblje čuvanja uzoraka važni su za kvalitetnu pripremu uzoraka. Enzimaska razgradnja tumorskog tkiva može proizvesti enzimima inducirane biokemijske promjene u jezgri, što uzrokuje nastanak artefakata, gubitak tumorskih stanica, pojavu lažnog aneuploidnog vrška, nemogućnost otkrivanja aneuploidnog vrška te nedostatno vezanje boje (56).

Za bojenje uzoraka rabe se različiti fluorokromi. Najčešće je to propidijev jodid (PJ). Bojenje stanične DNA kemijska je reakcija u ravnoteži, pa stoga broj stanica ili jezgri koje se boje i koncentracija boje koja se rabi moraju biti u ravnoteži. PJ nije specifična boja za DNA, već se veže i za RNA, pa je stoga potrebna prethodna razgradnja RNA. Fiksacija uzorka tkiva može značajno utjecati na stabilnost DNA. Pri fiksaciji formalinom stvara se križna veza između krajnjih aminokiselinskih skupina proteina i histonskih molekula DNA, što uvjetuje smanjeno vezanje boje. Zbog tog su razloga vrijednosti koeficijenta varijacije (CV) fluorescentnih vršaka u uzorcima iz parafinskih blokova veći nego u svježem nefiksiranom tkivu.

#### 1.8.1. Protočni citometar

Protočni citometar je kombinacija lasera, elektroničkog računala i mehaničkog sustava za stvaranje protoka stanica. Laser stvara koherentno svjetlo koje pobuđuje fluorescenciju jezgara (DNA) obojenih s PJ. Na elektroničkom računalu se automatski obrađuju signali sa stanice i prikazuju na ekranu u željenom obliku i kombinacijama. Mehanički sustav stvara protok stanica. U postupku razvrstavanja dodaje mu se i elektronički dio koji omogućava razvrstavanje (57).

Kontrola kvalitete analize DNA protočnom citometrijom postiže se uporabom standarda. Prethodno se mora učiniti kontrola mjernog aparata tj. provjera točnosti i



linearnosti s pomoću standardiziranih kuglica npr. DNA-Check Fluorospheres, dok se optimalna rezolucija postiže sporim protokom uzoraka. Biološki standard, npr. pileći eritrociti ili humani limfociti rabe se za provjeru ispravnosti reagensa za bojenje. Ovi standardi ne mogu se rabiti za analizu uzoraka uklopljenih u parafinski blok, već se u te svrhe rabi normalno tkivo istog uzorka zbog istog načina vezanja boje. Uporaba standarda osigurava stalni položaj diploidnog vrška, a to znači stalnu srednju vrijednost intenziteta fluorescencije i CV unutar očekivanog raspona (58).

### 1.8.2. Tumačenje histograma DNA

U literaturi se definicija ploidije i proliferacijske aktivnosti tumorskih stanica vrlo razlikuju. Tako Wersto i sur. (1991) opisuju 38 definicija za aneuploidiju DNA (59). Najveći broj autora aneuploidiju definira kao dodatni vršak G0/G1-vršku ili dodatni vršak s  $DI < 0.9 > 1.0$ . Rijeđe se aneuploidija definira kao dodatni vršak s  $DI > 1.25$  ili udjelom stanica u G2/M-fazi  $> 25\%$ . Konačna preporuka za definiciju DNA aneuploidije je nazočnost dva odvojena vrška u G0/G1-fazi staničnog ciklusa. Proliferacijska aktivnost tumorskih stanica izražava se kao udio stanica u S-fazi staničnog ciklusa (60).

### 1.9. Molekularne osobitosti meningeoma

Molekularne genetske analize različitih tumora pokazale su da je nastanak zloćudnih tumora postupni proces koji uključuje brojne genetske abnormalnosti (61). Genetska hipoteza nastanka raka drži da je tumorska masa rezultat klonskog rasta proisteklog od jedne stanice koja je pretrpjela genetsko oštećenje (tj. tumori su monoklonski). Glavne mete genetskog oštećenja su tri razreda normalnih regulacijskih gena: a) protoonkogeni koji promiču rast; b) inhibitori rasta, tj. tumor-supresijski geni (antionkogeni); i c) geni koji reguliraju programiranu staničnu smrt ili apoptozu.

Četvrta kategorija, geni koji reguliraju popravak oštećene DNA, također sudjeluju u karcinogenezi (62).

### 1.9.1. Onkogeni

Onkogeni ili geni uzročnici raka nastaju iz protoonkogeni, staničnih gena koji promiču normalni rast i razvoj jer sudjeluju u normalnoj kontroli stanične proliferacije (62). Protoonkogeni kodiraju proteine koji djeluju kao čimbenici rasta, receptori čimbenika rasta, čimbenici važni u prijenosu signala i kao proteini jezgre važni u regulaciji prepisivanja. Promjena samo jednog alela može uzrokovati aktivaciju onkogeni.

Protoonkogeni mogu postati onkogenični transdukcijom s retrovirusima (v-oncs) ili pod utjecajem koji oštećuje njihovo ponašanje *in situ* pretvarajući ih u stanične onkogene (c-oncs). Najčešća oštećenja koja dovode do strukturnih i funkcijskih promjena su točkaste mutacije, preuređenje kromosoma (translokacije i inverzije) i genska amplifikacija (62).

U normalnim, fiziološkim uvjetima, stanična proliferacija može se podijeliti u nekoliko faza, a rezultat svih stimulatora promaknuća rasta je ulaz mirujuće stanice u stanični ciklus (63). Faze stanične proliferacije uključuju sljedeće događaje:

- vezanje faktora rasta za specifični receptor stanične membrane;
- prolaznu i ograničenu aktivaciju receptora faktora rasta koji povratno aktiviraju nekoliko proteina za prijenos signala na unutarnjoj površini plazma membrane;
- prijenos signala kroz citosol do jezgre s pomoću drugih glasnika;
- indukciju i aktivaciju regulacijskih faktora koji započinju prepisivanje DNA;
- ulazak i progresiju stanice u stanični ciklus što konačno rezultira diobom.

Proteini za prijenos aktivacijskog signala su heterogeni. Najbolje proučeni primjer je onkoprotein iz obitelji *ras* gvanin trifosfata (GTP)-vezujućih proteina. Najprije su otkriveni kao virusni onkogeni. Mutacija gena *ras* je najčešća abnormalnost dominantnih onkogeni u ljudskim tumorima. Nekoliko studija govori da *ras* igra važnu ulogu u mitogenezi uzrokovanoj faktorima rasta. Kada je stanica stimulirana faktorima rasta ili ostalim receptorskim interakcijama, *ras* se aktivira izmjenom GDP za GTP. U normalnoj stanici, aktivirano stanje proteina *ras* je prolazno, jer unutrašnja GTP-azna aktivnost hidrolizira GTP u GDP i tako vraća *ras* u mirovanje (63).

Prolazak stanice iz G0 u S-fazu je moduliran nizom proteina nazvanih ciklin-ovisnim protein-kinazama (Cdks), koje su katalitički partneri ciklina. Svaka Cdk reagira sa posebnom podgrupom ciklina, a svaki ciklin može reagirati sa brojnim Cdk (64).

Izgleda da *ras* kontrolira Cdks još uvijek nepoznatim mehanizmom (63).

### 1.9.2. Tumor-supresijski geni

Dok protoonkogeni kodiraju proteine koji potiču stanični rast, produkti tumor-supresijskih gena zaustavljaju staničnu proliferaciju. Na neki način, naziv tumor-supresijski, je pogrešan, jer fiziološka uloga ovih gena je da reguliraju stanični rast, a ne da spriječavaju nastanak tumora. Proučavajući dosta rijetki tumor retinoblastom (Rb), Knudson je postavio svoju hipotezu onkogeneze (62). Oko 60% retinoblastoma nastaje sporadično, a preostalih 40% su obiteljski, kada se naslijeđuju autosomno dominantno. Da bi objasnio obiteljsko i sporadično pojavljivanje gotovo istog tumora, Knudson je predložio dvostruki recesivni model (engl. "*two-hit*") zbivanja. Pretpostavio je da je u obiteljskim slučajevima jedna genska promjena (engl. "*first hit*") naslijeđena od zahvaćenog roditelja i prisutna je stoga u svim somatskim stanicama organizma, dok se druga mutacija (engl. "*second hit*") javlja u jednoj od brojnih stanica retine (koja već nosi prvu mutaciju). U sporadičnim slučajevima obje

mutacije zbivaju se u jednoj stanici retine, čijim rastom nastaje tumor. Kako je Rb-gen udružen s tumorom kada su obje normalne kopije gena izgubljene, ponekad se naziva i recesivnim karcinomskim genom (63).

Gen Rb pronađen je na dugom kraku kromosoma 13. Produkt gena Rb je protein molekularne mase od 110 kDa koji regulira kompleks čimbenika prepisivanja E2F-DP (E2F-1, 2 te DP-1, 2 i 3) (65). Taj kompleks regulira brojne gene koji su nužni za pokretanje i napredovanje S-faze staničnog ciklusa, uključujući cikline E i A, dihidrofolat-reduktazu i jezgrin antigen stanične proliferacije (engl. PCNA, *proliferating cell nuclear antigen*). Fosforilacija proteina RB s pomoću ciklina D1-Cdk4 uzrokuje otpuštanje proteina E2F-DP iz Rb-kompleksa, što za posljedicu ima aktiviranje njihovog prepisivanja (64).

Način funkcioniranja pRb-E2F osnovice u regulaciji prijelaza G1 u S-fazu nije još u cijelosti jasan, ali je jasno da je stanje fosforilacije Rb kritična odrednica u progresiji staničnog ciklusa (63).

Postoje dokazi da jedna neograničena aktivnost proteina E2F (kakva se javlja s gubitkom oba Rb alela) ne samo da pokreće stanični ciklus, već također započinje apoptozu. Ova akcija E2F potrebuje funkciju gena p53 (66).

### 1.9.3. Tumor supresijski gen NF2

Mutacije NF2 gena u zametnim stanicama uvjetuju razvoj neurofibromatoze tipa 2 (NF2) (67). U bolesnika s NF2 razvijaju se bilateralni schwanomi slušnog živca. Somatske mutacije koje zahvaćaju oba alela NF2 također su otkrivene i u sporadičnim meningeomima i ependimomima. Produkt NF2 gena, nazvan merlin, pokazuje značajnu homologiju s citoskeletnim proteinom 4.1 eritrocitne membrane. Merlin se veže s jedne strane na aktin, a s druge strane na CD44, transmembranski

protein koji je uključen u interakcije unutar staničnog matriksa. Na koji način gubitak merlina vodi u transformaciju, zasad nije poznato (67).

Zanimljivo je da se učestalost genske mutacije NF2 razlikuje između tri najčešće varijante meningeoma. Fibroblastni i tranzicijski tip, imaju mutaciju NF2 u oko 70%-80% slučajeva, za razliku od meningotelijskog oblika u kojeg se mutacija NF2 nalazi u samo 25% slučajeva. To upućuje da ovaj potonji oblik ima genetsko podrijetlo koje je neovisno o genskoj alteraciji NF2 (67). Ovu hipotezu podupire opažanje da postoji bliska veza između gubitka alela na 22q fibroblastnih meningeoma, kao i opažanje da većina bolesnika s meningeomima bez mutacije NF2 razvija meningotelijski oblik tumora. Nadalje, primjećena je smanjena izraženost merlina (schwanomin proteina) u različitim histopatološkim oblicima meningeoma, ali izgleda da je rijetka u meningotelijskim tumorima (68). U atipičnim i anaplastičnim meningeomima mutacija NF2 javlja se u oko 70% slučajeva, što se dobro podudara s učestalošću mutacija NF2 u benignim fibroblastnim i tranzicijskim meningeomima (67). Ova jednaka učestalost ukazuje da mutacija gena NF2 nije uključena u progresiju u više stupnjeve meningeoma. Uska povezanost mutacija NF2 u meningeoma s gubitkom alela na kromosomu 22 upućuje na to da je upravo NF2 glavni meningeomski tumor-supresijski gen na kromosomu 22 (67). Citogenetske studije otkrile su monosomiju na kromosomu 22 kao jedinu specifičnu kariotipsku abnormalnost u skoro 70% meningeoma, a u dijelu bolesnika uočena je i delecija dugog kraka kromosoma 22 (5).

Ipak, istraživanja su otkrila gubitak i translokacije genetičkog materijala izvan regije NF2, otvarajući mogućnost da i drugi "meningeomski" gen leži na kromosomu 22. Kandidat gen je i *b-adoptin* koji se nalazi unutar regije koja homozigotno nedostaje u meningeoma i pokazuje smanjenu izraženost u nekim meningeomima. Drugi genski

kandidat na kromosomu 22q je MN1 za kojeg je nađeno da je u meningeomima prekinut translokacijom (5).

Jedan veliki meningeom odstranjen u četrdesetjednogodišnje žene mogao se već makroskopski razvrstati u tri područja koja su i histološki pokazivala različite slike: uobičajenog meningotelijskog meningeoma, veoma atipičnog meningotelijskog meningeoma sa znakovima anaplazije i, konačno, anaplastičnog meningeoma sa anaplastičnim izgledom, invazijom mozga, visokim mitotskim indeksom i spontanim nekrozama. Analiza sva tri područja pokazala je identični izgled gubitka alela na kromosomu 22, sugerirajući parcijalnu deleciju kraja drugog kraka kromosoma 22. Ovo jasno pokazuje da je tumor u početku bio klonski i da se parcijalna delecija dugog kraka kromosoma 22 pojavila rano u razvoju tumora, prije nastanka anaplazije. Potrebno je napomenuti da je čest gubitak alela kromosoma 22 nađen i u drugim tipovima tumora, kao npr. u dječjim tumorima, a i svi opisani ependimomi pokazuju isti nalaz. Promjena je nađena i u značajnim broju karcinoma dojke i raku debelog crijeva (2).

Gubitak heterozigotnosti na kromosomu 22 i mutacije lokusa NF2 vjerojatno ne igraju ulogu u progresiji malignosti meningeoma. Rempel i sur. (1993) objavili su podatke o gubitku markera na kromosomu 10 u morfološki malignim meningeomima (69). Te delecije se nisu vidjele u pet bolesnika s invazijom mozga koji nisu imali druge znakove malignosti. Simon i sur. (1995) našli su samo dva slična slučaja s invazijom mozga i bez znakova malignosti: i u ovih bolesnika nije nađena delecija na kromosomu 10. Oba tumora su zadržala heterozigotnost za lokuse na kromosomima 1p i 14q. U istoj studiji autori su ispitali 18 benignih (WHO I. stupnja), 15 atipičnih (II. stupnja) i 13 anaplastičnih/malignih (III. stupnja) meningeoma na gubitak heterozigotnosti na kromosomima 1p, 6p, 9q, 10q i 14q. Čest gubitak lokusa na ovim kromosomima nađen je u tumorima II. i III. stupnja, posebno 14q (47% i 55%), 1p

(40% i 70%), i 10q (27% i 40%). Za razliku od ovih nalaza, gubitak heterozigotnosti za lokuse ovih kromosoma bio je rijedak u benignim meningeomima, posebno 14q (0%), 1p (11%) i 10q (12%). Nađena je jasna korelacija između gubitka alela na kromosomima 14q, 10q i 1p i primjećeno je da učestalost delecija u sve tri kromosomske regije raste sa stupnjem malignosti tumora (70).

Atipični i anaplastični meningeomi često pokazuju oštećenja alela na krakovima kromosoma 1p, 9q, 10q, 14q i 17p, što sugerira da se geni povezani s progresijom tumora nalaze na ovim lokusima (5,70).

Tumorogeneza uključuje višestruke genetičke promjene u stanici koja uslijed toga može steći sposobnost selektivnog rasta. Očito je da delecija kromosoma 22 igra važnu ulogu u nastanku meningeoma. Također je zapaženo da somatske mutacije u genu NF2 doprinose nastanku meningeoma. Stoga je logično zaključiti da su potrebne dodatne genetičke promjene koje meningeom vode u malignost. Osim delecije na kromosomu 22, delecija na kromosomu 17p bila je prisutna u histološki najmalignijim područjima anaplastičnog meningeoma (Lindblom i sur., 1994) (71). Zato izgleda moguće da oštećenja gena p53 mogu biti uključena u malignu progresiju meningeoma. Podaci o zahvaćenosti p53 u ljudskim meningeomima su oskudni (72). Zato je u ovom radu i ispitivana ekspresija p53 na meningeomima I., II. i III. stupnja s pomoću imunohistokemijskog bojenja.

#### 1.9.4. Gen p53

Drugi dobro proučeni tumor-supresijski gen je p53 koji se nalazi na kromosomu 17 (17p13.1) (63). Mutacija jednog alela gena p53 uzrokuje stvaranje promijenjenog proteina, a ako je i drugi alel izgubljen ili inaktivan, tada nema stvaranja proteina p53. U velikom broju ljudskih zloćudnih tumora jedan alel gena p53 ima nesvrhovitu mutaciju koja uzrokuje stvaranje mutiranog proteina, a drugi alel je reduciran do

homozigotnosti genskom konverzijom ili delecijom. To je prvi puta pokazano 1989. godine u karcinomu kolona (73). Mutacija gena p53 zatim je dokazana u brojnim zloćudnim tumorima: kosti (74), mokraćnog mjehura (75), mozga (76,77), dojke (78), jednjaka (79), želuca (80), jetre (81), pluća (82), limfnih čvorova (83), jajnika (84) i prostate (85). Mutirani protein koji je rezultat nesvrshodne mutacije ima važnu ulogu u poticanju rasta i diobi tumorskih stanica (78).

U većini slučajeva inaktivirajuće mutacije koje zahvaćaju oba alela p53 stečene su u somatskim stanicama. Manje često, neke osobe naslijede mutirani alel p53. Kao i u slučaju Rb-gena, nasljeđivanje jednog mutiranog alela predisponira osobu za razvoj malignog tumora jer je potreban samo jedan dodatni hitac da se inaktivira drugi normalni alel. Te osobe imaju Li-Fraumenijev sindrom i 25 puta veću šansu od opće populacije da razviju maligni tumor. Ovdje je spektar mogućih tumora širok, za razliku od osoba koje nose mutaciju gena Rb. Najčešće nastaju sarkomi, tumori dojke, leukemija, moždani tumori i karcinomi nadbubrežnih žlijezda. U usporedbi sa sporadičnim tumorima, oni nastali u pacijenata s Li-Fraumenijevim sindromom nastaju u mlađoj dobi i mogu biti multipli (63).

Humani gen p53 sadrži 393 kodona, a položaj nesvrshodnih mutacija u genu nije slučajan. Gotovo sve mutacije smještene su između kodona 118 i 309. Zajedničko većini mutacija jest da se javljaju u područjima koja pokazuju visoku podudarnost između različitih vrsta. Naime, ostaci aminokiselina između kodona 117 i 142, 171 i 181, 236 i 268 te 270 i 286 u proteinu p53 pokazuju podudarnost slijeda u 99%-100% u *Xenopus* (vodozemca) i čovjeka (78). Ova očuvanost slijeda upućuje na funkcionalno značenje redosljeda aminokiselina u p53. Mutacije u ovim regijama vrlo su često nađene u mutiranom obliku proteina. Točno mjesto mutacije ovisno je o tkivu u kojem je primarni karcinom nastao. Na primjer, mutirani kodon 175 često je



pronađen u kolorektalnom karcinomu i Burkittovom limfomu, ali nikad u karcinomima pluća ili jetre (78).

Protein p53 nalazi se u jezgri, a kada je aktiviran primarno kontrolira prepisivanje nekoliko drugih gena. U fiziološkim uvjetima p53 ima kratak poluživot (20 minuta) zbog proteolize uvjetovane ubikvitinom. Stoga suprotno od pRb, p53 ne vrši nadzor nad normalnim staničnim ciklusom. P53 zaustavlja stanični ciklus tek kada je DNA oštećena iradijacijom, UV-svjetlom ili mutagenim kemikalijama. Slabo poznatim mehanizmima zbiva se nagli porast nivoa p53 i njegova aktivacija u stanici kao čimbenika prepisivanja. Nakupljeni nemutirani (divlji) p53 veže se za DNA i stimulira prepisivanje nekoliko gena koji posreduju dva glavna efekta p53: zastoj staničnog ciklusa i apoptozu. Zastoj staničnog ciklusa zbiva se u kasnoj G1-fazi i uzrokovan je p53-ovisnom transkripcijom gena za p21 koji je inhibitor CDK. Gen za p21 inhibira kompleks ciklin/CDK i tako sprječava fosforilaciju pRb koja je neophodna da stanica prijeđe u S-fazu (64). Ova dobrodošla pauza omogućava stanici da popravi DNA oštećenu mutagenim agensima. Ovom procesu pomaže p53 tako što direktno inducira transkripciju proteina GADD45 (engl. growth arrest and DNA damage) uključenog u popravak DNA. Protein GADD45 pomaže u zastoju stanice u G1-fazi još nepoznatim mehanizmima. Ako se oštećena DNA nije uspješno popravila, normalni p53 u zadnjem aktu aktivira gene koji induciraju apoptozu. On potiče i gene bax i IGF-BP3, što vodi stanicu u smrt. Gen bax veže se i antagonizira protein koji inhibira apoptozu (bcl-2). Kompleks IGF-BP3 veže se na receptor inzulinu-nalik faktora rasta (IGF) i vjerojatno inducira apoptozu blokirajući IGF-posredovane intracelularne signale. Nedavno je otkriveno da i hipoksija stimulira aktivaciju normalnog p53. Hipoksične tumorske stanice podliježu apoptozi ako imaju normalne kopije p53-gena. Ako je p53 mutiran, tumorske stanice su otporne na apoptozu. Tako

hipoksija uzrokuje selekciju stanica u kojima je p53 inaktivan i potpomaže umnožavanju stanica s manjkavim p53 (63).

#### Utjecaj na terapiju

Može se reći da p53 zasad nepoznatim mehanizmom prepoznaje oštećenja DNA, pomaže u popravku DNA uzrokujući zaustavljanje staničnog ciklusa u G1-fazi i inducira gene za popravak DNA. Stanicu s oštećenom DNA koja se ne može popraviti, p53 vodi prema apoptozi. Zbog ovih aktivnosti p53 je ispravno nazvan "čuvar genoma" (65). Homozigotnim gubitkom p53 oštećenje DNA prolazi nepopravljeno, mutacije ostaju fiksne u dijelećoj stanici, a sama stanica ulazi u smjer koji vodi u malignu transformaciju (63).

Sposobnost p53 da kontrolira apoptozu kao odgovor na oštećenje DNA ima praktične terapijske implikacije. Radijacija i kemoterapija, dva najčešća načina liječenja raka, izazivaju oštećenje DNA i posljedičnu apoptozu (78). Iz toga proizlazi da tumori koji sadrže normalni gen p53 bolje odgovaraju na terapiju nego tumori koji nose mutirani p53. Takav je slučaj s karcinomima testisa i dječjom akutnom limfoblastnom leukemijom. Naprotiv, karcinom pluća i kolorektalni karcinomi, koji često sadrže mutacije p53, relativno su rezistentni na kemoterapiju i zračenje (63).

#### 1.9.5. PCNA

Jezgrin antigen proliferirajućih stanica (PCNA, engl. proliferating cell nuclear antigen) izvorno je identificiran imunoflorescencijom kao jezgrin protein čija je pojava povezana s proliferacijom stanice. Protein zavisao o staničnom ciklusu opisao je Bravo (1987) i nazvao ga ciklinom, a pokazao se identičnim s PCNA (86). PCNA je potreban za replikaciju SV40 DNA in vitro i prepoznat je kao protein kofaktor za DNA polimerazu-delta. Za razliku od polimeraze alfa, beta i gama, polimeraza-delta ima

korektivnu ulogu i igra značajnu ulogu u održavanju točnosti replikacije DNA u sisavaca. PCNA je evolucijski dobro očuvan protein. Pojedini slijedovi aminokiselina štakora i čovjeka se razlikuju samo u 4 od 261 aminokiselina. Ljudska anti-PCNA protutijela reagiraju ne samo sa jezgrama proliferirajućih stanica svih ispitivanih eksperimentalnih životinja, nego također i sa jezgrama biljaka. Suzuka i sur. (1989) dokazali su prisutnost PCNA/ciklin-povezanih gena u višim biljkama (87).

Travali i sur. (1989) izolirali su cDNA klon cijelog ljudskog gena PCNA i susjednih slijedova. Humani gen prisutan je u pojedinačnoj kopiji i ima 6 eksona. Neobična je značajka da postoji znatna sličnost u slijedovima između introna, kao i između introna i eksona (88). Southern-blot analizom hibridne DNA somatskih stanica, Ku sa sur. (1989) su locirali gen PCNA na 20. kromosom. Identificirana su i dva pseudogena od kojih je jedan lociran na Xpter-g13, a drugi na 6pter-p12 (89). Iz studija izvedenih metodom in situ hibridizacije, Rao sa sur. (1991) su zaključili da je PCNA gen smješten ili se nalazi blizu lokusa 20p12 (90). Za vrijeme trajanja staničnog ciklusa najveća koncentracija PCNA se nalazi u kasnoj G1-fazi i tijekom cijele S-faze, a najmanja koncentracija bila je za vrijeme G2-faze. Nivoi PCNA vrlo su niski u M-fazi, a u Go-fazi se ne detektira (50).

Budući da i histološki benigni meningeomi također recidiviraju, biološko ponašanje meningeoma i rizik za nastanak recidiva u pojedinog bolesnika ne može se predvidjeti samo na osnovu histologije. Zato analiza proliferacije tumorskih stanica može pomoći u otkrivanju agresivnih meningeoma (50). Ovaj rad ispituje da li mjerenje proliferacijske aktivnosti meningeoma imunohistokemijskim bojenjem na PCNA može pripomoći da se predvidi recidiv meningeoma.

## 2. SVRHA I CILJ RADA

---

### 2.1. Svrha rada

Jedan od glavnih ciljeva u patološkim studijama odstranjenih novotvorina jest utvrditi proliferacijski potencijal ostatnog tumorskog tkiva. Posebno je to važno za tumore središnjeg živčanog sustava gdje je potpuna resekcija često nemoguća, pa vrsta i opseg postoperativnog liječenja prije svega ovise o histološkom stupnju. Zbog toga se u ispitivanju kliničkog materijala primjenjuju druge metode ne bi li se s većom sigurnošću procijenila kinetika stanica u operiranom tumoru (91).

Meningeomi su česti intrakranijalni tumori koji mogu nastati iz bilo kojeg dijela meninga. Većinom se radi o benignim, spororastućim tumorima koji su često izlječivi nakon potpunog odstranjenja. Obrnuto, oni mogu pokazivati histološku varijaciju ili promijenjeno biološko ponašanje udruženo s lokalno agresivnom naravi i kasnim udaljenim metastazama. Prilično različite histološke slike meningeoma mogu stvarati teškoće u procjeni prognoze ili postoperativnog liječenja bolesnika. Važno je odrediti biološko ponašanje meningeoma u smislu zloćudne preobrazbe (92).

Cilj ovog rada jest ispitati prognostičku vrijednost parametara rasta i izražaja p53 u meningeomima histološki klasificiranih prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO) u klasične, atipične i anaplastične. Histološki parametri uključuju celularnost, broj mitozu, područja nekroza i stupanj atipije stanica. Ploidnost i stupanj proliferacije stanica analiziran je metodom protočne citometrije iz parafinskih rezova tkiva. Usporedno, svi su tumori analizirani s pomoću imunohistokemijskog bojenja na ekspresiju dvaju biljega: biljega proliferacije PCNA i produkta tumor-supresijskog gena p53. Biljeg PCNA služi za procjenu udjela stanica u S-fazi staničnog ciklusa, dok detekcija biljega p53 unutar stanica ukazuje na mutaciju istoimenog tumor-supresijskog gena (produžen poluvijek produkta p53 u stanicama).

## 2.2. Cilj rada

Specifični ciljevi rada su slijedeći:

1. Razvrstati tumore prema ekspresiji biljega PCNA, a nalaz usporediti s histološkim (broj mitozama) i citometrijskim pokazateljima proliferacije stanica (G0/G1, S i G2/M faze staničnog ciklusa). Budući da se opisanim tehnikama mogu analizirati sve faze staničnog ciklusa (G0/G1, S i G2/M), time je omogućena točnija usporedba staničnih pokazatelja rasta s histološkim osobitostima tumora i kliničkim tijekom bolesti.
2. Ispitati ekspresiju proteina p53 u odnosu na: a) stupanj atipije stanica, posebice u anaplastičnim i recidivirajućim meningeoma, b) stupanj aneuploidije, i c) proliferacijsku aktivnost stanica. Na taj će se način procijeniti vrijednost otkrivanja p53 kao potencijalnog prognostičkog pokazatelja.
3. Ispitati učestalost i vrstu aneuploidije meningeoma te je dodatno usporediti s rezultatima iz literature, posebice za skoro-diploidne (engl. near-diploid) tumore. Ti su tumori ranije bili definirani malim odstupanjem sadržaja DNA od normale i obično su predstavljali problem prilikom razvrstavanja u prognostičke skupine. Budući da suvremeni programi analize staničnog ciklusa (npr. ModFit) ne poznaju kategoriju skoro-diploidnih tumora, vjerojatno je za očekivati da takvi tumori budu svrstani ili u aneuploidne ili u euploidne tumore.
4. Kombinacijom opisanih metoda pokušat će se iz operativnog materijala inicijalno "benignih tumora" izdvojiti pokazatelje s potencijalnim prognostičkim značajem, posebice one koji bi upućivali na pojavu recidiva tumora.

### 3. MATERIJAL I METODE RADA

---

#### 3.1. Bolesnici

Ispitivani uzorak obuhvaća 102 meningeoma operirana u razdoblju od 1985. do 1994. godine, na Odjelu za neurokirurgiju KB Firule-Split i Klinici za neurokirurgiju KBC Rebro-Zagreb. Ukupno je obrađeno 78 bolesnika. Bolesnici su podijeljeni u tri skupine: bolesnici s recidivom meningeoma (N=36), bolesnici bez recidiva (N=30) i bolesnici s inicijalno atipičnim ili malignim tumorom (N=12). Primarno liječenje bilo je isključivo kirurško, a redoviti kontrolni pregledi vršeni su u odgovarajućim klinikama. Uzorci tkiva obrađeni su standardnim histološkim metodama u Zavodu za neuropatologiju KBC Rebro-Zagreb i Zavodu za patologiju KB Firule-Split. U svakog bolesnika su iz povijesti bolesti bilježeni podaci o dobi, spolu, kliničkoj slici, lokalizaciji, veličini tumora te njegovim makroskopskim karakteristikama, operativnom zahvatu, postoperativnom tijeku bolesti te recidivima. Patohistološki nalazi i uzorci tumora u obliku parafinskih kocki vađeni su iz arhiva Zavoda za neuropatologiju KBC Rebro u Zagrebu i Odjela za patologiju KB Firule u Splitu. Većina autora smatra da nepotpuno resecirani meningeomi imaju veću sklonost recidivu. U ovoj studiji se iz kirurških protokola utvrdila širina i potpunost ekscizije tumora. Vrlo rijetki meningeomi su operirani *en block*, dok ih je većina resecirana postepenim kiretiranjem tumorske mase, ali u cijelosti, dok je podležeća dura ili odstranjena ili spržena kauterom (operacija po Simpsonu stupnja I i II).

#### 3.2. Patohistološka analiza

Tumorsko je tkivo nakon preuzimanja fiksirano u 4% formalinu i uklopljeno u parafinske blokove. Parafinski blokovi serijski su rezani u debljini od 5 $\mu$ m, a rezovi su

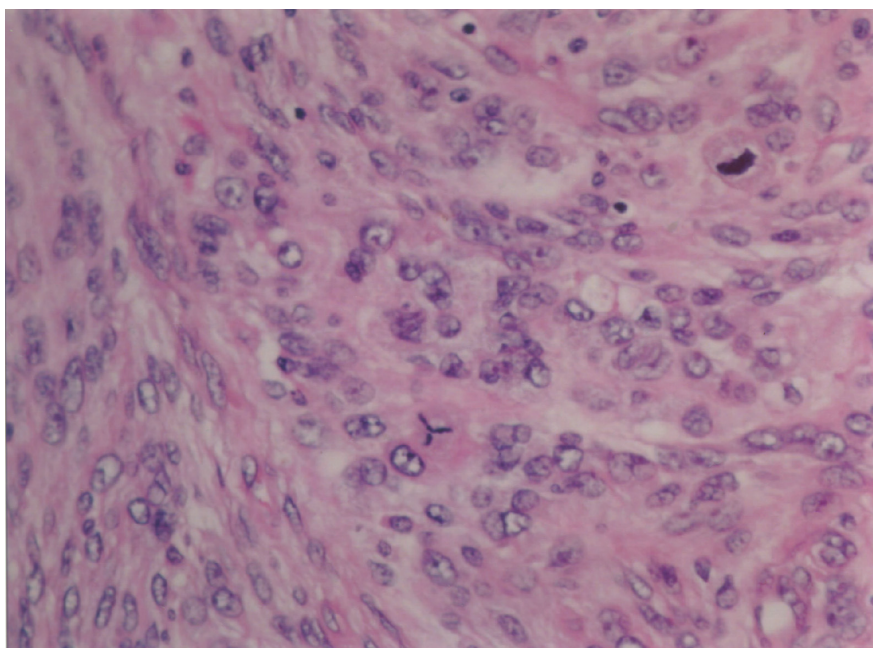
bojani hemalaunom i eozinom (HE). Retrospektivno je ispitano 11 histoloških parametara meningeoma da bi se utvrdila njihova međusobna povezanost, kao i značaj u histološkom stupnjevanju i recidiviranju (6): pleomorfizam stanica, atipija jezgara, prisutnost makronukleola i patoloških mitozâ, gubitak strukture, stvaranje malih stanica, nekroza, invazija mozga, hipercelularnost, tip krvnih žila i broj mitozâ. Sedam od njih—stanični polimorfizam, atipija jezgara, makronukleoli, stvaranje malih stanica (visok odnos jezgra/citoplazma), gubitak arhitekture (engl. sheeting), atipične mitoze i nekroze—bilježene su kao odsutne ili prisutne. Invazija mozga je okarakterizirana kao a) prisutna; b) nije prisutna; i c) nepoznato (kad u materijalu nije prisutno tkivo mozga). Obično perivaskularno širenje tumora u Virchow-Robinove prostore nije smatrano invazijom mozga. Krvne žile također su analizirane prema stupnju hijalinizacije stjenki.

### 3.2.1. Atipija jezgara

Ova značajka je stupnjavana s 0 kada su tumorske stanice imale jednolične nježne jezgre sa gustim kromatinom i bez nukleola. Ako su (žarišno ili u većim područjima tumora) stanice imale dva ili tri puta veće jezgre s nepravilnim rubovima i urezima te izraženu hiperkromaziju, zabilježena je atipija. Pojava nukleola također prati atipiju. Hiperkromazija jezgara bez nukleola nije ubrajana u atipiju: taj je nalaz smatran degenerativnom pojavom i ubrojen je u polimorfizam stanica, tj. u varijaciju izgleda i veličine. Patološke mitoze su bilježene zasebno.

### 3.2.2. Makronukleoli

Nalaz uočljivih nukleola unutar jezgre označen je stupnjem 1. Obično su bili mali i centralno postavljeni, ali se našlo i većih eozinofilnih nukleola (sl. 1). Meningeomi bez prisutnih makronukleola stupnjevani su s 0.



Slika 1. Anaplastični meningeom. Unutar jezgri uočavaju su nukleoli. U sredini slike vidi se jedna patološka mitozu. H&Ex400.

### 3.2.3. Tvorba malih stanica

Stvaranje malih stanica s visokim odnosom jezgra/citoplazma stupnjevano je s 1. Histološki izgled takvih područja naliči na meningeom s limfocitnom infiltracijom što treba jasno razlikovati.

### 3.2.4. HiperCelularnost (dijametar)

Maksimalna celularnost izražena je kao broj stanica u promjeru jednog vidnog polja velikog povećanja objektiva (engl. high power field, HPF). Zato je ta značajka nazvana "dijametar" vidnog polja i on predstavlja broj izbrojenih jezgara po dužini promjera HPF. Kako ova značajka varira u različitim područjima istog tumora, izabrana su uvijek najcelularnija područja. Brojeno je deset vidnih polja velikog povećanja i izračunata srednja vrijednost.



### 3.2.5. Broj mitoza

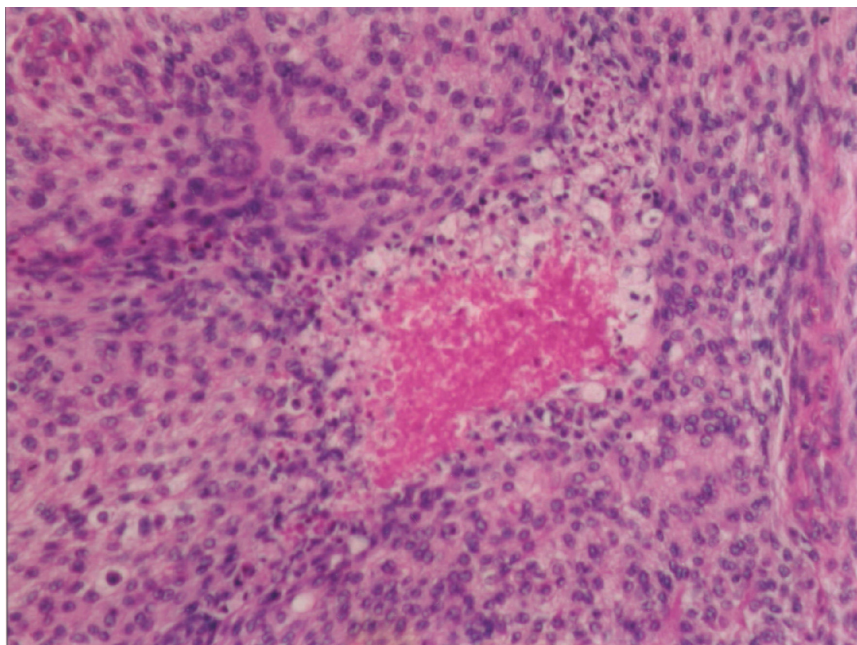
Broj mitoza je izražen kao zbir svih viđenih mitoza u 10 HPF i to u najaktivnijim područjima tumora. Kod prepoznavanja mitotskih figura primjenjeni su jasni morfološki kriteriji (93). Oni uključuju:

- nepostojanje zone jezgrine membrane;
- nepostojanje svijetlog područja u centru jezgre;
- prisutnost vlasastih izdanaka umjesto trokutastih i šiljastih; i
- bazofiliju okolne citoplazme umjesto eozinofilije.

U radu su uračunate samo jasne mitotske figure, dok su nejasni slučajevi isključeni.

### 3.2.6. Nekroze

Ispitivane su gledanjem svih preparata na malom i srednjem povećanju i utvrđena je veličina i izgled područja koagulacijske nekroze tumorskih stanica (sl. 2).

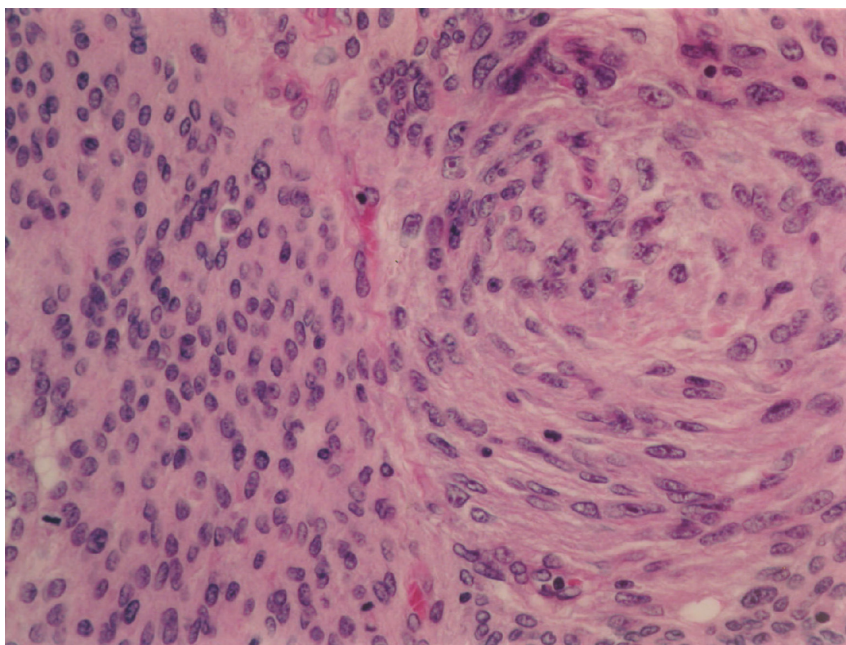


Slika 2. Žarište mikronekroze u malignom meningeomu. Mikronekrotično žarište sastoji se od centralno nekrotičnog debrisa i okolnih palisadnih stanica u karioreksi. H&E x200.

Tumori bez prisutnih nekroza stupnjevani su s 0. Kada su područja nekroze bila mala i zauzimala manje od polovine vidnog polja velikog povećanja, tumori su stupnjevani s 1. Supanj 2 označio je tumore s velikim, konfluentnim žarištima nekroza (tzv. "geografska nekroza"). Pritom je isključena mogućnost da se radi o postembolizacijskim nekrozama unutar tumora (94).

### 3.2.7. Gubitak arhitekture (engl. sheeting)

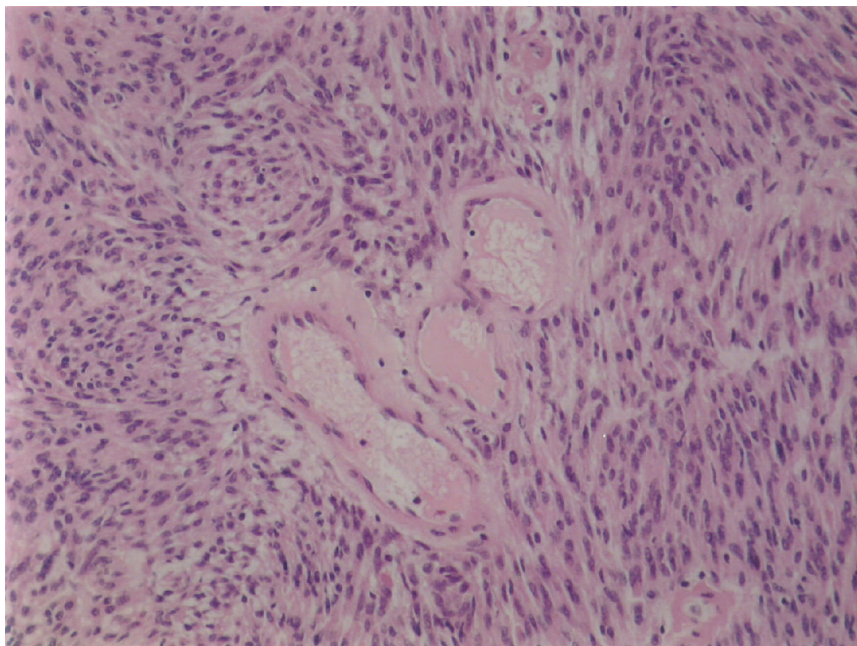
Ova značajka sastoji se od djelimičnog ili potpunog gubitka uobičajenog rasporeda tumorskih stanica u koncentrične vrtloge meningotelijskog tipa meningeoma ili u snopove vretenasto izduženih meningotelijskih stanica tipične za fibroblastni podtip. Umjesto toga, tumorske stanice stvaraju solidna područja sincicijskog izgleda koja nisu pregrađena vezivnim septima (sl. 3). Ova značajka je stupnjevana kao 0 kad je bila potpuno odsutna, odnosno s 1 kada su se identificirala u žarišnim područjima ili u većem obimu.



Slika 3. Anaplastični meningeom. Gubitak arhitekture vidi se na lijevoj polovini slike u odnosu na desnu gdje je prisutno vrtložno nakupljanje stanica. H&Ex400.

### 3.2.8. Krvne žile

Analizirane su po brojnosti i po tipu stjenke. Nalaz malog broja kapilara stupnjevan je s 0. Nalaz velikog broja krvnih žila tanke stjenke (poput pukotina) tipa kapilara obloženih endotelom stupnjevan je s 1. Veliki broj krvnih žila sa zadebljanom hijalinom stjenkom, stupnjevan je s 2 (sl. 4).



Slika 4. Meningeom u kojem su krvne žile hijalino zadebljane stjenke. H&Ex200.

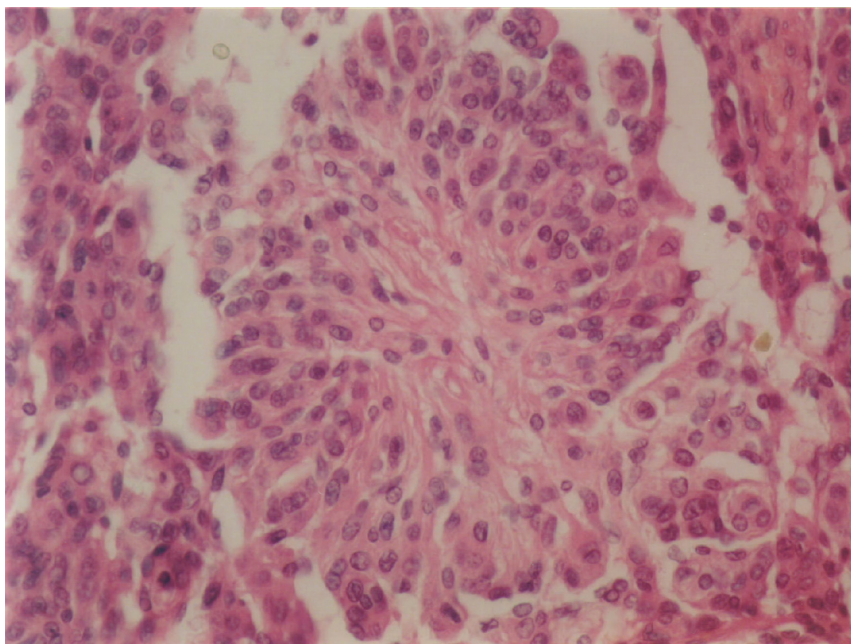
3.2.9. Histološka klasifikacija rađena je prema kriterijima Svjetske zdravstvene organizacije iz 1993. godine (tab. 1), a tumori su statistički analizirani s obzirom na tri histološka stupnja – klasični, atipični i maligni.

#### Atipični meningeom (WHO gradus II)

Atipični meningeom je definiran kao meningeom u kojemu su zastupljene neke od sljedećih značajki: česte mitoze, povećana celularnost, male stanice s visokim odnosom jezgra/citoplazma i/ili uočljivim nukleolima, neprekinuti izgled pločastog rasta (engl. sheet-like) i žarišta "spontane" ili "geografske nekroze".

### Anaplasični meningeom (WHO gradus III)

Definiran je kao meningeom koji pokazuje histološke značajke jasne malignosti, pa su histološke abnormalnosti prisutne u mnogo većem obimu nego u atipičnom meningeomu. To uključuje malignu citologiju, visoki mitotski iznos, jasne nekroze i invaziju mozga. Papilarni meningeom je svrstan u III. stupanj, tj. u grupu malignih meningeoma (sl. 5). U skladu s revidiranim WHO-kriterijima, hemangiopericitomi i hemangioblastomi dore ne smatraju se meningeomima i nisu uključeni u studiju.



Slika 5. Papilarni meningeom s jasno uočljivom papilarnom tvorbom u centru slike. H&Ex400.

Shema koja je primijenjena u ovom radu za klasifikaciju atipičnih i malignih meningeoma je slijedeća:

#### ATIPIČNI meningeom

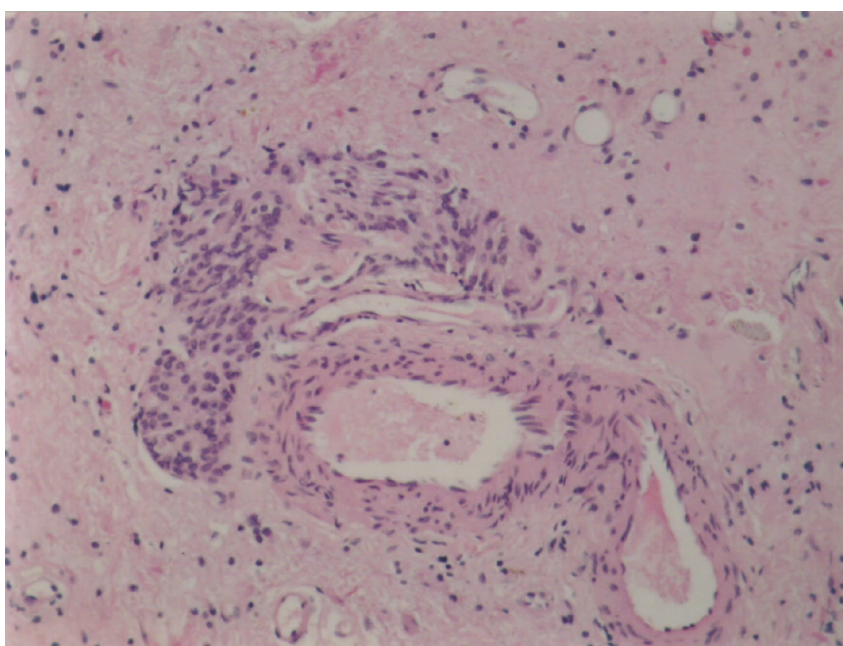
Bilo koja histološka varijanta koja pokazuje najmanje jedan od slijedećih kriterija:

1. maksimalni mitotski broj: 4 mitoze / HPF (2.5/mm) i
2. prisutnost najmanje tri od slijedećih histoloških značajki:

- brisanje arhitekture (engl. sheeting)
- hipercelularnost
- makronukleoli
- nakupine malih stanica (engl. small cell forming).

### ANAPLASTIČNI meningeom

Invazija mozgovine s nepravilnom projekcijom tumora u okolni parenhim mozga, bez interventnog sloja leptomeninga (sl. 6). Perivaskularno širenje uzduž Virchow Robinovih prostora i nalaz prije navedenih histoloških znakova jasne anaplazije.



Slika 6. Ovalni produljci malignog meningeoma koji infiltriraju bijelu tvar uz reaktivne promjene astrocita. Između nema potisnutog komprimiranog reaktivnog veziva. H&E x 200.

### 3.3. Imunohistokemijsko bojanje

Tumorsko tkivo je nakon preuzimanja fiksirano u 4% formalinu i nakon standardne obrade uklopljeno u parafin. Parafinski blokovi rezani su u rezove debljine 3-5 mikrona i imunohistokemijski bojeni primjenom monoklonskih protutijela (75). Korištena su sljedeća monoklonska protutijela: Monoclonal Mouse Anti-Human p53

(Dako-p53, DO-7) Code No. M 7001, Kopenhagen, Danska, u razrjeđenju 1:50 i Monoclonal Mouse Anti-PCNA (DAKO EPOS Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen/HRP Clone, PC 10) Code No. U 7032, Kopenhagen, Danska, u razrjeđenju 1:2000. Izabrani su uzorci u kojima je bilo dovoljno očuvanog tumorskog tkiva, a manje nekroza, krvarenja i upalnog infiltrata. Preparati su analizirani svjetlosnim mikroskopom marke "Olympus" BH-2 (Tokio, Japan), pri povećanju 400x.

Histološki rezovi za imunohistokemijsku analizu su nakon deparafinizacije i rehidracije obrađeni metodom za razotkrivanje antigena (engl. antigen retrieval). Ona se sastoji od kuhanja preparata u mikrovalnoj peći snage 750W na temperaturi od 110°C u citratnom puferu u trajanju od tri puta po 5 min. za PCNA i šest puta po 5 min. za p53 (96). Nakon deparafinizacije i razotkrivanja antigena, ohlađeni rezovi su oprani u destiliranoj vodi i fiziološkoj otopini puferiranoj fosforom (PBS) i potom imunohistokemijski bojani metodom LSAB na sobnoj temperaturi. Metoda LSAB sastoji se od sljedećih faza:

1. inkubacija rezova s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> radi blokiranja endogene peroksidaze tijekom 15 min. i nakon toga isprani u destiliranoj vodi i otopini PBS;
2. inkubacija rezova s optimalno razrijeđenim primarnim protutijelima u vremenu od 30 minuta u vlažnoj tamnoj komori te potom oprani otopinom PBS. Protutijela su razrijeđivana u puferu TRIS-NaCl s 1% goveđeg albumina 20 minuta prije uporabe;
3. inkubacija rezova u vlažnoj komori s veznim protutijelom (DAKO, Danska LSAB-Kit Kod: K0690) tijekom 30 minuta, nakon čega su isprani u otopini PBS;
4. slijedi inkubacija rezova sa streptavidin-peroksidazom u trajanju od 30 minuta i potom ispiranje u otopini PBS;

5. inkubacija rezova u vlažnoj komori s kromogenom diaminobenzidinom (DAB) (DAKO, Danska Kod: 3466) u trajanju od 15 minuta, nakon čega slijedi ispiranje preparata u destiliranoj vodi;

6. kontrastno bojenje preparata u hematoksilinu (30 sekundi) i potom ispiranje u vodi;

7. dehidracija preparata u gradijentu alkohola (96%, 100%), izbistravanje u ksilolu, te prekrivanje kanadskim balzomom i pokrovnim stakalcem.

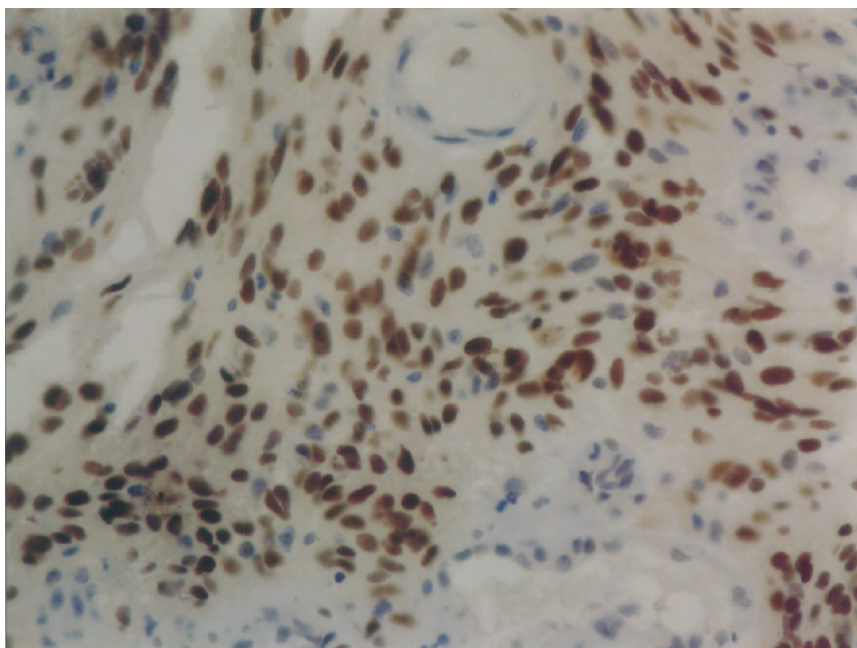
Krajnji smeđi produkt boje nije topiv u alkoholu.

### 3.3.1. Bojenje na p53

p53 reaktivnost je procjenjivana nalazom smeđe obojenosti jezgara (sl. 7) i semikvantitativno određivana na slijedeći način. Na svakom od 10 polja velikog vidnog povećanja izbrojene su sve jezgre tumorskih stanica. Na istim poljima izbrojene su smeđe obojene jezgre tumorskih stanica. Izračunata je srednja vrijednost i izražena kao postotak (%) pozitivno obojenih stanica. Pri tome je sveukupna reaktivnost na p53 izražena na slijedeći način:

negativni nalaz	ne vidi se obojene jezgre tumorskih stanica ili one čine <10%
+	10-20% jezgara pokazuje pozitivnu reakciju
++	20-50% jezgara pokazuje pozitivnu reakciju
+++	50-100% stanica pokazuje pozitivnu reakciju

Kod bojenja na p53 kao kontrola je služio rak pločastih stanica cerviksa. Prilikom bojanja uvijek je urađena i negativna kontrola (kompletno bojene preparata, ali bez primarnog protutijela).



Slika 7. Papilarni meningeom. Izražaj p53 vidljiv kao smeđa obojenost jezgri. LSAB metoda (povećanje 400x).

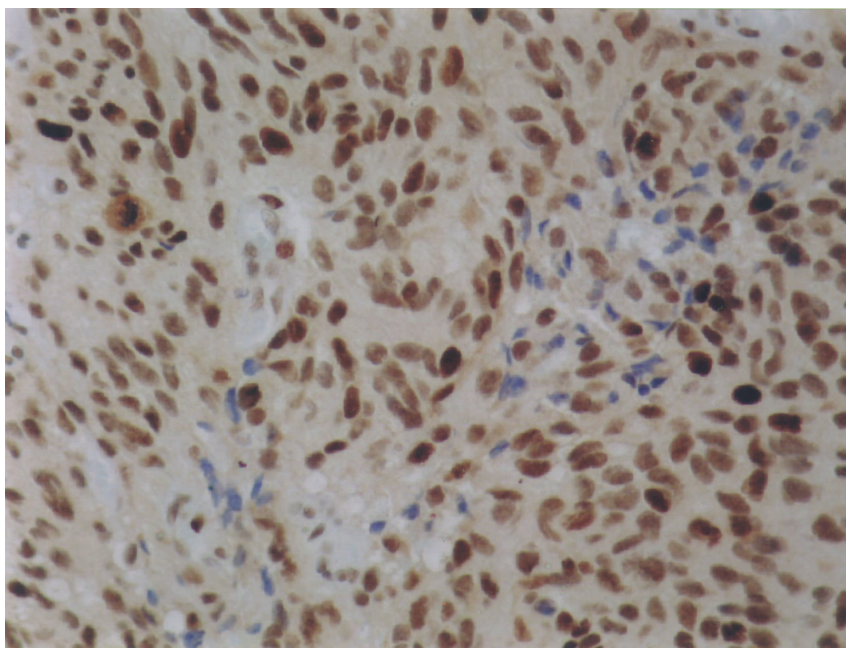
### 3.3.2. Bojenje na PCNA

PCNA-reaktivnost procjenjivana je nalazom smeđe obojenosti jezgara (sl. 8) i semikvantitativno određivana na slijedeći način. Na svakom od 10 polja velikog vidnog povećanja izbrojene su sve jezgre tumorskih stanica. Endotelne stanice krvnih žila te upalne stanice koje su bile pozitivne na PCNA isključene su iz brojenja. Na istim poljima su izbrojene smeđe obojene jezgre tumorskih stanica. Izračunata je srednja vrijednost obojenih tumorskih jezgara u uzorku izražena kao postotak (%), pri čemu je sveukupna reaktivnost na PCNA izražena na slijedeći način:

negativni nalaz	ne vidi se obojene jezgre tumorskih stanica ili one čine <10%
+	10-20% jezgara pokazuje pozitivnu reakciju
++	20-50% jezgara pokazuje pozitivnu reakciju
+++	50-100% stanica pokazuje pozitivnu reakciju

Kod bojenja na PCNA kao kontrola korišten je reaktivni limfni čvor i rak pločastih stanica cerviksa, dok je negativna kontrola bilo tkivo bojeno bez primarnog protutijela.





Slika 8. Atipični meningeom. Izražaj PCNA u obliku smeđe obojenih jezgri. LSAB metoda (povećanje 400x).

#### 3.4. Analiza staničnog ciklusa rasta s pomoću protočnog citometra

Rabljeno je tumorsko tkivo koje je fiksirano standardnim tehnikama i uklopljeno u parafin. U ovom procesu korišten je Hadleyev postupak (97) za vađenje jezgara iz tumorskih parafinskih rezova i Vindelov postupak (98) za bojenje oslobođenih jezgara propidijevim jodidom. Svaki uzorak je rezan na tri odsječka debljine 40 $\mu$ m. Parafin je uklonjen uranjanjem odsječaka u ksilen, nakon čega je slijedila rehidracija u 100%, 95% i 70% alkoholu. Uzorak se zatim dva puta ispere u destiliranoj vodi, a tkivo se razgradi do razine jezgri enzimatskom reakcijom s pomoću 0,5% otopine pepsina (Sigma) u PBS. S 1NHCl podesi se pH otopine na 1,5. Uzorak se inkubira 30 minuta na 37°C, uz stalno miješanje. Uzorak se centrifugira i vakuum-crpkom odstrani nadtalog, nakon čega se na oslobođene jezgre doda hladni PBS (4°C) te ponovno centrifugira 10min. Ponovno se dodaje hladni PBS ali uz miješanje Pasterovom pipetom. Ovaj postupak je važan zbog odvajanja jezgara, nakon čega se uzorak

filtrira kroz najlonsku mrežicu (veličina pora  $35\mu\text{m}$ ). Nakon centrifugiranja talog dobivenih jezgara tumorskih stanica obradi se ribonukleazom S (Sigma). Uklanjanje RNA pomaže preveniranju pogrešnog bojenja uzorka tj. vezanja boje za RNA. Na talog staničnih jezgri doda se 200  $\mu\text{l}$  otopine propidijevog jodida (50g/ml; 5mgPJ u 0.1% Na citratu) i inkubira najmanje 30 minuta na sobnoj temperaturi u tami. Intenzitet vezane boje je proporcionalan sadržaju DNA i može se kvantitativno izraziti.

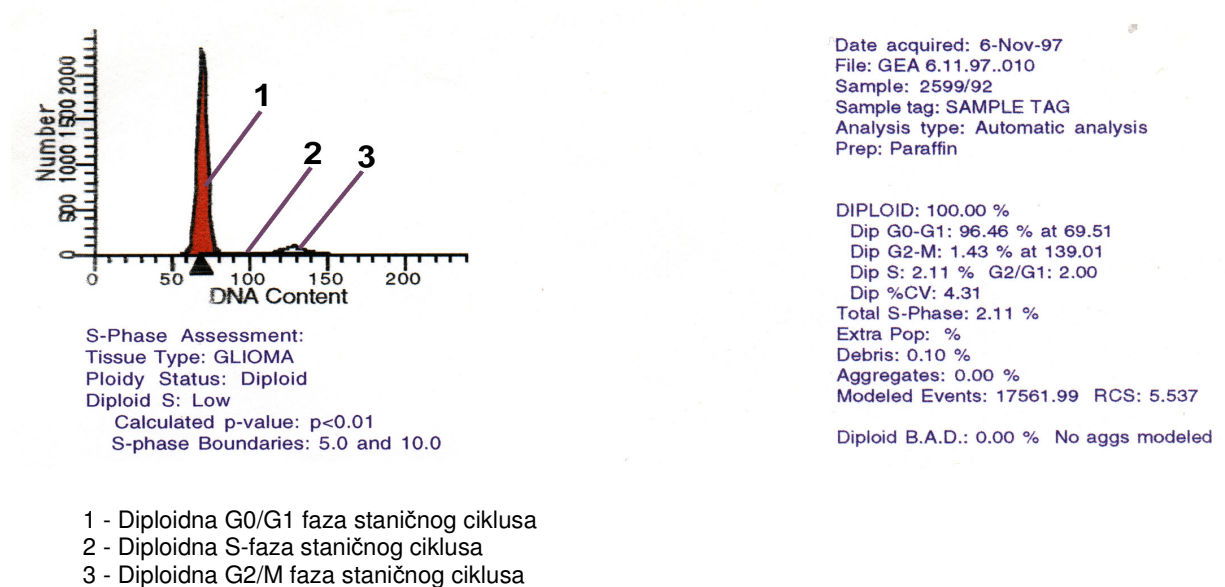
Analiza sadržaja DNA i udjela stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa učinjena je na protočnom citometru FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA, SAD) u Zavodu za imunologiju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb. Kroz stroj se pušta najmanje 10000 jezgara po uzorku, a dobiveni histogrami intenziteta fluorescencije analizirani su uz uporabu računalskih programa– Cellquest™ (Becton Dickinson Immunochemistry Systems, San Jose, CA, SAD) i ModFit LT™ (Verity Software House, Inc., SAD, 1995) na osobnom računalu Macintosh Quadra 650. Program CellQuest™ služi za mjerenje uzoraka i pohranjivanje izmjerenih podataka, a program ModFit LT™ za analizu pohranjenih podataka. Jednparametrijski histogrami (intenzitet fluorescencije  $\times$  broj stanica/jezgara) analizirani su programom ModFit LT™ (99).

#### 3.4.1. Tumačenje histograma DNA

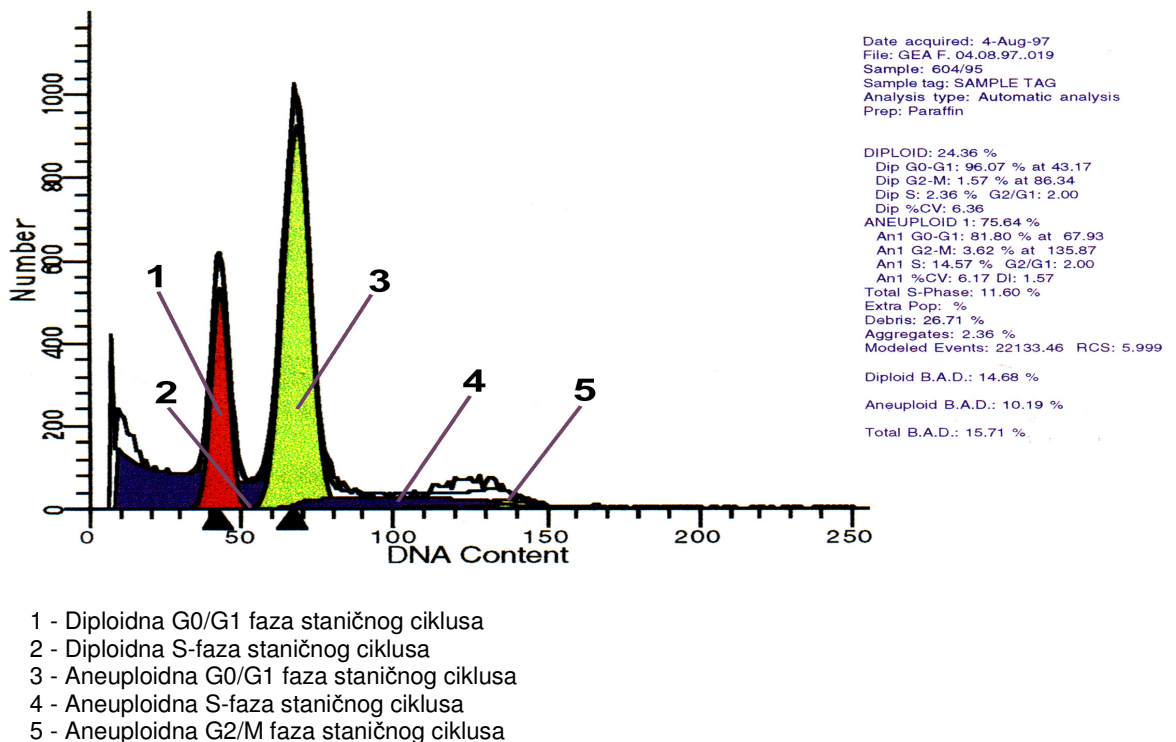
Na temelju jednparametrijskog histograma fluorescencije i njegovih brojčanih izvednica dobiven je sadržaj DNA i raspodjela tumorskih stanica prema fazama staničnog ciklusa: faza G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (stanice u mirovanju), S-faza (stanice u fazi podvostručenja DNA, označava stanice u proliferaciji) i faza G<sub>2</sub>/M (stanice u dijeljenju) (59). Brojčani pokazatelj stupnja ploidnosti je DNA-indeks. To je omjer relativnog sadržaja DNA G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-faze staničnog ciklusa ispitivanog uzorka i relativnog sadržaja DNA stanica standarda. Međutim, preporuka je SAC XIV društva (Society of

Analytical Cytology Subcommittee, 1990) da se aneuploidija ne izražava putem DNA indeksa.

Histogram se tumači kao diploidan ako postoji jedan simetričan G0/G1 vršak (sl. 9), dok nazočnost više od jednog vrška pokazuje da se radi o aneuploidiji (sl. 10).



Slika 9. Jednoparametrijski histogram DNA diploidnog meningeoma s pripadajućim statističkim podacima



Slika 10. Jednoparametrijski histogram DNA aneuploidnog meningeoma s pripadajućim statističkim podacima

Proliferacijska aktivnost tumorskih stanica izražena je kao ukupna S-faza, tj. kao udio svih izmjerenih stanica u S-fazi staničnog ciklusa. Kod aneuploidnih tumora moguće je ustanoviti posebno udio diploidnih i udio aneuploidnih stanica u S-fazi staničnog ciklusa.

### 3.5. Statistička obrada podataka

U opisu osnovnih karakteristika uzorka rabljene su metode opisne statistike. Prilikom statističke analize dobivenih podataka korištene su slijedeće metode: Kruskal-Wallis-ova analiza varijance, Mann-Whitney test, Studentov t-test,  $\chi^2$  test, Fisherov egzaktni test i Spearmannov test korelacije ranga. Usporedbe preživljenja napravljene su Log-rang testom i prikazane Kaplan-Meier-ovim krivuljama preživljenja. Zaključivanje o statističkim hipotezama u ovome radu provedeno je uz razinu sigurnosti od  $p < 0,05$  kod svih primjenjenih testova.

## 4. REZULTATI

---

### 4.1. Bolesnici

Radom se htjelo analizirati meningeome koji su recidivirali nakon prve operacije i otkriti histološke, imunohistokemijske i citometrijske karakteristike po kojima se razlikuju od meningeoma koji nisu recidivirali u promatranom periodu, pa se mogu smatrati izliječenima nakon prve operacije.

Pregledan je arhivski materijal Kliničke bolnice Firule u Splitu od 1980. do 2000. godine. U dvadeset godina bilo je operirano 167 bolesnika s meningeomom. Od toga je bilo 109 (65.3%) žena i 58 (34.7%) muškaraca. Odnos žena prema muškarcima iznosio je 2:1. Srednja vrijednost za dob iznosila je  $56.5 \pm 14.1$  za žene i  $58.1 \pm 9.71$  za muškarce. Analiza t-testom nije pokazala statističku razliku ( $t=0.77$ ,  $p=0.44$ ). Whitneyev test također nije pokazao statističku razliku za dob između žena i muškaraca ( $z=0.45$ ,  $p=0.65$ ).

U istom dvadesetgodišnjem periodu recidiv tumora se javio u 15 (9%) bolesnika. Žena je bilo 7 (46.7%), a muškaraca 8 (53.3%). U toj grupi je odnos žena i muškaraca gotovo 1:1 (tj. 1.14 u korist muškaraca).

Za izradu ovog rada korišteno je tumorsko tkivo meningeoma uklopljeno u parafin iz arhivskog materijala Odjela za patologiju u Splitu i Zavoda za neuropatologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. U rad je uključeno 78 bolesnika, a analizirani su uzorci 102 operirana meningeoma. Grupa bolesnika s recidivom meningeoma povećana je na 36 bolesnika. Po arhivskom materijalu histološka dijagnoza prve biopsije glasila je meningeoma. Za usporedbu analizirana je grupa bolesnika s dijagnosticiranim malignim/atipičnim meningeomoma već pri prvoj operaciji ( $N=12$ ). Namjera je bila analizirati 130 uzoraka operiranih meningeoma. Međutim od 11 tumora nisu pronađene parafinske kocke. Iz obrade je isključeno još 14 tumora jer nisu zadovoljili kvalitetom materijala ili količinom potrebnom za obradu. Tri tumora su isključena tokom statističke analize jer su bolesnici umrli neposredno nakon operativnog zahvata zbog komplikacija.

Konačna analiza obuhvatila je grupu bolesnika čiji su meningeomi recidivirali ( $N=36$ ) i kontrolnu skupinu bolesnika čiji meningeomi nisu recidivirali ( $N=30$ ), a srednja vrijeme praćenja bolesnika je iznosilo  $88.4 \pm 35.7$  mjeseci. Ujedno je analizirana grupa meningeoma koji su nakon prve operacije dijagnosticirani kao maligni ili atipični ( $N=12$ ) i uspoređena sa prethodne dvije kliničke grupe meningeoma.

Od 36 bolesnika s meningeomom koji su recidivirali nakon makroskopski potpune operacije analizirano je 20 primarnih meningeoma, 35 recidivirajućih tumora i pet uzoraka kod bolesnika gdje je tumor ponovno nastao i operiran po treći put.

Vremenski su praćene dvije kliničke grupe bolesnika: 36 bolesnika kod kojih je nastao recidiv meningeoma te su bili podvrgnuti novoj operaciji i 30 bolesnika bez recidiva koji su činili kontrolnu skupinu. Recidiv se (mjereno vremenom do druge operacije u mjesecima) u 74% slučajeva javio u prvih pet godina nakon prve operacije: u 16% slučajeva nastao je 7 do 10 godina nakon prve operacije, a nakon više od 10 godina recidiviralo je tek 10% meningeoma.

Srednje vrijeme praćenja kontrolne skupine iznosilo je  $88.4 \pm 35.7$  mjeseci (60-156 mjeseci). Vrijeme praćenja kontrolne skupine (N=30) iznosilo je od 5 do 12 godina. Kako se većina recidiva javlja unutar pet godina od prve operacije, kontrolna skupina zadovoljava statističke kriterije za duljinu praćenja eventualnih recidiva (> 5 godina).

Arhivski materijal parafinskih kocki nakon prvog operativnog zahvata postojao je za 20 bolesnika, a uzorci dobiveni nakon druge operacije za 35 bolesnika. Pet bolesnika je podvrgnuto trećoj operaciji i njihov bioptički materijal je također analiziran. Primarni tumori recidiva dobiveni prvom operacijom uspoređeni su s kontrolnom grupom meningeoma koji nisu imali recidiva i sa inicijalno dijagnosticiranom malignom/atipičnom skupinom meningeoma.

#### 4.2. Kliničkopatološke grupe bolesnika sa meningeomom

Pri prvoj statističkoj obradi uspoređene su tri kliničkopatološke grupe bolesnika s meningeomom: oni s recidivom (N=36), bolesnici bez recidiva tumora (N=30) i grupa gdje je na uzorku prve operacije histološka dijagnoza glasila atipični/maligni meningeom (N=12) (tab. 2-8).

Iz tablice 2. vidljivo je da se grupe bolesnika statistički ne razlikuju po dobi ( $p=0.176$ ), a iz tablice 3. vidljivo je da ni za spol ne postoji značajna statistička razlika među grupama bolesnika ( $p=0.39$ ).

Usporedbu histoloških značajki meningeoma svrstanih u tri kliničkopatološke grupe - recidivni (N=20), nerekidivni (N=30) i atipični/maligni (N=12) kod prve biopsije - prikazuje tablica 4. Metodom krostabulacije utvrdilo se da između grupa meningeoma postoji razlika za tri histološke značajke, dok drugih pet histoloških značajki nema statistički značaj. Značajna statistička razlika postoji u zastupljenosti staničnog pleomorfizma ( $p=0.000$ ), atipije jezgara ( $p=0.000$ ) i gubitka strukture meningeoma

( $p=0.000$ ). Nije nađena statistički značajna razlika među grupama za sljedeće histološke značajke: prisustvo makronukleola, prisustvo malih stanica i prisustvo krvnih žila različito debelih stjenki ( $p<0.05$ ). Pri statističkoj analizi patoloških mitozu i vidljive invazija mozga bio je premali broj promjena, što je onemogućilo statističku analizu. Patološke mitoze se vide u 14.5% ukupno ispitivanih meningeoma, a u grupi meningeoma koji nisu recidivirali ih nema. Invazija mozga je uočena samo u 6.5% meningeoma, a nepristupačna je analizi u 70.9% slučajeva.

Talica 5. prikazuje izražaj p53 i PCNA u grupi recidivnih, nerecidivnih i primarno histološki dijagnosticiranih atipičnih/malignih meningeoma. Metodom krostabulacije utvrdilo se da postoji statistički značajna razlika u izražaju p53 među ispitivanim grupama ( $p=0.0033$ ). U grupi malignih meningeoma pretežu tumori s udjelom p53+stanica $>20\%$ . Izražaj PCNA se značajno statistički razlikuje među ispitivanim grupama ( $p=0.013$ ). U grupi malignih meningeoma nema ni jednog negativnog nalaza. U recidivnim meningeomima izražajnost je pretežno viša od 20%.

U tablici 5. prikazana je zastupljenost ploidijske u ispitivanim grupama meningeoma. Zbog malog broja aneuploidnih tumora unutar pojedinih grupa bolesnika, statistička obrada nije bila moguća. Aneuploidnih histograma bilo je svega 19.4%.

Tablica 6. pokazuje usporedbu srednjih vrijednosti G0/G1-faze, S-faze i G2/M-faze staničnog rasta kao i CV (koeficijent varijacije) među kliničkopatološkim grupama meningeoma ( $\chi^2$  test). Za spomenute varijable ne postoji statistička razlika među kliničkopatološkim grupama ( $p<0.05$ ).

U tablici 6. prikazane su srednje vrijednosti broja stanica u promjeru vidnog polja ("dijametar", mjera celularnosti tumora) te broja mitozu za tri kliničkopatološke grupe meningeoma. Statistički značajna razlika među grupama postoji za obje značajke, tj. za celularnost ("dijametar") ( $p=0.001$ ) i za broj mitozu ( $p=0.044$ ). Broj stanica u promjeru vidnog polja kao i broj mitozu značajno su statistički manji u kontrolnoj grupi meningeoma koji nisu recidivirali!

Značajnost statističke razlike među pojedinim kliničkopatološkim grupama meningeoma ispitan je Mann-Whitneyevim testom (tab. 7). Postoji značajna razlika u celularnosti (dijametru) između grupe meningeoma koji su recidivirali i kontrolne grupe bez recidiva. Takođe je nađena razlika između nerecidivnih i inicijalno malignih/atipičnih meningeoma. Između recidivnih i inicijalno malignih/atipičnih nema razlike u celularnosti. Mann-Whitney test ukazuje na statistički značajno različit broj mitozu između istih kliničkopatoloških grupa.

Nakon provedene histološke reklasifikacije, meningeomi su svrstani u tri histološka stupnja (I.-benigni, II.-atipični, III.-maligni). Njihov udio u do sada upoređivanim kliničkopatološkim grupama tumora prikazan je u tablici 8. Frekvencija raspodjele histološkog stupnja meningeoma značajno se statistički razlikuje između grupe recidivnih, nerecidivnih i inicijalno dijagnosticiranih atipičnih/malignih tumora ( $\chi^2=31.5$ ,  $p=0.000$ ). Statistička analiza ukazuje na razliku između grupe nerecidivnih od ostale dvije ispitivane grupe meningeoma. Od meningeoma koji su recidivirali, 55% je imalo potpuno benignu histologiju i nakon primijenjenih striktnih histoloških kriterija, dok je 20% bilo atipičnih i 25% malignih. U kontrolnoj skupini je 90% meningeoma imalo benignu histologiju, dok je svega 10% bilo atipičnih.

Iz tablica 7. i 8. slijedi zaključak da se grupa nerecidivnih meningeoma značajno razlikuje od ostale dvije kliničkopatološke grupe po broju mitozna, celularnosti i histološkom stupnju tumora.

Tablica 2. Raspodjela bolesnika s meningeomom prema dobi

BOLESNICI	N	DOB ( $x \pm s.d.$ )	p (t-test)
S recidivom	36	48.86 $\pm$ 12.8	p=0.176 (t=1.78)
Bez recidiva	30	51.9 $\pm$ 13.6	
Maligni/Atipični	12	56.33 $\pm$ 12.12	

Tablica 3. Spolna struktura bolesnika s meningeomom

BOLESNICI	Žene	Muškarci	Ukupno
S recidivom	16	20	36
Bez recidiva	18	12	30
Atipični/Maligni	7	5	12
Ukupno	41	37	78

Frekvencija raspodjela između skupina ( $\chi^2=1.88$ ,  $p=0.39$ )



Tablica 4. Usporedba histoloških pokazatelja meningeoma prema kliničkim grupama bolesnika

KLINIČKI OBLIK MENINGEOMA					
Pokazatelji	Recidivirajući* N=20	Nerecidivirajući N=30	Maligni/Atipični N=12	$\chi^2/p$	
Pleomorfizam					
Ne	5	22	0	$\chi^2=22.88$ $p=0.000$	
Da	15	8	12		
Atipija jezgara					
Ne	7	28	2	$\chi^2=28.4$ $p=0.000$	
Da	13	2	10		
Makronukleoli					
Ne	9	21	4	$\chi^2=5.80$ $p=0.055$	
Da	11	9	8		
Patološke mitoze					
Ne	16	30	7	85.4%	
Da	4	0	5		14.5%
Gubitak strukture					
Ne	1	16	1	$\chi^2=16.7$ $p=0.000$	
Da	19	14	11		
Male stanice					
Ne	7	16	2	$\chi^2=5.13$ $p=0.08$	
Da	13	14	10		
Krvne žile					
Malo	5	10	5	$\chi^2=1.63$ $p=0.80$	
Puno (deblje stjenke)	9	10	3		
Puno (tanke stjenke)	6	10	4		
Invazija mozga					
Nema je	3	6	5	22.6%	
Vidljiva	2	0	2		6.5%
Nepristupačna	15	24	5		70.9%

\*nalaz pri prvom operativnom zahvatu

Tablica 5. Razdioba rezultata imunohistokemijskog bojenja meningeoma na p53 i PCNA i ploidije prema kliničkim grupama bolesnika

Pokazatelji	Recidivirajući* N=20	Nerecidivirajući N=30	Maligni/Atipični N=12	$\chi^2/p$
Izražaj p53				
0 - 20%	10	22	2	$\chi^2=11.4$ $p=0.0033$
20% - 100%	10	8	10	
Izražaj PCNA				
0 - 20%	3	10	0	$\chi^2=8.7$ $p=0.013$
20-50%	6	12	5	
> 50%	11	8	7	
Ploidija				
Diploidni	14	28	8	80.6%
Aneuploidni	6	2	4	

\*nalaz pri prvom operativnom zahvatu

Tablica 6. Razdioba histoloških i proliferacijskih značajki meningeoma prema kliničkim grupama bolesnika

Pokazatelji	Tip meningeoma	N	(x ± s.d.)	Koeficijent korelacije	Značajnost
G0/G1-faza (% stanica)	Recidivirajući*	20	90.78 ± 5.1	0.45	0.5
	Nerecidivirajući	30	91.43 ± 6.4		
	Maligni/Atipični	12	88.72 ± 9.7		
S-faza (% stanica)	Recidivirajući*	20	6.22 ± 3.7	0.0	0.99
	Nerecidivirajući	30	6.85 ± 5.4		
	Maligni/Atipični	12	9.40 ± 9.2		
G2/M-faza (% stanica)	Recidivirajući*	20	2.86 ± 4.5	0.68	0.41
	Nerecidivirajući	30	2.42 ± 2.8		
	Maligni/Atipični	12	2.42 ± 3.1		
CV	Recidivirajući*	20	7.83 ± 3.9	2.14	0.14
	Nerecidivirajući	30	6.36 ± 1.8		
	Maligni/Atipični	12	6.63 ± 1.6		
Dijametar**	Recidivirajući*	20	63.5 ± 10.1	13.99	0.001
	Nerecidivirajući	30	53.1 ± 9.3		
	Maligni/Atipični	12	64.5 ± 14.4		
Broj mitozu	Recidivirajući*	20	5.15 ± 10.0	6.2	0.044
	Nerecidivirajući	30	1 ± 1.7		
	Maligni/Atipični	12	6.1 ± 9.1		

\*nalaz pri prvom operativnom zahvatu

\*\* broj stanica po promjeru vidnog polja velikog povećanja

Tablica 7. Usporedba celularnosti ("dijametar") i broja mitozu u kliničkim grupama meningeoma

Mann Whitney test	Recidivirajući*- Nerecidivirajući	Nerecidivirajući- Maligni	Recidivirajući*- Maligni
Dijametar**	z=3.3, p=0.001	z=2.84, p=0.04	z=0.28, p=0.78
Mitoze	z=1.98, p=0.048	z=2.14, p=0.032	z=0.65, p=0.54

\*nalaz pri prvom operativnom zahvatu

\*\* broj stanica po promjeru vidnog polja velikog povećanja

Tablica 8. Razdioba nerecidivnih, recidivnih\* i malignih/atipičnih meningeoma u histološke stupnjeve prema WHO (I-III)

Histološki stupanj	Recidivirajući*	Nerecidivirajući	Maligni/Atipični	Ukupno
I Benigni	11 (55%)	27 (90%)	0	38
II Atipični	4 (20%)	3 (10%)	5 (42%)	12
III Maligni	5 (25%)	0	7 (58%)	12
Ukupno	20	30	12	62

\*nalaz pri prvom operativnom zahvatu

Frekvencija raspodjela između skupina ( $\chi^2=31.5$ ,  $p=0.000$ )

#### 4.3. Analiza recidivnih meningeoma iz prvog operacijskog zahvata

Od meningeoma koji su recidivirali posebno su izdvojeni i analizirani histološki benigni tumori prilikom prve operacije (N=11) i uspoređeni s meningeomima koji nisu recidivirali (N=27) (tab. 9-12).

U tablici 9. prikazani su rezultati dobiveni  $\chi^2$  i Fisherovim egzaktnim testom za male uzorke. Usporedbom histoloških značajki nađena je statistički značajna razlika za tri histološke značajke: pleomorfizam ( $p=0.036$ ), atipiju jezgara ( $p=0.019$ ) i gubitak strukture ( $p=0.005$ ).  $\chi^2$  testom se nalazi značajna statistička razlika ( $p=0.005$ ) za gubitak strukture, ali ne i za pleomorfizam. U tablici 9. prikazan je udio patoloških mitozu u ispitivanim tumorima, ali je broj premalen za statističku analizu.

Tablica 9. također prikazuje rezultate analize Fisherovim egzaktnim testom za stupanj ploidijske i broj mitozu (<3 i >4/HPF) za iste grupe meningeoma. Za stupanj ploidijske i broj mitozu ne postoji statistička razlika između meningeoma benigne histologije koji su recidivirali i onih koji nisu recidivirali.

U tablici 10. prikazan je izražaj p53 u meningeomima. Između grupa meningeoma benigne histologije koji su recidivirali i grupe nerekidivnih meningeoma postoji 90% vjerojatnost i razlike za izražaj p53 na granici <20% i >20%. Taj rezultat ukazuje da tumori koji su recidivirali imaju tendenciju povećanog nakupljanja p53 proteina u jezgrama.

U tablici 11. prikazan je izražaj PCNA u meningeomima. Skupina meningeoma s više od 50% PCNA-pozitivnih jezgara (visoki stupanj obojenja tj. proliferacije) pokazuje statistički značajnu razliku između recidivnih tumora benigne histologije i nerekidivnih meningeoma. Znatno je veći broj PCNA-negativnih jezgara u grupi nerekidivnih meningeoma. Visoki stupanj obojenosti (>50%) statistički je podjednako zastupljen u obje grupe.

Iz tablice 12. vidi se da među ovim grupama nema statistički značajne razlike u broju mitozu kao ni u udjelu stanica u G0/G1-fazi, S-fazi i G2/M-fazi ciklusa rasta stanica. Kada se usporede meningeomi benigne histologije koji su recidivirali s meningeomima koji nisu recidivirali, uočava se da se ove dvije grupe tumora statistički značajno razlikuju u celularnosti tumora ("dijametar") ( $p=0.005$ ) i širini G0/G1 vrška (CV) ( $p=0.003$ ). Nerekidivnim meningeomima je srednja vrijednost broja stanica u promjeru vidnog polja velikog povećanja iznosila  $52.89 \pm 9.63$ , a CV  $6.51 \pm 1.73$ . Srednja vrijednost CV meningeoma koji su recidivirali iznosi  $9.59 \pm 4.51$  što je granična vrijednost za kvalitetu pripremljenog uzorka. Alternativno, visok CV može

označavati i tzv. "nearidiploidne" tumore, što se razlikuje od nerecidivnih meningeoma čiji histogrami obzirom na srednju vrijednost CV imaju jasne kriterije za diploidni histogram.

Tablica 9. Usporedba histoloških značajki, ploidijske i broja mitoze između kliničkih grupa bolesnika s meningeomom

KLINIČKI OBLIK MENINGEOMA				
Pokazatelji	Recidivirajući* N=11	Nerecidivirajući* N=27	Fisherov egzaktni test	$\chi^2/p$
Pleomorfizam				
Ne	5	22	p=0.036	$\chi^2=4.9$ p=0.026
Da	6	5		
Atipija jezgara				
Ne	7	26	p=0.019	
Da	4	1		
Makronukleoli				
Ne	8	21	p=0.052	
Da	3	6		
Patološke mitoze				
Ne	8	27	malen uzorak	
Da	3	0		
Gubitak strukture				
Ne	1	16	p=0.005	$\chi^2=7.96$ p=0.005
Da	10	11		
Male stanice				
Ne	4	16	p=0.18	
Da	7	11		
Krvne žile				
Malo	3	9	p=1	
Puno (deblje stjenke)	5	9		
Puno (tanke stjenke)	3	9		
Ploidija				
Diploidni	10	26	p=1	
Aneuploidni	1	1		
Mitose				
$\leq 3/10\text{HPF}$	8	26	p=1	
$\geq 4/10\text{HPF}$	3	1		

\*nalaz isključivo benigne histologije pri prvom operativnom zahvatu

Tablica 10. Razdioba rezultata imunohistokemijskog bojenja meningeoma na p53 u bolesnika s recidivirajućim\* i nerecidivirajućim\* meningeomom

Izražaj p53	Recidivirajući N=11	Nerecidivirajući N=27	N	Fisherov egzaktni test
0 - 10%	3	13	16	p=0.098 (90% vjerojatnost razlike)
10 - 20%	3	9	12	
20 - 50%	4	3	7	
> 50%	1	2	3	
0 - 20%	6	22		
> 20%	5	5		

\*nalaz isključivo benigne histologije pri prvom operativnom zahvatu

Tablica 11. Razdioba rezultata imunohistokemijskog bojenja meningeoma na PCNA u bolesnika s recidivirajućim\* i nerekidivirajućim\* meningeomom

Izražaj PCNA	Recidivirajući N=11	Nerekidivirajući N=27	N	Fisherov egzaktni test	$\chi^2/p$
0 - 10%	1	2	3		
10 - 20%	1	8	9		
20 - 50%	2	11	13		
> 50%	7	6	13		
0 - 50%	4	21		p=0.024	$\chi^2=5.96$ p=0.015
> 50%	7	6			

\*nalaz isključivo benigne histologije pri prvom operativnom zahvatu

Tablica 12. Razdioba histoloških i proliferacijskih značajki recidivirajućih\* i nerekidivirajućih\* meningeoma

Pokazatelji	meningeomi	N	( $\bar{x} \pm s.d.$ )	Koeficijent korelacije	p
Dijametar broj st. / HPF	recidivirajući	11	62.55 $\pm$ 7.59	2.84	0.005
	nerekidivirajući	27	52.89 $\pm$ 9.63		
Broj mitozna	recidivirajući	11	8.00 $\pm$ 14.32	1.6	0.11
	nerekidivirajući	27	0.78 $\pm$ 1.63		
G0/G1-faza % stanica	recidivirajući	11	90.36 $\pm$ 5.64	0.18	0.86
	nerekidivirajući	27	90.62 $\pm$ 6.25		
S-faza % stanica	recidivirajući	11	7.08 $\pm$ 3.58	0.27	0.78
	nerekidivirajući	27	7.40 $\pm$ 5.44		
G2/M-faza % stanica	recidivirajući	11	2.80 $\pm$ 4.53	0.74	0.46
	nerekidivirajući	27	2.63 $\pm$ 2.89		
CV	recidivirajući	11	9.59 $\pm$ 4.51	2.95	0.003
	nerekidivirajući	27	6.51 $\pm$ 1.73		

\* nalaz isključivo benigne histologije pri prvom operativnom zahvatu

#### 4.4. Analiza recidivnih meningeoma iz drugog operacijskog zahvata

U tablicama 13.-25. prikazana je statistička analiza značajki meningeoma dobivenih pri drugoj operaciji bolesnika tj. značajki recidiva tumora (N=35) u usporedbi s meningeomima koji nisu recidivirali (N=30).

Usporedbom ove dvije grupe tumora uočava se da se one statistički razlikuju u šest histoloških značajki: pleomorfizmu stanica (p=0.000), atipiji jezgara (p=0.000), vidljivim makronukleolima (p=0.000), gubitku strukture (p=0.01), broju patoloških mitozna (p=0.000) i prisustvu nekroze (p=0.041) (tab. 13). Nastanak malih stanica i broj krvnih žila nisu se statistički razlikovali.

Broj aneuploidnih meningeoma bio je dovoljan za analizu koja je pokazala da postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti aneuploidije između nerekidivirajućih

meningeoma i recidiva ( $p=0.003$ ). U grupi nerecidivnih tumora bila su samo dva aneuploidna, za razliku od 13 aneuploidnih tumora u grupi recidiva.

Kada se usporede meningeomi koji su recidivirali ( $N=35$ ) s grupom nerecidivnih ( $N=30$ ), uočava se statistički značajna razlika u stupnju izražaja p53 na razdjelnici od 20% i 50% (tab. 14). Taj rezultat naglašava statistički značajno veći izražaj p53 u grupi recidivnih meningeoma za razliku od nerecidivnih.

Rezultati bojenja na PCNA (tab. 14) također pokazuju značajnu statističku razliku u izražaju između grupe recidivnih meningeoma i meningeoma koji nisu recidivirali. U grupi recidiva izražaj PCNA bio je statistički značajno viši ( $p=0.008$ ).

Kada se usporede meningeomi koji su recidivirali ( $N=35$ ) s grupom nerecidivnih ( $N=30$ ), vidi se značajna razlika u broju mitozu ( $p=0.023$ ) i broju jezgara u promjeru vidnog polja malog povećanja ("dijametar") ( $p=0.047$ ) (tab. 15). Za vrijednosti analiziranih histograma dobivenih metodom protočne citometrije nije se našla statistički značajna razlika.

U tablici 16. prikazana je usporedba recidivnih ( $N=35$ ) i nerecidivnih meningeoma ( $N=30$ ) prema histološkom stupnju. Uočava se statistički značajna razlika među grupama meningeoma prema histološkom stupnju ( $p=0.000$ ). U grupi recidiva veći je broj tumora II. (46%) i III. stupnja (23%). Benigne histologije bilo je 31% meningeoma, za razliku od 90% benignih meningeoma u nerecidivnoj grupi. Najčešći oblik meningeoma u recidivu bio je atipični (46%).

U tablici 17. prikazani su rezultati univarijatne statističke analize Wilcoxonim i Log-rang testom za dvije kliničke grupe bolesnika: bez recidiva ( $N=30$ ) i s recidivom meningeoma ( $N=35$ ). Ispitan je utjecaj histološkog stupnja meningeoma, izražaja p53, izražaja PCNA i broja mitozu na ukupno preživljenje bolesnika s meningeomom do nastanka prvog recidiva. Vidljivo je da histološki stupanj ( $p=0.167$ ), izražaj p53 ( $p=0.96$ ), izražaj PCNA ( $p=0.66$ ) kao i broj mitozu ( $p=0.14$ ) nisu vjerodostojni pojedinačni pokazatelji za dužinu preživljenja bolesnika s meningeomom s obzirom na nastanak recidiva ( $p<0.05$ ). Slike 11.-14. prikazuju krivulje ukupnog preživljenja prema navedenim statistički vjerodostojnim pokazateljima.

Slika 11. prikazuje krivulje ukupnog preživljenja prema izraženosti p53. Prema izražaju p53 tumori su podijeljeni u tri grupe: 0-20%, 20-50% i >50%.

Slika 12. prikazuje krivulje ukupnog preživljenja bolesnika prema izraženosti PCNA. Prema izražaju PCNA tumori su podijeljeni u dvije grupe: 0-20% i >20%.

Slika 13. prikazuje krivulje ukupnog preživljenja bolesnika prema broju mitozu. Prema broju bolesnika meningeomi su podijeljeni u dvije grupe:  $\leq 4$  mitoze i  $\geq 5$  mitozu.

Slika 14. prikazuje krivulje ukupnog preživljenja bolesnika prema trima histološkim stupnjevima meningeoma: I.- benigni, II.-atipični, III.-maligni.

Tablica 13. Razdioba i usporedba histoloških značajki i ploidijske recidivirajućih\* (N=35) i nerekidivirajućih meningeoma (N=30)

Pokazatelji	Recidivirajući* N=35	Nerekidivirajući N=30	$\chi^2/p$
Spol			
Žene	16	18	$\chi^2=1.58$ $p=0.21$
Muškarci	19	12	
Pleomorfizam			
Ne	8	22	$\chi^2=16.6$ $p=0.000$
Da	27	8	
Atipija jezgara			
Ne	12	28	$\chi^2=23.8$ $p=0.000$
Da	23	2	
Makronukleoli			
Ne	9	21	$\chi^2=12.75$ $p=0.000$
Da	26	9	
Patološke mitoze			
Ne	23	30	$\chi^2=12.6$ $p=0.000$
Da	12	0	
Gubitak strukture			
Ne	5	16	$\chi^2=11.3$ $p=0.01$
Da	30	14	
Male stanice			
Ne	11	16	$\chi^2=3.2$ $p=0.074$
Da	24	14	
Nekroze			
Ne	26	28	$\chi^2=4.17$ $p=0.041$
Mikro i geografske	9	2	
Krvne žile			
Malo	11	10	$\chi^2=0.72$ $p=0.69$
Puno (deblje stjenke)	15	10	
Puno (tanke stjenke)	9	10	
Ploidija			
Diploidni	22	28	$\chi^2=8.85$ $p=0.003$
Aneuploidni	13	2	

\*nalaz pri drugom operativnom zahvatu

Tablica 14. Razdioba i usporedba izraženosti imunohistokemijskog bojenja na p53 i PCNA (u % pozitivno obojenih jezgara) između grupe recidivirajućih\* (N=35) i nerekidivirajućih meningeoma (N=30)

Izražaj p53	Recidivirajući* N=35	Nerekidivirajući N=30	$\chi^2/p$
0%	9	13	$\chi^2=13.98$ $p=0.003$
0 - 20%	3	9	
20 - 50%	17	4	
> 50%	6	4	
Izražaj PCNA			
0 - 20%	2	10	$\chi^2=9.64$ $p=0.008$
20 - 50%	13	12	
> 50%	20	8	

\* nalaz pri drugom operativnom zahvatu

Tablica 15. Razdioba i usporedba ispitivanih parametrijskih vrijednosti za histološke značajke dijametar i mitoze te za parametre staničnog ciklusa između grupe recidivirajućih\* i nerecidivirajućih meningeoma

Pokazatelji	Ispitivane grupe	N	( $\bar{x} \pm s.d.$ )	Koeficijent korelacije	Značajnost
Dob	Recidivirajući*	35	48.86 $\pm$ 12.8	0.94	0.35
	Nerecidivirajući	30	51.93 $\pm$ 13.60		
Dijametar	Recidivirajući*	35	60.60 $\pm$ 12.65	1.98	0.047
	Nerecidivirajući	30	53.10 $\pm$ 9.28		
Broj mitoz	Recidivirajući*	35	3.46 $\pm$ 4.55	2.28	0.023
	Nerecidivirajući	30	1.00 $\pm$ 1.70		
G0/G1-faza	Recidivirajući*	35	92.95 $\pm$ 6.32	0.92	0.28
	Nerecidivirajući	30	90.82 $\pm$ 6.21		
S-faza	Recidivirajući*	35	5.67 $\pm$ 3.32	0.22	0.83
	Nerecidivirajući	30	6.85 $\pm$ 5.43		
G2/M-faza	Recidivirajući*	35	2.94 $\pm$ 3.49	0.84	0.40
	Nerecidivirajući	30	2.59 $\pm$ 2.83		
CV	Recidivirajući*	35	7.18 $\pm$ 8.55	0.31	0.76
	Nerecidivirajući	30	6.36 $\pm$ 1.78		

\* nalaz pri drugom operativnom zahvatu

Tablica 16. Razdioba i usporedba histološkog stupnja između grupe recidivirajućih\* i nerecidivirajućih meningeoma

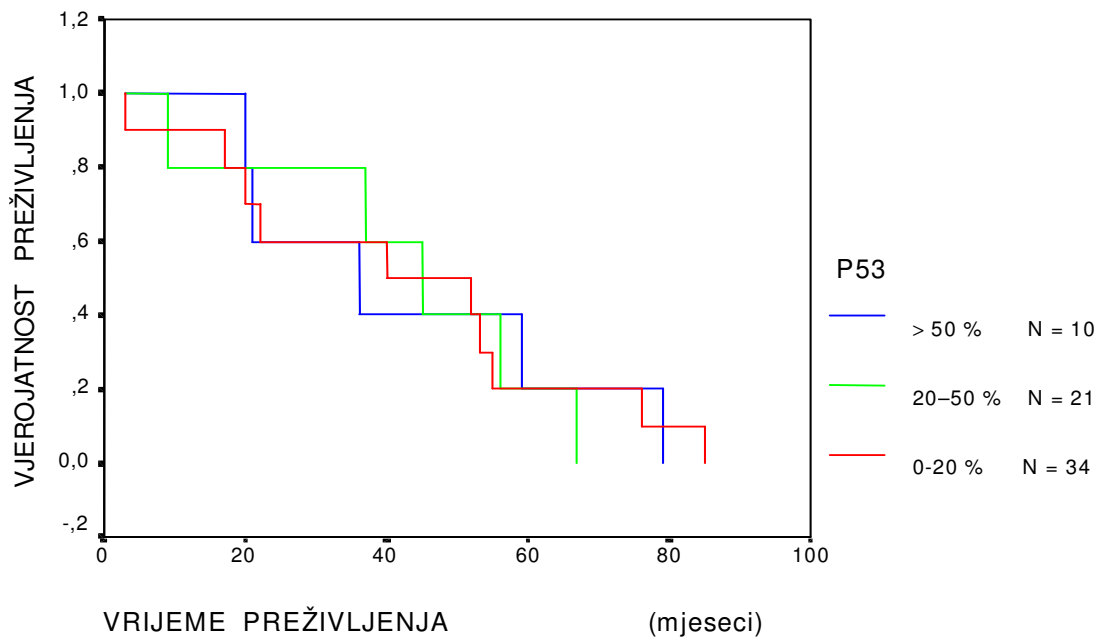
Histološki stupanj	N=65	Recidivirajući* N=35	Nerecidivirajući N=30	$\chi^2/p$
Benigni (I.)	38	11 (31%)	27 (90%)	$\chi^2=23.4$
Atipični (II.)	19	16 (46%)	3 (10%)	p=0.000
Maligni (III.)	8	8 (23%)	0	

\* nalaz pri drugom operativnom zahvatu

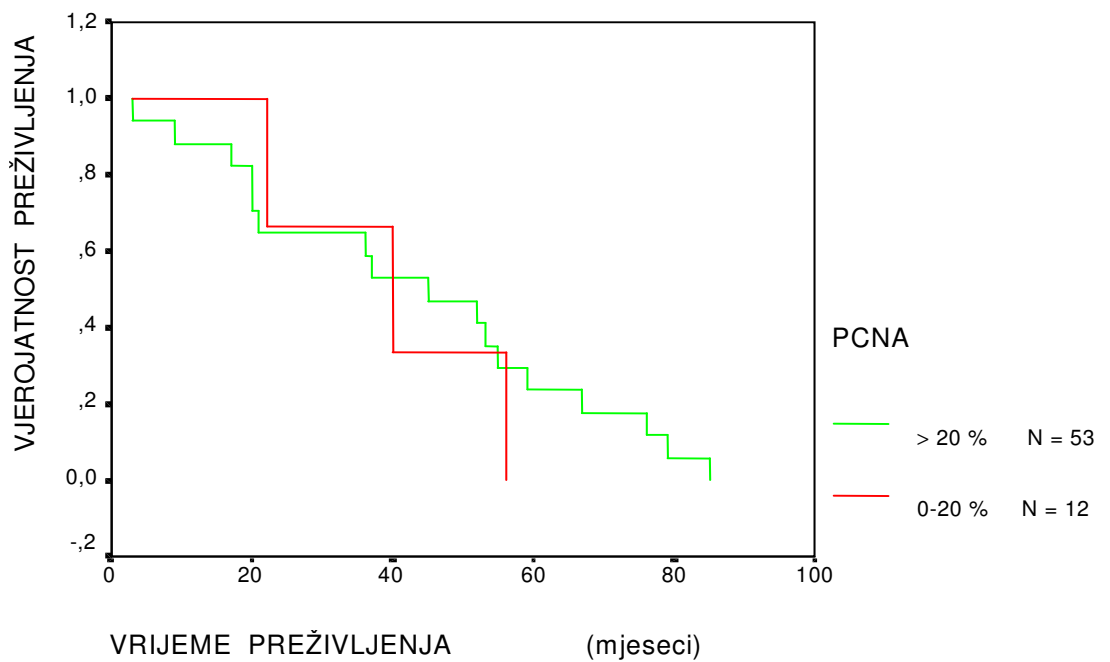
Tablica 17. Long-rang analiza brzine nastanka recidiva u odnosu na histološki stupanj meningeoma, izražaj p53 i PCNA te broj mitoz

Pokazatelj	Log rang	p
p53	0.07	0.96
PCNA	0.19	0.66
Broj mitoz	2.21	0.14
Histološki stupanj	3.58	0.167

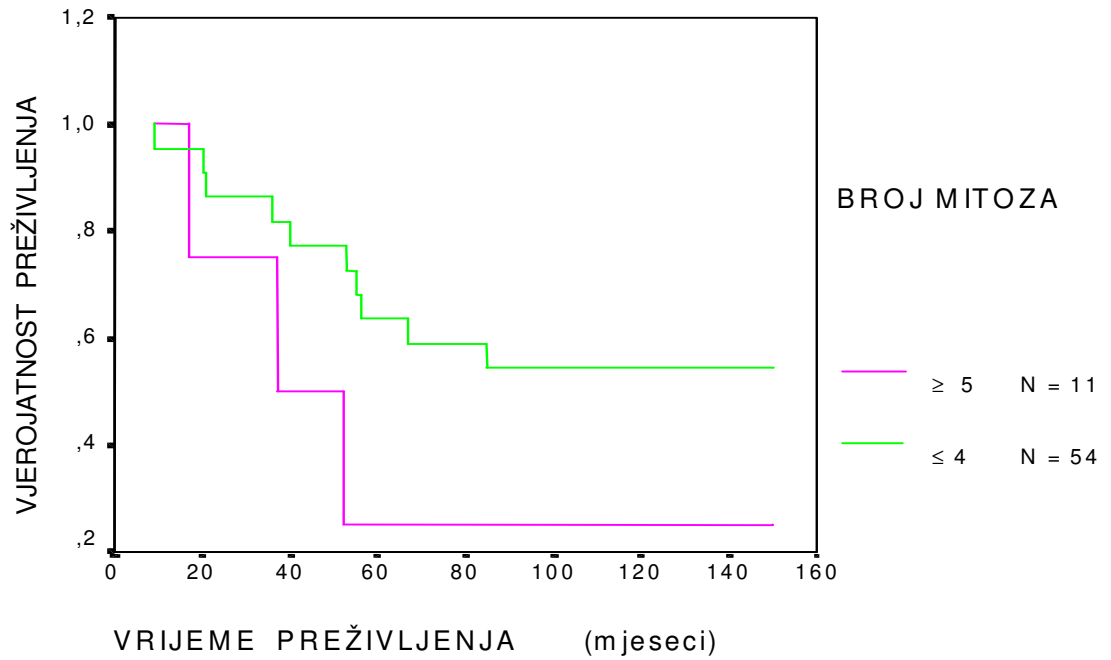




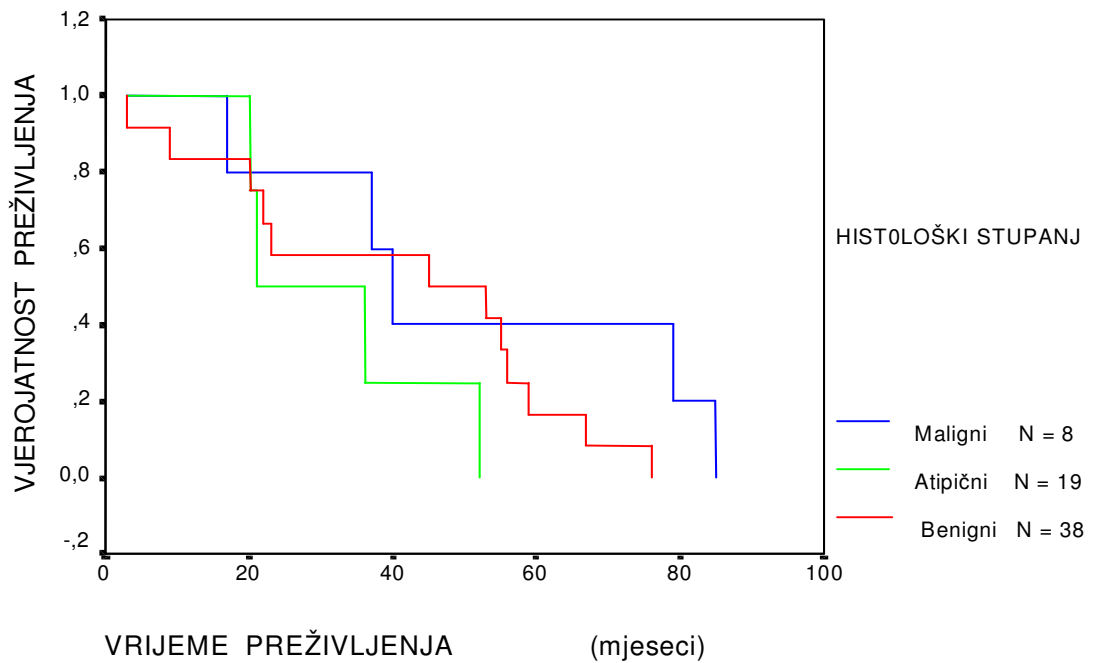
Slika 11. Krivulja ukupnog preživljenja prema izraženosti p53 u meningiomima.



Slika 12. Krivulja ukupnog preživljenja prema izraženosti PCNA u meningiomima.



Slika 13. Krivulja ukupnog preživljenja prema broju mitoza u meningeomima.



Slika 14. Krivulja ukupnog preživljenja prema histološkom stupnju meningeoma.

#### 4.4.1. Analiza prema histološkom stupnju

Nadalje je analiziran izražaj p53 (tab. 18) i PCNA (tab. 19) u 35 recidiva i 30 nerecidivnih meningeoma u odnosu na tri histološka stupnja kako bi se ispitala veza izražaja p53 i PCNA s histologijom. Analiza pokazuje vrlo značajnu statističku razliku u izraženosti p53 prema histološkom stupnju meningeoma ( $p=0.000$ ). U grupi benignih tumora p53 nije bio izražen ili je bio slabo izražen u 74% tumora, a u grupi atipičnih u 16%. Izražaj p53 na razini  $>20\%$  imalo je 26% benignih meningeoma, za razliku od 84% atipičnih meningeoma.

Izražaj PCNA u odnosu na histološki stupanj meningeoma prikazan je u tablici 19. Postoji značajna statistička razlika u izražaju PCNA za sva tri histološka stupnja meningeoma ( $p=0.023$ ). U grupi atipičnih veći je broj tumora (63%) s visokim ( $>50\%$ ) izražajem PCNA, dok je u grupi benignih više slučajeva (29%) s neizraženim PCNA. Svi maligni tumori imali su izražaj PCNA  $>20\%$ , tj. srednji i visoki stupanj izraženosti. Ploidija je imala veću i statističku značajnost kada se analizirala u odnosu na pojavu recidiva meningeoma (tab. 13). Kada se analizira vezano uz histološki stupanj, spomenuta statistička značajnost se izgubila (tab. 20). Kada prilikom statističke analize zbog malog broja isključimo maligne tumore, između prve dvije grupe (benignih i atipičnih) postoji tek 92% vjerojatnoća statističke razlike ( $\chi^2=2.36$ ,  $p=0.085$ ). Parametrijske vrijednosti histograma (G0/G1-faza, S-faza, G2/M-faza i CV) nisu imale statistički značaj pa nisu tablično niti prikazane.

U tablicama 21. i 22. prikazane su vrijednosti za broj mitozu i dijametar. Broj mitozu statistički se značajno razlikuje između meningeoma različitih histoloških stupnjeva ( $p=0.000$ ) (tab. 21). Statistički se međusobno razlikuju grupa benignih i atipičnih ( $p=0.000$ ) i benignih i malignih meningeoma ( $p=0.000$ ) (tab. 22). Celularnost tumora statistički se značajno razlikuje ( $p=0.002$ ) prema histološkom stupnju (tab. 21). Statistička razlika utvrđena Mann-Whitneyevim testom postoji samo između grupa benignih i atipičnih ( $p=0.001$ ) (tab. 22). Prema celularnosti ne razlikuju se statistički atipični od malignih, dok je za broj mitozu pronađena statistički značajna razlika.

Tablica 18. Izražaj p53 u tri histološka stupnja recidivirajućih\* (N=35) i nerecidivirajućih meningeoma (N=30)

Izražaj p53	Benigni N=38	Atipični N=19	Maligni N=8	$\chi^2/p$
0 - 20%	28 (74%)	3 (16%)	3	$\chi^2=17.7$ $p=0.000$
20 - 50%	8 (21%)	9 (47%)	4	
> 50%	2 (5%)	7 (37%)	1	

\* nalaz pri drugom operativnom zahvatu

Tablica 19. Izražaj PCNA u tri histološka stupnja recidivirajućih\* (N=35) i nerecidivirajućih meningeoma (N=30)

Izražaj PCNA	Benigni N=38	Atipični N=19	Maligni N=8	$\chi^2/p$
0 - 20%	11 (29%)	1 (5%)	0	$\chi^2=7.59$ $p=0.023$
20 - 50%	16 (42%)	6 (32%)	3	
> 50%	11 (29%)	12 (63%)	5	

\* nalaz pri drugom operativnom zahvatu

Tablica 20. Razdioba ploidije (diploidni i aneuploidni tumori) u tri histološka stupnja u recidivirajućih\* (N=35) i nerecidivirajućih meningeoma (N=30)

Ploidija	Benigni N=38	Atipični N=19	Maligni N=8	$\chi^2/p$
Diploidni	32	12	6	$\chi^2=2.36$ $p=0.085$
Aneuploidni	6	7	2	

\* nalaz pri drugom operativnom zahvatu

Tablica 21. Kruskal Wallisova analiza varijance za dijametar i broj mitozu u tri histološka stupnja recidivirajućih\* (N=35) i nerecidivirajućih meningeoma (N=30)

Srednja vrijednost	Benigni N=38	Atipični N=19	Maligni N=8	$\chi^2$	p
Dijametar	52.6 ± 10.7	62.8 ± 10.0	64.1 ± 14.3	12.2	0.002
Broj mitozu	0.62 ± 1.44	3.15 ± 2.8	8.0 ± 6.3	31.4	0.000

\* nalaz pri drugom operativnog zahvatu

Tablica 22. Značajnost statističke razlike između histoloških stupnjeva meningeoma u grupi recidivirajućih\* (N=35) i nerecidivirajućih meningeoma (N=30)

Histološki stupanj	Dijametar		Broj mitozu	
Benigni-Atipični	z=3.2	p=0.001	z=4.6	p=0.000
Benigni-Maligni	z=2.2	p=0.032	z=4.4	p=0.000
Atipični -Maligni	z=0.2	p=0.84	z=1.97	p=0.049

\* nalaz pri drugom operativnom zahvatu

#### 4.4.2. Analiza prema kliničkom tijeku

U tablicama 23.–25. prikazane su analize kliničkih grupa meningeoma (recidivni-nerecidivni) jednakog histološkog stupnja u odnosu na izražaj p53 i PCNA, ploidiiju i parametrijske značajke - broj mitozu, dijametar i Go/G1-fazu, S-fazu, G2/M-fazu i CV. Grupi 0 sačinjavaju benigni meningeomi koji nisu recidivirali (N=27) (isključena su tri atipična slučaja). Grupe 1 (N=11), 2 (N=16) i 3 (N=8) čine recidivni meningeomi svrstani prema histološkom stupnju. Tako je omogućena usporedba benignih recidivnih s nerecidivnim meningeomima u odnosu na histološki tip meningeoma. Za parametrijske vrijednosti histograma ne postoji statistički značajna razlika pa su izostavljeni iz daljnjeg prikaza. Za S-fazu je učinjena dodatna analiza sa više različitih prijelomnih vrijednosti, ali statistički značajna razlika među grupama nije nađena ni za jednu mjeru (u tablici 23. ostavljen je primjer rezultata analize sa graničnom vrijednošću za S-fazu na granici  $>6<$ ). Statistički značajna razlika među grupama postoji za izražaj p53 i za stupanj ploidiije (tab. 23). U recidivima p53 je jače izražen. Ako se usporede skupine 0 i 1 s benignom histologijom, Fisherov egzaktni test daje vrijednosti  $p=0.054$ , a po  $\chi^2=4.1$ ,  $p=0.44$ . To znači da postoji 95% vjerojatnosti razlike između dviju skupina benigne histologije, odnosno da postoji povezanost recidiva sa izražajem p53. U skupini nerecidivnih, a benigne histologije (0), 22 bolesnika (81%) imalo je negativan izražaj p53. U skupini recidiva benigne histologije (1), pola ih je imalo izražen p53, a pola ne.

Za stupanj ploidiije postoji značajna statistička razlika među grupama ( $p=0.007$ ). Veći broj aneuploidnih meningeoma je u atipičnim tumorima i recidivima (benigne histologije), za razliku od većeg broja diploidnih u nerecidivnim tumorima benigne histologije (tab. 23). Osim na II. histološki stupanj, aneuploidija ukazuje i na gori biološki tijek bolesti (recidiv!). Zbog malog broja uzoraka iz statističke analize se isključila grupa 3.

Prilikom usporedbe grupa, izražaj PCNA nije imao statistički značaj ( $p=0.031$ ). Ipak, izražaj PCNA  $<50\%$  povezan je s zastupljenošću nerecidivnih benignih meningeoma, a pri izraženosti PCNA  $>50\%$  s recidivnim atipičnim tumorima (tab. 23).

Nadalje je ispitana povezanost celularnosti tumora i broja mitozu (tab. 24 i 25) s kliničkim grupama meningeoma (recidivni-nerecidivni) jednakog histološkog stupnja. Broj mitozu se značajno statistički razlikuje između ispitivanih grupa meningeoma ( $p=0.000$ ) (tab. 24), a razlika postoji između različitih histoloških stupnjeva tumora. Nema razlike između benignih recidivnih i benignih nerecidivnih meningeoma po broju mitozu (tab. 25).

Celularnost tumora značajno se statistički razlikuje ( $p=0.004$ ) između ispitivanih grupa (tab. 24), a statistički značajna razlika postoji između nerecidivnih benignih i recidivnih atipičnih tumora (tab. 25).

Tablica 23. Razdioba p53, PCNA, ploidijske i S-faze u meningeomima različitog kliničkog toka i različitog histološkog stupnja

Pokazatelji	0 N=27	1 N=11	2 N=16	3 N=8	$\chi^2/p$
Izražaj p53					
0 - 20%	22	6	3	3	$\chi^2=17.7$ $p=0.001$
> 20%	5	5	13	5	
Izražaj PCNA					
0 - 50%	21	5	5	3	$\chi^2=8.8$ $p=0.031$
> 50%	6	6	11	5	
Ploidija					
Diploidni	26	6	10	6	$\chi^2 = 9.9$ $p=0.007$
Aneuploidni	1	5	6	2	
S-faza					
< 6	15	8	11	4	$\chi^2 = 2.06$ $p=0.056$
> 6	12	3	6	4	

0= nerecidivirajući (samo benigni) (N=27)  
 1= recidivirajući benigni (N=11)  
 2= recidivirajući atipični (N=16)  
 3= recidivirajući maligni (N= 8)

Tablica 24. Kruskal-Wallisova analiza varijance za dijametar i broj mitoze u meningeomima različitog kliničkog toka i različitog histološkog stupnja

Pokazatelji	0	1	2	3	$\chi^2$	p
Dijametar	52.9 ± 9.6	51.9 ± 13.4	64.2 ± 10	64.1 ± 14.2	13.3	0.004
Mitoze	0.78 ± 1.6	0.25 ± 0.9	3.2 ± 3.1	8.0 ± 6.3	29.8	0.000

0= nerecidivirajući (samo benigni) (N=27)  
 1= recidivirajući benigni (N=11)  
 2= recidivirajući atipični (N=16)  
 3= recidivirajući maligni (N= 8)

Tablica 25. Značajnost statističke razlike za dijametar i broj mitoze u meningeomima različitog kliničkog toka i različitog histološkog stupnja

Pokazatelji	0 - 1	0 - 2	0 - 3	1 - 2	1 - 3	2 - 3
Dijametar z	0.03	3.2	2.1	2.4	1.77	0.06
p	0.98	0.001	0.039	0.015	0.076	0.95
Mitoze z	1.6	3.6	3.8	3.5	3.9	1.94
p	0.2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.053

Mann-Whitney test, z=koeficijent varijacije, p=značajnost

0= nerecidivirajući (samo benigni) (N=27)  
 1= recidivirajući benigni (N=11)  
 2= recidivirajući atipični (N=16)  
 3= recidivirajući maligni (N= 8)

#### 4.5. Klasifikacija meningeoma (WHO)

Ukupno je analizirano 102 meningeoma. Razdioba 49 benignih meningeoma u histološke podtipove prema WHO prikazana je u tablici 26. Od benignih tumora najčešći su bili tranzicijski (25%) i meningotelijski tip (19%). Razdioba svih analiziranih meningeoma (N=102) prema WHO-klasifikaciji prikazana je u tablici 27. Razdioba svih analiziranih meningeoma u tri histološka stupnja prikazana je u tablici 28. (benignih-48%, atipičnih-29% i malignih-23%).

Tablica 26. Razdioba 49 benignih meningeoma u histološke podtipove prema WHO

	Histološki podtip	Učestalost	%
1	Meningotelijski	9	19
2	Fibrozni	2	4
3	Tranzicijski	12	25
4	Psamomski	4	8
5	Angiomatozni	4	8
6	Mikrocistični	3	6
7	Sekretorni	5	10
8	Svijetlih stanica	5	10
9	Hordoidni	0	0
10	Bogat limfocitima i plazmasticama	2	4
11	Metaplastični-ksantomski	2	4
12	Metaplastični drugi: osealni, hondroidni	1	2
		49	100%

Tablica 27. Razdioba svih analiziranih meningeoma prema WHO klasifikaciji

	Histološki tip	Učestalost	%
1	Meningotelijski	9	9
2	Fibrozni	2	2
3	Tranzicijski	12	12
4	Psamomski	4	4
5	Angiomatozni	4	4
6	Mikrocistični	3	3
7	Sekretorni	5	5
8	Svijetlih stanica	5	5
9	Hordoidni	0	0
10	Bogat limfocitima i plazmasticama	2	2
11	Metaplastični-ksantomski	2	2
12	Metaplastični drugi: osealni, hondroidni	1	1
13	Papilarni	4	4
14	Atipični	30	29
15	Anaplastični	19	18
		102	100%

Tablica 28. Razdioba analiziranih meningeoma u tri histološka stupnja

Benigni	49	48%
Atipični	30	29%
Maligni	23	23%
Ukupno	102	100%

#### 4.6. Histološki stupnj meningeoma

Svi meningeomi (N=102) podijeljeni su u tri grupe prema histološkom stupnju, a potom analizirani prema ispitivanim značajkama. Rezultati analize prikazani su u tablicama 29.-32.

Metodom krostabulacije utvrđeno je da postoji značajna statistička razlika u zastupljenosti staničnog pleomorfizma ( $p=0.000$ ), atipije jezgara ( $p=0.000$ ), vidljivim makronukleolima ( $p=0.000$ ), broju patoloških mitozama ( $p=0.000$ ), gubitku strukture meningeoma ( $p=0.000$ ) i prisutnosti nekroze ( $p=0.000$ ). To govori o visokoj vrijednosti ovih značajki pri histološkom stupnjevanju. Prisutnost malih stanica ( $p=0.035$ ) i brojnost krvnih žila ( $p=0.033$ ) nema ovakav statistički značaj. Među 102 meningeoma bio je premali broj onih s invazijom mozga pa su se zato isključili iz daljnje analize. Stupanj ploidijske razlike nije postigao statistički značaj, iako pokazuje tendenciju (postoji 95% vjerojatnosti razlike među histološkim stupnjevima).

Tablica 30. prikazuje izražaj p53 i PCNA u tri histološka stupnja meningeoma - benignom (N=49), atipičnom (N=30) i malignom (N=23). Postoji statistički značajna



razlika u izražaju p53 prema histološkom stupnju meningeoma ( $p=0.000$ ). Izražaj PCNA se također značajno statistički razlikuje ( $p=0.032$ ) među ispitivanim grupama. Parametrijske vrijednosti histograma staničnog ciklusa rasta stanica (Go/G1-faza, S-faza, G2/M-faza staničnog rasta i CV) nisu se statistički razlikovale među histološkim grupama meningeoma.

U tablici 31. prikazana je usporedba srednjih vrijednosti broja stanica po promjeru vidnog polja ("dijametar") koji je mjera celularnosti tumora, te broja mitozu s histološkim stupnjem meningeoma. Postoji veliki statistički značaj za obje histološke značajke, tj. za "dijametar" ( $p=0.000$ ) i broj mitozu ( $p=0.000$ ) u odnosu na histološki stupanj meningeoma.

Za parametar celularnost nađena je razlika između grupe benignih od atipičnih i malignih, dok Mann-Whitneyev test ukazuje na statistički značajno različit broj mitozu između svih skupina meningeoma.

Tablica 29. Razdioba meningeoma u tri histološka stupnja (benigni, atipični, maligni) u odnosu na histološke značajke i ploidiju

Pokazatelji	Benigni N=49	Atipični N=30	Maligni N=23	$\chi^2/p$
Pleomorfizam				
Ne	34	1	0	$\chi^2=51.5$ $p=0.000$
Da	15	29	23	
Atipija jezgara				
Ne	42	6	2	$\chi^2=51.5$ $p=0.000$
Da	7	24	21	
Makronukleoli				
Ne	33	7	5	$\chi^2=20.7$ $p=0.000$
Da	16	23	18	
Patološke mitoze				
Ne	49	22	6	$\chi^2=46.3$ $p=0.000$
Da	0	8	17	
Gubitak strukture				
Ne	22	1	0	$\chi^2=27.05$ $p=0.000$
Da	27	29	23	
Male stanice				
Ne	24	8	5	$\chi^2=6.7$ $p=0.035$
Da	25	22	18	
Nekroze				
Ne	46	16	8	$\chi^2=28.6$ $p=0.000$
Mikro i geografske	3	14	15	
Krvne žile				
Malo	12	7	13	$\chi^2=10.5$ $p=0.033$
Puno (deblje stjenke)	21	13	3	
Puno (tanke stjenke)	16	10	7	
Ploidija				
Diploidni	41	18	17	$\chi^2=5.97$ $p=0.051$ (95% vj.)
Aneuploidni	8	12	6	

Tablica 30. Razdioba meningeoma u tri histološka stupnja (benigni, atipični, maligni) u odnosu na stupanj izražaja p53 i PCNA

Pokazatelji	Benigni N=49	Atipični N=30	Maligni N=23	$\chi^2/p$
Izražaj p53				
0% stanica	22	2	4	$\chi^2=24.2$ $p=0.000$
0 - 20% stanica	11	3	6	
20 - 50% stanica	12	14	7	
> 50% stanica	4	11	6	
Izražaj PCNA				
0 - 20% stanica	13	2	1	$\chi^2=10.5$ $p=0.032$
20 - 50% stanica	18	9	10	
> 50% stanica	18	19	12	

Tablica 31. Dijametar i broj mitozu u tri histološka stupnja meningeoma prema WHO

Pokazatelji	N	( $x \pm s.d$ )	Koeficijent korelacije	Značajnost
Dijametar				
Benigni I	49	54.6 $\pm$ 10.9	17.86	0.000
Atipični II	30	64.3 $\pm$ 10.0		
Maligni III	23	65.4 $\pm$ 12.1		
Broj mitozu				
Benigni I	49	0.71 $\pm$ 1.38	40.2	0.000
Atipični II	30	3.03 $\pm$ 2.82		
Maligni III	23	12.23 $\pm$ 13.7		

Tablica 32. Razlike između meningeoma podijeljenih po histološkom stupnju za dijametar i broj mitozu

Pokazatelji	Benigni - Atipični	Benigni - Maligni	Atipični - Maligni
Dijametar			
z	3.6	3.3	0.19
p	0.000	0.001	0.84
Mitoze			
z	4.9	5.3	2.6
p	0.000	0.000	0.009

Mann-Whitney test, z=koeficijent varijacije, p=značajnost

#### 4.7. Broj mitozu

U daljnjim analizama tabelarno su navedeni isključivo rezultati samo onih analiza koji su imale statistički značaj. Analize su rađene istim redosljedom kao usporedbe svih ispitivanih značajki među određenim grupama meningeoma.

U ovom je radu broj mitozu  $\leq 3$  i  $\geq 4$  određen za granicu između benignih i atipičnih meningeoma kao jedan od kriterija pri dijagnozi. Svi meningeomi podijeljeni u dvije grupe prema broju mitozu ( $\leq 3$  mitoze i  $\geq 4$ ) uspoređeni su u odnosu na ispitivane

parametre (tab. 33-34). Grupe su se razlikovale u pleomorfizmu stanica ( $p=0.002$ ), atipiji jezgara ( $p=0.000$ ), prisustvu patoloških mitozâ ( $p=0.000$ ), gubitku strukture ( $p=0.003$ ) i prisustvu nekroze ( $p=0.000$ ). Za vidljive makronukleole, nastanak malih stanica, brojnost i debljinu krvnih žila te stupanj ploidiije nije postojala statistička veza s brojem mitozâ ( $p>0.05$ ). Izražaj p53 i izražaj PCNA nisu pokazali statističku povezanost s brojem mitozâ ( $p>0.05$ ).

Iz tablice 33. vidi se da je broj mitozâ ( $\leq 3$  i  $\geq 4$ /HPF) statistički značajno povezan s histološkim stupnjem meningeoma ( $p=0.000$ ) i da postoji značajna statistička povezanost broja mitozâ s kliničkopatološkim grupama tumora ( $p=0.01$ ).

Parametrijske vrijednosti histograma staničnog ciklusa rasta stanica (Go/G1-, S-, G2/M-faze staničnog rasta i CV) nisu se statistički razlikovale među grupama meningeoma podijeljenih po broju mitozâ ( $\leq 3$  i  $\geq 4$ /HPF) ( $p>0.05$ ).

Iz tablice 34. vidi se da je statistička analiza za celularnost tumora pokazala značajnu razliku za srednju vrijednost broja stanica u promjeru vidnog polja velikog povećanja ( $p=0.033$ ) između dvije grupe meningeoma sa brojem mitozâ  $\leq 3$  i  $\geq 4$ /HPF, a samo 94% vjerojatnosti povezanosti broja mitozâ sa CV histograma staničnog ciklusa rasta ( $p=0.082$ ).

Tablica 33. Odnos broja mitozâ i histoloških i kliničkih značajki meningeoma

BROJ MITOZA					
Pokazatelji	N	$\leq 3$	$\geq 4$	$\chi^2$	p
Pleomorfizam					
Ne	35	33	2	$\chi^2=9.4$	$p=0.002$
Da	67	45	22		
Atipija jezgara					
Ne	50	46	4	$\chi^2=13.15$	$p=0.000$
Da	52	32	20		
Makronukleoli					
Ne	42	37	5	$\chi^2 = 20.31$	$p=0.000$
Da	60	40	20		
Patološke mitoze					
Ne	77	72	5	$\chi^2=50.7$	$p=0.000$
Da	25	6	19		
Gubitak strukture					
Ne	23	23	0	$\chi^2=9.13$	$p=0.003$
Da	79	55	24		
Nekroze					
Ne	70	62	8	$\chi^2=19.8$	$p=0.000$
Mikro	13	8	5		
Geografske	19	8	11		
Histološki stupanj					
I	49	48	1	$\chi^2=29.9$	$p=0.000$
II	30	22	8		
III	23	8	15		
Kliničkopatološke grupe					
Recidivirajući	60	44	16	$\chi^2=9.3$	$p=0.01$
Nerecidivirajući	30	28	2		
Maligni/Atipični	12	6	6		

Tablica 34. Dijametar ("celularnost") i CV meningeoma u odnosu na broj mitozu ( $\leq 3$  mitoze i  $\geq 4/10$ HPF)

Broj mitozu	N	( $\bar{x} \pm$ s.d.)	z	p
Dijametar				
Broj mitozu $\leq 3$	78	$58.59 \pm 12.16$	2.13	0.033
Broj mitozu $\geq 4$	24	$63.83 \pm 9.90$		
CV				
Broj mitozu $\leq 3$	78	$6.87 \pm 2.52$	1.74	0.082 (94%)
Broj mitozu $\geq 4$	24	$7.32 \pm 1.75$		

#### 4.8. Izražaj PCNA

Svi meningeomi podijeljeni su u tri grupe prema udjelu PCNA+ stanica : niskog (od 0-20%), srednjeg (20-50%) i visokog (>50%) udjela stanica. Te su grupe upoređene u odnosu na ispitivane značajke (tab. 35-37).

U odnosu na histološke značajke (tab. 35), uočeno je da se grupe razlikuju samo u tri značajke: atipiji jezgara ( $p=0.005$ ), pleomorfizmu stanica ( $p=0.002$ ) i makronukleolima ( $p=0.004$ ).

Izražaj PCNA bio je statistički povezan s histološkim stupnjem i kliničkopatološkim grupama meningeoma (tab. 35).

Usporedba srednjih vrijednosti dijametra, mitozu, G0/G1-, S-, G2/M-faze i CV meningeoma u odnosu na PCNA pokazuje statističku razliku između grupa za broj mitozu ( $p=0.016$ ) i vrijednost Go/G1-faze (tab. 36). Visoka izraženost PCNA statistički je značajno povezana s brojem mitozu ( $p=0.016$ ). U grupi bez negativnog ili nisko izraženog PCNA srednji broj mitozu je iznosio  $1.0 \pm 2.1$ , za srednji stupanj izraženosti  $2.62 \pm 4.18$ , a za visoki izražaj PCNA  $5.59 \pm 10.6$ . Izražaj PCNA nije povezan s povećanom celularnošću.

Nadalje, grupa 2 (srednjeg) i 3 (visokog izražaja PCNA) statistički se razlikuju od grupe meningeoma bez izražaja PCNA s obzirom na broj mitozu i iznos G0/G1-faze (tab. 37).

Tablica 35. Usporedba izražaja PCNA s histološkim značajkama, histološkim stupnjem i kliničkopatološkim grupama meningeoma

PCNA (% stanica)						
Pokazatelji:	N	0-20%	20-50%	> 50%	$\chi^2$	p
Atipija						
Ne	50	13	21	16	12.25	0.005
Da	52	3	16	33		
Makronukleoli						
Ne	42	13	16	13	11.2	0.004
Da	60	3	21	36		
Pleomorfizam						
Ne	35	11	14	10	12.43	0.002
Da	67	5	23	39		
Histološki stupanj						
I	49	13	18	18	10.5	0.032
II	30	2	9	19		
III	23	1	10	12		
Kliničkopatološke grupe						
Recidivirajući	60	6	20	34	13.1	0.011
Nerecidivirajući	30	10	12	8		
Maligni/Atipični	12	0	5	7		

Tablica 36. Usporedba izražaja PCNA s brojem mitozu i G0/G1-fazom

	PCNA	N	$X \pm s.d.$	$\chi^2$	p
Broj mitozu	0-20 %	16	$1.0 \pm 2.1$	8.2	0.016
	20-50%	37	$2.62 \pm 4.18$		
	> 50%	49	$5.59 \pm 10.56$		
G0/G1-faza	0-20 %	16	$87.75 \pm 6.66$	5.9	0.0051
	20-50%	37	$90.53 \pm 9.34$		
	> 50%	49	$91.57 \pm 6.4$		

Tablica 37. Značajnost statističke razlike za broj mitozu i G0/G1-fazu ciklusa rasta među grupama meningeoma po stupnju izražaja PCNA

Izražaj PCNA	1 - 2	1 - 3	2 - 3
Broj mitozu	z=1.8	z=2.7	z=1.5
	p=0.07 gr.	p=0.006	p=0.14
G0/G1-faza	z=2.15	z=2.3	z=0.19
	p=0.031	p=0.02	p=0.85

1-niski izražaj PCNA (od 0-20%)  
 2-srednji izražaj PCNA (20-50%)  
 3-visoki izražaj PCNA (>50%)

## 4.9. Izražaj p53

Izraženost p53 u odnosu na histološke značajke meningeoma pokazao je statistički značajnu povezanost s atipijom jezgara ( $p=0.004$ ), pleomorfizmom stanica ( $p=0.000$ ) i gubljenjem strukture ( $p=0.001$ ), dok druge histološke značajke ni plovidija nisu imale statistički značaj (tab. 38).

Kruskal-Wallisova analiza varijance nije pokazala statistički značajnu razliku između grupa meningeoma podijeljenih u tri grupe po stupnju obojenosti na p53 i ispitivanih parametrijskih značajki, srednje vrijednosti za celularnost tumora, broj mitozu, G0/G1-, S-, G2/M-faze i CV histograma ( $p>0.05$ ).

Tablica 38. Usporedba izražaja p53 s histološkim značajkama, histološkim stupnjem i kliničkopatološkim grupama meningeoma

p53 ( % stanica )						
Pokazatelji:	N	0-20%	20-50%	> 50%	$\chi^2$	p
Atipija						
Ne	50	31	13	6	10.9	0.004
Da	52	17	20	15		
Gubljenje strukture						
Ne	23	18	2	3	13	0.001
Da	79	30	31	18		
Pleomorfizam						
Ne	35	26	7	2	18.1	0.000
Da	67	22	26	19		
Histološki stupanj						
I	49	33	12	4	21.5	0.000
II	30	5	14	11		
III	23	10	7	6		
Kliničkopatološke grupe						
Recidivirajući	60	24	24	12	16.2	0.003
Nerecidivirajući	30	22	4	4		
Maligni/Atipični	12	2	5	5		

Rezultati multivarijantne analize (Spearmanov koeficijent korelacije ranga) za statističku značajnost korelacije između izražaja PCNA, p53, histološkog stupnja meningeoma i kliničkopatoloških skupina u odnosu na ispitivane histološke značajke, plovidiju i parametrijske vrijednosti (celularnost, broj mitozu, faze staničnog ciklusa rasta i CV) prikazani su u tablici 39.

Tablica 39. Spearmanovim testom utvrđena korelacija za izražaj PCNA, izražaj p53, histološki stupanj meningeoma i kliničkopatološke skupine

Pokazatelj:	Izražaj PCNA	Izražaj p53	Histološki stupanj	Histopatološka grupa
Pleomorfizam stanica	*		*	
Atipija jezgara		*	*	
Makronukleoli		*	*	
Gubljenje strukture			*	
Broj mitoza				*

Spearmanov koeficijent korelacije ranga

\* dobro ( $p < 0.01$ )

## 5. RASPRAVA

---

### 5.1. Značajnost histoloških parametara pri stupnjevanju meningeoma

Iako se općenito smatraju benignim tumorima, meningeomi mogu uzrokovati tešku bolest i smrt bolesnika. Prognostički nepovoljni faktori uključuju specifična sjedišta tumora (npr. bazu lubanje), rast "*en-plaque*", invaziju kosti, mekih tkiva ili sinusa dure. Ti faktori onemogućuju resekciju tumora u cjelosti i zbog toga su usko povezani s pitanjem potpune kirurške resekcije kao ključnim faktorom za ishod bolesti. No, poznato je da i nakon potpune makroskopske resekcije meningeomi mogu recidivirati. Ostali poznati klinički pokazatelji su dob i spol pacijenta.

U periodu od 1980. do 2000. godine u KB Split bilo je ukupno operirano 167 bolesnika s meningeomom. Od toga su 109 (65.3%) bile žene, a 58 (34.7%) muškarci. Odnos žena prema muškarcima iznosio je 2:1. Srednja vrijednost za dob je iznosila  $56.5 \pm 14.1$  godina za žene i  $58.1 \pm 9.71$  godina za muškarce. Nije utvrđena statistička razlika za dob između muškaraca i žena.

Perry (1997) je na skupini od 581 bolesnika s meningeomom našao da je odnos žena prema muškarcima 2:1, a medijan dobi 57 godina, što se poklapa s našim rezultatima (6). To odgovara i podacima iz literature po kojoj su meningeomi najčešće otkriju u srednjoj dobi i uz očiglednu predominaciju žena. Iznimka je nađena u afričkoj seriji koju je objavio Kepes, u kojoj su dominirali muškarci, a 20% meningeoma pojavilo se u drugoj dekadi života (43).

U istom dvadesetgodišnjem periodu recidiv menigeoma javio se u 15 (9%) naših bolesnika, 7 (46.7%) žena i 8 (53.3%) muškaraca (odnos žena prema muškarcima 1:1). Nije postojala razlika u dobi bolesnika između skupine žena i muškaraca.

Slične rezultate objavili su Beks i sur. (1988) koji su analizirali skupinu od 113 pacijenata s meningeomom. Meningeomi su recidivirali u 18 bolesnika (17.5%), od toga 13 žena (17.8%) i 5 muškaraca (12.5%). Među bolesnicima s recidivom meningeoma nije postojala korelacija s dobi. Nije bilo statističke razlike u zastupljenosti muškaraca i žena (45).

Chan i sur. (1984) analizirali su seriju od 257 pacijenata na kojima je učinjeno 338 kraniotomija zbog meningeoma. Bilo je 97 muškaraca i 160 žena (odnos 3:5). Najmlađi bolesnik je imao 5 godina, a najstariji 80 godina, dok je srednja vrijednost za dob iznosila 53.1 godine. Potpuno makroskopsko odstranjenje tumora s



ekscizijom dure bilo je popraćeno recidivom meningeoma u 10 od 89 bolesnika (11%) (100). Podatak za potpuno makroskopski odstranjene tumore podudara se s našim rezultatima prema kojima je meningeom i nakon makroskopski potpune resekcije recidivirao u 9% bolesnika.

U ovom radu praćeno je 36 bolesnika s recidivom meningeoma. U 74% bolesnika recidiv se javio unutar pet godina od prve operacije, a u 16% bolesnika nakon 7 do 10 godina od prve operacije. Nakon više od 10 godina od prve operacije recidiv se razvio u svega 10% bolesnika. Kontrolna skupina bolesnika (N=30) praćena je od 5 do 12 godina i u tom periodu nije bilo znakova recidiva bolesti. Srednje vrijeme praćenja iznosilo je  $88.4 \pm 35.7$  mjeseci (raspon 60-156 mjeseci). Crompton i sur. (1970) analizirali su skupinu od 181 meningeoma i smatraju da se većina recidivnih meningeoma javlja 5.5 godina nakon prve operacije (101).

Hsu i sur. (1994) ispitali su grupu od 63 bolesnika s meningeomom. U grupi je bilo 39 žena i 24 muškarca, a prosječna dob je iznosila  $54.2 \pm 1.7$  godina. Recidiv se javio u 24 bolesnika, a prosječno vrijeme do pojave recidiva bilo je  $52 \pm 11.8$  mjeseci. Prosječno vrijeme praćenja meningeoma koji nisu recidivirali iznosilo je  $82 \pm 8.5$  mjeseci (51). U drugoj su studiji Hsu i suradnici (1997) analizirali 70 bolesnika s meningeomom, od čega je 29 recidiviralo. Prosječno vrijeme za pojavu recidiva iznosilo je  $50.1 \pm 10$  mjeseci. Prosječno vrijeme praćenja za nerecidivne tumore iznosilo je  $82.1 \pm 7.7$  mjeseci (17). Podaci o vremenima nastajanja recidiva kao i praćenje kontrolnih skupina podudaraju se s našim rezultatima.

Kako prema literaturi i u našoj skupini većina recidiva nastaje u prvih pet godina nakon prvog operativnog zahvata, smatramo da je naša kontrolna skupina bila praćena u zadovoljavajućem vremenskom periodu s minimumom praćenja od 5 godina (max=12 godina) i medijanom od 88.4 mjeseci, što se podudara sa studijama drugih autora.

Najduže vrijeme praćenja bolesnika s meningeomom opisao je Jaaskelainen sa suradnicima (1986). U svom je radu pratio klinički tijek i analizirao 657 bolesnika s meningeomom. Meningeomi su recidivirali u 59 bolesnika. Srednje vrijeme praćenja bilo je 7.5 godina (1.0-21.0 god.). Ukupna stopa recidiva izražena na 20 godina iznosila je 19%. Svi su recidivi bili benigne histologije. Multivarijatnom analizom brojnih kliničkih značajki utvrdio je da su statistički značajni faktori vezani za recidiv tumora bili: 1. koagulacija dure; 2. invazija kosti; i 3. mekana konzistencija tumora. Bez ovih faktora rizika nađeno je 249 bolesnika, sa stopom recidiva tumora u 20 godina od 11% (46).

Osim kliničkih faktora, analizirane su i brojne histološke značajke meningeoma i njihova uloga u nastanku recidiva. Glavni histološki parametri za koje je utvrđeno da su pokazatelji agresivnog ponašanja ili predskazuju brz recidiv meningeoma jesu gubitak arhitekture, celularnost, broj mitozu, žarišta nekroze, pleomorfizam jezgara i invazija okolnih struktura (92). U ovom radu uspoređene su tri grupe bolesnika s meningeomom (tab. 4) u odnosu na deset histoloških značajki tumora. Uspoređene su grupe bolesnika s recidivom tumora i bolesnika bez recidiva, kao i skupina s inicijalno malignim/atipičnim meningeomom. Statistički značajna razlika između grupa nađena je za slijedeće histološke značajke: pleomorfizam stanica ( $p=0.000$ ), atipiju jezgara ( $p=0.000$ ), gubitak strukture ( $p=0.000$ ), izraženost makronukleola ( $p=0.055$ ), celularnost ( $p=0.001$ ) i broj mitozu ( $p=0.044$ ). Nije nađena statistički značajna razlika između meningeoma u odnosu na prisutnost malih stanica i brojnost krvnih žila. Statistička analiza za histološke značajke, patološke mitoze, nekroze i invaziju mozga zbog premalog broja prisutnih promjena nije bila moguća. Patološke mitoze nađene su u 14.5% ispitivanih meningeoma, a u kontrolnoj skupini ih nije bilo. Invazija mozga bila je vidljiva u 6.5% meningeoma, a nepristupačna analizi u 70.9% slučajeva. Mann-Whitnyjev test pokazao je da postoji statistički značajna razlika u broju mitozu i celularnosti između grupe meningeoma koji su recidivirali od nerecidivne skupine, te između skupine nerecidivnih i malignih/atipičnih meningeoma. Između meningeoma koji su recidivirali i malignih/atipičnih ne postoji statistička značajna razlika u broju mitozu i celularnosti. Nakon provedene reklasifikacije (6) i histološkog stupnjevanja meningeoma, u skupini bolesnika s recidivom bilo je 11 (55%) benignih, 4 (20%) atipičnih i 5 (25%) malignih. U skupini meningeoma koji nisu recidivirali bilo je 27 (90%) benignih i 3 (10%) atipičnih (tab. 8). U skupini inicijalno atipičnih/malignih bilo je 5 (42%) atipičnih i 7 (58%) malignih meningeoma. Frekvencija raspodjele histoloških stupnjeva unutar uspoređivanih skupina bolesnika statistički se značajno razlikuje ( $p=0.000$ ). Od meningeoma koji su recidivirali, 55% je imalo potpuno benignu histologiju prilikom prvog zahvata, 20% je bilo atipičnih, a 25% malignih. U kontrolnoj skupini čak 90% meningeoma pokazivalo je potpuno benignu histologiju, dok je 10% bilo atipičnih. Provedena statistička analiza ukazuje na razliku između bolesnika bez recidiva meningeoma i ostalih dviju uspoređivanih kliničkih skupina bolesnika s meningeomom. U tim je grupama puno veća učestalost meningeoma II. i III. stupnja u odnosu na kontrolnu skupinu bolesnika u kojih meningeomi nisu recidivirali.

De la Monte i sur. (1986) istražili su grupu od 82 bolesnika s meningeomom, od kojih 38 s recidivom i 44 bez recidiva meningeoma. Analizirali su 20 histopatoloških značajki na uzorcima tkiva dobivenih tijekom prve operacije: tvorbe u obliku lukovica, psamomska tjelešca, adipocite, mucin, melanin, hijaline inkluzije u citoplazmi, intranuklearne vakuole, limfocitnu infiltraciju, metaplaziju, ksantomatozna žarišta, hipervaskularnost, hemosiderin, gubitak strukture, nukleole, mitotske figure, nekrozu, nuklearni pleomorfizam, invaziju mozga, invaziju kosti te histološki stupanj meningeoma. Sedam je histoloških značajki bilo povezano s recidivom: hipervaskularnost tumora, depoziti hemosiderina, gubitak strukture, uočljivost nukleola, mitotske figure, nekroze pojedinih ili grupa stanica i nuklearni pleomorfizam. Prema histološkom stupnju bilo je 49 benignih, 22 atipična i 11 malignih meningeoma. Statistički značajno veći udio atipičnih i malignih tumora nađeno je u recidivirajućim tumorima u odnosu na tumore koji nisu recidivirali. Sam histološki stupanj nije bio statistički povezan s pojavom recidiva (102). Za razliku od ovog rada, autori nalaze hipervaskularnost tumora kao značajku povezanu s recidivom. Iako je zbog biologije tumorskog rasta za pretpostaviti da se broj krvnih žila povećava paralelno sa stupnjem tumora, u ovom radu hipervaskularnost tumora i debljina stjenki krvnih žila nije dostigla ni približnu statističku značajnost glede pojave recidiva.

Rezultate slične opisanima u ovom radu dobili su Ohta i sur. (1994) na skupini od 43 bolesnika s meningeomom. Primijenjena histološka klasifikacija bila je ista, tj. revidirana WHO-klasifikacija iz 1993., pa se stoga rezultati mogu upoređivati. Autor je ispitivao značaj šest histoloških parametara: gubitak arhitekture, povećanu celularnost, broj mitozu, polimorfizam jezgara, nekrozu i invaziju okolnih struktura, kao i njihovu povezanost s pojavom recidiva meningeoma. Autori su utvrdili da postoji značajna statistička razlika između grupa za slijedeće histološke značajke: povećanu celularnost, pleomorfizam jezgara i broj mitozu. Za gubitak arhitekture, nekrozu i invaziju mozga autori nisu našli statističku potvrdu. Od histoloških značajki, celularnost ( $p < 0.001$ ), mitoze ( $p < 0.001$ ) i nuklearni pleomorfizam ( $p < 0.001$ ) u grupi bez recidiva bili su statistički značajno manje izraženi nego u grupi tumora s recidivom i/ili metastazama. Autori ističu statistički značajnu povezanost recidiva s povećanom celularnošću i brojem mitozu, kao i s pleomorfizmom jezgara (92).

To odgovara rezultatima dobivenim u ovom radu na temelju analize uzoraka uzetih tijekom druge operacije tj. samih recidivnih tumora ( $N=35$ ) i usporedbom s meningeomima koji nisu recidivirali ( $N=30$ ). U ovom se radu grupa recidivnih

meningeoma statistički značajno razlikuje od nerecidivnih prema sljedećim histološkim značajkama (tab. 13): pleomorfizmu stanica, atipiji jezgara, nalazu makronukleola i patoloških mitozama ( $p=0.000$ ), gubitku strukture ( $p=0.01$ ) i nalazu nekroze ( $p=0.041$ ). Grupe se značajno razlikuju prema broju mitozama ( $p=0.023$ ) i celularnosti ( $p=0.047$ ). Broj mitozama i celularnost značajno su veći u recidivima meningeoma. Grupe se značajno statistički razlikuju i po histološkom stupnju meningeoma ( $p=0.000$ ). U grupi tumora koji su recidivirali veći je broj meningeoma II. i III. stupnja (tab. 16). Benigne histologije bilo je svega 31% ( $N=11$ ), za razliku od 90% ( $N=27$ ) benignih meningeoma u grupi bez recidiva.

Za razliku od rezultata ovog rada Ohta i sur. (1994), nisu našli statistički značajnu razliku za gubitak arhitekture i nekrozu između grupe recidivnih i nerecidivnih meningeoma (92). Cruz-Sanchez i sur. (1993) nalaze statistički značajnu povezanost između recidiva meningeoma i pleomorfizma, povećane gustoće stanica, mitotske aktivnosti te infiltracije mozga i mekih tkiva. Primjenivši istu histopatološku klasifikaciju kao i u ovom radu, razvrstali su meningeome u tri histološka stupnja (103). Beks i sur. (1988) povezuju recidiv tumora s nalazom brojnih mitozama, visoke celularnosti, gubitka strukture i kortikalne invazije. Analizirali su 113 bolesnika s meningeomom, od kojih 12 malignih i 91 benignih meningeoma. Recidiv se javio u 18 meningeoma. Nije postojala korelacija između recidiva i dobi bolesnika. Stopa recidiva nije se razlikovala između muškaraca i žena, što odgovara i rezultatima ovog rada (45). Za razliku, autori Beks i Cruz-Sanchez (45, 103) ističu infiltraciju mozga i mekih tkiva kao značajan histološki parametar povezan s recidivima meningeoma, što u ovom radu nije dokazano zbog malenog broja prisutnih promjena. Također nije nađena statistički značajna razlika između recidivnih i nerecidivnih meningeoma u odnosu na stvaranje malih stanica, a što nalaze spomenuti autori.

Jaaskelainen i sur. (1986) došli su do sličnog zaključka na značajno većem uzorku od 936 meningeoma. Autori su zaključili da infiltracija mozga nije mogla biti studirana jer u materijalu obično nije bilo prisutno tkivo okolne kore mozga, što potpuno odgovara rezultatima ovog rada (34).

Mc Lean i sur. (1993) analizirali su samo tumore II. i III. stupnja. Autori smatraju da je invazija mozga, kao individualni faktor, od male prognostičke važnosti, dok su mikronekroze bile jedina histopatološka značajka udružena s povećanim rizikom za recidiv meningeoma. Analizirali su 28 meningeoma, od kojih je 15 bilo atipičnih i 13 malignih. Klasifikacija je učinjena prema reviziji WHO iz 1990., a analizirali su sljedeće histološke značajke: invaziju mozga, mitoze, pleomorfizam jezgara,

mikronekroze i makronukleole (94). I u ovom radu prisutnost mikronekroza statistički je značajno veća u recidivnim tumorima ( $p=0.041$ ), uz napomenu da je u skupini recidivnih tumora bilo i benignih meningeoma (tab. 13). Nalaz Mc Lean i sur. (1993) značajan je stoga što od svih histoloških značajki samo nekroze zadržavaju statistički značaj za razlikovanje recidivnih od nerecidivnih meningeoma II. i III. stupnja (94). To znači da su ostale značajke više ili manje povezane s novim histološkim stupnjevanjem meningeoma i najviše značajne za razlikovanje benignih od nove grupe atipičnih tumora, odnosno meningeoma II. stupnja, a kojih nakon naše reklasifikacije ima značajno više u recidivnim tumorima. Navedeno će se argumentirati u raspravi koja slijedi.

## 5.2. Histološko stupnjevanje meningeoma

Većina autora smatra da histološko stupnjevanje meningeoma osigurava dodatne prognostičke podatke, a u nekim slučajevima vodi daljnji tijek terapije (45).

Rusellova i Rubinsteinova (1989) "Patologija tumora živčanog sustava" je klasična osnova za izučavanje tumora SŽS (43). Opisuju se tri klasična tipa meningeoma: sincicijski, fibroblastni i tranzicijski te brojne histološke inačice i podtipove. Niti jedan od klasičnih podtipova nema specijalno prognostičko značenje. "Sve histološke inačice mogu očitovati zloćudne značajke", pišu autori, dok je "hemangiopericitni oblik je možda najmaligniji od svijeta". Citološki kriteriji jesu pokazatelji daljnjeg kliničkog ponašanja i, štoviše, Rubinstein je pri pisanju tog izdanja svoje knjige bio uvjeren da su mitotski indeks i LI-indeks označavanja s pomoću radioaktivnog timidina (engl. labeling index) predskazatelji brzine tumorskog rasta. Unutar zloćudnih meningeoma posebno mjesto zauzima papilarni tip koji može biti združen sa svim histološkim tipovima. Trećina malignih meningeoma su povezani s hemangiopericitnim tipom (43).

Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) objavila je vrlo sličnu klasifikacijsku shemu tumora meningi koja se ne razlikuje ni u jednoj značajnijoj pojedinosti. Originalna WHO-klasifikacija iz 1979. godine priznaje samo dva "stupnja" meningeoma: klasični i anaplastični ili maligni. Tada predložena definicija za anaplaziju glasila je da je to "svaki meningeom koji ispoljava anaplastične značajke, ali se još nije razvio u pravi sarkom". Revidirana WHO-klasifikacija iz 1993. uključuje tri stupnja meningeoma, što je primjenjeno i u ovom radu-klasični (I. stupanj), atipični (II. stupanj) i maligni (III. stupanj). Iako se od klasičnih oblika svi smatraju benignima, papilarni meningeom je

izdvojen kao poseban i odgovara II. ili III. stupnju prema WHO. Dijagnostički kriteriji atipije i anaplazije znatno su poboljšani, ali definicija atipije još uvijek uključuje nedovoljno određene konstatacije poput "neke od sljedećih značajki" i "česte mitoze". Dodatno, anaplazija ostaje predmetom subjektivne procjene, a što se tiče invazije mozga, ostaje dilema da li je to znak malignosti ili ne (27).

Druga popularna shema za stupnjevanje primjenjuje šest parametara: gubitak strukture (engl. sheeting), hipercelularnost, pleomorfizam, mitoze, nekroze i invaziju mozga, a svaki se boduje od 0-3 (nije prisutno, slabo, srednje ili značajno), a bodovi se zbrajaju. Metoda je bila primjenjena od strane nekoliko autora i pokazala je dobru korelaciju s kliničkim tijekom bolesti. Na primjer, Jaaskelainen i sur. (1986) utvrdili su da unutar 5 godina od prve operacije recidivira 3% benignih, 38% atipičnih i 78% malignih meningeoma (34). Iako je doprinos ovog sistema da je uključio sve kombinacije histoloških značajki, ipak ostaje nekoliko problema. Prvo, izgleda da su sve značajke jednako vrijedne, tako da patolog jednako vrednuje jaki polimorfizam, invaziju mozga i broj mitoz. Znatna degenerativna atipija i pleomorfizam nisu rijetke pojave u meningeomima i često se vide u mikrocističnom ili angiomatoznom podtipu. Ne bi odgovaralo biološkoj naravi tog tumora da ga se proglašuje atipičnim shodno ovoj shemi. Pojam "sarkomatozni" još više može zavesti nego nejasni naziv "anaplastični". Upotreba termina "sarkomatozni" ne traži ni prave elemente sarkoma, niti da je prisutan sarkomski izgled. Štoviše, on može dovesti do poistovjećenja sa sarkomima povezanim s durom, koji se sada smatraju posebnim entitetom. Čak je moguće i prekomjerno stupnjevanje, jer je samo 11 bodova potrebno da se tumor proglašuje "sarkomatoznim" meningeomom (6). Za razlikovanje atipičnog i malignog stupnja meningeoma Younis i sur. (1995) dodatno primjenjuje sljedeće kriterije: 1) invaziju mozga, 2) sarkomatozna područja, i 3) ekstremnu histološku sliku povezanu s agresivnim ponašanjem. Međutim, Younis smatra da i ovakva diferencijacija ostaje subjektivnom. Radi ilustracije, Younis je u grupi od 25 meningeoma, početno dijagnosticiranih kao maligni, reklasifikacijom dobio slijedeću razdiobu: 12 malignih, 6 atipičnih, 4 hemangiopericitoma i 3 meningealna sarkoma (8).

Kriteriji za histološko stupnjevanje primjenjeni u ovom radu iscrpno su opisani u poglavlju o metodologiji rada. Analizirano je ukupno 102 meningeoma (tab. 26). Od klasičnih podtipova najčešći su bili tranzicijski 25% (N=12) i meningoteliski 19% (N=9). Papilarnih meningeoma je bilo 4 i sve smo svrstali histološki u III. stupanj. Učestalost meningeoma prema histološkim stupnjevima u ovom radu bila je slijedeća: klasičnih 48%, atipičnih 29% i malignih 23%. Meningeomi svrstani u tri

grupe prema histološkim stupnjevima pokazali su vrlo visoko značajnu statističku povezanost sa sljedećim histološkim značajkama: pleomorfizmom stanica, atipijom jezgara, vidljivim makronukleolima, patološkim mitozama, gubitkom strukture i mikronekrozama ( $p < 0.001$ ). Jedina statistička značajnost za prisutnost malih stanica ( $p = 0.035$ ) i brojnost krvnih žila ( $p = 0.033$ ) u ovom radu nađena je za povezanost s histološkim stupnjevima meningeoma, i to samo u kompletnom uzorku od 102 meningeoma (tab. 29). Infiltracija mozga i na ovako velikom broju uzoraka premalo je zastupljena, pa stoga statistička analiza tog parametra nije bila moguća. Kruskal-Wallisovom analizom varijance pokazano je da postoji jaka statistička povezanost histološkog stupnja meningeoma s brojem mitozama ( $p = 0.000$ ) i s celularnošću ( $p = 0.000$ ) (tab. 31). Mann-Whitneyevim testom dokazana je statistički značajna razlika i za broj mitozama i za celularnost između meningeoma I. stupnja i atipičnih meningeoma, a s 94% vjerojatnoće i razlika između atipičnih i malignih meningeoma (tab. 32).

Hsu DW i sur. (1994) primjenili su sličnu analizu: u radu su pregledani svi dostupni histološki preparati tumora i određen je histološki stupanj (benigni, atipični i maligni). Menigeome su klasificirali kao atipične kada su bile prisutne dvije ili više sljedećih značajki: velika celularnost, tendencija rasta u "plažama" (engl. sheet), naglašeni nukleoli, mitotske figure, prisutnost malih stanica i gubitak tipičnog izgleda, kao što je lobulacija i stvaranje lukovica. Tumori koji su sadržavali šest i više mitozama po 10/HPF (400x) u najaktivnijim područjima također su klasificirani kao atipični, bez obzira da li su pokazivali i ostale atipične histološke značajke. Maligni menigeomi dodatno su sadržavali fokalne nekroze, polimorfizam jezgara i invaziju mozga. Multivarijatnom regresijskom analizom pokazalo se da je broj mitozama  $> 6$  najvažnija pojedinačna značajka povezana s pojavom recidiva ( $p < 0.05$ ). Dob, spol i histološki podtip nisu korelirali s ostalim varijablama, osim što je meningotelijski podtip znatno češće recidivirao (51).

Postoji opće slaganje da je broj mitozama jedan od najznačajnijih histoloških parametara za stupnjevanje meningeoma, a posebno za definiranje nove grupe atipičnih tumora, odnosno tumora II. stupnja. Međutim ni WHO, niti različiti autori ne definiraju točan broj mitozama koji bi predstavljao granicu za odvajanje tumora I. i II. stupnja. U ovom radu korišteni su Perryjevi (1997) kriteriji za definiciju atipičnog meningeoma, odnosno tumora II. stupnja (6). Primijenjeni su dosta rigorozni kriteriji koji menigeom određuju kao atipični: to je svaki menigeom s maksimalnim brojem mitozama  $\geq 4/10\text{HPF}$  i bar tri od četiri sljedećih značajki - gubitak strukture,

hipercelularnost, nalaz makronukleola i stvaranje malih stanica. Te iste kriterije citiraju Kleihues i Cavenee (2000) u knjizi o tumorima nervnog sistema tiskanoj pod pokroviteljstvom WHO (9).

Na svakom retrospektivno analiziranom materijalu nužno je provesti vlastitu reklasifikaciju prema suvremenim standardima u određenom području patologije, ali i naznačiti vlastite kriterije za koje se autor mora odlučiti pri izradi rada. Prilikom interpretacije i usporedbe rezultata pojedinih autora, važno je obratiti pažnju na postojeće razlike u standardima koji su korišteni pri studiji. U ovom je radu povezanost recidiva s histološkim stupnjem tumora pokazala statistički značajnu povezanost. Raspodjela meningeoma I., II. i III. stupnja unutar kliničkih grupa bolesnika također se statistički značajno razlikuje ( $p=0.000$ ). Od meningeoma koji su recidivirali, 55% je bilo benigne histologije, 20% je bilo atipičnih i 25% malignih (tab. 8). Analizom recidiva tumora našlo se 46% atipičnih, 23% malignih i 31% benignih (tab. 16). U kontrolnoj skupini meningeoma koji nisu recidivirali nije bilo malignih tumora, atipičnih je bilo 10%, a benignih 90%. Ispitivane grupe statistički se razlikuju za histološki stupanj meningeoma ( $p=0.000$ ). Značajno veći broj meningeoma histološkog stupnja II i III nalazi se u skupinama meningeoma koji su recidivirali u odnosu na tumore kontrolne skupine koji nisu razvili recidiv u promatranom periodu. Grupe meningeoma s definiranim brojem mitozama slično kao i u ovom radu analizirali su Maier i sur. (1992). Primjenjena je ista klasifikacija, tj. WHO iz 1993. god. Na seriji od 1799 primarnih i recidivnih meningeoma, u 1582 bolesnika našli su jaku povezanost s kliničkim tokom za klasične, atipične i maligne tumore. Atipični su definirani kao hipercelularni ( $\geq 5$  mitozama/10HPF), dok su anaplastični pokazivali hipercelularnost, velik broj mitozama, patološke mitoze, "anaplaziju" i nekroze (104). Doprinos ove sheme stupnjevanju tumora je u jednostavnosti. Međutim, nekoliko važnih značajki, uključujući invaziju mozga i gubitak arhitekture nisu spomenuti. U radu je primjenjeno bojenje jezgara s AgNOR, a rezultati podupiru postojanje atipičnih entiteta kao skupina čije je biološko ponašanje između klasičnih i malignih. Autori smatraju da stupnjevanje prema WHO nije jasno definiralo kriterije za meningeome II. i III. stupnja, tako da ostaje nejasno da li meningeomi II. stupnja prema WHO odgovaraju njihovim atipičnim tumorima. Autori su na 252 tumora našli statistički značajno različitu stopu recidiva između meningeoma različitog histološkog stupnja. Primarno atipični i maligni meningeomi recidiviraju i poslije potpune resekcije čak do deset puta češće od klasičnih, pokazujući time da širina resekcije nije jedini prognostički faktor (104). I u ovom se radu grupa atipičnih meningeoma ponašala kao



jasno određeni, posebni biološki entitet. Od klasičnih se tipova značajno razlikuje u više parametara, a danas se najveća pažnja poklanja broju mitozu prema kojima se odvajaju od grupe klasičnih meningeoma.

U ovom su radu svi meningeomi podijeljeni u dvije grupe prema broju mitozu/10HPF ( $\leq 3$  mitoze/10HPF i  $\geq 4$  mitoze/10HPF). Rezultati pokazuju da broj mitozu dobro korelira s ostalim ispitivanim histološkim značajkama, slično kao i s histološkim stupnjem. Značajna statistička povezanost nađena je za pleomorfizam ( $p=0.002$ ), atipiju jezgara ( $p=0.000$ ), nalaz makronukleola ( $p=0.000$ ), patološke mitoze ( $p=0.0000$ ), gubitak strukture ( $p=0.003$ ) i mikronekroze ( $p=0.000$ ). Statistička povezanost nije nađena za stvaranje malih stanica niti za stvaranje krvnih žila (tab. 33). Broj mitozu je statistički značajno povezan i s celularnošću ( $p=0.033$ ): u grupi s  $\leq 3$  mitoze srednja vrijednost za dijametar iznosi  $58.59 \pm 12.16$ , a u grupi s  $\geq 4$  mitoze srednja vrijednost za dijametar iznosi  $63.83 \pm 9.9$  (tab. 34). Meningeomi podijeljeni u dvije grupe prema broju mitozu do  $\leq 3$  i  $\geq 4/10HPF$  imaju statističku povezanost s histološkim stupnjem meningeoma ( $p=0.000$ ) i s kliničkim grupama (recidivni, nerekidivni, atipični/maligni) ( $p=0.01$ ).

Hsu i sur. (1994) ispitivali su prognostički značaj broja mitozu i PCNA u grupi od 63 meningeoma. Tumore su klasificirali u benigne (26), atipične (24) i maligne (13). Lokalno je recidiviralo 24 tumora, od čega 23.1% (6/26) benignih, 37.5% (9/24) atipičnih i 69,2% (9/13) malignih meningeoma. Analizom varijance pokazana je statistički značajna razlika između tri histološka stupnja tumora za oba parametra, i mitoze i PCNA. Broj mitozu/10HPF iznosio je:  $0.08 \pm 0.05$  za benigne,  $4.75 \pm 0.91$  za atipične i  $19.00 \pm 4.07$  za maligne ( $p=0.069$ ) (51).

To odgovara rezultatima u ovom radu za broj mitozu ( $p=0.000$ ) (tab. 33) i za izražaj PCNA ( $p=0.032$ ) (tab. 35) u odnosu na histološke stupnjeve tumora. Međutim, u ovom radu meningeomi podijeljeni u dvije skupine prema broju mitozu do  $\leq 3$  i  $\geq 4/10HPF$  ne pokazuju statističku povezanost sa stupnjem izražaja PCNA. Međutim, kada se stupanj izražaja PCNA usporedi sa srednjim brojem mitozu unutar tako formiranih grupa vidi se raspored i porast broja mitozu s porastom izražaja PCNA. U grupi bez izraženog PCNA srednji broj mitozu je iznosio  $1.0 \pm 2.1$ , za srednji stupanj izražaja PCNA broj mitozu bio je  $2.62 \pm 4.18$ , a u tumorima s visokim izražajem PCNA broj mitozu bio je  $5.59 \pm 10.6$  (tab. 36). Postoji statistički značajna razlika u srednjem broju mitozu među grupama s različitim stupnjem izražaja PCNA ( $p=0.016$ ). Statistička razlika postoji između grupa bez izraženog PCNA i grupe s visoko izraženim PCNA ( $p=0.006$ ) (tab. 37). Tu leži odgovor zašto kod analize meningeoma

postavljanje granice pri analizi broja mitozu ne daje rezultat. Broj mitozu je vrlo mali, i vrijednosti se jako preklapaju baš ispod razine od 5 mitozu najrigorozniji kriterij za broj mitozu ( $\leq 3$  i  $\geq 4/10\text{HPF}$ ) prilikom definiranja i izdvajanja biološki proliferativnijih meningeoma II. stupnja tj grupe atipičnih meningeoma. Srednji broj mitozu u ovom radu za grupu bez izraženog PCNA ( $<20\%$ ) tj. niskog proliferativnog potencijala, iznosio je  $1 \pm 2.1$ , što brojčano potvrđuje naš izabrani kriterij od  $\leq 3/10\text{HPF}$  kao gornju granicu kod grupe zaista benignih meningeoma. Sve više od tog broja tj.  $\geq 4/10\text{HPF}$  možemo smatrati višim stupnjem meningeoma s gorim biološkim tijekom, tj. meningeomima II. stupnja.

Perry i sur. (1997) ispitali su uzorak od 581 bolesnika i odredili značajnost histoloških parametara u meningeoma. Klasifikacija je učinjena po reviziji WHO (1993) kao i u ovom radu. Za granicu broja mitozu izabrali su  $\geq 4$  mitoze/10HPF za definiciju atipije, što je primjenjeno i u ovom radu. Srednja dob bolesnika bila je 57 godina (5–93 god.). Odnos žena i muškaraca bio je 2:1, što odgovara rezultatima u ovom radu. Maksimalni mitotski iznos  $\geq 4/\text{HPF}$  i hipercelularnost  $\geq 53/\text{dijametr}$  dvije su najznačajnije histološke značajke vezane uz nastanak recidiva. Invazija mozga bila je vidljiva samo u 89 slučajeva. Od najveće statističke važnosti vezano za nastanak recidiva bili su: pleomorfizam, gubitak stukture, nuklearna atipija i porast broja mitozu. Hipercelularnost i dijametar bili su nezavisni prognostički parametri, čak nezavisno od broja mitozu (6). Slični rezultati dobiveni su i u ovom radu (tab. 6), u kojem za srednju vrijednost dijametara postoji statistička razlika između nerecidivnih i meningeoma koji su recidivirali ( $p=0.001$ ). Čak je brojčani iznos od 53 izbrojenih jezgara po dijametr vidnog polja velikog povećanja mikroskopa isti kao u Perry-a (1997), što dakako dodatno potvrđuje značajnost i reproducibilnost ispitivanog kriterija. Dodatnom analizom vidi se da je statistički značajna razlika postojala upravo između grupe nerecidivnih i recidivnih meningeoma ( $p=0.001$ ) (tab. 7).

Prilikom daljnje statističke analize u ovom su radu postepeno izostavljani meningeomi višeg histološkog stupnja i analiza je bila sužena na grupu potpuno histološki benignih tumora (u prvoj operaciji) koji su bili makroskopski potpuno odstranjeni, a ipak su nakon izvjesnog vremena recidivirali. Uspređeni su s grupom također histološki potpuno benignih meningeoma koji nisu recidivirali u promatranom periodu ( $>5\text{god}$ ). Cilj je bio utvrditi da li među njima postoje histološke značajke povezane s recidiviranjem tumora. Statističkom analizom utvrđeno je da u grupi benignih meningeoma koji su recidivirali postoji značajno više izražen pleomorfizam stanica, atipija jezgara i gubitak stukture (tab. 9) kao i povećana celularnost (tab.

12). Grupe se nisu razlikovale prema broju mitozu (broj mitozu i vidljivi makronukleoli bili su značajno vezani sa histološkim stupnjevima meningeoma).

Pokazano je da meningeomi II. i III. stupnja češće recidiviraju. Ohta i sur. (1994) promjenu morfološkog izgleda u recidivu tumora nalaze u 9 od 15 bolesnika (60%). U pet bolesnika meningeomi su postali atipični ili anaplastični. Od histoloških značajki, celularnost ( $p=0.001$ ), mitoze ( $p=0.001$ ) i nuklearni pleomorfizam ( $p=0.001$ ) bili su značajno niži u grupi koja nije recidivirala nego u recidivnoj grupi, a proliferativna aktivnost i histološka anaplazija recidivnih meningeoma povećavala se sa svakim recidivom (92).

U ovom radu značajni histološki parametri za progresiju histološki benignih meningeoma bili su: pleomorfizam stanica, atipija jezgara, gubitak strukture i povećana celularnost. Pleomorfizam stanica i atipija jezgara su, kao histološke značajke, jako bliske i teško ih je strogo odvajati. Njihova zastupljenost je gotovo podjednaka i u ovom radu mogli bi se ujediniti pod jedan nazivnik. De la Monte i sur. (1986) našli su umjereni ili značajni pleomorfizam jezgara u malignom i nemalignim meningeomima, ali je njihova učestalost bila značajno viša u grupi tumora koji su recidivirali (102). Za razliku, Kepes i sur. (1982) su nalaz staničnog pleomorfizma teško korelirali kako s recidivnim tako i s nerecidivnim meningeomima (105). De la Monte (1986) smatra da je raskorak u nalazima u odnosu na stanični pleomorfizam i ponašanje tumora možda nastao zbog varijabilnosti u načinu kako se citološki pleomorfizam određivao. Shodno rezultatima svog rada autori smatraju da je jezgrin pleomorfizam važniji nego citoplazmatski pleomorfizam (102). Ovaj rezultat dijelom je potvrđen opažanjem da je povećanje područja jezgre u meningeomima povezano s recidivom tumora, kao i s generalnim nalazom da su nuklearni pleomorfizam i hiperkromazija važne značajke za predviđanje biološkog ponašanja mnogih neoplazmi. To potkrepljuje rezultate dobivene i u ovom radu, u kojem se pleomorfizam stanica većinom odnosio na varijabilnost stanične populacije. Pleomorfizam stanica je bio u uskoj vezi sa jezgrinom atipijom koja je najčešće opažena uz hiperkromaziju i povećanje područja jezgre. Smatramo da ih u histološkom rutinskom radu možemo svesti pod zajednički naziv pleomorfizam i jezgre i citoplazme, odnosno "stanični pleomorfizam", jer su te promjene biološki povezane i teško razlučive na osnovu rutinskih HE histoloških preparata. Mi smo ih u rezultatima statističke obrade navodili kao dva entiteta.

Gubitak strukture evidentno je objektivna i dobro karakterizirana histološka značajka meningeoma povezana s recidivom i histološkim stupnjem tumora. De la Monte, koja

ima slične rezultate, smatra da rast meningotelijskih stanica u obliku pločastih područja (engl. sheets) može predstavljati niži stupanj diferenciranosti stanica u usporedbi s lukovicama ili sincicijskim rastom, doprinoseći tako većoj sklonosti meningeoma za recidiv kada je prisutno gubljenje tipične arhitekture (102). Taj nalaz u potpunosti odgovara rezultatima dobivenim u ovom radu. Celularnost je jednostavni brojčani iznos koji se lako može definirati i standardizirati u budućoj metodologiji pri analizi meningeoma i njihovog biološkog ponašanja.

### 5.3. Kinetika rasta tumora

Jedan od glavnih ciljeva u patološkim studijama odstranjenih novotvorina je utvrditi proliferacijski potencijal ostatnog tumorskog tkiva. Posebno je to važno za tumore središnjeg živčanog sustava gdje je potpuna resekcija često nemoguća, pa vrsta i opseg postoperativnog liječenja prije svega ovise o histološkom stupnju. Danas se procjena temelji na zaključcima dobivenim iz iskustva sličnih tumora i iz histoloških osobina kao što su izgled jezgara, proliferacija krvih žila i nekroza. Mitotski indeks je vrijedan izravni pokazatelj rasta tumora, ali se i u izrazito malignim tumorima mitoze često ne vide. Slično tome, u recidivirajućim se meningeoma mitoze često ne nalaze ili su one malobrojne. Zbog toga se u ispitivanju kliničkog materijala primjenjuju druge metode ne bi li se s većom sigurnošću procijenila kinetika stanica u operiranom tumoru. Preoperativna ugradnja bromdeoksiuridina (BrdU) u tkivo meningeoma i analiza tkiva nakon operacije priznata je metoda za otkrivanje brzine rasta tumora, ali nije primjenjiva za rutinski rad. Međutim, ona služi kao osnova za usporedbu i vrednovanje drugih lakše primjenjivih metoda za procjenjivanje proliferacijske aktivnosti meningeoma. Assietti (1990) je ispitivao proliferacijski potencijal tumora mozga ljudi s pomoću ugradnje bromdeoksiuridina *in vivo* i protočne citometrije. Bolesnicima s različitim oblicima tumora mozga preoperativno je intravenski injicirao 250 mg otopine spoja BrdU, da bi nakon odstranjenja tumora mjerio kinetske parametre stanica, kao npr. S-fazu staničnog ciklusa i vjerojatno vrijeme udvostučenja mase tumora. Rezultati su pokazali vjerodostojnu razliku indeksa obilježavanja (engl. labelling index, LI) s BrdU između meningeoma i glioma, ali nisu pokazali razliku u LI između benignih i anaplastičnih meningeoma (106).

Tehnika AgNOR je na meningeomima dosta primjenjivana tehnika koja je upoređena s novijim imunohistokemijskim metodama. Maier i sur. (1992) usporedili su histopatološku klasifikaciju meningeoma s kliničkopatološkim podacima biološke

aktivnosti tumora. Retrospektivnom je studijom bilo obuhvaćeno 1799 kirurških uzoraka meningeoma od ukupno 1582 bolesnika. Klasični histološki tip meningeoma, potom atipični meningeom s jače izraženom celularnošću i s najmanje 5 mitotskih figura/10HPF, anaplastični (maligni) meningeom te angiopericitni ili papilarni meningeom nađeni su u slijedećim postotcima: 87,6%, 7,2%, 2,4% i 2,8%. Ponovna pojava tumora bila je rijetka u klasičnom meningeomu s potpunom resekcijom, a mnogo učestalija u atipičnim i anaplastičnim oblicima nakon potpune resekcije. Autori su primijenili tehniku AgNOR na 112 meningeoma i zaključili da preklapanje vrijednosti AgNOR između različitih stupnjeva zloćudnosti meningeoma ograničuje važnost te metode u pojedinačnim slučajevima, iako vjerodostojno korelira s histološkim skupinama stupnja zloćudnosti (104).

Korkolopoulou i sur. (1993) su u komparativnoj studiji izražaja PCNA i prikaza AgNOR u 82 tumora SŽS pokazali da se obje tehnike mogu uspješno primijeniti na rutinski materijal u cilju otkrivanja potencijala rasta tumora SŽS (107). Coltera i sur. (1991) su u staničnim kulturama različitih tkiva usporedili tri metode za određivanje proliferacije tumora: imunohistokemijsko bojenje na Ki67 i PCNA te ugrađivanje radioaktivno obilježenog timidina. Ekspresija PCNA i ugradnja BrdU pokazala je kvalitativne i kvantitativne razlike između različitih staničnih linija. Izgled bojanja na PCNA i BrdU nisu ekvivalentni, što upućuje da oni ne prepoznaju isti antigen u istim staničnim linijama (A431 i HeLa). Analiza dva markera u dvije stanične linije ipak demonstrira moguću povezanost još nekarakteriziranog Ki67 antigena i PCNA/ciklina (108).

Karamitopoulou i sur. (1994) su u skupini 136 primarnih tumora SŽS ispitali 50 meningeoma na parafinskim kockama s pomoću imunohistokemijskog bojenja antigena Ki67 s monoklonskim antitijelom MIB1. Od 50 meningeoma u toj seriji, 41 je pokazivao malen broj Ki67+ imunoreaktivnih staničnih jezgara, što upućuje na niski proliferacijski stupanj ovih tumora. Međutim, u preostalih 9 slučajeva, jaka reakcija bila je prisutna u velikom broju neoplastičnih jezgara. Od ovih meningeoma, koji su inače histološki tipični, 3 su pokazivala povećani broj mitoz, dok je preostalih 6 tumora pokazivalo potpuno benignu histološku sliku (109). Slične rezultate primjetili su i drugi autori, koji su također uočili visok udio Ki67+ stanica u brojnim histološki benignim meningeomima. Međutim Siegers i sur. (1989) u studiji od 52 meningeoma nisu našli povećane vrijednosti udjela Ki67+ stanica u recidivnim tumorima, niti u uzorku tumora s lokalnim znakovima malignosti. Autori su zaključili da ponovni rast meningeoma ne ovisi samo o njihovoj proliferacijskoj aktivnosti, već i o drugim

faktorima, uključujući duljinu trajanja staničnog ciklusa, rast stanica i širinu kirurške ekscizije (110).

Novija istraživanja stanične biologije moždanih tumora, uključujući ekspresiju jezgrina biljega vezanog za proliferaciju stanica – Ki67 (M1B1), pokazala su da je indeks bojenja za M1B1 bio vjerodostojno niži u skupini nerecidivnih meningeoma nego li u skupini recidivirajućih i meningeoma koji su metastazirali (92). Slično tome i drugi autori izvješćuju o pozitivnoj korelaciji između stupnja proliferacije tumorskih stanica analiziranog s pomoću biljega Ki67 i PCNA. To je posebice važno budući da je do nedavno Ki67 bio primjenljiv samo na svježem i zamrznutom materijalu, a PCNA na tkivu uklopljenom u parafin. Wolf i sur. (1992) su dokazali linearnu korelaciju između PCNA i S-faze frakcije (BrdU) u regenerirajućoj jetri. Postojala je dobra korelacija između PCNA i indeksa bojenja sa Ki67. Autori smatraju da je PCNA potencijalno vrijedan biljeg za definiranje proliferativne aktivnosti, jer se može primijeniti na formalinom fiksiranom tkivu i ne zavisi od vanjskih faktora poput ugrađivanja BrdU (111). Od tri ispitana protutijela na PCNA, najkvalitetnije bojenje je postignuto protutijelom PC10 koje se primjenilo u ovom radu.

Distribuciju imunoreaktivnosti PCNA u histološkim rezovima normalnog tkiva ispitivali su Hall i sur. (1990). PC10 je gotovo uvijek bio ograničen na jezgru, a može pokazivati i difuzni granulirani uzorak ili pak mješoviti izražaj. Rjeđe je primijećeno obojenje citoplazme čija priroda nije jasna, ali može predstavljati citoplazmatsku sintezu. Stanice u mitozu često pokazuju difuzno bojenje stanice, ali to ne iznenađuje jer se jezgrina membrana gubi tokom mitoze. Pojedine stanice u mitozu nisu pokazivale obojenost s PC10 (112). U istoj studiji autori su zapazili da svaka obojenost jezgre predstavlja pozitivni nalaz, bez obzira na intenzitet bojenja. Mi smo došli do istih zapažanja, a primijenili smo i jednak kriterij - svako obojenje smatrano je pozitivnim bez obzira na razlike u intenzitetu bojanja.

Benjamin i sur. (1991) dolaze do sličnih rezultata bojanja na PCNA na uzorcima limfnih čvorova u bolesnika s Hodgkinovom bolesti. Veoma neuobičajena ekspresija PCNA u citoplazmi stanica u slučajevima Hodgkinove bolesti, od kojih su većina RS-stanice ili njihove varijante, otvara brojna pitanja. Precizna lokalizacija proteina u citoplazmi je zasad nepoznata. Kako je upotrijebljeni reagens monoklonsko protutijelo, ne bi trebalo biti posljedica križne reaktivnosti, iako se i to ne može potpuno isključiti. Autori predlažu više mogućih rješenja te pojave. Moguće je da ona predstavlja aberantnu ekspresiju proteina u specifičnoj malignoj stanici shodno stečenoj genetskoj abnormalnosti ili preuređenju gena. Generalna intenzivnost

bojenja mogla bi upućivati na poremećaj sinteze proteina ili nemogućnost stanice da razgradi već formirani proizvod. To može biti ili zbog poremećaja u transportu ili pak u metabolizmu proteina između citoplazme i jezgre. Ovo je manje vjerojatno jer mnoge jezgre pokazuju ekspresiju proteina. Autor ostavlja mogućnost da neki stanični podtipovi imaju jedinstveni fenotip i da stoga izražavaju PCNA u citoplazmi (113).

Osim varijabilnosti u ekspresiji PCNA u odnosu jezgra/citoplazma, pri analizi ekspresije PCNA u ovom radu primijećena je i varijabilnost obojenosti između određenih područja istog meningeoma. Za neke rjeđe podtipove, kao npr. mikrocistični i papilarni, to je bilo naročito izraženo. Neka područja tumora bila su intenzivnije i difuzno obojena, dok u drugima obojenost na PCNA nije bila izražena ili je bila vrlo slaba. Garcia (1989) nalazi značajnu varijabilnost obojenosti PCNA u različitim regijama istog tumora (114). Stupnjevanjem izražaja PCNA na niski, srednji i visoki (0-25%, 26-50%, i >51%) nalazi se dobra korelacija s rezultatima protočne citometrije, pa je to bilo razlogom što je slična metodologija primijenjena u ovom radu. Regionalnu heterogenost rasporeda obojenih stanica, posebno u bolesnika s recidivom meningeoma, zamjećuju Ohta i sur. (92). To odgovara rezultatima u ovom radu i izgleda da je to karakteristika rasta meningeoma. Zbog toga je metodologija usmjerena na određivanje ekspresije PCNA u najintenzivnije obojenim regijama, odnosno područjima najintenzivnije proliferacije.

Kao što je i za očekivati, indeks bojenja s PCNA viši je od ugradnje radioaktivnog timidina ili BrdU zbog toga što ove zadnje dvije tehnike raspoznaju samo S-fazu, dok je PCNA izražen u kasnoj G1-, S-, G2- i M-fazi staničnog ciklusa. Drugo, budući da PCNA ima dug poluvijek (20h), može se imunohistokemijski detektirati i u stanicama koje su upravo izašle iz staničnog ciklusa diobe (108,112,115). Međutim, mora se uzeti u obzir konstatacija Louisa i sur. (1991) da varijabilni uzorak bojenja na PCNA dovodi do velikih poteškoća pri brojenju stanica i to znatno više nego s Ki67. Ovi faktori mogli bi ograničiti upotrebu anti-PCNA, pogotovo što je odnedavna Ki67 primjenjiv i na formalinski fiksiranom materijalu (116). Smatramo da će Ki67 na fiksiranom materijalu i dalje biti rutinski biljeg za objektivno mjerilo proliferacijske aktivnosti tumora koji najviše odgovara broju mitozama, pa mu PCNA ne treba biti zamjenom. Činjenica je da rezultati bojenja PCNA/ciklina i Ki67 nisu ekvivalentni sugerira da oni ne prepoznaju isti antigen u istim staničnim linijama (108). Slažemo se sa stavom Khoshyomn i sur. (1993) da je imunološko bojenje na PCNA od ograničene vrijednosti u pojedinačnom tumoru, uglavnom zbog prekomjernog

izražaja u mnogim tumorima i da se momentalno ne može preporučiti kao zamjena za Ki67 i/ili BrDU u rutinskom određivanju proliferacijske aktivnosti tumora (117). To ne umanjuje vrijednost dobivenih rezultata za ekspresiju PCNA u meningeomu i njegovu primjenu za rano otkrivanje meningeoma koji bi mogli recidivirati. U ovom radu postoji značajna statistička razlika između meningeoma koji su recidivirali i onih koji nisu recidivirali u stupnju ekspresije PCNA ( $p=0.008$ ) (tab. 14). Izraženost PCNA analizirana na svim meningeomima i dalje pokazuje značajnu statističku povezanost s recidivom meningeomima ( $p=0.011$ ) (tab. 35). Značajnu statističku razliku u stupnju obojenosti recidivnih od nerecidivnih meningeoma nalaze Cobb i sur. (1996), i smatraju da tehnika bojenja na PCNA u meningeomima daje značajne prognostičke informacije (118).

Slične rezultate nalaze Nakabayashi i sur. (1995) koji su analizirali meningeome koji su recidivirali nakon potpunog odstranjenja, a čije se biološko ponašanje nije moglo predvidjeti uobičajnom patohistološkom analizom. Analizirali su 52 meningeoma, a PCNA indeks recidivnih meningioma bio je značajno viši od nerecidivirajućih meningeoma ( $p<0.005$ ). Obrnuta linearna korelacija nađena je između indeksa PCNA i intervala do pojave recidiva, kao i između indeksa PCNA i indeksa BrdU ( $r=0.88$ ,  $p<0.01$ ). Autori smatraju da je indeks PCNA koristan parametar za utvrđivanje biološkog ponašanja meningeoma (119). I Korkolopoulou (1993) smatra da primjena antitijela PC10 dozvoljava ranije prepoznavanje potencijalno agresivnih tumora. Posebno je to važno u tumorima niskog stupnja, astrocitomima i meningeomima, gdje je veoma teško, ako ne i nemoguće s pomoću standardnih histoloških kriterija identificirati one tumore koji imaju sklonost brzom recidivu (107). Autori su ispitali 21 meningeom I. stupnja, 1 atipični i 1 maligni. Autori se ne slažu sa konstatacijom Luisa i suradnika (1991) i smatraju da su njihove teškoće proizišle iz činjenice da su upotrebljavali smrznuti materijal umjesto parafinskih rezova (116).

U ovom radu primijenjeno je imunohistokemijsko bojenje tumora s pomoću monoklonskog protutjela PC10 na PCNA, a koje se po literaturi pokazalo kao najspecifičnije. Analizirana su ukupno 102 meningeoma. Izražaj PCNA procjenjen je slabim ili negativnim (ako se obojalo od 0-20% jezgara), srednje izraženim (20-50% obojenih jezgara) i jako izraženim (obojenost je prelazila 50% jezgara). Statistički je ispitana povezanost histoloških značajki sa stupnjem ekspresije PCNA u meningeoma. Iz tablice 35. vidljivo je da je stupanj ekspresije PCNA statistički značajno vezan za pleomorfizam ( $p=0.002$ ), atipiju jezgara ( $p=0.005$ ) i vidljive makronukleole ( $p=0.004$ ). PCNA ne korelira s patološkim mitozama, gubitkom



strukture, malim stanicama, nekrozama ni brojnošću krvnih žila. Jaka izraženost PCNA statistički je značajno povezana s brojem mitozama ( $p=0.016$ ), ali ne i s razdiobom meningeoma prema broju mitozama u grupe  $\leq 3$  i  $\geq 4$  mitoze /10HPF. Izraženost PCNA nije povezana s povećanom celularnošću. Korkolopoulou i suradnici (1993) ispitali su izraženost PCNA i broja AgNOR u 82 slučaja tumora središnjeg živčanog sustava s pomoću monoklonskog protutijela PC10 (107). Studija je pokazala značajnu korelaciju indeksa PCNA i broja AgNOR sa histološkim stupnjevima. Više razine indeksa PCNA nađene su u rekurentnim tumorima. Imunoreaktivnost na PCNA utvrđena je u različitom omjeru neoplastičnih stanica u većini ispitivanih slučajeva osim u dva meningeoma, od kojih je jedan bio psamomski, a drugi meningotelijski (oba su bila negativna). Bojenje jezgara bilo je granularno, difuzno ili miješano, dok se u nekoliko slučajeva primijetilo slabije citoplazmatsko bojenje. U nekim mitotskim stanicama nađeno je difuzno citoplazmatsko i jezgreno bojenje (107). Slični uzorak bojenja opažen je i u ovom radu i utvrđena je povezanost s recidivnim tumorima. Također je primijećena neujednačenost u izraženosti PCNA unutar istog tumora. Uz područja s visokim izražajem PCNA nalazila su se područja s niskim ili čak negativnom izražajem PCNA. Luchi i sur. (1999) ispitali su regionalnu heterogenost proliferativne sposobnosti sedam u cijelosti resecirana meningeoma. Bojenje na PCNA primijenili su na cijeli rez kroz sredinu tumora koji je bio podijeljen i mapiran u adekvatne isječke za mikroskopsku analizu. Mape pozitivne izraženosti PCNA pokazivale su intratumorsku heterogenost proliferativne aktivnosti u svim slučajevima. Iz ovih rezultata proizlazi da samo nekoliko uzoraka meningeoma ne može sa sigurnošću reflektirati proliferativnu aktivnost cijelog tumora (120). Shodno tome, kao i iz rezultata ovog rada, proizlazi važan praktični zaključak da prilikom preuzimanja bioptičkog materijala treba ga u cjelosti uklopiti u rutinsku obradu i histološki pregledati, a zatim izabrati najproliferativnija područja i tek po njima suditi o budućem ponašanju tumora!

U ovom radu utvrđena je statistički značajna povezanost histološkog stupnja meningeoma i izražaja PCNA. Pri analizi kliničkopatoloških skupina meningeoma, niski, srednji i visoki stupanj izražaja PCNA bio je statistički značajno različit u odnosu na tri histološka stupnja ( $p=0.013$ ) (tab. 5). Štoviše, izražaj PCNA razlikovao se među histološkim stupnjevima grupe nerecidivnih meningeoma i recidiva ( $p=0.023$ ) (tab. 19). I kod analize svih meningeoma zajedno ( $N=102$ ), histološki stupanj statistički je značajno korelirao sa stupnjem izražaja PCNA ( $p=0.032$ ) (tab. 30). Slične rezultate iznosi Hsu sa sur. (1994). Oni su klasificirali 63 meningeoma u

benigne (26), atipične (24) i maligne (121). Bilo je 39 žena i 24 muškarca, srednje dobi  $54.2 \pm 1.7$  godina prilikom prve operacije. Od 63 primarna tumora, 24 su lokalno recidivirali, uključujući 23.1% (6/26) benignih, 37.5% (9/24) atipičnih i 69.2% (9/13) malignih meningeoma. Srednji interval za pojavu recidiva tumora iznosio je  $52 \pm 11.8$  mjeseci. Srednje vrijeme praćanja bolesnika u kojih tumor nije recidivirao iznosilo je  $82 \pm 8.5$  mjeseci. Analizom varijance utvrdili su statistički značajnu razliku između tumora za indeks PCNA ( $1.16 \pm 0.29\%$  za benigne,  $14.14 \pm 2.07\%$  za atipične i  $21.37 \pm 5.47\%$  za maligne) i mitotski indeks (ukupni broj mitozâ/10HPF) ( $0.08 \pm 0.05$  za benigne,  $4.75 \pm 0.91$  za atipične i  $19.00 \pm 4.07$  za maligne) (92).

Hakin-Smith i sur. (2001) ispitali su izražaj PCNA, p53 i p21 u 85 benignih meningeoma koji su recidivirali. Našli su da većina tumora izražava p53, p21 i PCNA, sa značajnom povezanošću ekspresije p53 s p21 i PCNA (122). U ovom je radu izražaj PCNA u grupi benignih meningeoma koji su recidivirali bio statistički značajno viši u odnosu na meningeome koji nisu recidivirali ( $p=0.015$ ) (tab. 11). U recidivima je bio veći broj meningeoma s visokim izražajem PCNA ( $>50\%$ ). Usporedba istih skupina, ali uspoređena prema histološkom stupnju, također se statistički razlikuje po broju meningeoma s visokim izražajem PCNA ( $p=0.031$ ) (tab. 23). Slične rezultate objavili su Takeuchi i sur. (1997), koji su ispitali izražaj PCNA i Ki67 na uzorku od 95 histološki benignih meningeoma. Od toga je bilo 82 uzorka nerecidivnih i 28 uzoraka recidivnih tumora u sveukupno 10 bolesnika u kojih je tumor recidivirao. Proliferacijska aktivnost ili agresivnost tumora nije uvijek bila izražena u svakom recidivnom uzorku. PCNA je bio značajno više izražen u recidivnoj grupi ( $3.98\% \pm 0.37\%$ ) nego u nerecidivnoj grupi ( $0.71 \pm 0.13\%$ ) ( $p<0.0001$ ). Ki67 je također bio više izražen u recidivnim tumorima ( $3.15 \pm 0.40\%$ ) nego u nerecidivnoma ( $0.39 \pm 0.07\%$ ) ( $p<0.0001$ ). Nađena je dobra korelacija između izražaja PCNA i izražaja Ki67 (koeficijent korelacije  $r=0.79$ ,  $p<0.001$ ). Zaključak autora je da PCNA ili Ki67 veći od 2% može predstavljati rizik za recidiv meningeoma. Zbog toga preporučuju da se radioterapija ili stereotaktička radiokirurgija mora uzeti u razmatranje u takvom slučaju čak i kod histološki benignih meningeoma, posebice ako je potpuno odstranjenje upitno (50).

#### 5.4. Protočna citometrija

Osnovna odlika metode je njezina prikladnost za brzu i točnu analizu stanica u heterogenom staničnom uzorku. Upotreba parafinskih rezova korisna je za

retrospektivnu analizu uzoraka. Analiza stanične DNA daje dva vrijedna podatka: 1. o ploidnosti stanica, tj. sadržaju DNA u stanicama u mirovanju (euploidne i aneuploidne stanice); i 2. udjelu stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa (G0/G1 ili fazi mirovanja, S-fazi ili fazi udvostručavanja DNA te u G2/M-fazi, koja označava mitozu stanica). Kako se sadržaj DNA u stanici mijenja u ovisnosti s fazom staničnog ciklusa, moguće je odrediti relativni udio stanica unutar svake faze ciklusa. U većini slučajeva, nalaz sadržaja DNA podudara se s kromosomskim kariotipom, iako i nalaz normalnog sadržaja DNA ne podrazumijeva i neophodno normalni kariotip. Naime, protočnom citometrijom neće se otkriti višak ili manjak 2-5% sadržaja DNA, što odgovara višku ili manjku jednog do tri ljudska kromosoma. Metoda protočne citometrije uspoređivana je s ugradnjom bromdeoksiuridina (106,123). Assietti i sur. (1990) ispitali su trajanje S-faze i potencijalno vrijeme udvajanja tumora s pomoću ugradnje BrdU danog intravenski. Autori nisu našli razliku u ugradnji BrdU između meningeoma i glioma. Također nisu našli razliku između benignih i anaplastičnih meningeoma (doduše, na ograničenom broju slučajeva) (106). Hoshino i sur (1986) analizirali su 20 bolesnika s meningeomom nakon što su im preoperativno dali intravensku infuziju 200 mg/m<sup>2</sup> bromdeoksiuridina (BrdU). On se veže za tumorske stanice u S-fazi, tj. u fazi sinteze DNA. Devet meningeoma imalo je indeks ugradnje BrdU >1%, a šest od njih (67%) su recidivirali. Izgleda da meningeomi sa indeksom ugradnje >1% rastu brže i da češće recidiviraju. Autori su zaključili da veći indeks ugradnje BrdU može pokazivati biološku malignost (123).

Protočnim citometrijom jezgara iz parafinskih rezova, Akchi i sur. (1991) su analizirali stupanj proliferacije i ploidnosti 52 meningeoma. Prema histološkoj slici, šest tumora je bilo svrstano u skupinu malignih, a aneuploidija je nađena samo u dva (33,3%) maligna meningeoma. Štoviše, tri klinički maligna meningeoma imala su normalan sadržaj DNA, tj. bili su diploidni. Nasuprot tomu, proliferacijski indeks histološki malignih meningeoma bio je značajno veći nego proliferacijski indeks benignih meningeoma. To ukazuje da je predviđanje biološkog ponašanja tumora (benigni vs. maligni) samo na temelju analize ploidije vrlo nepouzđano. Nasuprot tomu, stupanj proliferacije tumorskih stanica vjerodostojno je povezan s prognozom meningeoma (124). Rezultati ovog rada u tom se pogledu unekoliko razlikuju.

Salmon i sur. (1993) analizirali su 222 meningeoma. Prema histološkim značajkama nalaze 12 malignih (u slučaju postojanja invazije mozga), 5 anaplastičnih i 7 hemangiopericitoma te 210 klasičnih meningeoma. Sveukupno 86% meningeoma bilo je euploidno. Slabo aneuploidnih ("near-diploidnih"), odnosno hiperdiploidnih bilo

je 5%. Izrazito aneuploidnih tumora bilo je 9% (1% triploidnih, 3% hipertriploidnih i 5% pleomorfni) (125). Autori nisu našli statističku razliku između udjela diploidnih u šest klasičnih podtipova meningeoma u odnosu na dva maligna. Autori smatraju da pojedini klasični menigeomi mogu pokazivati visoki stupanj aneuploidije kao rezultat degenerativnih fenomena povezanih s dugim trajanjem, odnosno "starošću" tumora. I u ovom radu bio je zanemarivo malen broj poliploidnih tumora, odnosno visokoaneuploidnih, za razliku od npr. malignih limfoma analiziranih metodom protočne citometrije od istog autora (126).

Cruz-Sanchez i sur. (1993) analizirali su uzorke 41 meningeoma koji su histološki bili klasificirani u benigne, atipične i anaplastične. Protočnom su citometrijom odredili plovidiju stanica i udio stanica u S- i G2/M-fazi staničnog ciklusa. Nije nađena vjerodostojna korelacija između aneuploidije i kvalitativnih osobitosti tumorskih stanica (pleomorfizma, gustoće stanica i mitotske aktivnosti), infiltracije mozga i mekih tkiva te ponovne pojave tumora. Prema istim autorima, visok proliferativni indeks tumorskih stanica povezan je s klinički agresivnijom slikom bolesti (103). U ovom je radu na potpuno drugačiji način postavljena analiza sa stajališta kliničkopatoloških grupa meningeoma, meningeoma svrstanih prema histološkom stupnju, stupnju izražaja PCNA i p53, te broju mitozā ( $\leq 3$  i  $\geq 4$ ). Unutar tako definiranih skupina analizirani su stupanj plovidije i srednje vrijednosti udjela stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa. Zato rezultati nisu usporedivi pa i na to treba obratiti pažnju prilikom usporedbe rezultata ovog rada i rezultata i zaključaka drugih autora.

Iz rezultata ovog rada najznačajniji je podatak o različitoj zastupljenosti plovidije između tumora različitog biološkog tijeka, tj. meningeoma koji nisu recidivirali i grupe meningeoma s kasnijim recidivom, kao i između meningeoma I., II. i III. stupnja. To će se argumentirati na slijedeći način. Naime, uporedbom tri kliničkopatološke grupe i razdiobom plovidije među grupama nije dobivena statistički značajna razlika (tab. 5). Aneuploidni menigeomi su, pritom bili rijetki. Općenito se može reći da je udio aneuploidnih meningeoma nizak. Rezultati Mailla i sur. (1999) na seriji od 105 operiranih meningeoma potvrđuju da menigeomi pokazuju relativno nisku incidenciju DNA aneuploidije (14%) i da obično pokazuju niski proliferativni udio (srednja vrijednost postotka stanica u S-fazi je iznosila  $1.3 \pm 0.3\%$ ) (127). U ovom radu nađeni su slični rezultati te nešto veći udio aneuploidije. Od ukupno 102 meningeoma analiziranih metodom protočne citometrije uz višestruko ponavljanje

analize u većini slučajeva i automatsko očitavanje svih rezultata zbog ujednačenosti, diploidnih je meningeoma bilo 76 (74.5%), a aneuploidnih 26 (25.5 %).

Histološki stupnjevi tumora pokazali su tek 95% vjerojatnosti povezanosti s ploidiom ( $p < 0.05$ ) (tab. 29). U skupini malignih bilo je 17 diploidnih i 6 aneuploidnih meningeoma. U skupini atipičnih bilo je 18 diploidnih i 12 aneuploidnih tumora. U histološki potpuno benignim meningeomima bilo je 8 aneuploidnih, a 41 diploidnih. Određivanje benignosti ili malignosti meningeoma na osnovu same ploidijske stoga je teško i nepouzđano.

Do sličnih zaključaka došli su Akachi i sur. (1991), koji su metodom protočne citometrije analizirali 52 meningeoma uključivši i klinički maligne slućajeve koji nastaju multifokalno i koji brzo rastu. Među analiziranim tumorima bila su i tri multipla meningeoma koja su multifokalno recidivirala unutar tri godine. Određivali su proliferativni indeks ( $\%S+G2/M$ ) i DNA ploidijsku. Šest meningeoma bilo je histološki maligno, a samo su dva bila aneuploidna (33.3%). Među benignim tumorima aneuploidnih je bilo 23,9%! Štoviše, tri klinički maligna meningeoma bili su diploidni. Nasuprot, proliferacijski indeks od  $19.82 \pm 9.45\%$  među histološki malignim slućajevima bio je statistički znaćajno viši od benignih meningeoma ( $11.50 \pm 5.49\%$ ). Autori smatraju da je određivanje benignosti ili malignosti meningeoma na osnovi same ploidijske teško, a da je proliferativni indeks znaćajno povezan s prognozom (124).

Međutim, u ovom radu daljnjom analizom razlićitih grupa meningeoma prema biološkom tijeku bilo je moguće raščlaniti i pojasniti prije spomenute nejasnoće i pomalo zbunjujuće rezultate. Naime, usporedbom grupe recidiva meningeoma s kontrolnom skupinom tumora koja nije recidivirala nalazi se statistički znaćajna razlićka u zastupljenosti diploidnih i aneuploidnih tumora ( $p=0.003$ ) (tab. 13). Aneuploidija je bila znaćajno više zastupljena u grupi recidiva (37%) u odnosu na samo dva aneuploidna meningeoma (7%) među onima koji nisu imali recidiv. Diploidnih meningeoma je među recidivima bilo 22 (63%), a u skupini nerecidivnih meningeoma 28 ili 93%.

Kada se izdvoje nerecidivni meningeomi i recidivi, usporedbom samog histološkog stupnja meningeoma sa ploidijskom nije nađena razlićka za učestalost i raspodjelu diploidnih i aneuploidnih meningeoma (tab. 20). Međutim, kada se u analizu ukljući dodatna biološka karakteristika meningeoma, kao što je tendencija recidiviranja, zagonetka se rješava (tab. 23). Analizom grupa meningeoma razlićitog histološkog stupnja, ali i razlićitog kliničkog toka, dobivamo konaćno rješenoje problema i statistički

značajnu razliku među grupama ( $p=0.007$ ). U grupi benignih meningeoma koji nisu recidivirali samo je jedan aneuploidni histogram (4%). U grupi od 11 histološki benignih recidiva, 5 meningeoma je imalo aneuploidni histogram (45%). Upravo ova grupa histološki benignih meningeoma (s relativno mnogo aneuploidnih tumora) remeti statistiku prilikom analize provedene prema histološkom stupnju meningeoma jer se ovi aneuploidni meningeomi tada nalaze u grupi benignih. U recidivima meningeoma II. stupnja, 6 od 16 meningeoma pokazivalo je aneuploidiju (37%), a u recidivima III. stupnja bilo je 2 aneuploidnih od ukupno 8 tumora (25%). Ovi rezultati ukazuju da je za meningeome (kao posebnu grupu tumora koji generalno imaju nisku proliferativnu sposobnost) svaka aneuploidija znak lošijeg biološkog toka, tj. budućeg recidiva tumora odnosno da tumor već spada u histološki II. ili III. stupanj!

U ovom radu analiziran je stanični ciklus brojenjem stanica u G0/G1-, S- i G2/M-fazama, a rezultat je izražen kao relativni postotak na ukupni broj stanica. U ovom radu nije određivan proliferacijski indeks, jer je s pomoću računalnog programa dobivena vrijednost S-faze. Nije nađena statistički značajna razlika analiziranih vrijednosti u usporedbi recidivnih meningeoma s nerecidivnim i grupom atipičnih/malignih. Usporedbom grupe recidiva s kontrolnom grupom meningeoma koji nisu recidivirali također se ne nalazi statistički značajna razlika u S-fazi. Srednja vrijednost S-faze za recidivne meningeome bila je  $5.67 \pm 3.32$ , a za meningeome koji nisu recidivirali  $6.85 \pm 5.43$  (tab. 15).

Hoshino i sur. (1978) analizirali su 8 klasičnih meningeoma. Svi su bili diploidni, a njihovi histogrami sugeriraju da postoji vrlo mali broj stanica u proliferaciji ili veoma dugačko vrijeme udvajanja stanica koje se uglavnom sastoji od duge G1-faze (pre sintetska faza DNA) (128).

Ironside i sur. (1987) su u seriji 39 meningeoma od 35 bolesnika učinili analizu svježeg smrznutog materijala s pomoću protočne citometrije. Stanični ciklus analiziran je izračunom stanica u G0/G1-, S- i G2/M-fazama izraženo u relativnom postotku stanica na ukupni sadržaj stanica. Ukupno 23 meningeoma bili su diploidni, a 16 je bilo aneuploidnih (hipodiploidni, hiperdiploidni, poliploidni). Incidencija aneuploidije bila je statistički značajno veća u recidivnim nego u ostalim meningeomima. Nije bilo značajne razlike u G0/G1- i G2/M-fazama između diploidnih i aneuploidnih tumora ( $p<0.05$ ). Histološki podtipovi također nisu pokazivali povezanost s rezultatima protočne citometrije (129).

Rezultati ovog rada dobiveni metodom protočne citometrije mogli bi se usporediti s nalazima Ironside i sur. (1987), iako je ova analiza urađena na parafinskim kockama.

I ovdje je stanični ciklus analiziran brojenjem stanica u G0/G1-, S- i G2/M-fazama staničnog ciklusa. Incidencija aneuploidije bila je statistički značajno veća u recidivnim tumorima. Kvalitativna procjena udjela stanica u S-fazi staničnog ciklusa moguća je ako histogrami DNA imaju zadovoljavajuću vrijednost CV i mali udio raspadnutih i agregiranih stanica (99). Veća nazočnost raspadnutih stanica ima značajan utjecaj na točnost mjerenja udjela stanica u S-fazi staničnog ciklusa (povećanje udjela stanica). Starijim se programima za analizu staničnog ciklusa nije moglo točno odrediti udio stanica u S-fazi u aneuploidnih tumora zbog preklapanja površina koje su označavale S-fazu. Udio stanica u G2/M-fazi nije se uvijek mogao izraziti iz istog razloga ili zbog toga što površina koja odgovara G2/M-fazi nije bila vidljiva. Program ModFit LT daje vrlo točnu analizu udjela tumorskih stanica u S- i u G2/M-fazama staničnog ciklusa i to odvojeno udjela stanica u S-fazi diploidnih i aneuploidnih tumorskih stanica, kao i ukupnu proliferacijsku aktivnost tumorskih stanica. Zato je teško uspoređivati rezultate ovako dobivene S-faze s rezultatima izraženim u obliku proliferacijskog indeksa.

U ovom su radu uspoređene srednje vrijednosti faza staničnog ciklusa rasta unutar grupe benignih meningeoma koji su recidivirali sa meningeomima koji nisu recidivirali u praćenom periodu (tab. 12). Vrijednosti S-faza u obje grupe gotovo su podjednake (srednja vrijednost prve biopsije benignog meningeoma koji su recidivirali iznosi  $7.08+3.58\%$ , a meningeoma koji nisu recidivirali  $7.40+5.44\%$  ( $p=0.78$ ). CV benignih meningeoma koji su recidivirali (srednja vrijednost  $9.59 \pm 4.51$ ) bio je statistički značajno veći ( $p=0.003$ ) od CV u grupi meningeoma koji nisu recidivirali (srednja vrijednost  $6.51 \pm 1.73$ ). Time je kod meningeoma otkrivena grupa "neardiploidnih tumora" (za koje je i inače kritrij  $CV>8$ ), a koji mogu ukazivati na manji kariotipski poremećaj (2-5% ukupnog broja kromosoma (125, 126). Iz ovoga proizlazi važan praktični zaključak prilikom analize meningeoma metodom protočne citometrije: uvijek je potrebno analizirati više isječka tumora, jer meningeomi u različitom području istog tumora mogu pokazivati različitu proliferativnu aktivnost. Ako ijedan rezultat odskoče od diploidne slike, tj. prelazi dopušteni kriterij od  $CV=8$ , tom se tumoru mora posvetiti dodatna pažnja. U analizi meningeoma taj rezultat najčešće ne znači grešku u kvaliteti materijala (kao što smo mislili tijekom ovog rada i stoga često nepotrebno ponavljali analize istog uzorka), već sumnju u potencijalno agresivni biološki tok i narav tumora.

Finn i sur. (1944) analizirali su 16 meningeoma i 22 hemangiopericitoma, uključujući i "angioblastne meningeome". Od toga je broja 6 tumora bilo recidivnih, a 1

metastatski. Protočna citometrija je učinjena u 21 tumora i svi su bili diploidni. Za razliku od rezultata ovog rada, navedeni autori smatraju da ploidnost tumora nije koristan pokazatelj biološkog ponašanja meningeoma. Svi tumori koji su imali udio stanica u S+G2+M >11% bili su agresivnog kliničkog ponašanja (lokalni recidiv, metastaziranje ili smrt zbog invazivnosti tumora). Žarišta nekroze također povezuju s agresivnošću tumora (130).

May i sur. (1989) su analizirali 40 bolesnika s meningeomom i utvrdili da je proliferacijski indeks grupe recidiva značajno viši od nerecidivnih tumora ( $p < 0.002$ ), iako im je histološki podtip bio sličan. Autori smatraju da protočna citometrija može biti od koristi u predviđanju recidiva histološki benignih i makroskopski odstranjenih meningeoma (131).

Za razliku od rezultata Maya i sur. (1989), u ovom radu nismo utvrdili statistički značajnu razliku u S-fazama između recidivnih i nerecidivnih meningeoma. Međutim, smatramo da protočna citometrija može biti korisna u predviđanju recidiva histološki benignih meningeoma već i pri nalazu graničnog CV ( $>8$ ), što je vidljivo iz rezultata prethodne analize uzoraka uzetih tijekom prve operacije benignih meningeoma koji su kasnije recidivirali. Ovaj rezultat sam po sebi nije dovoljan, ali otkriva i definira grupu "neardiploidnih" meningeoma drugačijeg biološkog tijeka.

Appley i sur. (1990) analizirali su 19 meningeoma. Bez recidiva je bilo 16 bolesnika, pet je bilo podvrgnuto multiplim operacijama, a dva su bolesnika umrla zbog recidiva tumora. Autori su odredili PI (% stanica u fazama S i G2/M) i proliferacijski iznos kao omjer S+G2M/G0G1. Od 7 rekurentnih meningeoma, dva su imala veći PI. Srednja vrijednost CV bila je 12.0 u recidivima (132). Nije nađena korelacija između sadržaja DNA i histološkog tipa meningeoma, ali je nađen značajno širi CV u recidivnim meningeomima, što se slaže s našim rezultatima.

Malobrojni su radovi u kojima su meningeomi usporedno analizirani s pomoću metode protočne citometrije i bojenjem na PCNA. Myong i sur. (1997) usporedili su histološke značajke 120 meningeoma s njihovim proliferacijskim karakteristikama dobivenim imunohistokemijskim bojenjem na PCNA i s pomoću metode protočne citometrije (133). Cilj je bio utvrditi značajke koje odvajaju atipične od benignih meningeoma. Od ukupno 120 meningeoma, histološki benignih je bilo 101 (43 meningotelijiska, 40 tranzicijskih, 11 fibroblastnih, 2 sekretorna, 2 mikrocistična, 2 angiomatozna i 1 psamomski), 15 je bilo atipičnih, a svega 4 malignih. Atipični tumori bili su definirani prisustvošću dva od sljedećih kriterija: velikom celularnošću, fokalnom nekrozom, poremećajem rasta (neprekinuti rast) i određenim jasnim



citološkim nalaziom, kao visokim odnosom jezgra/citoplazma, grudastim kromatinom i prominentnim nukleolima. U 56 slučajeva, PCNA pozitivna frakcija stanica u atipičnim i malignim meningeomima bila je viša nego u benignim slučajevima ( $p < 0.05$ ). Aneuploidija je bila češća u atipičnim meningeomima u usporedbi s benignim ( $p < 0.05$ ). Autori nalaze da se histološki klasificirani meningeomi mogu razlikovati prema proliferacijskoj aktivnosti i ploidiiji i da se atipični meningeomi moraju razlikovati od benignih histološkim pregledom (133).

U ovom radu različiti stupanj izraženosti PCNA bio je statistički različit među meningeomima različitog histološkog stupnja ( $p = 0.032$ ) (tab. 30). Pritom je aneuploidija imala tendenciju biti češće zastupljena u tumorima II. i III. stupnja. Izražaj PCNA povećavao se s histološkim stupnjem meningeoma (tab. 30), što se slaže s rezultatima Myong i sur. (1997).

U ovom se radu izražaj PCNA, kao markera proliferacije meningeoma, pokazao korisniji od vrijednosti stanica u S-fazi dobivenoj automatskom analizom histograma koje su uglavnom bile niske (tab. 6). I Ironside (1987) navodi da je većina meningeoma u njegovom radu sadržavala  $< 10\%$  stanica u S-fazi, a najviše vrijednosti nađene su u anaplastičnim i hemangiopericitnim meningeomima (129).

Između ekspresije PCNA i sadržaja stanica u S-fazi staničnog ciklusa u ovom radu ne postoji statistički značajna korelacija. Stoga izražaj PCNA upravo zato što nije tako profinjena i uska mjera za proliferaciju kao sama S-faza staničnog ciklusa rasta, može služiti kod meningeoma kao bolji pokazatelj proliferativne aktivnosti, budući da je proliferativna aktivnost u meningeomima vrlo niska u usporedbi s drugim vrstama tumora. Sama S-faza sa svojim niskim brojčanim iznosima za meningeome sva tri histološka stupnja onemogućuje daljnje razlučivanje između sličnih vrijednosti koje se ujedno i međusobno preklapaju, pa statistička analiza ne može dati adekvatni rezultat. Naravno, to ne umanjuje proliferativno značenje visoke S-faze u svakom pojedinačnom slučaju.

Rezultate slične ovima u našem radu opisuju Maillo i sur. (1999) koji su određivali S-fazu i ploidiiju stanica u seriji od 105 meningeoma s pomoću protočne citometrije na svježem materijalu dobivenom prilikom intraoperativne biopsije (134). Meningeomi su pokazivali relativno nisku incidenciju aneuploidije (14%) i obično niski proliferacijski iznos (srednji postotak stanica u S-fazi bio je  $1.3 \pm 0.3\%$ ). Prisutnost aneuploidije povezana je s većom zastupljenošću agresivnih histoloških tipova ( $p = 0.045$ ), što odgovara i našim rezultatima. Isti autori nisu našli statističku povezanost između ploidnog statusa i preživljenja ( $p = 1$ ), što odgovara rezultatima u ovom radu. Za

razliku od ovog rada, autori nalaze da je visok udio stanica u S-fazi (>1.8%) statistički povezan sa agresivnim histološkim tipovima ( $p=0.03$ ) i većim udjelom aneuploidije DNA (134).

U ovom radu, broj mitozu u meningeomima na razdjelnici  $<3$  i  $>4/10$ HPF nema statističku povezanost s ploidnim statusom. Postoji tendencija (94% vjerojatnost) za povezanosti broja mitozu sa širinom CV. Ekspresija p53 nije korelirala s ploidijom, kao niti s pojedinim fazama staničnog ciklusa.

## 5.5. Genetika

Sadašnje znanje u odnosu na molekularnu genetiku meningeoma razmjerno je oskudno. Gotovo je sigurno da gubitak genetskog materijala s drugog kraka kromosoma 22 predstavlja korak u početnom razvoju meningeoma. Takozvani gen za meningeom lociran je u regiji između lokusa za mioglobin i c-sis proto-onkogen. Taj je lokus odvojen od gena za neurofibromatozu tip II. Radi se o tumor-supresijskom genu, što podrazumijeva da gen mora biti izgubljen ili promijenjen na oba alela kromosoma 22 prije nego arahnoidalna stanica postane meningeomska. Kada su benigni, meningeomi su sigurno monoklonski, što znači da cijeli tumor nastaje iz jedne transformirane stanice. Karakterizacija meningeomskog gena i ostalih mutiranih gena u meningeomima, kao i njihovih produkata, unaprijediti će razumijevanje biologije i klasifikacije tih tumora i možda uputiti na nov pristup liječenja (14).

Recidivni meningeomi obično imaju mnogo agresivniji oblik. U seriji Jaaskelainen i sur. (1986), od ukupno 70 meningeoma koji su histološki bili benigni kod prve operacije, a koji su kasnije recidivirali, 10 je imalo sliku anaplastičnih ili atipičnih meningeoma. Od 19 meningeoma koji su u početku bili atipični, četiri su se ponovo pojavila kao anaplastični, a jedan kao sarkomatozni meningeom (34).

Postojeći model zloćudne progresije je rastući broj genetskih mutacija koje zahvaćaju brojne gene s onkogenim potencijalom ili pak onkogene i tumor-supresijske gene. Specifični nukleotidni slijed mutiranog gena je važno, ali još uvijek neriješeno pitanje. Ljudski tumor-supresijski gen p53 je inaktiviran u nekoliko malignih tumora. Genska inaktivacija posljedica je mutacije unutar široke regije koja obuhvaća eksone 5 do 9. Ta mutacija za posljedicu ima stvaranje proteina p53 s dugim poluvijekom, što se može otkriti imunohistokemijski. Općenito, postoji dobra korelacija između mutacije proteina p53 i njegovog nakupljanja u stanici (70).

Karamitopoulou i sur. (1993) analizirali su parafinske uzorke 137 primarnih tumora SŽS, među kojima je bilo 57 meningeoma. U radu su ispitivali izražaj p53 s pomoću protutijela CM1 i DO7. Ekspresija p53 nađena je u 7 fibrilarnih astrocitoma, 17 anaplastičnih astrocitoma, 5 glioblastoma, 1 gliosarkomu, 1 oligodendrogliomu, 1 anaplastičnom ependimomu i 4 meningeoma s CM1 poliklonskim antitijelom. Dodatnih 10 tumora (3 anaplastična astrocitoma i 7 meningeoma) dalo je pozitivnu reakciju s monoklonskim protutijelom DO7. Svi meningeomi bili su benigne histologije (74).

Ahmed i sur. (1999) upotrijebili su monoklonska antitijela DO7 (anti-p53) i PC10 (anti-PCNA) u analizi 29 meningeoma (20 benignih, 7 atipičnih i 2 maligna). Četri benigna i 2 atipična meningeoma slabo su izražavali p53. Nasuprot, oba maligna tumora pokazala su jako obojenje na p53. Šest benignih meningeoma imalo je manje od 5% PCNA+ stanica, jedan 10%, dok su tri sadržavala više od 20% pozitivno obojenih jezgara. PCNA-pozitivnost kretala se od 10-80% u atipičnim meningeomima. U dva maligna meningeoma PCNA-pozitivnost bila je 70% i 90%. Autori smatraju da izražaj p53 i PCNA treba obavezno uključiti zajedno uz histološki pregled za predviđanje kliničkog toka meningeoma (135).

Za divlji i mutirani p53 je primijećeno da se akumuliraju u citoplazmama pojedinih karcinoma dojke i pluća. Jasno citoplazmatsko bojenje na p53 nalaze Wang i sur. (1995) u jednom slučaju meningeoma, ali nije bilo indikacija za mutaciju p53 u tim područjima (72).

U ovom radu, smeđe obojenje jezgara na p53 uglavnom je bilo difuzno, a ponekad granulirano. Intenzitet obojenosti jezgara je varirao od vrlo jako obojenih do blijedo obojenih, ali je svaka ekspresija uračunata, bez obzira na intenzitet. Brojenje obojenih jezgara je bilo lako izvodljivo zbog čistog i jasnog uzorka obojenosti (nema bojenja citoplazmi ni podloge), reprezentativno i bez teškoća opisanih kod bojenja sa PCNA (107). Iz rezultata ovog rada može se zaključiti da je metoda vrlo dobra za primjenu na formalinski fiksiranom materijalu.

Miyagami i sur. (1996) ispitivali su značajnost ekspresije p53 i Ki67 između grupa recidivnih (8 bolesnika i 17 uzoraka) i nerecidivnih meningeoma (10 bolesnika) (136). Rezultat su izrazili kao indeks proliferirajućih stanica (PCI). Protein p53 nije nađen u 10 meningeoma koji nisu recidivirali. Međutim, p53 je bio pozitivan u 5 od 8 recidivnih meningeoma. Dva recidivna meningeoma, od ukupno četiri s benignom histologijom na prvom i drugom operativnom uzorku, pokazivali su ekspresiju p53 proteina. Tri od četiri recidivna meningeoma koji su na prvoj operaciji bili benigni, a u drugoj

transformirani (maligni/atipični), bili su pozitivni na p53. Iako je pozitivnost na p53 primijećena u recidivnim meningeomima (i to s višim vrijednostima za indeks bojenja), nije nađena korelacija s izraženim Ki67. Protein p53 može biti oštećen u recidivnom tumoru i/ili malignoj transformaciji meningeoma. Autori smatraju da je određivanje proteina p53, kao i proliferacijskog potencijala pomoću Ki67, važan dodatni faktor za predviđanje recidiva meningeoma (136).

U ovom se radu izražaj proteina p53 statistički značajno razlikuje između grupe recidivirajućih i nerecidivnih meningeoma ( $p=0.003$ ) (tab. 14). U grupi meningeoma koji nisu recidivirali, p53 nije bio izražen u 43% tumora. Izražaj niskog intenziteta nađen je u 30% slučajeva, dok se srednji i visoki izražaj p53 našao u 27% tumora. U grupi recidiva bez izraženog p53 bilo je 9 (26%) tumora, s niskim izražajem 3 (8%), a sa srednjim i visokim izražajem p53 bilo je čak 66% meningeoma. Stupanj izražaja p53 bio je povezan s višim histološkim stupnjem meningeoma u recidivu (tab. 23). U grupi recidiva benigne histologije, srednji i visoki izražaj p53 imalo je 45%, a u grupi atipičnih čak 81% ( $p=0.001$ ) meningeoma. U nerecidivnim meningeomima benigne histologije, 81% tumora su bili bez ili s niskim izražajem p53.

Izražaj proteina p53 u ovom radu statistički je značajno različit između grupe recidiva i nerecidivnih meningeoma ( $p=0.003$ ) (tab. 14), za razliku od rezultata Miyagami i sur. (1996) (136) i Lanzafame i sur. (2000) (137).

Lanzafame i sur. (2000) analizirali su 69 u potpunosti ekscidirana meningeoma s pomoću bojenja na p53 i Ki67, pri čemu su primjenjeni kriteriji za histološku klasifikaciju kao i u ovom radu. Meningeoma I. stupnja bilo je 54, II. stupnja 10, a III. stupnja 5. Bolesnici su prosječno praćeni 6.7 godina. Meningeome su podijelili u dvije grupe s obzirom na recidiv tumora - 42 bez recidiva i 27 recidivnih meningeoma. Pozitivno bojenje s p53 ( $>1\%$ ) nađeno je u 26 od 45 meningeoma (57%), sa indeksom obilježavanja od 1-10% u 18 (40%) i indeksom obilježavanja  $>10\%$  u 8 (17%) meningeoma. Iako je indeks obilježavanja bio viši u atipičnim i malignim meningeomima, nije nađena statistički značajan odnos između izraženosti p53 i recidiva meningeoma ( $p=0.05$ ) (137).

Možda začuđuju nalazi pojedinih autora koji nisu našli ekspresiju p53 u benignim meningeomima (70,138) ili je pak nalaze u vrlo malenom broju slučajeva (139). Scarpelli i sur. (1997) smatraju da se shodno molekularno genetskim analizama mutacija gena p53 može smatrati markerom maligne transformacije u meningeomima. Također navode da imunoreaktivnost na p53 nije uvijek povezana s genskom mutacijom i da nije detektibilna u benignim meningeomima (138). Prayson

je analizirao ekspresiju tumor-supresijskog gena p53 i markera proliferacije Ki67 u 23 maligna meningeoma (139). Malignitet je definiran prisustnošću nesumnjive invazije mozga ili metastaza. Nuklearni pleomorfizam bio je prisutan u 22 od 23 tumora, dezorganizacija arhitekture u 22 od 23, područja nekroze u 20 od 23, prominentni nukleoli u 17 od 23 i hipervaskularnost u 4 od 23 tumora. Broj mitozata kretao se od 1 do 18/10HPF ( $\bar{x}=6.1$ ). Izražaj p53 nađen je u samo 2 od 20 meningeoma. Autori nisu našli korelaciju između Ki67 i ponašanja tumora. Izraženost Ki67 je u većini malignih meningeoma visoka što odgovara općenito brzom rastu ovih tumora. Samo rijetki meningeomi pokazivali su izraženost p53 imunohistokemijskim bojenjem. Autori zaključuju da je većina malignih meningeoma karakterizirana nuklearnim pleomorfizmom, dezorganizacijom arhitekture, nekrozama, prominentnim nukleolima i povećanim brojem mitozata (139).

U ovom radu analiziran je izražaj p53 proteina na uzorku od 102 meningeoma. Prema postotku pozitivno obojenih jezgara, podijeljeni su u tri stupnja: niskog (0-20% jezgara), srednjeg (20-50% jezgara) i visokog stupnja obojenosti (više od 50% jezgara). Pritom je udio pozitivnih jezgara značajno korelirao s pleomorfizmom stanica ( $p=0.000$ ), atipijom jezgara ( $p=0.004$ ) i gubitkom strukture ( $p=0.001$ ). Statistička povezanost s makronukleolima, patološkim mitozama, malim stanicama, mikronekrozama i brojnošću krvnih žila nije nađena. Također nije nađena statistička povezanost ni s brojem mitozata niti s povećanom celularnošću. Jaka statistička povezanost nađena je i za histološki stupanj meningeoma ( $p=0.000$ ) i kliničko-histološke grupe tumora (recidivni, nerekidivni, atipični/maligni) (tab. 38).

Opisana neslaganja rezultata ovog rada s podacima iz literature mogu se objasniti sadašnjim napretkom tehnike imunohistokemijskog bojenja na formalinski fiksiranom i u parafin uklopljenom materijalu. Nove tehnike za razotkrivanje antigena termičkom obradom preparata u mikrovalnoj peći dovele su do kvalitetnijeg imunohistokemijskog bojenja, pa epitopi, koji su prije bili zamaskirani, danas se mogu razotkriti i obojati. Tu činjenicu treba imati na umu prilikom interpretacije i usporedbe rezultata s drugim autorima.

Primjenjujući tehniku razotkrivanja antigena prilikom imunohistokemijskog bojenja na p53, Amatya i sur. (2001) su dobili rezultate slične opisanim u ovom radu (140). Autori su analizirali 146 bolesnika s meningeomom (33 muškarca i 113 žena) i primjenili jednake histološke kriterije kao i u ovom radu. Sve meningeome su reklasificirali, pa ih je bilo 27 atipičnih, 10 malignih i 109 benignih. U rad nisu uključili slučajeve papilarnog, rabdoidnog, svijetlih stanica ili hordoidnog meningeoma, za

razliku od ovog rada u kojem navedeni tipovi nisu isključeni. Prilikom imunohistokemijskog bojenja korištena je metoda razotkrivanja antigena kuhanjem u mikrovalnoj peći. Primijenjeno protutijelo na p53 bilo je od drugog proizvođača (DO7; Novokastra, Newcastle, England; u razrjeđenju od 1:50). Pozitivno bojenje na p53 nađeno je u 26 benignih meningoma. Međutim, samo 7 meningeoma je pokazivalo indeks obilježavanja >5%. Izražaj proteina p53 u većini atipičnih i anaplastičnih meningeoma bio je visok, a mnogi od meningeoma imali su indeks obilježavanja >5%. Osim samo jednog slučaja, svi anaplastični meningeomi izražavali su p53. Autori su našli značajnu statističku povezanost između izražaja p53 i histoloških stupnjeva meningeoma ( $p=0.001$ ) (140). Ovo u potpunosti odgovara rezultatima našeg rada, u kojem je najznačajnija statistička povezanost izražaja p53 nađena za histološki stupanj grupe recidivnih i nerecidivnih meningeoma ( $p=0.000$ ) (tab. 18). P53 nije nađen ili je on bio nizak u 74% histološki benignih tumora, za razliku od 16% atipičnih. Izražaj p53 bio je srednji ili visok u 84% atipičnih meningeoma, za razliku od benignih gdje je sličan izražaj nađen u 26% tumora.

Cho i sur. (1999) ispitivali su izražaj p53 imunohistokemijskim bojenjem u 41 intrakranijskih meningeoma (21 benignih, 11 atipičnih i 9 malignih). Što je bio viši histološki stupanj meningeoma, to je bio viši izražaj p53 (9.5% za benigne, 72.7% za atipične i 88.9% za maligne) sa statističkom značajnošću od  $p=0.000$ . Izražaj p53 je bio statistički značajno viši u recidivnim (71.4%) nego u nerecidivnim (10.5%) meningeomima ( $p=0.002$ ). Metodu PCR-SSCP su primijenili na imunohistokemijski pozitivne slučajeve i našli da je mutacija p53 gena statistički značajno viša u atipičnim (62.5%) i malignim (25%) meningeomima nego u benignim (0%) ( $p=0.232$ ). Također je broj mutacija viši u recidivnim meningeomima (20%) nego u nerecidivnim tumorima (0%,  $p=0.495$ ). Zaključak je autora da su imunohistokemijski izražaj p53 i mutacije gena p53 usko povezane sa histološkim stupnjem i histološkom atipijom intrakranijalnih meningeoma, te da se mutacija gena p53 može smatrati korisnim markerom pri utvrđivanju progresije intrakranijalnih meningeoma (141)

U ovom je radu izražaj p53 analiziran na ukupno 102 meningeoma podijeljenih u tri histološka stupnja (tab. 30). U 45% histološki benignih tumora nije nađeno nakupljanje p53 u jezgrama. Nakupljanje p53 također nije nađeno u 6% atipičnih i 17% malignih meningeoma. Slabo nakupljanje p53 (<20%) u jezgrama nađeno je u 22% benignih, 10% atipičnih i 26% malignih meningeoma. Srednji stupanj nakupljanja p53 u jezgrama (20-50%) viđen je u 24% benignih, 47% atipičnih i 30% malignih meningeoma. Visoki stupanj nakupljanja p53 (>50%) nađen je u samo 8%

benignih meningeoma, te u 37% atipičnih i 26% malignih meningeoma. Statistička razlika u nakupljanju p53 u meningeomima različitog histološkog stupnja u ovom je radu statistički značajna ( $p=0.000$ ). Samu narav p53 proteina ("divlji" ili mutirani tip) nismo u ovom radu određivali.

Matsuno i sur. (1996) nisu mogli odrediti da li je u meningeomima povećani izražaj aberantnog ili divljeg tipa p53, ali pokazuju da je p53 (određen metodom imunohistokemijskog bojenja) bio izražen u meningeomima s visokim MIB-1 i u recidivnim meningeomima. Poznato je da je divlji tip p53 proteina uključen u negativnu regulaciju stanične proliferacije, a da je mutirani p53 izgubio moć negativne regulacije staničnog rasta. Za divlji tip p53 (koji ima veoma kratki poluvijek) općenito se smatralo da nije detektabilan upotrebom imunohistokemijskih metoda. Mutirani p53 ima dulji poluvijek i zbog toga je vidljiv upotrebom imunohistokemijskog bojenja. Međutim, prema nedavnim izvještajima i divlji tip p53 može se nakupljati u jezgrama zbog oštećenog puta ubikvitina. Autori smatraju da, izražaj p53 imunohistokemijskim bojenjem može ukazati na proliferativnu aktivnost meningeoma i time poslužiti kao pokazatelj budućeg recidiva (142).

U svojim radovima Nagashima (1999) i Ohkoudo (1998) ispitali su narav nakupljenog i imunohistokemijski prikazanoga p53 u meningeomima. Nagashima i sur. (1999) ispitali su narav izraženog p53 imunohistokemijskim bojenjem smrznutih rezova na mutant-specifično protutijelo (mAb pAb240) i analizirali mutirani gen metodom SSCP (engl. single-strand conformational polymorphism). Njihovi rezultati upućuju da se radi o povećanom izražaju divljeg, a ne mutiranog p53 (143). Ohkoudo i sur. (1998) ispitali su značajnost izraženosti p53 u recidivnim meningeomima i njegov odnos prema proteinu MDM2 u 39 meningeoma. P53 je bio izražen u 11 od 31 (35%) nerecidivnog i 7 od 8 (88%) recidivnih meningeoma. Visoka učestalost izražaja p53 je zamijećena u recidivnim meningeomima, s tendencijom visokog p53-pozitivnog indexa (p53 PI), što ukazuje da p53 imunoreaktivnost može biti marker za predviđanje recidiva tumora. Većina MDM2+ tumora (71%) i relativno malen broj MDM2-negativnih tumora (17%) izražavalo je p53. To ukazuje da je izražaj MDM2 mnogo češći u p53+ meningeomima. Iminohistokemijsko bojenje na p53 u odsustvu mutacije može ukazati na stabilizaciju divljeg tipa kroz interakciju s proteinom MDM2. Meningeomi sa izražajem p53 imali su značajno viši MIB-1 PI nego p53 negativni tumori, sugerirajući da inaktivacija divljeg tipa p53 s proteinom MDM2 može biti uključena u kontrolu proliferativne aktivnosti u meningeomima. Kao zaključak, autori smatraju da imunohistokemijsko ispitivanje na p53 kao i proliferativna aktivnost

tumora mogu pomoći za predviđanje malignog potencijala recidiva meningeoma (144).

Bez obzira na narav nakupljenog p53 (divlji ili mutirani tip) u jezgri, ostaje činjenica da povećani izražaj p53 dokazan imunohistokemijskom metodom bojenja ukazuje na rizik za nastanak recidiva (142), pogotovo ako je udružen s visokom proliferativnom aktivnošću tumora. U ovom su radu visoki izražaj PCNA (>50%) kao markera proliferacije i izražaj p53 (>20%), također govorili u prilog atipičnih i malignih meningeoma (tab. 18 i 19).

Osim za predviđanje recidiva, izražaj p53 i visoka razina PCNA imaju implikacija i za terapiju, što bi trebalo ispitati u prospektivnim studijama. Naime, Nagashima i sur. (1999) su ispitali da li oštećenja p53 doprinose malignoj progresiji meningeoma. Imunohistokemijskim bojenjem analizirali su 61 bolesnika s meningeomima različitih histoloških stupnjeva. Četiri atipična meningeoma (negativna na p53) nisu recidivirala nakon kirurškog odstranjenja i zračenja, dok su četiri anaplastična meningeoma, prethodno s visokim izražajem p53, recidivirali u kratkom intervalu čak i nakon iradijacije. Ovi rezultati upućuju da je nakupljanje p53 udruženo s visokim proliferativnim potencijalom tumora i karakteristična značajka koja može ukazati na maligno biološko ponašanje meningeoma (143). Colvett i sur. (1997) su ispitali moguću povezanost između izražaja PCNA i kliničkog toka ozračenih bolesnika. Ispitali su arhivski materijal 33 meningeoma imunohistokemijskim bojenjem na PCNA pomoću protutijela PC10 (Daco, California). Multivarijatnom analizom, histološki malignitet (ali ne i atipični) i visok PCNA-indeks bili su sigurni pokazatelji progresije tumora i nakon iradijacije ( $p < 0.05$ ) (145). Autori smatraju da PCNA-indeks može biti koristan dodatak standardnim histološkim kriterijima pri određivanju lokalne kontrole meningeoma i vremena preživljenja bez recidiva bolesti nakon terapije zračenjem.

To, naravno, nije bila tema ovog rada, ali se iz dobivenih rezultata u ovom radu javlja potreba za daljnjom istraživanjem kliničkog tijeka bolesti i, posebice, odgovora na terapiju.



## 6. ZAKLJUČCI

---

1. Ukupno je 102 meningeoma imunohistokemijski analizirano na izražaj PCNA koji je bio procjenjen kao negativni ili slabi ako se obojalo od 0-20% jezgara, srednji za 20-50% obojenih jezgara i visoki ako je obojenost je obuhvaćala >50% tumorskih jezgara. Stupanj izražaja PCNA statistički je bio značajno vezan uz histološke značajke pleomorfizam stanica ( $p=0.002$ ), atipiju jezgara ( $p=0.005$ ) i vidljive makronukleole ( $p=0.004$ ). Izražaj PCNA ne korelira s patološkim mitozama, gubitkom strukture, malim stanicama, nekrozama ni brojnošću krvnih žila. Visoka izraženost PCNA statistički je značajno povezana s brojem mitozama ( $p=0.016$ ). U grupi bez negativnog ili nisko izraženog PCNA srednji broj mitozama je iznosio  $1.0 \pm 2.1$ , za srednji stupanj izraženosti  $2.62 \pm 4.18$ , a za visoki izražaj PCNA  $5.59 \pm 10.6$ . Izražaj PCNA nije povezan s povećanom celularnošću.

Pri analizi kliničkopatoloških skupina meningeoma, niski, srednji i visoki stupanj izražaja PCNA bio je statistički značajno različit u odnosu na tri histološka stupnja ( $p=0.013$ ). Pri analizi grupe nerecidivnih meningeoma i recidiva također se stupanj izražaja PCNA razlikovao među histološkim stupnjevima ( $p=0.023$ ).

Na ukupno 102 analizirana meningeoma stupanj izraženosti PCNA se statistički razlikovao među meningeomima različitog stupnja i rastao je s histološkim stupnjem meningeoma ( $p=0.032$ ).

2. Ukupno je 102 meningeoma imunohistokemijski analizirano na izražaj p53 koji je prema postotku pozitivno obojenih jezgara bio podijeljen u tri stupnja: niskog (0-20% jezgara), srednjeg (20-50% jezgara) i visokog stupnja obojenosti ako je bilo obojeno više od 50% jezgara. Meningeomi različitog stupnja obojenosti na p53 imali su značajnu statističku povezanost s pleomorfizmom stanica ( $p=0.000$ ), atipijom jezgara ( $p=0.004$ ) i gubitkom strukture ( $p=0.001$ ). Statistička povezanost s makronukleolima, patološkim mitozama, malim stanicama, mikronekrozama i brojnošću krvnih žila nije nađena. Također nije nađena statistička povezanost ni s brojem mitozama niti s povećanom celularnošću.

U ovom radu izražaj proteina p53 značajno se statistički razlikuje između grupe recidiva i nerecidivnih meningeoma ( $p=0.003$ ). U grupi meningeoma koji nisu recidivirali p53 nije uopće bio izražen u 13/30 (43%) tumora. Nisko izražen je bio u 30% slučajeva (9/30), a srednji i visoki izražaj se nalazi u 27% (8/30). U grupi

recidiva bez izraženog p53 bilo je 26% tumora (9/35), s niskim izražajem 8% (3/35), a sa srednjim i visokim izražajem p53 bilo je čak 66% meningeoma (23/35). Također je stupanj izražaja p53 pokazivao povezanost sa porastom histološkog stupnja meningeoma u recidivu ( $p=0.001$ ). U grupi recidiva benigne histologije 45% je imalo srednji i visoki izražaj p53 (5/11), a u grupi atipičnih čak 81% (13/16). U nerecidivnim meningeomima benigne histologije 81% tumora su bili bez ili s niskim izražajem p53 (22/27).

Na ukupno 102 analizirana meningeoma stupanj izraženosti p53 se značajno statistički razlikovao za meningeome različitog histološkog stupnja ( $p=0.000$ ).

3. Od ukupno 102 meningeoma analizirana metodom protočne citometrije uz višestruko ponavljanje analize u većini slučajeva i automatsko očitavanje svih rezultata zbog ujednačenosti, diploidnih je histograma bilo 76 (75%), a aneuploidnih 26 (25 %).

Histološki stupnjevi 102 meningeoma analizirana metodom protočne citometrije pokazivali su tek 95% vjerojatnost povezanosti s ploidiom ( $p<0.05$ ). U skupini malignih bilo je 17 diploidnih i 6 aneuploidnih meningeoma. U skupini atipičnih bilo je 18 diploidnih i 12 aneuploidnih tumora. U histološki potpuno benignim meningeomima 8 je bilo aneuploidnih, a 41 diploidnih. Određivanje benignosti ili malignosti meningeoma na osnovu same ploidijske je stoga teško i nepouzđano

Usporedbom grupe recidiva meningeoma s grupom meningeoma koji nisu recidivirali nalazi se statistički značajnu razlika u zastupljenosti diploidnih i aneuploidnih histograma ( $p=0.003$ ) između dvije grupe. Aneuploidija je bila značajno više zastupljena u grupi recidiva 37% (13/35) u odnosu na samo 7% aneuploidnih meningeoma (2/30) među onima koji nisu imali recidiv. Diploidnih meningeoma je među recidivima bilo 63% (22/35), a u skupini meningeoma koji se nisu navratili 93% (28/30).

U grupi histološki benignih meningeoma koji nisu recidivirali samo je jedan aneuploidni histogram (4%). U grupi histološki benignih recidiva 45% meningeoma je imalo aneuploidni histogram (5/11). U recidivima II stupnja 37% meningeoma pokazivalo je aneuploidiju (6/16), a u recidivima III stupnja 25% tumora (2/8). Među grupama postoji statistički značajna razlika ( $p=0.007$ ). Stoga smatramo da je svaka aneuploidija znak lošijeg biološkog ponašanja tj. budućeg recidiva tumora i/ili tumor već spada u histološki II ili III stupanj!

Analizom uzoraka s prve operacije histološki benignih meningeoma koji su kasnije recidivirali (N=11) i benignih meningeoma koji kasnije nisu imali recidiva (N=27) otkrivamo grupu neardiploidnih meningeoma (CV>8). U nju spadaju histološki benigni meningeomi koji su kasnije recidivirali. CV benignih meningeoma koji su razvili recidiv (srednja vrijednost  $9.59 \pm 4.51$ ) bio je statistički značajno veći ( $p=0.003$ ) od CV u grupi meningeoma koji nisu recidivirali (srednja vrijednost  $6.51 \pm 1.73$ ).

4. Frekvencija raspodjela meningeoma I., II. i III. stupnja unutar kliničkih grupa bolesnika statistički se značajno razlikuje ( $p=0.000$ ). Od meningeoma koji će razviti recidiv (uzorci s prve operacije), 55% ja bilo benigne histologije (11/20), 20% je bilo atipičnih (4/20) i 25% malignih (5/20).

Analizom recidiva tumora (uzorci s druge operacije) našlo se 46% atipičnih (16/35), 23% malignih (8/35) i 31% benignih (11/35). U kontrolnoj skupini meningeoma koji nisu recidivirali nije bilo malignih tumora, atipičnih je bilo 10% (3/30), a benignih 90% (27/30). Ispitivane grupe statistički se razlikuju za histološki stupanj meningeoma. Značajno veći broj meningeoma histološkog stupnja II i III nalazi se u grupi recidiva u odnosu na tumore kontrolne skupine koji nisu razvili recidiv u promatranom periodu ( $p=0.000$ ).

Statistička analiza bila je sužena na histološki benigne tumore (u prvoj operaciji) koji su bili makroskopski potpuno odstranjeni, a ipak su nakon izvjesnog vremena recidivirali (N=11). Uspređeni su s grupom također histološki potpuno benignih meningeoma koji nisu recidivirali (N=27) u promatranom periodu (>5god). Od histoloških značajki u grupi benignih meningeoma koji će recidivirati postoji statistički značajno više izražen pleomorfizam stanica, atipija jezgara, gubitak strukture i povećana celularnost (>53).

## 7. SAŽETAK

---

Biopsijski uzorci 102 meningeoma su fiksirani formalinom, uklopljeni u parafin i bojani hemalaun-eozinom (HE). Svi uzorci analizirani su metodom protočne citometrije kojom se odredilo proliferativnu aktivnost i ploidiiju. Usporedno, svi su tumori analizirani s pomoću imunohistokemijskog bojenja na izražaj dvaju biljega: biljega proliferacije PCNA i produkta-tumor supresijskog gena p53. Na HE bojenim preparatima ispitivane su histološke značajke koje uključuju celularnost, broj mitozu, područja nekroze i stupanj atipije stanica. Po standardima Svjetske zdravstvene organizacije iz 1993. god. revidiranoj po Perry-u i sur., meningeome smo klasificirali u tri stupnja: benigne (N=49), atipične (N=30) i anaplastične (N=23).

Analiziran je biopsijski materijal bolesnika s dijagnozom meningeoma na prvoj operaciji (N=66). Od toga u 36 bolesnika nastupio je recidiv bolesti. Ostali bolesnici kod kojih nije došlo do recidiva bolesti (N=30) predstavljali su kontrolnu skupinu. Bolesnici su praćeni su od 5 do 12 god. (srednje vrijeme praćenja  $88.4 \pm 35.7$  mjeseci). Usporedno je analiziran biopsijski materijal bolesnika s postavljenom dijagnozom atipičnog/malignog meningeoma već pri prvom operativnom zahvatu (N=12).

Nije bilo razlike u preživljenju za dob niti između grupe muškaraca i žena.

Histološki stupanj meningeoma povezan je s prognozom. Značajno veći broj meningeoma histološkog stupnja II i III nalazi se u grupi recidiva u odnosu na tumore kontrolne skupine koji nisu razvili recidiv u promatranom periodu ( $p=0.000$ ). U grupi recidiva bilo je 31% meningeoma I. stupnja, 46% meningeoma II. stupnja i 23% meningeoma III. stupnja. U kontrolnoj skupini meningeoma koji nisu recidivirali nije bilo malignih tumora, atipičnih je bilo 10% (3/30), a benignih 90% (27/30).

Od histoloških značajki u grupi benignih meningeoma koji će recidivirati postoji statistički značajno više izražen pleomorfizam stanica, atipija jezgara, gubitak strukture i povećana celularnost ( $>53$ ).

Aneuploidija je bila značajno više zastupljena u grupi recidiva 37% (13/35) u odnosu na samo 7% aneuploidnih meningeoma (2/30) među onima koji nisu imali recidiv.

U grupi histološki benignih meningeoma koji nisu recidivirali samo je jedan aneuploidni histogram (4%). U grupi histološki benignih recidiva 45% meningeoma je imalo aneuploidni histogram (5/11). Stoga smatramo da je svaka aneuploidija znak lošijeg biološkog ponašanja i koristan pokazatelj budućeg recidiva. Postotak stanica u S-fazi nije postigao statistički značaj prilikom korelacije sa ispitivanim značajkama. Visoka izraženost PCNA statistički je značajno povezana s brojem mitozna ( $p=0.016$ ). Na ukupno 102 analizirana meningeoma stupanj izraženosti PCNA se statistički razlikovao među meningeomima različitog stupnja i rastao je s histološkim stupnjem meningeoma ( $p=0.032$ ).

U grupi recidiva čak 66% meningeoma imalo je srednji i visoki izražaj p53 i taj je ujedno statistički značajno viši od izražaja p53 u meningeoma koji nisu recidivirali ( $p=0.003$ ). U grupi recidiva benigne histologije 45% je imalo srednji i visoki izražaj p53 (5/11). U nerekidivnim meningeomima benigne histologije 81% tumora su bili bez ili s niskim izražajem p53 (22/27).

Na ukupno 102 analizirana meningeoma stupanj izraženosti p53 se značajno statistički razlikovao za meningeome različitog histološkog stupnja ( $p=0.000$ ).

## 8. SUMMARY

---

Biopsy specimens from 102 meningiomas were formalin fixed, paraffin-embedded and H&E stained. All samples were analysed by flow cytometry to determine ploidy level and perform cell-cycle analysis. All samples were immunostained for PCNA and p53 protein expression.

On H&E stained slides we analysed histological parameters such as cellularity, number of mitoses, necrosis and cellular atypia. According to the 1993 WHO criteria, revised by Perry et al., 102 meningiomas were classified into grade I=49 benign meningiomas, grade II=30 atypical meningiomas, grade III=23 malignant meningiomas.

The patients were divided in two groups, according to the absence (N=30) or presence (N=36) of recurrence, and the third group of patients with diagnose of atypical/malignant meningioma at first biopsy (N=12). The patients were followed from 5 to 12 years (for an average of  $88.4 \pm 35.7$  months).

We did not find any statistically significant relation when sex, age and prognosis were considered.

Histological grade was significantly associated with prognosis. There were statistically satisfactory higher number of meningiomas with histological grade II and III in the recurrence group ( $p=0.000$ ). In fact in the recurrence group there were respectively 31% of grade I meningiomas, 46% of grade II and 23% of grade III meningiomas. In the control group of nonrecurrent meningiomas there were no grade tumors III, 90% were benign and 10% atypical meningiomas.

Histological features of benign meningiomas which significantly correlated with recurrence were cellular polymorphism, nuclear atypia, sheeting and high cellularity ( $>53$ ).

DNA aneuploidy was significantly higher in recurrent meningiomas 37% (13/35) compared to the nonrecurrent meningioma group 7% (2/30). In the group of histologically benign recurrent meningiomas 45% were aneuploid (5/11) compared to only one aneuploid tumor (4%) in benign nonrecurrent meningioma group. DNA ploidy is useful indicator of different biological behaviour within identical histological subgroup in meningioma. There were no statically significant differences in the S-phase fraction values compared with other parameters.

The percentage of PCNA positively stained cells was correlated with histological features and histological grade. Correlation between number of mitosis and PCNA was statistically significant ( $p=0.016$ ). Correlation between histological grade and PCNA expression was statistically significant and expression was increasing with histological grade ( $p=0.032$ ).

The expression of p53 was significantly higher in recurrent meningioma group ( $p=0.003$ ). Expression of p53  $>20\%$  was found in 66% of recurrent meningiomas. In benign recurrent meningeoma group 45% of meningiomas (5/11) had expression of p53 $>20\%$ , compared to 81% of meningiomas without or with low expression of p53 in benign nonrecurrent meningioma group (22/27).

In the group of 102 meningiomas statistically significant correlation was found between the p53 expression and histological grade ( $p=0.000$ ).

## 9. LITERATURA

---

1. Burger PC, Scheithauer BW, Vogel FS. Surgical pathology of the nervous system and its coverings. Third edition. New York: Churchill Livingstone, 1991;67-142.
2. Collins VP, Nordenskjöld M, Dumanski JP. The molecular genetics of meningiomas. *Brain Pathology* 1990;1:19-24.
3. Zulch KJ. Brain tumors. Their biology and pathology. Third edition. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 1986;357-460.
4. Cushing H, Eisenhardt L. Meningiomas. Their classification, regional behaviour, life history and surgical end results. Springfield, IL: Charles C. Thomas publishers, 1938.
5. Kleihues P, Cavenee WK. Pathology and genetics of tumours of the nervous system. Lyon: International agency for research on cancer (IARC Press), 1997;134-41.
6. Perry A, Stafford SL, Scheithauer BW, Suman VJ, Lohse CM. Meningioma grading. An analysis of histologic parameters. *Am J Surg Pathol* 1997;21:1455-65.
7. Lantos PL, VandenBerg SR, Kleihues P. Tumours of the nervous system. In: Graham DI, Lantos PI, editors. *Greenfield's neuropathology*, 6th ed. London: Arnold, 1996;586-879.
8. Younis GA, Sawaya R, De Monte F, Hess KR, Albrecht S, Bruner JM. Aggressive meningeal tumors: review of a series. *J Neurosurg* 1995;82:17-27.
9. Louis DN, Scheithauer BW, Budka H, von Deimling A, Kepes JJ. Meningiomas. In: Kleihues P, Cavenee WK, editors. *Pathology and genetics of tumours of the nervous system. World health organization classification of tumours*. Lyon: IARC Press, 2000;176-84.
10. Mann I, Yates PC, Ainslie JP. Unusual case of double primary orbital tumour. *Br J Ophthalmol* 1953;37:758-62.
11. Modan B, Baidatz D, Mart H. Radiation-induced head and neck tumours. *Lancet* 1974;1:277-9.
12. Preston-Martin S, Paganini-Hill A, Henderson BE. Case-control study of intracranial meningiomas in women in Los Angeles County, California. *J Natl Cancer Inst* 1980;65:67-73.
13. Preston-Martin S, Yu MC, Henderson BE, Roberts C. Risk factors for meningiomas in men in Los Angeles County. *J Natl Cancer Inst* 1983;70:863-6.
14. Wilson CB. Meningiomas: genetics, malignancy, and the role of radiation in induction and treatment. The Richard C. Schneider lecture. *J Neurosurg* 1994;81:666-75.



15. Harrison MJ, Wolfe DE, Tai-Shing L, Mitnick RJ, Sachdev P. Radiation-induced meningiomas: experience at the Mount Sinai Hospital and review of the literature. *J Neurosurg* 1991;75:564-574.
16. Carroll RS, Zhang MS, Dashner K. Progesterone and glucocorticoid receptor activation in meningiomas. *Neurosurgery* 1995;37:92-7.
17. Hsu DW, Efir JT, Hedley-White T. Progesterone and estrogen receptors in meningiomas: prognostic considerations. *J Neurosurg* 1997;86:113-20.
18. Nagashima G, Aoyagi M, Wakimoto H, Tamaki M, Ohno K, Hirakawa K. Immunohistochemical detection of progesterone receptors and the correlation with Ki-67 labeling indices in paraffin-embedded sections of meningiomas. *Neurosurgery* 1995;37:478-83.
19. Matsuda Y, Kawamoto K, Kiya K, Kurisu K, Sugiyama K, Uozumi T. Antitumor effects of antiprogestones on human meningioma cells in vitro and in vivo. *J Neurosurg* 1994;80:527-34.
20. Lattes R, Bigotti G. Lipoblastic meningioma: "vacuolated meningioma". *Hum Pathol* 1991;22:164-71.
21. Berho M, Suster S. Mucinous meningioma. Report of an unusual variant of meningioma that may mimic metastatic mucin-producing carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1994;18:100-6.
22. Alguacil-Garcia A, Pettigrew NM, Sima AAF. Secretory meningioma. A distinct subtype of meningioma. *Am J Surg Pathol* 1986;10:102-11.
23. Zorludemir S, Scheithauer BW, Hirose T, Van Houten C, Miller G, Meyer FB. Clear cell meningioma. A clinicopathologic study of a potentially aggressive variant of meningioma. *Am J Surg Pathol* 1995;19:493-505.
24. Roncaroli F, Riccioni L, Cerati M, Capella C, Calbucci F, Trevisan C, Eusebi V. Oncocytic meningioma. *Am J Surg Pathol* 1997;21:375-82.
25. Kepes JJ, Moral LA, Wilkinson SB, Abdullah A, Llena JF. Rhabdoid transformation of tumor cells in meningiomas: a histologic indication of increased proliferative activity. Report of four cases. *Am J Surg Pathol* 1998;22:231-8.
26. Kawasaki K, Takahashi H, Kaneko H, Sato H, Ikuta F. Novel eosinophilic intracytoplasmic inclusions in a meningioma. *Cancer* 1993;72:2675-9.
27. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. Histological typing of tumors of the central nervous system. WHO International histological classification of tumours. Berlin: Springer Verlag, 1993;33-7.
28. Perry A, Scheithauer BW, Nascimento AG. The immunophenotypic spectrum of meningeal hemangiopericytoma: a comparison with fibrous meningioma and solitary fibrous tumor of meninges. *Am J Surg Pathol* 1997;21:1354-60.
29. Winek RR, Scheithauer BW, Wick MR. Meningioma, meningeal hemangiopericytoma (angioblastic meningioma), peripheral hemangiopericytoma, and acoustic schwannoma. A comparative immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol* 1989;13:251-61.

30. Tsunoda S, Takeshima T, Sakaki T, Morimoto T, Hoshida T, Watabe Y, Goda K. Secretory meningioma with elevated serum carcinoembryonic antigen level. *Surg Neurol* 1992;37:415-8.
31. Partington MD, Scheithauer BW, Piepgras DG. Carcinoembryonic antigen production associated with an osteolytic meningioma. Case report. *J Neurosurg* 1995;82:489-92.
32. Kepes JJ, Chen WY, Connors MH, Vogel FS. "Chordoid" meningeal tumors in young individuals with peritumoral lymphoplasmacellular infiltrates causing systemic manifestations of the Castelman syndrome. *Cancer* 1988;62:391-406.
33. Gi H, Nagao S, Yochizumi H, Nishioka T, Uno J, Shingu T, Fujita Y. Meningioma with hypergammaglobulinemia. *J Neurosurg* 1990;73:628-9.
34. Jaaskelainen J, Haltia M, Servo A. Atypical and anaplastic meningiomas: radiology, surgery, radiotherapy, and outcome. *Surg Neurol* 1986;25:233-42.
35. Burger PC, Scheithauer BW. Tumors of the central nervous system. Washington: Armed forces institute of pathology, 1994;259-86.
36. Mahmood A, Caccamo DV, Tomecek FJ. Atypical and malignant meningiomas: a clinicopathological review. *Neurosurgery* 1993;33:955-63.
37. Thomas H, Dolman CL, Berry K. Malignant meningioma: clinical and pathological features. *J Neurosurg* 1981;55:929-34.
38. Deen HG, Scheithauer BW, Ebersold MJ. Clinical and pathological study of meningiomas of the first two decades of life. *J Neurosurg* 1982;56:317-22.
39. Bouvier C, Zattara-Canoni H, Daniel L, Gentet JC, Lena G, Figarella-Branger D. Cerebellar papillary meningioma in a 3-year-old boy. The usefulness of electron microscopy for diagnosis. *Am J Surg Pathol* 1999;23:844-8.
40. Meis JM, Ordonez NG, Bruner JM. Meningiomas. An immunohistochemical study of 50 cases. *Arch Pathol Lab Med* 1986;110:934-7.
41. Theaker JM, Gillett MB, Fleming KA, Gatter KC. Epithelial membrane antigen expression by meningiomas, and the perineurium of peripheral nerve. Letter to the Editor. *Arch Pathol Lab Med* 1987;111:409.
42. Schnitt SJ, Vogel H. Meningiomas. Diagnostic value of immunoperoxidase staining for epithelial membrane antigen. *Am J Surg Pathol* 1986;10:640-9.
43. Russel DS, Rubinstein LJ. Pathology of tumours of the nervous system. Fifth Edition. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989;449-532.
44. Simpson D. The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1957;20:22-39.
45. Beks JWF, Windt HL. The recurrence of supratentorial meningiomas after surgery. *Acta Neurochir (Wien)* 1988;95:3-5.
46. Jaaskelainen J. Seemingly complete removal of histologically benign intracranial meningioma: late recurrence rate and factors predicting recurrence in 657 patients. A multivariate analysis. *Surg Neurol* 1986;26:461-9.
47. Borovich B, Doron Y. Recurrence of intracranial meningiomas: the role played by regional multicentricity. *J Neurosurg* 1986;64:58-63.

48. Carella RJ, Ransohoff J, Newall J. Role of radiation therapy in the management of meningioma. *Neurosurgery* 1982;10:332-9.
49. Ludwin SK, Rubinstein LJ, Russell DS. Papillary meningioma: a malignant variant of meningioma. *Cancer* 1975;36:1363-73.
50. Takeuchi H, Kubota T, Kabuto M, Kitai R, Nozaki J, Yamashita J. Prediction of recurrence in histologically benign meningiomas: proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 immunohistochemical study. *Surg Neurol* 1997;48:501-6.
51. Hsu DW, Pardo FS, Efrid J, Linggood RM, Hedley-Whyte T. Prognostic significance of proliferative indices in meningiomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994;53:247-55.
52. Lovett EJ, Shnitzer B, Keren DF, Flint A, Hudson JL, McClatchey KD. Application of flow cytometry to diagnostic pathology. *Lab Invest* 1984;2:115-40.
53. Shapiro MM. *Practical flow cytometry: Parameters and probes*. 2nd. edition. New York: Alan Liss, 1988;133-64.
54. Howard A, Pelc SR. Synthesis of desoxyribose nucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity* 1963;6:261-73.
55. Robins JP. *Handbook of flow cytometry methods: Cell cycle histogram analysis*. 2nd. edition. New York: Alan Liss, 1993;93-4.
56. Landay AL, Ault Ka, Bauer KD, Rabinovitch PS. *Clinical flow cytometry: Quality control issues in DNA content flow cytometry*. New York: New York Academy of Sciences, 1993;59-73.
57. Žalud I, Marušić M. Protočni razvrstač stanica. *Liječ Vjesn* 1988;110:384-90.
58. Vindelov LL, Christensen IJ, Niessen NI. Standardization of high resolution flow cytometric DNA analysis by the simultaneous use of chicken and trout red blood cells as internal reference standards. *Cytometry* 1983;3:328-31.
59. Wersto RP, Liblit RL, Koss LG. Flow cytometric DNA analysis of human solid tumors: a review of the interpretation of DNA histograms. *Hum Pathol* 1991;22:1085-98.
60. Stavljenić Rukavina A, Batinić D, Bilić-Zulle L, urednici. *Protočna citometrija u kliničkolaboratorijskoj praksi*. Priručnik. Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1997;125-31.
61. Bradley J, Johnson D, Rubenstein D. *Molecular medicine*. 2nd. edition. Oxford: Blackwell Science, 2001;122-7.
62. Varmus H, Weinberg RA. *Genes and the biology of cancer*. New York: Scientific american library, 1993;101-53.
63. Cotran RS. Neoplasia. In: Robbins SL, editor. *Pathologic basis of disease*. 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1999;276-98.
64. Gartel AL, Serfas MS, Tyner AL. p21-negative regulator of the cell cycle. *PSEBM*. p21 and cell cycle 1996;213:138-47.
65. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Review. *Cell* 1997;88:323-31.

66. Shaw PH. The role of p53 in cell cycle regulation. *Path Res Pract* 1996;192:669-75.
67. Wellenreuther R, Kraus JA, Lenartz D, Menon AG, Schramm J, Louis DN, Ramesh V, Gusella JF, Wiestler OD, von Deimling A. Analysis of the neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. Short communication. *Am J Pathol* 1995;146:827-32
68. Lee JH, Sundaram V, Stein J, Kinney SE, Stacey DW, Golubic M. Reduced expression of schwannomin/merlin in human sporadic meningiomas. *Neurosurgery* 1997;40:578-87.
69. Rempel SA, Schwechheimer K, Davis RL, Cavenee WK, Rosenblum ML. Loss of heterozygosity for loci on chromosome 10 is associated with morphologically malignant meningioma progression. *Cancer Res* 1993;53:2386-92.
70. Simon M, von Deimling A, Larson JJ, Wellenreuther, Kaskel P, Waha A, Warnick RE, Tew JM, Menon AG. Allelic losses on chromosomes 14, 10, and 1 in atypical and malignant meningiomas: a genetic model of meningioma progression. *Cancer Res* 1995;55:4696-701.
71. Lindblom A, Rutledge M, Collins VP, Nordenskjold M, Dumanski JP. Chromosomal deletions in anaplastic meningiomas suggest multiple regions outside chromosome 22 as important in tumor progression. *Int J Cancer* 1994;56:354-7.
72. Wang J, Zhang Z, Hartman M, Smits A, Westermarck B, Muhr C, Nister M. Detection of TP53 gene mutation in human meningiomas: a study using immunohistochemistry, polymerase chain reaction/single-strand conformation polymorphism and DNA sequencing techniques on paraffin-embedded samples. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 1995;64:223-8.
73. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, van Tuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989;244:217-21.
74. Miller CW, Aslo A, Tsay C, Slamon D, Ishizaki K, Toguchida J, Yamamuro T, Lampkin B, Koeffler HP. Frequency and structure of p53 rearrangements in human osteosarcoma. *Cancer Res* 1990;50:7950-4.
75. Sidransky D, von Eschenbach A, Tsai YC, Jones PJ, Summerhayes J, Marshall F, Paul M, Green P, Hamilton SR, Frost P, Vogelstein B. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 1991;252:706-8.
76. Karamitopoulou E, Perentes E, Diamantis I. p53 protein expression in central nervous system tumors: an immunohistochemical study with CM1 polyvalent and DO-7 monoclonal antibodies. *Acta Neuropathol* 1993;85:611-6.
77. Schroder R, Bien K, Kott R, Meyers I, Vossing R. The relationship between Ki-67 labeling and mitotic index in gliomas and meningiomas: demonstration of the variability of the intermitotic cycle time. *Acta Neuropathol* 1991;82:389-94.

78. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. Review article. *Nature* 1991;351:453-6.
79. Hollstein MC, Metcalf RA, Welsh JA, Montesano R, Harris CC. Frequent mutation of the p53 gene in human esophageal cancer (tumor suppressor gene/DNA sequence analysis/nitrosamines). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990;87:9958-61.
80. Tamura G, Kihana T, Nomura K, Terada M, Sugimura T, Hirohashi S. Detection of frequent p53 gene mutations in primary gastric cancer by cell sorting and polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism analysis. *Cancer Res* 1991;51:3056-8.
81. Goldblum JR, Bartos RE, Carr KA, Frank TS. Hepatitis B and alterations of p53 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1993;17:1244-51.
82. Takahashi T, Nau MM, Chiba I, Birrer MJ, Rosenberg RK, Vinocour M, Levitt M, Pass H, Gazdar AF, Minna JD. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Reports. Science* 1989;246:491-5.
83. Ahuja H, Ber-Eli M, Advani SH, Benchimol S, Cline MJ. Alterations in the p53 gene and the clonal evolution of the blast crisis of chronic myelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:6783-7.
84. Marks JR, Davidoff AM, Kerns BJ, Humphrey PA, Pence JC, Dodge RK, Clarke-Pearson DL, Iglehart JD, Bast RC, Berchuck A. Overexpression and mutation of p53 in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 1991;51:2979-84.
85. Isaacs WB, Carter BS, Ewing CM. Wild-type p53 suppresses growth of human prostate cancer cells containing mutant p53 alleles. *Advances in brief. Cancer Res* 1991;51:4716-20.
86. Bravo R, Frank R, Blundel PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- $\delta$ . *Letters to Nature. Nature* 1987;326:515-7.
87. Suzuka I, Daidoji H, Matsuoka M, Kadowaki K, Takasaki Y, Nakane PK, Moriuchi T. Gene for proliferating-cell nuclear antigen (DNA polymerase delta auxiliary protein) is present in both mammalian and higher plant genomes. *Proc Nat Acad Sci* 1989;86:3189-93.
88. Travali S, Ku DH, Rizzo MG, Ottavio L, Baserga R, Calabretta B. Structure of the human gene for the proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem* 1989;264:7466-72.
89. Ku DH, Travali S, Calabretta B, Huebner K, Baserga R. Human gene for proliferating cell nuclear antigen has pseudogenes and localizes to chromosome 20. *Somat Cell Molec Genet* 1989;15:297-307.
90. Rao VVNG, Schnittger S, Hansmann I. Chromosomal localization of the human proliferating cell nuclear antigen (PCNA) gene to or close to 20p12 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1991;56:169-70.

91. Burger PC, Shibata T, Kleihues P. The use of the monoclonal antibody Ki-67 in the identification of proliferating cells: application to surgical neuropathology. *Am J Surg Pathol* 1986;10:611-7.
92. Ohta M, Iwaki T, Kitamoto T, Takeshita I, Tateishi J, Fukui M. MIB1 staining index and scoring of histologic features in meningioma. *Cancer* 1994;74:3176-89.
93. Baak JPA. Mitosis counting in tumors. Editorial. *Hum Pathol* 1990;23:608-11.
94. McLean CA, Jolley D, Cukier E, Giles G, Gonzales MF. Atypical and malignant meningiomas: importance of micronecrosis as a prognostic indicator. *Histopathology* 1993;23:349-53.
95. Hsu S-M, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29:577-80.
96. Shi S, Key ME, Karla KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. Rapid communication. *J Histochem Cytochem* 1991;39:741-8.
97. Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. Technical notes. *J Histochem Cytochem* 1983;31:1333-5.
98. Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen NI. A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 1983;3:323-7.
99. Bilić-Zulle L, Užarević B, Krašević M, Petrovečki M, Batinić D, Marušić M. Analiza sadržaja DNA i proliferacijske aktivnosti tumorskih stanica protočnom citometrijom i računalskim programom ModFIT™ u bolesnika sa seroznim karcinomom jajnika. *Biochemia Medica* 1996;4:255-64.
100. Chan RC, Thompson GB. Morbidity, mortality, and quality of life following surgery for intracranial meningiomas. A retrospective study in 257 cases. *J Neurosurg* 1984;60:52-60.
101. Crompton MR, Gautier-Smith PC. The prediction of recurrence in meningiomas. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 1970;33:80-7.
102. de la Monte SM, Flickinger J, Linggood RM. Histopathologic features predicting recurrence of meningiomas following subtotal resection. *Am J Surg Pathol* 1986;10:836-43.
103. Cruz-Sanchez FF, Miquel R, Rossi ML, Figols J, Palacin A, Cardesa A. Clinico-pathological correlation in meningiomas: a DNA and immunohistochemical study. *Histol Histopathol* 1993;1:1-8.
104. Maier H, Ofner D, Hittmair A, Kitz K, Budka H. Classic, atypical, and anaplastic meningioma: three histopathological subtypes of clinical relevance. *J Neurosurg* 1992;77:616-23.

105. Kepes JJ. Light-microscopic features of meningiomas. In: Meningiomas: biology, pathology, and differential diagnosis. New York: Masson, 1982;116-23.
106. Assietti R, Butti G, Magrassi L, Danova M, Riccardi A, Gaetani P. Cell kinetic characteristics of human brain tumors. *Oncology* 1990;47:344-51.
107. Korkolopoulou P, Christodoulou P, Papanikolaou A, Thomas-Tsagli E. Proliferating cell nuclear antigen and nucleolar organizer regions in CNS tumors: correlation with histological type and tumor grade. *Am J Surg Pathol* 1993;17:912-9.
108. Coltrera MD, Gown AM. PCNA/cyclin expression and BrdU uptake define different subpopulations in different cell lines. *J Histochem Cytochem* 1991;39:23-30.
109. Karamitopoulou E, Perentes E, Diamantis I, Maraziotis T. Ki-67 immunoreactivity in human central nervous system tumors: a study with MIB 1 monoclonal antibody on archival material. *Acta Neuropathol* 1994;87:47-54.
110. Siegers HP, Zuber P, Hamon MF, Van Melle GD, de Tribolet N. The implications of the heterogenous distribution of Ki-67 labelled cells in meningiomas. *Br J Neurosurg* 1989;3:101-8.
111. Wolf HK, Dittrich KL. Detection of proliferating cell nuclear antigen in diagnostic histopathology. *J Histochem Cytochem* 1992;40:1269-73.
112. Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC-W, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Complejohn R, Dover R, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 1990;162:285-94.
113. Benjamin DR, Gown AM. Abberant cytoplasmic expression of proliferating cell nuclear antigen in Hodgkin's disease. *Am J Surg Pathol* 1991;15:764-8.
114. Garcia RL, Coltrera MD, Gown AM. Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. Comparison with flow cytometric analysis. Rapid communication. *Am J Pathol* 1989;134:733-9.
115. Allegranza A, Girlando S, Arrigoni GL, Veronese S, Mauri FA, Gambacorta M, Pollo B, Palma PD, Barbareschi M. Proliferating cell nuclear antigen expression in central nervous system neoplasms. *Virchow Archiv A Pathol Anat* 1991;419:417-23.
116. Louis DN, Edgerton S, Thor AD, Hedley-Whyte ET. Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 immunohistochemistry in brain tumors: a comparative study. *Acta neuropathol* 1991;81:675-9.
117. Khoshyomn S, Maier H, Morimura T, Kitz K, Budka H. Immunostaining for proliferating cell nuclear antigen: its role in determination of proliferation in routinely processed human brain tumor specimens. *Acta Neuropathol* 1993;86:582-9.

118. Cobb MA, Husain M, Andersen BJ, Al-Mefty O. Significance of proliferating cell nuclear antigen in predicting recurrence of intracranial meningioma. *J Neurosurg* 1996;84:85-90.
119. Nakabayashi H, Sakaguchi M, Katsuyama J, Hakuba A. Proliferative potential of meningiomas evaluated by proliferating cell nuclear antigen expression. *J Neurooncol* 1995;24:209-17.
120. Iuchi T, Saeki N, Osato K, Yamaura A. Topographical analysis of proliferating cells in meningiomas. Regional heterogeneity of the ability of tumors to proliferate. *Neurol Res* 1999;21:721-6.
121. Hsu DW, Pardo FS, Efird JT, Linggood RM, Hedley-Whyte ET. Prognostic significance of proliferative indices in meningiomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994;53:247-55.
122. Hakin-Smith V, Battersby RD, Maltby EL, Timperley WR, Royds JA. Elevated p53 expression in benign meningiomas protects against recurrence and may be indicative of senescence. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2001;27:40-9.
123. Hoshino T, Nagashima T, Murovic J, Wilson CB, Davis RL. Proliferative potential of human meningiomas of the brain. A cell kinetics study with bromodeoxyuridine. *Cancer* 1986;58:1466-72.
124. Akachi K, Matsumoto M, Yasue M, Nakamura N, Kamada M, Ohno T. DNA analysis of meningiomas using paraffin-embedded surgical specimens in connection with clinical recurrence. *No Shinkei Geka - Neurol Surg* 1991;19:1129-34.
125. Salmon I, Kruczynski A, Camby I, Levivier M, Pasteels J-L, Brotchi J, Kiss R. DNA histogram typing in a series of 707 tumors of the central and peripheral nervous system. *Am J Surg Pathol* 1993;17:1020-8.
126. Forempoher G. Prognostički parametri ne-Hodgkinovih limfoma u korelaciji s protočnom citometrijom. (Magistarski rad). Zagreb: Medicinski fakultet, 1994.
127. Maillo A, Diaz P, Blanco A, Lopez A, Ciudad J, Hernandez J, Morales F, Perez-Simon JA, Orfao A. Proportion of S-phase tumor cells measured by flow cytometry is an independent prognostic factor in meningioma tumors. *Cytometry* 1999;38:118-23.
128. Hoshino T, Nomura K, Wilson CB, Knebel KD, Gray JW. The distribution of nuclear DNA from human brain-tumor cells. *J Neurosurg* 1978;49:13-21.
129. Ironside JW, Battersby RDE, Lawry JL, Loomes RS, Day CA, Timperley WR. DNA in meningioma tissues and explant cell cultures. A flow cytometric study with clinicopathological correlates. *J Neurosurg* 1987;66:588-94.
130. Finn WG, Goolsby CL, Rao MS. DNA flow cytometric analysis of hemangiopericytoma. *A J Clinical Path* 1994;101:181-5.
131. May PL, Broome JC, Lawry J, Buxton RA, Battersby RD. The prediction of recurrence in meningiomas. A flow cytometric study of paraffin-embedded archival material. *J Neurosurg* 1989;71:347-51.



132. Appley AJ, Fitzgibbons PL, Chandrasoma PT, Hinton DR, Apuzzo MLJ. Multiparameter flow cytometric analysis of neoplasms of the central nervous system: correlation of nuclear antigen p105 and DNA content with clinical behavior. *Neurosurgery* 1990;27:83-96.
133. Myong NH, Chi JG. Correlation of histopathologic classification with proliferative activity and DNA ploidy in 120 intracranial meningiomas, with special reference to atypical meningioma. *J Korean Med Sci* 1997;12:221-7.
134. Maillo A, Diaz P, Blanco A, Lopez A, Ciudad J, Hernandez J, Morales F, Perez-Simon JA, Orfao A. Proportion of S-phase tumor cells measured by flow cytometry is an independent prognostic factor in meningioma tumors. *Cytometry* 1999;38:118-23.
135. Ahmed R, Soomro IN, Aziz SA, Hasan SH. p53 and PCNA expression in benign, atypical and malignant meningiomas. *JPMA-J Pakistan Med Assoc* 1999;49:241-3.
136. Miyagami M, Kanou T, Nakamura S. P53 protein expression and proliferative potential in non-recurrent and recurrent meningiomas. *No to Shinkei-Brain & Nerve* 1996;48:719-25.
137. Lanzafame S, Torrisi A, Barbagallo G, Emmanuele C, Alberio N, Albanese V. Correlation between histological grade, MIB-1, p53, and recurrence in 69 completely resected primary intracranial meningiomas with a 6 year mean follow-up. *Path Res Pract* 2000;196:483-8.
138. Scarpelli M, Mazzucchelli R, Colanzi P. Meningioma: the impact of new techniques for the diagnosis and prognosis. *Adv Clin Path* 1997;1:149-53.
139. Prayson RA. Malignant meningioma: a clinicopathologic study of 23 patients including MIB1 and p53 immunohistochemistry. *A J Clin Path* 1996;105:719-26.
140. Amatya VJ, Takeshima Y, Sugiyama K, Kurisu K, Nishisaka T, Fukuhara T, Inai K. Immunohistochemical study of Ki-67 (MIB-1), p53 protein, p21WAF1, and p27KIP1 expression in benign, atypical, and anaplastic meningiomas. *Hum Path* 2001;32:970-5.
141. Cho H, Ha SY, Park SH, Park K, Chae YS. Role of p53 gene mutation in tumor aggressiveness of intracranial meningiomas. *J Korean Med Sci* 1999;14:199-205.
142. Matsuno A, Nagashima T, Matsuura R, Tanaka H, Hirakawa M, Murakami M, Tamura A, Kirino T. Correlation between MIB-1 staining index and the immunoreactivity of p53 protein in recurrent and non-recurrent meningiomas. *Am J Clinical Path* 1996;106:776-81.
143. Nagashima G, Aoyagi M, Yamamoto M, Yamamoto S, Wakimoto H, Ohno K, Yamamoto K, Hirakawa K. P53 overexpression and proliferative potential in malignant meningiomas. *Acta Neurochir* 1999;141:53-61; discussion 60-1.
144. Ohkoudo M, Sawa H, Hara M, Saruta K, Aiso T, Ohki R, Yamamoto H, Maemura E, Shiina Y, Fujii M, Saito I. Expression of p53, MDM2 protein and Ki-67 antigen in recurrent meningiomas. *J Neurooncol* 1998;38:41-9.

145. Colvett KT, Hsu DW, Su M, Lingood RM, Pardo FS. High PCNA index in meningiomas resistant to radiation therapy. *I J Radiat Oncol Biol Physics* 1997;38:463-8.

## 10. POPIS SLIKA I TABLICA

---

### 10.1. POPIS SLIKA

Slika 1. Anaplastični meningeom. Unutar jezgri uočavaju su nukleoli. U sredini slike vidi se jedna patološka mitozu. H&Ex400 .....	37
Slika 2. Žarište mikronekroze u malignom meningeomu. Mikronekrotično žarište sastoji se od centralno nekrotičnog debrisa i okolnih palisadnih stanica u karioreksi. H&Ex200 .....	38
Slika 3. Anaplastični meningeom. Gubitak arhitekture vidi se na lijevoj polovini slike u odnosu na desnu gdje je prisutno vrtložno nakupljanje stanica. H&Ex400 .....	39
Slika 4. Meningeom u kojem su krvne žile hijalino zadebljane stjenke. H&Ex200 .....	40
Slika 5. Papilarni meningeom s jasno uočljivom papilarnom tvorbom u centru slike. H&Ex400 .....	41
Slika 6. Ovalni produljci malignog meningeoma koji infiltriraju bijelu tvar uz reaktivne promjene astrocита. Između nema potisnutog komprimiranog reaktivnog veziva. H&E x 200 .....	42
Slika 7. Papilarni meningeom. Izražaj p53 vidljiv kao smeđa obojenost jezgri. LSAB metoda (povećanje 400x) .....	45
Slika 8. Atipični meningeom. Izražaj PCNA u obliku smeđe obojenih jezgri. LSAB metoda (povećanje 400x) .....	46
Slika 9. Jednparametrijski histogram DNA diploidnog meningeoma s pripadajućim statističkim podacima .....	48
Slika 10. Jednparametrijski histogram DNA aneuploidnog meningeoma s pripadajućim statističkim podacima .....	48
Slika 11. Krivulja ukupnog preživljenja prema izraženosti p53 u meningeomima .....	62
Slika 12. Krivulja ukupnog preživljenja prema izraženosti PCNA u meningeomima .....	62
Slika 13. Krivulja ukupnog preživljenja prema broju mitozu u meningeomima .....	63
Slika 14. Krivulja ukupnog preživljenja prema histološkom stupnju meningeoma .....	63

### 10.2. POPIS TABLICA

Tablica 1. Podjela meningeoma prema WHO .....	6
Tablica 2. Raspodjela bolesnika s meningeomom prema dobi .....	53
Tablica 3. Spolna struktura bolesnika s meningeomom .....	53
Tablica 4. Usporedba histoloških pokazatelja meningeoma prema kliničkim grupama bolesnika .....	54
Tablica 5. Razdioba rezultata imunohistokemijskog bojenja meningeoma na p53 i PCNA i ploidijske prema kliničkim grupama bolesnika .....	54
Tablica 6. Razdioba histoloških i proliferacijskih značajki meningeoma prema kliničkim grupama bolesnika .....	55

Tablica 7. Usporedba celularnosti ("dijametar") i broja mitozu u kliničkim grupama meningeoma .....	55
Tablica 8. Razdioba nerecidivnih, recidivnih* i malignih/atipičnih meningeoma u histološke stupnjeve prema WHO (I-III) .....	55
Tablica 9. Usporedba histoloških značajki, ploidijske i broja mitozu između kliničkih grupa bolesnika s meningeomom .....	57
Tablica 10. Razdioba rezultata imunohistokemijskog bojenja meningeoma na p53 u bolesnika s recidivirajućim* i nerecidivirajućim* meningeomom .....	57
Tablica 11. Razdioba rezultata imunohistokemijskog bojenja meningeoma na PCNA u bolesnika s recidivirajućim* i nerecidivirajućim* meningeomom .....	58
Tablica 12. Razdioba histoloških i proliferacijskih značajki recidivirajućih* i nerecidivirajućih* meningeoma .....	58
Tablica 13. Razdioba i usporedba histoloških značajki i ploidijske recidivirajućih* (N=35) i nerecidivirajućih meningeoma (N=30) .....	60
Tablica 14. Razdioba i usporedba izraženosti imunohistokemijskog bojenja na p53 i PCNA (u % pozitivno obojenih jezgara) između grupe recidivirajućih* (N=35) i nerecidivirajućih meningeoma (N=30) .....	60
Tablica 15. Razdioba i usporedba ispitivanih parametrijskih vrijednosti za histološke značajke dijametar i mitoze te za parametre staničnog ciklusa između grupe recidivirajućih* i nerecidivirajućih meningeoma .....	61
Tablica 16. Razdioba i usporedba histološkog stupnja između grupe recidivirajućih* i nerecidivirajućih meningeoma .....	61
Tablica 17. Long-rang analiza brzine nastanka recidiva u odnosu na histološki stupanj meningeoma, izražaj p53 i PCNA te broj mitozu .....	61
Tablica 18. Izražaj p53 u tri histološka stupnja recidivirajućih* (N=35) i nerecidivirajućih meningeoma (N=30) .....	64
Tablica 19. Izražaj PCNA u tri histološka stupnja recidivirajućih* (N=35) i nerecidivirajućih meningeoma (N=30) .....	65
Tablica 20. Razdioba ploidijske (diploidni i aneuploidni tumori) u tri histološka stupnja u recidivirajućih* (N=35) i nerecidivirajućih meningeoma (N=30) .....	65
Tablica 21. Kruskal Wallisova analiza varijance za dijametar i broj mitozu u tri histološka stupnja recidivirajućih* (N=35) i nerecidivirajućih meningeoma (N=30) .....	65
Tablica 22. Značajnost statističke razlike između histoloških stupnjeva meningeoma u grupi recidivirajućih* (N=35) i nerecidivirajućih meningeoma (N=30) .....	65
Tablica 23. Razdioba p53, PCNA, ploidijske i S-faze u meningeomima različitog kliničkog toka i različitog histološkog stupnja .....	67
Tablica 24. Kruskal-Wallisova analiza varijance za dijametar i broj mitozu u meningeomima različitog kliničkog toka i različitog histološkog stupnja .....	67
Tablica 25. Značajnost statističke razlike za dijametar i broj mitozu u meningeomima različitog kliničkog toka i različitog histološkog stupnja .....	68
Tablica 26. Razdioba 49 benignih meningeoma u histološke podtipove prema WHO .....	68
Tablica 27. Razdioba svih analiziranih meningeoma prema WHO klasifikaciji .....	69

Tablica 28. Razdioba analiziranih meningeoma u tri histološka stupnja .....	69
Tablica 29. Razdioba meningeoma u tri histološka stupnja (benigni, atipični, maligni) u odnosu na histološke značajke i ploidiiju .....	70
Tablica 30. Razdioba meningeoma u tri histološka stupnja (benigni, atipični, maligni) u odnosu na stupanj izražaja p53 i PCNA .....	71
Tablica 31. Dijametar i broj mitozu u tri histološka stupnja meningeoma prema WHO .....	71
Tablica 32. Razlike između meningeoma podijeljenih po histološkom stupnju za dijametar i broj mitozu .....	71
Tablica 33. Odnos broja mitozu i histoloških i kliničkih značajki meningeoma .....	72
Tablica 34. Dijametar ("celularnost") i CV meningeoma u odnosu na broj mitozu ( $\leq 3$ mitoze i $\geq 4/10\text{HPF}$ ) .....	73
Tablica 35. Usporedba izražaja PCNA s histološkim značajkama, histološkim stupnjem i kliničkopatološkim grupama meningeoma .....	74
Tablica 36. Usporedba izražaja PCNA s brojem mitozu i G0/G1-fazom .....	74
Tablica 37. Značajnost statističke razlike za broj mitozu i G0/G1-fazu ciklusa rasta među grupama meningeoma po stupnju izražaja PCNA .....	74
Tablica 38. Usporedba izražaja p53 s histološkim značajkama, histološkim stupnjem i kliničkopatološkim grupama meningeoma .....	75
Tablica 39. Spearmanovim testom utvrđena korelacija za izražaj PCNA, izražaj p53, histološki stupanj meningeoma i kliničkopatološke skupine .....	76

## 11. ŽIVOTOPIS

---

Rođena sam 19.5.1954. god. u Splitu. Osnovnu školu sam pohađala u Komiži na otoku Visu. Prirodni smjer Gimnazije "Ćiro Gamulin" završila u Splitu 1972. god. Medicinski fakultet u Rijeci upisala 1974. godine i završila 30.1.1980. godine.

Obavezni staž obavila u MC Šibenik gdje sam primljena u stalni radni odnos u službi Medicine rada do odlaska na specijalizaciju.

Specijalizaciju iz patološke anatomije započela sam 15.7.1984. u KBC Firule u Splitu. Specijalistički ispit položila sam 15.9.1989. u Zagrebu. Otada radim kao liječnik specijalista patolog, u KB Split.

Tijekom specijalizacije završila sam poslijediplomski studij iz Okologije na Medicinskom fakultetu u Zagrebu, a 1994. god. obranila magistarski rad pod naslovom "Prognostički parametri ne-Hodgkinovih limfoma u korelaciji sa protočnom citometrijom".

Na Medicinskom fakultetu u Zagrebu 1996. godine izabrana u suradničko zvanje naslovnog asistenta za predmet Neuropatologija, za potrebe nastave Područnog studija medicine u Splitu.