

Mateusz Józefowicz, Wielisław Papierz

Received: 25.05.2012

Accepted: 12.06.2012

Published: 29.06.2012

Histologiczne kryteria diagnostyczne oponiaków atypowych (GII WHO) i ich związek z potencjałem proliferacyjnym

Histologic features and MIB-1/Ki67 indices in atypical meningiomas (GII WHO)

Zakład Patomorfologii Katedry Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Adres do korespondencji: Zakład Patomorfologii Katedry Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi,

ul. Pomorska 251, 92-213 Łódź, tel./faks: 42 679 01 91, e-mail: mateusz.jozefowicz@umed.lodz.pl

Praca finansowana ze środków własnych

Streszczenie

Oponiaki atypowe zostały zdefiniowane w klasyfikacji WHO jako nowotwory charakteryzujące się histologicznie bądź aktywnością mitotyczną o wartości 4-20 mitoz/10 HPF, bądź co najmniej trzema spośród pięciu następujących cech: gęstokomórkowe utkanie, małe komórki z przesuniętym na korzyść jądra współczynnikiem „jądro-cytoplazmatycznym”, jądro z wyraźnym jąderkiem, brak struktur cytoarchitektonicznych (ang. *patternless or sheet-like growth*) i ogniska martwicy. Oznacza to, że guzy ukazujące mikroskopowo jedną, a nawet dwie spośród wymienionych cech należy zaliczyć, mimo tych nieprawidłowości, do grupy oponiaków łagodnych (GI WHO). Celem przeprowadzonych badań było poszukiwanie w grupie pięciu kryteriów diagnostycznych oponiaków atypowych wg WHO takich cech histologicznych, które w największym stopniu korelują z wartością indeksu proliferacyjnego tych nowotworów. Materiał badawczy obejmował 65 oponiaków atypowych oraz 59 oponiaków łagodnych, wykazujących przynajmniej jedną cechę histologiczną charakterystyczną dla oponiaków atypowych, wybranych spośród 240 archiwalnych przypadków z lat 2004-2011. Wszystkie nowotwory zostały ocenione pod względem pięciu histologicznych kryteriów diagnostycznych dla oponiaków atypowych oraz liczby mitoz na dziesięć pól widzenia. We wszystkich badanych guzach wykonano reakcję immunohistochemiczną z przeciwciałem MIB-1. Indeks proliferacyjny (PI) obliczono za pomocą komputerowego analizatora obrazu. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono związek PI z ogniskami martwicy, wyraźnymi jąderkami, brakiem układów cytoarchitektonicznych charakterystycznych dla oponiaków GI WHO, obecnością drobnych komórek ze zwiększonym stosunkiem jądro-cytoplazmatycznym oraz liczbą cech histologicznych.

Słowa kluczowe: oponiaki atypowe, oponiaki łagodne, kryteria histologiczne, indeks proliferacyjny

Summary

Atypical meningiomas are defined according WHO criteria as tumours characterized by: increased mitotic activity or three or more of the following histologic features: increased cellularity, small cells with a high nuclear/cytoplasmic ratio, prominent nucleoli, patternless or sheet like growth, and foci of “spontaneous” or “geographic” necrosis. It means, that those meningiomas which reveal only one or even two from above mentioned features are, according to WHO classification, still consistent with diagnosis of benign (GI WHO) tumours. Histologic slices from 65 atypical meningiomas were investigated and presence of each from those diagnostic histologic criteria which were mentioned above, were taken to account. Additionally, in the same way 59 benign meningiomas, which showed one or two histologic features char-

acteristic for atypical type of the tumours, were analysed. In all cases immunohistochemical reaction with MIB-1 antibody was carried out and proliferating indices (PI) were established using image analysis computer system. Correlation between histologic criteria for atypical meningiomas and proliferating indices of the tumours was statistically estimated. We found a significant relationship between PI and mitotic activity, necrosis, small cells changes, patternless growth, nucleolies and number of histologic features that tumors present.

Key words: atypical meningiomas, benign meningiomas, histologic features, proliferative index

WSTĘP

WPROWADZENIE

Oponiaki to jedne z najczęstszych pierwotnych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego (OUN)⁽¹⁻⁴⁾. Wywodzą się z komórek arachnoidalnych opon i lokalizują najczęściej wewnątrzczaszkowo^(5,6). Charakteryzuje je znaczna różnorodność budowy mikroskopowej. W klasyfikacji WHO wyróżniono aż 15 postaci histologicznych tych guzów⁽⁶⁾. Znacząca większość (9 postaci) to nowotwory łagodne (GI WHO), o powolnym wzroście i dobrym rokowaniu. Trzem postaciom przypisano II stopień złośliwości (GII WHO). W przypadkach oponiaków tej grupy, ze względu na wysokie prawdopodobieństwo wznowy pooperacyjnej, zalecane jest leczenie uzupełniające pod postacią radioterapii⁽⁷⁾. Kolejne trzy postaci oponiaków to guzy histologicznie złośliwe (GIII WHO), o niekorzystnym rokowaniu.

Od 2000 roku, w którym do klasyfikacji WHO guzów układu nerwowego wprowadzono sprecyzowane, histologiczne kryteria diagnostyczne dla oponiaków atypowych (GII WHO), zaznacza się wzrost częstości rozpoznań tej postaci histologicznej. Według najnowszych doniesień odsetek oponiaków atypowych sięga nawet ponad 20%⁽⁶⁾.

Coraz więcej uwagi zwraca się ponadto na grupę oponiaków łagodnych (GI WHO) ujawniających w obrazie mikroskopowym niektóre nieprawidłowości histologiczne z grupy kryteriów diagnostycznych oponiaków atypowych, które przyjęto nazywać oponiakami z cechami atypii (ang. *meningiomas with atypical features*) lub oponiakami o granicznej atypii (ang. *meningiomas with borderline atypia*)^(8,9).

O ile w dobie medycyny standardów i algorytmów oraz medycyny opartej na dowodach (ang. *evidence-based medicine*, EBM) wybór leczenia uzupełniającego pod postacią radioterapii w przypadkach rozpoznań oponiaków atypowych wydaje się oczywisty, o tyle nie ustalono dotąd sposobu postępowania z pacjentami, u których rozpoznano oponiaki o granicznej atypii.

W niniejszej pracy, ściśle morfologicznej, nie dajemy wprawdzie odpowiedzi na to pytanie, jednak oceniając kryteria histologiczne atypii oponiaków, zamierzaliśmy wskazać te spośród nich, które pozostają w najsilniejszym związku z potencjałem rozrostowym tych nowotworów. Adnotacja w raporcie lekarza histopatologa o obecności takich cech w utkanie oponiaka GI mogłaby nieść ze sobą praktyczne implikacje kliniczne.

EPIDEMIOLOGIA OPONIAKÓW

Zgodnie z danymi z dostępnej literatury naukowej oponiaki stanowiły do niedawna drugą pod względem częstości grupę pierwotnych nowotworów OUN⁽¹⁰⁻¹²⁾. Za najczęściej występujące pierwotne guzy OUN uważano glejaki⁽¹³⁾. W lutym 2010 i lutym 2011 roku opublikowano raporty Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS) dotyczące częstości występowania wszystkich pierwotnych guzów OUN zdiagnozowanych w Stanach Zjednoczonych w latach 2004-2006 oraz 2004-2007^(1,2). Dane uzyskane z powyższych raportów wykazały, iż oponiaki są najczęstszymi pierwotnymi nowotworami układu nerwowego, z częstością występowania wynoszącą odpowiednio 33,8%⁽¹⁾ i 34,4%⁽²⁾, podczas gdy częstość występowania glejaków wynosiła 31%. We wspomnianych raportach podano ponadto, iż oponiaki ponad dwukrotnie częściej (2,2:1) występują wśród kobiet niż u mężczyzn.

O ile w populacji dorosłych oponiaki są nowotworami występującymi często, o tyle u dzieci stanowią one od 1,9% (0-14 lat) do 4,3% (15-19 lat) pierwotnych nowotworów OUN^(1,2,14-17). W niektórych pracach podkreślany jest związek oponiaków u dzieci z neurofibromatozą typu 2⁽¹⁸⁻²⁰⁾ oraz znacznie częstsza niż u dorosłych lokalizacja śródkomorowa i podnamiotowa^(14,18,20,21). Ponadto w populacji dzieci chorych oponiaki nieznacznie częściej występują u chłopców niż u dziewcząt^(15,20,22).

CZYNNIKI RYZYKA I ETIOLOGIA OPONIAKÓW

Do czynników ryzyka przyczyniających się do rozwoju oponiaków należą: promieniowanie jonizujące, promieniowanie elektromagnetyczne w zakresie mikrofal, czynniki hormonalne oraz urazy OUN.

Za najważniejszy środowiskowy czynnik ryzyka uważa się obecnie promieniowanie jonizujące (ang. *ionizing radiation*, IR)⁽²³⁻²⁵⁾. Dane z piśmiennictwa wskazują, że ryzyko zachorowania wzrasta od 6 do 10 razy w zależności od dawki IR. Badanie przeprowadzone przez Prestona i wsp. pośród osób, które przeżyły wybuch bomby atomowej, wykazało silną korelację pomiędzy emisją promieniotwórczą i częstością występowania guzów OUN⁽²³⁾. Nie bez znaczenia pozostaje także wpływ IR stosowanego w celach diagnostycznych czy terapeutycznych. Wskazuje się na istotną rolę badań diagnostycznych z wykorzystaniem promieniowania RTG, w szczególności na wielokrotne wykonywanie zdjęcia pantomograficznego pełnego uzębienia oraz radioterapię guzów

wewnątrzczaszkowych^(26,27). Dostępne dane dotyczące badania wpływu IR na rozwój nowotworów OUN pochodzą jednak głównie z badań retrospektywnych. Obecnie stosowane w diagnostyce obrazowej dawki IR oraz zastosowanie w procedurach terapeutycznych nowoczesnego sprzętu prawdopodobnie nie powodują wzrostu częstości występowania oponiaków oraz innych nowotworów OUN⁽²⁶⁾.

Należy ponadto wspomnieć o domniemanym wpływie używania telefonów komórkowych na częstość występowania nowotworów OUN. Telefony te emitują promieniowanie elektromagnetyczne w zakresie mikrofal, które wywołuje szereg efektów, m.in. termiczny i genotoksyczny. Największe do tej pory, zakończone badania obejmowały osoby intensywnie korzystające z telefonów komórkowych przez okres dziesięciu lat. Uzyskane wyniki nie wykazały, aby u tych osób w sposób istotny statystycznie wzrosła częstość zachorowań na nowotwory OUN⁽²⁸⁻³⁰⁾.

Kolejnym istotnym czynnikiem zwiększającym ryzyko rozwoju oponiaków są hormony płciowe. Dane z dostępnych badań naukowych wykazały, iż wśród kobiet w wieku reprodukcyjnym częstość występowania oponiaków w stosunku do częstości występowania wśród mężczyzn wynosi nawet 3,15:1^(4,31).

W komórkach oponiaków wykazano obecność receptorów dla estrogenów, progesteronu i hormonów androgenowych⁽³²⁻³⁴⁾. Stwierdzono ponadto związek między występowaniem oponiaków i rakiem sutka, a także zauważono zmiany rozmiarów guza w przebiegu cyklu menstruacyjnego oraz w trakcie trwania ciąży^(35,36). Wyniki badań naukowych wskazują również na regresję guza u osób, u których przerwano terapię agonistami estrogenów^(37,38). Wyżej wymienione spostrzeżenia przyczyniły się do podjęcia dalszych badań nad wpływem układu endokrynnego na rozwój oponiaków. Szczególną uwagę zwrócono na wpływ hormonów, tak często stosowanych w formie dostępnych środków antykoncepcyjnych (ang. *oral contraceptives*, OC) lub hormonalnej terapii zastępczej (ang. *hormone replacement therapy*, HRT). Badania na dużych grupach pacjentek wykazały jednak nieznaczny tylko wzrost ryzyka częstości występowania oponiaków u kobiet przewlekłe stosujących HRT, a w odniesieniu do zażywania OC wzrost ryzyka nie był statystycznie istotny^(35,39-41). Z drugiej strony istnieją doniesienia o protekcyjnym działaniu OC⁽⁴²⁾.

Częstość występowania oponiaków u kobiet badano także w zależności od wieku pierwszej miesiączki, menopauzy, liczby ciąż oraz czynników antropometrycznych. Uzyskane wyniki okazały się niejednoznaczne. W większości nie wykazano istotnej zależności pomiędzy wymienionymi czynnikami a ryzykiem rozwoju nowotworów opon^(37,39-41,43).

W licznych badaniach klinicznych i epidemiologicznych przeprowadzonych do tej pory nie wykazano jednoznacznie wpływu endogennych i egzogennych hormonów na rozwój oponiaków. Pomimo niekiedy silnej ekspresji receptorów dla hormonów płciowych w komórkach oponiaków ich rola pozostaje nadal niejednoznaczna, przez co nie można tych guzów zakwalifikować do grupy nowotworów hormonozależnych ani w jednoznaczny sposób wyjaśnić dominacji płci żeńskiej wśród chorych na oponiaka⁽⁴⁴⁾.

Benson, który przeprowadził analizę wpływu takich zmieniowych, jak: wzrost, wskaźnik BMI (ang. *body mass index*) oraz zawartość tkanki tłuszczowej w organizmie, na rozwój oponiaków, wykazał statystycznie istotny wzrost ryzyka zachorowania wśród kobiet o wysokim wzroście i o dużej zawartości tkanki tłuszczowej w organizmie⁽⁴³⁾.

Lee stwierdził, że ilość tkanki tłuszczowej ma związek z aktywnością aromatazy steroidowej, co z kolei wpływa na większą ekspozycję na endogenne estrogeny⁽⁴²⁾.

W kilkunastu badaniach analizowano związek między występowaniem raka sutka i występowaniem oponiaków^(36,37,45). Wyniki tych analiz nie wykazały przyczynowej zależności pomiędzy występowaniem obu wymienionych nowotworów.

Prawdopodobne jest, że współwystępowanie kilku czynników, takich jak płeć żeńska, wiek oraz wpływ hormonów płciowych, zwiększa ryzyko rozwoju zarówno raka sutka, jak i oponiaka⁽³⁶⁾.

Do postulowanych czynników ryzyka rozwoju oponiaków zaliczono ponadto urazy głowy⁽⁴⁶⁾, jednakże największe do tej pory kohortowe badanie, przeprowadzone w Danii na ponad 228 000 pacjentów hospitalizowanych z powodu urazów głowy, nie wykazało takiej zależności⁽⁴⁷⁾.

PATOGENEZA OPONIAKÓW

Oponiaki są nowotworami wywodzącymi się z komórek arachnoidalnych opon^(48,49). W większości przypadków mają łagodny przebieg i tak samo jak w przypadku raków rozrostowi klonalnemu ulega jedna linia komórkowa⁽⁵⁰⁾. Guzy te rozwijają się sporadycznie (ponad 90%) lub rodzinnie jako składowe nerwiakowłóknakowatości typu 2., rzadkiej choroby genetycznej (1:210 000) dziedziczonej autosomalnie dominująco^(51,52). W przypadkach rodzinnych nierzadko występują oponiaki mnogie⁽¹¹⁾.

Badania molekularne wykazały, że podstawową rolę w etiologii oponiaków odgrywa gen *NF2* zlokalizowany na ramieniu długim 22. chromosomu (22q12.2) i kodujący białko merlinę (neurofibrominę-2)^(11,48-50,52-60). Oponiaki związane z nerwiakowłóknakowatością typu 2. oraz większość (około 60%) sporadycznych przypadków oponiaków łagodnych (I° WHO) rozwijają się poprzez pojedynczą mutację (delecję lub inaktywację) genu *NF2*. W przypadkach oponiaków II i III stopnia złośliwości wg WHO aberracje genetyczne ujawniają się w większej liczbie i wzrasta ona wraz ze stopniem złośliwości guza. Pojawiają się inaktywacje w obrębie chromosomów 1p, 14q, 10q i 9p, a także reaktywacja telomerazy oraz inaktywacja genu *p16/CDKN2A* (ang. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*)^(48,55,59).

Wraz z rozwojem technik biologii molekularnej pojawia się coraz więcej doniesień o kolejnych zaburzeniach molekularnych, które mogą mieć znaczenie we wczesnym okresie onkogenezy oponiaków. Najczęściej wymienia się BCR (ang. *breakpoint cluster region*), BAM22 (ang. *bovine adrenal medulla*) i TIMP-1 (ang. *tissue inhibitor of metalloprotease*) oraz zlokalizowany w 18. chromosomie 4.1B/DAL-1 (ang. *differentially expressed in adenocarcinoma of the lung*)^(11,48,49,60).

OCENA AKTYWNOŚCI PROLIFERACYJNEJ OPONIAKÓW

Znacząca większość oponiaków to guzy łagodne, o powolnym wzroście⁽⁶¹⁻⁶⁴⁾. Pomimo ich całkowitej resekcji wznowy nie są rzadkością i prognozowanie klinicznego przebiegu w okresie pooperacyjnym na podstawie jedynie cech histologicznych guza ma swoje ograniczenia. Dlatego też ustalenie aktywności proliferacyjnej nowotworu dostarcza ważnych informacji o znaczeniu prognostycznym. Często też, w odniesieniu do wielu nowotworów, wynik oceny aktywności proliferacyjnej wpływa na decyzje terapeutyczne, gdyż jest jednym z czynników odzwierciedlających wrażliwość nowotworu na radio- lub chemioterapię. Ponadto ocena proliferacji przed rozpoczęciem leczenia i po jego zakończeniu wzbogaca wiedzę na temat skuteczności zastosowanej metody terapeutycznej⁽⁶⁵⁾.

Do oceny frakcji wzrostowej nowotworów wykorzystuje się materiał tkankowy zarówno świeży, mrożony, jak i utrwalony w formalinie i zatopiony w bloczkach parafinowych. Gdy zachodzi taka potrzeba, można też wykorzystać materiał cytologiczny⁽⁶⁶⁾.

Wyniki przeprowadzonej oceny aktywności proliferacyjnej przedstawia się zazwyczaj jako tzw. indeks proliferacyjny (ang. *proliferation index*, PI)⁽⁶⁵⁾. Określa on stosunek liczby komórek zdolnych do proliferacji do całkowitej liczby ocenionych komórek nowotworowych.

Do oceny aktywności proliferacyjnej wykorzystywane są różne metody, a powszechność zastosowania danej metody zależy od prostoty jej wykonania, powtarzalności wyników oraz kosztów. Interpretacja wyników powinna uwzględniać także cechy histologiczne guza oraz dane kliniczne⁽⁶⁷⁾.

Należy wziąć pod uwagę ponadto heterogenność nowotworu w różnych jego obszarach. Czynniki te powodują, iż wyniki oceny indeksu proliferacyjnego nie zawsze odzwierciedlają właściwości biologiczne całego guza⁽⁶⁸⁻⁷¹⁾.

W odniesieniu do oponiaków najbardziej wiarygodnymi i powszechnie stosowanymi metodami oznaczania aktywności proliferacyjnej są określanie liczby mitotycznej w 10 polach widzenia pod dużym powiększeniem mikroskopu (400×) oraz określanie indeksu proliferacyjnego metodami immunohistochemicznymi, głównie z wykorzystaniem antygeny Ki-67.

Określanie liczby mitoz

Klasyczna metoda określania aktywności proliferacyjnej polega na ustaleniu liczby figur podziału mitotycznego w preparacie histopatologicznym przypadających na określoną liczbę pól widzenia, najczęściej na 10 pól w powiększeniu 400×^(72,73). Jest to tzw. liczba mitotyczna (ang. *mitotic count*). Wyniki można przedstawiać także jako liczbę mitoz na 1 mm² lub jako stosunek liczby figur podziału do całkowitej liczby zliczanych komórek. Wadą tej metody jest możliwość identyfikacji w mikroskopie świetlnym tylko komórek będących w fazie M, nie ma bowiem możliwości wyróżnienia komórek znajdujących się w pozostałych fazach cyklu podziałowego⁽⁶⁵⁾. Metoda ta nie

uwzględnia ponadto czasu trwania fazy M, który bywa różny. Niski indeks mitotyczny nie zawsze oznacza niską aktywność proliferacyjną, bowiem wynikać może z dużej szybkości procesów podziału⁽⁷²⁾.

Do zalet metody oceny liczby mitoz należą prostota, szybkość wykonania oraz niskie koszty⁽⁷³⁾.

W liczeniu figur podziału można też wspomagać się metodą immunohistochemiczną z użyciem przeciwciała PHH3 (ang. *anti-phosphohistone H3*), które znacznie poprawia czułość oraz ułatwia liczenie komórek w fazie M cyklu komórkowego⁽¹³⁾.

Białko proliferacyjne Ki-67

Antygen Ki-67 jest dużym, niehistonowym białkiem jądrowym składającym się z dwóch łańcuchów polipeptydowych o masach cząsteczkowych 345 kD i 396 kD⁽⁷⁴⁾. Gen kodujący ludzki antygen Ki-67 znajduje się na długim ramieniu 10. chromosomu (10q25)⁽⁶⁶⁾. Okres biologicznego półtrwania tego antygeny wynosi jedną godzinę, co oznacza, że wykrywane są komórki znajdujące się tylko w aktywnym cyklu komórkowym.

Należy pamiętać, że ekspresja tego antygeny dostarcza informacji jedynie o wielkości frakcji wzrostowej, a nie dostarcza danych o długości cyklu komórkowego⁽⁶⁶⁾.

Do oznaczania ekspresji Ki-67 stosuje się rutynowo przeciwciało MIB-1, które także w przypadku oponiaków okazało się najlepszym markerem proliferacji. Wielu autorów potwierdza przydatność tego przeciwciała w prognozowaniu wystąpienia wznowy, czasu przeżycia oraz planowaniu dalszej terapii po resekcji oponiaka^(10,61,63,68,69,71,75).

Inne metody oznaczania aktywności proliferacyjnej

Spośród innych metod oznaczania aktywności proliferacyjnej wymienić należy reakcję immunohistochemiczną na PCNA (ang. *proliferating cell nuclear antigen*), która znalazła zastosowanie także w diagnostyce oponiaków^(62,76,77).

Produktem genu PCNA jest kwaśne białko niehistonowe, którego obecność stwierdza się w komórkach prawidłowych oraz transformowanych u ludzi, a także i u różnych gatunków zwierząt⁽⁷⁸⁾. Antygen PCNA wykazuje ekspresję podczas całego cyklu komórkowego, ale jego poziomy zmieniają się w kolejnych fazach, z największą kumulacją w późnym okresie fazy G1 oraz wczesnym okresie fazy S⁽⁷⁹⁾. Okres półtrwania PCNA wynosi około 20 godzin, zatem może być wykrywany także w komórkach znajdujących się w fazie G0^(65,78,80). Oznacza to, że ocena PCNA może dostarczać mylnych informacji dotyczących zdolności proliferacyjnych komórek nowotworowych⁽⁷⁹⁾. Dodatkowo, ekspresja PCNA uzależniona jest od czasu utrwalania materiału tkankowego, rodzaju użytych przeciwciał oraz zastosowanych procedur immunohistochemicznych^(80,81). Należy podkreślić ponadto, że nasilenie odczynu PCNA nacechowane jest dużą niejednorodnością, co stwarza trudności w interpretowaniu wyników^(79,82). Liczba komórek immunododatnich w reakcji z przeciwciałem PCNA jest zwykle większa niż po zastosowaniu przeciwciała MIB-1⁽⁸⁰⁾.

Karamitopoulou i wsp., Khoshyomni i wsp. oraz Louis i wsp. wskazują na ograniczone znaczenie oceny aktywności proliferacyjnej w nowotworach układu nerwowego z zastosowaniem PCNA⁽⁸²⁻⁸⁴⁾.

PODZIAŁ MORFOLOGICZNY I KLASYFIKACJA OPONIAKÓW

Klasyfikacja WHO nowotworów ośrodkowego układu nerwowego

W przyjętej w 2007 roku przez WHO kolejnej już modyfikacji klasyfikacji histologicznej nowotworów układu nerwowego przyjęto następujący podział⁽⁸⁵⁾:

- I. nowotwory neuroepitelialne;
- II. nowotwory nerwów czaszkowych i rdzeniowych;
- III. nowotwory opon;
- IV. chłoniaki i nowotwory układu krwiotwórczego;
- V. nowotwory germinalne;
- VI. nowotwory okolicy siodła tureckiego;
- VII. nowotwory przerzutowe;
- VIII. torbiele i zmiany nowotworopodobne.

Klasyfikacja WHO nowotworów opon

W grupie nowotworów opon wyodrębniono cztery podgrupy⁽⁸⁵⁾:

- I. nowotwory z komórek meningotelialnych – oponiaki;
- II. nowotwory mezenchymalne;
- III. pierwotne zmiany barwnikowe;
- IV. inne nowotwory związane z oponami.

Klasyfikacja WHO oponiaków

Oponiaki są bardzo zróżnicowaną histologicznie grupą nowotworów. Aktualna klasyfikacja WHO wyróżnia 15 postaci histologicznych. W większości są to guzy łagodne (GI WHO)

Typ histologiczny	Stopień złośliwości
Meningotelialny	I
Włókniasty	I
Przejęściowy	I
Piaszczakowaty	I
Naczyniakowaty	I
Drobnotorbielkowy	I
Wydzielniczy	I
Z naciekami limfocytarno-plazmocytnymi	I
Metaplastyczny	I
Jasnokomórkowy	II
Struniakowaty	II
Atypowy	II
Brodawkowaty	III
Pałeczkowaty	III
Anaplastyczny	III

Tabela 1. Postaci histologiczne oraz stopnie złośliwości oponiaków wg WHO 2007⁽⁸⁵⁾

– dziewięć postaci, z których najczęstsze to postać meningotelialna, włókniasta i przejęściowa. Szczegółowe zestawienie wszystkich postaci histologicznych oponiaków wraz z ich stopniem złośliwości przedstawiono w tabeli 1.

W ostatnich latach, po wprowadzeniu w 2000 roku sprecyzowanych kryteriów diagnostycznych dla oponiaków atypowych (GII WHO), zaznacza się wzrost częstości rozpoznania tej postaci histologicznej. O ile przed rokiem 2000 odsetek oponiaków atypowych w całej grupie guzów z komórek meningotelialnych określano na 4,7% do 7,2%, o tyle najnowsze doniesienia podają wartości rzędu nawet 20%^(6,59).

LECZENIE OPONIAKÓW

Leczeniem z wyboru w przypadku oponiaków, podobnie jak większości nowotworów OUN, jest zabieg operacyjny polegający na resekcji guza. W przypadku oponiaków rozległość zabiegu operacyjnego uznawana jest za jeden z podstawowych, klinicznych czynników ryzyka wznowy⁽⁸⁶⁾. Wykorzystuje się do tego opracowaną w latach 50. XX wieku tzw. skalę Simpsona⁽⁸⁷⁾. Na jej podstawie, biorąc pod uwagę rozległość resekcji, można prognozować ryzyko wznowy. Szczegółowe kryteria skali Simpsona przedstawiono w tabeli 2. Za kluczowe uważa się usunięcie możliwie jak największej ilości tkanki nowotworowej (efekt cytoredukcyjny) i zmniejszenie ciasnoty śródczaszkowej bez uszkodzenia otaczających struktur OUN. Złotym standardem postępowania powinno być maksymalne, bezpieczne wycięcie guza i takie przeprowadzenie zabiegu operacyjnego, aby stan ogólny i neurologiczny chorego nie był gorszy po operacji w odniesieniu do stanu wyjściowego. Podstawowym czynnikiem ograniczającym resekcję jest zazwyczaj lokalizacja guza. Jeśli zmiana położona jest w obszarze eloquentnym lub w jego najbliższym sąsiedztwie, maleją szanse na całkowitą resekcję, tzw. GTR (ang. *gross total resection*), natomiast wzrasta ryzyko nieodwracalnych uszkodzeń i będących ich następstwem ubytków neurologicznych⁽⁸⁸⁾.

Z powodu braku efektywnych chemioterapeutyków radioterapia jest obecnie podstawowym elementem uzupełniającego leczenia oponiaków⁽⁷⁾. Stosuje się ją w przypadkach resekcji subtotalnych oraz guzów o wyższym stopniu złośliwości, nawet po GTR. Standardowo wykonuje się naświetlania obszaru, w którym znajdował się guz, choć rozważana jest możliwość zastosowania brachyterapii⁽⁷⁾. W ostatnich latach coraz więcej nieoperacyjnych

Stopień według skali Simpsona	Zakres resekcji	Wznowy w ciągu 10 lat
I	Resekcja całkowita wraz z przyczepem	9%
II	Resekcja całkowita z koagulacją przyczepu	19%
III	Resekcja całkowita bez przyczepu i bez jego koagulacji	29%
IV	Resekcja częściowa	40%

Tabela 2. Skala Simpsona – zależność częstości wznów od zakresu resekcji

oponiaków leczę się metodami stereotaktycznej radiochirurgii, przy użyciu noża gamma^(7,89). Aghi i wsp., badając wznowy oponiaków atypowych po GTR z następową radioterapią i bez radioterapii, stwierdzili znacznie wyższy odsetek wznów w grupie, w której nie zastosowano energii promienistej jako leczenia uzupełniającego⁽⁹⁰⁾. Odmienne wyniki uzyskali Adegbite i wsp.⁽⁹¹⁾

UZASADNIENIE WYBORU TEMATU ORAZ CELE PRACY

Oponiaki atypowe zdefiniowane zostały w klasyfikacji WHO jako nowotwory charakteryzujące się histologicznie bądź aktywnością mitotyczną o wartości 4-19 mitoz/10 HPF, bądź co najmniej trzema spośród pięciu następujących cech:

- gęstokomórkowe utkanie;
- małe komórki z przesuniętym na korzyść jądra współczynnikiem „jądro-cytoplazmatycznym”;
- jądro z wyraźnym jąderkiem;
- brak struktur cytoarchitektonicznych charakterystycznych dla oponiaków GI (ang. *patternless or sheet-like growth*);
- ogniska martwicy.

Oznacza to, że guzy wykazujące mikroskopowo jedną, a nawet dwie spośród wymienionych cech, mimo tych nieprawidłowości zaliczyć należy do grupy oponiaków łagodnych (GI WHO). Wiadomo również, że oponiaki atypowe charakteryzują się większymi od oponiaków łagodnych wartościami potencjału proliferacyjnego, co ma związek z większym ryzykiem wystąpienia wznowy (29-52%). Z tego powodu pacjenci z rozpoznaniem oponiaka o wyższym niż łagodny (GI WHO) stopniu złośliwości oprócz leczenia operacyjnego poddawani są także radioterapii. Celem badania jest ocena, które z histologicznych cech z grupy kryteriów diagnostycznych oponiaków atypowych wywierają największy wpływ na potencjał rozrostowy oponiaków. Obecność takiej cechy (bądź cech) w przypadkach rozpoznania guzów łagodnych (GI WHO) wskazywałaby na większe, zbliżone do oponiaków GII, ryzyko wystąpienia wznowy.

CELE PRACY

1. Porównanie wartości indeksów proliferacyjnych między grupami:
 - oponiaków atypowych GII WHO;
 - oponiaków GI WHO wykazujących 1 bądź 2 cechy histologiczne spośród 5 kryteriów diagnostycznych oponiaków atypowych;
 - oponiaków GI WHO niewykazujących nieprawidłowości histologicznych z grupy kryteriów diagnostycznych oponiaków atypowych.

2. Ocena związku między indeksem proliferacyjnym a poszczególnymi histologicznymi kryteriami diagnostycznymi oponiaków atypowych GII WHO.

MATERIAŁ I METODY

MATERIAŁ

We wstępnym etapie badaniami objęto materiał pooperacyjny 240 oponiaków rozpoznanych histopatologicznie w Zakładzie Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, pochodzący od pacjentów operowanych w latach 2004-2011 na Oddziale Klinicznym Neurochirurgii i Onkologii Centralnego Układu Nerwowego Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego nr 1 im. N. Barlickiego w Łodzi.

Wśród 240 guzów zdiagnozowano 65 oponiaków atypowych GII WHO (**I grupa badawcza**) i 59 oponiaków GI WHO ujawniających w obrazie mikroskopowym jedną lub dwie cechy z grupy pięciu kryteriów histologicznych określonych w klasyfikacji WHO dla diagnozy oponiaków atypowych (**II grupa badawcza**).

Pozostałe 116 guzów przedstawiało mikroskopowo obraz różnych postaci histologicznych oponiaków GI WHO bez nieprawidłowości histologicznych. Spośród nich zostało wybranych po 10 kolejnych przypadków trzech najczęstszych postaci histologicznych oponiaków (meningotelialnych, włóknistych i przejściowych) – oponiaki te stanowiły **III grupę badawczą (kontrolną)**.

Łącznie materiał badawczy obejmował 154 przypadki. Wiek pacjentów w całej tej grupie zawierał się w przedziale 18-83 lat, średnia wieku wynosiła 57,8 roku z odchyleniem standardowym (SD) $\pm 13,7$ roku. Liczba kobiet w całej grupie wynosiła 107, mężczyzn – 47.

Dane dotyczące wieku i płci pacjentów z poszczególnych grup badawczych przedstawiono w tabeli 3.

METODY BADAŃ

Badania histochemiczne

Materiały pooperacyjne bezpośrednio po pobraniu utrwalano w 10% zbuforowanej formalinie i przesyłano do Zakładu Patomorfologii. Po dokonanej ocenie makroskopowej i pobraniu wycinków każdy z nich był poddany odwodnieniu w szeregu alkoholi i ksylenów przy użyciu automatycznego procesora tkankowego firmy Thermo Shandon i zatopiony w bloczek parafinowy. Skrawki parafinowe o grubości 4 mikrometrów uzyskiwano za pomocą mikrotomu saneczkowego. Skrawki po odparafinowaniu i ponownym uwodnieniu zabarwiono hematoxyliną i eozyną.

Grupy	Liczebność	Wiek [lata]	Średnia wieku [lata]	Odchylenie standardowe [lata]	Kobiety	Mężczyźni
Oponiaki atypowe GII	65	18-83	59,3	14,4	40	25
Oponiaki GI z cechami atypii	59	21-80	58,6	11,9	47	12
Oponiaki GI	30	19-78	52,9	14,5	20	10

Tabela 3. Wiek, liczebność oraz rozdział płci pacjentów w poszczególnych grupach

Antygen	Producent	Rodzaj surowicy	Klasa	Klon	Rozcieńczenie	Typ ekspresji
MIB-1	Novocastra	Mysia monoklonalna	IgG1	MM1	1:100	Jądrowy

Tabela 4. Charakterystyka zastosowanego przeciwciała oraz użyte rozcieńczenie

Ocena jakościowa badanego materiału

Każdy preparat poddano ocenie przy użyciu mikroskopu świetlnego Olympus BX 40. Dla określenia postaci histologicznej nowotworu zastosowano obowiązujące według klasyfikacji WHO kryteria morfologiczne (klasyfikacja WHO guzów układu nerwowego z 2007 roku).

Badania immunohistochemiczne

Skrawki parafinowe o grubości 4 mikrometrów nałożone na szkiełka SuperFrost odparafinowano w szeregu ksilenów i odwodniono w szeregu alkoholi. Następnie skrawki płukano w dwóch zmianach wody destylowanej. W celu odzyskania antygenowości tkanek skrawki gotowano w 0,01 M buforze cytrynianowym o pH 6,0 (DAKO, Target Retrieval Solution) w kuchenie mikrofalowej przy następujących poziomach mocy: 360 W (2×3 minuty), 180 W (2×5 minut), 90 W (2×5 minut). Po wystudzeniu skrawki płukano dwukrotnie w 0,05 M buforze TRIS (TBS, DAKO) o pH 7,6, przez 5 minut, i inkubowano przez 10 minut w 3-procentowym roztworze nadtlenu wodoru (H₂O₂) w celu zablokowania aktywności endogennej peroksydazy. Następnie poddano je całościowej inkubacji z właściwym pierwotnym przeciwciałem rozcieńczonym w rozcieńczalniku zawierającym komponentę blokującą tło (DAKO, Antibody Diluent with Background Reducing Components). Charakterystykę zastosowanego przeciwciała oraz użyte rozcieńczenie przedstawiono w tabeli 4.

Inkubację przeprowadzono w komorze wilgotnej w temperaturze 4°C. Po inkubacji skrawki dwukrotnie płukano w buforze TBS, a następnie, aby uwidocznić reakcje antygen – przeciwciała, stosowano system wizualizacyjny EnVision/HRP/DAB+ firmy DAKO Cytomation. Po 30-minutowej inkubacji skrawków z użyciem wtórnych przeciwciał znakowanych peroksydazą chrzanową przeprowadzono reakcję enzymatyczną, z zastosowaniem substratu dla peroksydazy – tetrachloru 3,3-diaminobenzyny (DAB). Po zakończeniu reakcji immunohistochemicznej jądra komórkowe podbarwiano hematoksyliną według Meyera (2 min), a następnie odwadniano w szeregu alkoholi o rosnących stężeniach, przeprowadzono przez szereg ksilenów i zaklejano DPX. Do kontroli negatywnej użyto skrawków, w których pierwotne przeciwciała zastąpiono buforem TBS, z zastosowaniem opisanej powyżej procedury immunohistochemicznej.

Badania ilościowe

Liczbę mitoz na dziesięć pól widzenia pod dużym powiększeniem mikroskopu (ang. *high power field*, HPF) oceniano za pomocą ogólnie przyjętej metody, mającej na celu zminimalizowanie subiektywizmu oceny. Najpierw, w każdym ocenianym preparacie, szukano pola znajdującego się w obrębie utkania nowotworu, które cechuje się największą liczbą mitoz, tzw. „gorącego punktu” (ang. *hot spot*). Następnie, po policzeniu

figur podziału w obrębie „gorącego punktu”, liczone mitozy w dziewięciu sąsiadujących polach widzenia, tak aby w sumie ocenić dziesięć pól w powiększeniu 400×.

W przypadkach, w których nie można było odnaleźć „gorącego punktu”, bowiem mitozy były nieliczne i przypadkowo rozmieszczone w całej tkance nowotworu, wybierano jedną figurę podziału i od niej rozpoczynano liczenie.

W przypadkach tych guzów, które nie wykazywały aktywności mitotycznej, ocenie poddano sto pól widzenia pod dużym powiększeniem mikroskopu. Obserwacje prowadzono przy użyciu mikroskopu świetlnego Olympus BX 40.

Badania morfometryczne

Immunoekspresję białka Ki-67 oceniano metodą ilościową, przy użyciu systemu do analizy obrazu, składającego się z komputera zgodnego z IBM PC z zainstalowanym systemem operacyjnym Microsoft Windows Millennium, wyposażonego w kartę do cyfrowej obróbki obrazu w czasie rzeczywistym firmy Indeo Fast, współpracującego z kolorową kamerą telewizyjną firmy Panasonic połączoną z mikroskopem świetlnym Jenaval firmy Carl Zeiss Jena. Jako element wskaźnikowy systemu wykorzystano mysz optyczną. Podstawowym elementem użytego systemu pomiarowego był program MultiScan wersja 8.08, napisany przez firmę Computer Scanning Systems. Kopie wymienionych programów są własnością Zakładu Nefropatologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi i posiadają licencje producentów.

Określano liczbę komórek immunododatnich na 1000 komórek w każdym preparacie na podstawie dodatniej ekspresji przeciwciała MIB-1 w kolejnych sąsiadujących polach widzenia o powierzchni 0,0047 mm² (pow. 400×) aż do osiągnięcia łącznej liczby zliczonych komórek równej 1000. Za dodatnią przyjęto ekspresję jądrową badanego białka, ekspresję cytoplazmatyczną uznawano za ujemną. Kryteria wyboru pierwszego z ocenianych pól były takie same jak w przypadku liczenia figur podziału. W celu ułatwienia analizy i zminimalizowania subiektywizmu stworzono dwie makroinstrukcje, automatycznie zliczające wszystkie komórki nowotworu w danym polu widzenia oraz komórki immunododatnie w tym samym polu. Działania poszczególnych poleceń makroinstrukcji zliczających wszystkie komórki i komórki immunododatnie w danym polu widzenia przedstawiono w tabelach 5 i 6.

Po zakończeniu obu procedur wyniki skopiowano z raportu wewnętrznego programu MultiScan, a następnie wklejono do arkusza kalkulacyjnego Microsoft Excel 2007, w którym policzono odsetek komórek immunododatnich dla każdego przypadku.

Analiza statystyczna

Dla potrzeb analizy statystycznej wykorzystano następującą metodę:

1. Test W Shapiro-Wilka do badania normalności rozkładu zmiennych w poszczególnych grupach.

Polecenie programu MultiScan	Opis działania
txx 1 Zliczanie wszystkich jąder w obrazie	Nazwa procedury
Unfrz	Wybór obrazu wyjściowego
Freeze	Zamrożenie i pobranie wybranego obrazu
ctr 55 240	Ustawienie kontrastu obrazu według zadanych wartości i wyświetlenie poprawionego obrazu na ekranie
Mono	Przekształcenie obrazu oryginalnego w obraz czarno-biały z 16-bitową skalą stopni szarości
imbrgd w	Ustawienie jasnego tła
backgrM 30	Uśrednienie jasności tła według zadanych parametrów
ctr 0 175	Ustawienie kontrastu obrazu według zadanych wartości i wyświetlenie poprawionego obrazu na ekranie
ucontrast 30 2	Wyrównanie kontrastu obrazu
palette 200	Przełączenie na pracę z paletą zewnętrzną i ustawienie poziomu odcięcia dla tej palety
palette i 5	Przełączenie na pracę z paletą wewnętrzną o zadanej barwie
Mono	Przekształcenie obrazu oryginalnego w obraz w skali szarości
bin 200	Binaryzacja obrazu według zadanych parametrów
nlf 5 1 4	Zastosowanie filtrów nieliniowych: otwarcia, pierwszego kwartylu i erozji – wygładzenie konturów i usunięcie drobnych obiektów (tzw. „szumów”). Wyświetlenie zidentyfikowanych profili podlegających pomiarowi
dots 1 100 360000 /b	Identyfikacja i zliczenie obiektów z odfiltrowaniem artefaktów
txx THE END	Wyświetlenie informacji o zakończeniu procedury
Autostore	Automatyczne zachowanie pomiarów w pliku raportu

Tabela 5. Opis poleceń makroinstrukcji zliczającej wszystkie komórki w danym polu widzenia

Polecenie programu MultiScan	Opis działania
txx 1 Zliczanie Ki-dodatnich jąder w obrazie	Nazwa procedury
Unfrz	Wybór obrazu wyjściowego
Freeze	Zamrożenie i pobranie wybranego obrazu
ctr 30 140	Ustawienie kontrastu obrazu według zadanych wartości i wyświetlenie poprawionego obrazu na ekranie
Mono	Przekształcenie obrazu oryginalnego w obraz czarno-biały z 16-bitową skalą stopni szarości
imbrgd w	Ustawienie jasnego tła
nlf 2 2	Zastosowanie filtru nieliniowego – mediana – i usunięcie drobnych obiektów (tzw. „szumów”). Wyświetlenie zidentyfikowanych profili podlegających pomiarowi
nlf 5 2	Zastosowanie filtrów nieliniowych: otwarcie i mediana (wypełnienie drobnych nieciągłości w badanych obiektach, usunięcie zbędnych połączeń pomiędzy obiektami i usunięcie drobnych obiektów)
bin 200	Binaryzacja obrazu według zadanych parametrów
dots 200 150 360000 /b	Identyfikacja i zliczenie obiektów z odfiltrowaniem artefaktów
txx THE END	Wyświetlenie informacji o zakończeniu procedury
Autostore	Automatyczne zachowanie pomiarów w pliku raportu

Tabela 6. Opis poleceń makroinstrukcji zliczającej komórki immunododatnie w danym polu widzenia

- Test U Manna-Whitneya, test Fishera-Haltona-Freemana, test H Kruskala-Wallisa oraz test mid-P do badania różnic pomiędzy grupami.
 - Wieloczynnikową analizę wariancji do oceny zależności indeksu proliferacyjnego od wieku, płci oraz grupy.
 - Analizę korelacji Spearmana do oceny związków pomiędzy danymi ilościowymi.
 - Test Scheffégo do porównań wielokrotnych *post-hoc*.
- Dla wszystkich wykorzystanych testów przyjęto poziom istotności $p \leq 0,05$.

WYNIKI BADAŃ

CHARAKTERYSTYKA MORFOLOGICZNO-KLINICZNA GRUP BADAWCZYCH

Grupa I – oponiaki atypowe (GII WHO)

Do grupy I liczącej 65 przypadków zakwalifikowane zostały nowotwory spełniające bądź kryterium diagnostyczne WHO dla oponiaków atypowych, odnoszące się do cyto-

Liczba cech	Liczba przypadków	Średnia wieku [lata]	Odchylenie standardowe [lata]	Kobiety	Mężczyźni
Jedna	0	0	0	0	0
Dwie	7	58,4	12,5	5	3
Trzy	41	59,7	14,3	25	14
Cztery	14	57,6	17,2	7	8
Pięć	3	64,6	9,0	2	1

Tabela 7. Wiek, płeć oraz liczebność przypadków w poszczególnych podgrupach oponiaków atypowych

Podgrupa	Liczba cech				Razem	Średnia wieku [lata]	Odchylenie standardowe [lata]	Kobiety	Mężczyźni
	2	3	4	5					
Przypadki spełniające tylko kryterium figur podziału	7	0	0	0	7	58,4	12,5	4	3
Przypadki spełniające tylko kryteria morfologiczne	0	17	4	0	21	58,4	13,6	16	5
Przypadki spełniające oba kryteria	0	24	10	3	37	60,0	15,5	20	17

Tabela 8. Wiek, płeć oraz liczebność przypadków w poszczególnych podgrupach oponiaków atypowych

architektoniki nowotworów (co najmniej trzy z grupy pięciu cech) (21 przypadków), bądź kryterium liczby figur podziału (4-19/10 HPF) (7 przypadków), bądź oba kryteria (37 przypadków).

Indeks proliferacyjny w omawianej grupie wahał się od 4,0% do 38,3%, średnio wynosił 13,1%.

Dane dotyczące liczby cech cytoarchitektonicznych zaliczanych do kryteriów diagnostycznych oponiaków atypowych (GII WHO) oraz wieku i płci przypadków I grupy badawczej zostały przedstawione w tabeli 7.

W tabeli 8 zestawiono dane dotyczące cech histologicznych oponiaków atypowych (GII WHO) oraz wieku i płci chorych w podgrupach obejmujących oddzielnie guzy zdiagnozowane wyłącznie na podstawie grupy cech cytoarchitektonicznych, liczby figur podziału oraz obu tych kryteriów.

Grupa II – oponiaki (GI WHO) z nieprawidłowościami histologicznymi

Do grupy II, obejmującej 59 przypadków, zostały zaliczone guzy, które w obrazie mikroskopowym wykazywały obecność jednej lub dwóch cech morfologicznych z grupy kryteriów cytoarchitektonicznych dla oponiaków atypowych oraz charakteryzowały się liczbą figur podziału (jeśli występowały) poniżej 4/10 HPF. Indeks proliferacyjny w tej grupie wahał się od 0,9% do 13,71%; średnio wynosił 5,1%.

Dane dotyczące liczby cech cytoarchitektonicznych w obrazie mikroskopowym guzów oraz wieku i płci chorych zestawiono w tabeli 9.

W tabeli 10 zamieszczono zestawienie uwzględniające postaci histologiczne oponiaków GI WHO, występujące w materiale II grupy badawczej, oraz wiek i płeć pacjentów.

	Liczebność	Średnia wieku [lata]	Odchylenie standardowe [lata]	Kobiety	Mężczyźni
Oponiaki GI z jedną cechą	27	59,1	13,5	23	4
Oponiaki GI z dwiema cechami	32	58,2	10,6	24	8

Tabela 9. Dane dotyczące liczby cech cytoarchitektonicznych guzów oraz wieku i płci chorych w II grupie badawczej

Postać histologiczna oponiaka	Liczebność	Średnia wieku [lata]	Odchylenie standardowe [lata]	Kobiety	Mężczyźni
Meningotelialna	15	56,3	15,2	10	5
Włóknista	21	59,4	11,7	19	2
Przejęściowa	12	58,2	9,5	8	4
Piaszczakowata	3	59,7	9,2	2	1
Wydzielnicza	3	59,0	9,5	3	0
Drobnotorbielkowa	3	67	17,6	3	0
Metaplastyczna	2	56,0	0	2	0

Tabela 10. Liczebność poszczególnych postaci histologicznych oponiaków oraz wiek i płeć chorych w II grupie badawczej

Grupa badawcza	Liczebność	Zmiany o typie drobnych komórek	Obecność jąder	Zwiększona gęstość komórkowa	Nietypowy dla oponiaków GI wzrost	Obecność martwicy
I	65	62	55	42	25	24
II	59	48	28	14	1	0

Tabela 11. Zestawienie poszczególnych cech cytoarchitektonicznych w I i II grupie badawczej

Grupy	Liczebność	Średnia wieku [lata]	Odchylenie standardowe [lata]	Kobiety	Mężczyźni
Oponiaki meningotelialne	10	53,7	10,9	6	4
Oponiaki włókniste	10	54,1	16,4	8	2
Oponiaki przejściowe	10	51,1	17,0	6	4

Tabela 12. Zestawienie danych dotyczących wieku i płci chorych z III grupy badawczej (kontrolnej)

W tabeli 11 przedstawiono szczegółowe zestawienie rozkładu poszczególnych kryteriów cytoarchitektonicznych dla oponiaków atypowych (GII WHO) w I i II grupie badawczej.

Grupa III. Oponiaki łagodne (GI WHO)

Do trzeciej grupy (kontrolnej) włączono 30 przypadków reprezentujących najczęstsze postaci histologiczne oponiaków GI WHO (meningotelialną, włóknistą i przejściową), po 10 kolejnych zdiagnozowanych guzów w materiale Zakładu Patomorfologii UM w Łodzi, które w obrazie mikroskopowym nie wykazywały żadnej cechy cytoarchitektonicznej należącej do kryteriów diagnostycznych oponiaków atypowych i nie wykazywały obecności figur podziału.

Indeks proliferacyjny wahał się od 0,4% do 5%; średnio wynosił 2,2%.

Zestawienie danych dotyczących wieku i płci chorych w III grupie badawczej przedstawiono w tabeli 12.

WYNIKI ANALIZY STATYSTYCZNEJ

Statystyki opisowe oraz sprawdzenie założeń

Statystyki opisowe dla danych ilościowych

Statystyki podano dla całej grupy obejmującej łącznie oponiaki grupy I i II oraz oddzielnie dla tych dwóch grup. Najpierw sprawdzono rozkład zmiennych – czy jest to rozkład normalny (Gaussowski), czy rozkład nienormalny (test W Shapiro-Wilka).

Bez podziału na grupy

	N	Min.	LQ	Mediana	UQ	Maks.
Wiek	124	18,000	51,500	58,500	69,000	83,000
Mitozy/10 HPF	124	0,000	1,000	2,000	5,000	15,000
MIB-1%	124	0,009	0,043	0,072	0,128	0,383

Tabela 13. Statystyki opisowe dla danych ilościowych bez podziału na grupy

Shapiro-Wilk	
W=0,9608	p=0,0018
W=0,8514	p<0,0001
W=0,8633	p<0,0001

Tabela 14. Wyniki testu W Shapiro-Wilka dla danych ilościowych bez podziału na grupy

Wynik statystycznie istotny dla wszystkich 3 zmiennych ilościowych oznacza, iż żadna z analizowanych zmiennych nie posiada rozkładu normalnego (p<0,005).

Grupa I

	N	Min.	LQ	Mediana	UQ	Maks.
Wiek	65	18,000	54,000	61,000	70,000	83,000
Mitozy/10 HPF	65	1,000	3,000	5,000	6,000	15,000
MIB-1%	65	0,040	0,074	0,111	0,172	0,383

Tabela 15. Statystyki opisowe dla danych ilościowych w grupie I

Shapiro-Wilk	
W=0,9413	p=0,0040
W=0,9002	p<0,0001
W=0,9050	p<0,0001

Tabela 16. Wyniki testu W Shapiro-Wilka dla danych ilościowych w grupie I

Wynik statystycznie istotny dla wszystkich trzech zmiennych ilościowych oznacza, iż żadna z analizowanych zmiennych nie posiada rozkładu normalnego (p<0,005).

Grupa II

	N	Min.	LQ	Mediana	UQ	Maks.
Wiek	59	21,000	51,000	58,000	68,000	80,000
Mitozy/10 HPF	59	0,000	1,000	1,000	2,000	3,000
MIB-1%	59	0,009	0,030	0,044	0,062	0,143

Tabela 17. Statystyki opisowe dla danych ilościowych w grupie II

Shapiro-Wilk	
W=0,9712;	p=0,1754
W=0,8550;	p<0,0001
W=0,8790;	p<0,0001

Tabela 18. Wyniki testu W Shapiro-Wilka dla danych ilościowych w grupie II

Wyniki testu wskazują, że wiek pacjentów w grupie II posiada rozkład normalny, natomiast pozostałe 2 zmienne nie mają rozkładu Gaussowskiego ($p<0,0001$).

Ponieważ ww. zmienne nie posiadają w większości rozkładu normalnego, do ich analizy zastosowano testy nieparametryczne. W pierwszej kolejności sprawdzono różnice pomiędzy grupami I oraz II za pomocą testu U Manna-Whitneya.

	U	Poziom p
Wiek	1773,500	0,471
Mitozy/10 HPF	369,000	<0,0001
MIB-1%	503,000	<0,0001

Tabela 19. Wyniki testu U Manna-Whitneya dla danych ilościowych w grupach I i II

Na podstawie wyników testu U Manna-Whitneya można stwierdzić, że:

- nie ma istotnych różnic w średniej wartości wieku pacjentów pomiędzy grupami I a II [GI vs GII: 61 (54-70) vs 58 (51-68); $p=0,471$];
- średnia liczba figur podziału w grupie I jest statystycznie istotnie wyższa w porównaniu z grupą II [GI vs GII: 5 (3-6) vs 1 (1-2); $p<0,0001$];
- średni indeks proliferacyjny w grupie I jest statystycznie istotnie wyższy niż w grupie II [0,111 (0,074-0,172) vs 0,044 (0,030-0,062); $p<0,0001$].

Statystyki opisowe dla danych jakościowych

Grupy I i II porównywano na podstawie rozkładu częstości poszczególnych poziomów zmiennych jakościowych. Różnice pomiędzy tymi grupami testowano za pomocą dokładnego testu mid-P (dla tabel 2×2) oraz testu Fishera-Haltona-Freemana (dla tabel $r \times c$).

a)

	Płeć		Test mid-P
	M	K	
Grupa II	25 (38%)	40 (62%)	p=0,0296
Grupa I	12 (20%)	47 (80%)	OR=0,41 (0,18-0,92)

Tabela 20. Różnice w rozkładzie płci w grupach oponiaków I i II

b)

	Jąderka		Test mid-P
	Nie	Tak	
Grupa II	9 (14%)	56 (86%)	p<0,0001
Grupa I	31 (53%)	28 (47%)	OR=6,8 (2,8-16,6)

Tabela 21. Różnice w rozkładzie cechy „obecność jąderek” w grupach oponiaków I i II

c)

	Martwica		Test mid-P
	Nie	Tak	
Grupa II	41 (63%)	24 (37%)	p<0,0001
Grupa I	59 (100%)	0 (0%)	OR=NA

Tabela 22. Różnice w rozkładzie cechy „obecność martwicy” w grupach oponiaków I i II

d)

	Atypowy wzrost		Test mid-P
	Nie	Tak	
Grupa II	40 (62%)	25 (38%)	p<0,0001
Grupa I	57 (96,5%)	2 (3,5%)	OR=35,6 (6,1-750,8)

Tabela 23. Różnice w rozkładzie cechy „brak struktur cytoarchitektonicznych charakterystycznych dla oponiaków GI” w grupach oponiaków I i II

e)

	Komórki z ↑ N/C		Test mid-P
	Nie	Tak	
Grupa II	3 (5%)	62 (95%)	p=0,0160
Grupa I	11 (19%)	48 (81%)	OR=4,7 (1,3-21,9)

Tabela 24. Różnice w rozkładzie cechy „obecność drobnych komórek z wysokim N/C” w grupach oponiaków I i II

f)

	Gęstokomórkowy		Test mid-P
	Nie	Tak	
Grupa II	22 (34%)	43 (66%)	p<0,0001
Grupa I	44 (75%)	15 (25%)	OR=5,6 (2,5-12,5)

Tabela 25. Różnice w rozkładzie cechy „podwyższona gęstość komórkowa” w grupach oponiaków I i II

Podsumowanie

Wyniki testów przedstawione w tabelach 21-25 wskazują, że zgodnie z założeniami oponiaki atypowe w porównaniu z oponiakami GI WHO, wykazującymi w obrazie mikroskopowym obecność jednej lub dwóch cech z grupy kryteriów diagnostycznych dla oponiaków atypowych (GII WHO), charakteryzują się:

- statystycznie istotnie większym odsetkiem przypadków z jąderkami ($p<0,0001$);

- statystycznie istotnie większym odsetkiem przypadków ze zmianami martwiczymi ($p < 0,0001$);
- statystycznie istotnie większym odsetkiem przypadków z atypowym wzrostem ($p < 0,0001$);
- statystycznie istotnie większym odsetkiem przypadków z wysokim N/C ($p < 0,05$);
- statystycznie istotnie większym odsetkiem przypadków gęstości komórkowych ($p < 0,0001$).

Oponiaki atypowe (GII WHO) wykazują także statystycznie istotnie wyższą średnią wartość indeksu proliferacyjnego $p < 0,0001$ (tabela 15 i 17).

Należy też zauważyć, iż w grupie I odsetek przypadków dotyczących mężczyzn jest znamienne większy niż w grupie II (38% vs 20%); $p < 0,05$ (tabela 20).

Ocena zależności między wartością indeksu proliferacyjnego a stopniem histologicznej złośliwości

Dane dotyczące wartości indeksu proliferacyjnego w I i II grupie badawczej przedstawiono w tabeli 26.

	N ważnych	Min.	LQ	Mediana	UQ	Maks.
Grupa II	65	0,040	0,074	0,111	0,172	0,383
Grupa I	59	0,009	0,030	0,044	0,062	0,143

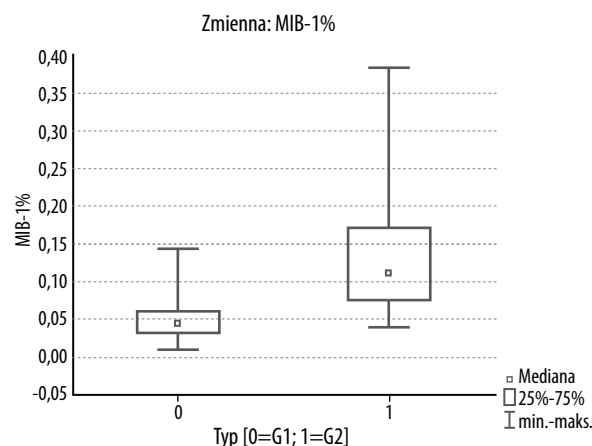
Tabela 26. Statystyki opisowe dla wartości indeksu proliferacyjnego w grupach I i II

Do zbadania różnicy w rozkładzie wartości indeksu proliferacyjnego wykorzystano test U Manna-Whitneya, którego wyniki przedstawiono w tabeli 27.

	U	Poziom p
MIB-1%	503,000	1,47398E-12

Tabela 27. Wyniki testu U Manna-Whitneya dla różnic w wartości indeksu proliferacyjnego w grupach I i II

Różnice wartości indeksu proliferacyjnego w grupie I (oponiaki atypowe) i grupie II przedstawiono na rys. 1.



Rys. 1. Różnice wartości indeksu proliferacyjnego w grupach I (1) i II (0)

Indeks proliferacyjny jest zależny od stopnia złośliwości guza (GI bądź GII). Średnia jego wartość w grupie oponiaków GI WHO jest statystycznie istotnie niższa niż w grupie oponiaków atypowych – 0,044 (0,030-0,062) vs 0,111 (0,074-0,383); $p < 0,0001$.

Analiza zależności indeksu proliferacyjnego od grupy, płci oraz wieku – wieloczynnikowa analiza wariancji

Wyniki wieloczynnikowej analizy wariancji przedstawiono w tabeli 28.

	F	P
Wyraz wolny	12,9281	0,0004
Wiek	0,0080	0,9288
Grupa	46,2848	<0,0001
Płeć	1,3973	0,2391
Grupa*płeć	0,0910	0,9130

Tabela 28. Wyniki wieloczynnikowej analizy wariancji

Wartość zmiennej zależnej „indeks proliferacyjny” jest statystycznie istotnie zależna tylko od wyrazu wolnego oraz od grupy [grupy I, II, III (kontrolnej)]; $p < 0,0001$, natomiast nie jest zależna od płci ani od wieku pacjentów. Ostatni parametr grupa*płeć mówi nam o interakcji pomiędzy tymi dwiema zmiennymi, czyli o tym, czy np. płeć pacjenta zmienia sposób, w jaki przynależność do grupy badawczej I, II bądź III (kontrolnej) wpływa na wartość indeksu proliferacyjnego. Interakcja ta nie jest istotna, więc można twierdzić, że przynależność do danej grupy ma taki sam wpływ na wartość indeksu proliferacyjnego u kobiet i u mężczyzn.

Analiza zależności indeksu proliferacyjnego od grupy

Dane dotyczące wartości indeksu proliferacyjnego w I i II grupie badawczej oraz grupie kontrolnej (grupa III) przedstawiono w tabeli 29.

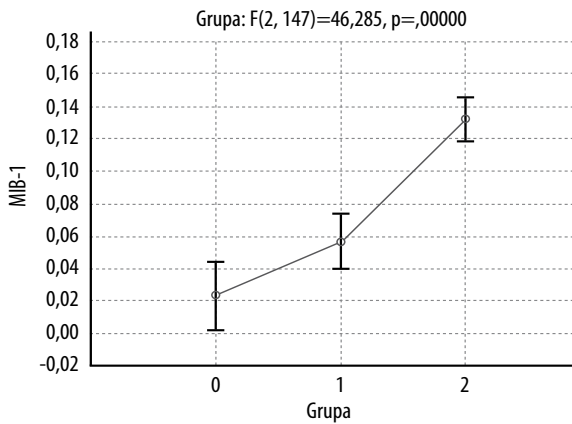
	N	Średnia	SD	SE
Grupa III	30	0,022	0,011	0,002
Grupa II	59	0,052	0,033	0,004
Grupa I	65	0,131	0,075	0,009

Tabela 29. Średnie wartości MIB-1 oraz odchylenia standardowe w poszczególnych grupach oponiaków

Różnice wartości indeksów proliferacyjnych w grupie I i grupie II oraz grupie III (kontrolnej) przedstawione zostały na rys. 2. Aby sprawdzić, które grupy się od siebie różnią, zastosowano test wielokrotnych porównań *post-hoc* (test Scheffégo), którego wyniki przedstawiono w tabeli 30.

	Grupa II	Grupa I
Grupa III	0,0510	0,0000
Grupa II		0,0000

Tabela 30. Wyniki testów *post-hoc* (test Scheffégo) – porównanie poszczególnych grup oponiaków



Grupa III (0); Grupa II (1); Grupa III (2)

Rys. 2. Wykres pokazujący zależność wartości indeksu proliferacyjnego od grupy.

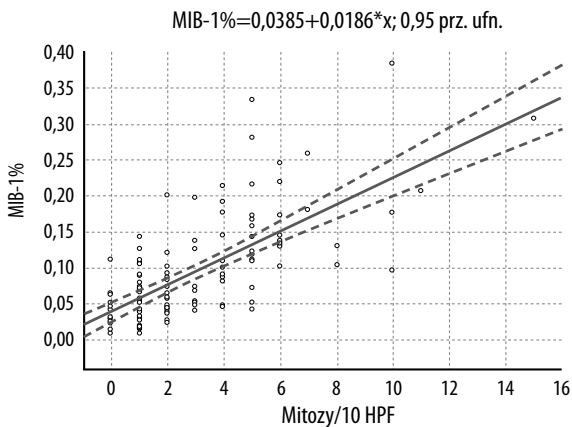
Na podstawie wyników testów *post-hoc* (test Scheffégo) można stwierdzić, iż występuje istotna statystycznie różnica w wartościach indeksu proliferacyjnego pomiędzy wszystkimi grupami.

Korelacja indeksu proliferacyjnego oraz liczby figur podziału mitotycznego

Liczbę figur podziału mitotycznego potraktowano jako zmienną ilościową i przeprowadzono analizę korelacji pomiędzy immunоекспresją MIB-1 a liczbą figur podziału mitotycznego. Ponieważ chodzi o zmienne bez rozkładu Gaussowskiego, zastosowana została analiza korelacji Spearmana (nieparametryczna, korelacja rang).

N	124
R _{sp}	0,6880
p	1,08E-18
R ²	0,4733

Tabela 31. Wyniki testu korelacji Spearmana wartości indeksu proliferacyjnego z liczbą figur podziału mitotycznego



Rys. 3. Wykres korelacji pomiędzy indeksem proliferacyjnym a indeksem mitotycznym

Wyniki analizy związku pomiędzy wartością indeksu proliferacyjnego a liczbą figur podziału przedstawiono na rys. 3. Na podstawie wyniku testu korelacji Spearmana można stwierdzić, iż liczba podziałów mitotycznych wysoce istotnie dodatnio koreluje z wartością potencjału proliferacyjnego ($R_{sp}=0,6880; p<0,0001$).

Ocena zależności indeksu proliferacyjnego od obecności jąderek

Jąderka	N	Min.	LQ	Mediana	UQ	Maks.	W	p
0	40	0,0135	0,0282	0,0419	0,0724	0,2190	0,7604	<0,0001
1	83	0,0091	0,0531	0,0912	0,1428	0,3829	0,8871	<0,0001

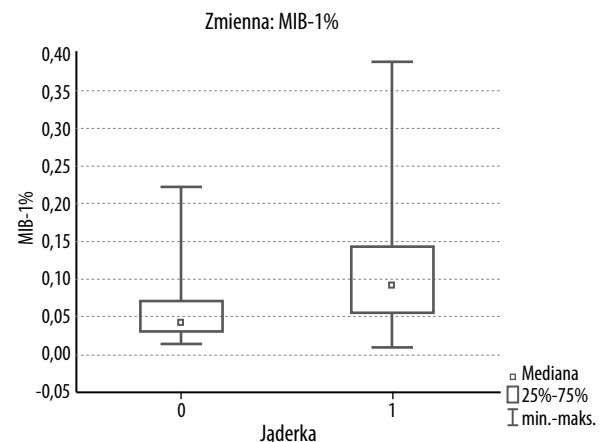
Tabela 32. Statystyki opisowe dotyczące indeksu proliferacyjnego w grupach oponiaków z obecnością jąderek i bez jąderek

W pierwszej kolejności zbadano rozkład indeksu proliferacyjnego w poszczególnych grupach. Wyniki testu są statystycznie istotne, dlatego w badanych grupach nie należy spodziewać się rozkładu normalnego. Do opisu zastosowane więc zostaną statystyki nieparametryczne, a do testowania różnic i zależności testy nieparametryczne.

U	801,5
p	0,000004

Tabela 33. Wyniki testu U Manna-Whitneya dla różnic w wartościach indeksu proliferacyjnego w grupach z obecnością jąderek i bez ich obecności

Różnice wartości indeksów proliferacyjnych w grupie z obecnością jąderek i bez jąderek przedstawiono na rys. 4.



Rys. 4. Różnice w wartościach indeksu proliferacyjnego w grupie z obecnością jąderek (1) i bez jąderek (0)

Na podstawie wyniku testu U Manna-Whitneya można stwierdzić, iż wartość indeksu proliferacyjnego w grupie guzów z widocznymi jąderkami (1) jest statystycznie istotnie wyższa niż

w grupie bez jąderek (0) [0,0912 (0,0531-0,1428) vs 0,0419 (0,0282-0,0724); $p < 0,0001$].

Ocena zależności indeksu proliferacyjnego od obecności ognisk martwicy

Martwica	N	Min.	LQ	Mediana	UQ	Maks.	W	p
0	100	0,0091	0,0390	0,0572	0,1020	0,2590	0,8843	<0,0001
1	24	0,0520	0,1158	0,1442	0,2105	0,3829	0,9290	0,0924

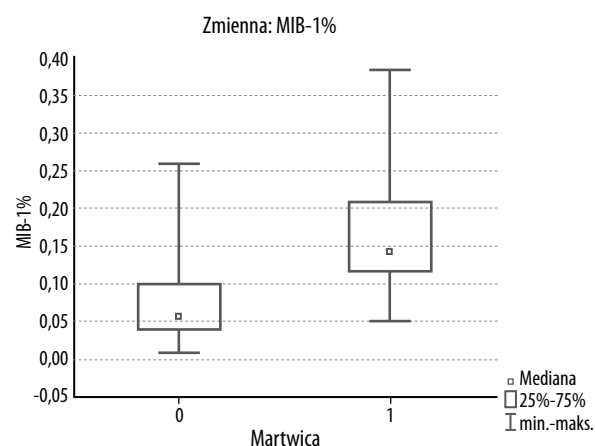
Tabela 34. Statystyki opisowe dla wartości indeksu proliferacyjnego w grupach oponiaków z obecnością ognisk martwicy (1) i bez martwicy (0)

W pierwszej kolejności zbadano rozkład wartości indeksu proliferacyjnego w poszczególnych grupach. Wyniki testu są statystycznie istotne dla grupy bez zmian martwiczych, dlatego w tej grupie nie należy spodziewać się rozkładu normalnego. W celu porównania obu grup oraz do statystyk opisowych zostaną zastosowane statystyki nieparametryczne oraz testy nieparametryczne.

U	324,0
p	3,02172E-08

Tabela 35. Wyniki testu U Manna-Whitneya dla różnic w wartości indeksu proliferacyjnego w grupach z obecnością ognisk martwicy i bez martwicy

Różnice wartości indeksów proliferacyjnych w grupie z obecnością martwicy i bez martwicy przedstawiono na rys. 5.



Rys. 5. Różnice w wartości indeksu proliferacyjnego w grupie z obecnością martwicy (1) i bez martwicy (0)

Na podstawie wyniku testu U Manna-Whitneya można stwierdzić, iż wartość indeksu proliferacyjnego w grupie oponiaków, w których utkaniu są widoczne ogniska martwicy (1), jest statystycznie istotnie wyższa niż w grupie bez zmian martwiczych (0) [0,1442 (0,1158-0,2105) vs 0,0572 (0,0390-0,1020); $p < 0,0001$].

Ocena zależności indeksu proliferacyjnego od braku obecności w obrazie mikroskopowym guza struktur cytoarchitektonicznych charakterystycznych dla oponiaków łagodnych GI, tzw. atypowy wzrost

Atypowy wzrost	N	Min.	LQ	Mediana	GQ	Maks.	W	p
0	97	0,0091	0,0386	0,0582	0,1103	0,3829	0,8342	0,0000
1	26	0,0396	0,0818	0,1187	0,1757	0,3333	0,9183	0,0410

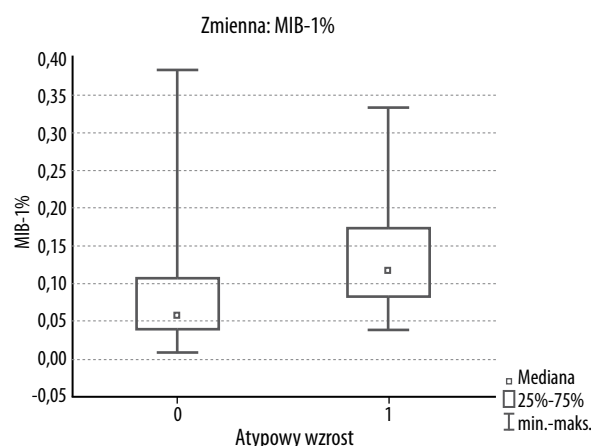
Tabela 36. Statystyki opisowe dla wartości indeksu proliferacyjnego w grupach oponiaków z „atypowym wzrostem” (1) i z obecnością struktur cytoarchitektonicznych typowych dla oponiaków GI (0)

W pierwszej kolejności zbadano rozkład wartości indeksu proliferacyjnego w grupach guzów z „atypowym wzrostem” lub bez niego. Wynik testu W Shapiro-Wilka jest istotny, dlatego nie należy spodziewać się normalnego rozkładu w żadnej z grup. Do opisu grup oraz do testowania różnic pomiędzy grupami zostały zastosowane statystyki nieparametryczne oraz nieparametryczne testy.

U	674,5
p	0,0003

Tabela 37. Wyniki testu U Manna-Whitneya dla różnic w wartości indeksu proliferacyjnego w grupach z obecnością struktur cytoarchitektonicznych typowych dla oponiaków GI i z obecnością „atypowego wzrostu”

Różnice wartości indeksów proliferacyjnych w grupie z „atypowym wzrostem” i z obecnością struktur cytoarchitektonicznych typowych dla oponiaków GI przedstawiono na rys. 6.



Rys. 6. Różnice w wartościach indeksu proliferacyjnego w grupie oponiaków z „atypowym wzrostem” (1) i z obecnością struktur cytoarchitektonicznych typowych dla oponiaków GI (0)

Na podstawie wyniku testu U Manna-Whitneya można stwierdzić, iż średnia wartość indeksu proliferacyjnego jest zależna od wartości zmiennej: „atypowy wzrost”. W grupie oponiaków, w których zaobserwowano nietypowy wzrost (1), średnia wartość indeksu proliferacyjnego jest statystycznie istotnie wyższa niż w grupie oponiaków bez nietypowego wzrostu (0) [0,1187 (0,0818-0,1757) vs 0,0582 (0,0386-0,1183); $p < 0,0005$].

Ocena zależności indeksu proliferacyjnego od obecności drobnych komórek ze zwiększonym stosunkiem jądro-cytoplazmatycznym (N/C)

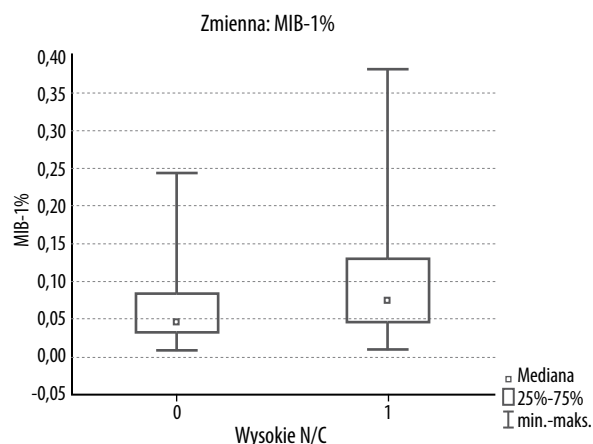
Wysokie N/C	N	Min.	LQ	Mediana	UQ	Maks.	W	p
0	14	0,009	0,031	0,047	0,086	0,244	0,7664	0,0020
1	110	0,009	0,044	0,074	0,132	0,383	0,8688	<0,0001

Tabela 38. Statystyki opisowe dla wartości indeksu proliferacyjnego w grupie oponiaków bez obecności drobnych komórek ze zwiększonym stosunkiem N/C (0) oraz w grupie oponiaków z obecnością takich komórek (1)

W pierwszej kolejności zbadano rozkład wartości indeksu proliferacyjnego w grupie bez obecności drobnych komórek ze zwiększonym stosunkiem N/C (0) oraz w grupie z obecnością takich komórek (1). Ponieważ wynik testu W Shapiro-Wilka jest istotny w obu grupach, nie można spodziewać się rozkładu normalnego zmiennej indeksu proliferacyjnego w żadnej z badanych grup. Dlatego do opisu oraz testowania zastosowane zostaną statystyki oraz testy nieparametryczne.

U	510,5
p	0,0405

Tabela 39. Wyniki testu U Manna-Whitneya dla różnic w wartości indeksu proliferacyjnego w grupach bez obecności drobnych komórek ze zwiększonym stosunkiem N/C oraz w grupie oponiaków z obecnością takich komórek



Rys. 7. Różnice w wartościach indeksu proliferacyjnego w grupie oponiaków z obecnością drobnych komórek ze zwiększonym stosunkiem N/C (1) i bez obecności tych komórek (0)

Różnice wartości indeksów proliferacyjnych w grupie oponiaków z obecnością drobnych komórek ze zwiększonym stosunkiem N/C i bez obecności tych komórek przedstawiono na rys. 7. Na podstawie wyniku testu U Manna-Whitneya można stwierdzić, iż średnia wartość indeksu proliferacyjnego zależna jest od poziomu zmiennej „obecność drobnych komórek ze zwiększonym stosunkiem N/C”. W grupie oponiaków, w których zaobserwowano obecność tych komórek (1), średnia wartość indeksu proliferacyjnego jest statystycznie istotnie wyższa niż w grupie oponiaków, w których utkaniu tych komórek nie zaobserwowano (0) [0,074 (0,044-0,132) vs 0,047 (0,031-0,086); $p < 0,05$].

Ocena zależności indeksu proliferacyjnego od gęstości komórkowej

Gęstokomórkowy	N	Min.	LQ	Mediana	UQ	Maks.	W	p
0	63	0,0091	0,0359	0,0645	0,1205	0,2813	0,9029	0,0001
1	56	0,0188	0,0457	0,0738	0,1453	0,3829	0,8423	<0,0001

Tabela 40. Statystyki opisowe dla wartości indeksu proliferacyjnego w grupie oponiaków z podwyższoną gęstością komórkową (1) oraz w grupie z normalną gęstością komórek (0)

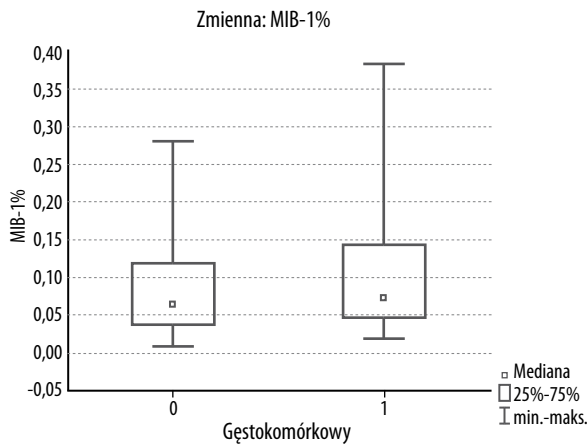
W pierwszej kolejności zbadano rozkład wartości indeksu proliferacyjnego w grupie oponiaków z podwyższoną gęstością komórkową (1) oraz w grupie z normalną gęstością komórek (0). Ponieważ wynik testu W Shapiro-Wilka jest istotny w obu grupach, nie można spodziewać się rozkładu normalnego zmiennej indeksu proliferacyjnego w żadnej z badanych grup. Dlatego do opisu oraz testowania zastosowane zostaną statystyki oraz testy nieparametryczne.

U	1495,0
p	0,1521

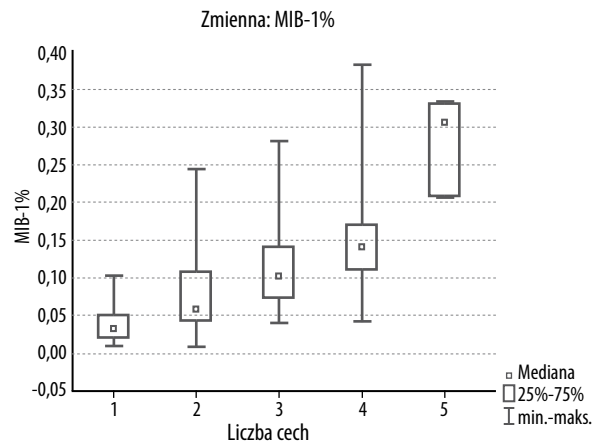
Tabela 41. Wyniki testu U Manna-Whitneya dla różnic w wartości indeksu proliferacyjnego w grupie oponiaków z podwyższoną gęstością komórkową oraz w grupie z normalną gęstością komórek

Różnice wartości indeksów proliferacyjnych w grupie oponiaków „gęstokomórkowych” i o normalnej gęstości komórek przedstawiono na rys. 8.

Na podstawie wyniku testu U Manna-Whitneya nie stwierdza się żadnej statystycznie istotnej różnicy w średniej wartości indeksu proliferacyjnego pomiędzy grupą oponiaków z wysoką gęstością komórek (1) oraz grupą oponiaków z normalną gęstością komórek (0). Wartości indeksu proliferacyjnego w grupach 1 i 0 nie różnią się między sobą i wszelkie obserwowane różnice są tylko przypadkowe [1 vs 0: 0,0738 (0,0457-0,1453) vs 0,0645 (0,0359-0,1205); $p = 0,1521$].



Rys. 8. Różnice w wartościach indeksu proliferacyjnego w grupie oponiaków „gęstokomórkowych” (1) i o normalnej gęstości komórek (0)



Rys. 9. Różnice w wartościach indeksu proliferacyjnego w grupach oponiaków z różną liczbą cech histologicznych

Analiza zależności indeksu proliferacyjnego od liczby cech histologicznych

Aby dowiedzieć się, które grupy różnią się między sobą, został zastosowany test z dla porównań wielokrotnych *post-hoc*.

Liczba cech	N	Min.	LQ	Mediana	UQ	Maks.	W	p
1	27	0,00920	0,01880	0,03270	0,05120	0,10220	0,8837	0,0058
2	39	0,00910	0,04200	0,05710	0,10890	0,24440	0,8359	0,0001
3	41	0,03960	0,07160	0,10180	0,14320	0,28130	0,9106	0,0035
4	14	0,04200	0,10940	0,14035	0,17180	0,38290	0,8313	0,0125
5	3	0,20680	0,20680	0,30660	0,33330	0,33330	0,8998	0,3850

Tabela 42. Statystyki opisowe dla wartości indeksu proliferacyjnego w grupach oponiaków z różną liczbą cech histologicznych

W pierwszej kolejności zbadano rozkład wartości indeksu proliferacyjnego w poszczególnych grupach. Ponieważ wynik testu W Shapiro-Wilka jest istotny w 4 z 5 grup (oprócz grupy z pięcioma cechami histologicznymi), nie można spodziewać się normalnego rozkładu zmiennej indeksu proliferacyjnego w żadnej z badanych grup. Dlatego do opisu oraz testowania zastosowane zostaną statystyki oraz testy nieparametryczne.

z-values	2	3	4	5
1	2,8545	5,7203	5,2961	4,1935
2		3,1435	3,3046	3,0668
3			1,0546	1,8966
4				1,2699

Tabela 44. Podsumowanie wielokrotnych porównań *post-hoc*

H(4,124)	52,03049
p	<0,0001

Tabela 43. Wyniki testu H Kruskala-Wallisa dla różnic w wartości indeksu proliferacyjnego w grupach z różną liczbą cech histologicznych

p-values	2	3	4	5
1	0,0431	<0,0001	<0,0001	0,0003
2		0,0167	0,0095	0,0216
3			1,0000	0,5788
4				1,0000

Tabela 45. Podsumowanie wielokrotnych porównań *post-hoc*

Różnice wartości indeksów proliferacyjnych w grupie oponiaków z różną liczbą cech histologicznych przedstawiono na rys. 9. W celu porównania grup oponiaków z różną liczbą cech histologicznych pod względem wartości indeksu proliferacyjnego został zastosowany test H Kruskala-Wallisa (nieparametryczna wersja analizy wariancji). Wynik testu jest istotny statystycznie, można więc stwierdzić, iż średnia wartość indeksu proliferacyjnego jest różna w testowanych grupach ($p < 0,0001$).

Jak wynika z zestawień podsumowujących wielokrotne porównania *post-hoc*, tylko porównania grupy 3 z grupą 4, grupy 3 z grupą 5 oraz grupy 4 z grupą 5 nie dały wyników statystycznie istotnych. To oznacza, iż wartość indeksu proliferacyjnego w tych 3 grupach nie różni się statystycznie istotnie. Natomiast wszystkie pozostałe porównania dały wyniki statystycznie istotne, w związku z tym można stwierdzić, iż średnie wartości indeksu proliferacyjnego dla tych grup różnią się między sobą w sposób statystycznie istotny.

Dodatkowo sprawdzono jeszcze hipotezę, czy wartość indeksu proliferacyjnego różni się pomiędzy grupami guzów z <3 i ≥3 cechami histologicznymi.

≥3	N	Min.	LQ	Mediana	UQ	Maks.	W	p
0	66	0,009	0,031	0,046	0,079	0,244	0,8202	0,0000
1	58	0,040	0,073	0,112	0,172	0,383	0,8977	0,0001

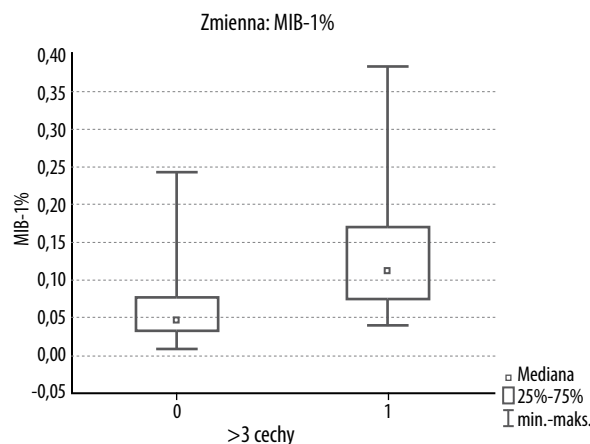
Tabela 46. Statystyki opisowe dla wartości indeksu proliferacyjnego w grupach oponiaków z <3 (0) i ≥3 (1) cechami histologicznymi

W pierwszej kolejności zbadano rozkład wartości indeksu proliferacyjnego w poszczególnych grupach. Ponieważ wynik testu W Shapiro-Wilka jest istotny, nie można spodziewać się normalnego rozkładu zmiennej indeksu proliferacyjnego w żadnej z badanych grup. Dlatego do opisu oraz testowania zastosowane zostaną statystyki oraz testy nieparametryczne.

U	657
p	3,08107E-10

Tabela 47. Wyniki testu U Manna-Whitneya dla różnic w wartości indeksu proliferacyjnego w grupach oponiaków z <3 (0) i ≥3 (1) cechami histologicznymi

Różnice wartości indeksu proliferacyjnego w grupach oponiaków z <3 i ≥3 cechami histologicznymi przedstawiono na rys. 10.



Rys. 10. Różnice w wartościach indeksu proliferacyjnego w grupach oponiaków z <3 (0) i ≥3 (1) cechami histologicznymi

Na podstawie wyniku testu U Manna-Whitneya można stwierdzić, iż średnia wartość indeksu proliferacyjnego jest zależna od tego, czy w guzie zaobserwowano 3 lub więcej cech histologicznych (grupa 1), czy mniej niż 3 cechy histologiczne (grupa 0). W grupie oponiaków, w których zaobserwowano ≥3 cechy, średnia wartość indeksu proliferacyjnego jest statystycznie istotnie wyższa niż w grupie oponiaków, w których

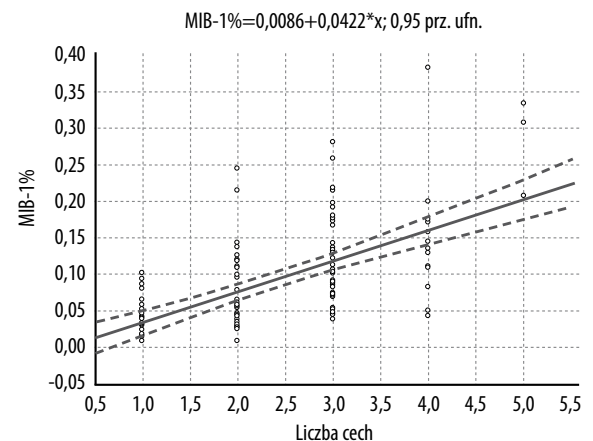
zaobserwowano <3 cechy [0,112 (0,073-0,172) vs 0,046 (0,031-0,079); p<0,0001].

Analiza korelacji indeksu proliferacyjnego oraz liczby cech histologicznych

Liczbę cech histologicznych można potraktować też jako zmienną ilościową i przeprowadzić analizę korelacji pomiędzy indeksem proliferacyjnym i liczbą cech histologicznych. Ponieważ chodzi o zmienne bez rozkładu Gaussowskiego, zastosowana zostanie analiza korelacji Spearmana (nieparametryczna, korelacja rang).

N	124
R_{SP}	0,6424
p	8,89E-16
R²	0,4127

Tabela 48. Wyniki testu korelacji Spearmana wartości indeksu proliferacyjnego z liczbą cech histologicznych



Rys. 11. Wykres korelacji pomiędzy wartością indeksu proliferacyjnego a liczbą cech histologicznych

Na podstawie wyniku testu korelacji Spearmana można stwierdzić, iż wartość indeksu proliferacyjnego koreluje dodatnio wysoce istotnie z liczbą cech histologicznych guza (R_{SP}=0,6423; p<0,0001).

Analiza zależności indeksu proliferacyjnego od rodzaju kryterium diagnostycznego (liczby figur podziału lub cech morfologicznych)

Oponiaki z grup GI i GII podzielono na 3 grupy:

- A – 3 i więcej cech morfologicznych;
- B – 4 i więcej mitoz;
- C – 3 i więcej cech morfologicznych oraz 4 i więcej mitoz.

Ponieważ wynik testu W Shapiro-Wilka jest istotny w grupie A i C, nie można spodziewać się normalnego rozkładu zmiennej indeksu proliferacyjnego w tych grupach. Dlatego do opisu oraz testowania zostaną zastosowane statystyki oraz testy nieparametryczne (nieparametryczna analiza wariancji rang).

	N ważnych	Min.	LQ	Mediana	UQ	Maks.
A	21	0,0396	0,0513	0,0732	0,0901	0,2000
B	7	0,0428	0,0962	0,1089	0,2148	0,2444
C	37	0,0452	0,1094	0,1432	0,1808	0,3829

Tabela 49. Statystyki opisowe dla wartości indeksu proliferacyjnego w poszczególnych grupach oponiaków

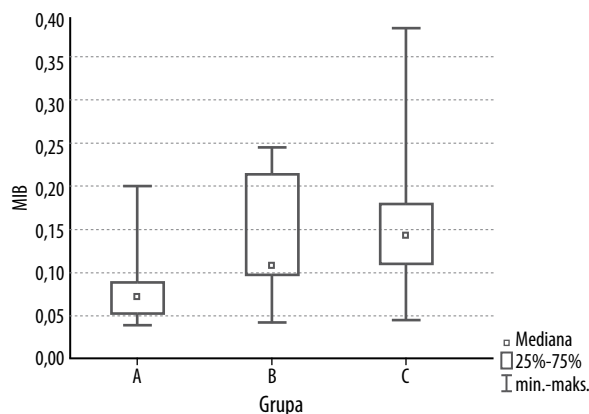
Test W Shapiro-Wilka	W	p
A	0,7847	0,0004
B	0,8837	0,2435
C	0,9236	0,0143

Tabela 50. Wyniki testu W Shapiro-Wilka dla rozkładu wartości indeksu proliferacyjnego w poszczególnych grupach

H(2, N=65)	17,6385
p	0,0001

Tabela 51. Wyniki testu H Kruskala-Wallisa dla różnic w wartościach indeksu proliferacyjnego w poszczególnych grupach

Wynik testu jest statystycznie istotny, na bardzo wysokim poziomie istotności ($p < 0,0001$). By dowiedzieć się, które grupy różnią się od siebie, zastosowany został test z dla porównań wielokrotnych *post-hoc*.



Rys. 12. Różnice w wartościach indeksu proliferacyjnego w poszczególnych grupach oponiaków

z-value	B	C
A	1,8120	4,1972
B		0,8634

Tabela 52. Podsumowanie wielokrotnych porównań *post-hoc*

p-value	B	C
A	0,2100	0,0001
B		1,0000

Tabela 53. Podsumowanie wielokrotnych porównań *post-hoc*

Testy wielokrotnych porównań *post-hoc* wykazały, iż istotna różnica w wartości indeksu proliferacyjnego istnieje tylko pomiędzy grupą A oraz C ($p < 0,0001$). Pozostałe porównania nie dały wyniku statystycznie istotnego.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

PORÓWNANIE INDEKSU PROLIFERACYJNEGO W POSZCZEGÓLNYCH GRUPACH OPONIAKÓW

Indeks proliferacyjny (PI) mierzony przy pomocy immunoreaktywności komórek guza z przeciwciałem MIB-1 uważany jest przez wielu badaczy za bardzo pomocne narzędzie prognostyczne^(68,92-94). Niektórzy autorzy dowodzą nawet, że w przypadku oponiaków indeks proliferacyjny jest jedynym wiarygodnym markerem pozwalającym przewidywać wznowy i prognozować czas przeżycia w okresie pooperacyjnym⁽¹⁰⁾.

Niemniej Tyagi i wsp. w retrospektywnym badaniu obejmującym 65 przypadków oponiaków wykazali, że wartość indeksu proliferacyjnego nie odzwierciedla tendencji danego nowotworu do wznowy, a wartość prognostyczną posiadają rozległość zabiegu operacyjnego pierwotnego guza oraz jego postać histologiczna⁽⁹⁵⁾.

Mimo to większość doniesień wskazuje na przydatność oceny indeksu proliferacyjnego, chociaż dopiero w połączeniu z takimi czynnikami, jak: obraz histologiczny guza, indeks mitotyczny, obraz radiologiczny, doszczętność resekcji oraz profil molekularny^(69,71,75).

Znany jest fakt, że średnie wartości PI różnią się pomiędzy poszczególnymi stopniami złośliwości histologicznej oponiaków. I tak według WHO dla oponiaków łagodnych (GI) za średnią wartość PI należy przyjąć 3,8%, dla oponiaków GII – 7,2%; oponiaki GIII mają się charakteryzować PI rzędu 14,7%⁽⁶⁾.

Roser i wsp., badając PI w 600 przypadkach oponiaków, uzyskali następujące średnie wartości: GI – 3,28%, GII – 9,95% oraz GIII – 12,18%⁽⁶⁹⁾. Abry i wsp. w przeglądzie piśmiennictwa obejmującym 53 artykuły dotyczące indeksu proliferacyjnego Ki-67/MIB-1 w oponiakach określili średnie wartości PI dla poszczególnych stopni złośliwości histologicznej WHO jako: GI – 3%, GII – 8% i 17% dla oponiaków GIII⁽⁶⁸⁾. Należy zaznaczyć, że rozpiętości uzyskiwanych wyników były bardzo duże. Poczynając od oponiaków łagodnych GI, wartości PI zawierały się w przedziale od 0,1%⁽⁶²⁾ do 27,5%⁽⁶⁴⁾, w przypadku oponiaków atypowych GII – od 0,1%⁽⁹⁶⁾ do 34,1%⁽⁶⁴⁾. Indeks proliferacyjny oponiaków GIII oscylował pomiędzy wartościami 0,5%⁽⁹⁷⁾ i 67,9%⁽⁸⁾.

W niniejszej pracy przeanalizowaliśmy wartości indeksu proliferacyjnego w 154 oponiakach, z których 65 przypadków spełniało kryteria diagnostyczne oponiaków atypowych GII, 59 przypadków zostało sklasyfikowanych jako oponiaki łagodne „GI z cechami atypii”, a 30 przypadków jako oponiaki „typowo” łagodne GI. Ze względu na małą liczbę dostępnych przypadków oraz odmienne kryteria diagnostyczne w pracy nie uwzględniliśmy oponiaków GIII. Średnie wartości PI uzyskane w badanych grupach wyniosły odpowiednio 13,1% w grupie oponiaków atypowych GII i 5,2% w grupie oponiaków „GI z cechami atypii”. W grupie

kontrolnej, którą stanowiły oponiaki łagodne, nieprzejawiające żadnej z cech oponiaków atypowych, średnia wartość PI wyniosła 2,2% (tabela 29). Wykonana analiza statystyczna wykazała istotne statystycznie różnice pod względem wartości PI w poszczególnych grupach (tabela 27). Ponadto wieloczynnikowa analiza wariancji wykazała, że przynależność do grupy (I, II i III – kontrolnej) jest jedynym czynnikiem wpływającym na wartość zmiennej zależnej PI (tabela 28). Żadna z pozostałych analizowanych zmiennych, takich jak płeć, wiek oraz parametr grupa*pleć (określający, w jakim stopniu płeć pacjenta w danej grupie wpływa na wartość indeksu proliferacyjnego), nie wpływa na wartość zmiennej zależnej PI.

Interesujący wydaje się fakt, że w specjalnie wyodrębnionej na potrzeby tego badania grupie oponiaków GI z cechami atypii średnia wartość PI różniła się istotnie statystycznie od wartości PI w grupie kontrolnej. Uzyskany wynik może wskazywać, iż guzy łagodne, które w swoim utkaniu mikroskopowym przejawiają 1 lub 2 cechy charakterystyczne dla oponiaków atypowych, mogą mieć, ze względu na podwyższony w porównaniu z pozostałymi oponiakami GI indeks proliferacyjny, bardziej „agresywny” przebieg.

Uśrednione dane z piśmiennictwa wskazują, że graniczna wartość PI MIB-1, powyżej której ryzyko wznowy guza znacząco wzrasta, wynosi 4%⁽⁶⁸⁾. W badaniu własnym wynik PI wynoszący 5,2% w grupie oponiaków GI z cechami atypii wskazuje zatem na podwyższone ryzyko wznowy.

Różnice między uzyskanymi wynikami wartości PI w badaniu własnym a wartościami PI z dostępnych badań naukowych prawdopodobnie wynikają z zastosowanej metodologii. Metoda immunohistochemiczna oznaczania PI posiada pewne ograniczenia na każdym etapie jej przeprowadzania. Istotne różnice w uzyskiwanych wynikach zależą od techniki pobierania odpowiednich wycinków z utrwalonego materiału pooperacyjnego, wyboru najbardziej reprezentatywnego blocka do wykonania reakcji immunohistochemicznej, procedury wykonywania barwień (rozcieńczenia, czasu inkubacji itp.) z dobo-rem producenta czy też klonu przeciwciała. Etap, który powoduje największe różnice w uzyskiwanych wartościach PI przez poszczególnych badaczy, to zliczanie komórek immunododatnich. Różnice w uzyskanych wynikach mogą być spowodowane wyborem techniki obliczania komórek immunododatnich, przy pomocy mikroskopu świetlnego bądź też komputerowego analizatora obrazu. Najistotniejszy wydaje się jednak wybór metody obliczania potencjału proliferacyjnego, który jest uzależniony od preferencji ośrodka badawczego. Stosuje się dwie metody obliczania PI na podstawie reakcji immunohistochemicznej z przeciwciałem MIB-1. Pierwsza polega na zliczaniu komórek immunododatnich w losowo wybieranych obszarach preparatu, tzw. RLI (ang. *random labeling index*), druga opiera się na zliczaniu komórek immunododatnich w polach, gdzie jest ich najwięcej, tzw. HLI (ang. *highest labeling index*). W piśmiennictwie naukowym są dostępne tylko dwie prace z niezależnych ośrodków badawczych porównujące obie metody w kontekście wartości prognostycznych uzyskiwanych wyników. Konkluzje autorów są jednak sprzeczne. Vankalakunti i wsp. po przebadaniu 85 przypadków oponiaków wskazują

HLI jako metodę o wyższej wartości prognostycznej⁽⁷¹⁾. Z kolei japońscy naukowcy po przeanalizowaniu indeksu proliferacyjnego w 139 przypadkach oponiaków jako bardziej wiarygodną prognostycznie uznali metodę RLI^(98,99). W badaniu własnym do określenia indeksu proliferacyjnego zastosowaliśmy metodę HLI, gdyż w naszym przekonaniu metoda ta bardziej odzwierciedla faktyczny potencjał rozrostowy guzów. Należy zaznaczyć, że przeprowadzone badania nie miały na celu oceny wartości prognostycznej wybranej metody ani też porównania wartości prognostycznej obu opisywanych metod badawczych.

KORELACJA INDEKSU PROLIFERACYJNEGO Z AKTYWNOŚCIĄ MITOTYCZNĄ

Aktywność mitotyczna, obok potencjału proliferacyjnego Ki-67/MIB-1, uważana jest za najbardziej wiarygodny czynnik prognostyczny w oponiakach⁽¹⁰⁰⁻¹⁰²⁾. Wyniki badań autorów porównujących wyżej wymienione markery potencjału rozrostowego oponiaków były zgodne i potwierdzały istotną statystycznie dodatnią korelację^(70,103). Torp i wsp. wykazali, iż aktywność mitotyczna określona liczbą figur podziału na 10 HPF ma znacznie wyższą wartość prognostyczną niż potencjał proliferacyjny obliczony za pomocą badań immunohistochemicznych⁽⁶⁴⁾. Pogląd ten znajduje swoje odzwierciedlenie w wytycznych WHO, które stawiają liczbę figur podziału mitotycznego/10 HPF jako niezależne, obok cech morfologicznych, kryterium diagnostyczne odróżniające oponiaki łagodne (GI) od atypowych (GII) oraz anaplastycznych (GIII) (WHO). Pomimo iż średnie wartości potencjału proliferacyjnego określanego metodą immunohistochemiczną różnią się w poszczególnych grupach złożowości histologicznej oponiaków, nie jest on uznawany za kryterium diagnostyczne w wyżej wymienionej klasyfikacji.

W badaniu własnym, na podstawie wyniku testu korelacji Spearmana, stwierdziliśmy (tabela 31), że liczba podziałów mitotycznych istotnie koreluje z wartością MIB-1, przy czym korelacja ta jest dodatnia. Dodatkowo określony współczynnik determinacji wskazuje, że ponad 47% zmienności MIB-1 można tłumaczyć zmiennością liczby figur podziału mitotycznego. W układzie biologicznym, będącym pod wpływem wielu czynników, jest to wartość wysoka.

OCENA ZALEŻNOŚCI INDEKSU PROLIFERACYJNEGO OD POSZCZEGÓLNYCH CECH HISTOLOGICZNYCH CHARAKTERYZUJĄCYCH OPONIAKI ATYPOWE GII

Histologiczne kryteria diagnostyczne odróżniające oponiaki atypowe od łagodnych w swojej obecnej formie pojawiły się w klasyfikacji WHO dopiero w 2000 roku. W najnowszej klasyfikacji, opublikowanej przez WHO w 2007 roku, kryteria te pozostały niezmiennie. Od tego też czasu notuje się znaczący wzrost częstości rozpoznania oponiaków atypowych. Willis i wsp., stosując kryteria z 2000 roku, dokonali powtórnej oceny 314 przypadków oponiaków zdiagnozowanych według starszych klasyfikacji.

Reklasyfikacja wykazała, że 38,1% przypadków oponiaków atypowych było zaklasyfikowanych wcześniej jako guzy łagodne⁽¹⁰⁴⁾. Eksperti WHO wskazują na pięć cech morfologicznych charakteryzujących oponiaki atypowe. Są to: wyraźne jąderka, wzrost gęstości komórkowej, obecność grup komórek ze zwiększonym stosunkiem jądro-cytoplazmatycznym, brak struktur cytoarchitektonicznych charakterystycznych dla oponiaków łagodnych oraz ogniskowa martwica (WHO). Obecność w utkaniu oponiaka trzech z wyżej wymienionych pięciu cech uprawnia do rozpoznania oponiaka atypowego. W piśmiennictwie naukowym istnieje kilka prac oceniających zależność potencjału proliferacyjnego od obecności wyżej wymienionych cech^(103,105,106). Niektórzy badacze oceniali również poszczególne cechy pod względem wartości prognostycznych, porównując częstość ich występowania w grupach guzów pierwotnych i we wznowach^(8,107,108). Dobór poszczególnych cech morfologicznych nie był jednak identyczny we wszystkich tych pracach i dlatego nie jest możliwe porównywanie ich wyników. W żadnej ze wspomnianych wyżej prac nie badano wszystkich cech ocenionych przez nas w badaniach własnych.

Obecność ognisk martwicy w utkaniu oponiaków uważana jest od dawna za przejaw dużej agresywności tych guzów. Częstość jej występowania znacząco wzrasta wraz ze wzrostem stopnia histologicznej złośliwości oponiaków. W badaniach Moradiego i wsp. częstość występowania ognisk martwicy w poszczególnych grupach przedstawiała się następująco: GI – 3,4%, GII i GIII – 36,7%⁽¹⁰⁶⁾. Wyniki uzyskane przez McLeana i wsp. z kolei wynosiły odpowiednio: 8% dla grupy guzów GI, 42% dla grupy GII i 71% dla grupy GIII. Autorzy stwierdzili ponadto, że martwica jest jedyną cechą warunkującą podwyższone ryzyko wznowy⁽¹⁰⁸⁾. We własnych badaniach żaden z guzów z grupy GI nie przejawiał w swoim utkaniu tej cechy. W grupie GII martwicę zaobserwowaliśmy w 24 guzach, co stanowiło 37% wszystkich przypadków oponiaków atypowych (tabela 22). Różnica w rozkładzie tej cechy była statystycznie istotna ($p < 0,0001$). Dokonane przy pomocy testu U Manna-Whitneya porównanie indeksu proliferacyjnego w grupach oponiaków z martwicą i bez jej obecności (tabela 35) wykazało statystycznie istotnie wyższe wartości PI w grupie guzów z obecnością zmian martwiczych [0 vs 1: 0,1442 (0,1158-0,2105) vs 0,0572 (0,0390-0,1020); $p < 0,0001$]. Sądzić więc można, że obecność martwicy w obrazie mikroskopowym guza wskazywać może, iż jest to oponiak atypowy [dla tej cechy niemożliwe było policzenie wskaźnika OR (ang. *odds ratio*) ze względu na brak martwicy w guzach GI]. Znacznie wyższe wartości PI w grupie oponiaków z martwicą niż w guzach bez ognisk martwicy powinny stanowić przesłankę do ścisłego nadzoru nad pacjentem w takich przypadkach, w związku z wyższym ryzykiem wystąpienia wznowy.

Brak tendencji do tworzenia układów komórkowych przypominających te występujące w oponiakach łagodnych to kolejna wymieniana przez wielu autorów cecha silnie związana z podwyższonymi wartościami PI oraz zwiększonym ryzykiem wznowy^(103,106,107). W utkaniu mikroskopowym cecha ta przejawia się najczęściej bezładnie układającymi się komórkami na dość dużej powierzchni ocenianego wycinka. Ho i wsp. wymieniają tę cechę, obok martwicy i figur podziału mitotycznego, jako

najbardziej charakterystyczną dla oponiaków atypowych. Badacze ci w podsumowaniu swojej pracy proponują nawet zmianę kryteriów diagnostycznych i rozpoznawanie oponiaków atypowych w przypadku obecności dwóch z wyżej wymienionych trzech cech⁽¹⁰⁵⁾. Willis i wsp. z kolei krytykują to kryterium jako zbyt subiektywne w ocenie i obniżające wartość diagnostyczną⁽¹⁰⁴⁾. W niniejszym badaniu cechę tę zaobserwowaliśmy tylko w jednym guzie GI, co stanowiło 2% wszystkich przypadków. W grupie oponiaków atypowych bezładne utkanie dało się zaobserwować w 38% przypadków (25 guzów). Różnica w rozkładzie tej cechy w obu badanych grupach była statystycznie istotna ($p < 0,0001$), a obliczony na podstawie różnicy rozkładu iloraz szans (wskaźnik OR) wyniósł 35,6 (tabela 23). Porównanie wartości indeksu proliferacyjnego w obu grupach także dało statystycznie istotne różnice (tabela 37), z wyższymi wartościami PI w grupie z obecnością bezładnych formacji komórkowych [1 vs 0: 0,1187 (0,0818-0,1757) vs 0,0582 (0,0386-0,1183); $p < 0,0005$]. Powyższe wyniki wskazują więc, że obecność opisywanej cechy w utkaniu oponiaka ponad 35-krotnie zwiększa szansę, że jest to oponiak atypowy. Statystycznie istotne różnice w wartości PI wskazują, że oponiaki z tą cechą może charakteryzować zwiększona tendencja do wystąpienia wznowy.

Pojawianie się w obrazie mikroskopowym oponiaków grup drobnych komórek z podwyższonym stosunkiem jądro-cytoplazmatycznym jest kolejną cechą zaliczaną do histologicznych kryteriów diagnostycznych oponiaków atypowych. W świetle dostępnych badań naukowych cecha ta także związana jest z podwyższonymi wartościami PI⁽¹⁰¹⁾ oraz zwiększonym ryzykiem wznowy⁽¹⁰⁶⁾. W badaniu własnym stwierdziłem, że była to cecha występująca najczęściej w utkaniu ocenianych guzów. Czterdzieści osiem (81%) przypadków oponiaków GI z nieprawidłowościami histologicznymi i 62 (95%) przypadki z grupy GII przejawiały tę cechę w swoim obrazie mikroskopowym (tabela 24). Różnica w rozkładzie tej cechy była statystycznie istotna ($p < 0,05$), natomiast OR wynosił 4,7. Różnice w wartości potencjału proliferacyjnego były statystycznie istotne ($p < 0,05$) (tabela 39), choć nie tak znamienne jak w przypadkach wyżej opisywanych cech [1 vs 0: 0,074 (0,044-0,132) vs 0,047 (0,031-0,086)]. Statystycznie istotnie wyższa wartość PI w związku z obecnością w utkaniu oponiaka grup komórek drobnych o podwyższonym stosunku jądro-cytoplazmatycznym może wskazywać na podwyższone ryzyko wznowy.

Wyraźne jąderka w jądrach komórek są przejawem zwiększonej aktywności proliferacyjnej nie tylko w przypadku oponiaków. W wielu nowotworach ich obecność świadczy o złośliwości i niekorzystnym rokowaniu. Abramovich i wsp., porównując guzy pierwotne i wznowy, wykazali, iż wyraźne jąderka były jedyną cechą statystycznie częstszą w oponiakach nawrotowych⁽⁸⁾. W badaniach de la Monte i wsp. osiągnięto podobne wyniki, z tym że oprócz wyraźnych jąderek wymieniono jeszcze martwicę oraz utratę cytoarchitektoniki charakterystycznej dla oponiaków GI jako cechy świadczące o podwyższonym ryzyku wznowy⁽¹⁰⁷⁾. W oponiakach badanych przez nas jąderka były obecne w 28 (47%) przypadkach guzów GI z nieprawidłowościami histologicznymi oraz w 55 (86%) oponiakach atypowych GII. Różnica w rozkładzie tej cechy była statystycznie

istotna ($p < 0,0001$), a wyliczony na podstawie różnicy częstości występowania tej cechy w obu badanych grupach współczynnik OR wyniósł 6,8 (tabela 21). Porównanie wartości indeksu proliferacyjnego w obu grupach dało statystycznie istotną różnicę (tabela 33) z wyższymi wartościami PI w grupie z obecnością wyraźnych jąderek [1 vs 0: 0,0912 (0,0531-0,1428) vs 0,0419 (0,0282-0,0724); $p < 0,0001$]. Zatem zaobserwowanie w obrazie mikroskopowym guza jąder komórkowych z wyraźnymi jąderkami prawie 7 razy zwiększa szansę na rozpoznanie oponiaka atypowego. Podwyższony potencjał proliferacyjny w związku z obecnością tej cechy z kolei świadczy o realnej możliwości wznowy guza.

Zwiększona gęstość komórkowa to ostatnie z badanych przez nas histologicznych kryteriów diagnostycznych dla oponiaków atypowych. Nieliczni z cytowanych wyżej autorów dowodzą wyższej częstości tej cechy w grupie guzów nawrotowych⁽¹⁰³⁾ oraz jej bezpośredniego związku ze stopniem złośliwości oponiaków⁽¹⁰⁶⁾. Wynikać to może z nieprecyzyjnego określenia pojęcia podwyższonej gęstości komórkowej. Niska wiarygodność rozpoznania opartych na podstawie obecności tej cechy stwierdzona została także przez Willisa i wsp., którzy uważają ją za zbyt subiektywną⁽¹⁰⁴⁾. Nasze badania potwierdzają cytowany wyżej pogląd. Zwiększona gęstość komórkowa jako jedyna z analizowanych cech nie wpływała na wartość indeksu proliferacyjnego. Wartości PI w grupach ze zwiększoną gęstością komórkową i bez obecności tej cechy [1 vs 0: 0,0738 (0,0457-0,1453) vs 0,0645 (0,0359-0,1205)] nie różniły się statystycznie ($p = 0,1521$), a wszelkie obserwowane różnice były tylko przypadkowe (tabela 41). Rozkład częstości tej cechy w obu badanych grupach przedstawiał się następująco: podwyższoną gęstość komórkową prezentowało 14 (25%) guzów z grupy oponiaków GI i 42 (66%) guzy z grupy GII. Różnica w rozkładzie była statystycznie istotna ($p < 0,0001$), a obliczony iloraz szans wyniósł 5,6 (tabela 25). Oznacza to, że zaobserwowanie w utkaniu oponiaka zwiększonej gęstości komórkowej ponad pięciokrotnie zwiększa szansę na rozpoznanie guza atypowego GII. Natomiast obecność tej cechy nie wpływa na wartość potencjału proliferacyjnego.

OCENA ZALEŻNOŚCI INDEKSU PROLIFERACYJNEGO OD LICZBY CECH/KRYTERIÓW HISTOLOGICZNYCH OBECNYCH W UTKANIU OPONIAKÓW

Problematyka związana z zależnością wartości PI od liczby histologicznych cech charakterystycznych dla oponiaków atypowych nie była do tej pory poruszana na łamach piśmiennictwa naukowego. Podjęta przez nas próba ma na celu określenie, czy średnie wartości indeksu proliferacyjnego są różne w grupach z poszczególnymi liczbami cech histologicznych oraz które grupy się od siebie różnią. Analizę taką można przeprowadzić, jeśli potraktuje się liczbę cech histologicznych jako dane jakościowe, przy czym liczba cech w danym guzie określa grupę, do której zostanie zakwalifikowany (od 1 do 5, gdzie 1 określa grupę z jedną cechą histologiczną, 2 określa grupę z dwiema cechami itd.). Wynik testu porównania grup oponiaków z różną liczbą cech histologicznych pod względem wartości

indeksu proliferacyjnego był statystycznie istotny ($p < 0,0001$), można więc stwierdzić, że średnie wartości PI różnią się pomiędzy testowanymi grupami (tabela 43). Wielokrotne porównania *post-hoc* z kolei nie wykazały statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupą 3 i grupą 4, grupą 3 i grupą 5 oraz grupą 4 i grupą 5 (tabele 44, 45). Na podstawie uzyskanych wyników należy uznać, że grupy z trzema i więcej cechami można traktować jako jedną pod względem wartości indeksu proliferacyjnego. Dodatkowo sprawdzono jeszcze hipotezę, czy wartości potencjału proliferacyjnego różnią się pomiędzy grupami guzów z < 3 (grupa 0) i ≥ 3 (grupa 1) cechami histologicznymi (analiza ta nie jest tożsama z porównaniem grupy oponiaków łagodnych GI i atypowych GII, gdyż w grupie GII znalazły się guzy z mniej niż 3 cechami, zakwalifikowane na podstawie niezależnego kryterium liczby figur podziału). Na podstawie wyniku testu U Manna-Whitneya można stwierdzić, iż w grupie oponiaków, w których zaobserwowano ≥ 3 cechy, średni indeks proliferacyjny jest statystycznie istotnie wyższy niż w grupie oponiaków, w których zaobserwowano < 3 cechy [1 vs 0: 0,112 (0,073-0,172) vs 0,046 (0,031-0,079); $p < 0,0001$] (tabela 47). Przytoczone wyniki dowodzą, w naszym przekonaniu, słuszności ustalenia przez ekspertów WHO prognozy diagnostycznej dla oponiaków atypowych na poziomie obecności trzech lub więcej kryteriów histologicznych. Dodatkowo, liczbę kryteriów histologicznych można potraktować też jako zmienną ilościową i przeprowadzić analizę korelacji pomiędzy ich liczbą a indeksem proliferacyjnym. Wynik testu korelacji Spearmana wskazuje, iż wartość indeksu proliferacyjnego koreluje wysoce istotnie z liczbą kryteriów histologicznych ujawnionych w guzie ($R_{sp} = 0,6423$; $p < 0,0001$), przy czym korelacja ta jest dodatnia (tabela 48). Współczynnik determinacji na poziomie $R^2 = 0,4127$ mówi o tym, iż ponad 41% zmienności indeksu proliferacyjnego można tłumaczyć zmiennością liczby kryteriów histologicznych guza.

OCENA ZALEŻNOŚCI INDEKSU PROLIFERACYJNEGO OD RODZAJU KRYTERIUM DIAGNOSTYCZNEGO (LICZBY FIGUR PODZIAŁU LUB CECH MORFOLOGICZNYCH)

W swoich badaniach postanowiliśmy sprawdzić, które z kryteriów histologicznych klasyfikujących oponiaka do grupy atypowych wiąże się w największym stopniu z potencjałem proliferacyjnym. W tym celu w grupie oponiaków atypowych wyodrębniliśmy trzy grupy: A – guzy z trzema lub więcej cechami morfologicznymi, ale liczbą mitoz $< 4/10$ HPF; B – guzy z mniej niż trzema cechami morfologicznymi, lecz liczbą figur podziału $\geq 4/10$ HPF; C – guzy z trzema lub więcej cechami morfologicznymi i indeksem mitotycznym $\geq 4/10$ HPF. Następnie wykonaliśmy test nieparametrycznej analizy wariancji rang (test H Kruskala-Wallisa), aby sprawdzić, czy grupy różnią się pod względem wartości indeksu proliferacyjnego (tabela 51). Wynik testu okazał się statystycznie istotny ($p < 0,0001$). Ponadto wykonaliśmy testy wielokrotnych porównań *post-hoc*, aby przekonać się, które grupy się od siebie różnią. Istotną statystycznie różnicę ($p < 0,0001$) uzyskałem tylko przy porównaniu grupy A i grupy C. Brak jest wystarczających dowodów

doświadczalnych, by stwierdzić, iż grupa B różni się statystycznie istotnie od grupy A bądź grupy C (tabele 52, 53).

Na podstawie przedstawionych wyżej wyników można stwierdzić, iż wartości PI różnią się pomiędzy badanymi grupami. Grupa oponiaków atypowych sklasyfikowanych tylko na podstawie obecności trzech lub więcej cech morfologicznych ma najniższe średnie wartości indeksu proliferacyjnego. Najwyższe średnie wartości PI prezentuje natomiast grupa spełniająca oba niezależne kryteria diagnostyczne i różni się ona statystycznie istotnie od grupy A. Grupa guzów sklasyfikowanych tylko na podstawie liczby figur podziału mitotycznego $\geq 4/10$ HPF ma wyższe średnie wartości PI niż grupa A i niższe niż grupa C, lecz uzyskane różnice nie są statystycznie istotne. W świetle uzyskanych przez nas wyników słuszny wydaje się fakt ustanowienia w klasyfikacji WHO oponiaków kryterium diagnostycznego opartego na liczbie mitoz $\geq 4/10$ HPF, jako niezależnego kryterium diagnostycznego oponiaków atypowych. Zwiększa ono pulę tej postaci oponiaków oraz stawia liczbę mitotyczną jako istotny, dodatkowy czynnik rokowniczy.

WNIOSKI

W świetle wyników przeprowadzonych badań uzasadnione wydają się następujące stwierdzenia:

1. Oponiaki łagodne GI ujawniające histologicznie jedną bądź dwie cechy należące do grupy pięciu kryteriów diagnostycznych dla oponiaków atypowych (GII WHO) stanowią pod względem wartości potencjału proliferacyjnego grupę odmienną od grupy oponiaków GI bez nieprawidłowości histologicznych.
2. Chorzy, u których rozpoznano pooperacyjnie oponiaka GI WHO ujawniającego histologicznie jedną bądź dwie cechy należące do grupy pięciu kryteriów diagnostycznych dla oponiaków atypowych, winni być poddawani częstszym badaniom kontrolnym niż pacjenci z rozpoznaniem oponiaka GI WHO bez nieprawidłowości histologicznych, ze względu na większe prawdopodobieństwo wznowy, a adnotacja o obecności takich cech znaleźć się powinna w protokole badania histopatologicznego.
3. Ogniska martwicy, wyraźne jąderka oraz brak układów cytoarchitektonicznych charakterystycznych dla oponiaków GI WHO są cechami histologicznymi wykazującymi najsilniejszy związek z potencjałem proliferacyjnym oponiaków atypowych (GII WHO).
4. Podwyższona gęstość komórkowa jest cechą najmniej istotną spośród pięciu cech obrazu histologicznego określonych w klasyfikacji WHO jako kryteria diagnostyczne dla oponiaków atypowych GII.
5. Oponiaki atypowe spełniające dwa niezależne, histologiczne kryteria diagnostyczne wg klasyfikacji WHO (grupa cech obrazu mikroskopowego i liczba figur podziału) charakteryzuje znamienne wyższy indeks proliferacyjny niż indeks oponiaków spełniających tylko jedno kryterium. Adnotacja o spełnieniu tych kryteriów powinna znaleźć się w rozpoznaniu patomorfologicznym.

PIŚMIENNICTWO:

BIBLIOGRAPHY:

1. CBTRUS (2010). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2004-2006. Source: Central Brain Tumor Registry of the United States, Hinsdale, IL. Adres: www.cbtrus.org.
2. CBTRUS (2011). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2004-2007. Source: Central Brain Tumor Registry of the United States, Hinsdale, IL. Adres: www.cbtrus.org.
3. Durand A., Labrousse F., Jouvett A. i wsp.: WHO grade II and III meningiomas: a study of prognostic factors. *J. Neurooncol.* 2009; 95: 367-375.
4. Wiemels J., Wrensch M., Claus E.B.: Epidemiology and etiology of meningioma. *J. Neurooncol.* 2010; 99: 307-314.
5. Burger P.C., Scheithauer B.W.: Tumor of meningeothelial cells. W: Rosai J. (red.): *Tumors of the Central Nervous System*. Armed Forces Institute of Pathology, Washington 1994: 259-286.
6. Kleihues P., Cavenee W.K.: *Pathology and Genetics of Tumours of the Central Nervous System*. IARC Press, Lyon 2000.
7. Modha A., Gutin P.H.: Diagnosis and treatment of atypical and anaplastic meningiomas: a review. *Neurosurgery* 2005; 57: 538-550; discussion 538-550.
8. Abramovich C.M., Prayson R.A.: Histopathologic features and MIB-1 labeling indices in recurrent and nonrecurrent meningiomas. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1999; 123: 793-800.
9. Commins D.L., Atkinson R.D., Burnett M.E.: Review of meningioma histopathology. *Neurosurg. Focus* 2007; 23: E3.
10. Bruna J., Brell M., Ferrer I. i wsp.: Ki-67 proliferative index predicts clinical outcome in patients with atypical or anaplastic meningioma. *Neuropathology* 2007; 27: 114-120.
11. Heinrich B., Hartmann C., Stemmer-Rachamimov A.O. i wsp.: Multiple meningiomas: Investigating the molecular basis of sporadic and familial forms. *Int. J. Cancer* 2003; 103: 483-488.
12. Lee Y., Liu J., Patel S. i wsp.: Genomic landscape of meningiomas. *Brain Pathol.* 2010; 20: 751-762.
13. Kim Y.J., Ketter R., Steudel W.I., Feiden W.: Prognostic significance of the mitotic index using the mitosis marker anti-phosphohistone H3 in meningiomas. *Am. J. Clin. Pathol.* 2007; 128: 118-125.
14. Cancès C., Chaix Y., Karsenty C. i wsp.: [Clear cell meningioma: recurrent intraspinal tumor in a child]. *Arch. Pediatr.* 1998; 5: 758-762.
15. Di Rocco C., Di Rienzo A.: Meningiomas in childhood. *Crit. Rev. Neurosurg.* 1999; 9: 180-188.
16. Erşahin Y., Ozdamar N., Demirtaş E., Karabiyiköglü M.: Meningioma of the cavernous sinus in a child. *Childs Nerv. Syst.* 1999; 15: 8-10.
17. Shah S.H., Soomro I.N., Hussainy A.S., Hassan S.H.: Clinico-morphological pattern of intracranial tumors in children. *J. Pak. Med. Assoc.* 1999; 49: 63-65.
18. Baumgartner J.E., Sorenson J.M.: Meningioma in the pediatric population. *J. Neurooncol.* 1996; 29: 223-228.
19. Erdiñçler P., Lena G., Sarioğlu A.C. i wsp.: Intracranial meningiomas in children: review of 29 cases. *Surg. Neurol.* 1998; 49: 136-140; discussion 140-141.
20. Menon G., Nair S., Sudhir J. i wsp.: Childhood and adolescent meningiomas: a report of 38 cases and review of literature. *Acta Neurochir. (Wien)* 2009; 151: 239-244; discussion 244.
21. Byard R.W., Bourne A.J., Clark B., Hanieh A.: Clinicopathological and radiological features of two cases of intraventricular meningioma in childhood. *Pediatr. Neurosci.* 1989; 15: 260-264.

22. Mallucci C.L., Parkes S.E., Barber P. i wsp.: Paediatric meningeal tumours. *Childs Nerv. Syst.* 1996; 12: 582-588; discussion 589.
23. Preston D.L., Ron E., Yonehara S. i wsp.: Tumors of the nervous system and pituitary gland associated with atomic bomb radiation exposure. *J. Natl Cancer Inst.* 2002; 94: 1555-1563.
24. Ron E., Modan B., Boice J.D. Jr i wsp.: Tumors of the brain and nervous system after radiotherapy in childhood. *N. Engl. J. Med.* 1988; 319: 1033-1039.
25. Sadezki S., Flint-Richter P., Ben-Tal T., Nass D.: Radiation-induced meningioma: a descriptive study of 253 cases. *J. Neurosurg.* 2002; 97: 1078-1082.
26. Longstreth W.T., Phillips L.E., Drangsholt M. i wsp.: Dental X-rays and the risk of intracranial meningioma. *Cancer* 2004; 100: 1026-1034.
27. Ryan P., Lee M.W., North B., McMichael A.J.: Amalgam fillings, diagnostic dental x-rays and tumours of the brain and meninges. *Eur. J. Cancer B Oral Oncol.* 1992; 28B: 91-95.
28. Cardis E., Deltour I., Vrijheid M. i wsp.: Brain tumour risk in relation to mobile telephone use: results of the INTERPHONE international case-control study. *Int. J. Epidemiol.* 2010; 39: 675-694.
29. Frei P., Poulsen A.H., Johansen C. i wsp.: Use of mobile phones and risk of brain tumours: update of Danish cohort study. *BMJ* 2011; 343: d6387.
30. Johansen C., Boice J. Jr, McLaughlin J., Olsen J.: Cellular telephones and cancer – a nationwide cohort study in Denmark. *J. Natl Cancer Inst.* 2001; 93: 203-207.
31. Hu J., Little J., Xu T. i wsp.: Risk factors for meningioma in adults: a case-control study in northeast China. *Int. J. Cancer* 1999; 83: 299-304.
32. Black P., Carroll R., Zhang J.: The molecular biology of hormone and growth factor receptors in meningiomas. *Acta Neurochir. Suppl.* 1996; 65: 50-53.
33. Omulecka A., Papierz W., Nawrocka-Kunecka A., Lewy-Trenda I.: Immunohistochemical expression of progesterone and estrogen receptors in meningiomas. *Folia Neuro-pathol.* 2006; 44: 111-115.
34. Pravdenkova S., Al-Mefty O., Sawyer J., Husain M.: Progesterone and estrogen receptors: opposing prognostic indicators in meningiomas. *J. Neurosurg.* 2006; 105: 163-173.
35. Custer B., Longstreth W.T. Jr, Phillips L.E. i wsp.: Hormonal exposures and the risk of intracranial meningioma in women: a population-based case-control study. *BMC Cancer* 2006; 6: 152.
36. Custer B.S., Koepsell T.D., Mueller B.A.: The association between breast carcinoma and meningioma in women. *Cancer* 2002; 94: 1626-1635.
37. Claus E.B., Black P.M., Bondy M.L. i wsp.: Exogenous hormone use and meningioma risk: what do we tell our patients? *Cancer* 2007; 110: 471-476.
38. Vadivelu S., Sharer L., Schulder M.: Regression of multiple intracranial meningiomas after cessation of long-term progesterone agonist therapy. *J. Neurosurg.* 2010; 112: 920-924.
39. Blitshteyn S., Crook J.E., Jaeckle K.A.: Is there an association between meningioma and hormone replacement therapy? *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: 279-282.
40. Jhavar B.S., Fuchs C.S., Colditz G.A., Stampfer M.J.: Sex steroid hormone exposures and risk for meningioma. *J. Neurosurg.* 2003; 99: 848-853.
41. Wigertz A., Lönn S., Mathiesen T. i wsp.: Swedish Interphone Study Group: Risk of brain tumors associated with exposure to exogenous female sex hormones. *Am. J. Epidemiol.* 2006; 164: 629-636.
42. Lee E., Grutsch J., Persky V. i wsp.: Association of meningioma with reproductive factors. *Int. J. Cancer* 2006; 119: 1152-1157.
43. Benson V.S., Pirie K., Green J. i wsp.: Million Women Study Collaborators: Lifestyle factors and primary glioma and meningioma tumours in the Million Women Study cohort. *Br. J. Cancer* 2008; 99: 185-190.
44. Korhonen K., Salminen T., Raitanen J. i wsp.: Female predominance in meningiomas can not be explained by differences in progesterone, estrogen, or androgen receptor expression. *J. Neurooncol.* 2006; 80: 1-7.
45. Rao G., Giordano S.H., Liu J., McCutcheon I.E.: The association of breast cancer and meningioma in men and women. *Neurosurgery* 2009; 65: 483-489.
46. Eskandary H., Sabba M., Khajehpour F., Eskandari M.: Incidental findings in brain computed tomography scans of 3000 head trauma patients. *Surg. Neurol.* 2005; 63: 550-553.
47. Inskip P.D., Mellekjaer L., Gridley G., Olsen J.H.: Incidence of intracranial tumors following hospitalization for head injuries (Denmark). *Cancer Causes Control* 1998; 9: 109-116.
48. Mawrin C., Perry A.: Pathological classification and molecular genetics of meningiomas. *J. Neurooncol.* 2010; 99: 379-391.
49. Perry A., Gutmann D.H., Reifenberger G.: Molecular pathogenesis of meningiomas. *J. Neurooncol.* 2004; 70: 183-202.
50. Hansson C.M., Buckley P.G., Grigelioniene G. i wsp.: Comprehensive genetic and epigenetic analysis of sporadic meningioma for macro-mutations on 22q and micro-mutations within the NF2 locus. *BMC Genomics* 2007; 8: 16.
51. Carvalho L.H., Smirnov I., Baia G.S. i wsp.: Molecular signatures define two main classes of meningiomas. *Mol. Cancer* 2007; 6: 64.
52. Shen Y., Nunes F., Stemmer-Rachamimov A. i wsp.: Genomic profiling distinguishes familial multiple and sporadic multiple meningiomas. *BMC Med. Genomics* 2009; 2: 42.
53. Antinheimo J., Haapasalo H., Haltia M. i wsp.: Proliferation potential and histological features in neurofibromatosis 2-associated and sporadic meningiomas. *J. Neurosurg.* 1997; 87: 610-614.
54. Choy W., Kim W., Nagasawa D. i wsp.: The molecular genetics and tumor pathogenesis of meningiomas and the future directions of meningioma treatments. *Neurosurg. Focus* 2011; 30: E6.
55. Dezamis E., Sanson M.: [The molecular genetics of meningiomas and genotypic/phenotypic correlations]. *Rev. Neurol. (Paris)* 2003; 159: 727-738.
56. Gabeau-Lacet D., Engler D., Gupta S. i wsp.: Genomic profiling of atypical meningiomas associates gain of 1q with poor clinical outcome. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2009; 68: 1155-1165.
57. Pham M.H., Zada G., Mosich G.M. i wsp.: Molecular genetics of meningiomas: a systematic review of the current literature and potential basis for future treatment paradigms. *Neurosurg. Focus* 2011; 30: E7.
58. Riemenschneider M.J., Perry A., Reifenberger G.: Histological classification and molecular genetics of meningiomas. *Lancet Neurol.* 2006; 5: 1045-1054.
59. Simon M., Boström J.P., Hartmann C.: Molecular genetics of meningiomas: from basic research to potential clinical applications. *Neurosurgery* 2007; 60: 787-798; discussion 787-798.
60. Wozniak K., Piaskowski S., Gresner S.M. i wsp.: BCR expression is decreased in meningiomas showing loss of heterozygosity of 22q within a new minimal deletion region. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2008; 183: 14-20.
61. Babu S., Uppin S.G., Uppin M.S. i wsp.: Meningiomas: correlation of Ki67 with histological grade. *Neurol. India* 2011; 59: 204-207.
62. Takeuchi H., Kubota T., Kabuto M. i wsp.: Prediction of recurrence in histologically benign meningiomas: proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 immunohistochemical study. *Surg. Neurol.* 1997; 48: 501-506.

63. Torp S.H., Lindboe C.F., Granli U.S. i wsp.: Comparative investigation of proliferation markers and their prognostic relevance in human meningiomas. *Clin. Neuropathol.* 2001; 20: 190-195.
64. Torp S.H., Lindboe C.F., Grønberg B.H. i wsp.: Prognostic significance of Ki-67/MIB-1 proliferation index in meningiomas. *Clin. Neuropathol.* 2005; 24: 170-174.
65. Hall P.A., Coates P.J.: Assessment of cell proliferation in pathology – what next? *Histopathology* 1995; 26: 105-112.
66. Brown D.C., Gatter K.C.: Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 1990; 17: 489-503.
67. Quinn C.M., Wright N.A.: The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic variables. *J. Pathol.* 1990; 160: 93-102.
68. Abry E., Thomassen L.Ø., Salvesen Ø.O., Torp S.H.: The significance of Ki-67/MIB-1 labeling index in human meningiomas: a literature study. *Pathol. Res. Pract.* 2010; 206: 810-815.
69. Roser F., Samii M., Ostertag H., Bellinzona M.: The Ki-67 proliferation antigen in meningiomas. Experience in 600 cases. *Acta Neurochir. (Wien)* 2004; 146: 37-44; discussion 44.
70. Takahashi J.A., Ueba T., Hashimoto N. i wsp.: The combination of mitotic and Ki-67 indices as a useful method for predicting short-term recurrence of meningiomas. *Surg. Neurol.* 2004; 61: 149-155; discussion 155-156.
71. Vankalakunti M., Vasishta R.K., Das Radotra B., Khosla V.K.: MIB-1 immunolabeling: a valuable marker in prediction of benign recurring meningiomas. *Neuropathology* 2007; 27: 407-412.
72. Kordek R.: Ocena aktywności proliferacyjnej nowotworów pochodzenia glejowego. W: Mossakowski M.J., Liberski P.P. (red.): Guzy układu nerwowego. Ossolineum, Wrocław – Warszawa – Kraków 1997: 41-44.
73. Kros J.M., Hop W.C., Godschalk J.J., Krishnadath K.K.: Prognostic value of the proliferation-related antigen Ki-67 in oligodendrogliomas. *Cancer* 1996; 78: 1107-1113.
74. Sawhney N., Hall P.A.: Ki-67 structure, function, and new antibodies. *J. Pathol.* 1992; 168: 161-162.
75. Lanzafame S., Torrisi A., Barbagallo G. i wsp.: Correlation between histological grade, MIB-1, p53, and recurrence in 69 completely resected primary intracranial meningiomas with a 6 year mean follow-up. *Pathol. Res. Pract.* 2000; 196: 483-488.
76. Maes L., Kalala J.P., Cornelissen M., De Ridder L.: PCNA, Ki-67 and hTERT in residual benign meningiomas. *In Vivo* 2006; 20: 271-275.
77. Striepecke E., Handt S., Weis J. i wsp.: Correlation of histology, cytogenetics and proliferation fraction (Ki-67 and PCNA) quantitated by image analysis in meningiomas. *Pathol. Res. Pract.* 1996; 192: 816-824.
78. Travali S., Ku D.H., Rizzo M.G. i wsp.: Structure of the human gene for the proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 7466-7472.
79. Kordek R., Biernat W., Alwasiak J., Liberski P.P.: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 immunopositivity in human astrocytic tumours. *Acta Neurochir. (Wien)* 1996; 138: 509-512; discussion 513.
80. McCormick D., Hall P.A.: The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology* 1992; 21: 591-594.
81. Taylor C.R., Shi S.R., Chaiwun B. i wsp.: Strategies for improving the immunohistochemical staining of various intranuclear prognostic markers in formalin-paraffin sections: androgen receptor, estrogen receptor, progesterone receptor, p53 protein, proliferating cell nuclear antigen, and Ki-67 antigen revealed by antigen retrieval techniques. *Hum. Pathol.* 1994; 25: 263-270.
82. Louis D.N., Edgerton S., Thor A.D., Hedley-Whyte E.T.: Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 immunohistochemistry in brain tumors: a comparative study. *Acta Neuropathol.* 1991; 81: 675-679.
83. Karamitopoulou E., Perentes E., Diamantis I., Maraziotis T.: Ki-67 immunoreactivity in human central nervous system tumors: a study with MIB 1 monoclonal antibody on archival material. *Acta Neuropathol.* 1994; 87: 47-54.
84. Khoshyomn S., Maier H., Morimura T. i wsp.: Immunostaining for proliferating cell nuclear antigen: its role in determination of proliferation in routinely processed human brain tumor specimens. *Acta Neuropathol.* 1993; 86: 582-589.
85. Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K. (red.): WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. International Agency for Research on Cancer, Lyon 2007.
86. Yu S.Q., Wang J.S., Ji N. i wsp.: Clinical characteristics and therapeutic strategies of atypical meningioma. *Chin. Med. J. (Engl.)* 2011; 124: 1094-1096.
87. Sughrue M.E., Kane A.J., Shangari G. i wsp.: The relevance of Simpson Grade I and II resection in modern neurosurgical treatment of World Health Organization Grade I meningiomas. *J. Neurosurg.* 2010; 113: 1029-1035.
88. Heleniak M.: Zależność czasu przeżycia chorych z glejakiem wielopostaciowym od stopnia resekcji. Praca doktorska. Promotor: Prof. dr hab. n. med. Marek Zawirski. Klinika Neurochirurgii i Onkologii Układu Nerwowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Łódź 2011: 34-45.
89. Nakaya K., Chernov M., Kasuya H. i wsp.: Risk factors for regrowth of intracranial meningiomas after gamma knife radiosurgery: importance of the histopathological grade and MIB-1 index. *Minim. Invasive Neurosurg.* 2009; 52: 216-221.
90. Aghi M.K., Carter B.S., Cosgrove G.R. i wsp.: Long-term recurrence rates of atypical meningiomas after gross total resection with or without postoperative adjuvant radiation. *Neurosurgery* 2009; 64: 56-60; discussion 60.
91. Adegbite A.B., Khan M.I., Paine K.W., Tan L.K.: The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J. Neurosurg.* 1983; 58: 51-56.
92. Abdelzaher E., El-Gendi S.M., Yehya A., Gowil A.G.: Recurrence of benign meningiomas: predictive value of proliferative index, BCL2, p53, hormonal receptors and HER2 expression. *Br. J. Neurosurg.* 2011; 25: 707-713.
93. Maiuri F., De Caro M.B., Esposito F. i wsp.: Recurrences of meningiomas: predictive value of pathological features and hormonal and growth factors. *J. Neurooncol.* 2007; 82: 63-68.
94. Ozen O., Demirhan B., Altinörs N.: Correlation between histological grade and MIB-1 and p53 immunoreactivity in meningiomas. *Clin. Neuropathol.* 2005; 24: 219-224.
95. Tyagi A., Chakrabarty A., Franks A.: MIB1 proliferation index in meningiomas: does it predict recurrence? A clinicopathological study. *Br. J. Neurosurg.* 2004; 18: 357-361.
96. Abramovich C.M., Prayson R.A.: MIB-1 labeling indices in benign, aggressive, and malignant meningiomas: a study of 90 tumors. *Hum. Pathol.* 1998; 29: 1420-1427.
97. Yang S.Y., Park C.K., Park S.H. i wsp.: Atypical and anaplastic meningiomas: prognostic implications of clinicopathological features. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2008; 79: 574-580.
98. Nakasu S., Fukami T., Jito J., Nozaki K.: Recurrence and regrowth of benign meningiomas. *Brain Tumor Pathol.* 2009; 26: 69-72.
99. Nakasu S., Li D.H., Okabe H. i wsp.: Significance of MIB-1 staining indices in meningiomas: comparison of two counting methods. *Am. J. Surg. Pathol.* 2001; 25: 472-478.
100. Kim Y.J., Ketter R., Henn W. i wsp.: Histopathologic indicators of recurrence in meningiomas: correlation with clinical and genetic parameters. *Virchows Arch.* 2006; 449: 529-538.

101. Perry A., Stafford S.L., Scheithauer B.W. i wsp.: Meningioma grading: an analysis of histologic parameters. *Am. J. Surg. Pathol.* 1997; 21: 1455-1465.
102. Schiffer D., Ghimenti C., Fiano V.: Absence of histological signs of tumor progression in recurrences of completely resected meningiomas. *J. Neurooncol.* 2005; 73: 125-130.
103. Akyildiz E.U., Oz B., Comunoglu N., Aki H.: The relationship between histomorphological characteristics and Ki-67 proliferation index in meningiomas. *Bratisl. Lek. Listy* 2010; 111: 505-509.
104. Willis J., Smith C., Ironside J.W. i wsp.: The accuracy of meningioma grading: a 10-year retrospective audit. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2005; 31: 141-149.
105. Ho D.M., Hsu C.Y., Ting L.T., Chiang H.: Histopathology and MIB-1 labeling index predicted recurrence of meningiomas: a proposal of diagnostic criteria for patients with atypical meningioma. *Cancer* 2002; 94: 1538-1547.
106. Moradi A., Semnani V., Djam H. i wsp.: Pathodiagnostic parameters for meningioma grading. *J. Clin. Neurosci.* 2008; 15: 1370-1375.
107. de la Monte S.M., Flickinger J., Linggood R.M.: Histopathologic features predicting recurrence of meningiomas following subtotal resection. *Am. J. Surg. Pathol.* 1986; 10: 836-843.
108. McLean C.A., Jolley D., Cukier E. i wsp.: Atypical and malignant meningiomas: importance of micronecrosis as a prognostic indicator. *Histopathology.* 1993; 23: 349-353.

Zasady prenumeraty kwartalnika „Aktualności Neurologiczne”

1. Prenumeratę można rozpocząć od dowolnego numeru pisma. Prenumerujący otrzyma zamówione numery kwartalnika pocztą na podany adres.
2. Pojedynczy egzemplarz kwartalnika kosztuje 25 zł. Przy zamówieniu rocznej prenumeraty (4 kolejne numery) koszt całorocznej prenumeraty wynosi 80 zł.
3. Istnieje możliwość zamówienia numerów archiwalnych (do wyczerpania nakładu). Cena numeru archiwalnego – 25 zł.
4. Zamówienie można złożyć:
 - Wypełniając załączony blankiet i dokonując wpłaty w banku lub na poczcie. Prosimy o podanie dokładnych danych imiennych i adresowych.
 - Dokonując przelewu z własnego konta bankowego (ROR) – wpłaty należy kierować na konto:
Medical Communications Sp. z o.o., ul. Powsińska 34, 02-903 Warszawa
Deutsche Bank PBC SA
42 1910 1048 2215 9954 5473 0001
W tytule przelewu proszę wpisać: „Prenumerata AN”.
 - Drogą mailową: redakcja@neurologia.com.pl.
 - Telefonicznie lub faksem: tel.: 22 651 97 83, faks: 22 842 53 63.
 - Wypełniając formularz prenumeraty zamieszczony na stronie www.neurologia.com.pl.
5. Zamawiający, którzy chcą otrzymać fakturę VAT, proszeni są o kontakt z redakcją.