

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**

**Sveučilište u Dubrovniku**

**Institut Ruđer Bošković**

**Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij**

**Molekularne bioznanosti**

**Ines Trninić**

**Stanična distribucija proteinskih konjugata 4-hidroksi-2-nonenala u  
ljudskim meningealnim tumorima**

**Doktorska disertacija**

**Osijek, 2018.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Doktorska disertacija

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti

**Znanstveno područje:** Interdisciplinarno područje znanosti

**Znanstvena polja:** Biologija i Temeljne medicinske znanosti

### Stanična distribucija proteinskih konjugata 4-hidroksi-2-nonenala u ljudskim meningealnim tumorima

Ines Trninić

**Disertacija je izrađena u:** Klinički zavod za patologiju i citologiju, KBC Zagreb

**Mentor:** prof. dr. sc. Kamelija Žarković

#### **Kratki sažetak doktorske disertacije:**

Oksidacijskim stresom inducirana lipidna peroksidacija povezana je s fiziološkim procesima kao i s različitim teškim bolestima čovjeka, uključujući i rak. Brojna istraživanja pokazuju da su reaktivni lipidni medijatori koji se stvaraju tijekom oksidacijskog stresa, poput 4-hidroksi-2-nonenala (HNE), biomarkeri oksidacijskog stresa koji igraju važnu ulogu u posredovanju brojnih signalnih putova. Meningeomi su učestale neoplazme mozga i kralježnične moždine. Postoje tri gradusa prema klasifikaciji SZO, većina meningeoma klasificira se kao gradus I, te gradus II (atipični) i gradus III (anaplastični). Ovo je retrospektivno istraživanje planirano kao analiza ekspresije HNE-a u ljudskim meningeomima različitih gradusa. Cilj je istraživanja ispitati imunohistokemijsku pojavnost HNE-a u meningeomima različitih gradusa, te utvrditi distribuciju ekspresije u tim gradusima prema sastavnicama tumorskog tkiva i prema drugim patološko-kliničkim čimbenicima tumorskog rasta. Proširenje znanja o nazočnosti HNE-a u humanim meningeomima različitih gradusa može dovesti do bolje prevencije, dijagnoze i liječenja ovih tumora.

**Broj stranica:** 103

**Broj slika:** 17

**Broj tablica:** 18

**Broj literaturnih navoda:** 154

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** HNE, lipidna peroksidacija, meningeomi, oksidacijski stres

**Datum obrane:** 19.11.2018.

#### **Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. **prof. dr. sc. Jerko Barbić**, redoviti profesor Medicinskog fakulteta u Osijeku; predsjednik
2. **prof. dr. sc. Neven Žarković**, redoviti profesor/znanstveni savjetnik – trajno zvanje; član
3. **prof. dr. sc. Nela Pivac**, redovita profesorica Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku; član
4. **doc.dr.sc. Ana Čipak Gašparović**, docentica Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku; zamjena člana

**Disertacija je pohranjena u** Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek  
University of Dubrovnik  
Ruđer Bošković Institute  
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of  
Molecular biosciences  
Scientific Area: Interdisciplinary Area of Science  
Scientific Fields: Biology and Basic Medical Sciences

PhD thesis

### Cellular distribution of 4-hydroxy-2-nonenal protein adducts in human meningioma

Ines Trninić

Thesis performed at: Department of Pathology and Cytology, UHC Zagreb

Supervisor: prof. dr. sc. Kamelija Žarković

#### Short abstract:

Oxidative stress – induced lipid peroxidation has been associated with physiologic processes and diseases, including cancer. Overwhelming data suggest that reactive lipid mediators generated from this process, such as 4-hydroxynonenal (4-HNE), are biomarkers for oxidative stress and important mediators in a number of signaling pathways. Meningiomas are common neoplasms of the brain and spinal cord. There are three grades according to the World Health Organization: grade I, grade II (atypical), and grade III (anaplastic). This is a retrospective study of analysis of the expression of HNE-histidine conjugates in human meningiomas of different grade. The aim is to explore the association between immunohistochemical expression of HNE in meningiomas of different grade and to determine the distribution of expression in components of tumor tissue in correlation to other clinical-pathological factors of tumor growth. The increase of knowledge of the expression of HNE in human meningiomas of different grade might lead to better prevention, diagnosis, and treatment of these tumors.

**Number of pages:** 103

**Number of figures:** 17

**Number of tables:** 18

**Number of references:** 154

**Original in:** Croatian

**Key words:** HNE, lipidin peroxidation, meningioma, oxidative stress

**Date of the thesis defense:** 19.11.2018.

#### Reviewers:

1. Prof Jerko Barbić, PhD, MD, full professor at Faculty of medicine in Osijek; president
2. Prof Neven Žarković, PhD, MD, full professor, senior scientist
3. Prof Nela Pivac, PhD, full professor at University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek
4. Ass Prof Ana Čipak Gašparović, PhD, associate professor at University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek

**Thesis deposited in:** National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek.

Doktorska disertacija izrađena je na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Voditeljica rada je prof. dr. sc. Kamelija Žarković.

Zahvale

*Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Kameliji Žarković na susretljivosti i pomoći oko izrade ove disertacije te na izvrsnim savjetima u teškim trenucima prilikom provedbe ovoga istraživanja.*

*Također zahvaljujem prof. dr. sc. Nevenu Žarkoviću, mom studijskom savjetniku, na korisnim savjetima te uvijek prisutnom entuzijizmu i pozitivnoj energiji koja mi je bila potrebna.*

*Posebno zahvaljujem prof. dr. sc. Velimiru Lupretu, mom učitelju, i čovjeku koji je najzaslužniji za moj osobni, profesionalni i znanstveni razvoj. Sretna sam što Vas poznajem!*

*Zahvaljujem se prof.dr.sc. Veri Cesar, Vaša stručnost i znanje, pogled na svijet te kritičan način razmišljanja dali su mi povoda da se uvijek i iznova nastojim promijeniti na bolje.*

*Neizmjeno hvala tehničarkama gosp. Branki Franković i gosp. Danijeli Pavlović na pomoći tijekom obrade i prikupljanja preparata za imunohistokemijsku analizu.*

*Zahvaljujem gđi. Tei Vuković za pomoć oko imunohistokemije.*

*Zahvaljujem se gosp. Joški Luki Bogdanu na pomoći i potpori u izradi ove disertacije.*

*Veliko hvala doc.dr.sc. Kolenc i dr.sc. Jakovčević na korisnim savjetima i podršci te svim djelatnicima Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KBC Zagreb.*

*Od srca se zahvaljujem gosp. Antoniji Galić, prof. hrvatskog jezika za lektoriranje ove disertacije.*

*Također se zahvaljujem mojoj dragoj prijateljici Antonij Gašpar na potpori i pomoći.*

*Zahvalnost upućujem i Klinici za neurokirurgiju KBC Zagreb, mojim dragim kolegama (dr. Barić i dr. Barl), te posebno svim njezinim djelatnicima na susretljivosti i dozvoli za prikupljanje relevantnih podataka o bolesnicima.*

*Veliko hvala svim profesorima Instituta Ruđer Bošković, ponosna sam jer sam bila dio Vaše zajednice!*

*I na kraju, jedno veliko HVALA mojim roditeljima (Vladimiru i Mileni) i dragom bratu Igoru te svim prijateljima i kolegama na podršci, Vaša snaga bila mi je potrebna!*

Doktorsku disertaciju lektorirala je gosp. Galić Antonija, prof. hrvatskog jezika.

## Sadržaj

<b>I. POPIS KRATICA</b> .....	i
<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Meningeomi .....	2
1.2. Etiologija meningeoma .....	3
1.3. Lokalizacija meningeoma .....	4
1.4. Radiološka dijagnostika meningeoma .....	5
1.5. Histopatologija meningeoma .....	6
1.5.1. Gradus I .....	7
1.5.2. Gradus II .....	9
1.5.3. Gradus III .....	10
1.6. Kirurški i nekirurški oblici liječenja .....	11
1.7. Karcinogeneza i oksidacijski stres .....	13
1.7.1. Oksidacijski stres .....	18
1.7.2. Slobodni radikali .....	19
1.7.3. Reaktivne kisikove vrste .....	20
1.7.4. Reaktivni dušikovi spojevi .....	22
1.7.5. Lipidna peroksidacija .....	23
1.7.6. 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) – bioaktivni marker oksidacijskog stresa .....	25
1.7.7. Imunohistokemijska pojavnost HNE u različitim tumorima .....	27
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA</b> .....	29
2.1. Ciljevi istraživanja .....	30
2.2. Hipoteza .....	30
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	31
3.1. Ispitanici .....	32
3.2. Obrada uzoraka i priprema tkiva za svjetlosnu mikroskopsku analizu .....	33
3.3. Imunohistokemijsko bojanje preparata monoklonskim protutijelom na HNE – histidinske konjugate .....	36
3.4. Analiza imunohistokemijskih preparata .....	37
3.5. Statistička obrada podataka .....	38
<b>4. REZULTATI</b> .....	39
4.1. Analiza obilježja tumora odabranih za imunohistokemijsku obradu .....	40
4.2. Imunohistokemijska nazočnost 4-hidroksinonenala u meningeomima .....	45

<b>5. RASPRAVA</b> .....	63
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	75
<b>7. LITERATURA</b> .....	78
<b>8. SAŽETAK</b> .....	96
<b>9. SUMMARY</b> .....	98
<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	100

## I. POPIS KRATICA

AR – aldoza reduktaza

BSA – albumin goveđeg seruma (eng. Bovine serum albumin)

CAT – katalaza

CEA – karcinoembrionalni antigen

COX2 – ciklooksigenaza 2

CT – kompjuterizirana tomografija

DAB – diaminobenzidin

DNK – deoksiribonukleinska kiselina (eng. Deoxyribonucleic acid)

EMA – epitelijalni membranski antigen (eng. Epithelial membrane antigen)

GCL -  $\gamma$ -glutamilcistein ligaza

GGT -  $\gamma$ -glutamil-transpeptidaza

G I – gradus I

G II – gradus II

G III – gradus III

GPx – glutation peroksidaza

GS-DHN – glutationil-1,4-dihidroksinonane

GSH – glutation

GST – glutation – transferaza

Gy – grej

HE – hemalaun-eozin

HIF – faktor hipoksije

HNE – 4-hidroksi-2-nonenal

HNO<sub>2</sub> – dušična kiselina

IFN- $\gamma$ – interferon –  $\gamma$

IH – imunohistokemija

IMV – Inoue – Melnick virus

ISN – međunarodno društvo za neuropatologiju (engl. International Society of Neuropathology)

LOO· - lipoperoksilni radikal

LOOH – lipidni hidroperoksid

LPO – lipidna peroksidacija

MAPKs – mitogenom aktivirane protein kinaze (engl. Mitogen activated protein kinases)

MDA – malondialdehid

MR – magnetska rezonanca

NF2 – neurofibromatoza tip 2

NF $\kappa$ B – nuklearni faktor  $\kappa$ B

NO – dušikov oksid

NO<sub>2</sub> – dušikov dioksid

NOS2 – sintaza dušikova oksida 2 (engl. Nitric oxide syntase 2)

NOX – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaza (engl. NADPH oxidase)

NS – nije statistički značajno (engl. not significant)

ONOO<sup>-</sup> - peroksinitrit

ONOOH – peroksinitritna kiselina

O<sub>2</sub> - kisik

OS – oksidacijski stres

8-OHdG - 8-hidroksi2'-deoksigvanozin (engl. 8-hydroxy2'-deoxyguanosine)

8-oksodG – 8-okso2'-deoksigvanozin (engl. 8-oxo2'-deoxyguanosine)

PBS –fosfatom puferirana fiziološka otopina (eng. Phosphate buffered saline)

PG – prostaglandini

PI3K – fosfatidilinozitol-3-kinaza (engl. Phosphatidylinositol-3-kinase)

PLC $\gamma$ 1 – fosfolipaza C-g1 (engl. Phospholipase C-g1)

PNSTs – periferni tumori živčane ovojnice

PUFA – višestrukonezasićene masne kiseline (engl. Polyunsaturated fatty acids)

RCC – karcinom stanica bubrega (engl. Renal cell carcinoma)



RNK – ribonukleinska kiselina

RNS – reaktivne dušikove vrste (engl. Reactive nitrogen species)

ROONO – alkil peroksinitrit

ROS – reaktivne kisikove vrste (engl. Reactive oxygen species)

SOD – superoksid dismutaza

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

SŽS – središnji živčani sustav

TERT – telomeraza reverzna transkriptaza

TNF- $\alpha$  - faktor nekroze tumora  $\alpha$  (engl. Tumor necrosis factor  $\alpha$ )

XO – ksantin oksidaza

## **1. UVOD**

1

# 1. UVOD

## 1.1. Meningeomi

Meningeomi nastaju iz arahnoidalnih kapa stanica koje nastanjuju najpovršnji dio arahnoidalne membrane koja se nalazi odmah ispod unutrašnje površine tvrde moždane ovojnice. Ove stanice najviše se nalaze u području arahnoidalnih resica gdje stvaraju iznad svake resice kapu, ali mogu se naći bilo gdje duž moždane ovojnice, kao i na drugim mjestima [1-10, 19]. Arahnoidalne resice protrudiraju u venske sinuse, a venski endotel u kontaktu je s cijelom ili samo s dijelom resice. Također, arahnoidalne granulacije i Pacchionijeva tjelešca predstavljaju veće i naglašenije oblike arahnoidalnih resica [10].

Meningeomi spadaju među najčešće primarne tumore mozga odraslih, a u odnosu na druge tumore središnjeg živčanog sustava (SŽS) obuhvaćaju otprilike jednu trećinu svih slučajeva [11-17, 20, 21]. Njihova zastupljenost približno je 32% svih primarnih tumora SŽS, što ih svrstava među najčešće intrakranijske tumore odmah uz tumore glijalnog porijekla [19]. Općenito, meningeomi su dobroćudni, sporo rastući tumori s dobrom prognozom [22]. Češće se javljaju kod žena, a njihov odnos je približno 3:2 u korist ženskog spola. Spolna razlika prema učestalosti pojavljivanja ovisi i o lokalizaciji tumora, tako se meningeomi u području grudne kralježnice pojavljuju u omjeru 9:1, također u korist žena [19, 23]. Obično se pojavljuju u srednjoj i starijoj životnoj dobi, a srednja dob pojavljivanja je oko 64 godine života, no bez razlike prema učestalosti između rasa. Muškarci i djeca imaju nižu incidenciju meningeoma, ali njihovi tumori su agresivniji i češće su višeg gradusa. Većina meningeoma prezentira se simptomima i znakovima koji su povezani s lokalizacijom tumora i okolnim peritumorskim edemom, međutim ukoliko invadiraju punu debljinu kosti lubanje mogu se prezentirati i kao zadebljale mase na lubanji [19, 24]

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO), meningeomi se klasificiraju na gradus I (G I) benigni, gradus II (G II) atipični, i gradus III (G III) anaplastični meningeomi. Kirurška resekcija za ovu vrstu tumora predstavlja standardni oblik liječenja. Obično, adjuvantno liječenje nije potrebno u dugotrajnoj tumorskoj kontroli, naročito u meningeomima G I. Bolesnici s G II i G III meningeomima, osobito u slučajevima nepotpune resekcije, uobičajeno

dobivaju adjuvantno zračenje. Međutim, podskupina bolesnika, a osobito meningeomi s visokim gradusom, pokazuju izrazito agresivni tumorski rast unatoč ponovljenim kirurškim resekcijama i zračenju [25].

## 1.2. Etiologija meningeoma

Neki istraživači smatraju i viruse jednim od mogućih uzroka u nastanku meningeoma. Istražuje se Inoue-Melnick virus (IMV), deoksiribonukleinski (DNK) virus povezan sa subakutnom mijelo-optikoneuropatijom. U svom radu Inoue je prikazao kako su izolirali IMV iz kulture stanica u šest od sedam humanih meningeoma, dok IMV nije bio izoliran u drugim tumorskim staničnim kulturama [26]. Pojavnost IMV protutijela u zdravih odraslih Japanaca je 17.3%. Od 26 bolesnika s meningeomima, 22 (84.6%) su bili pozitivni na IMV protutijela [10, 26]. Nadalje, pokazalo se da u neurofibromatozi tip 2 (NF2) kao autosomno dominantnom poremećaju imamo češću pojavnost meningeoma i perifernih tumora živčane ovojnice (PNSTs) [22]. Inaktivacija tumorskoga supresor gena NF2 mutacijom i monosomija kromosoma 22 dovode do nastanka karakterističnih promjena u NF2 kao što su švanomi kranijalnih, spinalnih i perifernih živaca, multiplih meningeoma, ependimoma i oftalmoloških promjena [27-31]. Nedavne genomske analize pokazale su učestale mutacije na AKT1, KLF4, SMARCE1, SMO i TRAF7 u meningeomima koji nemaju NF2 mutaciju [32-36]. Druga genomska istraživanja ukazuju na činjenicu kako su različiti tipovi mutacija i kromosomskih aberacija pronađeni u meningeoma s različitim histološkim podtipovima i anatomskim distribucijama tumora SŽS [37]. Na primjer, KLF4(K409Q) i TRAF7 mutacije javlja se u sekretornim meningeomima [33-34], dok se mutacije u SMARCE1 javljaju u meningeomima svijetlih stanica [35, 36]. Fibroblastični meningeomi imaju NF2 mutacije [32, 33], dok angiomatoznim meningeomima nedostaje NF2 mutacija, ali oni imaju multiple kromosomske polisomije [38]. Mann i suradnici su 1953. godine prvi put opisali zračenjem inducirane meningeome kod 6-godišnje djevojčice 4 godine nakon resekcije optičkog glioma i provedenog zračenja od 6500 rada [10]. Većina bolesnika s meningeomima koji su potaknuti zračenjem imaju u svojoj anamnezi podatak o niskoj dozi zračenja (800 rada) u području vlasništva. Druga velika skupina bolesnika dobila je visoku dozu zračenja (> 2000 rada)

zbog primarnog tumora mozga [14, 39]. Zračenjem inducirani meningeomi češće su atipični ili agresivni oblici meningeoma, obično multifokalni, visoko proliferativni i općenito se javljaju u mlađoj dobnoj skupini [39-41]. Uloga spolnih hormona u genezi meningeoma još je uvijek nejasna. Češće pojavljivanje meningeoma u žena može se povezati sa spolnim hormonima. Oko 88% meningeoma imaju progesteronske, 40% estrogenske, a negdje 39% imaju androgene receptore [14, 42].

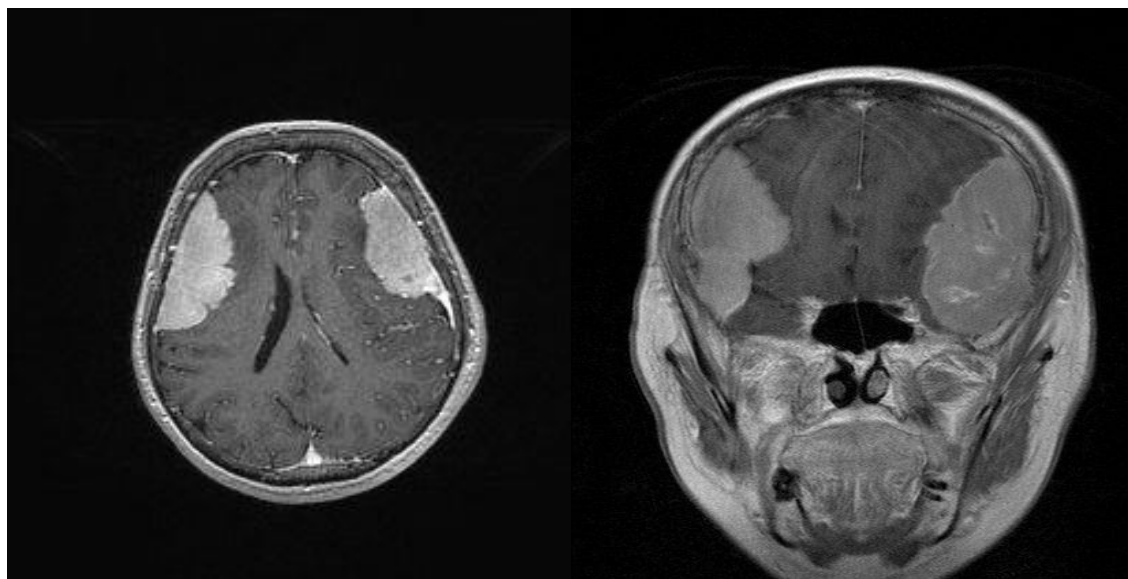
### **1.3. Lokalizacija meningeoma**

Meningeomi mogu nastati bilo gdje duž neuroaksisa, ali pokazuju osobitu sklonost području moždanih ovojnica konveksiteta mozga i parasagitalnog područja (lateralno od gornjeg sagitalnog sinusa). Druga učestala mjesta su: moždani srp (*falx cerebri*), krilo sfenoidne kosti („sfenoidni greben“ koji je prednja granica temporalne jame), šupljikava ploča (*lamina cribrosa*), šatorasti pokrov malog mozga (*tentorium cerebelli*), supraselarno i paraselarno područje. Intraventricularni meningeomi rijetka su pojava, a tipično se nalaze u trigonumu postranične komore, glavčina tumora leži na koroidnom spletu, ali nastaju i u drugim dijelovima postranične komore te vrlo rijetko u trećoj i četvrtoj komori [19]. Većina meningeoma kralježničkog kanala smještena je u području torakalne regije. Atipični i anaplastični meningeomi najčešće zahvaćaju moždani srp (*lat. falx cerebri*) i lateralni konveksitet mozga. U progresiji ove bolesti prema višem stupnju malignosti dolazi do metastaziranja tumora izvan kranija tako da presadnice malignih meningeoma najčešće zahvaćaju pluća, plućnu ovojnicu, kosti i jetru [14, 43].

## 1.4. Radiološka dijagnostika meningeoma

Postoji nekoliko tipičnih obilježja koja olakšavaju radiomorfološko prepoznavanje meningeoma, a to su: ekstraaksijalna masa sa širokom duralnom bazom, hiperostoza kosti, homogenost i dobra ograničenost tumora te kalcifikacija. Na kompjutoriziranoj tomografiji (CT) bez intravenoznog kontrasta meningeomi su tipično izodenzni do blago hiperdenzni u usporedbi sa susjednim mozgovnim parenhimom, a kalcifikacije u tumoru obično su najbolje vidljive na CT-u. Oštro su ograničeni od okolnog parenhima, a širokom bazom prilježu uz tvrdi moždanu ovojnicu i okolnu kost [10]. Meningeomi se mogu dijagnosticirati magnetskom rezonancom (MR) koja se sada smatra zlatnim standardom u dijagnostici tumora mozga. Dodatno se mogu dijagnosticirati i CT-om u većini slučajeva, a osobito kod osoba koje nisu u mogućnosti učiniti MR [8, 44]. Obično se prezentiraju kao solitarni okrugli tumorski procesi koji su u bliskom kontaktu s tvrdom moždanom ovojnicom i izrazito se dobro prikazuju nakon primjene kontrasta. Tipično su izointenzivni na T1 sekvenci MR-a, izointenzivni i hiperintenzivni na inverziji oporavka kod oslabljivanja tekućina i pokazuju znakove izrazitog i homogenog povećanja intenziteta nakon intravenskog davanja kontrasta - gadolinija (Slika 1 i 2). Zadebljanje tvrde moždane ovojnice uokolo tumora, takozvani duralni rep prikazuje se na T1 sekvenci s gadolinijem i tipična je radiomorfološka karakteristika meningeoma [8, 45]. CT je najbolja dijagnostička pretraga za prikazivanje kalcifikata u tumoru, također je dobro vidljiva hiperostoza susjedne kosti kao i prikaz intraosealnog tumorskog rasta, osobito u meningeomima koji su smješteni u području lubanjske osnovice. Konvencionalna angiografija mozga ne koristi se kao rutinska pretraga u dijagnostici meningeoma, ali se može koristiti kao dodatna pretraga u planiranju liječenja u specifičnim i odabranim slučajevima [8, 46, 47]. Angiografija omogućuje neurokirurgu procjenu vaskularnosti i vaskularne opskrbe tumora, te zadiranje tumora u vaskularne strukture što zapravo olakšava neurokirurgu planiranje operacije [10]. Peritumorski edem mozga često je prisutan, a naročito kod atipičnih ili anaplastičnih meningeoma. Opisan je i u sekretornoj varijanti [48] kao i kod meningotelijalnih tumora s takozvanim pericitnim nakupljanjem oko krvnih žila [49]. Ciste se mogu formirati unutar tumora ili ih možemo pronaći na samoj periferiji meningeoma. Općenito, neuroradiološki nalazi nisu uvijek pouzdani u identifikaciji gradusa i podtipa meningeoma, također nisu pouzdani u

predviđanju tumorskog ponašanja ili u isključivanju druge diferencijalno dijagnostičke patologije [14].



**Slika 1 i 2.** Slikovni prikaz meningeoma s MR-om. T1 sekvenca nakon primjene kontrasta, vidljiv je karakteristični „duralni rep“ na T1 sekvenci s gadolinijem

### 1.5. Histopatologija meningeoma

Meningeomi imaju širok raspon histološkog pojavljivanja [14, 50-53]. Od svih podtipova prema SZO klasifikaciji, meningotelijalni, fibrozni i tranzicionalni su najčešći podtipovi. Većina podtipova ponaša se na uobičajeni klinički način, za razliku od četiri histološka podtipa koja pripadaju tumorskom gradus II i III, a takvi podtipovi daleko češće imaju mogućnost recidiviranja uz agresivniji klinički tijek bolesti uključujući i metastaziranje. Pleomorfne jezgre i mitoze mogu se naći u bilo kojoj varijanti meningeoma bez nužne povezanosti s agresivnijim ponašanjem tumora [14]. Histopatološki meningemi dijele se u tri gradusa: benigni (obični) meningeomi, atipični meningeomi (G II) i anaplastični meningeomi (G III), a ovakva podjela zapravo utječe na kliničko ponašanje tumora [54, 55]. Važno je naglasiti kako određene podskupine bolesnika s meningeomima viših gradusa imaju općenito agresivniji tumorski rast

unatoč ponovljenim kirurškim resekcijama i unatoč zračenju. Prema dijagnostičkim kriterijima iz različitih istraživanja atipični meningeomi čine između 5% do 17% od ukupnog broja, dok maligni (anaplastični) meningeomi obuhvaćaju 1% do 3% svih [56-58]. Analizirajući dosadašnju literaturu, ne postoji dovoljan broj podataka o povezanosti histološkog podtipa meningeoma s njegovom anatomskom lokalizacijom. Međutim, od svih podtipova meningeoma najčešće su zastupljeni meningotelijalni (63%), koji se predominantno nalaze u parasagitalnom području, zatim slijede tranzicionalni (19%), potom fibrozni (13%) i psamomatozni (2%). Za određene malignije varijante meningeoma najčešće mjesto lokalizacije su pontocerebelarni kut, intraventricularno područje, sfenoidni greben i stražnje parafalcino područje [59, 60].

Patohistološki nalazi i podtipovi meningeoma dijele se prema klasifikaciji meningeoma SZO iz 2016. godine [11]. Histološke inačice meningeoma prema SZO 2016 jesu gradus I koji obuhvaća: meningotelijalni (sincicijski) meningeom, fibroblastični (fibrozni) meningeom, tranzicionalni (miješani) meningeom, psamomatozni meningeom, angiomatozni (vaskularni) meningeom, mikrocistični meningeom, sekretorni meningeom, limfoplazmatični meningeom, metaplastični meningeom. Gradus II obuhvaća: hordoidni meningeom, meningeomi svijetlih stanica i atipični meningeom, a gradus III obuhvaća: papilarni meningeom, rabdoidni meningeom i anaplastični (maligni) meningeom.

### **1.5.1. Gradus I**

Gradus I meningeomi najčešće su zastupljeni među svim gradusima, a čine oko 80 % od ukupnog broja. Oni su dobroćudni i spororastući tumori koji obično imaju indolentan tijek rasta i razvoja, a postoji 9 histoloških podtipova. U njih se ubrajaju sljedeći podtipovi tumora: meningotelijalni, fibrozni, tranzicionalni (miješani koji se sastoji od meningotelijalne i fibrozne komponente), psamomatozni, angiomatozni, mikrocistični, sekretorni, metaplastični i limfoplazmatična obogaćeni meningeomi [11]. Prema definiciji meningotelijalni podtip je više sincicijskog izgleda te je učestala i klasična varijanta meningeoma. Karakteriziraju ga epiteloidne tumorske stanice srednje veličine koje stvaraju lobule, dok su pojedini dijelovi



djelomično odijeljeni tankim kolagenim pregradama. Tumorske stanice meningotelijalnog meningeoma dosta su slične normalnim arahnoidalnim kapa stanicama, a većim dijelom su ujednačenog izgleda s ovalnim jezgrama osjetljivog kromatina uz prisutne nuklearne pseudoinkluzije (citoplazmatske invaginacije). Ovaj podtip meningeoma najčešće je lokaliziran u području prednje lubanjske jame.

Fibrozni podtip sastoji se od elongiranih vretenastih stanica koje tvore paralelne i isprepletene snopove u kolageno bogatom matriksu. U ovom podtipu meningeoma rijetko se nalaze vrtložaste formacije i psamomska tjelešca. Tumorske stanice su u obliku fascikulusa i posjeduju različitu količinu međustaničnog kolagena, a većina fibroznih meningeoma ima izražen pozitivitet na epitelijalni membranski antigen (EMA).

Tranzicionalni meningeom sastoji se od meningotelijalne i fibrozne komponente, ali i od prijelaznih elemenata. Obično imaju lobulirana i fascikularna žarišta pored kojih se nalaze vrtlozi i psamomska tjelešca. Često su lokalizirani na konveksitetu mozga i posjeduju NF2 mutacije.

Psamomatozni podtip sadrži predominantno psamomska tjelešca koja su često konfluentna i stvaraju nepravilne kalcificirane mase, a ponekad i kost. Obično su smješteni u području torakalne kralježnice i nešto češće se pojavljuju kod žena srednje životne dobi.

Značajke su angiomatoznog meningeoma brojne krvne žile koje čine veći udio tumorske mase, a međusobno su povezane i isprepletene sa stanicama meningeoma. Njihovi su vaskularni kanalići male do srednje veličine s tankom ili debelom stijenkom te su varijabilno hijalinizirani.

Mikrocistični podtip karakteriziraju stanice s tankim i produljenim nastavcima okružene mikrocistama koje stvaraju paučinastu pozadinu. Iako su po prirodi benigni tumori, kod njih je često vidljiva degenerativna nuklearna atipija.

Za sekretorni podtip meningeoma karakteristične su fokalna epitelna diferencijacija i pseudopsamomska tjelešca koja sadrže Schiff pozitivni kiseli sadržaj. Pseudopsamomska tjelešca u ovom podtipu meningeoma pokazuju imunoreaktivnost na karcinoembrionalni antigen (CEA) te na druge epitelne i sekretorne markere. Često su povezani s povišenom

razinom CEA u krvi koja obično pada nakon kirurške resekcije, a raste ukoliko tumor ponovno recidivira.

Rijetka varijanta meningeoma G I su limfoplazmacitima bogati meningeomi koje karakterizira ekstenzivna kronična infiltrativna upala, često zasjenjena s neprimjetnom meningotelijalnom komponentom. Drugi naziv za ovaj podtip meningeoma su “upalom bogati – meingeomi” jer sadrže veliku količinu makrofaga i plazma-stanica.

Metaplastični meningeomi imaju izraženu mezenhimalnu komponentu uključujući kost, hrskavicu, lipomatozno, miksoidno i ksantomatozno tkivo, pojedinačno ili više komponenti u kombinaciji [11-14].

Benigni meningeomi ne invadiraju mozak, ali rastu potiskujući okolne neuralne strukture. Po prirodi su dobroćudni, ali ovisno o veličini i lokalizaciji mogu biti i životno ugrožavajući, osobito ako se ne liječe u pravo vrijeme. Stanice G I meningeoma pod mikroskopom dosta su slične normalnim stanicama moždanih ovojnica i imaju mali broj mitozu, dok atipični meningeomi imaju dosta abnormalniji oblik stanica, viši mitotski indeks i obično invadiraju mozak [61]. U liječenju meningeoma G I metoda izbora je kirurško odstranjenje ukoliko se tumorska promjena nalazi u području koje je kirurški dostupno. Nepotpuna resekcija G I meningeoma najbolji je prediktor recidiva bolesti. Oko 90% bolesnika s potpunom resekcijom G I meningeoma ima slobodni interval ponovnog pojavljivanja bolesti unutar 5 godina, a postotak opada na 60-70% kod nepotpunog odstranjenja tumora [19].

### **1.5.2. Gradus II**

Atipični meningeomi mogu se dijagnosticirati prema histološkim kriterijima na dva načina: 1) razina mitotske aktivnosti ili 2) kombinacija tri ili više histoloških obilježja atipije. U meningeomima povišen broj mitozu definira se 4 ili više mitozu u 10 velikih vidnih polja 400 x uvećanih polja, ali s naglaskom na područje najviše mitotičke aktivnosti u ispitivanom tkivu. G II

meningeomi imaju 4 do 19 mitozna na deset velikih vidnih povećanja. Međutim, postoji još pet histoloških obilježja koja ukazuju na povećanje agresivnosti, čak i kad je broj mitozna niži od onog broja koji je uobičajen za atipični meningeom, a to su nekroza, gubitak arhitekture, hipercelularnost, makronukleoli i visok omjer jezgra/citoplazma. Prema novoj klasifikaciji tumora SŽS (SZO 2016) vidljiva je važnost invazije mozga koja predstavlja značajno histopatološko obilježje karakteristično za atipične meningeome [8, 19]. Osim atipičnog meningeoma postoje još dva podtipa meningeoma G II, a to su hordoidni i meningeom svijetlih stanica.

Hordoidni meningeom histološki je nalik hordomu jer sadrži eozinofilne trabekule i vakuolizirane stanice koje se nalaze u obilnom mukoidnom matriksu. Najčešće se prezentiraju kao veliki supratentorijski tumori koji često recidiviraju nakon nepotpune resekcije.

Meningeomi svijetlih stanica rijetka su varijanta meningeoma, a karakteriziraju ih okrugle do poligonalne svijetle stanice koje su bogate glikogenom uz prisutni prominentni perivaskularni i intersticijski kolagen. Ovaj podtip meningeoma ima sklonost nastanka u području pontocerebelarnog kuta i u području kaude ekvine unutar kralježničnog kanala [11]. Izloženost ionizirajućem zračenju snažno je povezana s povećanim rizikom za nastanak meningeoma. Radiološki inducirani meningeomi češće su atipični ili anaplastični te multifokalni nego pojedinačni [62, 63]. Također, kroz dosadašnju literaturu prikupljeni su podatci o molekularnoj genetici i vidljivo je kako određene genetičke mutacije karakteriziraju atipične i maligne meningeome, npr. mutacije telomerazne reverzne transkriptaze (TERT) češće su povezane s meningeomima viših gradusa [64, 65].

### **1.5.3. Gradus III**

Anaplastične meningeome dijagnosticiramo prema sljedećim kriterijima: 20 ili više mitozna na 10 velikih vidnih povećanja, papilarni ili rabdoidni uzorak te izrazito invazivni i infiltrativni rast. Broj mitozna i histološki uzorak tkiva predstavljaju objektivna dijagnostička obilježja, ali prilikom patohistološke analize nije jednostavno procijeniti pravi gradus jer često jedan gradus prelazi u

drugi te nalaz može biti i graničan. Meningeomi G III vrlo rijetko pokazuju pravu i jasnu malignu morfologiju u kojoj se ne nalaze i neka druga obilježja koja su specifična za niže graduse, osobito za G II. Stoga, u takvom slučaju patolog za vrijeme patohistološke analize donosi vlastitu procjenu, a potom i odluku o kategorizaciji meningeoma kao anaplastičnog ili atipičnog [19]. Obično su makroskopski nešto nepravilnijeg oblika i karakterizira ih veća i patološka vaskularizacija, imaju snažniju tendenciju ponovnog recidiviranja, a mogu i metastazirati za razliku od meningeoma nižih gradusa. Također, karakterizira ih veći udio NF2 mutacija, difuzni rast i invazija mozgovnog korteksa. Kirurško odstranjenje G III meningema uvijek zahtijeva radikalnost, a potom je potrebno provesti adjuvantno frakcionirano zračenje kako bi se smanjila mogućnost recidiviranja. Farmakoterapijski oblik liječenja još uvijek je u eksperimentalnoj fazi, a podatci o učinkovitosti antineoplastičnih lijekova za sada su oskudni u literaturi [8]. Osim anaplastičnog podtipa meningeoma u G III meningeome ubrajamo još papilarni i rabdoidni podtip.

Papilarni meningeom prema definiciji karakteriziran je perivaskularnim pseudopapilarnim uzorkom koji čini veći dio tumora. Ima tendenciju javljanja u mlađoj životnoj dobi, osobito kod djece, često recidiviraju, a najčešće metastaziraju u pluća.

Rabdoidni meningeomi sastoje se primarno od rabdoidnih stanica, a to su zrnate stanice s ekscentričnim jezgrama otvorenog kromatina u kojima se nalaze prominentni nukleoli i paranuklearne inkluzije. Ove rabdoidne stanice nalik su rabdoidnim stanicama u drugim tumorima, poput atipičnog teratoidnog/rabdoidnog tumora [11].

## **1.6. Kirurški i nekirurški oblici liječenja**

Jedini i konačni oblik izlječenja meningealnih tumora je kompletno kirurško odstranjenje. Zapravo možemo reći što je bolja tumorska resekcija, to je manja mogućnost recidiva meningeoma na mjestu resekcije. Simpson je 1957. godine uveo klasifikaciju za kirurško odstranjenje meningeoma koja se dijeli na pet stupnjeva prema širini resekcije tumora. Simpson I odnosi se na makroskopski potpuno odstranjenje tumora, dure i kosti koja je prožeta tumorom, a stopa recidiva je 9%. Simpson II predstavlja makroskopski potpuno odstranjenje tumora uz dodatnu koagulaciju dure, a stopa recidiva je 19%. Simpson III odnosi se na potpunu

resekciju tumora, ali bez dodatne koagulacije dure i stopa recidiva je 29%. Simpson IV predstavlja djelomičnu resekciju tumora, a stopa recidiva je 44%, dok se Simpson V odnosi na jednostavnu dekompresiju tumora s biopsijom ili bez nje. Analizirajući podatke iz dosadašnje literature uočavamo stopu recidiva koja je za G I meningeome oko 10%, dok je za G II dvostruko veća. Postotak recidiva viši je i kod višeg stupnja Simpson gradacije što je samo po sebi razumljivo jer što je razina resekcije manja, to je Simpson gradus viši. Odstranjenje tumora koje uključuje i dodatna 2 cm rubnog dijela tvrde moždane ovojnice označava se kao stupnj 0, a recidiv kod ovog stupnja resekcije vrlo je rijedak [10]. Prva linija liječenja za atipične meningeome tipična je agresivna mikrokirurška resekcija [66], a poznato je kako širina resekcije tumora korelira s dugoročnim preživljenjem. Goyal i suradnici objavili su njihovu seriju od 22 bolesnika u kojoj prikazuju brzinu progresije tumora nakon nepotpune resekcije atipičnih meningeoma koja iznosi oko 83% u usporedbi s 13% nakon potpune resekcije. Mozak i kralježnična moždina osjetljive su živčane strukture pa potpuna resekcija tumora nije uvijek moguća. Ponekad je potpunu resekciju tumora teško postići i sam tijekom operacije može se komplicirati ukoliko dođe do invazije venskih sinusa, ukoliko je tumor priljubljen za kranijske živce ili krvne žile te u slučaju duboke lokalizacije tumora. Adjuvantna stereotaktička radiokirurgija i zračenje koriste se kao dodatni poslijeoperacijski oblici liječenja kako bi se poboljšala lokalna kontrola bolesti nakon nepotpune resekcije atipičnih meningeoma [67, 68]. Zračenje ima i svoje negativne posljedice po zdravlje svakog pojedinca. Stoga je potrebno prije primjene ovog oblika liječenja upozoriti bolesnika o štetnom učinku zračenja kao i o mogućnosti nastanka tumora induciranih zračenjem. Guthrie i suradnici smatraju kiruršku eksciziju glavnim izborom liječenja, a zračenje je potrebno razmotriti u sljedećim slučajevima: 1) nakon operacije malignog meningeoma, 2) nakon nepotpune resekcije meningeoma, 3) kod bolesnika s multiplim recidivirajućim tumorima za koje je ponovna operacija previše rizična i 4) kod bolesnika koji su neoperabilni kao jedini oblik liječenja [10]. Radiokirurgija se obično koristi u kombinaciji s operacijskim oblikom liječenja nakon nepotpune kirurške resekcije ili samostalno kao primarni modalitet liječenja. Stereotaktička radiokirurgija može se ponuditi kao oblik liječenja za meningeome koji su manjeg volumena, a dopuštena je jedna aplikacija od 14-16 greja (Gy). Postoji nekoliko retrospektivnih i manji broj prospektivnih istraživanja koja su provedena na određenim lijekovima za liječenje G II i G III meningeoma. Lijekovi koji su do sada istraživani su: hidroksikarbamid, ciklofosfamid-doksorubicin-vinkristin, interferon-alfa,

megestrol acetat, medroksiprogesteron acetat, oktreotid, pasireotid, imatinib, erlotinib, gefitinib, vatalanib, sunitinib i bevacizumab. Obećavajući rezultati su objavljeni za bevacizumab, vatalanib i sunitinib, a to su zapravo skupina lijekova s antiangiogenim svojstvima. Dobiveni rezultati još moraju proći kroz cijeli niz prospektivnih kontroliranih istraživanja prije samog početka njihovog kliničkog korištenja u bolesnika s meningeomima viših gradusa [69-72].

## **1.7. Karcinogeneza i oksidacijski stres**

Rak se definira kao novotvorina kojoj je svojstvena nekontrolirana dioba stanica, odnosno stanice imaju sposobnost prodiranja u ostatak tkiva bilo izravnim urastanjem (invazija) ili migracijom do udaljenih područja (metastaze). Postoje određeni rizični čimbenici koji se povezuju s nastankom zloćudnih novotvorina kao što su pušenje, pretjerano konzumiranje alkohola, pretilost, ionizirajuće i ultraljubičasto zračenje, infekcija HPV virusom i hepatitisom C te mnogi drugi čimbenici, ali i genetičko nasljeđe te kromosomske promjene igraju važnu ulogu u nastanku raka. Danas u svijetu zloćudne novotvorine predstavlja ozbiljan globalni problem i smatraju se jednim od vodećih uzroka smrti u razvijenim zemljama. Prema literaturi u zemljama u razvoju vidljiv je stalni porast učestalosti različitih tumora, a koji je pravi uzrok porasta još uvijek se ne zna. Povećanu učestalost možemo povezati s nedostatkom zdravstvene edukacije, nedostatkom prevencije, neprovođenjem pravovremenog probira i nedostupnosti opće medicinske skrbi. Općenito, onkološko područje medicine jako je zanimljivo, a nedostatak znanja o biologiji tumora kao i ograničene mogućnosti u liječenju ove bolesti još uvijek su veliki izazov za većinu znanstvenika [73, 74]. Oksidacijski stres definira se kao poremećaj ravnoteže prooksidansa i antioksidansa, ali u korist prooksidansa. Do pomaka ravnoteže najčešće dolazi ukoliko je smanjena antioksidativna zaštita organizma ili ukoliko je pojačano stvaranje slobodnih radikala. U stanjima oksidacijskog stresa dolazi do porasta reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, engl. Reactive oxygen species) u tkivima ili organizmu, a potom ROS dovode do oštećenja biomolekula kao što su deoksiribonukleinska kiselina (DNK), bjelančevine i lipidi [18, 75].

Karcinogeneza je proces pretvorbe normalne stanice u malignu, a taj proces potaknut je različitim karcinogenima. Za nastanak tumora potrebne su određene promjene u genomu, a takve promjene dovode do novih bioloških svojstava stanice. Oštećenje deoksiribonukleinske kiseline smatra se primarnim uzrokom neoplazmi, a oštećenje nastaje izloženosti DNK određenim egzogenim i endogenim čimbenicima. Postoje razne hipoteze i teorije o karcinogenezi odnosno o malignoj transformaciji stanice koja se odvija kroz nekoliko stadija. Još davne 1929. godine Boveri je izjavio da su kromosomske promjene i točkaste mutacije osnova za početak svake karcinogeneze jer u tom trenutku dolazi do promjene u funkciji same stanice. Na taj način izbjegnute su mehanizmi negativne kontrole stanice te dolazi do nekontroliranog rasta i proliferacije stanica odnosno maligne alteracije [75, 76].

Proces karcinogeneze prikazuje se kao slijed zbivanja koji ima tri stadija: inicijacija, promocija i progresija. Karcinogene čimbenike dijelimo u dvije osnovne skupine: potpune i nepotpune. Potpuni karcinogeni dovode do sva tri stadija karcinogeneza, dok nepotpuni karcinogeni izazivaju samo jedan stadij, i to najčešće inicijaciju, što je ovisno i o količini karcinogenog čimbenika. Današnji suvremeni način života, napredak tehnologije i onečišćenje okoliša doprinose sve većoj zastupljenosti karcinogenih čimbenika. U karcinogene ubrajamo određene kemijske, fizikalne i biološke čimbenike koji potiču nastanak tumora. Inicijacija je prva faza karcinogeneze u kojoj dolazi do mutacije stanice, a predstavlja ireverzibilan proces. Za vrijeme inicijacije mijenja se molekulska struktura DNK te dolazi do aktivacije brojnih protoonkogenih i inaktivacije tumor supresor gena. Promocija je reverzibilan proces, a karakterizira je stimulacija proliferacije već prethodno izmijenjenih stanica. Tada dolazi do mijenjanja ekspresije genoma i prijenosa signala te do selektivne klonalne ekspanzije stanica koje izbjegavaju kontrolne mehanizme rasta i diferencijacije. Progresija je opet ireverzibilan proces u kojem uslijed nakupljanja genetskih mutacija dolazi do autonomnog rasta tumora. Na kraju, metastaziranje predstavlja četvrti stadij u kojem maligno transformirane stanice udaljavaju se od primarnog tumora i ulaze u krvotok ili limfni sustav te se šire tijelom na udaljena mjesta. Svaki stanični gen koji sudjeluje u proliferaciji i diferencijaciji stanice može mutirati, točnije, normalni gen koji nazivamo protoonkogen može se promijeniti u maligni onkogen. Normalna stanica nakon određenog vremena odumire i ulazi u apoptozu što ovisi o unutrašnjoj komunikaciji između stanične membrane i jezgre odnosno DNK [18, 77]. Apoptoza je po definiciji programirana stanična smrt koja je potrebna za razvoj organizma i održavanje

stanične homeostaze. Zapravo predstavlja ravnotežu između gubitka i stvaranja stanica normalnog tkiva tijekom cijelog života [78]. Prema dosadašnjoj literaturi smatra se da slobodni radikali utječu na sva tri stadija karcinogeneze. Pojedini istraživački rezultati do sada su pokazali povećanje ROS u tumorskim stanicama, a ROS igraju važnu ulogu u inicijaciji i progresiji tumora kao i u metastaskom proširenju bolesti. Tumorske stanice više su izložene oksidacijskom stresu, a također one su i otpornije na oksidacijski stres za razliku od netumorskih (normalnih) stanica. Što dovodi do otpornosti tumorske stanice za sada je nejasno, a prema nekim istraživanjima smatra se da važnu ulogu ima glutation (GSH) koji se stvara u tumorskim stanicama [18, 79]. GSH kao antioksidans sudjeluje u određenim staničnim procesima, uključujući diferencijaciju, proliferaciju i apoptozu stanica. Poremećaji u homeostazi GSH vidljivi su u mnogim ljudskim bolestima, a opisani su i kod tumora. Povišena razina GSH zamijećena je u određenim tipovima tumora kao što su tumor dojke i kolorektalni karcinom, a to dovodi i do otpornosti neoplastičnih tkiva na kemoterapiju. Viša razina GSH u nekim tumorskim stanicama povezana je s višom razinom GSH-vezanih enzima, poput aktivnosti  $\gamma$ -glutamylcistein ligaze (GCL) i  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidaze (GGT) [80]. Osim što sudjeluju u karcinogenzi ROS djeluju i na inhibiciju tumorskog rasta stanica ukoliko su u povišenoj razini, štoviše, stvaranje veće količine ROS dovodi do nastanka apoptoze, a to je način na koji djeluje većina kemoterapijskih lijekova. Poznato je kako ROS imaju širok spektar djelovanja ovisno o količini njihove razine, duljini trajanja izloženosti, lokalizaciji te prirodi bolesti u koju su uključeni [81]. Niske razine ROS su mitogene i potiču staničnu proliferaciju, dok srednja razina uzrokuje prolazno ili trajno zaustavljanje staničnog ciklusa i inducira staničnu diferencijaciju [82]. Visoka razina ROS vrlo je reaktivna i oni lako reagiraju s membranskim lipidima djelujući tako na promjenu permeabilnosti membrane. Također uzrokuju oštećenje DNK i dovode do genomske nestabilnosti, a što se tiče proteina, njihovim djelovanjem dolazi do oksidacijske modifikacije što mijenja katalitičku aktivnost enzima, ali i povećanu osjetljivost za proteolitičku degradaciju [83, 84]. Osim što induciraju staničnu apoptozu ili nekrozu, ROS djeluju kao primarni glasnici u modulaciji unutarstanične signalne kaskade koja dovodi do progresije tumora [88].



Novotvorina se definira kao bolest u kojoj su normalne stanice izgubile svoj normalan programirani razvoj te je došlo do razvoja malignih populacija stanica koje više nisu pod strogom kontrolom fiziološke homeostaze [85]. Heterogenost unutar tumora nastaje kao posljedica genetskih i negenetskih promjena (epigenetske promjene i okolišni čimbenici) koje predstavljaju glavnu prepreku u personaliziranoj medicini i učinkovitom liječenju karcinoma.

Općenito, metastatsko širenje karcinomskih stanica glavni je uzrok izrazito visokog mortaliteta u različitim tipovima tumora [86]. Normalne stanice koje su izgubile svoj kontakt s izvanstaničnim matriksom idu u apoptozu, proces smrti stanice poznat kao anoikis. Presadnice su otporne na anoikis i ova populacija stanica je sposobna preživjeti nedostatak komponenti izvanstaničnog matriksa što im omogućuje širenje i preživljenje kroz limfatični i cirkulacijski sustav na sekundarna tumorska mjesta [87]. Dosadašnji rezultati koji su provedeni na različitim karcinomskim modelima pokazali su kako povećanje oksidacijskog stresa dovodi do povećanja apoptoze kroz različite mehanizme – djelovanja između određenih staničnih tipova i antitumorskih lijekova. Zajedničko obilježje svih tumora koji su liječeni s različitim antitumorskim lijekovima dovelo je do povećanja unutarstanične razine ROS. U svim slučajevima došlo je do sinergističkog učinka antitumorskih lijekova što je vidljivo kroz indukciju apoptoze, smanjenje stanične proliferacije i povećanje koncentracije ROS u stanicama. Osim toga, povećanje apoptotičke aktivnosti antitumorskim lijekovima u kombiniranom liječenju s agentima koji induciraju ROS dovodi do dodatnog povećanja ROS unutar stanica te posljedične smrti stanice [88]. Većina istraživanja provedena je na vrlo agresivnim tumorima koji su slabo odgovorili na kemoterapiju, npr. karcinom gušterače koji je jedan od najmalignijih tumora probavnog sustava s vrlo lošom prognozom odličan je primjer za ovaj oblik liječenja. Tumorske stanice gušterače koje su liječene s MDA-7/IL24 i induktorima ROS-a (arsenični trioksid ili ditiofen) pokazale su kako je došlo do povećanja apoptoze, ali učinak ovih lijekova mogao bi biti poništen djelovanjem ROS inhibitora poput N-acetil-L-cisteina [89].

Biološki utjecaj HNE na tumorske stanice prema većini dosadašnjih istraživanja redukcija je stanične proliferacije i indukcija apoptoze. Prvo istraživanje koje je napravljeno na kulturi humanih leukemičnih stanica nije sadržavalo endogeni HNE te tako nisu uspjeli detektirati razinu lipidne peroksidacije. Međutim, u humanim HL-60 leukemičnim stanicama, HNE je snažno djelovao izazivajući tako diferencijaciju uz pomoć granulocita, smanjenje stanične proliferacije i u isto vrijeme blokadu ekspresije c-myc te c-myb onkogeni [88]. Inhibicija c-myc

ekspresije HNE-om potvrđena je u U937 i ML1 humanim leukemičnim stanicama, a također i u MEL mišjim eritroleukemičnim stanicama, u svim stanicama HNE je izazvao diferencijaciju. Dok je istraživanje na tumorskim stanicama debelog crijeva pokazalo tranzitorno povećanje c-myc ekspresije, a potom naknadno smanjenje poslije dodavanja HNE-a [90]. Različite istraživačke skupine pokazale su inhibiciju proliferacije u tumorskim stanicama debelog crijeva s HNE kroz regulaciju MAP kinaznih i gama PPAR puteva. Štoviše, u stanicama karcinoma dojke (MCF7) koje su tretirane s konjugiranom linoleinskom kiselinom vidljiva je snažna inhibicija stanične proliferacije uz povećanje endogene razine HNE-a. Razmatrajući ukupno ponašanje HNE-a kroz različita istraživanja može se zaključiti kako ovisno o njegovoj ukupnoj količini i vremenskoj dužini djelovanja ovisi hoće li stanična proliferacija biti potaknuta ili ne. Dualni učinak HNE-a može se objasniti kroz prisutnost antioksidativne zaštite, metabolizam mitohondrija i prisutnost aldehidnih metabolizirajućih enzima [88]. Osim toga, HNE doprinosi karcinogenezi, inhibirajući popravak ekscizije nukleotida oštećene DNK u tumorskim stanicama s koncentracijom većom od 50  $\mu$ M (Feng et al, 2004). U svakom slučaju HNE stvara spojeve s DNK samo u visokim koncentracijama, on može brzo reagirati s amino i sulfidrilnim skupinama proteina, ali primarno sa sulfidrilnom skupinom glutationa (GSH). Izračunato je za GSH konjugate da su 20 000 puta brojniji nego DNK spojevi kada se HNE egzogeno doda u kulturu stanica (Falletti & Douki, 2008). Stanice debelog crijeva izložene su utjecaju HNE-a iz različitih izvora, ali najčešći izvor je hrana. HNE može nastati putem lipidne peroksidacije iz višestruko nezasićenih masnih kiselina (engl. polyunsaturated fatty acid - PUFA) koje su uvedene s prehranom u enterohepatičnu cirkulaciju ili endogeno iz PUFA u staničnim membranama. Metabolička transformacija HNE započinje u enterocitima gdje nastaje glavni metabolit GSH-HNE. Većina metabolita HNE-a pronađena je u urinu, a nekoliko različitih skupina istraživača upozoravali su nas na dokaze o protumorskoj aktivnosti HNE-a i drugih produkata lipidne peroksidacije u karcinogenezi debelog crijeva. Dosadašnja in vitro i in vivo istraživanja pokazala su genotoksično svojstvo HNE-a u staničnim linijama karcinoma debelog crijeva. U jednom istraživanju došlo je do povećanja količine HNE-a i HNE-DNK spojeva tijekom progresije raka debelog crijeva in vivo, dok su druga istraživanja pokazala oprečne rezultate, tako da su navedeni rezultati ponovno potvrdili protumorsku i antitumorsku ulogu HNE-a u karcinogenezi debelog crijeva [91].

ROS i oksidacijski stres koji nastaju iz fibroblasta, a povezani su s rakom, pokazali su da imaju tzv. "ulogu promatrača" u susjednim tumorskim stanicama dovodeći tako do genomske nestabilnosti, aneuploidije i oštećenja DNK. Iz ovog primjera vidljiva je važnost tumorske i stromalne koevolucije. Jedna od sastavnica tumorskog mikrokoliša su fibroblasti koji su povezane s rakom, a i s drugim stromalnim stanicama (vaskularne i imune stanice). Fibroblasti doprinose progresiji tumora te njegovom metastatskom širenju na udaljena područja. Tumorske stanice koje se nalaze u osjetljivom tumorskom mikrokolišu mogu biti u stanju uspavanosti, točnije, te stanice su u G0 fazi staničnog ciklusa. G0 faza poznata je kao faza staničnog mirovanje ili kao faza kada se stanica ne dijeli, a tumorske se stanice ponekad čak i godinama mogu nalaziti u stanju uravnotežene proliferacije i apoptoze. Hoće li stanica biti u aktivnoj ili možda u uspavanoj fazi, najviše ovisi o signalima koje dobiva iz mikrokoliša. Učinak HNE na staničnu adheziju, invaziju i metastaziranje još uvijek je nejasan, a do sada je istražen utjecaj lipidne peroksidacije na nekoliko različitih ljudskih tumora [74]. Produkti lipidne peroksidacije do sada su se mogli koristiti kao indikatori u prognozi razvoja raka. U bolesnika liječenih od karcinoma dojke izmjerena je smanjena razina malondialdehida (MDA), a MDA se smatra važnim prognostičkim čimbenikom. Do sada je zabilježena značajno niža razina MDA u plazmi bolesnica s velikim tumorom dojke u kojem su limfni čvorovi i metastaze bili pozitivni. Važnost oksidacijskog stresa i lipidne peroksidacije vidljiva je i u tumorima SŽS, osobito kod malignih tumora. HNE proteinski konjugati pronađeni su u ependimalnim i astrocitnim glijalnim tumorima mozga, a bili su proporcionalni sa stupnjem zloćudnosti i neovaskularizacijom [92, 93].

### **1.7.1. Oksidacijski stres**

Oksidacijski stres prema definiciji je stanje neravnoteže između prooksidansa (slobodni radikali ili ROS) i antioksidansa (vitamin C, E i antioksidacijski enzimi), ali u korist prooksidansa [93]. Oksidacijski stres nastaje kao posljedica neravnoteže redoks sustava u kojem se stvaraju ROS, a biološki sustav nije u mogućnosti da ih odstrani. Helmut Sies je definirao oksidacijski stres 1985. godine, a povezan je sa starenjem i različitim patološkim stanjima poput raka, neurodegenerativnim bolestima, aterosklerozom, upalnim stanjima i sa šećernom bolešću.

Kisik je neophodan za život, a za vrijeme aerobne respiracije u stanicama dolazi do metaboličkog stvaranja slobodnih radikala i ROS.

ROS smatraju se važnim signalnim molekulama koje ne djeluju samo kao prenositelji poruka u stanicama već su i dio izvanstaničnog okoliša u kojem moduliraju osjetljivi redoks sustav. Održavanje homeostaze redoks sustava u stanicama ovisi o enzimatskoj i neenzimatskoj antioksidativnoj zaštiti kojom se odstranjuje višak ROS-a. U enzimatsku antioksidativnu zaštitu ubrajaju se superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i glutacion peroksidaza (GPX), dok u neenzimatske antioksidanse svrstavamo glutacion, tioredoksin, karotenoide, vitamin C i E, flavonoidi i druge [74].

### **1.7.2. Slobodni radikali**

Slobodni radikali se definiraju kao atomi ili molekule koji u vanjskoj ljusci imaju jedan ili više nesparenih elektrona [95]. Nastaju homolitičkim cijepanjem kovalentne veze (zajedničkog elektronskog para), pri kojemu po jedan elektron pripada svakom od atoma koji gradi ovu vezu. Nespareni elektroni čine ih izrazito reaktivnima i dosta nestabilnima te često reagiraju s različitim molekulama u svojoj blizini. U ljudskom organizmu imaju važnu ulogu jer se proizvode u normalnim fiziološkim procesima poput oksidativne fosforilacije u mitohondrijima, a također njihovo stvaranje povećano je za vrijeme tjelovježbe, u procesima starenja i kod različitih bolesti [96]. Oni predstavljaju stalnu prijetnju našem organizmu koja je vidljiva u njihovom doprinosu karcinogenezi, a najvažniju skupinu ipak čine slobodni radikali kisika. ROS nastaju uslijed apsorpcije energije zračenja, u redukcijsko-oksidacijskim reakcijama, za vrijeme oksidacije masnih kiselina u peroksisomima, kod prijenosa elektrona u endoplazmatskom retikulumu sustava citokroma P-450, u metabolizmu arahidonske kiseline staničnih membrane te za vrijeme fagocitoze [18]. Biokemijski su najznačajniji reaktivni oblici kisika – ROS, što je zajednički naziv za radikale kisika (superoksidni anion i hidroksilni radikal) i reaktivni derivati kisika koji nisu radikali (vodikov peroksid i hipoklorna kiselina). Osim ROS jako su važne i reaktivne dušikove vrste (engl. RNS – reactive nitrogen species), poput slobodnih radikala dušika (dušikov oksid i dušikov dioksid) te različiti spojevi dušika (peroksinitriti). Osim endogenih

izvora ROS postoje i egzogeni izvori kao što su razni lijekovi, industrijske kemikalije, različiti okolišni čimbenici, ultraljubičasto i ionizirajuće zračenje [94].

### 1.7.3. Reaktivne kisikove vrste

Reaktivni kisikovi spojevi skupina su spojeva koja primarno nastaje u mitohondrijima kao produkt staničnog metabolizma. Smatraju se odgovornima za alteraciju makromolekula, a dovode do nastanka oksidacijskog stresa. ROS obuhvaćaju slobodne kisikove radikale poput superoksidnog aniona i hidroksilnog radikala, a također i druge reaktivne spojeve kisika kao što su vodikov peroksid, reaktivni (singlet) kisik, hipoklornu kiselinu i ozon. Između svih do sada poznatih spojeva ROS-a najreaktivnijim se smatra hidroksilni radikal ( $\cdot\text{OH}$ ) koji nastaje putem Fentonove i Haber-Weissove reakcije [88]. Tijekom Fentonove reakcije dolazi do reakcije između iona dvovalentnog željeza ( $\text{Fe}^{2+}$ ) i vodikovog peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) pri čemu se stvara hidroksilni radikal i hidroksilni ion uz nastanak trovalentnog iona željeza ( $\text{Fe}^{3+}$ ), dok u Haber-Weissovoj reakciji superoksidni anion reagira s vodikovim peroksidom te također dolazi do nastanka hidroksilnog radikala i hidroksilnog iona. Njegovo poluvrijeme života kratko je, a kao jedan od najsnažnijih prooksidansa djeluje na veliki broj biomolekula u neposrednoj blizini [18].

U "primarne" ROS ubraja se superoksidni anion koji metabolički nastaje "aktivacijom" kisika pod utjecajem zračenja [96]. Stvara se na dva načina, enzimatski (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaza – NOX i ksantin oksidaza – XO), ali i neenzimatski u elektronskom transportnom lancu mitohondrija tijekom direktnog prijenosa jednog elektrona na kisik. Sudjeluje u interakciji s drugim molekulama direktno ili indirektno preko enzima ili putem metalnih katalizatora stvarajući tako "sekundarne" ROS. Njegovo djelovanje je ograničeno zbog slabe topljivosti u mastima, a u kiseloj sredini veže se za proton i na taj način stvara se još reaktivniji perhidroksilni radikal ( $\text{HO}_2\cdot$ ) [97].

Vodikov peroksid stvara se u mitohondrijima ili pomoću NOX enzima nakon njihove aktivacije s različitim citokinima i čimbenicima rasta. Relativno je stabilna molekula koja može prolaziti kroz membrane i difundirati u stanice što je važno u signalizaciji redoks sustava, a razgrađuje se djelovanjem katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GPx) i uz pomoć drugih

peroksidaza. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nije radikal jer ne sadrži nespareni elektron, ali je oksidans koji u prisutnosti iona prijelaznih metala stvara vrlo reaktivne slobodne radikale [74].

Ovisno o različitim mehanizmima stanice dolazi do povećanog stvaranja ROS, osobito kod aktivacije onkogena, promijenjenog metabolizma, disfunkcije mitohondrija i gubitka funkcije p53 [98]. Upalne stanice poput neutrofila i makrofaga doprinose izrazitoj proizvodnji ROS, a zapravo taj mehanizam predstavlja ubijanje tumorskih stanica. Međutim i tijekom fagocitoze u eozinofilima, neutrofilima i makrofazima dolazi do kontinuiranog stvaranja ROS-a. [99]. Povećanim stvaranjem ROS-a oštećuju se lipidi, bjelančevine i DNK te posljedično dolazi do ozbiljnog ireverzibilnog oksidativnog oštećenja tih biomolekula. Do sada je identificirano oštećenje u više od 20 baza DNK, a najviše je istraživani 8-okso-2'-deoksigvanin (8-oksodG). Oksidativno oštećenje baze uzrokuje mutaciju DNK i to predstavlja važni korak u nastanku karcinogeneze [100]. Povišena razina 8-oksodG pronađena je u nekoliko različitih neoplazmi, a tu se ubrajaju neoplazma štitne žlijezde, karcinom skvamoznih stanica, ne-sitnostanični rak pluća, a povišena je razina i u stanicama raka prostate [88].

Osim što djeluju kao primarni prenositelji poruka te moduliraju unutarstaničnu kaskadnu komunikaciju, ROS djeluju na aktivaciju brojnih signalnih putova kao što su: mitogenima aktivirane protein kinaze (MAPKs), fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K/Akt), fosfolipaza C-g1 (PLCg1), protein kinaza C, nuklearni faktor-κB (NF-κB) i Jak/Stat. ROS kroz različite signalne transdukcijske kaskade djeluju i na indukciju ekspresije obitelji proteina toplinskog šoka (eng. families of heat shock proteins), djeluju neposredno na rane gene članova bZIP obitelji poput c-Fos i c-Jun, na inducibilni faktor hipoksije (HIF) i antioksidativne enzime koji pomažu u regulaciji homeostaze redoks sustava, a također djeluju i na ekspresiju čimbenika rasta i onkoproteina [81, 82].

Antioksidanse definiramo kao tvari koje u malim koncentracijama, u odnosu prema oksidabilnim supstratima, dovode do odgađanja ili inhibicije oksidacije supstrata. Naše stanice posjeduju učinkovitu obranu protiv oksidacijskih oštećenja, a antioksidacijska zaštita temelji se na sprječavanju nastanka slobodnih radikala, neutralizaciji već nastalih radikala, popravku oštećenja koja su nastala djelovanjem radikala i povećanim uklanjanjem oštećenih molekula [101]. Već duže vrijeme antioksidansi se smatraju korisnim u prevenciji raka jer je njihova glavna funkcija smanjiti razinu ROS i poboljšati neželjene učinke poput mutacije DNK koja je odgovorna za transformaciju normalnih stanica u maligne [74]. Istraživanja o raku prostate dala

su nam kontradiktorne rezultate. Istraživači su pokazali kako konzumacija likopena, važnog crvenog pigmenta, i predominantno karotenoidi iz rajčice smanjuju incidenciju raka prostate, a isto tako pokazali su da tri do pet porcija rajčica tjedno značajno smanjuje rizik od raka prostate [102-104]. Dok su neke druge studije pokazale da je adjuvantna terapija antioksidansima ili kao nadopuna kemoterapiji ili u kombinaciji s kemoterapijom bila povezana sa smanjenjem nuspojava i sekundarizacijom raka. Do sada su bili testirani sljedeći antioksidansi koji imaju određenu kliničku korist za ljudski organizam: askorbinska kiselina, ekstrakt aronije, bradoksolon,  $\beta$ -karoten, koenzim Q, kurkumin, flavonoidi ili ekstrakt zelenog čaja, aktovegin, ursolična kiselina i selen [74].

#### **1.7.4. Reaktivni dušikovi spojevi**

U oksidacijskom stresu osim reaktivnih kisikovih spojeva postoje i reaktivni dušikovi spojevi koji su također od velike važnosti za pojavu lipidne peroksidacije. Sam naziv "reaktivni dušikovi spojevi" (engl. reactive nitrogen species – RNS) predstavlja skupinu visoko reaktivnih spojeva dušika, a oni uz slobodne dušikove radikale (dušikov oksid – NO i dušikov dioksid – NO<sub>2</sub>) sadrže i druge reaktivne dušikove spojeve poput dušične kiseline (HNO<sub>2</sub>), peroksinitrite (ONOO<sup>-</sup>), peroksinitritnu kiselina (ONOOH) i alkil peroksinitrat (ROONO) [75]. RNS također smatramo "obitelji antimikrobnih molekula" koje nastaju iz dušikovitih oksida i superoksida uz pomoć enzimatske aktivnosti inducibilne dušik oksid sintaze 2 (NOS2, engl. Nitric oxide syntase 2) i NADPH oksidaze. NOS2 se prvenstveno nalazi u makrofazima nakon njihove indukcije citokinima i produktima mikroba, a znatan dio je potaknut i od strane interferona gama (IFN- $\gamma$ ) i lipopolisaharida [105]. NO je relaksacijski čimbenik krvožilnog sustava, a kao slobodni radikal može reagirati s endogenim radikalima, poput superoksidnog radikala stvarajući tako peroksinitrite. ONOO<sup>-</sup> je nestabilni strukturni izomer nitrata (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), a smatara se izrazito jakim oksidansom koji oštećuje biomolekule poput DNK i bjelančevina, a pri kiselom pH razgrađuje se sve do hidroksilnih radikala neovisno o prisutnosti prijelaznih metala [101]. Dušikov oksid inače nastaje u endotelnim, živčanim i upalnim stanicama iz L-arginina djelovanjem NOS2, a posjeduje prooksidativna i antioksidativna svojstva. RNS s jedne strane doprinose normaloj

fiziološkoj funkciji, dok njihova povećana koncentracija uzrokuje lipidnu peroksidaciju, oksidaciju proteina i oštećenje DNK [18].

### 1.7.5. Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija (LPO) autokatalitički je proces uzrokovan oksidativnim stresom u kojem ROS i RNS izazivaju oksidaciju višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA). Takvi reaktivni međuproducti mogu mijenjati membranski lipidni dvosloj dovodeći do stvaranja lipoperoksilnih radikala ( $\text{LOO}^\cdot$ ) koji potom reagiraju s lipidima stvarajući lipidne radikale i lipidni hidroperoksid ( $\text{LOOH}$ ) [88]. Za razliku od PUFA, zasićene masne kiseline i masne kiseline koje posjeduju jednu dvostruku vezu pokazuju veću otpornost prema djelovanju ROS-a. Hidroksilni radikal ( $\text{OH}^\cdot$ ) najčešće uzrokuje LPO, ali i drugi slobodni radikali mogu potaknuti proces peroksidacije. Lančana reakcija lipidne peroksidacije odvija se kroz 3 faze: inicijacija, propagacija i terminacija. Peroksidacijski niz započinje napadom ROS na lipide, tada dolazi do izdvajanja atoma vodika iz metilenske skupine ( $-\text{CH}_2-$ ), a na taj način iz PUFA nastaju slobodni lipidni radikali – faza inicijacije. Superoksidni radikal nije dovoljno reaktivan za eliminaciju vodika, a u slobodne radikale koji mogu izazvati oksidaciju PUFA ubrajaju se:  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{HO}_2^\cdot$ ,  $\text{RO}^\cdot$  i  $\text{RO}_2^\cdot$ . Ukoliko postoje aerobni uvjeti konjugirani dieni spajaju se s kisikom ( $\text{O}_2$ ) stvarajući tako peroksilne radikale koji potom mogu eliminirati  $\text{H}^\cdot$  iz organskih molekula, ubrajajući i PUFA, pri čemu nastaju lipidni hidroperoksidi i reaktivni ugljikovi radikali koji nastavljaju reakciju – faza propagacije. Za vrijeme propagacije  $\text{LOOH}$  u prisutnosti željeza disocira do  $\text{LO}^\cdot$  i  $\text{LOO}^\cdot$ , a potom uzrokuju reinicijalizaciju peroksidacije [101]. Tijek LPO ovisi o antioksidansima koji su važni kontrolni i obrambeni mehanizmi, međutim, ukoliko nisu prisutni, započeta lančana reakcija ulazi u fazu propagacije što može dovesti i do uništenja okolnih molekula [18]. Sama pojava LPO u biološkim membranama dovodi do poremećaja funkcije i smanjenja fluidnosti membrane, a takve promjene povezane su s brojnim bolesnim stanjima. Osim gubitka fluidnosti, intenzivna LPO dovodi do opadanja vrijednosti membranskog potencijala, povećanja permeabilnosti prema  $\text{H}^+$  i drugim ionima, a sve opisane promjene dovode do moguće rupture stanice i otpuštanja njenog sadržaja [101, 106].



Završni produkti lipidne peroksidacije su visoko reaktivni aldehidi koji su mnogo stabilniji od ROS-a, imaju duži poluvijek života i mogu difundirati od mjesta nastanka te tako djelovati na udaljenim ciljnim mjestima. LPO može biti povećana u različitom opsegu kao uzročni kofaktor u pojedinim bolestima. To su najčešće bolesti koje su obično povezane sa starenjem, poput ateroskleroze i šećerna bolest tipa II, a također i u nekim neurodegenerativnim bolestima te u različitim tumorima. Međutim, Gago-Dominguez i suradnici postavili su hipotezu o zaštitnoj ulozi lipidne peroksidacije u raku dojke [107, 108].

Reaktivni aldehidi završni su produkti lipidne peroksidacije, a to su 4-hidroksialkenali i drugi srodni  $\alpha$ ,  $\beta$  – nezasićeni aldehidi koji se nazivaju i “drugim toksičnim glasnicima” primarnih slobodnih radikala [75, 109]. Bez obzira što se nazivaju završnim produktima LPO-a, oni mogu u određenim situacijama nastaviti lančanu reakciju oksidacijskog oštećenja. Njihova reaktivnost je nešto niža u odnosu na slobodne radikale, ali opet dovoljno velika te oni mogu reagirati s molekulama u svojoj okolini i tako oštetiti stanice što ponekad uzrokuje i staničnu smrt. U biološkim uzorcima kao glavni produkti LPO-a pronađeni su heksanal, malondialdehid (MDA), 4-hidroksi-2-nonenal (HNE), pa su stoga ovi završni produkti do sada i najviše istraživani [18].

MDA koji se tijekom peroksidacije lipida stvara u malim količinama, a općenito se u većim količinama stvara u mikrosomima jetre, također je pokazatelj LPO-a. Može postojati u različitim oblicima, a u fiziološkim se uvjetima nalazi u obliku enolatnog iona koji ulazi u interakciju s bjelančevinama, pokazujući izraziti afinitet prema lizinskom aminokiselinskom ostatku. Postoji i još jedna skupina spojeva produkata LPO-a, a to su izoprostani koji se stvaraju oksidacijom fosfolipida. Izoprostani su zapravo izomeri prostaglandina (PG), a razlikuju se od njih po lokalnom nastanku u membranama i nešto su složeniji sustav. Oni se također koriste kao markeri lipidne peroksidacije, a mogu se određivati u ljudskoj mokraći i plazmi.

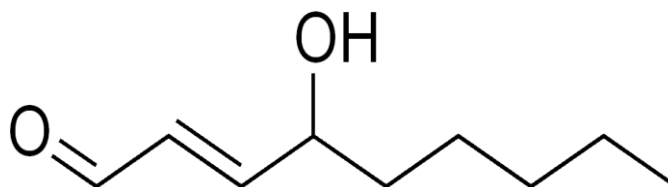
#### 1.7.6. 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) – bioaktivni marker oksidacijskog stresa

HNE je  $\alpha,\beta$  – nezasićeni hidroksialkenal koji se stvara u stanicama putem lipidne peroksidacije, a njegova molekulska masa iznosi 156,22. Slabo je topiv u vodi, ali je topiv u većini organskih otapala poput alkohola, kloroforma i heksana. U usporedbi s ostalim produktima lipidne peroksidacije, HNE se pokazao najzanimljivijim zbog njegove izrazito elektrofilne prirode. Ima tri funkcionalne skupine: aldehidnu (C=O), ugljik-ugljik dvostruku vezu (C=C) i hidroksilnu skupinu (OH), poput svih ostalih 4-hidroksialkenala. Navedene skupine u kemijskim reakcijama mogu sudjelovati same ili u sekvencama, a koja će skupina reagirati, ovisi o tipu reaktanata i samim uvjetima reakcije [75, 110]. Mitohondriji su stanični organeli eukariotskih stanica koji nam služe kao izvor energije, a stvaranje i katabolizam 4-HNE odvija se u mitohondrijima. Za vrijeme oksidativne fosforilacije dolazi do stvaranja ATP-a, a također nastaje i značajna količina superoksida na kompleksu I i III elektronskog transportnog lanca. Pomoću SOD-a većina superoksida pretvara se u vodikov peroksid. Zapravo HNE nastaje raspadanjem hidroksiperoksida od  $\omega$ -6 PUFA na sn-2 mjestu glicerofosfolipida u staničnim membranama, a u svom kemijskom sastavu fosfolipidi sadrže linoleinsku i arahidonsku kiselinu koje se smatraju glavnim izvorom HNE-a [111].

Općenito, HNE se smatra "sekundarnim toksičnim glasnikom slobodnih radikala" koji se u nižim koncentracijama (fiziološkim) nalazi u normalnom tkivu gdje djeluje kao signalna molekula pokazujući određene biološke aktivnosti (Slika 3). Stoga, u nižim koncentracijama stimulira neutrofilnu kemotaksiju, inhibira ekspresiju c-myc onkogene, aktivira c-jun/jun kinaza/AP-1 put, aktivira adenilat kinaze plazma membrane, aktivira membransku fosfolipazu C, a djeluje i na cikline kao i na aktivnost transkripcijskih čimbenika, dok je u velikim koncentracijama HNE citotoksičan i mutagen te djeluje na inhibiciju DNK i ribonukleinske kiseline (RNK), također inhibira i sintezu bjelančevina, uzrokuje disfunkciju mitohondrija i zaustavlja stanični ciklus što doprinosi nastanku određenih bolesti. U koncentracijama od 100  $\mu$ M i više HNE uzrokuje akutnu citotoksičnost što u većini slučajeva dovodi do smrti stanice [74, 112]. HNE je izrazito elektrofilna molekula te može lako reagirati s molekulama niske molekulske težine poput glutationa, lipida, bjelančevina, a u većim koncentracijama i s DNK. Esterbauer i suradnici pokazali su kako HNE stvara Michaelove adukte preko C-3 atoma sa sulfhidrilnom skupinom od Cys ostataka, imidazolsku skupinu od His ostataka i  $\epsilon$ -amino skupine

od Lys ostataka na velikom broju bjelančevina [113]. Parola i njegovi suradnici su istraživali HNE in vivo te su pokazali kako je bila dosegnuta koncentracija HNE iznad 10  $\mu\text{M}$  u različitim patološkim stanjima u kojima je bila povećana lipidna peroksidacija, a to se odnosilo na aterosklerozu, upalna stanja, kronične degenerativne bolesti SŽS-a i kronične bolesti jetre [114]. Yang i suradnici opisali su stvaranje HNE-a kao produkta LPO te njegovih epoksida (epoksi-4-hidroksinonenala) u plućnom tkivu pušača [115].

U stanicama količina HNE-a i njegovih proteinskih spojeva najčešće je postojana zbog balansa između stvaranja aldehida i njihovog katabolizma. Jednom kad nastane HNE, brzo dolazi do njegove degradacije preko tri glavne kemijske reakcije: redukcija do 1,4-dihidroksi-2-nonenala pomoću alkohol dehidrogenaze, oksidacija do 4-hidroksi-2-nonenoične kiseline putem aldehyd dehidrogenaze ili stvaranje glutation konjugata (GS-HNE) pomoću glutation-transferaze (GST). HNE se većinom metabolizira stvarajući GSH-konjugate koristeći enzim GST, potom dalje prelazi u merkapturnu kiselinu i izlučuje se mokraćom. Glutacion-transferaza je enzim koji je ubikvitarni, a najviše se nalazi u jetri i pomoću nje HNE se neenzimatski detoksicira konjugacijom s glutationom [75, 88].



**Slika 3.** Prikaz strukture 4-hidroksi-2 nonenal (HNE) (preuzeto iz Tullberg i suradnici 2016.)  
izvor: Tullberg C, Larsson K, Carlsson NG, Comi I, Scheers N, Vegarud G, Undeland I. Formation of reactive aldehydes (MDA, HHE, HNE) during the digestion of cod liver oil: comparison of human and porcine in vitro digestion models. Food Funct 2016; 7(3): 1401-1412.

### 1.7.7. Imunohistokemijska pojavnost HNE u različitim tumorima

O ulozi lipidne peroksidacije u karcinogenezi čovjeka još uvijek ne znamo dovoljno, ali ipak dobro je poznat utjecaj LPO na patogenezu različitih malignih tumora. Dosadašnja imunohistokemijska istraživanja otkrila su dvojaku ulogu HNE koja se očituje ne samo kroz njegovu ulogu u karcinogenezi, već i njegovu važnu ulogu u obrani domaćina protiv raka. Stoga, ovisno o koncentraciji HNE djeluje ili citotoksično ili utječe na regulaciju rasta stanica, a kako će zapravo djelovati, ovisi o njegovoj koncentracijskoj razini. Međutim, s druge pak strane važno je naglasiti kako upalno stanje organizma utječe ne samo na karcinogenezu već isto tako i na obranu domaćina protiv raka [116].

Imunohistokemijska analiza tumora mozga astrocitnog porijekla pokazala je povećanje HNE-imunopozitiviteta u tumorskim stanicama s povećanjem gradusa njihove malignosti [116, 117]. U tumorskim stanicama anaplastičnog ependimoma također je primijećena povišena nazočnost HNE imunopozitiviteta u usporedbi s benignim ependimomima. Istraživanja tumora SŽS-a pokazala su značajnu ekspresiju HNE u endotelnom i vaskularnom zidu gotovih svih tumorskih krvnih žila astrocitoma i ependimoma [93, 116].

Rak debelog crijeva kod ljudi je prema učestalosti na trećem mjestu, a mutacija i transformacija normalnih enterocita u karcinomske stanice najčešće su potaknuti slobodnim radikalima koji uzrokuju oštećenja makromolekula debelog crijeva. U dosadašnjim imunohistokemijskim istraživanjima vidljivo je povećanje akroleina od njegove srednje razine u tubularnom ili vilotubularnom adenomu do obilne razine u vilotubularnom adenomu visokog gradusa i u Duke's A stadiju adenokarcinoma kolona [116, 118], dok je druga skupina istraživača dobila suprotne rezultate, došlo je do smanjenja ekspresije HNE u tkivu karcinoma u usporedbi sa zdravim tkivom, a najvjerojatnije zbog nedostatka TGF $\beta$ 1 receptora [116, 119]. Imunohistokemijska pojavnost 8-hidroksi2'-deoksigvanozin (8-OHdG) i HNE proteinskih konjugata u tumorima bubrega pokazala se različitom, ovisno o histološkom podtipu tumora. Tako je pronađena veća količina 8-OHdG u humanom staničnom karcinomu bubrega (RCC, engl. Renal cell carcinoma) za razliku od okolnog netumorskog tkiva bubrega, navodeći nas na zaključak da je DNK u RCC mnogo izloženija ROS-u nego DNK netumorskog tkiva. Imunohistokemija (IH) HNE proteinskih konjugata bila je pozitivna u citoplazmi dok u normalnim nemaligim stanicama karcinoma bubrega nije bilo imunopozitiviteta. U procjeni

oksidacijskog stresa u zdravim ili malignim stanicama bubrega druga su istraživanja pokazala lokalizaciju HNE proteinskih konjugata predominantno u jezgrama i mitohondrijima kako u benignom tako i u malignom epitelu bubrega [120]. Također, u istraživanju imunohistokemijske ekspresije 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksigvanozina (8-oxodG) u citoplazmi tumorskih stanica raka debelog crijeva istraživači su pronašli pozitivnu korelaciju 8-oxodG s višim gradusom tumora i s lošijim kliničkim ishodom kod bolesnika [153]. Analize oksidacijskog stresa u karcinomima prostate pokazala su da proteinski konjugati akroleina više su prisutni u tkivu karcinoma prostate koji je recidivirajući, za razliku od tkiva karcinoma bolesnika koji nemaju recidiv nakon radikalne prostatektomije, stoga se prisutnost akroleina povezuje s progresijom karcinoma prostate [121]. U dobroćudnim i zloćudnim tumorima štitne žlijezde istraživači su također analizirali imunohistokemijsku razinu pojavnosti HNE i 8-OHdG te su biomarkere oksidacijskog stresa uspoređivali s normalnim tkivnom štitnjače. Biomarkeri su bili značajno više zastupljeni u citoplazmi dobroćudnih folikularnih, zloćudnih folikularnih i papilarnih karcinoma za razliku od niže razine u jezgrama nemaligh stanica [122]. Karihtala i suradnici pokazali su značajno smanjenje ekspresije 8-OHdG u invazivnom karcinomu dojke za razliku od neinvazivnog karcinoma dojke dok je ekspresija najjače bila izražena u benignim stanicama unutar samog tumora. Osim toga, ovi autori istraživali su i HNE proteinske konjugate koji su pokazali snažniju ekspresiju u invazivnom karcinomu dojke nego u benignim tumorima [123]. Recentne studije u području respiratornog trakta također su pokazale snažnu povezanost ekspresije HNE s karcinomom pluća [124]. Iz gore navedenih različitih rezultata vidljiva je važna uloga LPO i oksidacijskog stresa u patofiziologiji i karcinogenezi različitih tumora.

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA**

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA**

### **2.1. Ciljevi istraživanja**

Osnovni su ciljevi ovog istraživanja:

1. Ispitati imunohistokemijsku pojavnost HNE u meningeomima gradusa I, gradusa II (atipični) i gradusa III (anaplastični).
2. Utvrditi distribuciju pojavnosti (ekspresije) u različitim gradusima prema sastavnicama tumorskog tkiva (osnovnim i stromalnim stanicama, tumorskim žilama i nekrozi).
3. Usporediti nazočnost (razinu) HNE u pojedinim gradusima s kliničko-patološkim čimbenicima kao što su podtip tumora, tumorsko sjelo, recidiv i invazivnost tumora, prethodna ozračenost tumora ili prethodno radiokirurško liječenje tumora.

### **2.2. Hipoteza**

Nazočnost 4-hidroksinonenala (HNE) kao konačnoga produkta lipidne peroksidacije bit će izražena različito u tumorskom tkivu različitih gradusa, pri čemu će intenzitet imunohistokemijske reakcije na HNE-proteinske konjugate biti izraženiji u višim histološkim gradusima tumora (G II i G III), nego u nižem gradusu (G I), kao i unutar recidivirajućih tumora.

### **3. MATERIJALI I METODE**



### **3. MATERIJALI I METODE**

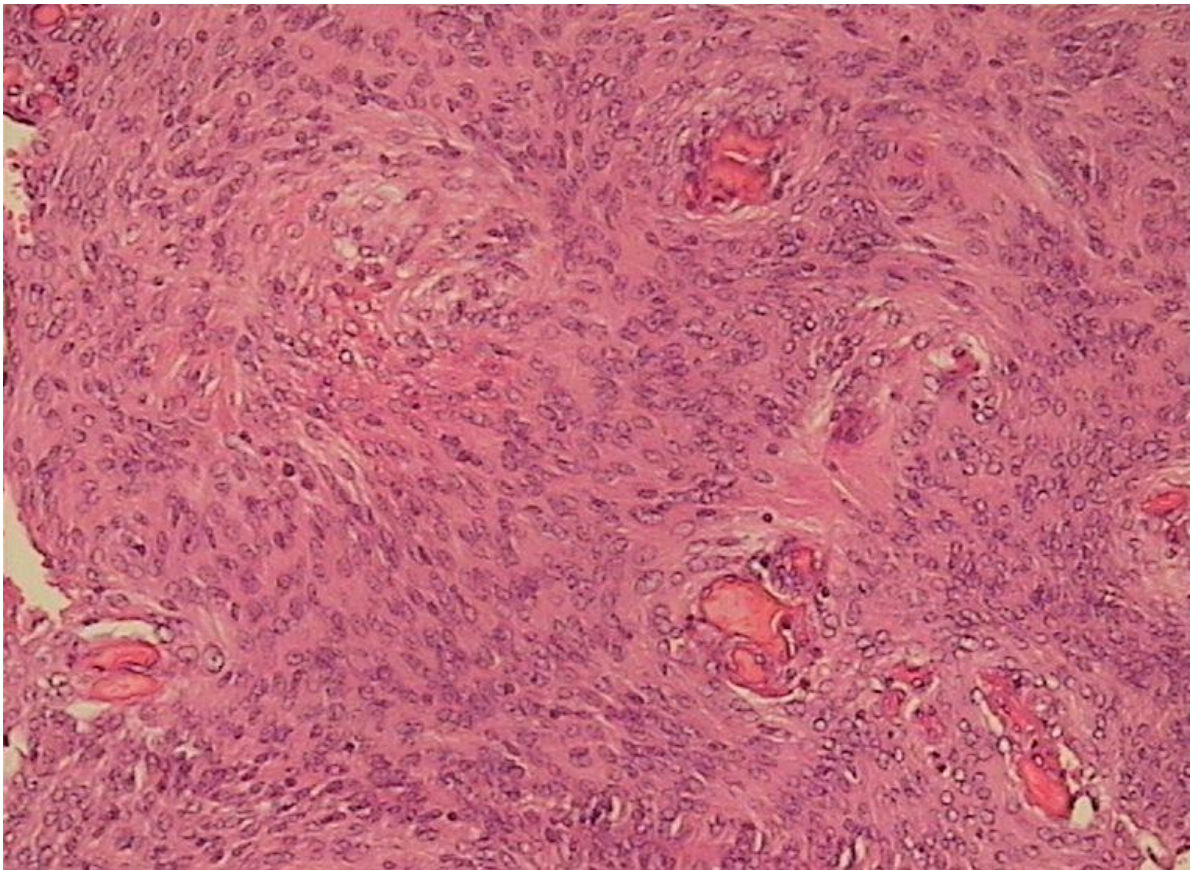
Istraživanje je provedeno u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

#### **3.1. Ispitanici**

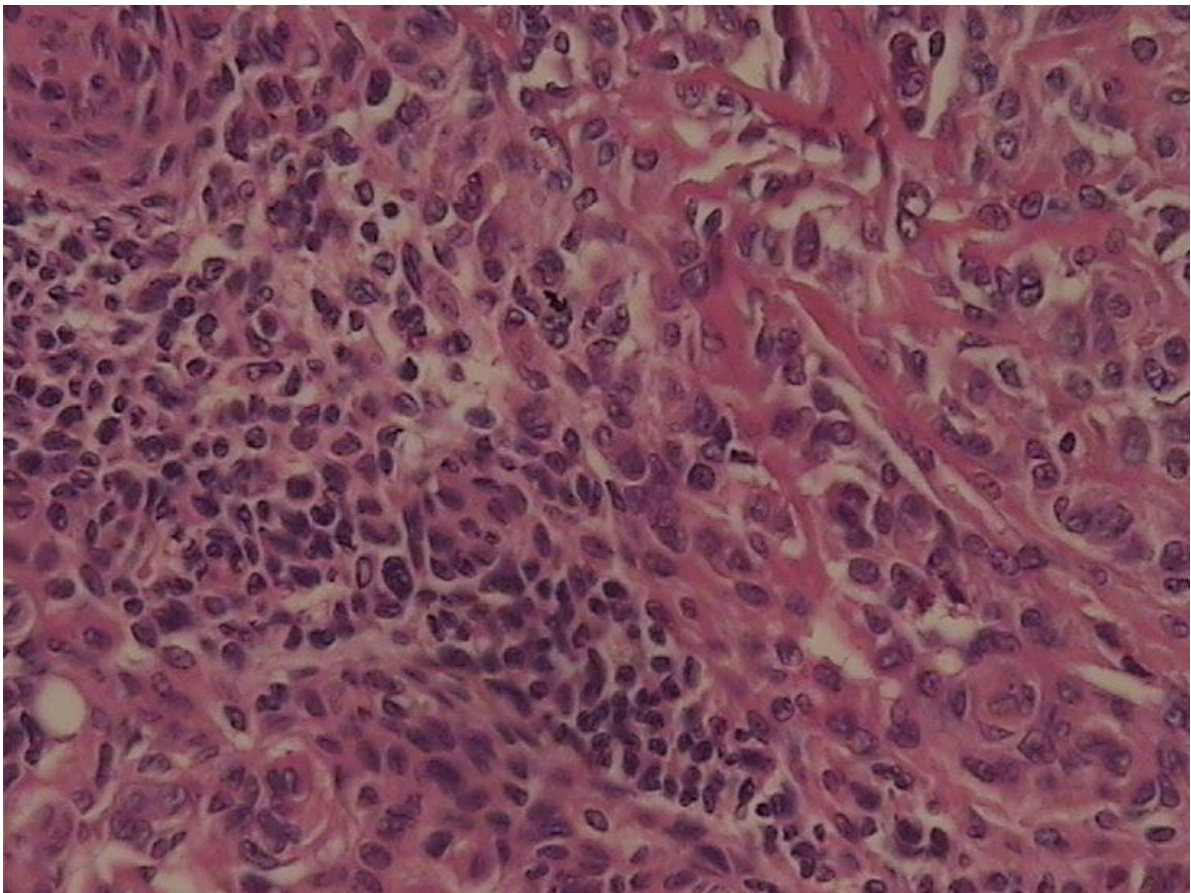
Istraživanje lipidne preoksidacije je retrospektivno i provedeno je na arhivskom bioptičkom materijalu Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju, Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Istraživanje je provedeno na ukupno 234 kirurški odstranjena meningeoma, od toga 100 uzoraka je gradus I, drugih 100 uzoraka je gradus II, a 34 uzorka su gradus III. Bolesnici su bili operirani u Klinici za neurokirurgiju KBC Zagreb, a isti su tumori bili obrađeni u Zavodu za neuropatologiju Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KBC Zagreb. Koristili su se parafinski blokovi iz vremenskog perioda od 2004. do 2014. godine, međutim, zbog nedostatka manjeg broja parafinskih blokova u ovom vremenskom periodu, jedan manji dio parafinskih blokova izuzet je iz 2015. godine. Istraživanje je provedeno na uzorcima meningeoma koji zadovoljavaju sva histološka mjerila prema klasifikaciji tumora SŽS prema SZO. Od kliničkih podataka gledao se spol (ženski i muški), dob u trenutku postavljanja dijagnoze, sjelo tumora (intrakranijski ili intraspinalno), prethodna ozračenost ili radiokirurško liječenje bolesnika i recidivitet tumora, a od patohistoloških gledala se invazivnost tumora, podtip tumora (meningotelijalni, tranzicionalni, fibrozni, psamomatozni, angiomatozni, mikrocistični, sekretorni, limfoplazmacitni, metaplastični, hordoidni, atipični, meningeom svijetlih stanica, papilarni, rabdoidni i anaplastični meningeom), gradus tumora: (gradus I, gradus II (atipični) i gradus III (anaplastični)). Kod svih tumora ponovno je utvrđena patohistološka dijagnoza meningeoma, podtip, gradus tumora, invazivnost tumora i relevantni klinički podatci. Za sve bolesnike prikupljeni su podatci o spolu, dobi u trenutku postavljanja dijagnoze, prethodnoj ozračenosti ili prethodnom radiokirurškom liječenju. Podatci su prikupljeni iz arhiviranih patohistoloških nalaza s Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju te iz povijesti bolesti Klinike za neurokirurgiju, KBC-a Zagreb.

### **3.2. Obrada uzoraka i priprema tkiva za svjetlosnu mikroskopsku analizu**

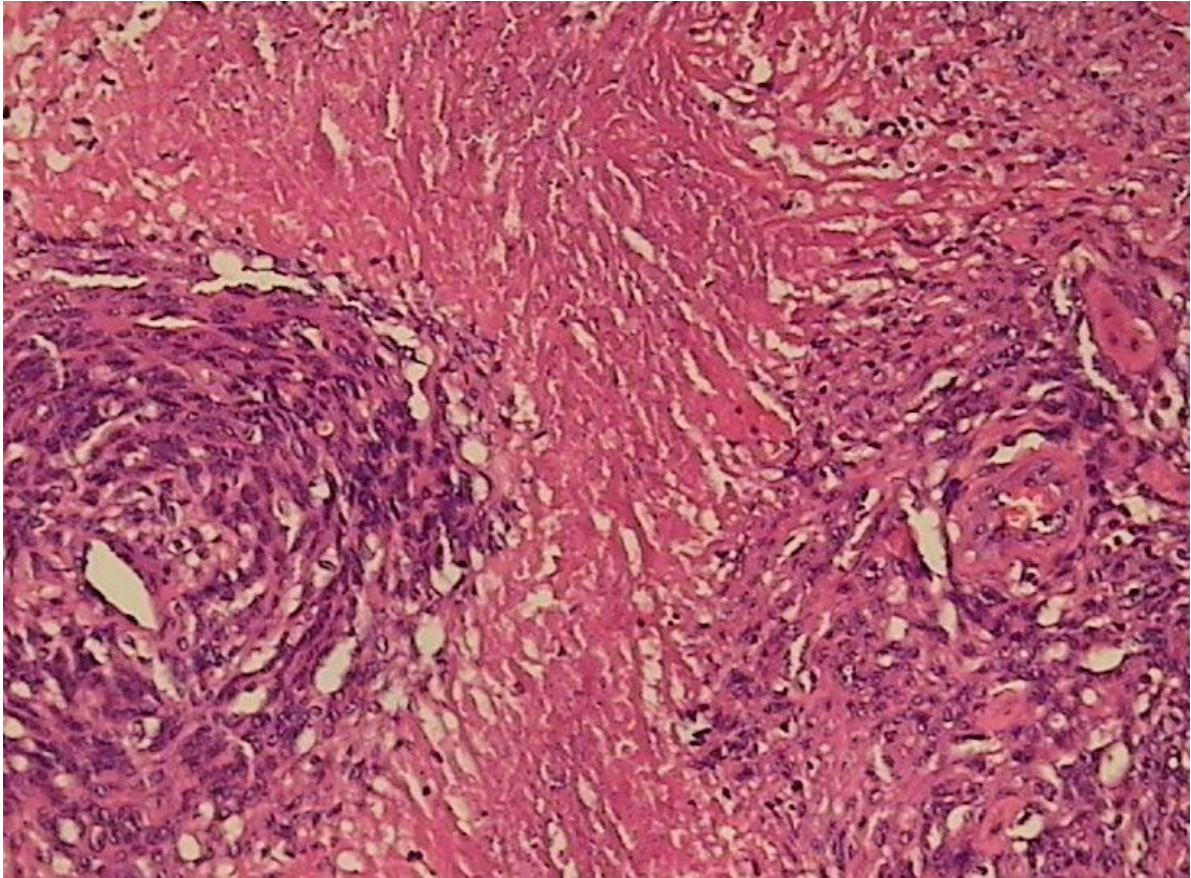
Operacijom dobiveni uzorci meningeoma obrađeni su standardnom histološkom metodom koja uključuje 12-24 satnu fiksaciju u 10%-tnom puferiranom formalinu te dehidraciju u etanolu rastućih koncentracija (70%, 80%, 96% i 100%). Tkivo je potom bilo provedeno kroz ksilol te prožeto u tekućem parafinu na temperaturi od +60°C, nakon čega je uklopljeno u parafinske blokove. Tako uklopljeno tkivo bilo je ohlađeno na +4°C, te je bilo rezano na kliznom mikrotomu na rezove debljine 4-5 µm. Ovi rezovi nakon deparafiniranja u ksilolu i dehidracije u opadajućem nizu koncentracije etanola (100%, 96%, 80% i 70%) bili su obojeni histokemijskom tehnikom na hemalaun-eozin (HE). Na HE preparatima ponovno je procijenjena morfološka građa tumorskog tkiva obzirom na izgled stanica i jezgara, proliferaciju endotela krvnih žila, prisutnost nekroza i mitozu te se potvrdio meningeom. Prema novim smjernicama SZO-a odredio se histološki gradus tumora, a postoje tri histološka gradusa tumora koja se određuju prema broju mitozu, gubitku lobulirane arhitekture, povećanju celularnosti, invaziji mozga, stvaranju malih stanica i uočljivih nukleola, atipiji stanica te pojavnosti nekroze (Slika 4, 5 i 6). Potom se odabrao reprezentativni parafinski blok koji se rezao za daljnja imunohistokemijska bojanja.



**Slika 4.** Prikaz meningeoma histološkog gradusa I (bojanje HE)



**Slika 5.** Prikaz meningeoma histološkog gradusa II (bojanje HE)



**Slika 6.** Prikaz meningeoma histološkog gradusa III (bojanje HE)

### **3.3. Imunohistokemijsko bojanje preparata monoklonskim protutijelom na HNE – histidinske konjugate**

Parafinski rezovi tumorskog tkiva debljine 4-5  $\mu\text{m}$  bili su podvrgnuti procesu deparafiniranja ksilenom i rehidracije u opadajućem nizu koncentracija etanola, a potom su isti preparati bili uronjeni 2 minute u metanol. Nakon ispiranja u fiziološkoj otopini puferiranoj s fosfatnim puferom, pH 7,2 (engl. phosphate buffered saline, PBS) endogena peroksidazna aktivnost bila je blokirana s 3%-tnim vodikovim peroksidom. Za imunohistokemijsko (IH) bojanje primarnim monoklonskim protutijelom anti-HNE razrijeđeno u omjeru 1:10 u BSA (engl. bovine serum albumin) koncentracije 1 mg/mL korišten je EnVision kit (K8000, DAKO). Primarno monoklonalno HNE protutijelo podrijetlom je iz kulture klona 'HNE 1g4' dobivenog spajanjem Sp2-Ag8 mijelomskih stanica s B-stanicama BALBc miševa imuniziranih s HNE modificiranim hemocijaninom. Protutijelo je specifično za HNE-histidinski epitop na HNE proteinskim konjugatima. HNE proteinski konjugati prisutni u stanicama prikazani su diaminobenzidinom (DAB, DAKO) kao smeđe obojenje i kontrastirani s hematoksilinom (Kemika, Zagreb, Hrvatska). Uz svako bojanje izrađuje se pozitivna i negativna kontrola. Pozitivna kontrola su bile stanice tretirane 1 $\mu\text{M}$ , 5 $\mu\text{M}$  i 50  $\mu\text{M}$  HNE-om, a negativna kontrola bile su stanice netretirane HNE-om te tkiva tumora na koje nije aplicirano primarno protutijelo HNE. Pozitivna kontrola bilo je tkivo s imunohistokemijski pozitivnom reakcijom kulture HeLa stanica tretirane s 100  $\mu\text{M}$  HNE.

### 3.4. Analiza imunohistokemijskih preparata

Procjena HNE imunopozitiviteta analizirana je svjetlosnom mikroskopom tehnikom semikvantitativne analize. Analiza procjene HNE imunopozitiviteta u citoplazmama i/ili jezgrama stanica temeljila se na četiri različita načina u odnosu na postotak pozitivnih stanica: (-) nema pozitiviteta u tumorskim stanicama, (+) imunopozitivitet u citoplazmi <25% tumorskih stanica, (++) 25-50% imunoreaktivnih tumorskih stanica, (+++) >50% imunoreaktivnih tumorskih stanica. Međutim, zbog potreba u statističkoj obradbi podataka znakove smo pretvorili u brojeve: (-) = 0, (+) = 1, (++) = 2, (+++) = 3, (-/+ ) = 4, (++)/ (++++) = 5. Tehnika semikvantitativne analize korištena je i pri procjeni imunoreaktivnosti na HNE endotelnih stanica krvnih žila, nekrotičnih područja, mezenhimske strome i upalnog infiltrata u stromi. Tako je negativna reakcija na HNE ocijenjena kao "0", a pozitivna reakcija na HNE kao "1". Patohistološki preparati bili su i pregledani pod svjetlosnim mikroskopom pri povećanju 200x te su ustanovljeni imunopozitiviteti tumorskih stanica i strome, a potom je bilo odabrano područje s najvećim brojem krvnih žila u tumoru kako bi se odredio imunopozitivitet krvne žile (endotel, stijenka i sadržaj krvne žile). Jačina intenziteta bojanja preparata podijeljena je u tri skupine: slaba imunoreakcija – žućkasto bojanje, umjerena imunoreakcija - smečkasto bojanje i jaka imunoreakcija – tamno smeđe bojanje. Svi preparati su bili pregledani od dva iskusna patologa.

### 3.5. Statistička obrada podataka

Podaci su prikazani tablično i grafički. U prikazu su se koristili uobičajeni načini semi-kvantitativnog vrednovanja imunohistokemijske reakcije. Pojavnost HNE u meningeomima gradusa I, gradusa II (atipični) i gradusa III (anaplastični), kao i raspodjela HNE prema sastavnicama tumorskog tkiva (osnovnim i stromalnim stanicama, tumorskim žilama, nekrozi) prikazana je kroz apsolutne brojeve i odgovarajuće učestalosti, dok se međusobna razlika između pojedinih gradusa analizirala  $\chi^2$  testom. Razlike u dobi između skupina prema gradusu tumora analizirane su Kruskal-Wallis-ovim testom. Za međusobne pojedinačne usporedbe koristila se dodatna korekcija P-vrijednosti prema Bonferroniju. Kendallov tau\_b korelacijski koeficijent koristio se u prikazu povezanosti nazočnosti (razine) HNE s ostalim kliničko-patološkim čimbenicima. Sve P-vrijednosti manje od 0,05 su smatrane statistički značajnima. U analizi se koristila programska podrška IBM SPSS Statistics verzija 24.0.0.1 i programsko okruženje R (verzija 3.4.3, <https://cloud.r-project.org/>).

## **4. REZULTATI**



## 4. REZULTATI

### 4.1. Analiza obilježja tumora odabranih za imunohistokemijsku obradu

U istraživanje je uključeno 234 bolesnika oboljela od meningeoma različitih gradusa. Tako smo analizirali 100 uzoraka meningeoma gradus I, 100 uzoraka meningeoma gradus II i 34 uzorka meningeoma gradus III. Učinjena je analiza spolne i dobne raspodjele, raspodjele po podtipu tumora, raspodjela po sijelima tumora, potom raspodjela po lokalizaciji tumora te po prethodnoj ozračenosti tumora ili prethodnom radiokirurškom liječenju bolesnika i po recidivu tumora.

U ukupnom broju ispitanika koji su imali meningeom G I bilo je 22 (22%) muškarca i 78 (78%) žena, u G II bilo je 39 (39%) muškaraca i 61 (61%) žena, dok je u G III meningeomu bilo 19 (55.9%) muškaraca i 15 (44.1%) žena. Usporedba spolne raspodjele ispitanika obzirom na gradus tumora prikazana je u Tablici 1. Analizom sva tri gradusa prisutne su značajne razlike u spolnoj raspodjeli na razini  $P < 0,001$ . Dodatnom analizom razvidno je da muškaraca ima značajno više u meningeomima gradusa II u odnosu na gradus I (39,0% naprema 22,0%;  $P = 0,027$ ) i kod gradusa III u odnosu na gradus I (55,9% naprema 22,0%,  $P = 0,001$ ). Ženski spol bio je značajno više zastupljen u meningeomima gradusa I.

**Tablica 1.** Usporedba spolne raspodjele ispitanika obzirom na gradus tumora

		Gradus tumora					
		I		II		III	
		Broj ispitanika	%	Broj ispitanika	%	Broj ispitanika	%
Spol	Muški	22	(22,0%)	39	(39,0%)	19	(55,9%)
	Ženski	78	(78,0%)	61	(61,0%)	15	(44,1%)

Analizirali smo dob kad je bolesnik obolio od meningeoma. Prosječna dob bolesnika u G I meningeomima bila je 57,7 godina, u G II je nešto viša 59,1, dok je u G III meningeomima prosječna dob ispitanika također bila 57,7 godina. Usporedba dobi ispitanika obzirom na gradus tumora vidljiva je u Tablici 2 i nije bilo statistički značajnih razlika.

**Tablica 2.** Usporedba dobi ispitanika obzirom na gradus tumora

Gradus tumora	Broj ispitanika	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile			
						25.	Medijan	75.	
Dob	I	100	57,73±	13,14	24	87	51,25	57,00	67,00
	II	100	59,11±	14,82	3	84	51,25	62,00	69,75
	III	34	57,76±	15,16	14	82	49,75	59,50	68,00

Legenda: SD – standardna devijacija

Podtipove meningeoma klasificirali smo prema SZO iz 2016 godine, a usporedba podtipova meningeoma obzirom na gradus tumora prikazana je u Tablici 3. Od svih podtipova u meningeomima G I najčešće je bio zastupljen meningotelijalni podtip (43%), potom fibromatozni podtip (25%), zatim slijedi tranzicionalni (20%), dok su drugi podtipovi sporadično zastupljeni. U G II najzastupljeniji je bio atipični podtip meningeoma (96%), a u G III najčešći je anaplastični podtip (97,1%). Iako je prisutna značajna razlika kada se gledaju ukupne usporedbe sva tri gradusa sa svim podtipovima meningeoma pri međusobnoj usporedbi svakog gradusa pojedinačno, unutar pojedinih podtipova te razlike nisu bile statistički značajne.

**Tablica 3.** Usporedba podtipova meningeoma obzirom na gradus tumora

		Gradus tumora					
		I		II		III	
		Broj ispitanika	%	Broj Ispitanika	%	Broj ispitanika	%
Podtip	Meningotelijalni	43	(43,0%)	0	(0,0%)	0	(0,0%)
	Fibromatozni	25	(25,0%)	0	(0,0%)	0	(0,0%)
	Psamomatozni	4	(4,0%)	0	(0,0%)	0	(0,0%)
	Tranizicionalni	20	(20,0%)	0	(0,0%)	0	(0,0%)
	Angiomatozni	3	(3,0%)	0	(0,0%)	0	(0,0%)
	Mikrocistični	4	(4,0%)	0	(0,0%)	0	(0,0%)
	Metaplastični	1	(1,0%)	0	(0,0%)	0	(0,0%)
	Atipični	0	(0,0%)	96	(96,0%)	0	(0,0%)
	Klarocelularni	0	(0,0%)	2	(2,0%)	0	(0,0%)
	Hordoidni	0	(0,0%)	2	(2,0%)	0	(0,0%)
	Anaplastični	0	(0,0%)	0	(0,0%)	33	(97,1%)
	Papilarni	0	(0,0%)	0	(0,0%)	1	(2,9%)

Gledali smo lokalizaciju tumora u meningeomima G I te je kod 42 (42%) ispitanika lokalizacija bila u području baze lubanjske osnovice, u 34 (34%) ispitanika bila je frontotemporalna lokalizacija duž konveksiteta mozga, 15 (15%) obuhvaćalo je ostalo (druge lokalizacije), a 9 (9%) ispitanika imali su lokalizaciju u području kralježničnog kanala. U meningeomima G II najčešća lokalizacija tumora bilo je frontotemporalno područje duž konveksiteta mozga kod 45 (45%) ispitanika, potom područje baze lubanjske osnovice 26 (26%) ispitanika, ostale lokalizacije obuhvaćale su 26 (26%) i kralježnični kanal 3 (3%) ispitanika. Usporedba gradusa tumora obzirom na lokalizaciju tumora prikazana je u Tablici 4).

**Tablica 4.** Usporedba gradusa tumora obzirom na lokalizaciju tumora

		Gradus tumora					
		I		II		III	
		Broj ispitanika	%	Broj ispitanika	%	Broj ispitanika	%
Lokalizacija	Baza lubanje	42	(42,0%)	26	(26,0%)	15	(44,1%)
	Frontotemporalno	34	(34,0%)	45	(45,0%)	11	(32,4%)
	Kralježnični kanal	9	(9,0%)	3	(3,0%)	1	(2,9%)
	Ostalo	15	(15,0%)	26	(26,0%)	7	(20,6%)

Analizirali smo i sijelo tumora u G I meningeomima, kod 92 (92%) ispitanika bilo je prisutno intrakranijsko sijelo, a intraspinalno sijelo nalazilo se u 8 (8%) ispitanika. U G II meningeomima 96 (96%) ispitanika su imali intrakranijski smještaj tumora, a 4 (4%) ispitanika intraspinalni smještaj, dok u G III meningeomima 32 (94,1%) ispitanika imala su intrakranijsko sijelo, a 2 (5,9%) ispitanika su imala intraspinalno sijelo. U Tablici 5 vidljiva je usporedbe gradusa tumora obzirom na sijelo tumora i nisu zabilježene statistički značajne razlike.

**Tablica 5.** Usporedba gradusa tumora obzirom na sijelo tumora

		Gradus tumora					
		I		II		III	
		Broj ispitanika	%	Broj ispitanika	%	Broj ispitanika	%
Sijelo tumora	Intrakranijski	92	(92,0%)	96	(96,0%)	32	(94,1%)
	Intraspinalno	8	(8,0%)	4	(4,0%)	2	(5,9%)

Iz analize rezultata recidiviranja tumora u meningeomima G I vidljivo je da 92 (92%) ispitanika nije imalo recidiv bolesti, a 8 (8%) ispitanika je imalo recidiv. U G II meningeomima 82 (82%) ispitanika nije imalo recidiv, a 18 (18%) ispitanika ga je imalo. U G III meningeomima 18 (52,9%) ispitanika nije imalo recidiv, a u 16 (47,15) ispitanika recidiv je bio prisutan. Usporedba gradusa tumora obzirom na recidiv tumora prikazana je u Tablici 6. Prema tome, vidljivo je da s porastom gradusa tumora češće se javljaju i recidivi tumora ( $P < 0,001$ ).

**Tablica 6.** Usporedba gradusa tumora obzirom na recidiv tumora

		Gradus tumora					
		I		II		III	
		Broj ispitanika	%	Broj ispitanika	%	Broj ispitanika	%
Recidiv	ne	92	(92,0%)	82	(82,0%)	18	(52,9%)
	da	8	(8,0%)	18	(18,0%)	16	(47,1%)

#### 4.2. Imunohistokemijska nazočnost 4-hidroksinonenala u meningeomima

Pojavnost (ekspresija) HNE-a imunohistokemijski je bila prikazana u tumorskim stanicama meningeoma različitih gradusa. U tumorskim stanicama pojava HNE-a vidljiva je u citoplazmama tumorskih stanica i tumorskoj stromi, ali ne i u jezgrama tumorskih stanica, osim u jednom sporadičnom slučaju. Nazočnost, HNE-a bila je prisutna u sadržaju krvnih žila, ali njegova prisutnost nije bila zabilježena u endotelu i stijenci krvnih žila, osim sporadično u nekoliko ispitanika. Također, pojava HNE-a u upalnim stanicama tumorske strome nije bila zabilježena, osim u pojedinim slučajevima.

Rezultati usporedbe gradusa tumora obzirom na upalu strome prikazani su u Tablici 7 te je vidljiva niska odnosno slaba nazočnost HNE-a u uzorcima meningeoma G I i G II kod 3 (3%) ispitanika, a u G III uopće nije zabilježena nazočnost HNE-a. Nisu zabilježene statistički značajne razlike.

**Tablica 7.** Usporedba gradusa tumora obzirom na upalu strome

		Gradus tumora					
		I		II		III	
		Broj ispitanika	%	Broj ispitanika	%	Broj ispitanika	%
Upala strome	Ne	97	(97,0%)	97	(97,0%)	34	(100,0%)
	Da	3	(3,0%)	3	(3,0%)	0	(0,0%)

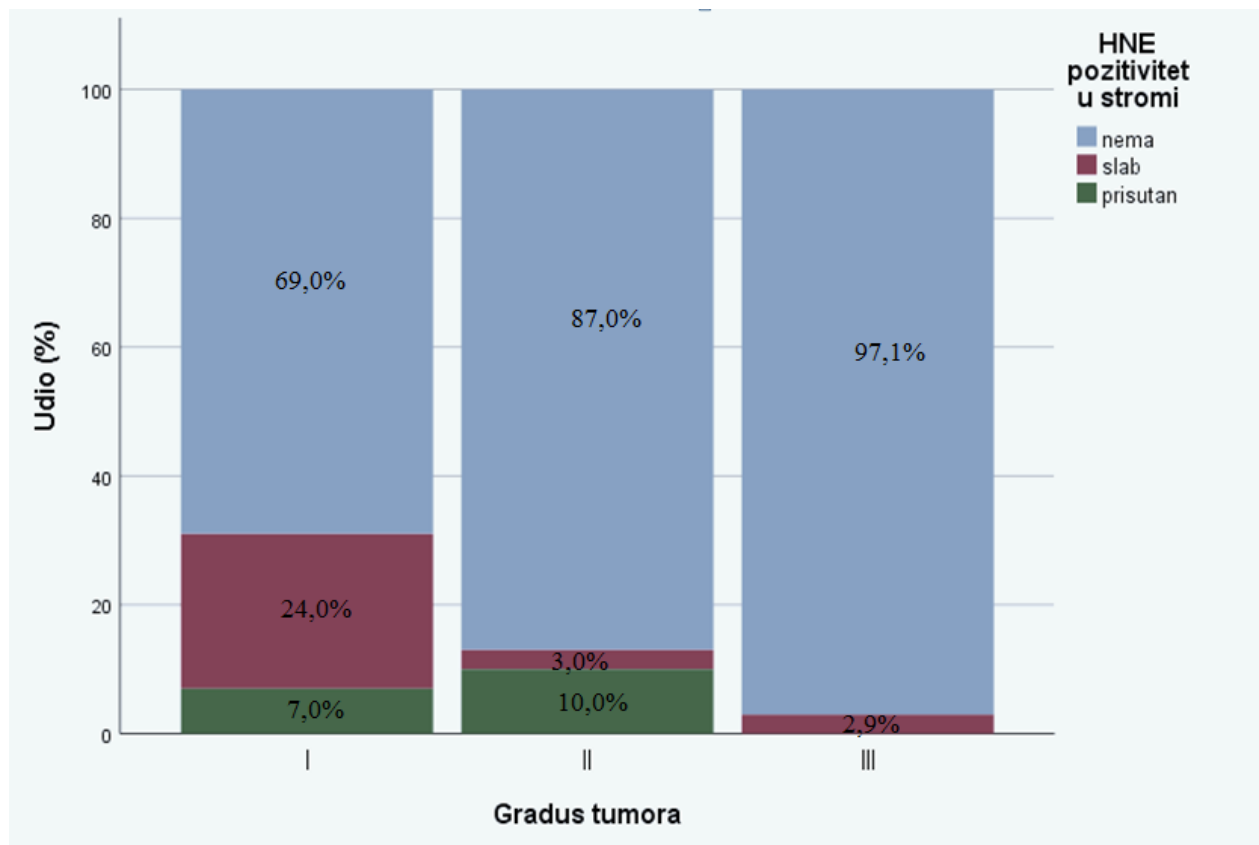
Rezultati nazočnosti HNE imunopozitiviteta u stromi tumora te njihova usporedba u odnosu na gradus tumora prikazani su u Tablici 8 i na Slici 7. U G I meningeomima stroma tumora nije bila HNE imunopozitivna u 69 (69%) uzoraka, slab imunopozitivitet pronađen je u 24 (24%) ispitanika, dok je prisutnost HNE imunopozitiviteta nazočna samo u 7 (7%) ispitanika. Stroma tumora u G II meningeomima nije pokazala imunopozitivitet u 87 (87%) ispitanika, slab HNE imunopozitivitet vidljiv je u 3 (3%) ispitanika, a prisutnost imunopozitiviteta je pronađena u 10 (10%) uzoraka. U G III meningeome nije bilo imunopozitiviteta u 33 (97,1%) ispitanika, slab imunopozitivitet u stromi vidljiv je u 1 (2,9%) ispitanika, a prisutnost HNE imunopozitiviteta u stromi nije zabilježena 0 (0%) ispitanika. Značajno je više tumora bez imunohistokemijske reakcije na HNE histidinske konjugate u

stromi u odnosu na one s pozitivnom imunoreakcijom kod sva tri gradusa ( $P < 0,001$ ). U međusobnim usporedbama slab HNE imunopozitivitet u stromi je značajno češći u tumorima gradusa I u odnosu na gradus II ( $P < 0,001$ ) i gradus III ( $P = 0,019$ ).

**Tablica 8.** Usporedba HNE imunopozitiviteta u stromi tumora obzirom na gradus tumora

		Gradus tumora					
		I		II		III	
		Broj ispitanika	%	Broj ispitanika	%	Broj ispitanika	%
HNE imunopozitivitet u stromi	Nema	69	(69,0%)	87	(87,0%)	33	(97,1%)
	Slab	24	(24,0%)	3	(3,0%)	1	(2,9%)
	Prisutan	7	(7,0%)	10	(10,0%)	0	(0,0%)

**Slika 7.** Grafički prikaz usporedbe HNE imunopozitiviteta u stromi tumora obzirom na gradus tumora



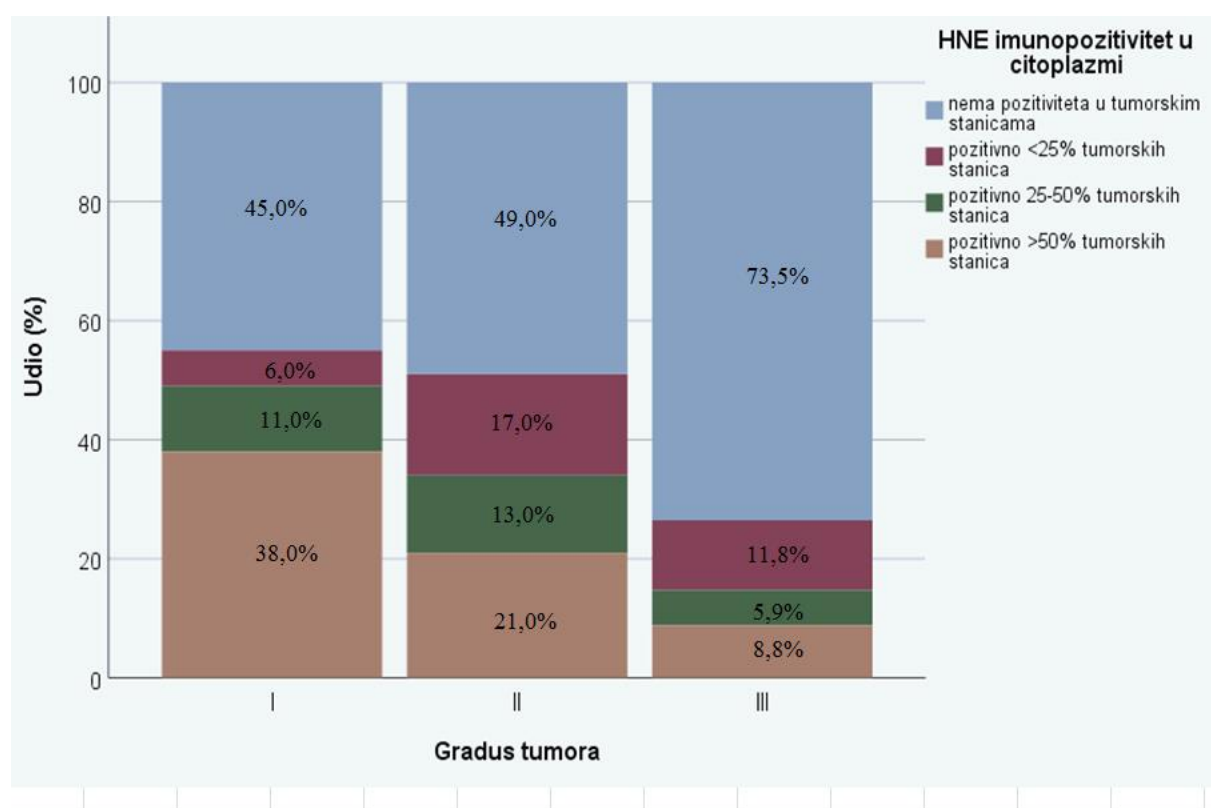
Rezultati patohistološke pojavnosti HNE-a u citoplazmama tumorskih stanica te njihova usporedba u odnosu na gradus tumora prikazani su u Tablici 9 i na Slici 8. U G I meningeomima nije bilo HNE imunopozitiviteta u 45 (45%) ispitanika, HNE imunopozitivitet <25% tumorskih stanica vidljiv je u 6 (6%) ispitanika, HNE imunopozitivitet između 25-50% nazočan je u 11 (11%) ispitanika, dok je HNE imunopozitivitet >50% tumorskih stanica bio prisutan u 38 (38%) ispitanika. Analizirajući G II tumore vidljivo je da nema HNE imunopozitiviteta u 49 (49%) ispitanika, HNE imunopozitivitet <25% tumorskih stanica prisutan je u 17 (17%) ispitanika, HNE imunopozitivitet 25-50% tumorskih stanica zabilježen je u 13 (13%) ispitanika, dok HNE imunopozitivitet >50% tumorskih stanica bio je prisutan u 21 (21%) ispitanika. Gledajući G III meningeome, vidljivo je da nema HNE imunopozitiviteta u 25 (73,5%) ispitanika, HNE imunopozitivitet <25% tumorskih stanica zamijećen je u 4 (11,8%) ispitanika, HNE imunopozitivitet između 25-50% tumorskih stanica zabilježen je u 2 (5,9%) ispitanika, a HNE imunopozitivitet >50% prisutan je u 3 (8,8%) ispitanika. U odnosu na sva tri gradusa, vidljive su statistički značajne razlike u HNE imunopozitivitetu u citoplazmi tumorskih stanica ( $P=0,002$ ; Tablica 9) koje su bile najizraženije u kategoriji bez pozitiviteta, a koja je značajno zastupljenija u skupini gradusa III u odnosu na gradus II (73,5% naprema 49,0%;  $P=0,039$ ) i u odnosu na gradus I (73,5% naprema 45,0%;  $P=0,012$ ). U gradus I meningeomu značajno više je bilo imunopozitivnih >50% tumorskih stanica nego u tumorima gradusa II ( $P=0,025$ ) i gradusa III ( $P=0,004$ ). Rezultati patohistološke analize imunohistokemijske nazočnosti HNE-a u citoplazmama tumorskih stanica u negativnoj su korelaciji s histološkim gradusom tumora te povećanjem gradusa tumora smanjuje se postotak pozitivnih stanica što je vidljivo na Slikama 10, 11 i 12.



**Tablica 9.** Usporedba HNE imunopozitiviteta u citoplazmi tumorskih stanica obzirom na gradus tumora

		Gradus tumora					
		I		II		III	
		Broj Ispitanika	%	Broj ispitanika	%	Broj ispitanika	%
HNE imunopozitivitet u citoplazmi tumorskih stanica	nema pozitiviteta u tumorskim stanicama	45	(45,0%)	49	(49,0%)	25	(73,5%)
	pozitivno <25% tumorskih stanica	6	(6,0%)	17	(17,0%)	4	(11,8%)
	pozitivno 25-50% tumorskih stanica	11	(11,0%)	13	(13,0%)	2	(5,9%)
	pozitivno >50% tumorskih stanica	38	(38,0%)	21	(21,0%)	3	(8,8%)

**Slika 8.** Grafički prikaz usporedbe HNE imunopozitiviteta u citoplazmi tumorskih stanica obzirom na gradus tumora

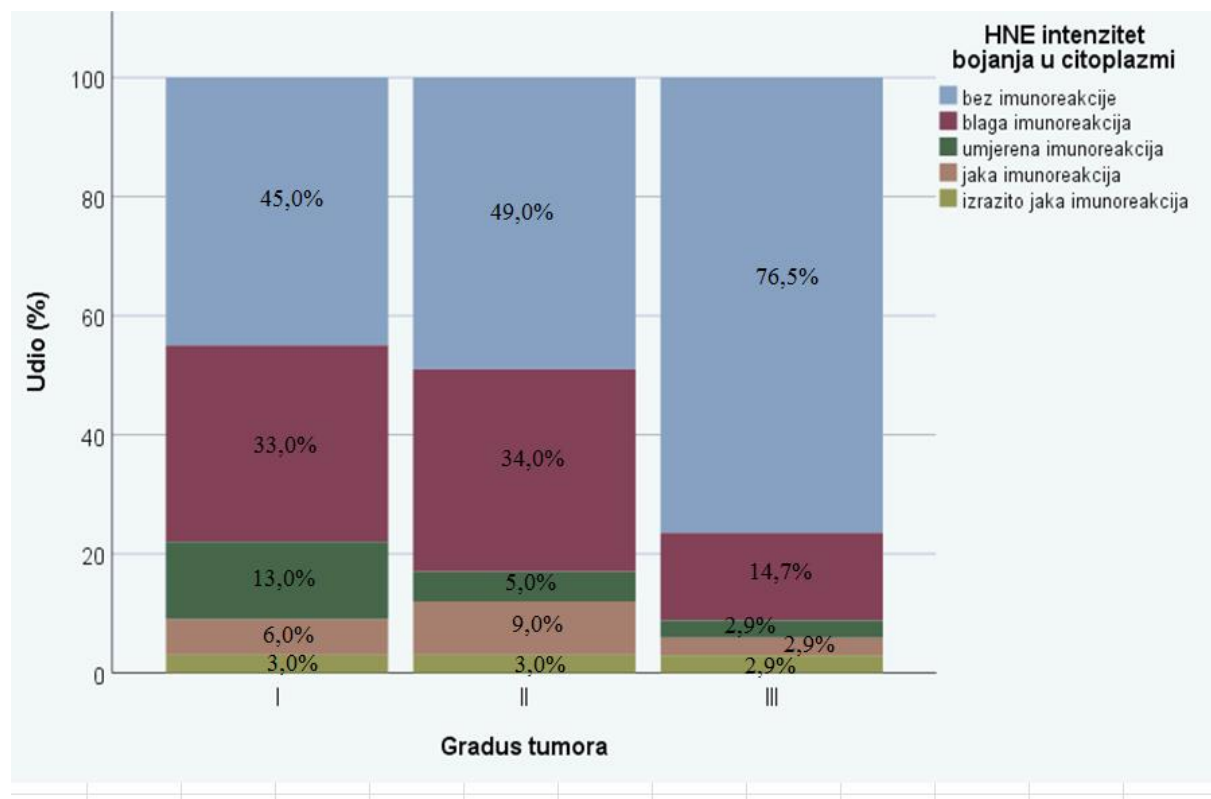


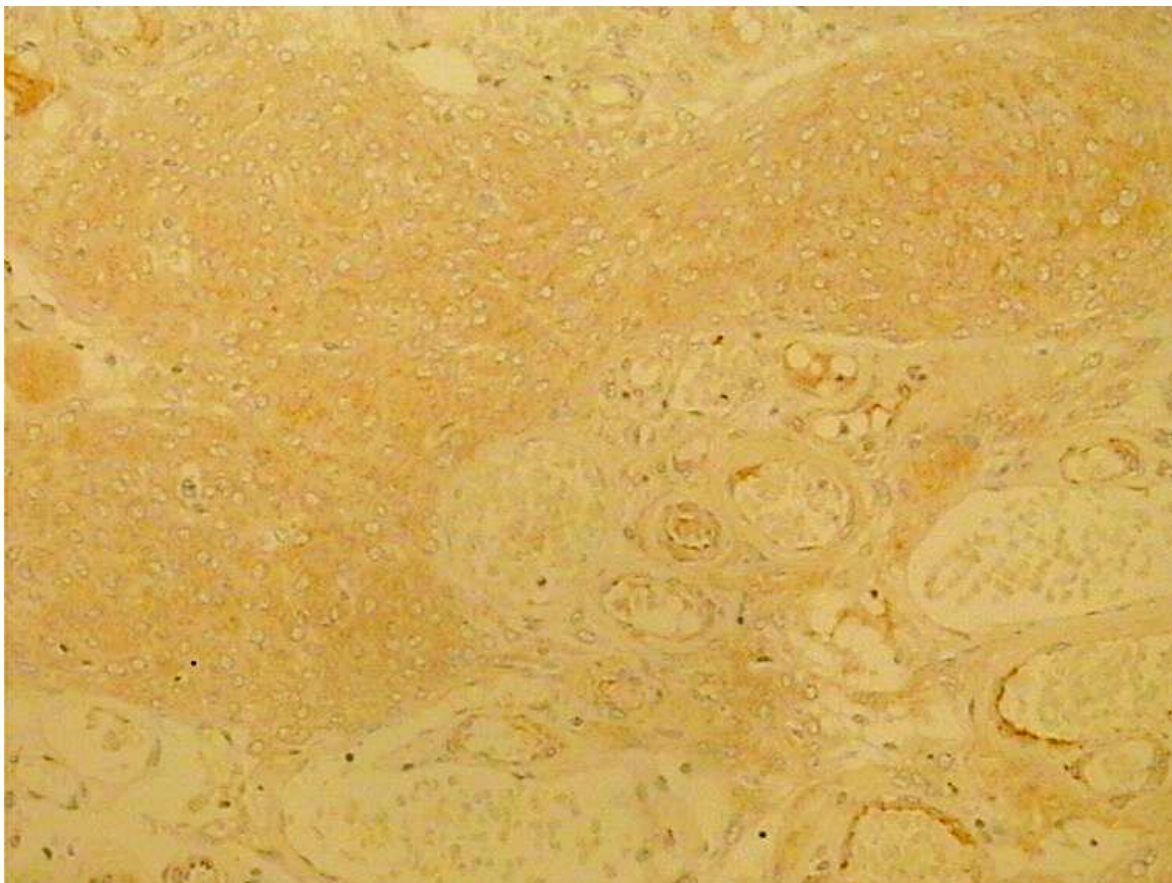
Usporedba HNE intenziteta bojanja u citoplazmama tumorskih stanica obzirom na gradus tumora prikazana je u Tablici 10 i na Slici 9. Intenzitet imunohistokemijskog bojanja na HNE histidinske konjugate u citoplazmama tumorskih stanica meningeoma G I bio je negativan u 45 (45%) ispitanika, blag intenzitet nazočan je u 33 (33%) ispitanika, umjeren intenzitet prisutan je u 13 (13%) ispitanika, jak intenzitet vidljiv je u 6 (6%), dok je izrazito jak intenzitet imunohistokemijske reakcije zabilježen u samo 3 (3%) ispitanika. Nisu zabilježene statistički značajne razlike obzirom na HNE intenzitet bojanja u citoplazmi ( $P=0,055$ ) iako je ova P vrijednost na graničnoj razini značajnosti te se u korelacijskoj analizi pokazala značajnom što je vidljivo u Tablici 16.

**Tablica 10.** Usporedba HNE intenziteta bojanja u citoplazmi tumorskih stanica obzirom na gradus tumora

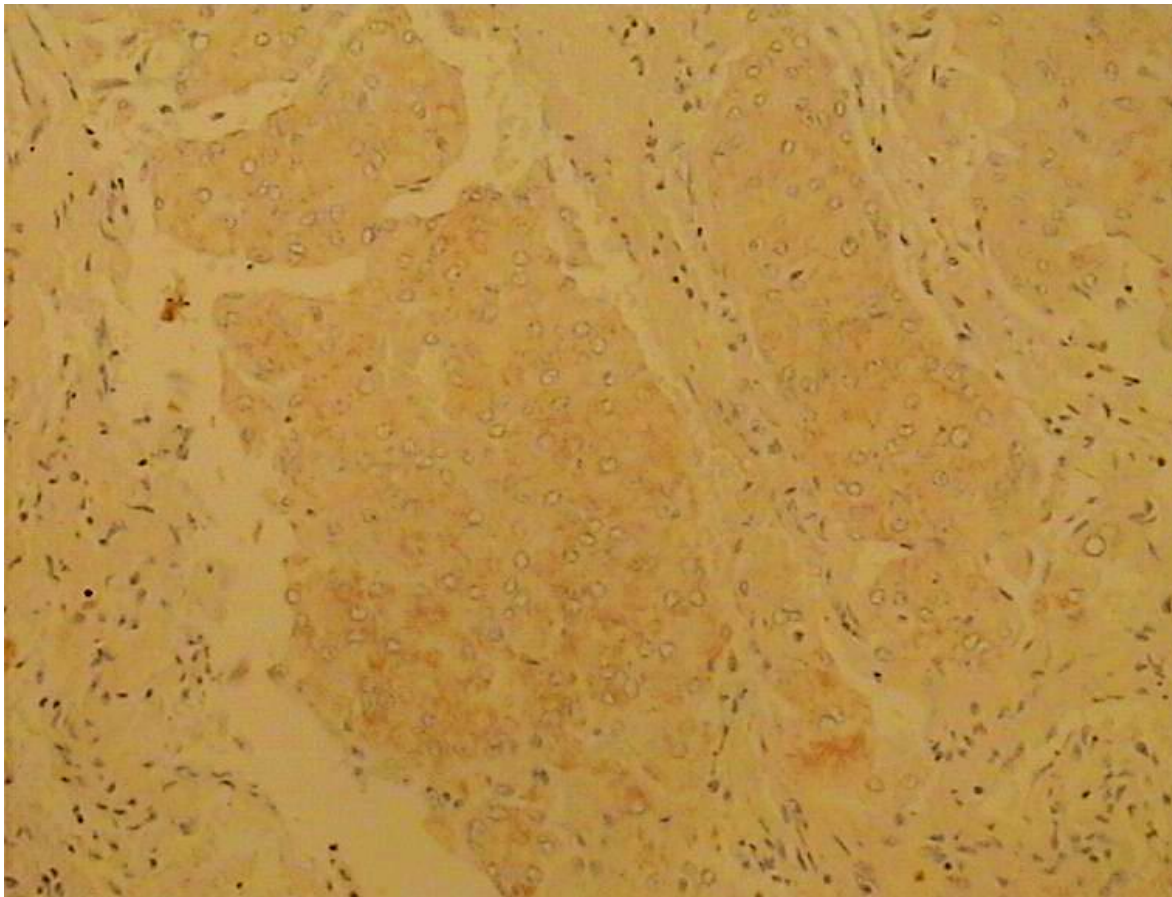
		Gradus tumora					
		I		II		III	
		Broj ispitanika	%	Broj ispitanika	%	Broj ispitanika	%
HNE intenzitet bojanja u citoplazmi	bez imunoreakcije	45	(45,0%)	49	(49,0%)	26	(76,5%)
	blaga imunoreakcija	33	(33,0%)	34	(34,0%)	5	(14,7%)
	umjerena imunoreakcija	13	(13,0%)	5	(5,0%)	1	(2,9%)
	jaka imunoreakcija	6	(6,0%)	9	(9,0%)	1	(2,9%)
	izrazito jaka imunoreakcija	3	(3,0%)	3	(3,0%)	1	(2,9%)

**Slika 9.** Grafički prikaz usporedbe HNE intenziteta bojanja u citoplazmi tumorskih stanica obzirom na gradus tumora

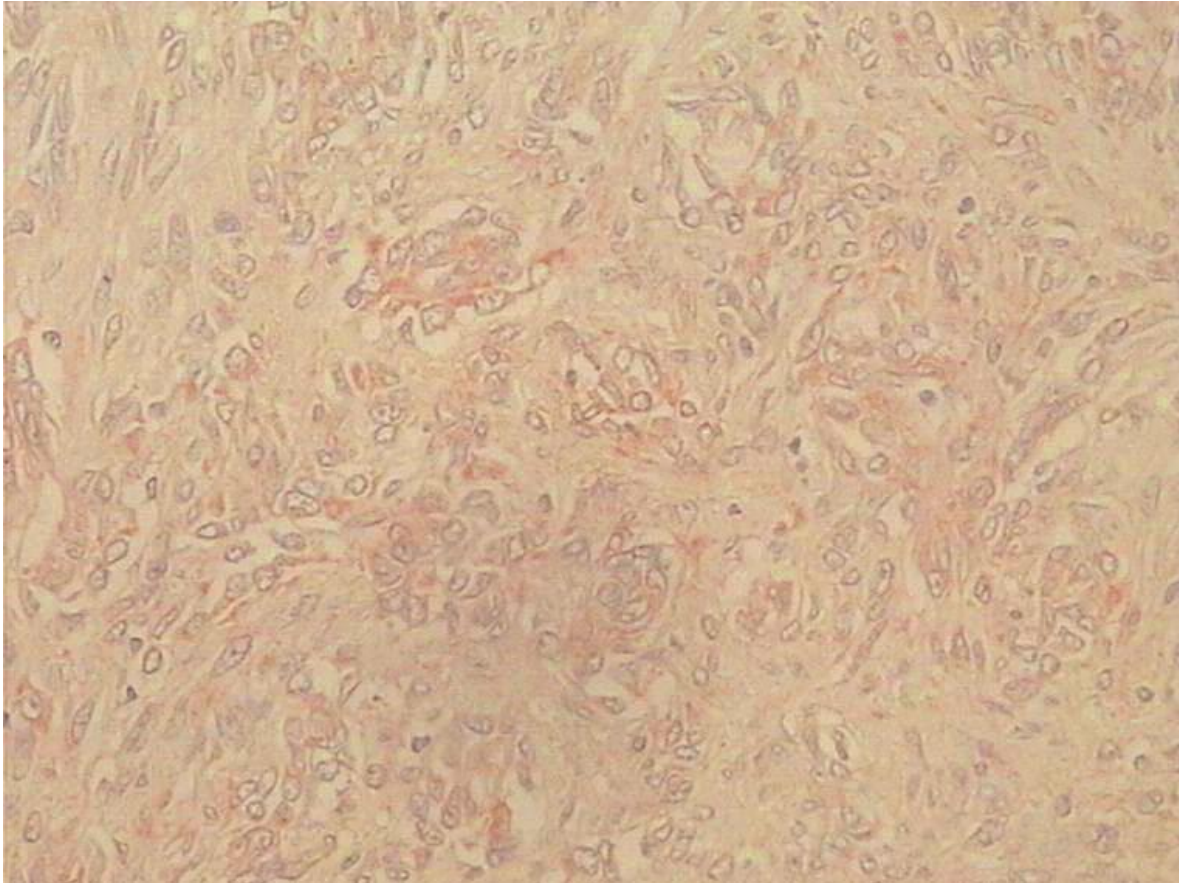




**Slika 10.** Prikaz imunohistokemijskog bojanja preparata monoklonskim protutijelom na HNE histidinske konjugate meningeoma G I. Slika prikazuje umjereni do jaki intenzitet bojanja u citoplazmama tumorskih stanica, vidljivo je i bojanje sadržaja krvnih žila, dok su jezgre tumorskih stanica negativne.



**Slika 11.** Prikaz imunohistokemijskog bojanja preparata monoklonskim protutijelom na HNE histidinske konjugate meningeoma G II. Slika prikazuje umjereni intenzitet bojanja u citoplazmi tumorskih stanica, dok su jezgre tumorskih stanica negativne.



**Slika 12.** Prikaz imunohistokemijskog bojanja preparata monoklonskim protutijelom na HNE histidinske konjugate meningeoma G III. Slika prikazuje blagi intenzitet bojanja u citoplazmi tumorskih stanica, dok su jezgre tumorskih stanica negativne.

Rezultati patohistološke analize nazočnosti HNE-a u jezgrama tumorskih stanica meningeoma različitih gradusa u Tablici 11 prikazuju da u tumorima G I i G III nema HNE imunopozitiviteta u jezgrama tumorskih stanica u 100 (100%) ispitanika, dok je u G II meningeomima HNE imunopozitivitet u jezgrama tumorskih stanica <25% prisutan u 1 (1%) ispitanika. Nisu zabilježene statistički značajne razlike obzirom na razinu HNE imunopozitiviteta u jezgrama tumorskih stanica ( $P=0,510$ ).

**Tablica 11.** Usporedba HNE imunopozitiviteta u jezgrama tumorskih stanica obzirom na gradus tumora

		Gradus tumora					
		I		II		III	
		Broj ispitanika	%	Broj ispitanika	%	Broj ispitanika	%
HNE imunopozitivitet u jezgri	nema pozitiviteta u tumorskim stanicama	100	(100,0%)	99	(99,0%)	34	(100,0%)
	pozitivno <25% tumorskih stanica	0	(0,0%)	1	(1,0%)	0	(0,0%)
	pozitivno 25-50% tumorskih stanica	0	(0,0%)	0	(0,0%)	0	(0,0%)
	pozitivno >50% tumorskih stanica	0	(0,0%)	0	(0,0%)	0	(0,0%)

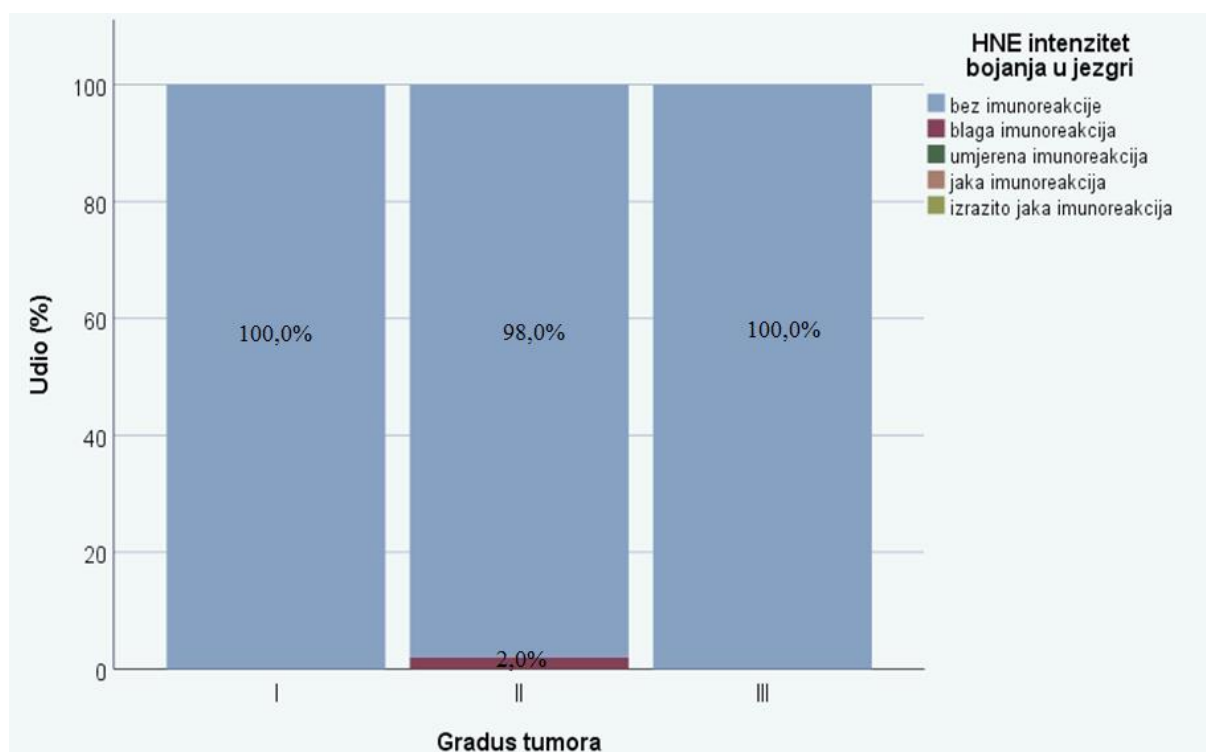
Usporedba HNE intenziteta bojanja u jezgri tumorskih stanica obzirom na gradus tumora prikazana je u Tablici 12 i na Slici 13. Gledajući patohistološke uzorke meningeoma G I i G III vidljivo je da u 100 (100%) ispitanika nije uopće zabilježen intenzitet IH reakcije u jezgrama, dok u G II meningeomima bio je blag HNE intenzitet bojanja u jezgri u samo 2 (2%) ispitanika. Nisu zabilježene statističke značajne razlike obzirom na razinu HNE intenziteta bojanja u jezgri ( $P=0,259$ ).

**Tablica 12.** Usporedba HNE intenziteta bojanja u jezgri tumorskih stanica obzirom na gradus tumora

		Gradus tumora					
		I		II		III	
		Broj Ispitanika	%	Broj ispitanika	%	Broj ispitanika	%
HNE intenzitet bojanja u jezgri	bez imunoreakcije	100	(100,0%)	98	(98,0%)	34	(100,0%)
	blaga imunoreakcija	0	(0,0%)	2	(2,0%)	0	(0,0%)
	umjerena imunoreakcija	0	(0,0%)	0	(0,0%)	0	(0,0%)
	jaka imunoreakcija	0	(0,0%)	0	(0,0%)	0	(0,0%)
	izrazito jaka imunoreakcija	0	(0,0%)	0	(0,0%)	0	(0,0%)



**Slika 13.** Grafički prikaz usporedbe HNE intenziteta bojanja u jezgri tumorskih stanica obzirom na gradus tumora

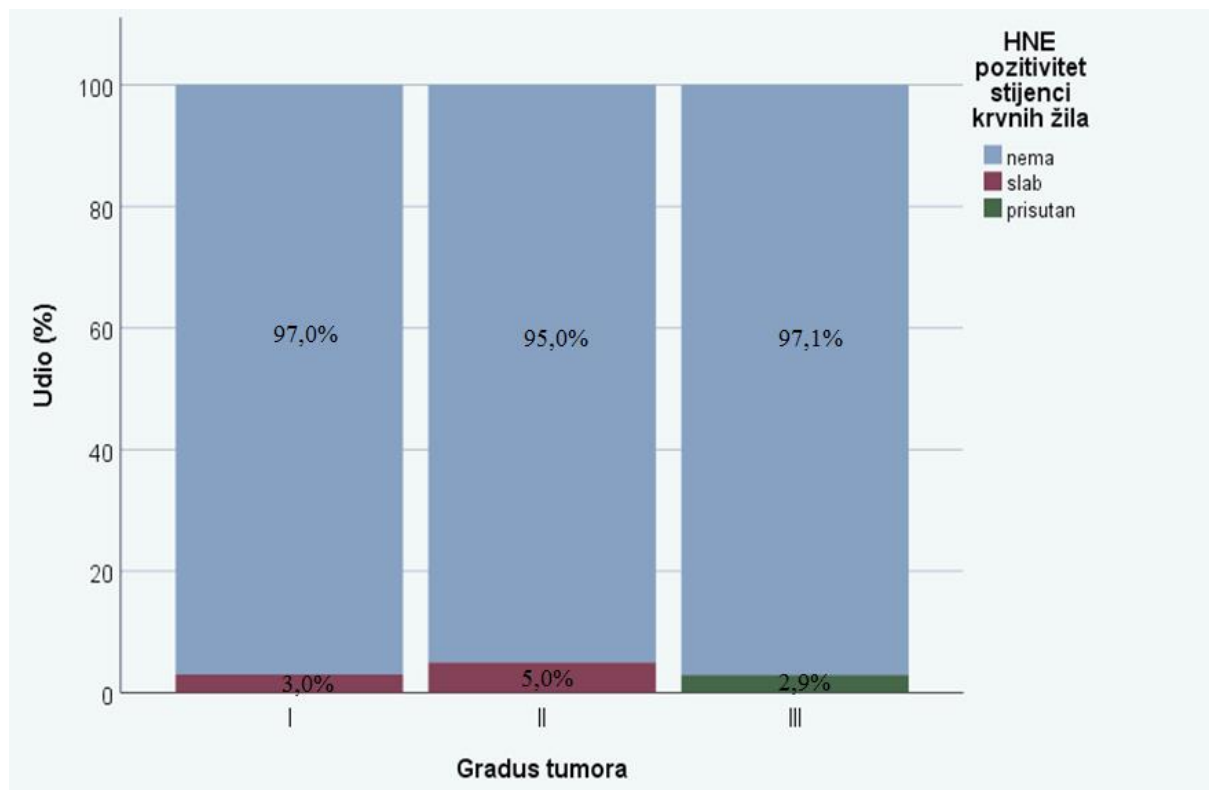


Rezultati patohistološke analize nazočnosti HNE-a u stijenci krvnih žila u meningeomima različitih gradusa prikazani su u Tablici 13 i na Slici 14. U 97 (97%) uzoraka G I meningeoma nije bilo HNE imunopozitiviteta, slab HNE imunopozitivitet zabilježen je u 3 (3%) ispitanika, dok je njegova prisutnost zapravo bila slaba. U G II tumorima vidljivo je da u 95 (95%) ispitanika nije bilo HNE imunopozitiviteta u stijenci krvnih žila, a u 5 (5%) uzoraka pronađen je slab HNE imunopozitivite, dok je njegova prisutnost bila slaba. U G III meningeomima HNE imunopozitivitet bio je prisutan samo kod 1 (2,9%) ispitanika, a u 33 (97,1%) ispitanika nije bilo HNE imunopozitiviteta.

**Tablica 13.** Usporedba HNE imunopozitiviteta u stijenci krvnih žila obzirom na gradus tumora

		Gradus tumora					
		I		II		III	
		Broj ispitanika	%	Broj ispitanika	%	Broj ispitanika	%
HNE imunopozitivitet u stijenci krvnih žila	nema	97	(97,0%)	95	(95,0%)	33	(97,1%)
	slab	3	(3,0%)	5	(5,0%)	0	(0,0%)
	prisutan	0	(0,0%)	0	(0,0%)	1	(2,9%)

**Slika 14.** Grafički prikaz usporedbe HNE imunopozitiviteta u stijenci krvnih žila obzirom na gradus tumora

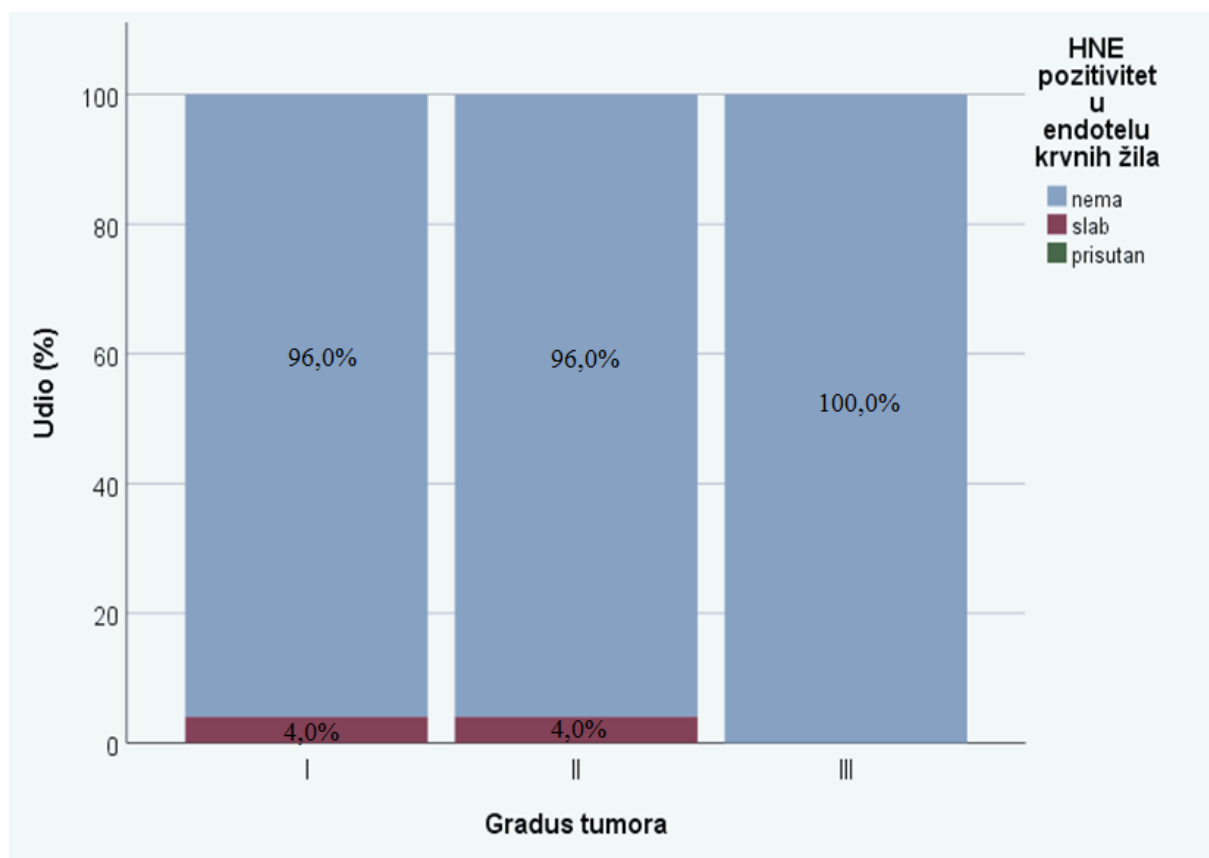


Rezultati usporedbe HNE imunopozitiviteta u endotelu krvnih žila obzirom na gradus tumora prikazani su u Tablici 14 i na Slici 15. Gledajući tumore G I i G II u endotelu krvnih žila nije zabilježen HNE imunopozitivitet u 96 (96%) ispitanika, slab HNE imunopozitivitet vidljiv je u 4 (4%) ispitanika, dok je njegova prisutnost bila slaba. U G III meningeomima HNE imunopozitiviteta u endotelu krvnih žila nije bio zabilježen.

**Tablica 14.** Usporedba HNE imunopozitiviteta u endotelu krvnih žila obzirom na gradus tumora

		Gradus tumora					
		I		II		III	
		Broj ispitanika	%	Broj ispitanika	%	Broj ispitanika	%
HNE imunopozitivitet u endotelu krvnih žila	Nema	96	(96,0%)	96	(96,0%)	34	(100,0%)
	Slab	4	(4,0%)	4	(4,0%)	0	(0,0%)
	Prisutan	0	(0,0%)	0	(0,0%)	0	(0,0%)

**Slika 15.** Grafički prikaz usporedbe HNE imunopozitiviteta u endotelu krvnih žila obzirom na gradus tumora

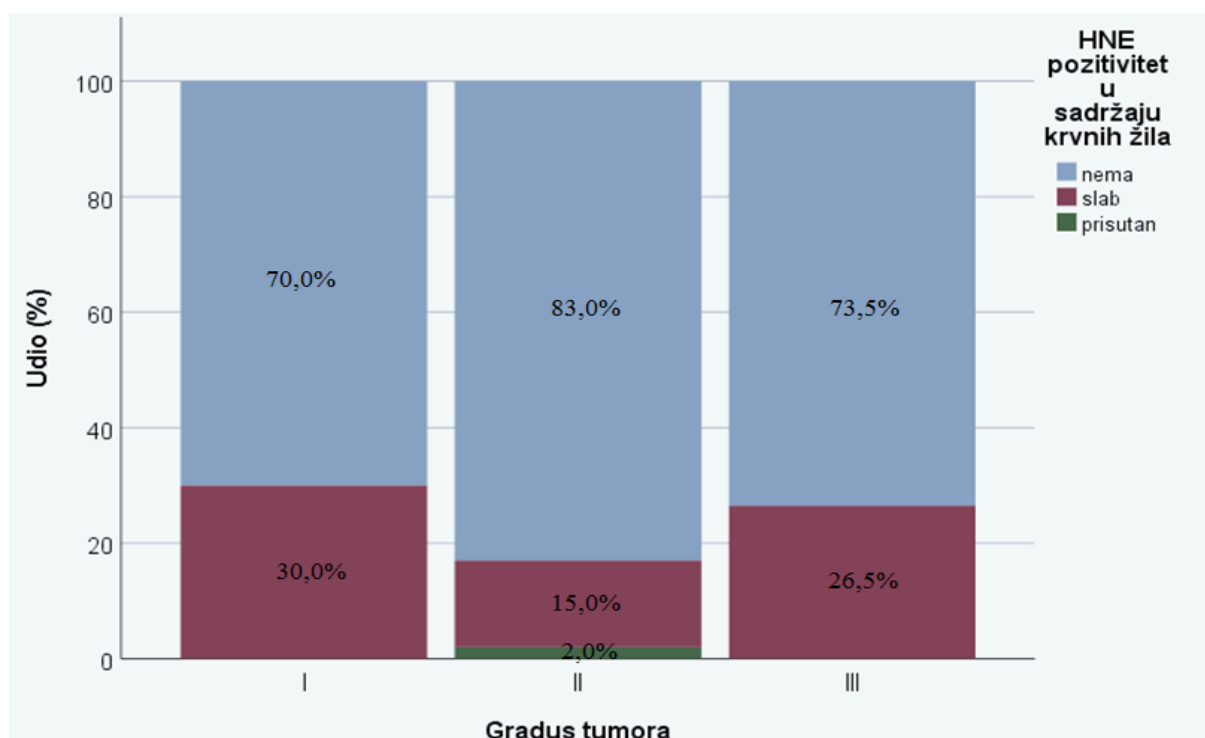


Usporedba HNE imunopozitiviteta u sadržaju krvnih žila obzirom na gradus tumora prikazana je u Tablici 15 i na Slici 16. Analizirajući meningeome G I, vidljivo je da u 70 (70%) ispitanika nije zabilježen HNE imunopozitivitet u sadržaju krvnih žila, slab HNE imunopozitivitet prisutan je u 30 (30%) ispitanika. U G II meningeomima nije bilo HNE imunopozitiviteta u 83 (83%) ispitanika, slab HNE imunopozitivitet vidljiv je u 15 (15%) uzoraka, a njegova prisutnost slaba je u samo 2 (2%) ispitanika, dok u G III nije zabilježen HNE imunopozitivitet u 25 (73,5%) ispitanika, slab HNE imunopozitivitet vidljiv je u 9 (26,5%) ispitanika. Iako nije bilo značajne razlike kada se analizira međudnos sva tri gradusa ( $P=0,064$ , Tablica 15), u međusobnoj usporedbi slab HNE imunopozitivitet u sadržaju krvnih žila bio je značajno češći u gradusu I u odnosu na gradus II (30,0% naprema 15,0%;  $P=0,033$ ).

**Tablica 15.** Usporedba HNE imunopozitiviteta u sadržaju krvnih žila obzirom na gradus tumora

		Gradus tumora					
		I		II		III	
		Broj ispitanika	%	Broj Ispitanika	%	Broj ispitanika	%
HNE pozitivitet u sadržaju krvnih žila	Nema	70	(70,0%)	83	(83,0%)	25	(73,5%)
	Slab	30	(30,0%)	15	(15,0%)	9	(26,5%)
	Prisutan	0	(0,0%)	2	(2,0%)	0	(0,0%)

**Slika 16.** Grafički prikaz usporedbe HNE imunopozitiviteta u sadržaju krvnih žila obzirom na gradus tumora



Korelacijski koeficijenti HNE imunopozitiviteta i intenziteta bojanja u citoplazmi s promatranim kliničkim parametrima prikazani su u Tablici 16. Značajna je slaba negativna korelacija HNE imunopozitiviteta i intenziteta bojanja u citoplazmi s većim gradusom tumora što govori u prilog prethodnim rezultatima da je najveći imunopozitivitet u citoplazmi, odnosno intenzitet bojanja u citoplazmi prisutan u tumorima gradusa I. Također, upala strome značajno pozitivno korelira s HNE imunopozitivitetom u citoplazmi: ( $\tau_b=0,153$ ,  $P=0,013$ ).

**Tablica 16.** Korelacijski koeficijenti HNE imunopozitiviteta i intenziteta bojanja u citoplazmi s promatranim kliničkim parametrima: Kendallov tau\_b koeficijent

		HNE imunopozitivitet u citoplazmi	HNE intenzitet bojanja u citoplazmi
Gradus tumora	Korelacijski koeficijent	-0,195	-0,144
	P	0,001	0,014
	N	234	234
Ženski spol	Korelacijski koeficijent	0,001	-0,030
	P	0,991	0,628
	N	234	234
Dob	Korelacijski koeficijent	0,025	0,013
	P	0,622	0,798
	N	234	234
Prethodna ozračenost tumora	Korelacijski koeficijent	-0,008	0,023
	P	0,894	0,708
	N	234	234
Intraspinalno sijelo tumora	Korelacijski koeficijent	-0,016	-0,011
	P	0,796	0,862
	N	234	234
Recidiv	Korelacijski koeficijent	0,050	0,111
	P	0,411	0,073
	N	234	234
Upala strome	Korelacijski koeficijent	0,153	0,115
	P	0,013	0,062
	N	234	234

Legenda: N – broj ispitanika, P – razina statističke značajnosti

Korelacijski koeficijenti HNE imunopozitiviteta i intenziteta bojanja u jezgri s promatranim kliničkim parametrima prikazani su u Tablici 17. Nije bilo značajnih korelacija sa svim promatranim kliničkim parametrima.

**Tablica 17.** Korelacijski koeficijenti HNE imunopozitiviteta i intenziteta bojanja u jezgri s promatranim kliničkim parametrima: Kendallov tau\_b koeficijent

		HNE imunopozitivitet u jezgri	HNE intenzitet bojanja u jezgri
Gradus tumora	Korelacijski koeficijent	0,033	0,047
	P	0,594	0,450
	N	234	234
Ženski spol	Korelacijski koeficijent	0,047	0,067
	P	0,471	0,307
	N	234	234
Dob	Korelacijski koeficijent	0,007	0,063
	P	0,900	0,246
	N	234	234
Prethodna ozračenost tumora	Korelacijski koeficijent	-0,015	-0,021
	P	0,824	0,753
	N	234	234
Intraspinalno sijelo tumora	Korelacijski koeficijent	-0,017	-0,023
	P	0,801	0,721
	N	234	234
Recidiv	Korelacijski koeficijent	-0,031	-0,043
	P	0,640	0,507
	N	234	234
Upala strome	Korelacijski koeficijent	-0,011	-0,015
	P	0,871	0,818
	N	234	234

Legenda: N – broj ispitanika, P – razina statističke značajnosti

Gradus tumora negativno korelira s HNE imunopozitivitetom u stromi (tau\_b=-0,236, P<0,001) što upućuje da je veći HNE imunopozitivitet u stromi zastupljeniji u tumorima nižeg gradusa. Dob pozitivno korelira s HNE imunopozitivitetom u stijenci krvnih žila (tau\_b=0,119; P=0,028). Sve ove korelacije su slabe (korelacijski koeficijent <0,300), ali statistički značajne. Korelacijski koeficijenti HNE imunopozitiviteta u ostalim lokacijama s promatranm kliničkim parametrima vidljivi su u Tablici 18.

**Tablica 18.** Korelacijski koeficijenti HNE imunopozitiviteta u ostalim lokacijama s promatranim kliničkim parametrima: Kendallov tau<sub>b</sub> koeficijent

		HNE pozitivitet u stromi	HNE pozitivitet na stijenci krvnih žila	HNE pozitivitet endotela krvnih žila	HNE pozitivitet u sadržaju krvnih žila
Gradus tumora	Korelacijski koeficijent	-0,236	0,023	-0,049	-0,081
	P	<0,001	0,710	0,431	0,193
	N	234	234	234	234
Ženski spol	Korelacijski koeficijent	0,069	0,004	0,086	-0,082
	P	0,282	0,949	0,189	0,210
	N	234	234	234	234
Dob	Korelacijski koeficijent	-0,010	0,119	-0,013	0,009
	P	0,845	0,028	0,813	0,862
	N	234	234	234	234
Prethodna ozračenost tumora	Korelacijski koeficijent	-0,003	-0,044	0,069	-0,077
	P	0,958	0,498	0,290	0,236
	N	234	234	234	234
Intraspinalno sijelo tumora	Korelacijski koeficijent	-0,029	0,043	-0,047	-0,016
	P	0,654	0,513	0,469	0,809
	N	234	234	234	234
Recidiv	Korelacijski koeficijent	-0,059	-0,034	-0,027	-0,029
	P	0,361	0,607	0,683	0,654
	N	234	234	234	234
Upala strome	Korelacijski koeficijent	-0,077	-0,032	-0,031	-0,028
	P	0,229	0,620	0,641	0,668
	N	234	234	234	234

Legenda: N – broj ispitanika, P – razina značajnosti

## **5. RASPRAVA**



## 5. RASPRAVA

Središnji živčani sustav (SŽS) smatra se pogodnim okolišem za slobodne radikale što se objašnjava velikom količinom višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA) u membranama neuronalnih stanica, stopom iskoristivosti kisika i prisutnošću metalnih iona s jedne strane, ali i s relativno slabom antioksidativnom zaštitom s druge strane. Arahidonska i dokosaheksaenoična kiselina koje su osnovna sastavnica fosfolipida mozga osobito su osjetljive na ROS i slobodne radikale, a njihove dvostruke veze omogućuju im laganu apstrakciju vodika. Oksidacijski stres u kojem dolazi do nakupljanja ROS te reaktivnih aldehida često je prisutan u određenim bolestima SŽS kao što su ishemijske lezije mozga, metabolička i upalna stanja, neurodegenerativne bolesti i u tumorima [116]. Različiti neuropsihijatrijski poremećaji također su povezani s povišenom razinom HNE. Na primjer, povišena razina HNE nađena je u korteksu mozga bolesnika oboljelih od bipolarnog poremećaja i kod shizofrenih bolesnika, dok u bolesnika liječenih zbog depresije visoka razina HNE nađena je u plazmi [138]. Peroksidacija lipidnih membrana glavni je izvor slobodnih radikala koji dovode do direktnog oštećenja neurona uzrokujući tako povišenje rigiditeta membrana, smanjenje aktivnosti membranskih enzima, alteracije membranske permeabilnosti i oštećenja membranskih receptora. Citotoksični lipidni aldehyd je 4-hidroksi-2-nonenal koji dovodi do oštećenja i alteracije staničnih funkcija stvarajući kovalentne spojeve s proteinima. HNE proteinski spojevi kao ključni markeri LPO značajno su povišeni u tjelesnim tekućinama i mozgovnom tkivu u Parkinsonovoj bolesti, Alzheimerovoj i Huntingtonovoj bolesti te u amiotrofičnoj lateralnoj sklerozi. Također, visoka razina HNE u mozgovnom korteksu nađena je u Huntingtonovim inkluzijama. Huntingtonova bolest je neurodegenerativni poremećaj koji je karakteriziran kognitivnim i psihološkim oštećenjima udruženim s gubitkom kontrole motorike, a sama bolest uzrokovana je ekspanzijom tripleta citozin-adenin-gvanin u kodirajućem genomu za Huntingtonov protein [138, 139].

Stoga, HNE je do sada najistraživaniji završni produkt lipidne peroksidacije, a izrazita elektrofilnost koju posjeduje omogućuje mu laganu interakciju sa svim staničnim makromolekulama kao što su DNK, fosfolipidi i bjelančevine [125]. HNE kao reaktivni aldehyd ne djeluje samo citotoksično, već djeluje na regulaciju rasta te kao signalna molekula u različitim biološkim stanjima poput kemotaksije, signalne transdukcije, stanične proliferacije i diferencijacije, genske ekspresije te smrti stanice. Svi navedeni procesi važni su u regulaciji

ponašanja same stanice tako da HNE utječe i na modulaciju kontrole normalnog ili malignog rasta stanice zbog svoje interakcije s brojnim citokinima i humoralnim čimbenicima rasta [126-128]. Oksidacijski stres uključen je u razvoj većine bolesti SŽS, a produkti lipidne peroksidacije, osobito HNE, prepoznati su kao potencijalni biomarkeri ovih bolesti te se danas sve više istražuje njihova prava uloga.

Dosadašnja istraživanja u kojima su se koristila monoklonska protutijela specifična za HNE histidinske konjugate pokazala su različitu pojavnost HNE u normalnom tkivu, a također i različitu pojavnost HNE u pojedinim tipovima tumora. Linija između dobrog i lošeg stresa vrlo je tanka i lako se slama u korist oksidacijskog stresa što posljedično dovodi do neželjenog učinka, a tako i do karcinogeneze. Karcinomske stanice imaju oštećenu homeostazu redoks sustava. Narušenost homeostaze rezultira viškom ROS koji dodatno potiču malignu transformaciju stanica ukoliko su bile izložene određenim vrstama stresa te se na taj način zapravo podržavaju tumorski rast i diseminacija maligne bolesti. Danas je dobro poznat utjecaj HNE na proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu tumorskih stanica s jedna strane, dok s druge pak strane HNE je važan i za funkcionalnost genoma [125]. Inače, potreban je određeni vremenski period te relativno dugi proces koji najčešće traje i nekoliko godina kako bi se dogodila neoplastična transformacija normalne stanice u malignu. Hereditarno naslijeđe važno je u nastanku raka, međutim i okolišni čimbenici koji uzrokuju oksidacijski stres utječu na indukciju te promociju raka. Slobodni radikali djeluju karcinogeno i mutageno dovodeći tako do stalnog oksidacijskog stresa u kojem se stvara HNE, a u onkologiji HNE se smatra važnim aldehydom jer djeluje kao drugi glasnik slobodnih radikala ili kao signalna molekula koja regulira rast stanice. Prema do sada navedenom razumljivo je zašto se HNE kao završni produkt lipidne peroksidacije u zadnje vrijeme toliko istražuje u različitim tipovima tumora [116].

Ovo je prvo retrospektivno istraživanje o analizi ekspresije HNE i oksidacijskog stresa u ljudskim meningealnim tumorima različitih gradusa. Provedeno je istraživanje imunohistokemijske nazočnosti protutijela specifičnog za HNE histidinski epitop na HNE proteinskim konjugatima u meningeomima gradusa I, II i III.

Meningeomi nastaju iz arahnoidalnih stanica mozga i mogu se pojaviti bilo gdje u području moždanih ovojnica. Klasificiraju se prema sustavu SZO na tri gradusa, a gradus I čini više od 80% ovih tumora. Gradus II meningeomi imaju veću celularnost i povišene znakove proliferativne aktivnosti te veću sklonost recidiviranju, dok su gradus III meningeomi agresivniji zloćudni tumori s tendencijom metastaziranja. Nešto češće se pojavljuju u žena, a žensko – muški odnos je 2,5 : 1, općenito obuhvaćaju srednju i staru populaciju s vrhom incidencije u šestoj dekadi [1, 3]. U našem istraživanju spolna raspodjela odgovara podacima iz literature [19, 23], tako da se uglavnom radilo o ženskom spolu (78%) koji je dominantan u odnosu na muški spol (22%). Također, u odnosu na sva tri gradusa tumora vidljive su značajne razlike u spolnoj raspodjeli te je uz dodatnu analizu razvidno kako muškaraca ima značajno više u gradusima II i III u odnosu na gradus I. Shodno navedenom, ženski spol je bio značajno više zastupljen u gradusu I što se poklapa i s istraživanjima iz drugih studija. Usporedba dobi bolesnika obzirom na gradus tumora nije pokazala statistički značajnu razliku, a uglavnom se radilo o srednjoj i staroj životnoj dobi što odgovara podacima iz literature [19, 24]. Analizirali smo dosadašnju literaturu te je vidljivo da su od svih podtipova meningeoma najčešće bili zastupljeni meningotelijalni meningeomi (63%) koji su se predominantno nalazili u parasagitalnom području, zatim slijede tranzicionalni (19%), potom fibrozni (13%) i psamomatozni (2%) podtipovi, dok su ispitanici uključeni u naše istraživanje imali su nešto drukčiju raspodjelu te je najčešće bio zastupljen meningotelijalni podtip meningeoma (43%), potom fibromatozni (25%), tranzicionalni (20%), te psamomatozni (4%) i mikrocistični (4%) podtip. Meningeomi pokazuju sklonost nastanka u područjima duž moždanih ovojnica, a česta mjesta predilekcije su falks, krilo sfenoidne kosti, područje tentorija te prednja lubanjska jama. Vrlo rijetko se nalaze intraventrikularno, a većina meningeoma kralježničnog kanala smještena je torakalno [19]. S obzirom na šarolikost lokalizacije meningeoma u našem istraživanju svrstali smo ih u 4 podskupine zbog bolje preglednosti: baza lubanjske osnovice, frontotemporalna lokalizacija, kralježnični kanal te ostali (falks, ventrikul, pinealna regija, okcipitalno i parijetalno područje). Najčešća lokalizacija meningeoma G I (42%) i G III (44.1%) bilo je područje baze lubanjske osnovice, dok su meningeomi G II (45%) najčešće bili smješteni u frontotemporalnom području duž konveksiteta mozga. Općenito, zabilježena je manja zastupljenost meningeoma unutar kralježničnog kanala, a što se tiče gradusa tumora ovog smještaja, najčešće su bili prisutni G I meningeomi i to oko 9%, u odnosu na G II i G III negdje oko 3%. Uvidom u dosadašnju literaturu zamijetili smo da je

učestalost pojavljivanja meningeoma u području baze lubanjske osnovice koja uključuje prednju, srednju i stražnju lubanjsku jamu uvelike podudara s našim rezultatima [130]. U našem materijalu nešto je učestalija lokalizacija meningeoma bila frontotemporalno područje duž konveksiteta mozga u odnosu na druge studije.

Meningeomi su tumori koji pokazuju sklonost recidiviranju, osobito ako se radi o tumorima koji se nalaze na kirurški nedostupnim mjestima ili ukoliko se radi o višem gradusu tumora. Potpuno odstranjenje tumora zajedno s tvrdom mozgovnom ovojnicom predstavlja najbolji način sprječavanja recidiva bolesti jer ukoliko se odstrani cijeli tumor i dalje postoji mogućnost ponovnog rasta tumora na istom mjestu u četvrtine do trećine operiranih bolesnika unutar vremenskog razdoblja od 15 godina. U našem istraživanju usporedili smo gradus tumora i sklonost recidivu te je zamijećeno da porastom gradusa dolazi do češćeg recidiva tumora što je u skladu s drugim istraživanjima. Međutim, u našem istraživanju nismo pronašli povezanost između recidiva tumora i intenziteta imunohistokemijske reakcije na HNE-proteinske konjugate.

Prema dosadašnjim istraživanjima o lipidnoj peroksidaciji vidljivo je kako tumori mozga dovode do lokalnog i općeg oksidacijskog stresa [117, 130-133]. Također, u određenim studijama prikazano je kako tumori mozga općenito imaju povećanu oksidaciju proteina i lipidnu peroksidaciju, a smanjenu razinu antioksidacijskog kapaciteta [154]. Patofiziologija oksidacijskog stresa i lipidne peroksidacije u osnovnim staničnim procesima, a osobito u regulaciji staničnog rasta u današnje vrijeme dobro je poznata. Naime, ROS su visoko reaktivne i kratkoživuće molekule te obično djeluju na malim udaljenostima (nm ili  $\mu\text{m}$ ), dok HNE ima snažni afinitet prema bjelančevinama s kojima stvara stabilne spojeve. Tako HNE kao sekundarni glasnik može difundirati od mjesta nastanka i djelovati na udaljena mjesta te mijenjati strukturu i funkciju odgovarajuće bjelančevine. Njegova citotoksičnost rezultat je alteracije stanične funkcije nakon stvaranja kovalentnih spojeva s bjelančevinama, a HNE kao ključni marker lipidne peroksidacije nađen je različitim bolestima i tumorima SŽS. Ovi procesi su ključni u regulaciji normalnog staničnog ponašanja, a njihova modulacija s HNE može ometati kontrolu rasta normalnih ili zloćudnih stanica čime se potiče ili inhibira razvoj tumora. Prema dosadašnjim podacima o HNE-u kao modulacijskom čimbeniku rasta koji je potvrđen u in vitro istraživanjima s karcinomskim stanicama [127], što dovodi do zaključka kako je regulirajući učinak HNE nastao zbog njegovog međudjelovanja s citokinima i humoralnim čimbenicima rasta. Osim toga, na taj način imao je i određeni utjecaj na regulaciju staničnog autokrinog rasta [125]. Važnost HNE

u modulaciji tumorskog rasta može se jednostavno shvatiti i razumjeti u njegovoj interakciji i modulaciji signalnih putova prema Hanahan i Weinberg obilježjima raka, koja se odnose na promjene u ekspresiji i aktivnosti velikog broja signalnih molekula [145]. Također, HNE je važan čimbenik karcinogeneze jer se kovalentno veže za DNK, a uključen je i u mehanizme radioterapije i citotoksičnih lijekova te tako pokazuje svoj antitumorski učinak. Prema tome, metabolički put za detoksikaciju HNE kroz RLIP76 je povećan u tumorima te može biti ciljno mjesto za liječenje kod određene antitumorske terapije [125]. Osim toga, analizirana je prisutnost HNE u normalnom tkivu što govori o njegovoj fiziološkoj ulozi, ali i o uključenosti HNE u rani početak patoloških procesa. Prema tome, promatrana je promjena stanične prisutnosti HNE u bolesnika s duodenalnim ulkusom, gdje je HNE nađen ne samo u citoplazmi žlijezdanih stanica želučane sluznice, nego također i u jezgrama ovih stanica [140].

U jednoj recentnoj studiji zamijećena je viša razina biomarkera lipidne peroksidacije i oksidacije proteina u gliomima viših gradusa nego u meningeomima i gliomima nižih gradusa [154]. Nazočnost HNE-a opisana je do sada u astrocitnim i ependimskim tumorima mozga te je dokazano kako pojavnost HNE-a postupno raste u tumorskim stanicama s višim gradusom, a osobito je vidljiva značajna ekspresija HNE imunopozitiviteta u endotelnom i vaskularnom zidu gotovih svih tumorskih krvnih žila [15, 18]. Aktivnost lipidne peroksidacije u našem istraživanju prema nađenoj prisutnosti HNE-a bila je potvrđena u citoplazmama i stromi tumorskih stanica te u sadržaju krvnih žila gotovo svih analiziranih meningeoma, a nije bila zamijećena u jezgrama tumorskih stanica, endotelu i stijenci krvnih žila, niti u upalnim stanicama strome, osim sporadično u pojedinim analiziranim uzorcima. Time se potvrđuje da je oksidacijski stres u meningeomima povezan sa stvaranjem HNE-a koji nastaje putem lipidne peroksidacije, a zamijećeno je i da se razina HNE imunopozitiviteta u tumorskim stanicama značajno smanjuje porastom gradusa tumora gledajući stupanj diferenciranosti tumora. Sva tri gradusa pokazala su statistički značajnu razliku HNE imunopozitiviteta u citoplazmama tumorskih stanica. Najizraženije razlike bile su u kategoriji bez imunopozitiviteta na HNE-proteinske konjugate u citoplazmama tumorskih stanica te su značajno bile zastupljene u skupini G III u odnosu na G II te u skupini G III u odnosu na G I. Također, u meningeomima gradusa I značajno više je bilo pozitivnih (>50% tumorskih stanica) nego u tumorima G II i G III. Što se tiče usporedbe HNE intenziteta bojanja u citoplazmi tumorskih stanica obzirom na gradus tumora, nisu bile zamijećene značajne razlike, iako je ova P vrijednost na graničnoj razini značajnosti te se u korelacijskoj

analizi bila pokazala značajnom. Prisutnost HNE imunopozitiviteta nije bila zamijećena u jezgrama tumorskih stanica što se u usporedbi s drugim kliničkim studijama pokazalo podudarnim [75, 122, 123]. Mozak je kao organ jako osjetljiv na štetni utjecaj ROS-a i LPO, što se objašnjava visokim sadržajem željeza i PUFA-a te niskom razinom antioksidativne zaštite. Osim što je u brojnim bolestima mozga dokazana prisutnost HNE-proteinskih konjugata, u zadnje vrijeme osobito se istražuje pojavnost HNE-a i uloga oksidacijskog stresa u tumorima SŽS. Dakle, prema do sada analiziranoj literaturi provedeno je istraživanje imunohistokemijske nazočnosti protutijela specifičnog za HNE-histidinski epitop na HNE-proteinskim konjugatima u tumorima mozga koji su astrocitnog porijekla, a ujedno su prema učestalosti i najčešći tumori SŽS. Imunohistokemijska analiza glijalnih tumora pokazala je da s porastom gradusa tumora raste i intenzitet imunohistokemijske reakcije na HNE-proteinske konjugate u tumorskim stanicama, što je suprotno od naših rezultata. Tako je najniži intenzitet imunohistokemijske reakcije na HNE-proteinske konjugate zabilježen kod difuznih astrocitoma niskog gradusa i to predominantno oko krvnih žila, a potom slijedi anaplastični astrocitom i na kraju glioblastom koji je i najzloćudniji podtip tumora. Imunopozitivitet na HNE-proteinske konjugate u zloćudnoj varijanti tumora astrocitnog porijekla pokazao je srednje do jaku te difuznu ekspresiju u tkivu tumora [18, 116]. Također, pojavnost HNE je značajno viša u tumorskim stanicama anaplastičnog ependimoma u usporedbi s dobroćudnim (benignim) ependimom te se razlikuje od naših rezultata koji su također suprotni [93, 116]. U osnovi, navedenu različitu ekspresiju HNE-a u tumorima SŽS objašnjavamo različitim stupnjem diferencijacije tumora, različitom fazom karcinogeneze te prema različitom embrionalnom i histološkom porijeklu stanica tumora mozga. Tumor je doista moduliran i izmijenjen pod utjecajem HNE-a, a također HNE mijenja i podešava imunološki odgovor domaćina kao i rast tumorskih stanica. Stoga, ekspresija HNE-a u tumorskom tkivu ovisi o brojnim čimbenicima kao što su metabolizam ugljikohidrata i lipida, osobito ovisi o metabolizmu kardiolipina, o razini antioksidansa, glutationu, AR, tumor-specifičnim katalazama, RLIP76 i drugim signalnim putevima [125].

Gledali smo i pojavnost HNE imunopozitiviteta u stromi tumora obzirom na gradus tumora te je vidljiva značajna razlika kada se promatra reakcija kod sva tri gradusa. Slab HNE imunopozitivitet u stromi u međusobnim usporedbama značajno je bio češći u tumorima G I u odnosu na G II i G III. Primijećeno je da se razina HNE imunopozitiviteta u stromi tumora smanjuje s porastom gradusa tumora, no samo je u stromi vidljiva nazočnost HNE-a, ali ne i u upalnim stanicama, osim sporadično. Za razliku od drugih istraživanja gdje je nađena

prisutnost HNE imunopozitiviteta u upalnim stanicama, u stromi oko tumora i u samom tumoru [75]. Prema navedenom, iz našeg istraživanja vidljivo je da HNE kao potencijalni biomarker lipidne peroksidacije u meningeomima različitih gradusa ne može se iskoristiti u praćenju progresije malignosti jer se njegova nazočnost smanjuje s porastom gradusa.

Naime, rak je složena bolest u kojem dolazi do promjene metabolizma zahvaćenog organizma, a upalni odgovor obično započinje u ranoj fazi raka. Iz tih razloga, svaki je tumor jedinstven te se različiti tumori mogu razlikovati ovisno o obrani tumora protiv domaćina. Fibroblasti kao ne-maligne stanice podržavaju širenje heterogenih karcinomskih stanica te stvaraju izvanstanični matriks i krvne žile formirajući tako tumorsku stromu. Adipociti zajedno s fibroblastima omogućuju neophodno povećanje citokina za tumorske stanice, za razliku od imunoloških stanica koje predstavljaju imunološki odgovor domaćina protiv tumorskih stanica. Kronični upalni procesi u tumorima često su destruktivni, dok HNE koji se stvara od ne-malignih stanica u malim koncentracijama inducira apoptozu tumorskih stanica [141]. Složenost i važnost tumorskog mikrokoliša vidljiva je kroz infiltrativni i agresivni rast tumorskih stanica, a koje uz pomoć fibroblasta, endotelijalnih progenitornih stanica i adipocita komuniciraju preko izvanstaničnog matriksa [125].

Stoga, ne postoji sumnja da upalno stanje igra važnu ulogu u modulaciji tumorskog rasta. Tako mehanizmi upale mogu pridonijeti ili su regulirani tumorskim stanicama što je važno u razumijevanju i omogućavanju ciljane tumorske terapije. U istraživanju raka debelog crijeva zamijećena je prekomjerna ekspresija ciklookisgenaze 2 (COX2), enzima koji je važan u kataliziranju biosinteze prostaglandina [142]. HNE stimulira ekspresiju COX2, a to je regulirano pomoću aldoza reduktaze (AR). U stanicama HNE se veže za GSH te se reducira s AR do glutationil-1,4-dihidroksinonane (GS-DHN) koji potom stimulira NF- $\kappa$ B i aktivira transkripciju COX2. U većine humanih tumora također je nađena i prekomjerna ekspresija AR [143]. NF- $\kappa$ B je ključan čimbenik složenog međudnosa HNE i različitih citokina u karcinogenezi i upali, a NF- $\kappa$ B dio je obitelji transkripcijskih čimbenika koji reguliraju apoptozu i imunološki odgovor te je povezan s drugim signalnim putevima u kojima stvara uvjete za početak aktivacije. Uloga NF- $\kappa$ B u tumorima smatra se dvosjeklim mačem, jer s jedne strane NF- $\kappa$ B aktiviran je s imunološkim stanicama, a s druge strane sudjeluje u citotoksičnoj aktivnosti protiv tumora [125, 144]. Njegova aktivnost regulirana je s inhibitorom kinaze (I $\kappa$ B) koji zapravo regulira kinetiku NF- $\kappa$ B aktivacije od spore do brze [146]. U in vitro i in vivo modelu tumora dojke, NF- $\kappa$ B potreban je za progresiju raka dojke

te je identificiran kao središnji regulator epitelijalno-mezenhimalnog prijelaza i na taj način doprinosi tumorskoj zloćudnosti [152].

Prema tome, HNE djeluje na nekoliko signalnih putova koji su važni u regulaciji staničnog rasta te u odgovoru na oksidacijski stres. Također, može utjecati ne samo na tumor, već na stromalne i upalne stanice ili direktno kao signalna molekula vežući se za citokinske receptore ili kao regulator staničnog antioksidativnog kapaciteta. Kao što je već naglašeno, koji će signalni put biti aktiviran u određenom trenutku ovisi o porijeklu stanica, biološkoj aktivnosti, fiziološkom i patofiziološkom stanju, ali ovisno o samoj nazočnosti HNE (slobodnog ili proteinski vezanog) te također i o koncentraciji HNE [125].

U pločastom karcinomu orofarinksa prisutnost HNE imunopozitiviteta nađena je u upalnim stanicama, osobito u makrofazima, dok u našem istraživanju nije pronađena prisutnost HNE-a u upalnim stanicama strome. Upalne stanice stvaraju veliku količinu ROS i dodatno potiču lipidnu peroksidaciju, a tijekom same fagocitoze dolazi do nastanka „oksidativnog praska“ pri čemu nastaju ROS koje dalje uzrokuju dodatno pojačanje oksidacijskog stresa te na taj način narušena je homeostaza redoks sustava [75]. Ne možemo objasniti zašto u našem istraživanju nije bilo ekspresije HNE-a u upalnim stanicama, iako je HNE bio prisutan u stromi tumora.

Inače, različite vrste tumora pokazuju različitu prisutnost HNE-a u stanicama, tako kod određenih tumora imunopozitivitet na HNE raste s porastom gradusa tumora, dok kod drugih tumora pada s porastom gradusa. Tumorske stanice mogu se sastojati od manje količine PUFA i lipida što će u konačnici rezultirati manjom količinom HNE-a u tkivu tumora, te na taj način objašnjavamo smanjenu količinu HNE-a i drugih reaktivnih aldehida u višim gradusima i stadijima tumora u odnosu na niže graduse. Poluvrijeme života za HNE je vrlo kratko, manje od 2 minute. Ključni enzimi koji su odgovorni za metabolizam HNE-a su glutation S transferaza, aldehyd dehidrogenaza i aldo-keto reduktaza. Ovi enzimi imaju važnu ulogu u detoksikaciji HNE-a te tako utječu i na samu razinu HNE-a u tkivu [137]. Stoga, fiziologija razine HNE-a u tkivu najvjerojatnije jednim dijelom ovisi o enzimima koji su odgovorni za metabolizam HNE-a. Recentna imunohistokemijska istraživanja o raku debelog crijeva su pokazala povećanje akroleina od njegove srednje razine u tubularnom ili vilo-tubularnom adenomu do obilne razine u vilo-tubularnom adenomu visokog gradusa i u Duke's A stadiju adenokarcinoma kolona. Međutim, u naprednom gradusu karcinoma Duke's



B i Duke's C, akrolein se teško primjećivao, a proteinski konjugati su bili pronađeni u obilnoj količini i u ne-malignom epitelu kolona oko samog karcinoma [116, 118]. Istraživanja o HNE imunopozitivitetu u pločastom karcinomu orofarinksa također su pokazala da s povećanjem gradusa planocelularnog karcinoma dolazi do smanjenja intenziteta nazočnosti HNE-a u citoplazmama tumorskih stanica [75], dok su se imunohistokemijske analize oksidacijskog stresa karcinoma dojke pokazale različitim ovisno o tome je li se radilo o invazivnom ili neinvazivnom obliku karcinoma.

Tako Karihtala i suradnici u svojim analizama pokazali su značajno smanjenje ekspresije 8-OHdG u invazivnom karcinomu dojke u odnosu na neinvazivni karcinom, a također su bili istraživali i HNE histidinske konjugate te su pokazali da je snažnija ekspresija u invazivnom karcinomu nego u benignim tumorima dojke [123]. Međutim, u dosadašnjim istraživanjima o mehanizmu djelovanja oksidacijskog stresa kod bolesnika s rakom prostate vidljivo je da smanjena razina antioksidansa u serumu povezana je s povišenim rizikom nastanka raka prostate. Također, bolesnici s rakom prostate pokazali su veću vrijednost ukupnog antioksidacijskog kapaciteta u odnosu na bolesnike s benignom hiperplazijom prostate. Dakle, prethodno navedena istraživanja uglavnom su proučavala ukupni antioksidacijski kapacitet seruma i plazme gdje su istraživači određivali ukupnu prisutnost enzimskih i neenzimskih antioksidansa [147, 148]. No, postoje i druge studije koje su pokazale kako su vrijednosti ukupnog antioksidacijskog kapaciteta u metastatskom raku prostate veće u odnosu na bolesnike s lokaliziranim rakom prostate [149-151].

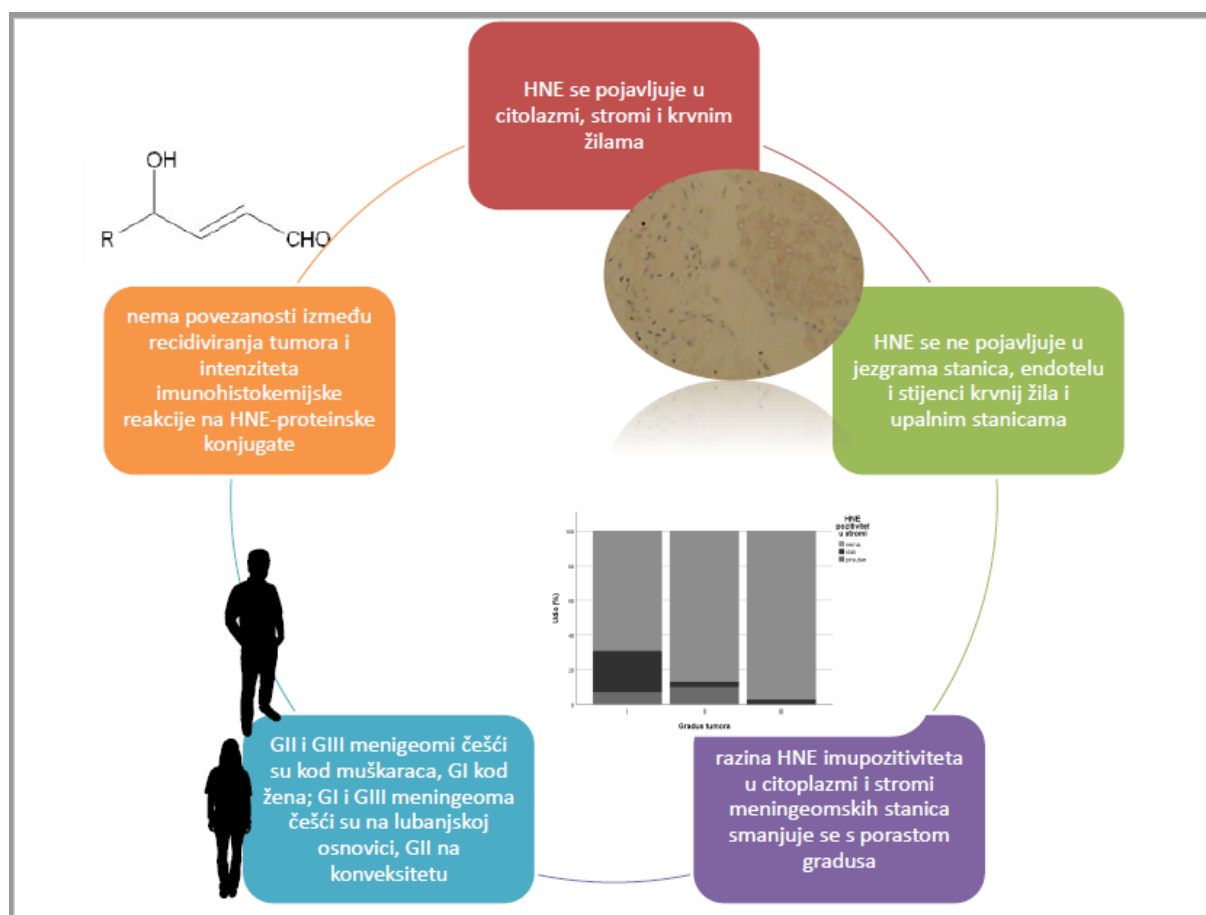
Prema tome, vidljivo je da prisutnost HNE-a ne mora uvijek korelirati s malignošću tumora, a njegova izraženija nazočnost u tumorima nižih gradusa najvjerojatnije je posljedica brojnih regresivnih promjena koje se događaju u spororastućim tumorima [18]. Prema navedenim rezultatima o koncentraciji HNE-a u različitim tumorima koje smo do sada prikazali, vidljiva je određena diskrepanca između razine oksidacijskog stresa i razine produkta lipidne peroksidacije. Tu razliku u ekspresiji HNE-a ovisno o određenoj vrsti tumora možemo povezati s nekoliko različitih, ali pretpostavljenih uzroka. Kao prvo, određenu ulogu imaju enzimi koji metaboliziraju HNE u tumorskim stanicama, potom lipidni sastav staničnih membrana (PUFA) te prisutnost upalnih stanica koje mogu povećati razinu propusnosti HNE-a u okolno tkivo tumora [88]. Što će prevagnuti u određenom trenutku ovisi ne samo o vrsti, biologiji i heterogenosti samog tumora već i o tumorskom okolišu koji ga okružuje. U našem istraživanju gledali smo HNE imunopozitivitet u jezgri tumora obzirom na gradus tumora te nismo pronašli statistički značajnu razliku, a također

nitenti intenzitet bojanja u jezgrama nije bio značajan što je zapravo podudarno s drugim istraživanjima. Analizirali smo HNE imunopozitivitet u endotelu i stijenci krvnih žila obzirom na gradus tumora, te je njegova prisutnost bila nezamijetna i bez statističke značajnosti. S druge strane, u sadržaju krvnih žila u odnosu na gradus tumora nije bilo značajne razlike ukoliko se gledao međuodnos sva tri gradusa, ali u međusobnoj usporedbi slab HNE imunopozitivitet u sadržaju krvne žile bio je značajno češći u G I u odnosu na G II tumore. Meningeomi nisu pokazali značajnu ekspresiju HNE-a u krvnim žilama tumora za razliku od astrocitnih i ependimskih tumora mozga. U glijalnim tumorima vidljiva je značajna ekspresija HNE-a u endotelnom i vaskularnom zidu gotovih svih tumorskih krvnih žila što se može objasniti proliferacijom krvnih žila koja je karakteristična za ovaj tip tumora, za razliku od meningeoma u kojima proliferacija krvnih žila uglavnom nije prisutna [15, 18]. Ne možemo objasniti zašto je u meningealnim tumorima izrazito niska ekspresija HNE-a u krvnim žilama tumora za razliku od drugih tumora SŽS, ali prepostavljamo da se radi o promjenama na razini krvno-mozgovne barijere. Krvno-mozgovnu barijeru čine endotel s čvrstim spojevima, bazalna membrana krvnih žila mozga i produljci astrocita te je ona kao neurovaskularna jedinica odgovorna za održavanje homeostaze i normalno funkcioniranje SŽS [134]. Pretpostavlja se da HNE u mozgu potječe od krvnih žila te da prolazi kroz krvno-mozgovnu barijeru, ali sama angiogeneza tumora različita je od angiogeneze mozga. Krvne žile tumora imaju veću propusnost od netumorskih krvnih žila pa tako HNE iz krvi djeluje na endotel krvnih žila pa potom na cijelu stijenu, a onda i preko njih na tumorske stanice [18, 135-136]. Prema različitim u literaturi dostupnim istraživanjima češće su bile HNE imunopozitivne endotelne stanice krvnih žila, a u našem slučaju mi smo imali slab HNE imunopozitivitet u sadržaju krvnih žila, dok endotel i stijena krvne žile nisu pokazali prisutnost HNE imunopozitiviteta. Analizirali smo korelacijski koeficijent HNE imunopozitiviteta i intenzitet bojanja u citoplazmi te smo dobili negativnu korelaciju s većim gradusom, tako da je najveći HNE imunopozitivitet, odnosno intenzitet bojanja u citoplazmi bio prisutan u tumoru G I. Također, ustanovili smo da stroma tumora značajno pozitivno korelira s HNE imunopozitivitetom u citoplazmi, dok za razliku od citoplazme nije bilo korelacije s jezgrama. Gradus tumora negativno korelira s HNE imunopozitivitetom u stromi što upućuje na to da smo dobili veću zastupljenost HNE imunopozitiviteta u stromi u tumorima nižih gradusa. Zabilježena je pozitivna korelacija s HNE imunopozitivitetom u stijenci krvnih žila. Sve ove korelacije su slabe, ali statistički značajne. Ovo istraživanje je potvrdilo važnost lipidne peroksidacije i oksidacijskog stresa u tumorima SŽS, te je dodatno

pojasnilo ulogu HNE kao potentne signalne molekule u meningeomima raličitih gradusa. Uloga HNE još uvijek je nedovoljno istražena, a osobito njegov utjecaj na lipidni sastav membrana tumorskih stanica SŽS te bi u budućnosti trebalo ispitati i dodatno pojasniti njegov složeni mehanizam djelovanja.

Dakle, sniženje HNE imunopozitiviteta u citoplazmi tumorskih stanica i stromi meningeoma porastom njihove zloćudnosti dovodi nas do zaključka da HNE u ovom tipu tumora je jače eksprimiran u bolje diferenciranim meningealnim tumorima, te da se smanjuje s porastom zloćudnosti. Isti nalaz opisan je u epitelnim novotvorinama orofarinksa [75] i debelog crijeva [116, 118], a razlikuje se od glijalnih tumora u kojima je s porastom zloćudnosti rasla i HNE imunohistokemijska nazočnost [18]. Meningotelijalni tumori su inačica mezenhimalnih tumora koji pokazuju imunohistokemijsku ekspresiju EMA i citokeratina pa je stoga moguće da je njihova HNE imunoreaktivnost sličnija epitelnim nego glijalnim novotvorinama.

**Slika 17.** Prikaz grafičkog sažetka



Legenda: HNE – 4-hidroksi-2-nonenal, G I – gradus I, G II – gradus II, G III – gradus III

## **6. ZAKLJUČCI**

## 6. ZAKLJUČCI

1. Imunohistokemijska reakcija na HNE-proteinske konjugate zabilježena je u citoplazmi tumorskih stanica i u stromi većine meningeoma.
2. Imunohistokemijskom analizom je utvrđena nazočnost HNE-proteinskih konjugata gotovo isključivo u citoplazmi tumorskih stanica, uz tek sporadičan nalaz imunohistokemijskog pozitiviteta na HNE u jezgri.
3. Intenzitet imunohistokemijske reakcije na HNE-proteinske konjugate u citoplazmi tumorskih stanica te u stromi tumora smanjuje se s povećanjem gradusa meningeoma, a prisutne su statistički značajne razlike u gradusu I u odnosu na gradus II i III.
4. Ustanovljen je negativni korelacijski koeficijent između gradusa tumora i HNE imunopozitiviteta odnosno intenziteta bojanja u citoplazmi. U tumorima G I zabilježen je najveći HNE imunopozitivitet odnosno intenzitet bojanja u citoplazmi.
5. Imunohistokemijska reakcija na HNE-proteinske konjugate u stromi tumora pokazala je negativnu korelaciju s gradusom, što upućuje na to da smo dobili veću zastupljenost HNE imunopozitiviteta u stromi kod tumora nižih gradusa.
6. Intenzitet imunohistokemijske reakcije na HNE-proteinske konjugate u sadržaju krvnih žila u odnosu na gradus tumora nije pokazao statistički značajnu razliku ukoliko se gledao međuodnos sva tri gradusa, ali u međusobnoj usporedbi slab HNE imunopozitivitet u sadržaju krvne žile bio je značajno češći u G I u odnosu na G II tumore
7. HNE imunopozitivitet nije bio zabilježen u endotelu i stijenci krvnih žila, osim sporadično.
8. Dobili smo pozitivnu korelaciju dobi bolesnika s HNE imunopozitivitetom u stijenci krvnih žila, sve ove korelacije su slabe, ali statistički značajne.

9. Muški spol je značajno više zastupljen u gradusima II i III u odnosu na gradus I, a ženski spol je više zastupljen u gradusu I.
10. Usporedba podtipova meningeoma u odnosu na gradus tumora pri međusobnoj usporedbi svakog gradusa pojedinačno, ali i unutar pojedinih podtipova tumora nije se pokazala statistički značajnom.
11. Najčešća lokalizacija meningeoma G I i G III bilo je područje baze lubanjske osnovice, a meningeomi G II najčešće su smješteni u frontotemporalnom području duž konveksiteta mozga.
12. Prema sijelu tumora zabilježena je manja učestalost meningeoma unutar kralježničnog kanala u odnosu na intrakranijski prostor.
13. Porastom gradusa meningeoma dolazi do češćeg recidiva tumora, što je dodatno potvrđeno i na pojedinačnim usporedbama.
14. Nismo pronašli povezanost između recidiva tumora i intenziteta imunohistokemijske reakcije na HNE-proteinske konjugate.

## **7. LITERATURA**

## 7. LITERATURA

1. Louis DN, Scheithauer BW, Budka H, von Deimling A, Kepes JJ. Meningiomas. In Kleihues P, Cavanee WK (eds) Tumours of the nervous system: pathology and genetics. IARS, Lyon 2000.
2. Lumenta CB, Di Rocco C, Haase J, Mooji JJA Eds. European manual of medicine, neurosurgery, Springer, Heidelberg 2009.
3. Sadetzki S, Flint-Richter P, Ben-Tal T, Nass D. Radiation-induced meningioma: a descriptive study of 253 cases. J Neurosurg 2002; 97: 1078-1082.
4. Lamszus K, Vahldiek F, Mautner VF, Schichor C, Tonn J, Stavrou D, Fillbrandt R, Westphal M, Kluwe L. Allelic losses in neurofibromatosis 2-associated meningiomas. J Neuropathol Exp Neurol 2000; 59: 504-512.
5. Kremer S, Grand S, Remy C, Pasquier B, Benabid AL, Bracard S, Le Bas JF. Contribution of dynamic contrast MR imaging to the differentiation between dural metastasis and meningioma. Neuroradiology 2004; 46: 642-648.
6. Brock M. The heroes return to earth. Surg Neurol 2005; 63: 590-591.
7. Chamberlain MC, Blumenthal DT. Intracranial meningiomas: diagnosis and treatment. Expert Rev Neurother 2004; 4: 641-648.
8. Goldbrunner R, Minniti G, Preusser M, D Jenkinson M, Sallabanda K, Houdart E et al. EANO guidelines for the diagnosis and treatment of meningiomas. Lancet Oncol 2016; 17: e383-91.
9. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? Lancet 1994; 344: 721-723.



10. Winn HR, ur. Youmans neurological surgery sixth edition. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011, p.1077-1087.
11. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, Deimling von A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 2016; 131: 803-820.
12. Chhabda S, Carney O, D'Arco F, Jacques TS, Kshitij M. The 2016 World Health Organization classification of tumours of the Central Nervous System: what the paediatric neuroradiologist needs to know. *Quant Imaging Med Surg* 2016; 6(5): 486-489.
13. Louis DN, Perry A, Burger P, Ellison DW, Reifenberger G, von Deimling A, Aldape K, Brat D, Collins VP, Eberhart C et al. International Society Of Neuropathology-Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain Pathol* 2014; 24: 429-435.
14. Kleihues P, Louis DN, Weistler OD, Burger PC, Scheithauer BW. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol* 2007; 28(9); 114-547.
15. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol* 1993; 3: 255-268.
16. Kleihues P, Cavenee WK (eds.) WHO Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System, IARC Press, Lyon, 2000.
17. Zulch KJ. Histological typing of tumours of the central nervous system. World Health Organization 1979; Geneva
18. Kolenc D. Imunohistokemijska koekspresija 4-hidroksinonenala i prominina-1 u glijalnim tumorima mozga. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, 2010.

19. Schniederjan MJ, Brat DJ. Biopsy Interpretation of the Central Nervous System. Philadelphia: Wolters Kluwer Health / Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p.200-233.
20. Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol* 2013; 15(ii): 1-56.
21. Hwang WL, Marciscano AE, Niemierko A, Kim DW, Stemmer-Rachamimov AO, Curry WT et al. Imaging and extent of surgical resection predict risk of meningioma recurrence better than WHO histopathological grade. *Neuro Oncol* 2016; 18(6): 863-872.
22. Feichtinger RG, Weis S, Mayr JA, Zimmermann FA, Bogner B, Sperl W and Kofler B. Alterations of oxidative phosphorylation in meningiomas and peripheral nerve sheath tumors. *Neuro Oncol* 2016; 18(2): 184-194.
23. Kepes J. Meningiomas: Biology, Pathology and Differential Diagnosis. 1 st ed. 1982, New York: Masson Publishing: 206.
24. Ghosal N, Kapila K, Sharma MC, Verma K. Fine needle aspiration cytology of a meningioma with extracranial extension after irradiation for medulloblastoma. *Acta Cytol* 2001; 45(6): 1092-3.
25. Seystahl K, Stoecklein V, Schüller U, Rushing E, Nicolas G, Schäfer N et al. Somatostatin receptor-targeted radionuclide therapy for progressive meningioma: benefit linked to <sup>68</sup>Ga-DOTATATE/-TOC uptake. *Neuro Oncol* 2016; 18(11): 1538-1547.
26. Inoue YK, Nishibe Y, Hollinshead AC, Takeuchi J, Uchida Y, Handa H. Isolation of Inoue-Melnick virus from human meningioma-derived cell cultures and detection of antibody in patients with meningioma. *J Med Virol* 1987; 21(3): 201-5.
27. Trofatter JA, MacCollin MM, Rutter JL, Murrell JR, Duyao MP, Parry DM et al. A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell* 1993; 72(5): 791-800.

28. Lekanne Deprez RH, Bianchi AB, Groen NA, Seizinger BR, Hagemeyer A, van Drunen E et al. Frequent NF2 gene transcript mutations in sporadic meningiomas and vestibular schwannomas. *Am J Hum Genet* 1994; 54(6): 1022-1029.
29. Rutledge MH, Sarrazin J, Rangaratnam S, Phelan CM, Twist E, Merel P et al. Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the majority of sporadic meningiomas. *Nat Genet* 1994; 6(2): 180-184.
30. Wellenreuther R, Kraus JA, Lenartz D, Menon AG, Schramm J, Louis DN et al. Analysis of the neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. *Am J Pathol* 1995; 146(4): 827-832.
31. Abedalthagafi M, Linda Bi W, Aizer AA, Merrill PH, Brewster R, Agarwalla PK et al. Oncogenic PI3K mutations are as common as AKT1 and SMO mutations in meningioma. *Neuro Oncol* 2016; 18(5): 649-655.
32. Brastianos PK, Horowitz PM, Santagata S, Jones RT, McKenna A, Getz G et al. Genomic sequencing of meningiomas identifies oncogenic SMO and AKT1 mutations. *Nat Genet* 2013; 45(3): 285-289.
33. Clark VE, Erson-Omay EZ, Serin A, Yin J, Cotney J, Ozduman K et al. Genomic analysis of non-NF2 meningiomas reveals mutations in TRAF7, KLF4, AKT1 and SMO. *Science* 2013; 339(6123): 1077-1080.
34. Reuss DE, Piro RM, Jones DT, Simon M, Ketter R, Kool M et al. Secretory meningiomas are defined by combined KLF4 K409Q and TRAF7 mutations. *Acta Neuropathol* 2013; 125(3): 351-358.
35. Smith MJ, O'Sullivan J, Bhaskar SS, Hadfield KD, Poke G, Caird J et al. Loss-of-function mutations in SMARCE1 cause an inherited disorder of multiple spinal meningiomas. *Nat Genet* 2013; 45(3): 295-298.

36. Smith MJ, Wallace AJ, Bennett C, Hasselblatt M, Elert-Dobkowska E, Evans LT et al. Germline SMARCE1 mutations predispose to both spinal and cranial clear cell meningiomas. *J Pathol* 2014; 234(4): 436-440.
37. Domingues P, González-Tablas M, Otero A, Pascual D, Ruiz L, Miranda D et al. Genetic/molecular alterations of meningiomas and the signaling pathways targeted. *Oncotarget*. 2015; 6(13): 1067-10688.
38. Abedalthagafi MS, Merrill PH, Bi WL, Jones RT, Listewnik ML, Ramkissoon SH et al. Angiomatous meningiomas have a distinct genetic profile with multiple chromosomal polysomies including polysomy of chromosome 5. *Oncotarget* 2014; 5(21): 10596-10606.
39. Harrison MJ, Wolfe DE, Lau TS, Mitnick RJ, Sachdev VP. Radiation-induced meningiomas: experience at the Mount Sinai Hospital and review of the literature. *J Neurosurg* 1991; 75: 564-574.
40. Mack EE, Wilson CB. Meningiomas induced by high-dose cranial irradiation. *J Neurosurg* 1993; 79: 28-31.
41. Musa BS, Pople IK, Cummins BH. Intracranial meningiomas following irradiation-a growing problem? *Br J Neurosurg* 1995; 9: 629-637.
42. Korhonen K, Salminen T, Raitanen J, Auvinen A, Isola J, Haapasalo H. Female predominance in meningiomas can not be explained by differences in progesterone, estrogen, or androgen receptor expression. *J Neurooncol* 2006; 80: 1-7.
43. 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: 616-623.
44. Zhang H, Rödiger LA, Shen T, Miao J, Oudkerk M. Preoperative subtyping of meningiomas by perfusion MR imaging. *Neuroradiology* 2008; 50: 835-40.

45. Takeguchi T, Miki H, Shimizu T, Kikuchi K, Mochizuki T, Ohue S, Ohnishi T. The dural tail of intracranial meningiomas on fluid-attenuated inversion-recovery images. *Neuroradiology* 2004; 46: 130-35.
46. Collamati F, Pepe A, Bellini F, Bocci V, Chiodi G, Cremonesi M, De Lucia E et al. Toward radioguided surgery with  $\beta$ -decays: uptake of a somatostatin analogue, DOTATOC, in meningioma and high-grade glioma. *J Nucl Med* 2015; 56: 3-8.
47. Rachinger W, Stoecklein VM, Terpolilli NA, Haug AR, Ertl L, Pöschl J et al. Increased  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATATE uptake in PET imaging discriminates meningioma and tumor-free tissue. *J Nucl Med* 2015; 56: 347-53.
48. Alguacil G, Pettigrew NM, Sima AA. Secretory meningioma. A distinct subtype of meningioma. *Am J Surg Pathol* 1986; 10: 102-111.
49. Robinson JC, Challa VR, Jones DS, Kelly DL, Jr. Pericytosis and edema generation: a unique clinicopathological variant of meningioma. *Neurosurgery* 1996; 39: 700-706.
50. Burger PC, Scheithauer BW, Vogel FS. *Surgical pathology of the nervous system and its coverings*. Churchill Livingstone; London, 1991.
51. Keppes JJ. *Meningiomas. Biology, Pathology, and Differential Diagnosis*. Masson Publishing; New York, 1982.
52. Lantos PL, VandenBerg SR, Kleihues P. Tumours of the Nervous System. In: *Greenfield's Neuropathology*. Graham DI, Lantos PL, eds. Arnold: London, pp. 583-879.
53. Russell DS, Rubinstein LJ. *Pathology of Tumours of the Nervous System*. Edward Arnold: London, 1989.
54. Ho DMT, Hsu CY, Ting LT, Chiang H. Histopathology and MIB-1 Labeling Index Predicted Recurrence of Meningiomas. *Cancer* 2002; 94(5): 1538-1547.

55. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. International histological classification of tumours. Histological typing of tumours of the central nervous system, 2nd ed. Geneva: World Health Organization, 1993.
56. Modha A, Gutin PH. Diagnosis and treatment of atypical and malignant meningiomas: a review. *Neurosurgery* 2005; 57(3): 538-550.
57. Perry A, Stafford SL, Scheithauer BW, Suman VJ, Lohse CM. Meningioma grading: an analysis of histologic parameters. *Am J Surg Pathol* 1997; 21(12): 1455-1465.
58. Kallio M, Sankila R, Hakulinen T, Jääskeläinen J. Factors affecting operative and excess long-term mortality in 935 patients with intracranial meningioma. *Neurosurgery* 1992; 31(1): 2-12.
59. Park BJ, Kim HK, Sade B, Lee JH. Epidemiology. In: Lee JH, editor. *Meningiomas: Diagnosis, Treatment, and Outcome*. London: Springer-Verlag; 2009. p. 11.
60. Bhat AR, Wani MA, Kirmani AR, Ramazan AU. Histological-subtypes and anatomical location correlated in meningeal brain tumors (meningiomas). *J Neurosci Rural Pract* 2014; 5(3): 244-249.
61. <http://www.braintumortreatment.com/Brain-Tumors/Tumor-Types/Meningioma.aspx>
62. Al-Mefty O, Topsakal C, Pravdenkova S, Sawyer JR, Harrison MJ. Radiation-induced meningiomas: clinical, pathological, cytogenetic, and cytogenetic characteristics. *J Neurosurg* 2004; 100: 1002-13.
63. Sadetzki S, Chetrit A, Freedman L, Stovall M, Modan B, Novikov I. Long-term follow-up for brain tumor development after childhood exposure to ionizing radiation for tinea capitis. *Radiat Res* 2005; 163: 424-32.

64. Sahm F, Schrimpf D, Olar A, Koelsche C, Reuss D, Bissel J, et al. TERT promoter mutations and risk of recurrence in meningioma. *J Natl Cancer Inst* 2016; 108: djv377.
65. Goutagny S, Nault JC, Mallet M, Henin D, Rossi JZ, Kalamarides M. High incidence of activating TERT promoter mutations in meningiomas undergoing malignant progression. *Brain Pathol* 2014; 24: 184-89.
66. Jo K, Park HJ, Nam DH, Lee JI, Kong DS, Park K, Kim JH. Treatment of atypical meningioma. *J Clin Neurosci* 2010; 17(11): 1362-1366.
67. Goyal LK, Suh JH, Mohan DS, Prayson RA, Lee J, Barnett GH. Local control and overall survival in atypical meningioma: a retrospective study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 46(1): 57-61.
68. Sun SQ, Cai C, Murphy RK, DeWees T, Dacey RG, Grubb RL, et al. Management of atypical cranial meningiomas, part 2: predictors of progression and the role of adjuvant radiation after subtotal resection. *Neurosurgery* 2014; 75(4): 356-363.
69. Kaley T, Barani I, Chamberlain M, McDermott M, Panageas K, Raizer J, et al. Historical benchmarks for medical therapy trials in surgery- and radiation-refractory meningioma: a RANO review. *Neuro Oncol* 2014; 16: 829-40.
70. Furtner J, Schöph V, Seystahl, Le Rhun E, Rudà R, Roelcke U, et al. Kinetics of tumor size and peritumoral brain edema before, during, and after systemic therapy in recurrent WHO grade II or III meningioma. *Neuro Oncol* 2016; 18: 401-07.
71. Lou E, Sumrall AL, Turner S, Peters KB, Desjardins A, Verdenburgh JJ, et al. Bevacizumab therapy for adults with recurrent/progressive meningioma: a retrospective series. *J Neurooncol* 2012; 109: 63-70.
72. Nayak L, Iwamoto FM, Rudnick JD, Norden AD, Lee EQ, Drappatz J, et al. Atypical and anaplastic meningiomas treated with bevacizumab. *J Neurooncol* 2012; 109: 187-93.

73. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90.
74. Milkovic L, Siems W, Siems R, Zarkovic N. Oxidative stress and antioxidants in carcinogenesis and integrative therapy of cancer. *Curr Pharm Des* 2014; 20: 6529-42.
75. Jakovčević A. Nazočnost 4-hidroksi-2-nonenal-a (HNE-a) u pločastom karcinomu orofarinksa. Doktorska disertacija, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Sveučilište u Dubrovniku, Institut Ruđer Bošković, Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti, 2016.
76. Boveri T. The origin of malignant tumors. Baltimore: Williams and Wilkins, 1929.
77. [http://www.klinikemija.kbcsm.hr/HDMB/BiochMedARHIVA/Vol05\\_1-1995/02\\_Straus\\_Karcinogeneza\\_Vol05\\_1-1995](http://www.klinikemija.kbcsm.hr/HDMB/BiochMedARHIVA/Vol05_1-1995/02_Straus_Karcinogeneza_Vol05_1-1995).
78. Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci* 1994; 107: 3569-77.
79. Perry RR, Mazeta J, Levin M, Barranco SC. Glutathione levels and variability in breast tumors and normal tissues. *Cancer* 1993; 72: 783-787.
80. Traverso N, Ricciarelli R, Nitti M, Marengo B, Furfaro AL, Pronzato MA, Marinari UM, Domenicotti C. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013: 972913.
81. Storz P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci* 2005; 1(10): 1881-1896.
82. Parola M, Bellomo G, Robino G, Barrera G, Dianzani MU. 4-Hydroxynonenal as a biological signal: molecular basis and pathophysiological implications. *Antioxid Redox Signal* 1999; 1(3): 255-284.



83. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408(6809): 239-247.
84. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 2002; 192(1): 1-15.
85. Cyr AR, Domann FE. The redox basis of epigenetic modifications: from mechanisms to functional consequences. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15: 551-89.
86. Magee JA, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell* 2012; 21: 283-96.
87. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-74.
88. Barrera G. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol* 2012; 2012: 137289.
89. Maiti AK. Genetic determinants of oxidative stress-mediated sensitization of drug-resistant cancer cells. *Int J Cancer* 2012; 130(1): 1-9.
90. Cerbone A, Toaldo C, Laurora S, Briatore F, Pizzimenti S, Dianzani MU et al. 4-hydroxynonenal and PPAR $\gamma$  ligands affect proliferation, differentiation, and apoptosis in colon cancer cells. *Free Radic Biol Med* 2007; 42(11): 1661-1670.
91. Ettarh R. Colorectal Cancer Biology – From Genes to Tumor. InTech; 2012, str. 161-163.
92. Gerber M, Astre C, Ségala C, Saintot M, Scali J, Simony-Lafontaine J, et al. Tumor progression and oxidant-antioxidant status. *Cancer Lett* 1997; 114: 211-4.
93. Juric-Sekhar G, Zarkovic K, Waeg G, Cipak A, Zarkovic N. Distribution of 4-hydroxynonenal-protein conjugates as a marker of lipid peroxidation and parameter of malignancy in astrocytic and ependymal tumors of the brain. *Tumori* 2009; 95: 762-8.

94. Sies H. Oxidative stress: Introductory remarks. In: Sies H, Ed. Oxidative stress, London: Academic press 1985; p. 1-7.
95. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press, Oxford 1989: 29-32.
96. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. Mol Cell Biochem 2004; 266(1-2): 37-56.
97. Fridovich I. Biological effects of the superoxide radical. Arch Biochem Biophys 1986; 247: 1-11.
98. Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, Fearon ER et al. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. Science 1997; 275(5306): 1649-1652.
99. Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. Nature Reviews Cancer 2009; 9(5): 361-371.
100. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. FASEB J 2003; 17: 1195-214.
101. Štefan L, Tepšić T, Zavidčić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipid peroxidation – causes and consequences. Medicina 2007; 43: 84-93.
102. Van Patten CL, de Boer JG, Tomlinson Guns ES. Diet and dietary supplement intervention trials for the prevention of prostate cancer recurrence: a review of the randomized controlled trial evidence. J Urol 2008; 180: 2314-21; discussion 2721-2.
103. Ilic D, Forbes KM, Hased C. Lycopene for the prevention of prostate cancer. Cochrane Database Syst Rev 2011: CD008007.

104. Tzonou A, Signorello LB, Lagiou P, Wu J, Trichopoulos D, Trichopoulou A. Diet and cancer of the prostate: a case-control study in Greece. *Int J Cancer* 1999; 80: 704-8.
105. Iovine NM, Pursnani S, Voldman A, Wasserman G, Blaser MJ, Weinrauch Y. Reactive nitrogen species contribute to innate host defense against *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 2008; 76(3): 986-93.
106. Yamamoto S. Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1128: 117-131.
107. Gago-Dominguez M, Jiang X, Castela JE. Lipid peroxidation, oxidative stress genes and dietary factors in breast cancer protection: a hypothesis. *Breast Cancer Res* 2007; 9: 201.
108. Wildburger R, Mrakovcic L, Stroser M, Andric L, Sunjic SB, Zarkovic K, Zarkovic N. Lipid peroxidation and age-associated diseases-cause or consequence? *Turkiye Klin J Med Sci* 2009; 29: 189-93.
109. Halliwell B, Chirco S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 715-25.
110. Porter NA. Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1984; 105: 273-82.
111. Zhong H, Yin H. Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: focusing on mitochondria. *Redox Biol* 2015; 4: 193-9.
112. Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 2003; 42: 318-43.
113. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Bio Med* 1991; 11(1): 81-128.

114. Parola M, Bellomo G, Robino G, Barrera G, Dianzani MU. 4-Hydroxynonenal as a biological signal: molecular basis and pathophysiological implications. *Antioxid Redox Signal* 1999; 1(3): 255-84.
115. Yang K, Fangl JL, Hemminki K. Abundant lipophilic DNA adducts in human tissues. *Mutat Res* 1998; 422(2): 285-95.
116. Zarkovic K, Jakovcevic A, Zarkovic N. Contribution of the HNE-immunohistochemistry to modern pathological concepts of major human diseases. *Free Radical Biology and Medicine* 2017; 111: 110-126.
117. Zarkovic K, Juric G, Waeg G, Kolenc D, Zarkovic N. Immunohistochemical appearance of HNE-protein conjugates in human astrocytomas. *BioFactors* 2005; 24: 33-40.
118. Zarkovic K, Uchida K, Kolenc D, Hlupic L, Zarkovic N. Tissue distribution of lipid peroxidation product acrolein in human colon carcinogenesis. *Free Radic Res* 2006; 40: 543-552.
119. Biasi F, Tessitore L, Zanetti D, Citrin JC, Zingaro B, Chiarpotto E, Zarkovic N, Serviddio G, Poli G. Associated changes of lipid peroxidation and TGF $\beta$ 1 levels in human cancer during tumor progression. *Gut* 2002; 50: 361-367.
120. Oberley TD, Toyokuni S, Szweda AI. Localization of hydroxynonenal protein adducts in normal human kidney and selected human kidney cancers. *Free Radic Biol Med* 1999; 27(5-6): 695-703.
121. Custovic Z, Zarkovic K, Cindric M, Cipak A, Jurkovic I, Sonicki Z, Uchida K, Zarkovic N. Lipid peroxidation product acrolein as a predictive biomarker of prostate carcinoma relapse after radical surgery. *Free Radic Res* 2010; 44(5): 497-504.
122. Young O, Crotty T, O'Connell R, O'Sullivan J, Curran AJ. Levels of oxidative damage and lipid peroxidation in thyroid neoplasia. *Head Neck* 2010; 32(6): 750-756.

123. Karihtala P, Kauppila S, Puistola U, Jukkola Vuorinen A. Divergent behavior of oxidative stress markers 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) in breast carcinogenesis. *Histopathology* 2011; 58: 854-862.
124. Gęgotek A, Nikliński J, Žarković N, Žarković K, Waeg G, Łuczaj W, Charkiewicz R, Skrzydlewska E. Lipid mediators involved in the oxidative stress and antioxidant defence of human lung cancer cells. *Redox Biol* 2016; 9: 210-219.
125. Gasparovic AC, Milkovic L, Sunjic SB, Zarkovic N. Cancer growth regulation by 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med* 2017; 111: 226-234.
126. Dianzani MU, Barrera G, Parola M. 4-Hydroxy-2,3-nonenal as a signal for cell function and differentiation. *Acta Biochim* 1999; 46: 61-75.
127. Zarkovic N, Ilic Z, Jurin M, Schaur RJ, Puhl H, Esterbauer H. Stimulation of HeLa cell growth by physiological concentrations of 4-hydroxynonenal. *Cell Biochem* 1993; 11: 279-286.
128. Milkovic L, Cipak Gasparovic A, Zarkovic N. Overview on major lipid peroxidation bioactive factor 4-hydroxynonenal as pluripotent growth-regulating factor. *Free Radic Res* 2015; 49: 850-860.
129. <http://www.hopkinsmedicine.org>
130. Cirak B, Inci S, Palaoglu S, Bertan V. Lipid peroxidation in cerebral tumours. *Clin Chim Acta* 2003; 327(1-2): 103-107.
131. Gayathri MR, Ashalatha VR, Annaswamy R, Suryanarayana R, Anjali R. Role of antioxidant enzymes in brain tumours. *Clin Chim Acta* 2000; 296(1-2): 203-212.
132. Woźniak B, Woźniak A, Kasprzak HA, Drewa G, Mila-Kierzenkowska C, Drewa T et al. Lipid peroxidation and activity of some antioxidant enzymes in patients with glioblastomas and astrocytomas. *J Neurooncol* 2007; 81: 21-26.

133. Zajdel A, Wilczok A, Slowinski J, Orchel J, Mazurek U. Aldehydic lipid peroxidation products in human brain astrocytomas. *J Neurooncol* 2007; 84(2): 167-173.
134. Cindrić M. Biomodulacija propusnosti krvno – mozgovne barijere 4-hidroksinonenalom in vitro. Doktorska disertacija, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Sveučilište u Dubrovniku, Institut Ruđer Bošković, Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti, 2014.
135. Schlag G, Redl H, Traber D. Shock, sepsis, and organ failure – Brain damage secondary to hemorrhagic traumatic shock, sepsis, and traumatic brain injury. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1996.
136. Fox SB, Gatter KC, Harris AL. Tumor angiogenesis. *J Pathol* 1996; 179: 232-7.
137. Siems W, Grune T. Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal. *Mol Asp Med* 2003; 24: 167-175.
138. Romano A, Serviddio G, Calcagnini, Villani R, Giudetti AM, Cassano T, Gaetani S. Linking lipid peroxidation and neuropsychiatric disorders: focus on 4-hydroxy-2-nonenal. *Free Radic Biol Med* 2017; 111: 281-293.
139. Di Domenico F, Tramutola A, Butterfield DA. Role of 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) in the pathogenesis of alzheimer disease and other selected age-related neurodegenerative disorders. *Free Radic Biol Med* 2017; 111: 253-261.
140. Yelisyeyeva O, Cherkas A, Zarkovic K, Semen K, Kaminsky D, Waeg G, Zarkovic N. The distribution of 4-hydroxynonenal-modified proteins in gastric mucosa of duodenal peptic ulcer patients. *Free Radic Res* 2008; 42: 205-211.
141. Bauer G, Zarkovic N. Revealing mechanisms of selective, concentration-dependent potentials of 4-hydroxy-2-nonenal to induce apoptosis in cancer cells through inactivation of membrane-associated catalase. *Free Radic Biol Med* 2015; 81: 128-144.

142. Tammali R, Ramana KV, Singhal SS, Awasthi S, Srivastava SK. Aldose reductase regulates growth factor-induced cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human colon cancer cells. *Cancer Res* 2006; 66: 9705-13.
143. Ramana KV, Srivastava KS. Aldose reductase: a novel therapeutic target for inflammatory pathologies. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42: 17-20.
144. Ben-Neriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF- $\kappa$ B as the match-maker. *Nat Immunol* 2011; 12: 715-723.
145. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-674.
146. Tong X, Yin L, Washington R, Rosenberg DW, Giardina C. The p50-p50 NFkappaB complex as a stimulus-specific repressor of gene activation. *Mol Cell Biochem* 2004; 265: 171-183.
147. Zibzibadze M, Bochorishvili I, Ramishvili L, Managadze L, Kortikadze N. Investigation of pro- and antioxidative systems changes in blood of patients with prostate tumours. *Georgian Med News* 2009; 169: 26-9.
148. Przybyszewski WM, Rzeszowska-Wolny J. Oxidative stress in prostate hypertrophy and carcinogenesis. *Postepy Hig Med Dosw* 2009; 20(63): 340-50.
149. Mikhak B, Hunter DJ, Spiegelman D, Platz EA, Wu K, Erdman JW Jr, Giovannucci E. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism, interactions with carotenoid levels and prostate cancer risk. *Carcinogenesis* 2008; 29(12): 2335-40.
150. Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 2004; 43(3): 200-27.

151. Lim HW, Hong S, Jin W, Lim S, Kim SJ, Kang HJ, Park EH, Ahn K, Lim CJ. Up-regulation of defense enzymes is responsible for low reactive oxygen species in malignant prostate cancer cells. *Exp Mol Med* 2005; 37(5): 497-506.
152. Huber MA, Azoitei N, Baumann B, Grünert S, Sommer A, Pehamberger H, Kraut N, Beug H, Wirth T. NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest* 2004; 114: 569-581.
153. Matosevic P, Klepac-Pulanic T, Kinda E, Augustin G, Brcic I, Jakic-Razumovic J. Immunohistochemical expression of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in cytoplasm of tumour and adjacent normal mucosa cells in patients with colorectal cancer. *World J Surg Oncol* 2015; 13: 241. doi:10.1186/s12957-015-0667-6.
154. Atukeren P, Oner S, Baran O, Kemerdere R, Eren B, Cakatay U, Tanriverdi T. Oxidant and anti-oxidant status in common brain tumors: Correlation to TP53 and human biliverdin reductase. *Clin Neurol Neurosurg* 2017; 158:72-76.



## **8. SAŽETAK**

## 8. SAŽETAK

Oksidativnim stresom inducirana lipidna peroksidacija povezana je s fiziologijom i bolestima čovjeka uključujući i rak. Sveobuhvatni podatci ukazuju da su reaktivni lipidni medijatori koji se stvaraju iz ovih procesa, poput 4-hidroksinonenala (4-HNE), biomarkeri oksidativnog stresa i igraju važnu ulogu u posredovanju brojnih signalnih putova. Meningeomi su učestale neoplazme mozga i kralježnične moždine. Postoje tri gradusa prema klasifikaciji SZO, većina meningeoma klasificira se kao gradus I, te gradus II (atipični) i gradus III (anaplastični).

Ovo je retrospektivno istraživanje o analizi ekspresije HNE u ljudskim meningealnim tumorima različitih gradusa. Cilj ovog istraživanja je ispitati imunohistokemijsku pojavnost HNE u meningeomima različitih gradusa te utvrditi distribuciju koekspresije u tim gradusima prema sastavnicama tumorskog tkiva i prema drugim patološko-kliničkim čimbenicima tumorskog rasta.

Analizirana je nazočnost HNE koristeći monoklonsko protutijelo na HNE-histidinske konjugate iz parafinskih blokova od 234 bolesnika s meningeomima različitih gradusa. Pojavnost HNE zamijećena je u određenim tumorskim stanicama i stromi, ali ne u svim uzorcima tumora. Razina HNE imunopozitiviteta smanjivala se s porastom zloćudnosti meningeoma u citoplazmi tumorskih stanica i stromi.

Povećanje znanja o nazočnosti HNE u ljudskim meningeomima različitih gradusa može dovesti do bolje prevencije, dijagnoze i liječenja ovih tumora. U budućnosti potrebna su daljnja istraživanja za bolje razumijevanje lipidne peroksidacije i oksidacijskog stresa u ljudskim meningeomima.

## **9. SUMMARY**

## 9. SUMMARY

Oxidative stress-induced lipid peroxidation has been associated with human physiology and diseases including cancer. Overwhelming data suggest that reactive lipid mediators generated from this process, such as 4-hydroxynonenal (4-HNE), are biomarkers for oxidative stress and important players for mediating a number of signaling pathways. Meningiomas are common neoplasms of the brain and spinal cord. There are three grades according to WHO, most meningiomas are classified as grade I, grade II (atypical) and grade III (anaplastic).

This is retrospective study of analysis of the expression of HNE in human meningiomas of different grade. The aim of the study is to explore the connection between immunohistochemical level of HNE in meningiomas of different grade and to determined distribution of co-expression in these grades to component of tumor tissue and according to other clinical-pathological factors of tumor growth.

The expression of HNE was analysed using monoclonal antibody for the HNE-histidine conjugates in tumor samples of 234 patients with meningiomas of different degrees. HNE immunopositivity was found in certain tumor cells and stroma, but not in all tumor samples. The level of HNE immunopositivity decreased with malignancy of meningiomas in cytoplasm of tumor cells and stroma.

The increase of knowledge of the expression of HNE in human meningiomas of different grade might lead to better prevention, diagnosis and treatments of this tumor. Further research is needed in the future for a better understanding of lipid peroxidation and oxidative stress in human meningiomas.

## **10. ŽIVOTOPIS**

## 10. ŽIVOTOPIS

### Osobne informacije

Ime i prezime: **Ines Trninić**

Titula: doktor medicine

Adresa: Gorica Svetoga Vlaha 149, 20 000 Dubrovnik

Telefon: +385 98 903 8075

E-mail: inestrninic@yahoo.com

Državljanstvo: hrvatsko

Datum i mjesto rođenja: 18. 09. 1984. Split, Hrvatska

### Radno iskustvo

Studenj 2012. – danas

specijalizantica neurokirurgije, Odjel za neurokirurgiju, Opća bolnica Dubrovnik, trenutno na provođenju specijalizacije u KBC-u Zagreb

Područja rada - neurokirurgija

Srpanj 2011. – listopad 2012.

Liječnik, Odjel za kirurgiju, Opća bolnica Dubrovnik

Područje rada – opća kirurgija

Ožujak 2011. – lipanj 2011.

Liječnik, Ustanova za hitnu medicinsku pomoć Dubrovnik

Područje rada: hitna medicina

Siječanj 2010. – siječanj 2011.

Liječnik pripravnik – Opća bolnica Dubrovnik

Područje rada – pripravnički staž

## **Obrazovanje**

Rujan 2012. – danas

Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Sveučilište u Dubrovniku i Institut Ruđer Bošković u Zagrebu

Studeni 2012. – danas

Specijalizacija iz neurokirurgije, Opća bolnica Dubrovnik i KBC Zagreb

Datum: 26. 01. 2011.

Položen stručni ispit pred ispitnom komisijom Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske i stečena stručna osposobljenost za samostalni rad kao doktor medicine

Srpanj 2003. – rujan 2009.

Medicinski fakultet, Sveučilišta u Mostaru, Bosna i Hercegovina

## **Materinski jezik**

Hrvatski jezik

## **Ostali jezici**

Engleski jezik

Njemački jezik – pasivno

## **Članstva**

Hrvatski liječnički zbor

Hrvatsko neurokirurško društvo

## **Računalne vještine**

MS Office

## POPIS PUBLIKACIJA

### Kongresna izvješća (sažetci)

1. Đurić KS, Mrak G, Trninić I, Jakovčević A, Žarković K, Miklić P. Third ventricular chordoid meningeoma or chordoma“: diagnostic dilemma based on a single case. Case report and literature review. 7th Congress of the Croatian Neurosurgical, November 20-22, 2014, Zagreb, Croatia (poster, sažetak, znanstveni)
2. Trninić I, Lupret V, Rumboldt Z. An unusual intracranial epidermoid tumor: A long indolent course followed by rapid onset of symptoms. A case report. 7th Congress of the Croatian Neurosurgical, November 20-22, 2014, Zagreb, Croatia (poster, znanstveni)

### Znanstveni članci

1. Vukojevic M, Trninic I, Dodaj A, Malenica M, Barisic T, Stojic S. Appearance of neurodevelopmental disorders in children delivered post-term: a cross-section study. *Mater Sociomed.* 2016; 28(2): 99-103.
2. Nemir J, Trninic I, Duric KS, Jakovcevic A, Mrak G, Paladino J. Extranodal right-optic nerve Rosai-Dorfman disease: A rare localization case report. *Surg Neurol Int.* 2016; 7(44): 1158-1162.
3. Pašalić I, Trninić I, Nemir J, Jednačak H, Žarković K, Mrak G. Rare infratentorial and supratentorial localization of juvenile angiofibroma: a case report. *Pediatr Neurosurg.* 2016; 51(6): 313-317.
4. Nemir J, Peterković V, Trninić I, Domazet I, Barić H, Vukić M. Intracranial Epidural Haematoma following Surgical Removal of a Giant Lumbosacral Schwannoma: A Case Report and Literature Review. *Pediatr Neurosurg.* 2018; 53(2): 89-93.



