

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

VLADIMIR S. MIJAJLOVIĆ

ISPITIVANJE ULOGE SENESCENCIJE I  
ELEMENTATA *HEDGEHOG* SIGNALNOG PUTA  
U MENINGIOMIMA

DOKTORSKA DISERTACIJA



Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

VLADIMIR S. MIJALOVIĆ

INVESTIGATING THE ROLE OF SENESCENCE  
AND *HEDGEHOG* SIGNALING PATHWAY IN  
MENINGIOMAS

DOCTORAL DISSERTATION



Belgrade, 2024

## **Mentori**

**Prof. dr Silvio De Luka**

Institut za patološku fiziologiju „Ljubodrag Buba Mihailović“  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

**Prof. dr Emilija Manojlović Gačić**

Institut za patologiju „Prof. dr Đorđe Joannović“  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu



## **Članovi komisije za odbranu doktorske disertacije**

**Prof. dr Svetislav Tatić**

Institut za patologiju „Prof. dr Đorđe Joannović“  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

**Prof. dr Jelena Nešović Ostojić**

Institut za patološku fiziologiju „Ljubodrag Buba Mihailović“  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

**Prof. dr Marina Nikitović**

Institut za onkologiju i radiologiju Srbije  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

**Prof. dr Vladimir Baščarević**

Klinika za neurohirurgiju, Univerzitetski klinički centar Srbije  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

**Prof. dr Ivan Čapo**

Zavod za histologiju i embriologiju  
Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu

## **Zahvalnica**

*Zahvaljujem se mentoru prof. dr Silvijju De Luki i mentorki prof. dr Emiliji Manojlović Gačić na ukazanom poverenju i želji da ostvare saradnju sa mnom, kao i na odvojenom vremenu, dragocenim savetima, glasu razuma u momentima kada moj nije bio dovoljan i bezrezervnoj podršci koja mi je neizmerno značila tokom mog naučnoistraživačkog puta i procesa izrade doktorske disertacije.*

*Hvala osoblju Klinike za Neurohirurgiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije, kolegenici doc. dr Rosandi Ilić, neurohiruškinji i kolegama, patolozima, doktoru Savi Raičeviću i doktoru Aleksandru Kostiću na gotoprinstvu i prijatnim uslovima za rad, a sve u cilju dobavljanja patohistološkog materijala i kliničkih podataka u svrhu izrade doktorske disertacije.*

*Neizmerno hvala, mom, pre svega prijatelju i kolegi doktoru Marku Mileru na bezuslovnoj pomoći, korisnim savetima i udelu u pisanju publikacija i doktorske disertacije.*

*Hvala veliko direktoru departmana u kome radim – Službe za patologiju, patohistologiju i medicinsku citologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije doc. dr Dejanu Rašiću na susretljivosti i podršci tokom moje čitave dosadašnje profesionalne karijere.*

*Direktoru Klinike za urologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije prof. dr Zoranu Džamiću neizmerno hvala na ukazanom poverenju, razumevanju, strpljenju i uvek nesebično odvojenom vremenu, od prvog momenta mog profesionalnog angažmana na odeljenju urološke i nefrološke patologije klinike za urologiju.*

*Moja doktorska disertacija tehnički ne bi uspela bez podrške Instituta za patologiju Prof. dr Đorđe Joannović Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na čelu sa prof. dr Sanjom Radojević Škodrić i prof. dr Sofijom Glumac, na čemu sam im veoma zahvalan.*

*Veliku zahvalnost dugujem kolegama sa kojima radim, Dušici Nikolić, Maji Vasilić, Mirjani Zonić i Aleksandru Ušendiću, na podršci i razumevanju koje su mi uvek pružali, naročito u momentima kada pacijenti i svakodnevne poslovne obaveze nisu smeli da "trpe" zarad nauke.*

*Svim mojim prijateljima, posebno kolegi patologu doktoru Nenadu Miladinoviću i vrednom i talentovanom studentu pete godine medicine Urošu Jovanoviću hvala što su bili i ostali uz mene kada god je to bilo potrebno, pružili mi neizmernu pomoć i podršku, iako me je u nekim momentima, priznajem, teško bilo „nositi na plećima“.*

*Najzahvalniji VAMA, mojim anđelima čuvaraima, roditeljima ♥, bratu ♥ i mom Radovanu ♥, bez čije ljubavi, podrške u nekada vrlo teškim trenucima i vetra u leđa ja danas ne bih ispisivao ove stranice svog života.*

*Ovaj rad je DAR svim dobrim ljudima i onima koji se tako osećaju, kolegama koji vole svoj posao, iskonski uživaju u istom, obavljaju ga etički i profesionalno, a nadasve onima koji svoje znanje i veštine nesebično DARuju mlađim kolegama i kolegenicama, obasjavajući im nekada težak i trnovit put ka cilju, kojim smo i mi nekada koračali.*

*Takođe zahvaljujem svima koji su imali udela u istraživanju i publikacijama u okviru ove doktorske teze zbog doprinosa:*

*Konceptualizaciji studije: prof. dr Emilija Manojlović Gačić, prof. dr Silvio De Luka*

*Prikupljanju podataka: doc. dr Rosanda Ilić, doktor Savo Raičević, doktor Aleksandar Kostić*

*Validaciji podataka: prof. dr Emilija Manojlović Gačić, doc. dr Rosanda Ilić, doktor Savo Raičević, doktor Aleksandar Kostić*

*Formalnoj analizi: prof. dr Emilija Manojlović Gačić, doktor Savo Raičević, doktor Aleksandar Kostić*

*Istraživanju: prof. dr Emilija Manojlović Gačić, prof. dr Silvio De Luka*

*Metodologiji: prof. dr Emilija Manojlović Gačić, prof. dr Ivan Soldatović, prof. dr Duško Dunderović*

*Superviziji: prof. dr Silvio De Luka, doktor polimerne hemije Radovan Vukićević, doktor bioloških nauka Marko Miler*

*Vizuelizaciji rezultata: prof. dr Emilija Manojlović Gačić, prof. dr Silvio De Luka*

*Administraciji projekata: Univerzitetski Klinički centar Srbije, Institut za patologiju Prof. dr Đorđe Joannović – Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu*

*Pisanju radova – originalni nacrt: prof. dr Emilija Manojlović Gačić*

*Pisanju radova – recenzija i uređivanje: prof. dr Silvio De Luka, doktor bioloških nauka Marko Miler, doktor polimerne hemije Radovan Vukićević*

## SAŽETAK

### ISPITIVANJE ULOGE SENESCENCIJE I ELEMENATA *HEDGEHOG* SIGNALNOG PUTA U MENINGIOMIMA

**Uvod:** Meningiomi su većinom benigni tumori gradusa 1. Faktori koji utiču na progresiju meningioma u gradus 2 i 3 nisu potpuno razjašnjeni. Senescencija je prepoznata kao mehanizam koji bi mogao imati ulogu u inhibiciji maligne transformacije tumora. *Hedgehog* je evoluciono visoko konzervirani signalni put uključen u tumorigenezu brojnih organa. GLI molekuli su transkripcijski faktori i glavni efektori *Hedgehog* signalnog puta, dok je SUFU njihov glavni inhibitor.

**Materijal i metode:** Analizirano je 318 meningioma (178 meningioma gradusa 1, 133 meningioma gradusa 2 i 7 meningioma gradusa 3). Konstruisani su tkivni mikronizovi i tretirani imunohistohemijski, korišćenjem sledećih antitela: za detekciju senescencije korišćena su antitela SA- $\beta$ -GAL, p16 i p21; za detekciju aktivacije *Hedgehog* signalnog puta antitela GLI2, GLI3 i SUFU.

**Rezultati:** Uočena je pozitivna korelacija gradusa tumora sa ekspresijom p16 i SA- $\beta$ -GAL. Ekspresija oba markera je bila viša u meningiomima gradusa 2 u poređenju sa meningiomima gradusa 1. Pozitivna korelacija između SA- $\beta$ -GAL sa p16 i p21 je uočena u čitavoj kohorti. Kod meningioma gradusa 2 pozitivna korelacija je uočena samo između SA- $\beta$ -GAL i p16. Analiziranjem *Hedgehog* signalnog puta u meningiomima, GLI3 je prepoznat kao marker koji je u pozitivnoj korelaciji sa progresijom gradusa meningioma, mitotičkom aktivnošću i lokalizacijom meningioma, i češće je eksprimiran kod meningioma muškaraca.

**Zaključci:** Naši rezultati ukazuju na aktivaciju senescencije kod meningioma gradusa 2 kao mogući mehanizam inhibicije progresije gradusa tumora. GLI3 je prepoznat kao faktor koji potencijalno doprinosi progresiji gradusa meningioma. Naši rezultati sugerišu na dalja istraživanja u smeru primene senolitičke anti-GLI terapije kod meningioma.

**Ključne reči:** Meningiomi, senescencija, *Hedgehog* signalni put, p16, SA- $\beta$ -GAL, GLI3

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Biologija tumora i oksidativna oboljenja

**UDK broj:**

## ABSTRACT

### INVESTIGATING THE ROLE OF SENESCENCE AND *HEDGEHOG* SIGNALING PATHWAY IN MENINGIOMAS

**Introduction:** Meningiomas are mostly benign grade 1 tumors. The factors that influence the progression of meningiomas to grades 2 and 3 have not been clarified. Senescence has been recognized as a mechanism that could play a role in inhibiting the malignant transformation of tumors. *Hedgehog* signaling pathway is an evolutionarily highly conserved signaling pathway involved in the tumorigenesis of numerous organs. GLI molecules are transcription factors and main effectors of the *Hedgehog* signaling pathway, while SUFU is their main inhibitor.

**Material and methods:** 318 meningiomas were analyzed (178 meningiomas grade 1, meningiomas 133 grade 2 and 7 meningiomas grade 3). Tissue microarrays were constructed and stained immunohistochemically, using the following antibodies: for senescence detection SA- $\beta$ -GAL, p16 and p21; for the detection of activation of the *Hedgehog* signaling pathway GLI2, GLI3 and SUFU.

**Results:** A positive correlation of tumor grade with the expression of p16 and SA- $\beta$ -GAL was observed. Expression of both markers was higher in grade 2 meningiomas compared to grade 1 meningiomas. A positive correlation of SA- $\beta$ -GAL expression with p16 and p21 was observed in the entire cohort. In grade 2 meningioma, a positive correlation was observed only between SA- $\beta$ -GAL and p16. By analyzing the *Hedgehog* signaling pathway in meningiomas, GLI3 was recognized as a marker that is positively correlated with grade progression, mitotic activity and meningioma localization, and was more frequently expressed present in male meningiomas.

**Conclusions:** Our results indicate activation of senescence in grade 2 meningiomas as a possible mechanism of inhibition of tumor grade progression. GLI3 is recognized as a factor potentially contributing to meningioma grade progression. Our results suggest further research in the direction of the application of senolytic anti-GLI therapy in meningiomas.

**Key words:** Meningiomas, senescence, Hedgehog signaling pathway, p16, SA- $\beta$ -GAL, GLI3

**Scientific field:** Medicine

**Scientific subfield:** Biology of tumors and oxidative diseases

**UDK number:**

## Sadržaj

1. Uvod .....	1
1.1. Meningiomi, od embriologije do patologije .....	1
1.2. Epidemiologija meningioma .....	1
1.3. Histološka klasifikacija meningioma .....	2
1.4. Histomorfologija meningioma .....	2
1.5. Primena i značaj imunohistohemije u dijagnozi meningioma .....	10
1.6. Senescencija .....	12
1.7. <i>Hedgehog</i> signalni put .....	13
2. Ciljevi istraživanja .....	14
3. Materijal i metode .....	15
3.1. Dizajn istraživanja i ispitanici .....	15
3.2. Etičko odobrenje za sprovođenje istraživanja .....	16
3.3. Tkivni uzorci i konstrukcija tkivnih mikronizova .....	16
3.4. Imunohistohemijska analiza .....	16
3.5. Standardizacija imunohistohemijskih analiza .....	17
3.6. Statistička analiza podataka .....	18
4. Rezultati .....	19
4.1. Opšte karakteristike pacijenata u studiji .....	19
4.2. Starost i pol .....	21
4.3. Analiza mitotskog indeksa (broja) .....	22
4.4. Imunohistohemijska ekspresija markera senescencije .....	22
4.5. Povezanost ekspresije p16 markera senescencije sa polom i starošću pacijenata, gradusom, lokalizacijom, kao i mitotskom aktivnošću meningioma .....	26
4.6. Povezanost ekspresije p21 markera senescencije sa polom i starošću pacijenata, gradusom, lokalizacijom, kao i mitotskom aktivnošću meningioma .....	28
4.7. Povezanost ekspresije SA- $\beta$ -GAL markera senescencije sa polom i starošću pacijenata, gradusom, lokalizacijom, kao i mitotskom aktivnošću meningioma .....	29
4.8. Poređenje ekspresije markera senescencije između različitih histoloških podtipova meningioma .....	31
4.9. Korelacije između markera senescencije .....	33
4.10. Imunohistohemijska ekspresija markera <i>Hedgehog</i> signalnog puta .....	34
4.11. Povezanost ekspresije GLI3 <i>Hedgehog</i> signalnog puta sa polom i starošću pacijenata, gradusom, lokalizacijom, kao i mitotskom aktivnošću meningioma .....	37
4.12. Povezanost ekspresije GLI2 <i>Hedgehog</i> signalnog puta sa polom i starošću pacijenata, gradusom, lokalizacijom, kao i mitotskom aktivnošću meningioma .....	39
4.13. Povezanost ekspresije SUFU <i>Hedgehog</i> signalnog puta sa polom i starošću pacijenata, gradusom, lokalizacijom, kao i mitotskom aktivnošću meningioma .....	41



4.14. Poređenje ekspresije markera <i>Hedgehog</i> signalnog puta između različitih histoloških podtipova meningioma .....	43
4.15. Korelacije između markera <i>Hedgehog</i> signalnog puta .....	46
5. Diskusija .....	47
6. Zaključci .....	56
7. Literatura.....	58

# 1. Uvod

## 1.1. Meningiomi, od embriologije do patologije

Meningiomi su najčešći primarni tumori centralnog nervnog sistema (eng. central nervous system, CNS). Obično su to benigni, sporo rastući tumori za koje se smatra da nastaju iz meningotelnih (arahnoidnih) ćelija, posebno onih meningotelnih ćelija koje vode poreklo od arahnoidnih granulacija/resica (lat. villi arachnoidales), i predstavljaju deo paučinaste moždane ovojnice (lat. arachnoidea) koja pokriva mozak i kičmenu moždinu (1,2). Meningotelne ćelije predstavljaju ćelijsku komponentu meke moždane ovojnice (lat. pia matter), paučinaste moždane ovojnice, kao i trabekula i septi subarahnoidnog prostora (3). One čine jednoslojni omotač moždanih ovojnica i povezane su preko međućelijskih veza/mostova (lat. junctiones cellulares), i to tesnih/čvrstih spojeva (lat. zonula ocludens), zatim komunikacijskih veza tj. pukotinastih spojeva kanala (lat. nexus) i dezmozoma (lat. macula adherens) obezbeđujući na taj način komunikaciju između nervnog tkiva i cerebrospinalne tečnosti (eng. cerebrospinal fluid, CSF) (4). Osim što obezbeđuju fizičku barijeru CNS-a i štite ga od mehaničkih oštećenja, meningotelne ćelije igraju i veoma značajnu ulogu u imunološkim procesima i održavanju homeostaze i odbrane domaćina unutar zatvorenog sistema CNS-a i cerebrospinalne tečnosti. Putem sekrecije proinflammatoryh i antiinflammatoryh hemokina i citokina, meningotelne ćelije su u stanju da iniciraju i održavaju i/ili obustave imunološke reakcije. Pored pomenute uloge u imunonadzoru, meningotelne ćelije takođe štite CNS od različitih infekcija i neurodegeneracije putem fagocitoze bakterija i apoptotičkih tela, kao i makropinocitoze neurotoksičnih peptida i proteina (5–7). Proces embriogeneze moždanih ovojnica se dešava duž ventralno-dorzalne ose CNS-a, a nakon embrionalnog zatvaranja neuralne cevi (8,9). Nakon formiranja primarnog sloja moždanih ovojnica koje pokrivaju novoformirani CNS, progresivna diferencijacija meningealnih slojeva dovodi do nastanka raznovrsnih i kompleksnih regionalnih populacija ćelija, obeleženih različitim profilima ekspresije gena i sledstvenim biološkim ulogama (10). Moždane ovojnice su stoga važan posrednik u razvoju mozga i lobanje, luče lokalne faktore koji pokreću deobu neurona, migraciju i sazrevanje tokom embrionalnog razvoja CNS-a (11,12). Intrakranijalno, ćelijsko poreklo moždanih ovojnica varira u zavisnosti od lokalizacije, pa tako dorzalni i zadnji regioni moždanih ovojnica potiču iz mezoderma, dok ventralni regioni (uključujući veći deo baze lobanje i prednjeg mozga) potiču od migrirajućih populacija ćelija nervnog grebena (13). Ovo različito embrionalno poreklo moždanih ovojnica može objasniti različite modalitete i tipove klasifikacije meningioma koji se dovode u vezu sa lokalizacijom meningioma, a pored toga utiče i na preovlađujuće histološke podtipove meningioma koji nastaju iz ćelija moždanih ovojnica, kao i na distribuciju rekurentnih somatskih mutacija. Ćelije arahnoidnih granulacija čine spoljašnji sloj paučinaste moždane ovojnice i arahnoidnih resica, i citološki su vrlo slične sa ćelijama meningioma, što opet ukazuje na verovatno porekla meningioma. Meningiomi su tumori moždanih ovojnica, ali se takođe retko javljaju i kao primarni tumori u komorama CNS-a i ekstrakranijalnim organima kao što su pluća, verovatno vodeći poreklo od aberantnih meningotelnih ćelija (14–16).

## 1.2. Epidemiologija meningioma

Meningiomi čine oko 40,8 % svih primarnih tumora mozga i 56,2 % „nemalignih“ primarnih tumora mozga. Stope incidencije nemalignih meningioma su najviše među svima tipovima tumora CNS-a. Incidencija meningioma se povećava sa godinama, pri čemu je srednja starost pri postavljanju dijagnoze 66 godina. Ove stope imaju tendenciju rasta i kontinulano se povećavaju nakon starosti od 65 godina i ponovo posle 85. godine života. Stope incidencije nemalignih meningioma prilagođene prethodno pomenutim starosnim parametrima takođe nastavljaju svoj rast među različitim polovima, etničkim grupama i rasama. Meningiomi čine najveći udeo intraduralnih tumora kičme kod pacijenata

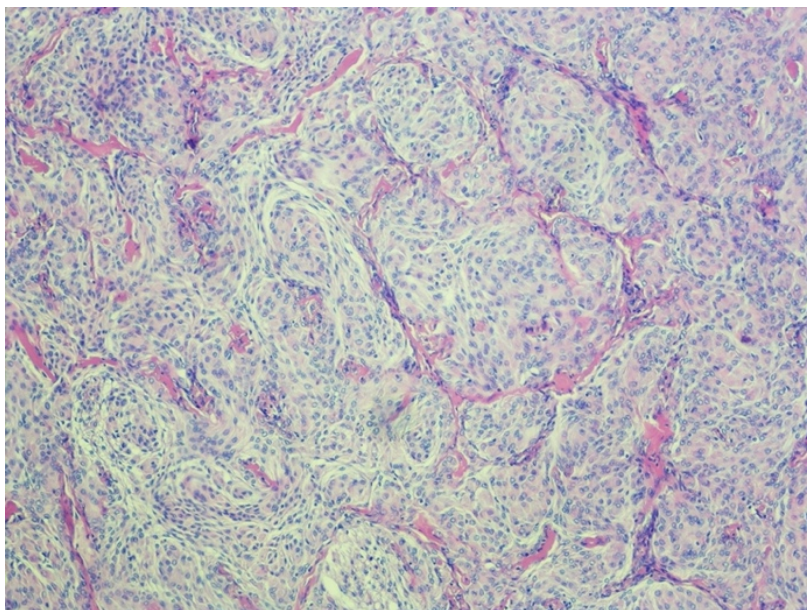
uzrasta od 20 godina i starijih, iako spinalno lokalizovani meningiomi predstavljaju svega 4,2 % svih dijagnostikovanih meningioma. Meningiomi su češći kod žena, sa odnosom stope incidencije žena u odnosu na muškarce od 2,33 i 1,12 (2,17–20). Deca najčešće imaju meningiome višeg gradusa sa većim rizikom od recidiva, ali je niži ukupan mortalitet od benignih i malignih meningioma dečijeg uzrasta. Benigni i maligni meningiomi su takođe češći kod crne u odnosu na belu rasu, uz stopu incidencije 1,52 i 1,18. Zanimljivo je da su na autopsijama meningiomi obično akcidentalni nalaz, kod 2-3 % obdukovanih (21–24).

### 1.3. Histološka klasifikacija meningioma

Histološka klasifikacija meningioma se menjala paralelno sa novim saznanjima, pre svega vezanih za molekularne karakteristike i genetiku meningioma. Prema aktuelnoj klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2021 godine meningiomi su podeljeni u tri histološka gradusa, gradus 1, gradus 2 i gradus 3. Gradiranje meningioma se zasniva na njihovim histološkim karakteristikama, kao i na osnovu pripadanja pojedinim tipovima meningioma (koji će u daljem tekstu detaljno biti objašnjeni). Tranzicionalni, meningotelijalni, psamomatozni, fibrozni, sekretorni, angiomatozni, mikrocistični, limfocitima bogat, metaplastični, atipični, svetloćelijski, hordoidni, rabdoidni, papilarni i anaplastični, 15 su različitih podtipova meningioma. U meningiome gradusa 1 spadaju tranzicionalni, meningotelijalni, psamomatozni, fibrozni, sekretorni, angiomatozni, mikrocistični, limfocitima bogat i metaplastični. U meningiome gradusa 2 spadaju atipični, svetloćelijski i hordoidni meningiomi. U meningiome gradusa 3 spadaju svi meningiomi koji ispunjavaju histološke kriterijume gradusa 3 (detaljno objašnjene dalje u tekstu) kao i sledeći histološki podtipovi: rabdoidni, papilarni i anaplastični meningiomi (18–20,25,26).

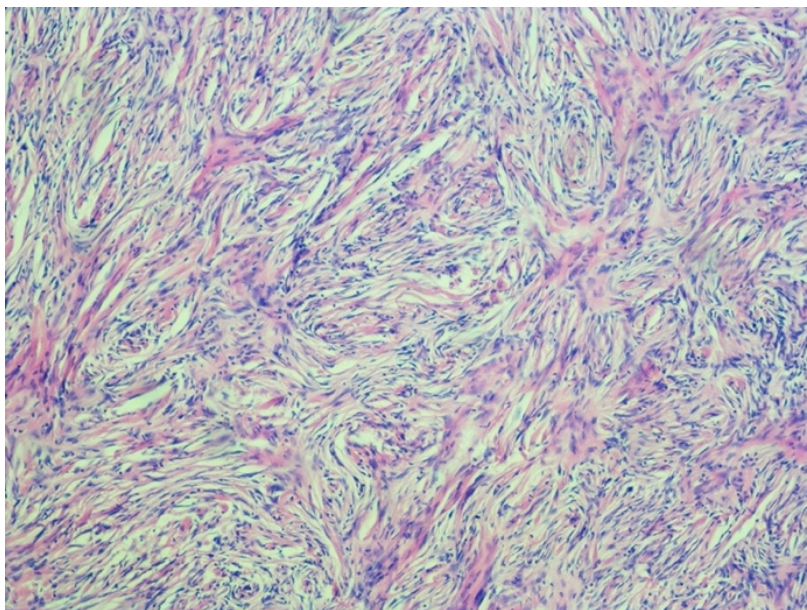
### 1.4. Histomorfologija meningioma

Meningotelijalni meningiom je podtip meningioma građen od ćelija epiteloidnog izgleda, nejasnih granica, koje formiraju sincicijalne lobuluse. Tumorske ćelije su monomorfne, bogate eozinofilne citoplazme. U jedrima pojedinih ćelija se uočavaju pseudoinkluzije. Formacije vrtloga i psamozna telašca se retko sreću (Ilustracija 1) (27).



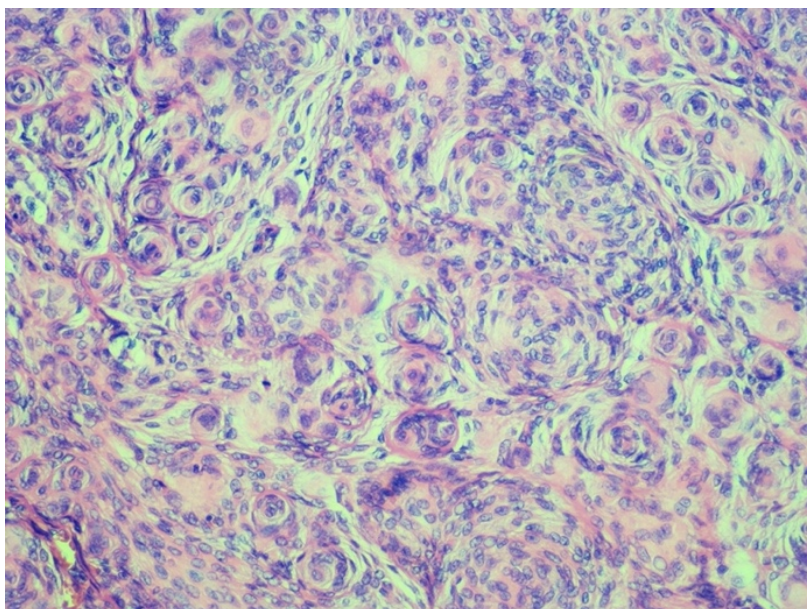
Ilustracija 1: Meningotelijalni meningiom, Hematoksilin i Eozin bojenje, uveličanje 10x

Fibrozni meningiom je građen od vretanastih ćelija, u paralelnom ili storiformnom aranžmanu. Između tumorskih ćelija se uočavaju brojna kolegana vlakna. Ovakva histološka slika neretko stvara diferencijalno-dijagnostičke dileme, zbog sličosti sa švanomom i solitarnim fibroznim tumorom. Pomenute diferencijalno-dijagnostičke poteškoće se rešavaju primenom imunohistohemije, o čemu će biti reči u jednom od narednih poglavlju (Ilustracija 2) (18–20,25,26).



Ilustracija 2: Fibrozni meningiom, Hematoksilin i Eozin bojenje, uveličanje 10x

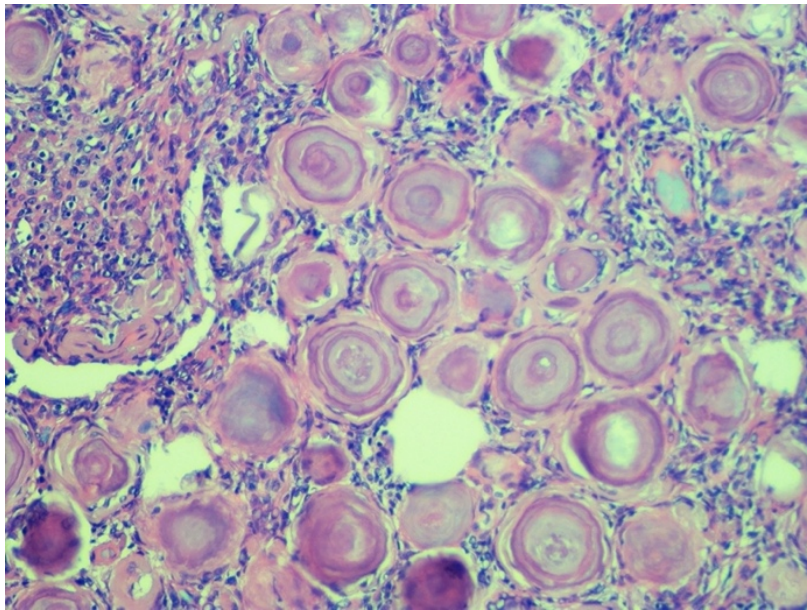
Tranzicionalni meningiom je jedan od najčešće dijagnostikovanih tipova meningioma, budući da predstavlja histomorfološku kombinaciju građe meningotelilajnog i fibroznog meningioma (odakle i potiče naziv „meningioma u tranziciji“) (Ilustracija 3) (18–20,25,26).



Ilustracija 3: Tranzicionalni meningiom, Hematoksilin i Eozin bojenje, uveličanje 20x

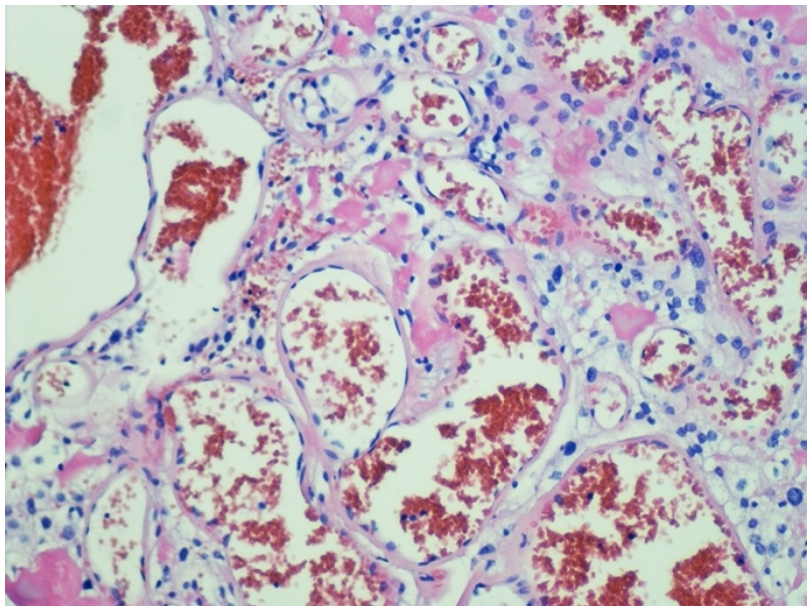
Psamomatozni meningiom je predominantno građen od brojnih psamoznih tealašaca. Psamozna telašca predstavljaju okruglaste, sferične kalcifikate, koji nekada mogu predstavljati problem prilikom histopatološke obrade materijala, a mogu se i palpirati prilikom makroskopskog pregleda i

uzorkovanja tkiva meningioma. Meningotelne ćelije mogu biti veoma retke u ovom tipu meningioma, što opet može predstavljati diferencijalno-dijagnostički izazov (Ilustracija 4) (18–20,25,26).



Ilustracija 4: Psamomatozni meningiom, Hematoksilin i Eozin bojenje, uveličanje 20x

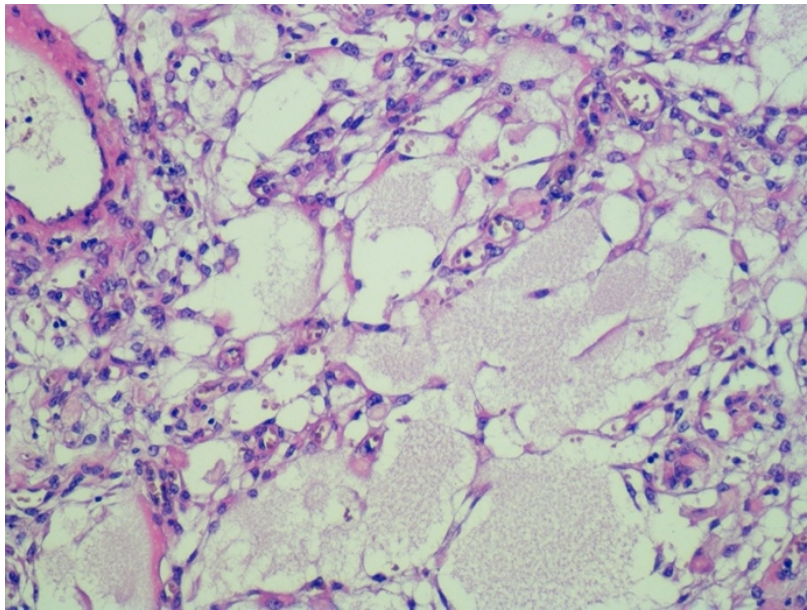
Angiomatozni meningiom je podtip meningioma, u kome dominiraju brojni vaskularni prostori, često hijalinizovanih zidova, između kojih se uočavaju meningotelne ćelije. Slično kao i kod psamomatoznog meningioma, meningotelne ćelije mogu biti veoma retke, što takođe predstavlja diferencijalno dijagnostički izazov. Sa druge strane, u zonama u kojima se uočavaju meningotelne ćelije, one su često miktocistično izmenjene, što takođe otežava identifikaciju i nameće diferencijalnu dijagnozu u pravcu mikrocističnog meningioma (Ilustracija 5) (28).



Ilustracija 5: Angiomatozni meningiom, Hematoksilin i Eozin bojenje, uveličanje 20x

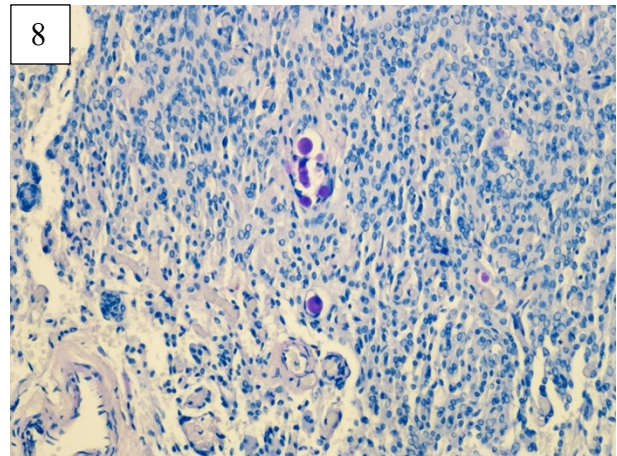
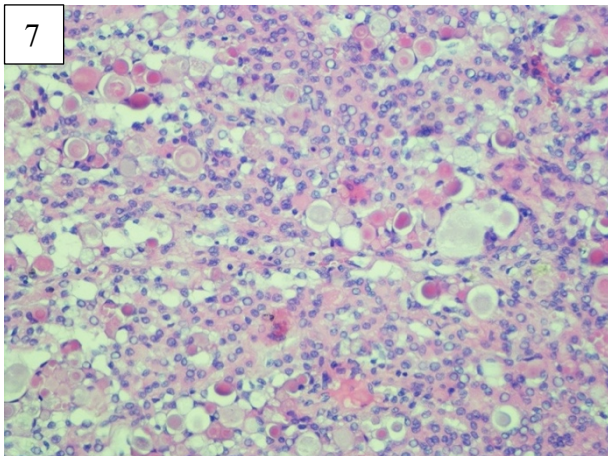
Mikrocistični meningiom je podtip meningioma sa brojnim mikrocistama u citoplazmi tumorskih ćelija. Cistična transformacija ćelija može biti veoma izražena, dajući tkivu histološki gledano

mrežast izgled. Kod mikrocističnih meningioma se može uočiti nuklearna atipija koja ne treba da pobuđuje sumnju na progresiju tumora u viši gradus (Ilustracija 6) (18–20,25,26).



Ilustracija 6: Mikrocistični meningiom, Hematoksilin i Eozin bojenje, uveličanje 20x

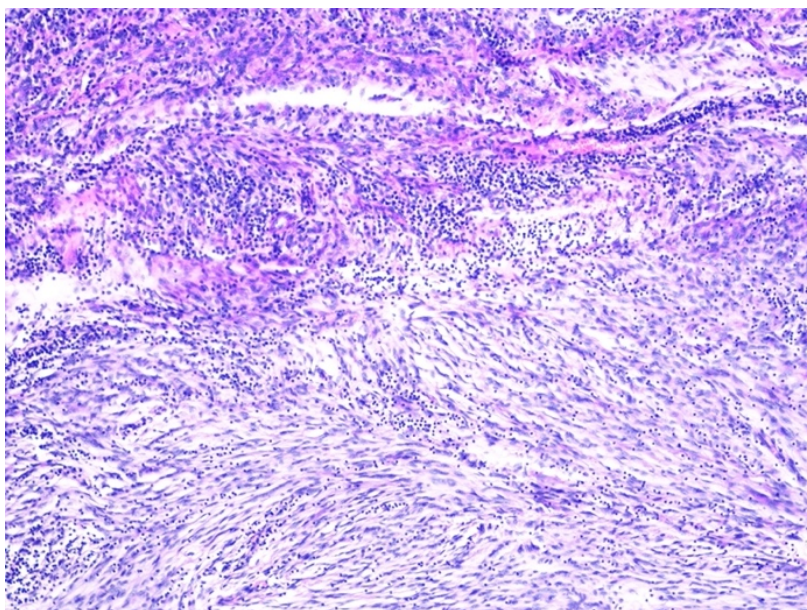
Sekretorni meningiom (Ilustracija 7) predstavlja podtip meningioma u kome se histološki uočavaju PAS (eng. periodic acid shiff, PAS) pozitivne globule (Ilustracija 8). Imunohistohemijski ove globule su pozitivne i na citokeratin (eng. cytokeratin, CKAE1/AE3) i karcino embrionalni antigen (eng. carcinoembryonic antigen, CEA) što može pobuditi diferencijalno-dijagnostičku dilemu o metastazi karcinoma, o čemu će više biti reči u poglavlju posvećenom imunohistohemijskim karakteristikama meningioma (29).



Ilustracija 7: Sekretorni meningiom, Hematoksilin i Eozin bojenje, uveličanje 20x

Ilustracija 8: Sekretorni meningiom, histochemijsko periodic acid shiff (PAS) bojenje, uveličanje 20x

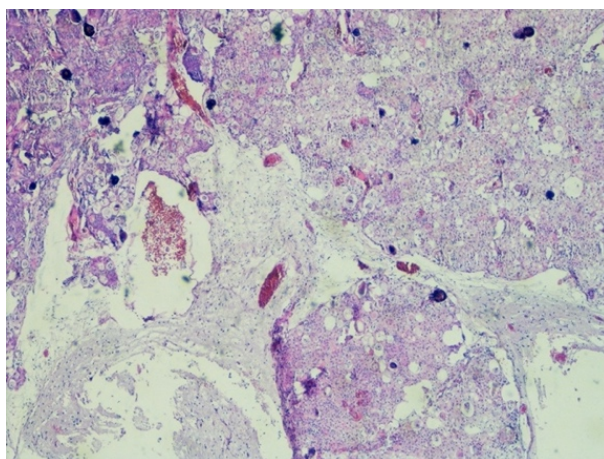
Limfocitima bogat meningiom je veoma redak podtip meningioma, čijom histološkom slikom dominira ekstenzivni mononuklearni zapaljenski infiltrat. Zapaljenskim infiltratom dominiraju makrofagi, limfociti su ređi, dok su plazmociti vrlo retki i pojedinačni. Kod ovog podtipa meningioma diferencijalno-dijagnostički uvek treba razmotriti limfoproliferativno oboljenje (Ilustracija 9) (30,31).



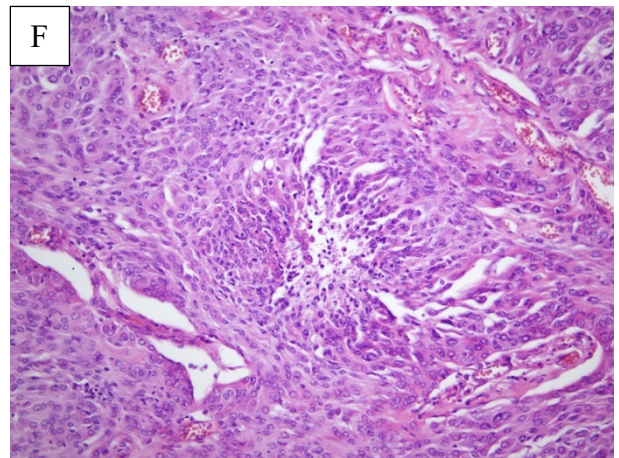
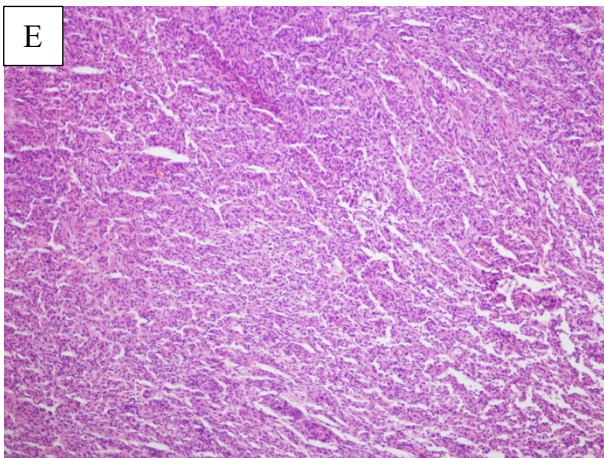
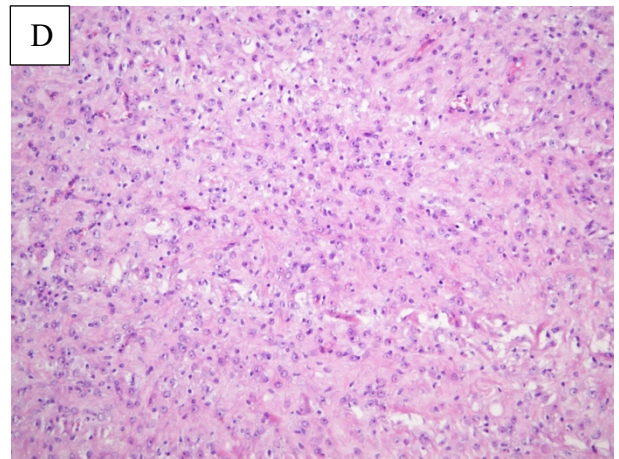
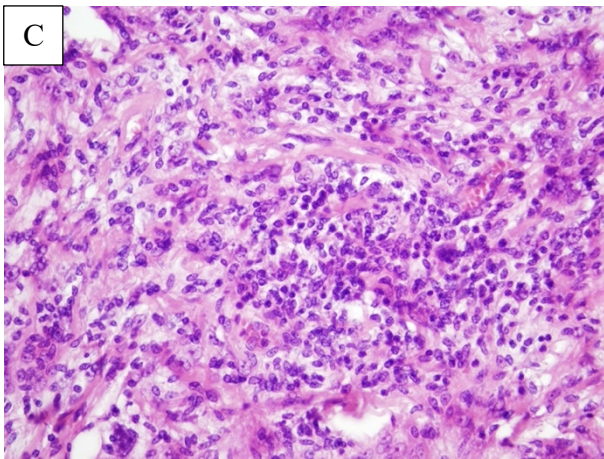
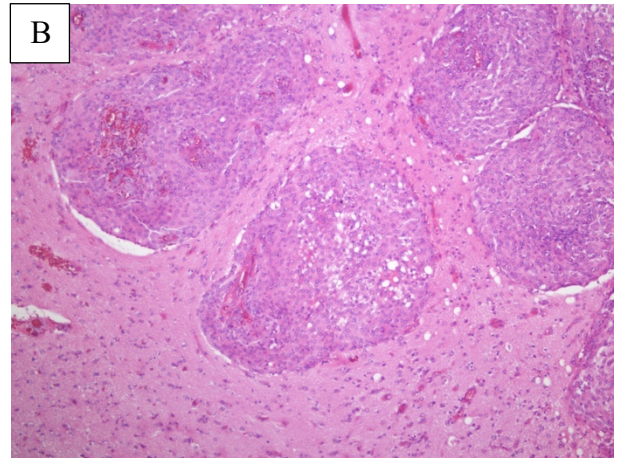
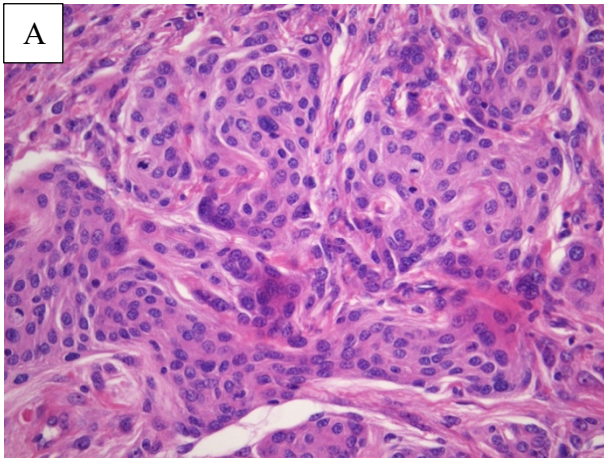
Ilustracija 9: Limfocitima bogat meningiom, Hematoksilin i Eozin bojenje, uveličanje 10x

Metaplastični meningiom histološki je okarakterisan fokalnom ili ekstenzivnom mezenhimalnom komponentom, koja može biti predstavljena koštanim, hrskavičavim, lipomatoznim ili miksoidnim tkivom, pojedinačno ili u kombinacijama. Prilikom dijagnostike ovog tipa meningioma neophodno je analizirati kompletno dostavljen tkivni materijal kako bi se izbegla diferencijalno-dijagnostička zamka i sledstvena dijagnostika mezenhimalnog tumora (18–20,25,26).

Atipični meningiom prema aktuelnim kriterijumima i klasifikaciji SZO predstavlja svaki od prethodno opisanih podtipova meningioma, u kome se uočavaju sledeći histološki elementi/kriterijumi tipični za histološki gradus 2 (Ilustracija 10). Ovi kriterijumi se dele na „major“ (kriterijume koji ako se nezavisno pojave ukazuju na gradus 2 meningioma) i „minor“ kriterijume (kriterijumi kojih mora biti minimum 3 od ukupno 5 za postavljanje dijagnoze atipičnog meningioma) (Ilustracija 11A-F). U major kriterijume spada mitotska aktivnost (Ilustracija 11A) predstavljena sa 4-19 mitoza na 10 uzastopno pregledanih polja velikog uveličanja (PVU) površine 0,16 mm<sup>2</sup> i invazija moždanog parenhima (Ilustracija 11B). U minor kriterijume spadaju povećana celularnost i fokusi tumora građeni od sitnih ćelija (11C ilustracija prikazuje oba prethodno pomenuta kriterijuma), prominenti nukleolusi (Ilustracija 11D), područja bestrukturnog rasta (Ilustracija 11E) i fokusi spontane tumorske nekroze (Ilustracija 11F) (32).



Ilustracija 10: Atipični meningiom, Hematoksilin i Eozin bojenje, uveličanje 20x

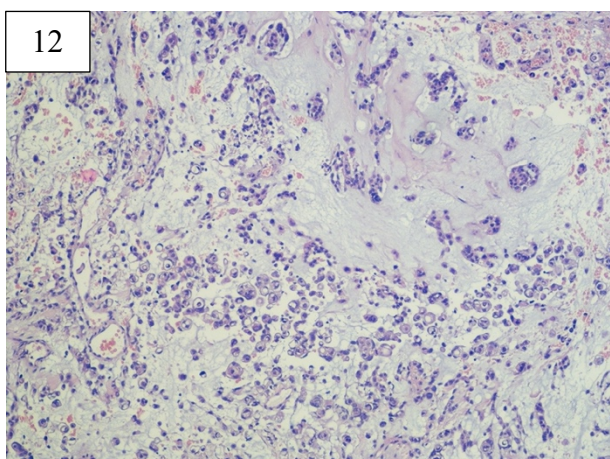


Ilustracija 11 (A-F): „Major“ i „minor“ kriterijumi. A) Povećana mitotska aktivnost, Hematoksilin i Eozin bojenje, uveličanje 40x. B) Invazija moždanog parenhima, Hematoksilin i Eozin bojenje, uveličanje 10x. C) u istom fokusu predstavljeni su povećana celularnost u meningiomu i fokusi građeni od sitnih ćelija, Hematoksilin i Eozin bojenje, uveličanje 40x. D) Prominentni nukleolusi, Hematoksilin i Eozin bojenje, uveličanje 40x. E) Područja bestrukturnog rasta, Hematoksilin i Eozin bojenje, uveličanje 40x. F) Fokusi spontane tumorske nekroze, Hematoksilin i Eozin bojenje, uveličanje 20x

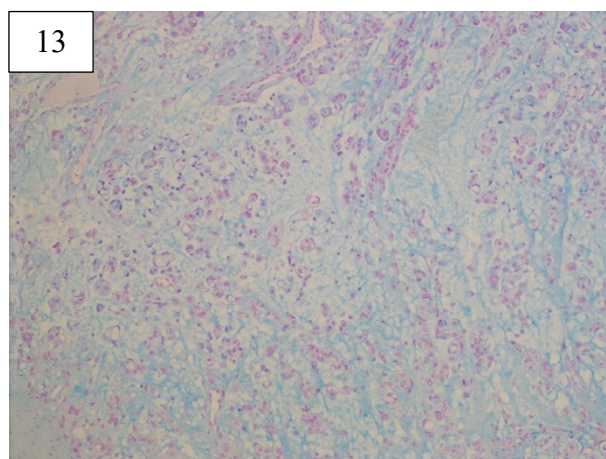
Hordoidni meningiom je podtip meningioma koji pripada histološkom gradusu 2 zbog svojih histoloških karakteristika, nezavisno od prisustva histoloških elemenata osobenih za atipični meningiom. Hordoidnom meningiomu je dodeljen histološki gradus 2 zbog tendencije ka agresivnom biološkom ponašanju. Histološki, kod hordoidnog meningioma tumorske ćelije su aranžirane u nizove epiteloidnih ćelija, koje su okružene mucinom bogatim matriksom. Ovaj podtip meningioma je dobio naziv zbog svoje histološke sličnosti sa hordomom, koga obavezno diferencijalno-



dijagnostički treba isključiti prilikom patohistološke dijagnostike ovog tipa meningioma (Ilustracija 12) i (Ilustracija 13) (33).

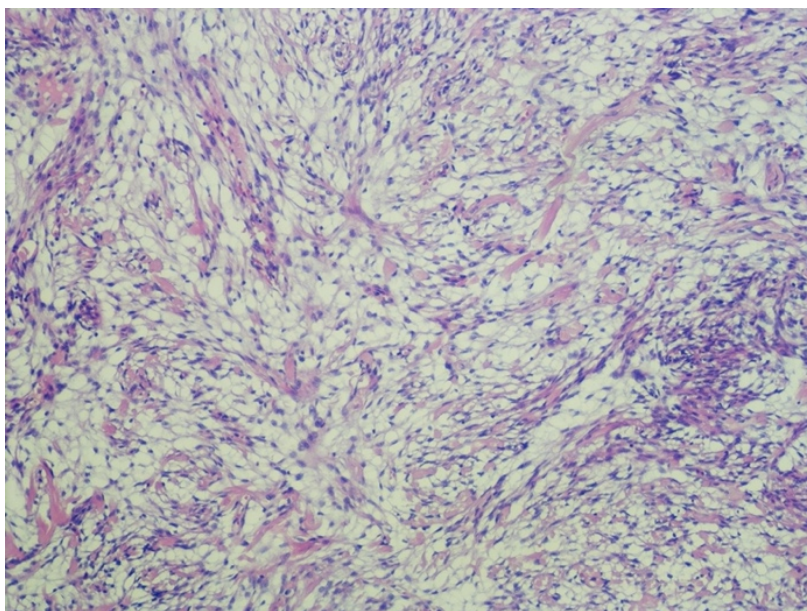


Ilustracija 12: Hordoidni meningiom, Hematoksilin i Eozin bojenje, uveličanje 20x



Ilustracija 13: Hordoidni meningiom, Histochemijsko mucin bojenje, uveličanje 20x

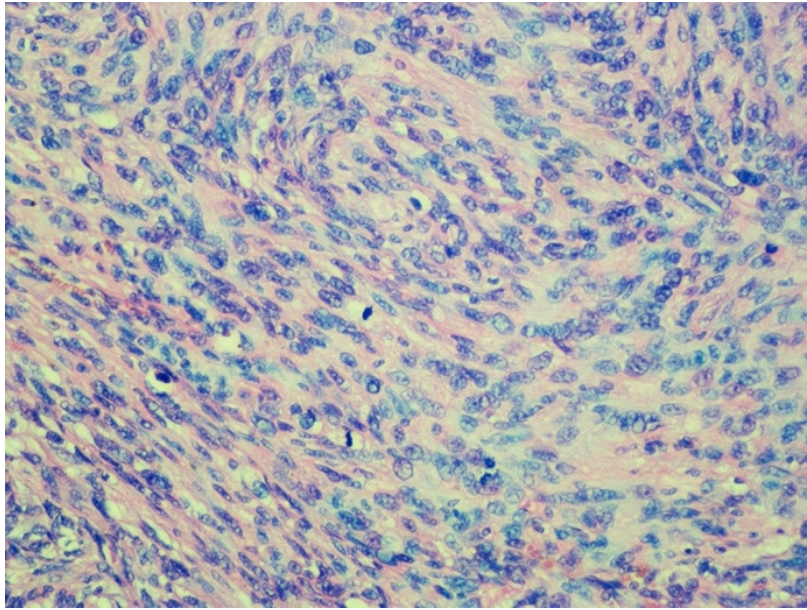
Svetloćelijski meningiom je još jedan u nizu meningioma koje se dodeljuje histološki gradus 2 kao posledica histoloških karakteristika koje ukazuju na agresivno biološko ponašanje. U tumorskom tkivu se uočavaju okruglaste ili poligonarne ćelije svetle citoplazme, u bestrukturinom aranžmanu, između kojih se uočava deponovanje kolagena. U citoplazmi tumorskih ćelija se uočava glikogen. Odsustvo vrtložnih formacija i psamoznih telašaca značajno otežava dijagnostiku ovog tumora, zbog čega je neophodno verifikovati meningotelnu diferencijaciju imunohistochemijski, o čemu će detaljnije biti reči dalje u tekstu (Ilustracija 14) (34).



Ilustracija 14: Svetloćelijski meningiom, Hematoksilin i Eozin bojenje, uveličanje 10x

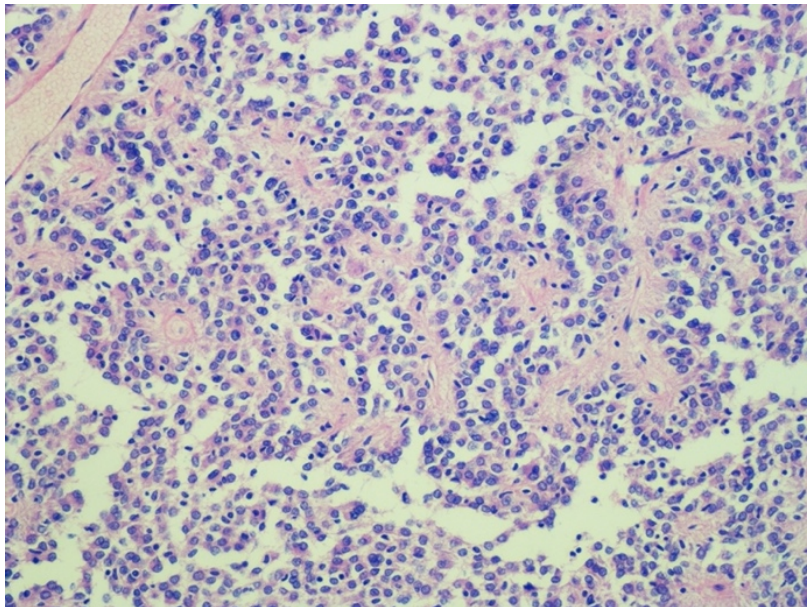
Anaplastični (maligni) meningiom je tumor histološkog gradusa 3, u kome se uočva 20 i više mitozna na 10 uzastopno pregledanih (PVU) površine 0,16 mm<sup>2</sup>, nezavisno od histološkog podtipa meningioma. Anaplastični meningiomi vrlo često nemaju histološke odlike meningotelnih ćelija,

zbog čega verifikacija meningotelnog porkela tumora zavisi isključivo od imunohistohemijskih analiza (Ilustracija 15).



Ilustracija 15: Anaplastični meningiom, Hemaroksilin i Eozin, uveličanje 20x

Papilarni meningiom je redak podtip meningioma koji prema kriterijumima SZO pripada gradusu 3 zbog izuzetne sklonosti ka agresivnom biološkom ponašanju i metastaziranju, naročito u pluća. Histološki se odlikuju dominantnim perivaskularnim pseudopapilarnim načinom rasta. Ponekada se uočava i rabdoidna morfologija ćelija kod ovog tipa meningioma. Zbog izrazitog gore pomenutog papilarnog rasta dferencijalno-dijagnostički se često u razmatranje uzimaju ependimomi (Ilustracija 16) (35).



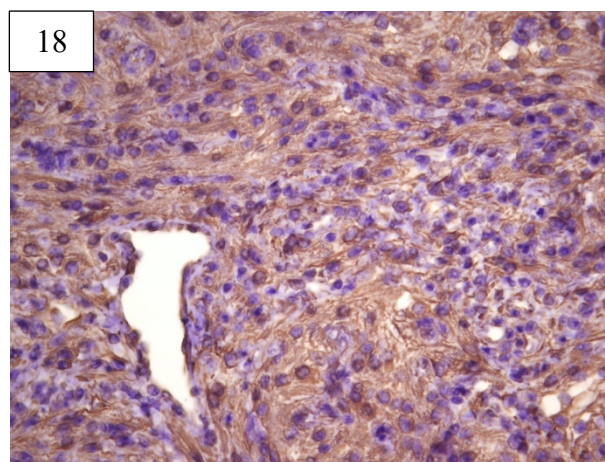
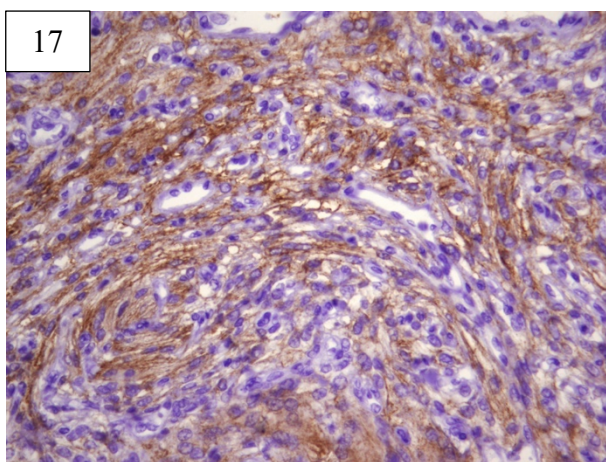
Ilustracija 16: Papilarni meningiom, Hematoksilin i Eozin bojenje, uveličanje 20x

Rabdoidni meningiom je podtip meningioma koji se definiše prisustvom rabdoidnih ćelija tj. ćelijama sa bogatom, ekscentrično potisnutom eozinofilnom citoplazmom i intracitoplazmatskim inkluzijama,

nalik na teniski reket. Jedra ovih ćelija su svetlog hromatina, upadljivog nukleolusa i takođe, jedro je unutar ćelije, kao i citoplazma potisnuto ekscentrično. Rabdoidni meningiomi pokazuju visok stepen rekurencije i letalnog ishoda, a vrlo često imaju i morfološke kriterijume za anaplastični meningiom (visoka mitotska aktivnost) (36,37).

## 1.5. Primena i značaj imunohistohemije u dijagnozi meningioma

Epitelne membrane antigen (eng. epithelial membrane antigen, EMA) (Ilustracija 17) i vimentin (Ilustracija 18) su najstariji i tradicionalno korišćeni markeri za detekciju meningotela i tumora njegovog porekla. Višedecenijska praksa je pokazala da bojenje na EMA kod nekih tipova meningioma može biti fokalno. Bitno je naglasiti da bojenje na EMA može biti negativno kod meningioma višeg gradusa. Negativno bojenje na EMA, naročito ekstraserebralnog tumora ne isključuje dijagnozu meningioma (18–20).

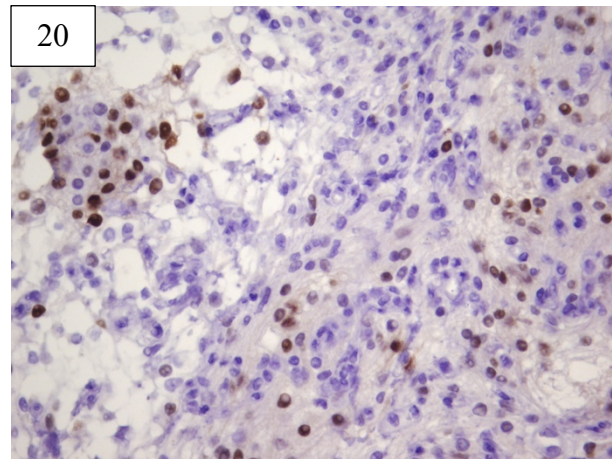
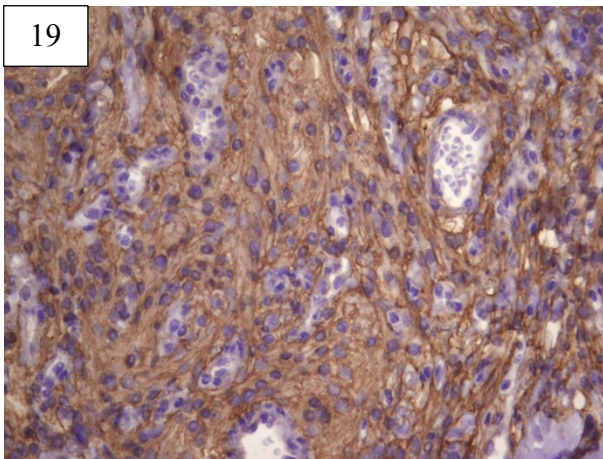


Ilustracija 17: Pozitivno imunohistohemijsko bojenje na epitelne membrane antigen EMA, uveličanje 40x

Ilustracija 18: Pozitivno imunohistohemijsko bojenje na Vimentin, uveličanje 40x

Somatostatinski receptor 2 (eng. somatostatin receptor 2, SSTR2A) (Ilustracija 19) je u protekloj deceniji prepoznat kao marker koji je konzistentno pozitivan kod svih meningioma (18–20). Ipak, prilikom njegove upotrebe treba biti kritički nastrojen s obzirom da se radi o neuroendokrinom markeru. U slučaju diferencijalno-dijagnostičke dileme, da se radi o tumoru neuroendokrinog porekla savetuje se istovremena primena još minimum dva različita neuroendokrina markera, koja će u slučaju meningioma biti negativna, dok će u slučaju da se radi o neuroendokrinom tumoru, bar jedan, neretko i oba primenjena neuroendokrina markera biti pozitivna. Kod većine meningioma se uočava nuklearna pozitivnost i na progesteronski receptor (eng. progesterone receptor, PR) (Ilustracija 20), koja je u većini slučajeva fokalnog tipa. Ova pozitivnost se češće uočava kod žena i kod meningioma nižeg gradusa, a istovremeno ukazuje i na manje agresivno biološko ponašanje meningioma i povoljniji klinički tok bolesti (18–20).

Prema aktuelnim kriterijumima SZO imunohistohemijska pozitivnost na EMA i SSTR2 spadaju u poželjne, ali ne i u obavezne dijagnostičke korake koje treba primeniti prilikom histopatološke analize meningioma (18–20).



Ilustracija 19: Pozitivno imunohistohemijsko bojenje na somatostatinski receptor 2 (SSTR2), uveličanje 40x

Ilustracija 20: Pozitivno imunohistohemijsko bojenje na progesteronski receptor (PR), uveličanje 40x

Pored prethodno pomenutih markera koji su tipično prisutni kod meningioma, sledeći markeri takođe mogu biti aberatno eksprimirani kod pojedinih meningioma. Pozitivnost markera S100 (eng. family of low molecular weight proteins) se može videti kod fibroznog meningioma. U cilju isključivanja, da se diferencijalno-dijagnostički radi o švanomu trebalo bi primeniti SOX10 (Sry-related HMg-Box gene 10) koji je negativan kod meningioma. S100 pozitivnost bi mogla pobuditi diferencijalno-dijagnostičku dilemu između hordoidnog meningioma i hordoma. Pomenuta dilema se može rešiti primenom imunohistohemijskog bojenja na brachiury, čija nuklearna pozitivnost ukazuje da se radi o hordomu. Treba obratiti pažnju da su i hordoidni meningiomi i hordomi pozitivni na EMA, CKAE1/AE3, S100 i Vimentin, ali se obrasci bojenja razlikuju kod ova dva tumora. Bojenje na CKAE1/AE3 i S100 kod hordoma je difuzno i intezivno, dok je kod hordoidnog meningioma najčešće negativno ili fokalno. Bojenje na EMA i Vimentin je difuznog karaktera kod oba tipa tumora, te se ne može koristiti u diferencijalno-dijagnostičke svrhe, tj. u cilju isključivanja/potvrđivanja dijagnoze jednog od dva prethodno pomenuta tumora. Budući da se marker S100 eksprimira i u glijalnim tumorima savetuje se primena glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (eng. glial fibrillary acidic protein, GFAP) u cilju isključivanja mogućnosti da se radi o tumoru glijalne diferencijacije. Primena GFAP je od velike pomoći u detekciji invazije moždanog parenhima, što je od presudnog značaja za prepoznavanje meningioma gradsua 2. Takođe, pozitivost markera GFAP kod tumora papilarne morfologije može ukazivati na dijagnozu ependimoma, dok su papilarni meningiomi uvek negativni na GFAP. Citokeratini, naročito CK7 (eng. cytokeratine 7, CK7) mogu da budu pozitivni u meningiomima, navodeći nas na široku lepezu diferencijalnih dijagnoza, pre svega karcinoma različitog porekla (18–20).

Pored navedenih markera, u slučaju diferencijalno-dijagnostičkih poteškoća, kao što bi bila meningiom vs solitarni fibrozni tumor trebalo bi primeniti markere (eng. signal transducer and activator of transcription 6 – STAT6) i CD34 (eng. cluster of differentiation 34) koji su kod meningioma uvek negativni, dok su u slučaju solitarnog fibroznog tumora pomenuti markeri pozitivni. OLIG2 (eng. oligodendrocyte transcription factor 2) i SOX10 su markeri koji su uvek negativni u meningiomima, zbog čega se mogu koristiti za pozdanu diferencijalnu dijagnozu glijalnih i meningotelijalnih tumora. (18–20).

Rekurentni meningiomi i meningiomi agresivnog biološkog ponašanja predstavljaju veliki klinički problem, zbog čega privlače pažnju istraživača, osobito u cilju otkrivanja uzroka njihove rekurencije (38–42). Jedan od mogućih objašnjenja agresivnog biološkog ponašanja meningioma je senescencija. Mofološka heterogenost meningioma se sve više ogleda i na molekularnom nivou (43–45).

## 1.6. Senescencija

Senescencija je kompleksan proces koji je rezultat delovanja različitih stresora koji dovodi do stanja nepovratnog zaustavljanja deljenja ćelija. Ćelije koje su ušle u proces senescencije (senescentne ćelije) se takođe karakterišu oštećenjem makromolekula i izmenama metabolizma ćelije (46–48). Iako naziv, koji potiče sa engleskog jezika asocira na starenje, senescencija je širi pojam od pojma starenja i nije nužno povezana sa njim (48–50). Pojam senescencije datira iz 1961. godine, kada je Hayflick svojim legendarnim eksperimentom na ćelijskim kulturama ukazao da postoji stanje u kojima se ćelije više ne dele, a nastavljaju da žive, i nazvao ga senescencija. Detekcija senescentnih fibroblasta u kulturi je vršena histoheimijskim bojenjem na beta galaktozidazu, lizosomalni enzim koji se pojačano nakuplja u senescentnim ćelijama, kao posledica povećane degradacije elemenata ćelije. Ovaj enzim je ujedno postao najstariji i najčešće korišćeni marker senescencije – beta galaktozidaza udružena sa senescencijom (eng. senescence-associated beta-galactosidase, SA- $\beta$ -GAL) (51). Senescentne ćelije se akumuliraju tokom starenja i povezane su sa nastankom brojnih bolesti povezanih sa starenjem. Senescencija može igrati važnu ulogu u supresiji tumora, zarastanju rana i zaštiti od fibroze tkiva. Međutim, postoje dokazi da senescentne ćelije mogu imati štetne efekte in vivo i da mogu doprineti remodeliranju tkiva i starenju organizma. Aktivacija senescencije dovodi do stvaranja senescentnog sekretornog fenotipa (eng. senescence associated secretory phenotype - SASP) koji doprinosi izmeni metabolizma ćelije i uzrokuje oštećenje makromolekula (52,53). Inicijacija senescencije je multifaktorijski proces, može biti prouzrokovana prestankom replikacije, oksidativnim stresom, aktivacijom onkogeni, jonizujućim zračenjem ili određenim vidovima terapije (54–57). Interesantno je da ishod senescencije u tumorskom tkivu zavisi od dužine njene aktivacije: kratkotrajna aktivacija može imati tumor supresivni efekat, dok dugoročna aktivacija može imati suprotan efekat, aktivirati i pospešiti malignu transformaciju ćelije (58–60).

Budući da do sad nije prepoznat jedinstven, dovoljno specifičan i senzitivni marker za detekciju senescencije, ispitivanje aktivacije senescencije zahteva ispitivanje nekoliko markera koji se, pored senescencije, koriste i kao markeri drugih procesa u ćeliji (61–63). Na celularnom nivou, proces senescencije se najčešće inicira aktivacijom p53/p21<sup>Waf1/Cip1</sup> i/ili p16<sup>INK4a</sup>. Povećavanje nivoa p53, p21 (eng. p21<sup>W1/Cip1</sup>) i/ili p16 (eng. p16<sup>INK4a</sup>) u ćeliji inhibira aktivnost kompleksa ciklina E i ciklin zavisnih kinaza 2, kao i ciklin zavisnih kinaza (eng. cyclin-dependent kinase, CDKN) 4/6 i ciklina D. Posledično dolazi do hiperfosforilacije Rb proteina, što onemogućava ulazak ćelije u S fazu ćelijskog ciklusa, i sledstveno vodi aktivaciji senescencije (63). Senescencija, aktivirana na ovaj način, predstavlja moćan tumor supresivni mehanizam (52,64). Sa druge strane, promene u navedenim genima i/ili njihovim promotorima mogu da uzrokuju inaktivaciju ili zaobilazanje procesa senescencije, što može dovesti do progresije tumora. Smatra se da kratkotrajna aktivacija senescencije onemogućava progresiju tumora, kada SASP aktivira imunski odgovor i dovodi do eliminacije senescentnih tumorskih ćelija. Ipak, dugotrajno dejstvo SASP i intenzivna aktivacija senescencije uzrokuju imunosupresiju, što onemogućava eliminaciju senescentnih ćelija i promovira njihovu malignu alteraciju (65–67). Ispitivanje aktivacije senescencije u savremenoj nauci ima veliki značaj zbog razvoja mogućnosti terapijskog dejstva na senescentne ćelije (68–71). Primena senolitika predstavljena širokom lepezom senolitičkih agenasa koji selektivno uništavaju (senolitički efekat) ili inhibiraju (senostatički efekat) senescentne ćelije, onemogućavajući njihovo štetno dejstvo na dalji tok razvoja bolesti (71–73).

Imajući u vidu da je senescencija multifaktorijski i izuzetno kompleksan proces, za njenu detekciju u tkivu se preporučuje sinhrona upotreba nekoliko markera. Najčešće korišćeni markeri za detekciju senescencije u tkivu su p16, p21 i SA- $\beta$ -GAL (62).

## 1.7. *Hedgehog* signalni put

*Hedgehog* je evolutivno visoko konzervirani i strogo regulisani signalni put sačinjen od kaskada liganada, receptora, transkripcionih faktora i regularotnih proteina, koji je uključen kako u embiogenezu, tako i u tumorigenezu brojnih organa (74). *Hedgehog* signalni put je uključen u održavanje progenitornih ćelija u mnogim tkivima odraslih, uključujući epitel mnogih organa i mozga (75). Kanonski put aktivacije *Hedgehog* signalnog puta započinje vezivanjem *Hedgehog* liganada, *Sonic Hedgehog*, *Desert Hedgehog* i *Indian Hedgehog*. U odsustvu *Hedgehog* liganada, *Hedgehog* receptor PTCH1 (eng. protein patched homolog 1, PTCH1) onemogućava aktivaciju puta inhibirajući aktivaciju koreceptora Smoothened (SMO). Vezivanje liganada za receptor dovodi do translokacije onkogena udruženog sa gliomima (eng. Glioma associated oncogene - GLI) u protruzije vezane za mikrotubule u cilijama ćelijske membrane (76,77). Abnormalna aktivacija elemenata *Hedgehog* signalnog puta je povezana sa tumorigenezom (78). Ona može biti ligand zavisna (na primer, kod tumora gastrointestinalnog trakta, pankreasa i prostate) i ligand nezavisna (na primer, kod bazocelularnog karcinoma i meduloblastoma) (79,80).

GLI molekuli su transkripcioni faktori i glavni efektori *Hedgehog* signalnog puta, dok je SUFU (eng. suppressor of fused) njihov glavni inhibitor. U tumorigenezi, GLI transkripcioni faktori mogu da učestvuju i u formi aktivatora i u formi represora (75,81,82). Smatra se da GLI2 ima ulogu aktivatora *Hedgehog* signalnog puta. Nasuprot tome, uloga GLI3 je dominantno represorska (75,83). SUFU je produkt tumor supresorskog gena lokalizovanog na hromozomu 10 čije su mutacije jedan od uzroka razvoja brojnih tumora, uključujući meningiome (74,84). Funkcija SUFU je inhibicija drugih proteina, koja se ostvaruje kroz interakciju njima (74). SUFU je inhibitor akumulacije GLI proteina u jedru (85). Imajući u vidu interakcije/vezivanja SUFU i GLI proteina, njihove mutacije bi, u zavisnosti od lokalizacije u proteinima, mogle dovesti do gubitka mogućnosti vezivanja, što za posledicu može imati aberantnu aktivaciju, kancerogenezu ili ubrzavanje progresije tumora (74,86). Gubitak SUFU proteina za posledicu ima „oslobađanje“ GLI proteina/transkripcionog faktora za kojeg je vezan, što dovodi do povećanja transkripcije gena uslovljenih ovim transkripcionim faktorima (82,87). Pored toga, GLI proteini mogu biti cilj antikancerske terapije (88–90). Detekcijom neizmenjenih proteina GLI2, GLI3 i SUFU metodom imunohistohemije, koja je relativno jednostavna, široko dostupna i jeftina, bi se na indirektan način mogla detektovati aktivacija ovih proteina, dok bi odsustvo pozitivnosti moglo ukazati ili na odsustvo aktivacije, ili na mutaciju.

Dosadašnja istraživanja su ukazala na aktivaciju *Hedgehog* signalnog puta u oko 5 % meningioma gradusa 1, kao i da je ona uzrokovana mutacijom gena SMO. Ovi meningiomi imaju tendenciju rekurencije i dominantno su lokalizovani u srednjoj liniji, što reflektuje ulogu *Hedgehog* signalnog puta u separaciji hemisfera. Mutacije SUFU gena su detektovane u malom procentu meningioma, kako sporadičnih tako i familijarnih (84,91). Aktivacija senescencije u meningiomima je detektovana u ćelijskim kulturama malignih meningioma primenom SA- $\beta$ -GAL, nakon primene pojedinih citostatika (92). Homozigotna delecija gena CDKN2A je dokazana kod malignih meningioma. Smatra se da primena antitela na proteinski produkt ovog gena, p16, bi mogla indirektno ukazati na prisustvo homozigotne delecije CDKN2A (93). Najnovije preporuke SZO, sagledane kroz cIMPACT-NOW 8 publikaciju, ukazuju na potrebu za korišćenjem molekularnih metoda i njihovih surogata u gradiranju meningioma (93). Imunohistoheijske studije, koje detektuju prisustvo proteinskog produkta gena *Hedgehog* signalnog puta i markera senescencije, na kojima je zasnovana ova studija, su retke.

## 2. Ciljevi istraživanja

- Odrediti ekspresiju markera senescencije (p16, p21 i SA- $\beta$ -GAL) u tkivu meningioma metodom imunohistohemije.
- Odrediti ekspresiju markera *Hedgehog* signalnog puta (GLI2, GLI3 i SUFU) u tkivu meningiomima metodom imunohistohemije.
- Odrediti povezanost ekspresije markera senescencije i markera *Hedgehog* signalnog puta sa gradusom, lokalizacijom, histološkim podtipom i mitotskom aktivnošću meningioma, kao i polom pacijenata.

## 3. Materijal i metode

### 3.1. Dizajn istraživanja i ispitanici

U ovoj retrospektivnoj studiji korišćeno je tkivo 343 pacijenta sa dijagnozom meningioma koji su bili podvrgnuti neurohirurškom lečenju na Klinici za neurohirurgiju Univerzitetskog Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Neurohirurški tretmani su se odvijali od 1. januara 2016. do 30. juna 2018. Kriterijumi za uključivanje pacijenata bili su dostupnost, kvalitet i količina tkiva u parafinskim tkivnim blokovima (korišćeno je samo tkivo pacijenata koje je uzorkovano u više od jednog parafinskog tkivnog bloka kako bi se osigurala dovoljna količina tkiva za potencijalna buduća istraživanja i dijagnostiku). Materijal od 25 pacijenata, koji svi pripadaju gradusu 1, nije mogao da se koristi jer parafinski tkivni blokovi nisu sadržali dovoljnu količinu kvalitetnog tkiva za izgradnju tkivnog mikroniza (TMN). Zbog toga je dodatno analizirano tkivo preostalih 318 pacijenata. Prosečna starost analiziranih/dijagnostikovanih pacijenata bila je  $58,83 \pm 12,54$  godine (minimalna starost je bila 23, a maksimalna 80 godina). Grupu je činilo 93 (29,25 %) pacijenata muškog pola prosečne starosti  $57,52 \pm 14,11$  i 225 (70,75 %) pacijenata ženskog pola prosečne starosti  $59,37 \pm 11,82$ .

Meningiomi su klasifikovani prema klasifikaciji tumora centralnog nervnog sistema SZO iz 2021. godine (18–20). Sto sedamdeset i devet meningioma (56,29 %) je bilo gradusa 1, 132 (41,51 %) gradusa 2, a preostalih 7 (2,20 %) gradusa 3. Ovaj neuobičajeno visok procenat meningioma gradusa 2 može se objasniti činjenicom da se komplikovani slučajevi (koji su dominantno meningiomi gradusa 2.) hirurški leče na Klinici za neurohirurgiju Univerzitetskog Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Rutinsko neurohirurško lečenje većine meningioma gradusa 1 obavlja se u drugim, manjim zdravstvenim centrima širom Republike Srbije. Što se tiče podtipova meningioma gradusa 1, 27 pacijenata (8,49 %) imalo je tip angiomatoznog meningioma, 23 (7,23 %) je imalo fibrozni tip meningioma, 20 pacijenata (6,29 %) je imalo tip meningotelijalnog meningioma, 9 pacijenata (2,83 %) tip mikrocističnog meningioma, 8 pacijenata (2,52 %) je imalo psamomatozni tip meningioma, 11 pacijenata (3,46 %) je imalo tip sekretornog meningioma i 81 pacijent (25,47 %) je imao tip tranzicionalnog meningioma. Meningiomi CNS-a gradusa 2 pretežno klasifikovani kao atipični meningiomi 126 (39,62 %), dok je 6 pacijenata sa tipom hordoidnog meningioma (1,89 %). Među meningiomima gradusa 3 je bio samo jedan podtip, anaplastični (maligni) meningiom, dijagnostikovani kod 7 pacijenata (2,20 %).

Mitotski indeks je dodeljen svakom meningiomu tokom inicijalne patohistološke dijagnostičke procedure, metodom, broj mitoza za svaki meningiom na 10 polja velikog uveličanja, površine  $0,16 \text{ mm}^2$ , prema kriterijumima SZO (18–20).

U zavisnosti od lokalizacije, meningiomi su klasifikovani na meningiome konveksiteta mozga (183 pacijenta), parasagitalne (21 pacijent), falksne (7 pacijenata), intraventricularne (5 pacijenata), orbitalne (1 pacijent), meningiome pontocerebelarnog ugla (12 pacijenata), selarne (13 pacijenata), sfenoidne meningiome (29 pacijenata), tentorijalne meningiome (2 pacijenta), meningiome klivusa (2 pacijenata), infratentorijalne (18 pacijenata), meningiome baze lobanje (1 pacijent) i meningiome spinalne lokalizacije (24 pacijenta).

Meningiomi su zatim na osnovu njihove lokalizacije, a prema preporukama literature, podeljeni i uvršćeni u tri velike grupe. Prva grupa, koju čine meningiomi baze lobanje (uključujući selarne, meningiome klivusa, sfenoidne meningiome, meningiome baze lobanje, tentorijalne meningiome, infratentorijalne meningiome, meningiome pontocerebelarnog ugla i meningiome orbitalno lokalizovane) (78 pacijenata), zatim druga grupa sa meningiomima koji ne zahvataju bazu lobanje (uključujući meningiome sa moždanih konveksiteta, parasagitalne meningiome, falksne meningiome



i meningiome intraventricularno lokalizovane) (216 pacijenata) i poslednja, treća grupa u kojoj su meningiomi spinalne lokalizacije (24 bolesnika). Prethodno opisana, simplifikovana podela meningioma usledila je prema preporukama literature, kao posledica molekularnih sličnosti meningioma i potrebe pojednostavljenja statističke analize podataka vezanih za lokalizaciju meningioma (94).

### 3.2. Etičko odobrenje za sprovođenje istraživanja

Etički komitet Univerzitetskog kliničkog centra Srbije - Beograd, formalno je odobrio sve eksperimente u okviru istraživanja (etička dozvola broj 341/7–2023), koji su sprovedeni prema Helsinškoj deklaraciji.

### 3.3. Tkivni uzorci i konstrukcija tkivnih mikronizova

Najpre je izvršena fiksacija tumorskog tkiva tretmanom sa 10 % puferisanom formalinom, nakon čega je usledila dehidracija u etanolu i pohranjivanje u rastopljeni parafinski vosak. Nakon toga, tkivo je isečeno na debljinu od 5 mm, obojeno hematoksilinom i eozinom i mikroskopski analizirano da bi se odredila tri reprezentativna područja koja će se koristiti za konstrukciju TMN. TMN su formirani ekstrakcijom cilindričnih tkivnih jezgara (prečnika 0,9 mm) iz prethodno pripremljenih parafinskih tkivnih blokova donora (tumorskog tkiva pacijenata) i posledično njihovim uranjanjem u parafinski blok akceptora (prazan parafinski blok). Tri cilindrična jezgra tkiva meningioma od svakog pacijenta su uronjena u parafinski blok akceptora, i sledstveno je konstruisano šesnaest TMN (svaki tkivni mikroniz je sadržao tkivo meningioma dvadeset pacijenata). Minimum jedan tkivni cilindar prihvatljivog kvantiteta i kvaliteta, dovoljan je bio da se uradi dalja analiza tkiva.

### 3.4. Imunohistohemijska analiza

Sva imunohistohemijska bojenja su obavljena prema uputstvima proizvođača. Za imunohistohemijsku analizu je korišćeno šest antitela: anti-p16, anti-p21 i SA- $\beta$ -GAL, GLI2, GLI3 i SUFU.

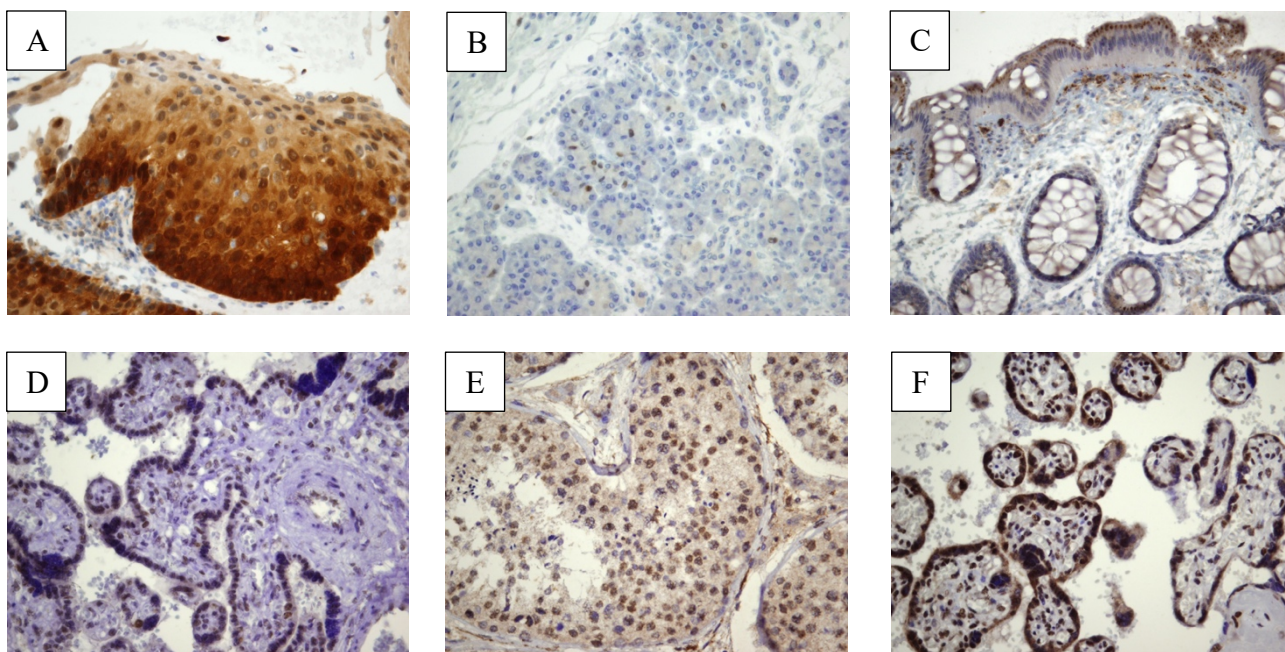
U cilju detekcije senescencije u tkivu meningioma korišćena su sledeća antitela: anti-p16 (CINtec), anti-p21 (DAKO, klon SX118, 1:50) i  $\beta$ -gal (Sigma, HPA069503, 1:200). Imunohistohemijsko bojenje za p16<sup>INK4a</sup> je obavljeno automatski, korišćenjem Ventana autostejnera BenchMark ULTRA. Nuklearna i citoplazmatska pozitivnost su razmatrane. Imunohistohemijsko bojenja na p21 je učinjeno manuelno, korišćenjem monoklonskog antitela proizvođača DAKO, klon SX118, sa razblaženjem 1:50, sa pretretmanom pH9, detekcionim sistemom PolyDetector Plus Bio SB i vizualizacijom pomoću diaminobenzidina (DAB) uz kontrastiranje hematoksilinom. Nuklearna pozitivnost je uzeta u razmatranje. Imunohistohemijsko bojenje na SA- $\beta$ -GAL je takođe učinjeno manuelno, poliklonskim antitelom Sigma, HPA069503, sa razblaženjem 1:200, pretretmanom pH6, detekcionim sistemom En Vision FLEX-HRP, da bi se vizualizacija izvršila pomoću DAB i kontrastiranje hematoksilinom. Citoplazmatska pozitivnost je uzeta u razmatranje.

U cilju detekcije aktivacije *Hedgehog* signalnog puta korišćena su sledeća antitela: anti GLI2 (Santa Cruz biotechnology, INC. klon C-10, kataloški broj: sc-271786), GLI3 (Santa Cruz biotechnology, INC. klon B-4, kataloški broj sc-74478) i SUFU (Sigma Aldrich, poliklonsko antitelo, kataloški broj HPA008700). Imunohistohemijsko bojenje za GLI2 je obavljeno manuelno, korišćenjem monoklonskog antitela proizvođača Santa Cruz, klon C-10, sa razblaženjem 1:200, pretretmanom pH9, detekcionim sistemom PolyDetector Plus Bio SB i vizualizacijom pomoću (DAB) uz kontrastiranje hematoksilinom. Nuklearna pozitivnost je uzeta u razmatranje. Imunohistohemijsko bojenje za GLI3 je takođe obavljeno manuelno, korišćenjem monoklonskog antitela proizvođača

Santa Cruz, klon B-4, sa razblaženjem 1:25, pretretmanom pH9, detekcionim sistemom PolyDetector Plus Bio SB i vizualizacijom pomoću (DAB) uz kontrastiranje hematoksilinom. Nuklearna pozitivnost je uzeta u razmatranje. Imunohistohemijsko bojenje za SUFU je učinjeno manuelno, korišćenjem poliklonskog antitela proizvođača Sigma Aldrich, sa razblaženjem 1:150, pretretmanom pH6, detekcionim sistemom PolyDetector Plus Bio SB i vizualizacijom pomoću (DAB) uz kontrastiranje hematoksilinom. Nuklearna pozitivnost je uzeta u razmatranje.

### 3.5. Standardizacija imunohistohemijskih analiza

Standardizacija imunohistohemijskog bojenja je izvršena korišćenjem odgovarajuće pozitivne kontrole: tkivo skvamozne intraepitelne lezije visokog stepena grlića materice za p16, tkivo patološki neizmenjenog pankreasa za p21 i tkivo patološki neizmenjenog debelog creva za SA- $\beta$ -GAL, kao i tkivo patološki neizmenjene placente za GLI2, tkivo patološki neizmenjenog testisa za GLI3 i tkivo patološki neizmenjene žučne kese za SUFU. Tkiva za spoljašnje pozitivne kontrole su dobavljena sa odeljenja za patologiju pri Klinici za urologiju, Klinikci za ginekologiju i akušerstvo i Instituta za digestivne bolesti, sve tri klinike u okviru Univerzitetskog Kliničkog centra Srbije (Ilustracija 21).



Ilustracija 21 (A-F): Spoljašnje pozitivne kontrole za p16, p21, SA- $\beta$ -GAL, GLI2, GLI3 i SUFU A) p16 bojenje (skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena), uveličanje 40x. B) p21 bojenje (zdravo tkivo pankreasa), uveličanje 40x. C) SA- $\beta$ -GAL bojenje (zdravo tkivo debelog creva), uveličanje 40x. D) GLI2 bojenje (zdravo tkivo placente), uveličanje 40x. E) GLI3 bojenje (zdravo tkivo testisa), uveličanje 40x. F) SUFU bojenje (zdravo tkivo žučne kese), uveličanje 40x.

Imunohistohemijski tretirani tkivni mikronizovi su mikroskopski analizirani pomoću svetlosnog mikroskopa Leica DM 750. Intenzitet bojenja citoplazme za SA- $\beta$ -GAL bio je difuzan u svim slučajevima. Dva patologa (VM i EMG) su izvršila inicijalnu analizu i predložila standardizaciju, složila se i definisala nekoliko reprezentativnih slučajeva negativnog, slabog, umerenog i jakog intenziteta bojenja na SA- $\beta$ -GAL. Za p16 citoplazmatsko i nuklearno bojenje, dok za p21, GLI2, GLI3 i SUFU samo nuklearno bojenje predstavljeni su u procentima. Uzeti su u obzir samo intenzivno obojeni uzorci tkiva. Definisano je pet grupa na osnovu intenziteta bojenja: grupa 1: 0 %, grupa 2: 1–25 %, grupa 3: 26–50 %, grupa 4: 51–75 %, i grupa 5: 76–100 %. Dalju, kompletnu analizu je obavio jedan posmatrač, patolog (VM). Nadalje, tkivo 40 pacijenata (tkivo iz nasumično odabranih TMN) je dodatno analizirano od strane drugog posmatrača (EMG) za svih šest markera (p16, p21 i SA- $\beta$ -GAL,

GLI2, GLI3 i SUFU), a u cilju provere varijabilnosti među patolozima (posmatračima). Vrednosti Kapa koeficijenta za p16, p21, SA- $\beta$ -GAL, GLI2, GLI3 i SUFU: 0,961 ( $p < 0,001$ ), 0,871 ( $p < 0,001$ ) i 0,870 ( $p < 0,001$ ), 0,966 ( $p < 0,001$ ), 0,876 ( $p < 0,001$ ) i 0,878 ( $p < 0,001$ ), respektivno, bile su iznad 0,8, što je kao utvrđeni normativ dovoljno za skoro savršeno slaganje između dva patologa (posmatrača).

### 3.6. Statistička analiza podataka

Rezultati istraživanja su predstavljani kao broj (%) ili srednja vrednost  $\pm$  SD, u zavisnosti od tipa podataka. Studentov t-test je korišćen za ispitivanje razlika između dve grupe normalno distribuiranih kontinuiranih varijabli. Spearmanova korelaciona analiza je korišćena za procenu korelacije između markera senescencije u meningiomima i drugih rednih ili numeričkih varijabli. Kruskal-Wallisov test je korišćen za ispitivanje razlika između tri grupe, dok je Mann-Whitney U test korišćen za procenu značajnih razlika između dve grupe. P vrednosti manje od 0,05 smatrane su značajnim. Svi podaci su analizirani pomoću statističkog softvera SPSS 29.0 (IBM corp.). Dogovor između posmatrača (patologa) se postiže korišćenjem Cohenove Weighted Kappa, koji se odnosi na redne podatke i dva posmatrača. Kapa koeficijent iznad 0,8 korišćen je kao utvrđeni prag za skoro savršene sporazume.

## 4. Rezultati

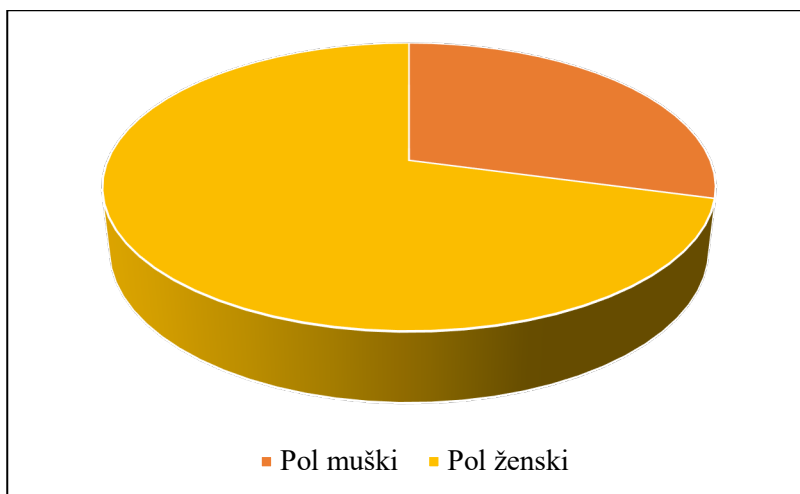
### 4.1. Opšte karakteristike pacijenata u studiji

Ukupan broj pacijenata u studiji je bio 318. Prosečna starost svih pacijenata iznosila je  $58,8 \pm 12,5$  godina, minimalna zabeležena starost pacijenta bila 23 godine, dok je maksimalna starost pacijenata iznosila 80 godina. Tabela 1 prikazuje deskripciju osnovnih karakteristika pacijenata sa meningiomom, gde se može videti distribucija menigioma prema polu pacijenata, gradusu meningioma, histološkom podtipu meningioma i njegovoj lokalizaciji.

Tabela 1: Osnovne karakteristike pacijenata sa meningiomom

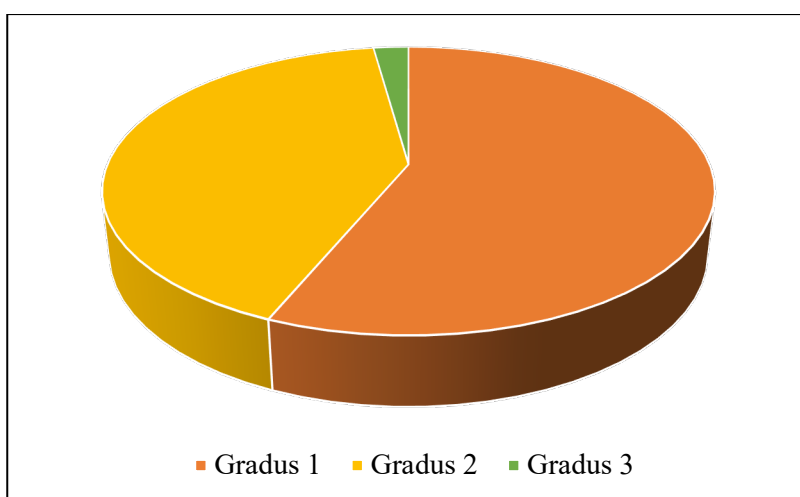
		N (%)
<b>Pol pacijenata</b>	Muški	93 (29,2 %)
	Ženski	225 (70,8 %)
<b>Gradus meningioma</b>	1	179 (56,3 %)
	2	132 (41,5 %)
	3	7 (2,2 %)
<b>Histološki podtip meningioma</b>	Anaplastični	7 (2,2 %)
	Angiomatozni	27 (8,5 %)
	Atipični	126 (39,6 %)
	Fibroblastični	23 (7,2 %)
	Hordoidni	6 (1,9 %)
	Meningotelijalni	20 (6,3 %)
	Mikrocistični	9 (2,8 %)
	Psamomatozni	8 (2,5 %)
	Sekretorni	11 (3,5 %)
	Tranzicionalni	81 (25,5 %)
<b>Lokalizacija meningioma</b>	Baza	78 (24,5 %)
	Konveksitet	216 (67,9 %)
	Spinalno	24 (7,6 %)

Od ukupnog broja pacijenata 93 (29,2 %) je bilo muškog pola, dok je 225 (70,8 %) bilo ženskog pola (Grafik 1).



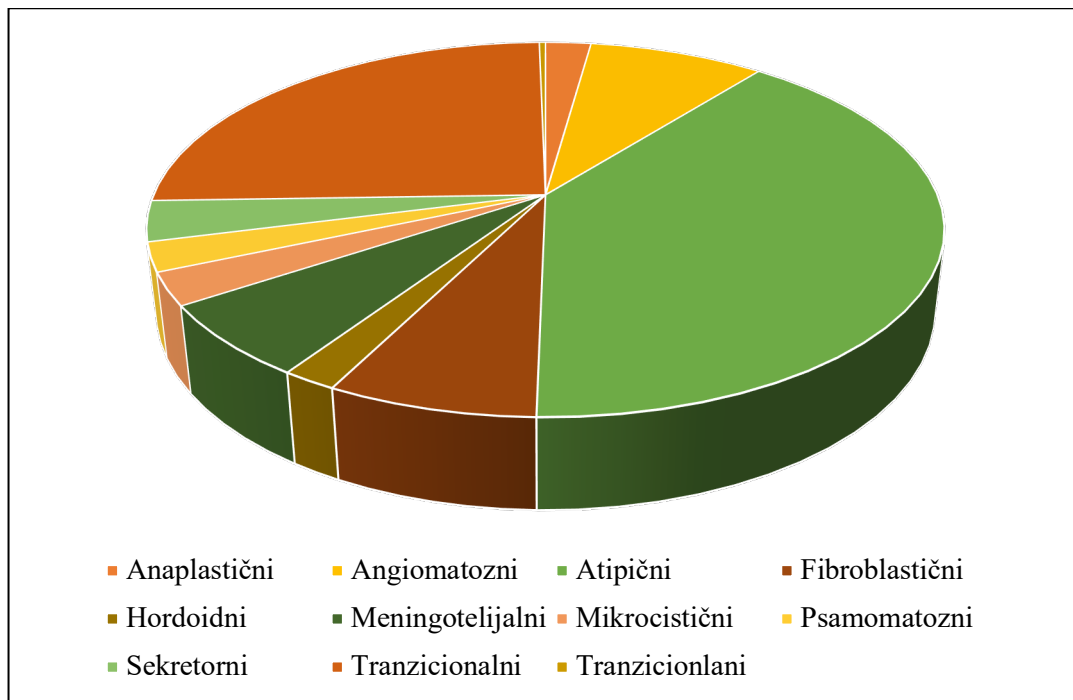
Grafik 1: Distribucija pacijenata sa meningiomom predstavljena prema polu

Analiza nuklearnog gradusa meningioma pokazala je da je većina pacijenata imala tumore gradusa 1 (56,3 %), dok su tumori gradusa 2 bili prisutni kod 41,5 % pacijenata, a tumori gradusa 3 kod 2,2 % pacijenata (Grafik 2). Neobično visok procenat tumora gradusa 2 može se objasniti činjenicom da se komplikovani slučajevi (koji su dominantno meningiomi gradusa 2) pretežno hirurški tretiraju na Klinici za neurohirurgiju, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije. Meningiomi gradusa 1 (koji su manje komplikovani) se tretiraju u drugim zdravstvenim centrima širom Republike Srbije.



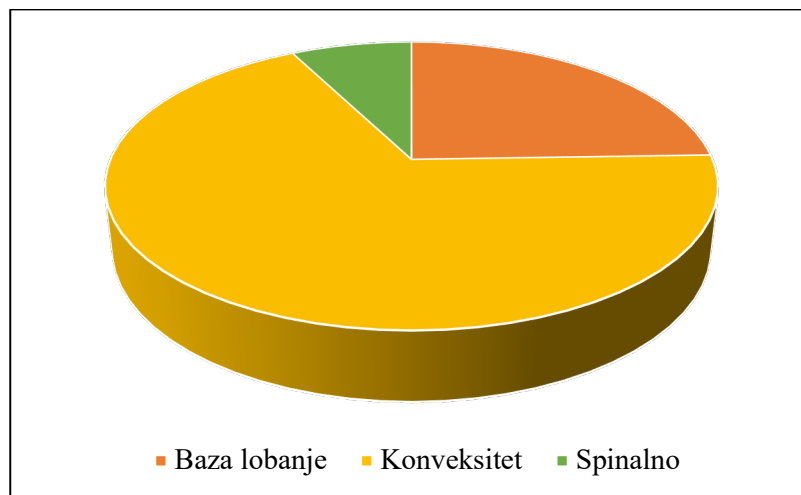
Grafik 2: Distribucija pacijenata sa meningiomom predstavljena prema gradusu meningioma

Najčešći histološki podtip meningioma bio je atipični meningiom (39,6 %), dok su tranzicionalni (25,5 %) i angiomatozni (8,5 %) takođe bili značajno zastupljeni. Najmanje zastupljeni histološki podtipovi su bili hordoidni (1,9 %) i anaplastični meningiom (2,2 %) (Grafik 3).



Grafik 3: Distribucija pacijenata sa meningiomom predstavljena prema histološkom podtipu

Meningiomi su najčešće bili lokalizovani na moždanim konveksitetima (67,9 %), dok je lokalizacija meningioma na bazi lobanje zabeležena kod 24,5 % pacijenata. Spinalno lokalizovani meningiomi zapaženi su kod 7,6 % ispitanika (Grafik 4).



Grafik 4: Distribucija pacijenata sa meningiomom predstavljena prema lokalizaciji meningioma

## 4.2. Starost i pol

Prosečna starosti pacijenata muškog pola je bila  $57,5 \pm 14,1$  godina, dok je prosečna starost pacijenata ženskog pola bila  $59,4 \pm 11,8$  godina. Nije primećena statistički značajna razlika u starosti između polova pacijenata sa meningiomom ( $p = 0,230$ ).

### 4.3. Analiza mitotskog indeksa (broja)

Tabela 2 i Tabela 3 prikazuju rezultate mitotskog indeksa meningioma. Prosečan broj mitozu u celokupnoj kohorti iznosio je  $3,1 \pm 4,3$ , sa medijanom od 1,0. Što se tiče meningioma gradusa 1, prosečan broj mitozu bio je  $1,2 \pm 0,0$ , sa medijanom od 1,0. Prosečan broj mitozu u meningiomima gradusa 2 iznosio je  $4,7 \pm 4,0$ , sa medijanom od 4,0. Kod meningioma gradusa 3, prosečan broj mitozu bio je  $22,6 \pm 3,9$ , sa medijanom od 22,0. Broj mitozu u meningiomima kod pacijenata muškog pola je bio statistički značajno veći nego kod meningioma pacijenata ženskog pola ( $p=0.018$ ).

Tabela 2: Mitotski broj predstavljen prema gradusu meningioma

<b>Gradus meningioma</b>	<b>Prosečan broj mitozu (medijana)</b>
Ukupno (svi gradusi)	$3,1 \pm 4,3$ (1,0)
Meningiomi gradusa 1	$1,2 \pm 0,0$ (1,0)
Meningiomi gradusa 2	$4,7 \pm 4,0$ (4,0)
Meningiomi gradusa 3	$22,6 \pm 3,9$ (22,0)

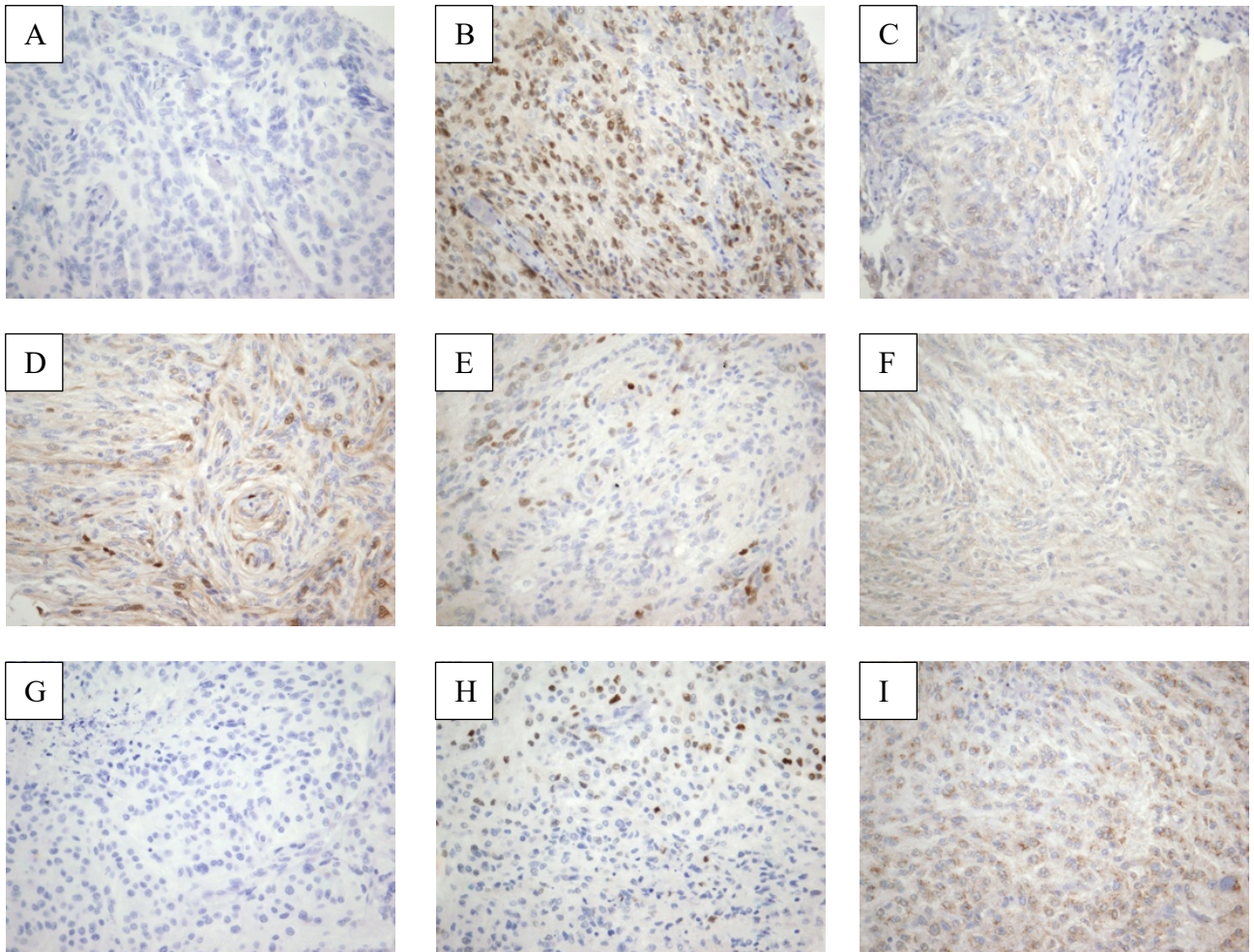
Prosečan broj mitozu u vezi sa lokalizacijom meningioma bio je sledeći: meningiomi sa moždanih konveksiteta  $3,7 \pm 4,9$  (medijana 1,0), meningiomi baze lobanje  $2,1 \pm 2,9$  (medijana 1,0) i spinalno lokalizovani meningiomi  $1,3 \pm 4,3$  (medijana 1,0). Statistički značajne razlike u pogledu broja mitozu uočene su u odnosu na lokalizaciju meningioma između grupa meningiomi sa moždanih konveksiteta i meningiomi spinalne lokalizacije ( $p < 0,001$ ), kao i između grupa meningiomi sa moždanih konveksiteta i meningiomi baze lobanje ( $p < 0,001$ ).

Tabela 3: Mitotski broj predstavljen prema lokalizaciji meningioma

<b>Lokalizacija meningioma</b>	<b>Prosečan broj mitozu (medijana)</b>
Meningiomi sa konveksiteta	$3,7 \pm 4,9$ (1,0)
Meningiomi baze lobanje	$2,1 \pm 2,9$ (1,0)
Spinalni meningiomi	$1,3 \pm 4,3$ (1,0)

### 4.4. Imunohistohemijska ekspresija markera senescencije

Ekspresija markera senescencije (p16, p21 i SA- $\beta$ -GAL) u meningiomima je određivana metodom imunohistohemije (Tabela 4). Za markere p16 i p21, a prema procentu pozitivnih (obojenih) ćelija, pet grupa bojenja je definisano: grupa 1 (0 %), grupa 2 (1-25 %), grupa 3 (26-50 %), grupa 4 (51-75 %) i grupa 5 (76-100 %). Za marker senescencije SA- $\beta$ -GAL, prema intezitetu bojenja, definisane su četiri grupe: negativna, slaba, umerena i jaka ekspresija (Ilustracija 22).



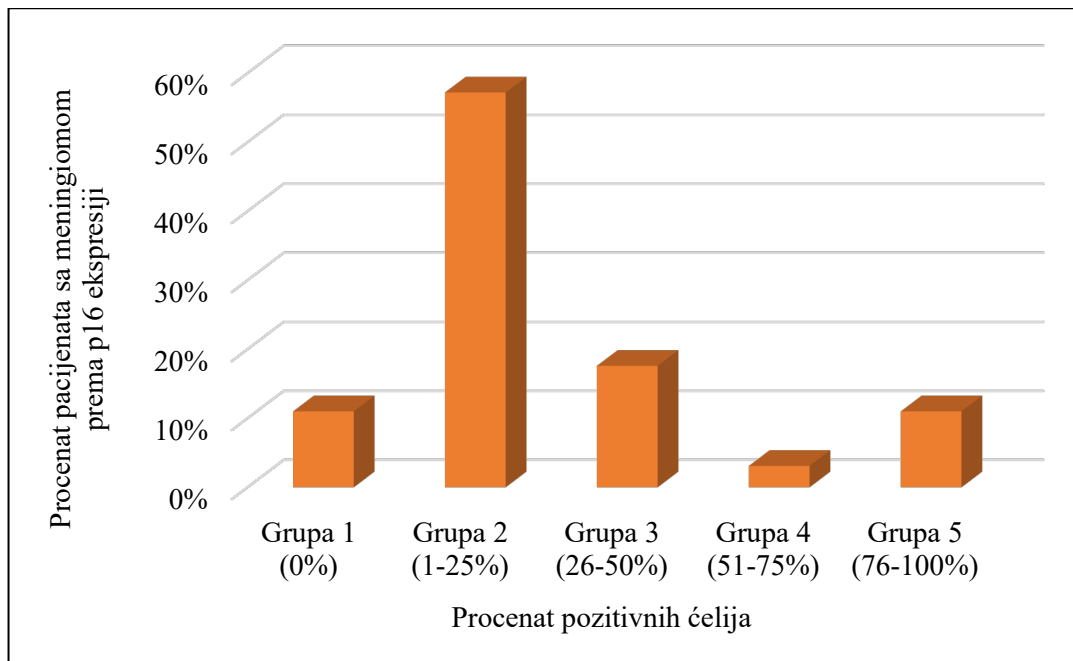
Ilustracija 22 (A-I): Imunohistohemijška ekspresija p16, p21 i SA-β-GAL A) p16 bojenje, meningiom gradus 1, uveličanje 40x. B) p16 bojenje, meningiom gradus 2, uveličanje 40x. C) p16 bojenje, meningiom gradus 3, uveličanje 40x. D) p21 bojenje, meningiom gradus 1, uveličanje 40x. E) p21 bojenje, meningiom gradus 2, uveličanje 40x. F) p21 bojenje, meningiom gradus 3, uveličanje 40x. G) SA-β-GAL bojenje, meningiom gradus 1, uveličanje 40x. H) SA-β-GAL bojenje, meningiom gradus 2, uveličanje 40x. I) SA-β-GAL bojenje, meningiom gradus 3, uveličanje 40x.



Tabela 4: Ekspresija markera senescencije (p16, p21 i SA- $\beta$ -GAL) u meningiomima određivana metodom imunohistohemije

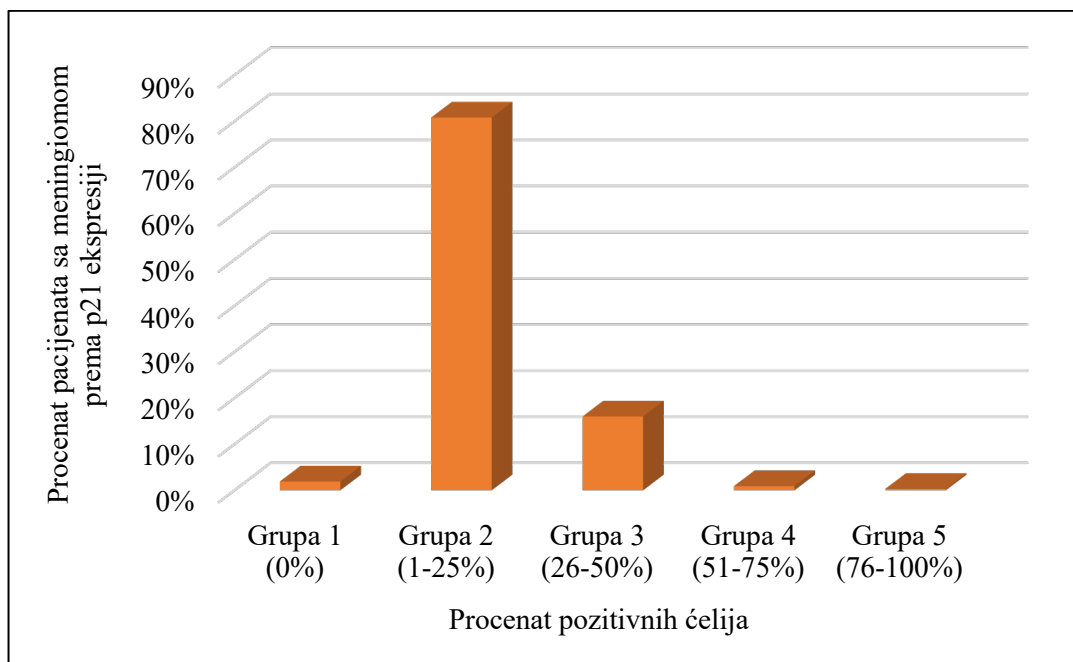
<b>Markeri senescencije</b>	<b>Procenat pozitivnih ćelija (p16 i p21)/intenzitet bojenja (SA-<math>\beta</math>-GAL)</b>	<b>N (%)</b>
<b>p16</b>	Grupa 1 (0 %)	35 (11,0 %)
	Grupa 2 (1-25 %)	182 (57,2 %)
	Grupa 3 (26-50 %)	56 (17,6 %)
	Grupa 4 (51-75 %)	10 (3,1 %)
	Grupa 5 (76-100 %)	35 (11,0 %)
<b>p21</b>	Grupa 1 (0 %)	6 (1,9 %)
	Grupa 2 (1-25 %)	257 (80,8 %)
	Grupa 3 (26-50 %)	51 (16,0 %)
	Grupa 4 (51-75 %)	3 (0,9 %)
	Grupa 5 (76-100 %)	1 (0,3 %)
<b>SA-<math>\beta</math>-GAL</b>	Negativna ekspresija	61 (19,2 %)
	Slaba ekspresija	45 (14,2 %)
	Umerena ekspresija	139 (43,7 %)
	Jaka ekspresija	73 (23,0 %)

Analizirajući p16 ekspresiju, većina uzoraka je iz grupe 2 (57,2 %), a zatim uzoraka iz grupe 3 (17,6 %), dok je 11,0 % uzoraka pripadalo grupi 1 i grupi 5. Najmanje uzoraka je bilo iz grupe 4 (3,1 %) (Grafik 5).



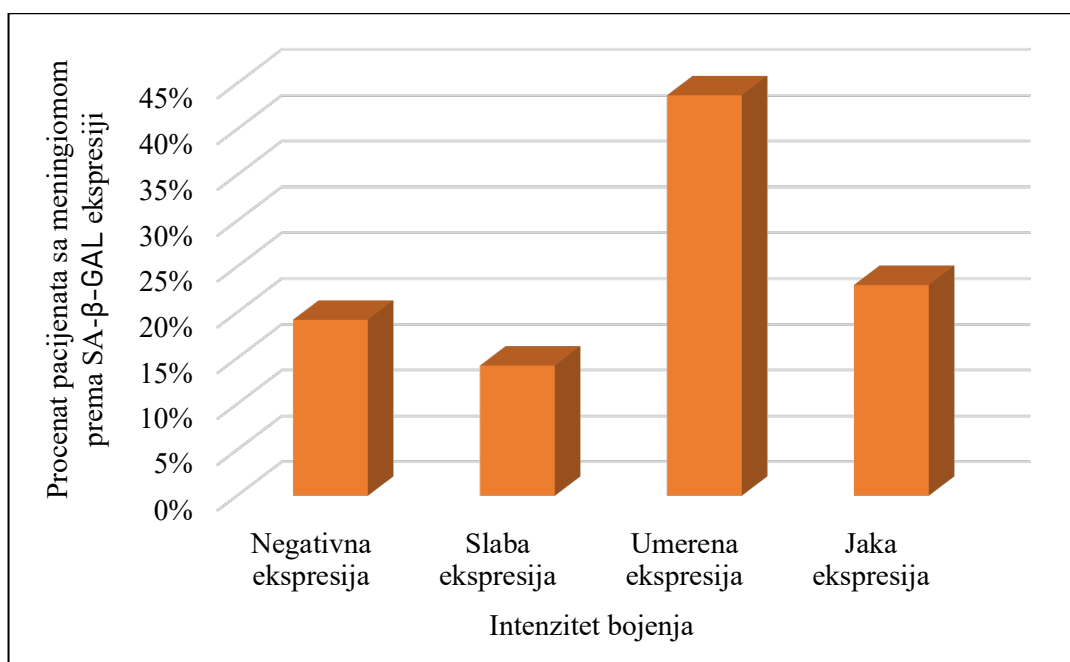
Grafik 5: Distribucija pacijenata sa meningiomom predstavljena prema p16 ekspresiji

Što se tiče p21 ekspresije, većina meningioma je pripadala grupi 2 (80,8 %), a zatim grupi 3 (16,0 %). Mala grupa uzoraka je imala potpunu odsutnost ekspresije (1,9 %), tj. nalazila se u grupi 1, sa (0 %) pozitivnih ćelija na p21 bojenje. Najmanje uzoraka je bilo u grupi 4 (0,9 %) i grupi 5 (0,3 %) (Grafik 6).



Grafik 6: Distribucija pacijenata sa meningiomom predstavljena prema p21 ekspresiji

U analizi SA- $\beta$ -GAL ekspresije, otprilike jedna petina uzoraka (19,2 %) bila je negativna na primenjeno bojenje, dok su ostali uzorci pokazali različite nivoe pozitivnosti, uključujući slabu (14,2 %), umerenu (43,7 %) i jaku (23,0 %) pozitivnost na primenjeno bojenje na SA- $\beta$ -GAL (Grafik 7).



Grafik 7: Distribucija pacijenata sa meningiomom prema SA-β-GAL ekspresiji

#### 4.5. Povezanost ekspresije p16 markera senescencije sa polom i starošću pacijenata, gradusom, lokalizacijom, kao i mitotskom aktivnošću meningioma

Poređena je ekspresije p16 markera senescencije prema polu, Tabela 5 prikazuje rezultate. Razlika u ekspresiji p16 između polova pacijenata s meningiomima nije primećena ( $p = 0,893$ ).

Tabela 5: Poređenje ekspresije p16 markera senescencije predstavljeno prema polu pacijenata

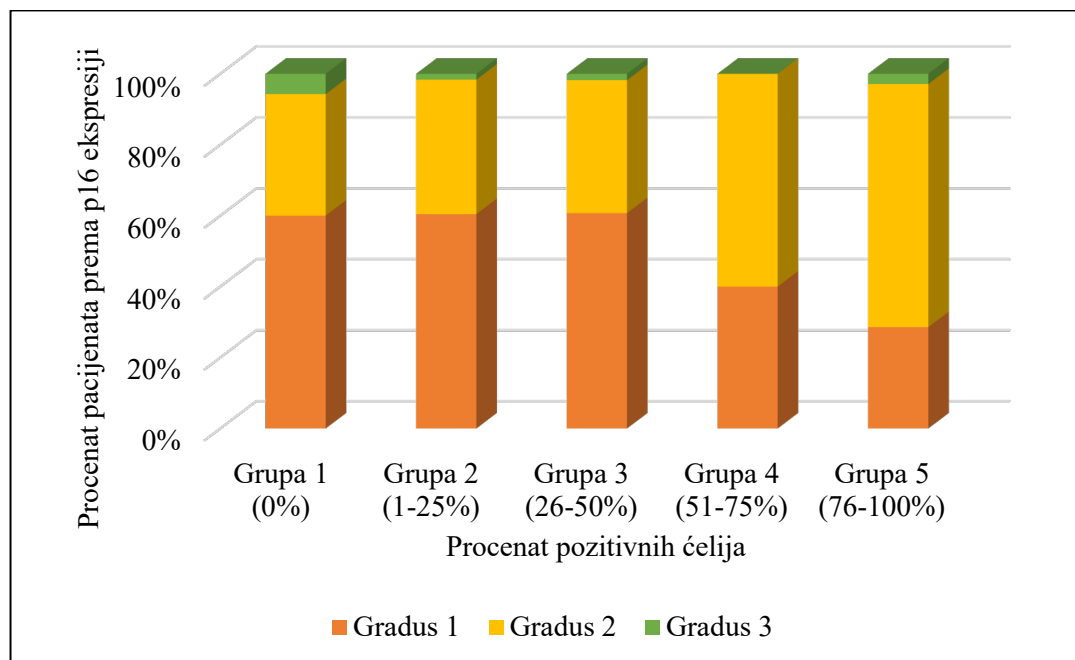
Marker senescencije	Procenat pozitivnih ćelija	Pol		p vrednost
		Muški	Ženski	
		N	N	
p16	Grupa 1 (0 %)	11	24	0,893
	Grupa 2 (1-25 %)	53	129	
	Grupa 3 (26-50 %)	16	40	
	Grupa 4 (51-75 %)	0	10	
	Grupa 5 (76-100 %)	13	22	

Poređena je ekspresija p16 markera senescencije prema gradusu meningioma (Tabela 6) i (Grafik 8). Primećena je pozitivna korelacija statističke značajnosti između gradusa meningioma i ekspresije p16 ( $Rho = 0,135$ ,  $p = 0,016$ ). Analizom razlika između grupa gradusa dobijena je statistički značajna razlika ( $p = 0,019$ ). Statistički značajne razlike primećene su u pogledu ekspresije p16 između meningioma gradusa 1 i meningioma gradusa 2 ( $p = 0,006$ ). Važno je napomenuti da statistička značajnost ostaje čak i uz korišćenje Bonferoni korekcije ( $p = 0,017$ ). Međutim, poređenje ekspresije p16 između meningioma gradusa 1 i gradusa 3, kao i između meningioma gradusa 2 i gradusa 3, nije

pokazalo statističku značajnost ( $p = 0,660$  za prvo pomenuto poređenje,  $p = 0,296$  za drugo pomenuto poređenje).

Tabela 6: Poređenje ekspresije p16 markera senescencije predstavljeno prema gradusu meningioma

Marker senescencije	Procenat pozitivnih ćelija	Gradus meningioma			Razlike između gradusa meningioma
		1	2	3	
		N	N	N	
<b>p16</b>	Grupa 1 (0 %)	21	12	2	H = 7,942 p = 0,019
	Grupa 2 (1-25 %)	110	69	3	
	Grupa 3 (26-50 %)	34	21	1	G1 vs G2 p = 0,006
	Grupa 4 (51-75 %)	4	6	0	G1 vs G3 p = 0,660
	Grupa 5 (76-100 %)	10	24	1	G2 vs G3 p = 0,296



Grafik 8: Poređenje ekspresije p16 markera senescencije predstavljeno prema gradusu meningioma

Pozitivnost p16 u meningiomima nije bila u korelaciji sa lokalizacijom tumora ( $Rho = 0,808$ ,  $p = 0,668$ ). Starost pacijenata nije bila u korelaciji s ekspresijom p16 u meningiomima ( $Rho = 0,043$ ,  $p = 0,449$ ). Broj mitozu u meningiomima pozitivno je korelirao s ekspresijom p16 ( $p < 0,001$ ). Primećena je statistički značajna pozitivna korelacija između gradusa meningioma i ekspresije p16 ( $Rho = 0,135$ ,  $p = 0,016$ ).

#### 4.6. Povezanost ekspresije p21 markera senescencije sa polom i starošću pacijenata, gradusom, lokalizacijom, kao i mitotskom aktivnošću meningioma

Tabela 7 prikazuje rezultate poređenja ekspresije p21 markera senescencije prema polu. Nisu primećene razlike između polova u vezi sa ekspresijom p21 u meningiomima ( $p = 0,315$ ).

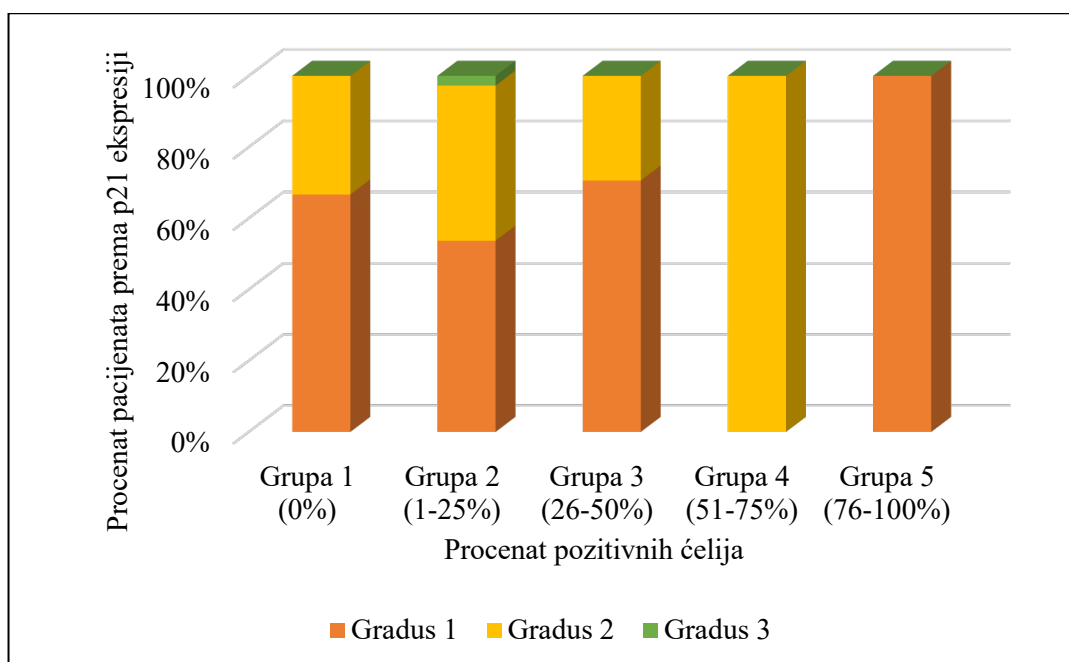
Tabela 7: Poređenje ekspresije p16 markera senescencije predstavljeno prema polu pacijenata

Marker senescencije	Procenat pozitivnih ćelija	Pol		p vrednost
		Muški	Ženski	
		N	N	
p21	Grupa 1 (0 %)	2	4	0,315
	Grupa 2 (1-25 %)	78	179	
	Grupa 3 (26-50 %)	12	39	
	Grupa 4 (51-75 %)	1	2	
	Grupa 5 (76-100 %)	0	1	

Poređena je ekspresija p21 markera senescencije prema gradusu meningioma, Tabela 8 i Grafik 9 pokazuju rezultate. Nisu uočene statistički značajne korelacije ( $Rho = -0,075$ ,  $p = 0,184$ ) i statistički značajne razlike ( $p = 0,327$ ) između gradusa meningioma, a u vezi sa ekspresijom p21.

Tabela 8: Poređenje ekspresije p21 markera senescencije predstavljeno prema gradusu meningioma

Marker senescencije	Procenat pozitivnih ćelija	Gradus meningioma			Razlike između gradusa meningioma
		1	2	3	
		N	N	N	
p21	Grupa 1 (0 %)	4	2	0	H = 2,233 p = 0,327
	Grupa 2 (1-25 %)	138	112	7	
	Grupa 3 (26-50 %)	36	15	0	
	Grupa 4 (51-75 %)	0	3	0	
	Grupa 5 (76-100 %)	1	0	0	



Grafik 9: Poređenje ekspresije p21 markera senescencije predstavljeno prema gradusu meningioma

Nije bila uočena korelacija između ekspresije p21 i starosti pacijenata ( $Rho = 0,059$ ,  $p = 0,292$ ). Slično tome, nije primećena korelacija između ekspresije p21 i broja mitoza ( $p = 0,230$ ). Lokalizacija meningioma nije bila u korelaciji s pozitivnošću na primenjeni marker senescencije p21 ( $Rho = 4,055$ ,  $p = 0,132$ ).

#### 4.7. Povezanost ekspresije SA- $\beta$ -GAL markera senescencije sa polom i starošću pacijenata, gradusom, lokalizacijom, kao i mitotskom aktivnošću meningioma

Poređena je ekspresija SA- $\beta$ -GAL markera senescencije prema polu (Tabela 9). Razlike u ekspresiji SA- $\beta$ -GAL u meningioma nisu primećene između polova ( $p = 0,395$ ).

Tabela 9: Poređenje ekspresije SA- $\beta$ -GAL markera senescencije predstavljeno prema polu pacijenata

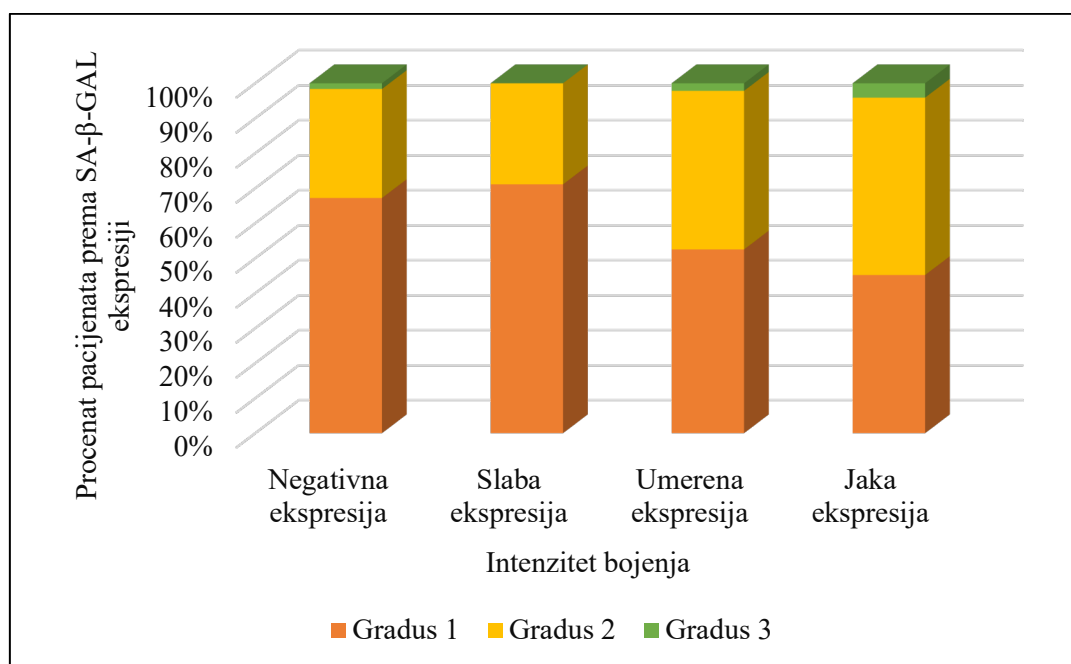
Marker senescencije	Intenzitet bojenja	Pol		p vrednost
		Muški	Ženski	
		N	N	
SA- $\beta$ -GAL	Negativna ekspresija	23	38	0,395
	Slaba ekspresija	10	35	
	Umerena ekspresija	40	99	
	Jaka ekspresija	20	53	

Poređena je ekspresija SA- $\beta$ -GAL markera senescencije prema gradusu meningioma (Tabela 10) i (Grafik 10). Primećena je pozitivna korelacija statističke značajnosti između gradusa meningioma i ekspresije SA- $\beta$ -GAL ( $Rho = 0,176$ ,  $p = 0,002$ ). Analizom razlika između grupa gradusa dobijena je statistički značajna razlika ( $p = 0,007$ ). Meningiomi gradusa 1 i gradusa 2 pokazali su statistički

značajne razlike u pogledu ekspresije SA-β-GAL ( $p = 0,004$ ). Slično kao i u slučaju sa primenjenim markerom senescencije p16, statistička značajnost u vezi sa ekspresijom SA-β-GAL ostaje i nakon upotrebe Bonferroni korekcije ( $p = 0,012$ ). Statistički značajne razlike u ekspresiji SA-β-GAL između meningioma gradusa 1 i gradusa 3, kao i između meningioma gradusa 2 i meningioma gradusa 3 nisu uočene ( $p = 0,117$  za prvo,  $p = 0,406$  za drugo).

Tabela 10: Poređenje ekspresije SA-β-GAL markera senescencije predstavljeno prema gradusu meningioma

Marker senescencije	Intenzitet bojenja	Gradus meningioma			Razlike između gradusa meningioma
		1	2	3	
		N	N	N	
SA-β-GAL	Negativna ekspresija	41	19	1	H = 9,992 p = 0,007
	Slaba ekspresija	32	13	0	G1 vs G2 p = 0,004
	Umerena ekspresija	73	63	3	G1 vs G3 p = 0,117
	Jaka ekspresija	33	37	3	G2 vs G3 p = 0,406



Grafik 10: Poređenje ekspresije SA-β-GAL markera senescencije predstavljeno prema gradusu meningioma

Primećena je pozitivna korelacija statističke značajnosti između SA-β-GAL i starosti pacijenata ( $Rho = 0,214$ ,  $p < 0,01$ ). Korelacija između broja mitoza i ekspresije SA-β-GAL bila je blizu statističke značajnosti ( $p = 0,066$ ). Nije primećena statistički značajna korelacija između pozitivnosti SA-β-GAL i lokalizacije meningioma ( $Rho = 4,273$ ,  $p = 0,118$ ).

#### 4.8. Poređenje ekspresije markera senescencije između različitih histoloških podtipova meningioma

Poređenjem ekspresije p16, p21 i SA- $\beta$ -GAL između različitih histoloških podtipova meningioma gradusa 1 nisu uočene statistički značajne razlike (Tabele 11, 12 i 13). Ova analiza ekspresije pomenutih markera je učinjena između histoloških podtipova meningioma gradusa 1 sa ciljem utvrđivanja uticaja histoloških/morfoloških karakteristika meningioma. Hordoidni meningiomi nisu obuhvaćeni ovom analizom, budući da pripadaju meningiomima gradusa 2.

Tabela 11: Rezultati ispitivanja razlike u ekspresiji p16 između različitih histoloških podtipova meningioma gradusa 1.

<b>Histološki podtipovi meningioma gradusa 1</b>	<b>p vrednost bez korekcionog faktora (Bonferoni)</b>	<b>p vrednost sa korekcionim faktorom (Bonferoni)</b>
angiomatozni-sekretorni	0.844	1.000
angiomatozni-mikrocistični	0.809	1.000
angiomatozni-psamomatozni	0.803	1.000
angiomatozni-tranzicionalni	0.298	1.000
angiomatozni-fibroblastični	0.375	1.000
angiomatozni-meningotelijalni	0.253	1.000
sekretorni-mikrocistični	0.960	1.000
sekretorni-psamomatozni	0.948	1.000
sekretorni-tranzicionalni	0.610	1.000
sekretorni-fibroblastični	0.617	1.000
sekretorni-meningotelijalni	0.473	1.000
mikrocistični-psamomatozni	0.988	1.000
mikrocistični-tranzicionalni	0.688	1.000
mikrocistični-fibroblastični	0.683	1.000
mikrocistični-meningotelijalni	0.539	1.000
psamomatozni-tranzicionalni	0.718	1.000
psamomatozni-fibroblastični	0.709	1.000
psamomatozni-meningotelijalni	0.568	1.000
tranzicionalni-fibroblastični	0.935	1.000
tranzicionalni-meningotelijalni	0.674	1.000
fibroblastični-meningotelijalni	0.779	1.000



Tabela 12: Rezultati ispitivanja razlike u ekspresiji p21 između različitih histoloških podtipova meningioma gradusa 1.

<b>Histološki podtipovi meningioma gradusa 1</b>	<b>p vrednost bez korekcionog faktora (Bonferoni)</b>	<b>p vrednost sa korekcionim faktorom (Bonferoni)</b>
mikrocistični-psamomatozni	0.915	1.000
mikrocistični-fibroblastični	0.798	1.000
mikrocistični-meningotelijalni	0.360	1.000
mikrocistični-angiomatozni	0.250	1.000
mikrocistični-tranzicionalni	0.112	1.000
mikrocistični-sekretorni	0.061	1.000
psamomatozni-fibroblastični	0.905	1.000
psamomatozni-meningotelijalni	0.450	1.000
psamomatozni-angiomatozni	0.331	1.000
psamomatozni-tranzicionalni	0.171	1.000
psamomatozni-sekretorni	0.089	1.000
fibroblastični-meningotelijalni	0.382	1.000
fibroblastični-angiomatozni	0.229	1.000
fibroblastični-tranzicionalni	0.052	1.000
fibroblastični-sekretorni	0.043	0.910
meningotelijalni-angiomatozni	0.795	1.000
meningotelijalni-tranzicionalni	0.444	1.000
meningotelijalni-sekretorni	0.207	1.000
angiomatozni-tranzicionalni	0.613	1.000
angiomatozni-sekretorni	0.270	1.000
tranzicionalni-sekretorni	0.379	1.000

Tabela 13: Rezultati ispitivanja razlike u ekspresiji SA- $\beta$ -GAL između različitih histoloških podtipova meningioma gradusa 1.

Histološki podtipovi meningioma gradusa 1	p vrednost bez korekcionog faktora (Bonferoni)	p vrednost sa korekcionim faktorom (Bonferoni)
meningotelijalni-angiomatozni	0.629	1.000
meningotelijalni-psamomatozni	0.174	1.000
meningotelijalni-fibroblastični	0.021	0.449
meningotelijalni-tranzicionalni	0.004	0.086
meningotelijalni-mikrocistični	0.055	1.000
meningotelijalni-sekretorni	0.004	0.093
angiomatozni-psamomatozni	0.293	1.000
angiomatozni-fibroblastični	0.050	1.000
angiomatozni-tranzicionalni	0.011	0.231
angiomatozni-mikrocistični	0.106	1.000
angiomatozni-sekretorni	0.010	0.214
psamomatozni-fibroblastični	0.742	1.000
psamomatozni-tranzicionalni	0.689	1.000
psamomatozni-mikrocistični	0.680	1.000
psamomatozni-sekretorni	0.283	1.000
fibroblastični-tranzicionalni	0.955	1.000
fibroblastični-mikrocistični	0.868	1.000
fibroblastični-sekretorni	0.321	1.000
tranzicionalni-mikrocistični	0.882	1.000
tranzicionalni-sekretorni	0.275	1.000
mikrocistični-sekretorni	0.506	1.000

#### 4.9. Korelacije između markera senescencije

Analiza korelacije između markera senescencije u celokupnoj kohorti pokazala je statistički značajnu pozitivnu korelaciju između SA- $\beta$ -GAL i p16 (Rho = 0,150, p = 0,008), kao i između SA- $\beta$ -GAL i p21 (Rho = 0,115, p = 0,041). Statistički značajne korelacije između ekspresije p16 i p21 u celokupnoj kohorti nisu primećene (Rho = 0,027, p = 0,638).

Osim toga, analizirana je korelaciju između markera senescencije posebno u svakom od tri gradusa meningioma.

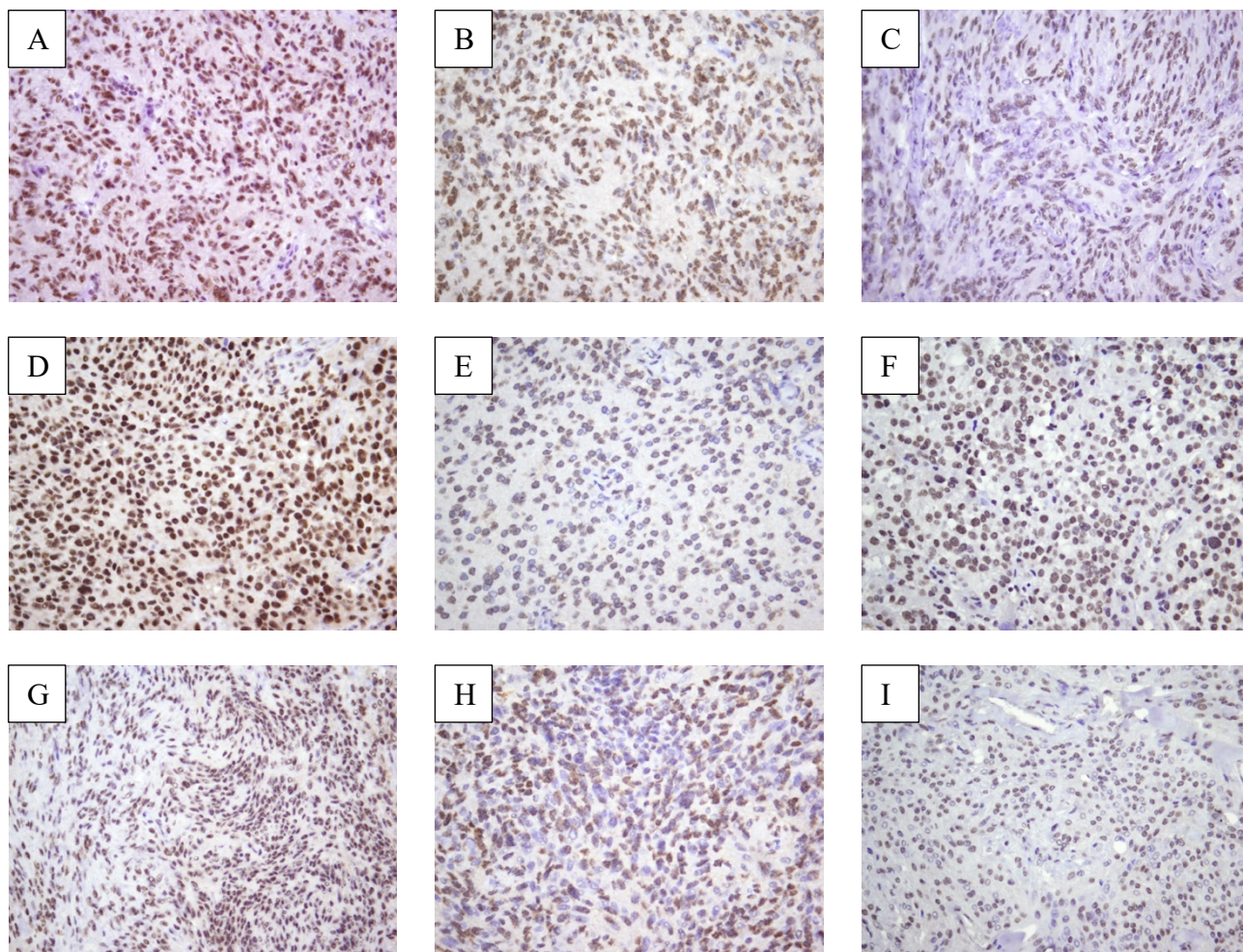
U meningiomima gradusa 1, primećena je statistički značajna pozitivna korelacija između SA- $\beta$ -GAL i p16 (Rho = 0,160, p = 0,033). Korelacija između SA- $\beta$ -GAL i p21 bila je blizu statističke značajnosti, ali formalno odsutna (Rho = 0,143, p = 0,056). U meningiomima gradusa 1 nije primećena korelacija između ekspresije p16 i p21 (Rho = 0,076, p = 0,314).

Što se tiče meningiomima gradusa 2, nijedna od korelacija između primenjenih markera starenja nije dostigla statističku značajnost (SA- $\beta$ -GAL vs. p16: Rho = 0,097, p = 0,266; SA- $\beta$ -GAL vs. p21: Rho = 0,114, p = 0,190; p16 vs. p21: Rho = -0,030, p = 0,732).

Na kraju, korelacija između markera senescencije u meningiomima gradusa 3 nije mogla biti procenjena zbog male veličine uzorka i nedostatka heterogenosti u rezultatima.

#### 4.10. Imunohistohemijska ekspresija markera *Hedgehog* signalnog puta

Analiza ekspresije markera *Hedgehog* signalnog puta pokazala je veliku raznovrsnost. Za markere GLI3, GLI2 i SUFU, a prema procentu pozitivnih (obojenih) ćelija, pet grupa bojenja je definisano: grupa 0 (0 %), grupa 1 (1-25 %), grupa 2 (26-50 %), grupa 3 (51-75 %) i grupa 4 (76-100 %) (Ilustracija 23) i (Tabela 14).

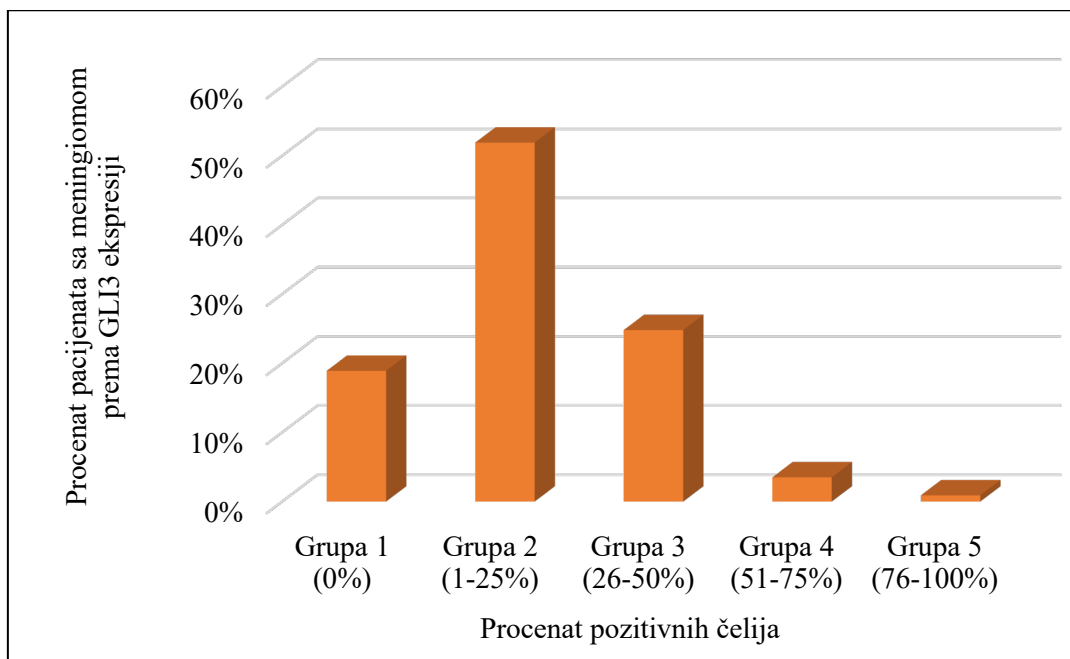


Ilustracija 23 (A-I): Imunohistohemijska ekspresija na GLI2, GLI3 i SUFU A) GLI2 bojenje, meningiom gradus 1, uveličanje 40x. B) GLI2 bojenje, meningiom gradus 2, uveličanje 40x. C) GLI2 bojenje, meningiom gradus 3, uveličanje 40x. D) GLI3 bojenje, meningiom gradus 1, uveličanje 40x. E) GLI3 bojenje, meningiom gradus 2, uveličanje 40x. F) GLI3 bojenje, meningiom gradus 3, uveličanje 40x. G) SUFU bojenje, meningiom gradus 1, uveličanje 40x. H) SUFU bojenje, meningiom gradus 2, uveličanje 40x. I) SUFU bojenje, meningiom gradus 3, uveličanje 40x.

Tabela 14: Ekspresija markera *Hedgehog* signalnog puta (GLI2, GLI3 i SUFU) u meningiomima metodom imunohistohemije

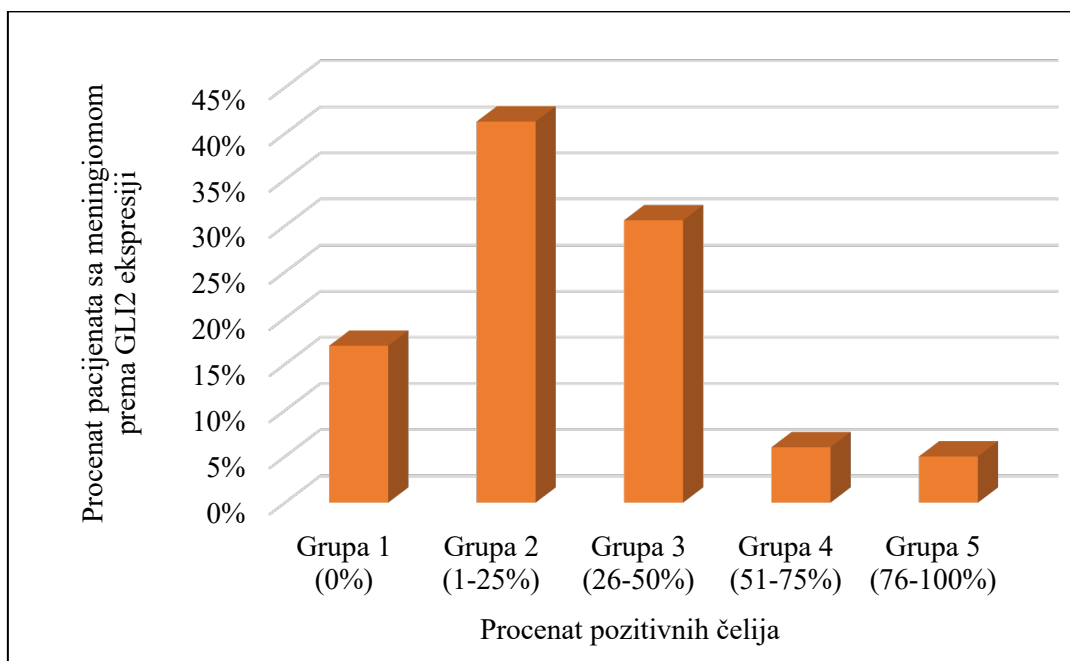
Markeri <i>Hedgehog</i> signalnog puta	Procenat pozitivnih ćelija	N (%)
<b>GLI3</b>	Grupa 1 (0 %)	60 (18,9 %)
	Grupa 2 (1-25 %)	165 (51,9 %)
	Grupa 3 (26-50 %)	79 (24,8 %)
	Grupa 4 (51-75 %)	11 (3,5 %)
	Grupa 5 (76-100 %)	3 (0,9 %)
<b>GLI2</b>	Grupa 1 (0 %)	54 (17,0 %)
	Grupa 2 (1-25 %)	131 (41,3 %)
	Grupa 3 (26-50 %)	97 (30,6 %)
	Grupa 4 (51-75 %)	19 (6,0 %)
	Grupa 5 (76-100 %)	16 (5,0 %)
<b>SUFU</b>	Grupa 1 (0 %)	81 (25,5 %)
	Grupa 2 (1-25 %)	167 (52,5 %)
	Grupa 3 (26-50 %)	66 (20,8 %)
	Grupa 4 (51-75 %)	2 (0,6 %)
	Grupa 5 (76-100 %)	2 (0,6 %)

Ekspresija markera GLI3 bila je sa najvećim brojem pacijenata u grupi 2 (51,9 %), praćena grupom 3 (24,8 %) i potom grupom 1 (18,9 %). Najmanje pacijenata je bilo u grupi 4 (3,5 %) i grupi 5 (0,9 %) (Grafik 11).



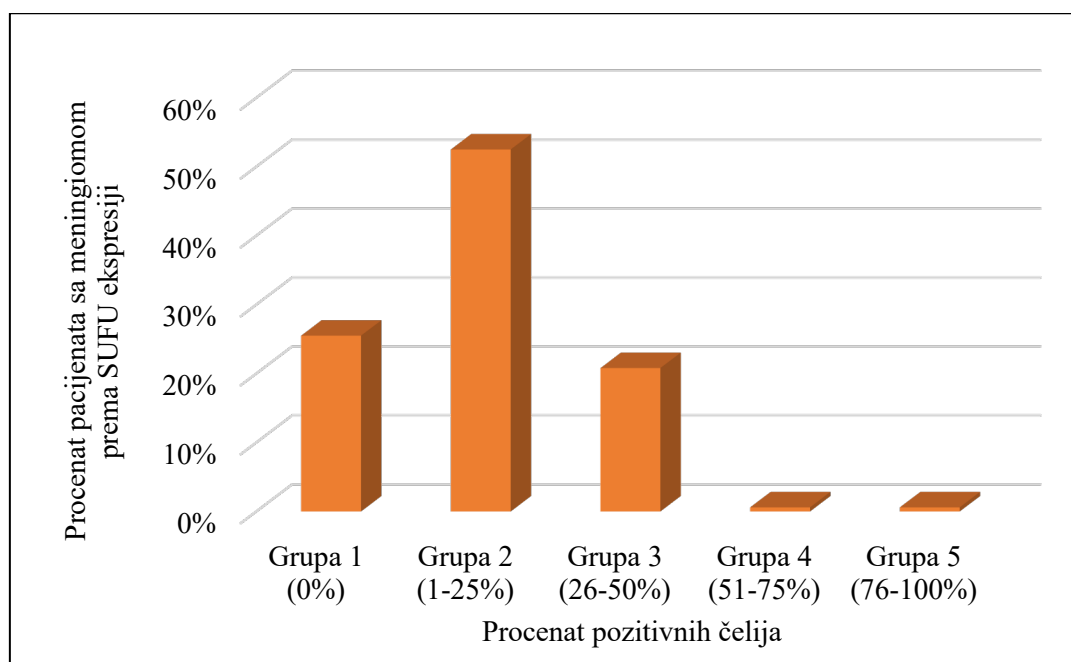
Grafik 11: Distribucija pacijenata sa meningiomom predstavljena prema GLI3 ekspresiji

Ekspresija GLI2 bila sa najvećim udelom pacijenata (41,3 %) takođe iz grupe 2, praćena grupom 3 (30,6 %) i potom grupom 1 (17,0 %). Najmanje pacijenata je i slučaju GLI2 ekspresije bilo u grupi 4 (6,0 %) i grupi 5 (5,0 %) (Grafik 12).



Grafik 12: Distribucija pacijenata sa meningiomom predstavljena prema GLI2 ekspresiji

SUFU ekspresija je i ovde zabeležena najvećim udelom u grupi 1 pacijenata (52,5 %), praćena grupom 0 (25,5 %) i potom grupom 2 (20,8 %). Najmanje pacijenata je i u slučaju SUFU ekspresije bilo u grupama 3 i 4 (u svakoj po 0,6 %) (Grafik 13).



Grafik 13: Distribucija pacijenata sa meningiomom predstavljena prema SUFU ekspresiji

#### 4.11. Povezanost ekspresije GLI3 *Hedgehog* signalnog puta sa polom i starošću pacijenata, gradusom, lokalizacijom, kao i mitotskom aktivnošću meningioma

Poređena je ekspresija GLI3 markera *Hedgehog* signalnog puta prema polu (Tabela 15). Pacijenti muškog pola su pokazali nižu ekspresiju GLI3 u poređenju sa ženskim pacijentima ( $p = 0,002$ ).

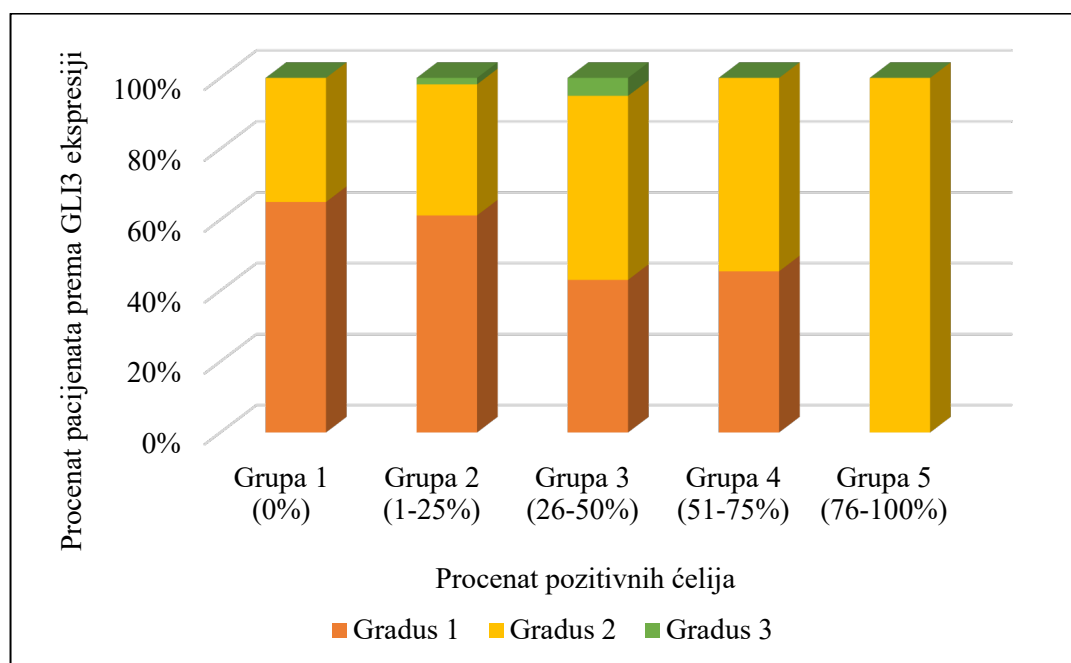
Tabela 15: Poređenje ekspresije GLI3 markera *Hedgehog* signalnog puta predstavljeno prema polu pacijenata

Marker <i>Hedgehog</i> signalnog puta	Procenat pozitivnih ćelija	Pol		p vrednost
		Muški	Ženski	
		N	N	
GLI3	Grupa 1 (0 %)	14	46	0,002
	Grupa 2 (1-25 %)	38	127	
	Grupa 3 (26-50 %)	36	43	
	Grupa 4 (51-75 %)	4	7	
	Grupa 5 (76-100 %)	1	2	

Poređena je ekspresija GLI3 markera *Hedgehog* signalnog puta prema gradusu meningioma (Tabela 16) i (Grafik 14). Uočena je statistički značajna razlika u ekspresiji GLI3 među različitim gradusima meningioma ( $p = 0,003$ ). Post hoc poređenjem otkriveno je da postoji statistički značajna razlika između meningioma gradusa 1 i meningioma gradusa 2 ( $p = 0,010$ ). Isto tako, postoji statistički značajna razlika između meningioma gradusa 1 i meningioma gradusa 3 ( $p = 0,041$ ), dok razlika između meningioma gradusa 2 i meningioma gradusa 3 nije bila statistički značajna ( $p = 0,242$ ).

Tabela 16: Poređenje ekspresije GLI3 markera *Hedgehog* signalnog puta predstavljeno prema gradusu meningioma

Marker <i>Hedgehog</i> signalnog puta	Procenat pozitivnih ćelija	Gradus meningioma			p vrednost
		1	2	3	
		N	N	N	
<b>GLI3</b>	Grupa 1 (0 %)	39	21	0	p = 0,003
	Grupa 2 (1-25 %)	101	61	3	G1 vs G2 p = 0,010
	Grupa 3 (26-50 %)	34	41	4	G1 vs G3 p = 0,041
	Grupa 4 (51-75 %)	5	6	0	
	Grupa 5 (76-100 %)	0	3	0	G2 vs G3 p = 0,242



Grafik 14: Poređenje ekspresije GLI3 markera *Hedgehog* signalnog puta predstavljeno prema gradusu meningioma

Tabela 17 pokazuje poređenje ekspresije GLI3 markera *Hedgehog* signalnog puta prema lokalizaciji. Analiza ekspresije GLI3 u odnosu na lokalizaciju meningioma otkrila je statistički značajne razlike ( $p = 0,016$ ). Post hoc tumačenje rezultata parnih poređenja lokalizacija meningioma u odnosu na ekspresiju GLI3 ukazuje na značajne razlike između određenih grupa. Statistički značajno smanjenje ekspresije GLI3 u spinalnim meningiomima u odnosu na meningiome na konveksitetu ( $p = 0,008$ ). Statistička značajnost ostaje i uz korišćenje Bonferoni korekcije ( $p = 0,024$ ). Takođe postoji statistički značajno smanjenje ekspresije GLI3 u spinalnim meningiomima u odnosu na meningiome bazalne lokalizacije ( $p = 0,005$ , prilagođeni  $p = 0,015$ ). Međutim, nije utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji GLI3 između meningioma na konveksitetu i meningioma baze lobanje ( $p = 0,543$ , Bonferoni korekcija  $p = 1,000$ ).

Tabela 17: Poređenje ekspresije GLI3 markera *Hedgehog* signalnog puta predstavljeno prema lokalizaciji meningioma

Marker <i>Hedgehog</i> signalnog puta	Procenat pozitivnih ćelija	Lokalizacija			p vrednost
		Baza lobanje	Konveksitet	Spinalno	
		N	N	N	
GLI3	Grupa 1 (0 %)	11	40	9	0,016
	Grupa 2 (1-25 %)	45	105	1	
	Grupa 3 (26-50 %)	23	55	1	
	Grupa 4 (51-75 %)	3	7	1	
	Grupa 5 (76-100 %)	0	3	0	

Ispitivana je povezanost GLI3 markera sa starošću, brojem mitozama i gradusom tumora. Nije utvrđena statistički značajna korelacija između ekspresije markera GLI3 i starosti pacijenata ( $Rho = 0,052$ ,  $p = 0,357$ ). Postoji statistički značajna pozitivna korelacija između ekspresije GLI3 i broja mitozama u meningiomima ( $Rho = 0,146$ ,  $p = 0,009$ ). Takođe, uočena je statistički značajna pozitivna korelacija između ekspresije GLI3 i gradusa meningioma ( $Rho = 0,210$ ,  $p < 0,001$ ).

#### 4.12. Povezanost ekspresije GLI2 *Hedgehog* signalnog puta sa polom i starošću pacijenata, gradusom, lokalizacijom, kao i mitotskom aktivnošću meningioma

Poređena je ekspresija GLI2 markera *Hedgehog* signalnog puta prema polu pacijenata (Tabela 18). Nisu zabeležene značajne razlike u ekspresiji GLI2 između pacijenata muškog i ženskog pola ( $p = 0,413$ ).

Tabela 18: Poređenje ekspresije GLI2 markera *Hedgehog* signalnog puta predstavljeno prema polu pacijenata

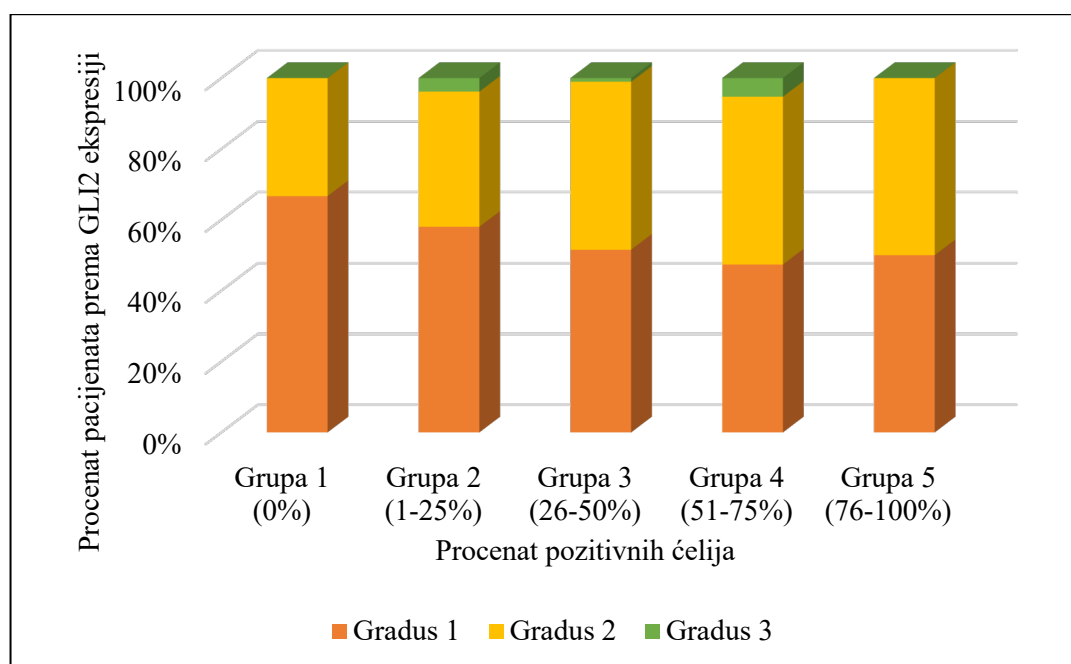
Marker <i>Hedgehog</i> signalnog puta	Procenat pozitivnih ćelija	Pol		p vrednost
		Muški	Ženski	
		N	N	
GLI2	Grupa 1 (0 %)	19	35	0,413
	Grupa 2 (1-25 %)	37	94	
	Grupa 3 (26-50 %)	26	71	
	Grupa 4 (51-75 %)	5	14	
	Grupa 5 (76-100 %)	5	11	

Poređena je ekspresija GLI2 markera *Hedgehog* signalnog puta prema gradusu meningioma (Tabela 19) i (Grafik 15). Analiza ekspresije gena GLI2 nije pokazala statistički značajne razlike prema gradusu meningioma ( $p = 0,124$ ).



Tabela 19: Poređenje ekspresije GLI2 markera *Hedgehog* signalnog puta predstavljeno prema gradusu meningioma

Marker <i>Hedgehog</i> signalnog puta	Procenat pozitivnih ćelija	Gradus meningioma			p vrednost
		1	2	3	
		N	N	N	
GLI2	Grupa 1 (0 %)	36	18	0	0,124
	Grupa 2 (1-25 %)	76	50	5	
	Grupa 3 (26-50 %)	50	46	1	
	Grupa 4 (51-75 %)	9	9	1	
	Grupa 5 (76-100 %)	8	8	0	



Grafik 15: Poređenje ekspresije GLI2 markera *Hedgehog* signalnog puta prema gradusu

(Tabela 20 pokazuje poređenje ekspresije GLI2 markera *Hedgehog* signalnog puta prema lokalizaciji meningioma. Nisu zabeležene značajne razlike u ekspresiji gena GLI2 između različitih lokalizacija meningioma ( $p = 0,251$ ).

Tabela 20: Poređenje ekspresije GLI2 markera *Hedgehog* signalnog puta predstavljeno prema lokalizaciji meningioma

Marker <i>Hedgehog</i> signalnog puta	Procenat pozitivnih ćelija	Lokalizacija			p vrednost
		Baza lobanje	Konveksitet	Spinalno	
		N	N	N	
GLI2	Grupa 1 (0 %)	13	37	4	0,251
	Grupa 2 (1-25 %)	26	93	12	
	Grupa 3 (26-50 %)	34	58	5	
	Grupa 4 (51-75 %)	6	10	3	
	Grupa 5 (76-100 %)	3	11	2	

Ispitivana je povezanost GLI2 markera sa starošću, brojem mitozama i gradusom tumora. Starost pacijenata nije pokazala statistički značajnu korelaciju sa ekspresijom GLI2 ( $Rho = 0,003$ ,  $p = 0,951$ ). Broj mitozama takođe nije pokazao značajnu korelaciju sa ekspresijom GLI2 ( $Rho = 0,087$ ,  $p = 0,123$ ). Analiza u vezi s gradusom tumora takođe nije otkrila značajnu korelaciju s ekspresijom GLI2 ( $Rho = 0,078$ ,  $p = 0,165$ ).

#### 4.13. Povezanost ekspresije SUFU *Hedgehog* signalnog puta sa polom i starošću pacijenata, gradusom, lokalizacijom, kao i mitotskom aktivnošću meningioma

Poređena je ekspresija SUFU markera *Hedgehog* signalnog puta prema polu (Tabela 21). Nema statistički značajne razlike u ekspresiji SUFU između muških i ženskih pacijenata ( $p = 0,353$ ).

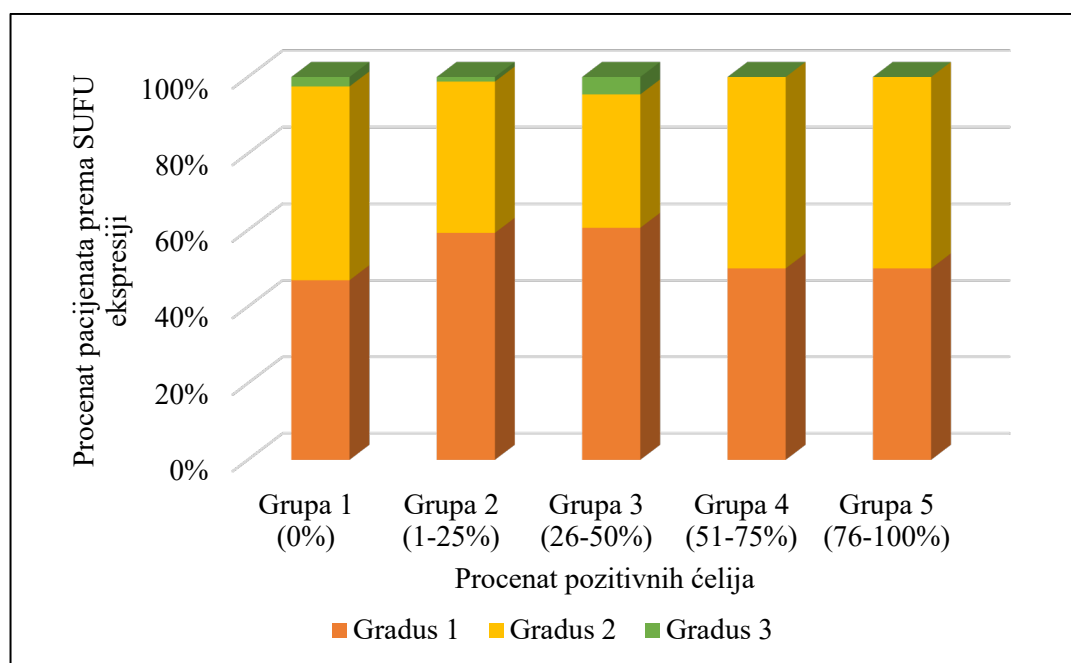
Tabela 21: Poređenje ekspresije SUFU markera *Hedgehog* signalnog puta predstavljeno prema polu pacijenata

Marker <i>Hedgehog</i> signalnog puta	Procenat pozitivnih ćelija	Pol		p vrednost
		Muški	Ženski	
		N	N	
SUFU	Grupa 1 (0 %)	28	53	0,353
	Grupa 2 (1-25 %)	45	122	
	Grupa 3 (26-50 %)	20	46	
	Grupa 4 (51-75 %)	0	2	
	Grupa 5 (76-100 %)	0	2	

Poređena je ekspresija SUFU markera *Hedgehog* signalnog puta prema gradusu (Tabela 22) i (Grafik 16). Nema statistički značajnih razlika u ekspresiji SUFU između različitih gradusa meningioma ( $p = 0,161$ ).

Tabela 22: Poređenje ekspresije SUFU markera *Hedgehog* signalnog puta predstavljeno prema gradusu meningioma

Marker <i>Hedgehog</i> signalnog puta	Procenat pozitivnih ćelija	Gradus meningioma			p vrednost
		1	2	3	
		N	N	N	
SUFU	Grupa 1 (0 %)	38	41	2	0,161
	Grupa 2 (1-25 %)	99	66	2	
	Grupa 3 (26-50 %)	40	23	3	
	Grupa 4 (51-75 %)	1	1	0	
	Grupa 5 (76-100 %)	1	1	0	



Grafik 16: Poređenje ekspresije SUFU markera *Hedgehog* signalnog puta predstavljeno prema gradusu meningioma

Tabela 23 pokazuje poređenje ekspresije SUFU markera *Hedgehog* signalnog puta prema lokalizaciji. Nema statistički značajnih razlika u izražavanju ekspresije SUFU između različitih lokalizacija meningioma ( $p = 0,120$ ).

Tabela 23: Poređenje ekspresije SUFU markera *Hedgehog* signalnog puta predstavljeno prema lokalizaciji tumora

Marker <i>Hedgehog</i> signalnog puta	Procenat pozitivnih ćelija	Lokalizacija			p vrednost
		Baza lobanje	Konveksitet	Spinalno	
		N	N	N	
SUFU	Grupa 1 (0 %)	16	60	5	0,120
	Grupa 2 (1-25 %)	50	106	11	
	Grupa 3 (26-50 %)	15	43	8	
	Grupa 4 (51-75 %)	1	0	1	
	Grupa 5 (76-100 %)	0	1	1	

Ispitivana je povezanost SUFU markera sa starošću, brojem mitozu i gradusom tumora. Nema značajne korelacije između ekspresije SUFU i starosti pacijenata ( $Rho = -0,091$ ,  $p = 0,107$ ). Nema značajne korelacije između ekspresije SUFU i broja mitozu u meningiomima ( $Rho = -0,053$ ,  $p = 0,349$ ). Nema značajne korelacije između ekspresije gena SUFU i gradusa meningioma ( $Rho = -0,081$ ,  $p = 0,149$ ).

#### 4.14. Poređenje ekspresije markera *Hedgehog* signalnog puta između različitih histoloških podtipova meningioma

Poređenjem ekspresije GLI2, GLI3 i SUFU između različitih histoloških podtipova meningioma gradusa 1 su uočene pojedinačne statistički značajne razlike u ekspresiji GLI2 i SUFU, dok u ekspresiji GLI3 nisu uočene (Tabela 24, 25 i 26). U ekspresiji GLI2 dominiraju statistički značajne razlike u poređenju angiomatoznih meningioma, sa jedne strane sa tranzicionalnim i meningotelijalnim meningiomima, sa druge strane (Tabela 25). Prilikom analiza razlika u ekspresiji SUFU između histoloških podtipova meningioma statistički značajne razlike su uočene u poređenju psamomatoznih meningioma, sa jedne strane, sa meningotelijalnim, angiomatoznim i mikrocistinim meningiomima, sa druge strane. Statistički značajne razlike u poređenju ekspresije SUFU su takođe uočene između fibroblastičnih meningioma, sa jedne strane i tranzicionalnih, meningotelijalnih, angiomatoznih i mikrocistinih meningioma, sa druge strane (Tabela 26).

Ova analiza ekspresije pomenutih markera je učinjena između histoloških podtipova meningioma gradusa 1 sa ciljem utvrđivanja uticaja histoloških/morfoloških karakteristika meningioma. Hordoidni meningiomi nisu obuhvaćeni ovom analizom, budući da pripadaju meningiomima gradusa 2.

Tabela 24: Rezultati ispitivanja razlike u ekspresiji GLI3 između različitih histoloških podtipova meningioma gradusa 1.

<b>Histološki podtipovi meningioma gradusa 1</b>	<b>p vrednost bez korekcionog faktora (Bonferoni)</b>	<b>p vrednost sa korekcionim faktorom (Bonferoni)</b>
meningotelijalni-angiomatozni	0.738	1.000
meningotelijalni-psamomatozni	0.651	1.000
meningotelijalni-mikrocistični	0.634	1.000
meningotelijalni-sekretorni	0.589	1.000
meningotelijalni-tranzicionalni	0.378	1.000
meningotelijalni-fibroblastični	0.140	1.000
angiomatozni-psamomatozni	0.822	1.000
angiomatozni-mikrocistični	0.811	1.000
angiomatozni-sekretorni	0.771	1.000
angiomatozni-tranzicionalni	0.586	1.000
angiomatozni-fibroblastični	0.215	1.000
psamomatozni-mikrocistični	0.998	1.000
psamomatozni-sekretorni	0.977	1.000
psamomatozni-tranzicionalni	0.934	1.000
psamomatozni-fibroblastični	0.524	1.000
mikrocistični-sekretorni	0.979	1.000
mikrocistični-tranzicionalni	0.934	1.000
mikrocistični-fibroblastični	0.508	1.000
sekretorni-tranzicionalni	0.958	1.000
sekretorni-fibroblastični	0.499	1.000
tranzicionalni-fibroblastični	0.328	1.000

Tabela 25: Rezultati ispitivanja razlike u ekspresiji GLI2 između različitih histoloških podtipova meningioma gradusa 1.

<b>Histološki podtipovi meningioma gradusa 1</b>	<b>p vrednost bez korekcionog faktora (Bonferoni)</b>	<b>p vrednost sa korekcionim faktorom (Bonferoni)</b>
angiomatozni-mikrocistični	0.348	1.000
angiomatozni-fibroblastični	0.087	1.000
angiomatozni-psamomatozni	0.183	1.000
angiomatozni-tranzicionalni	0.002	0.037
angiomatozni-sekretorni	0.036	0.763
angiomatozni-meningotelijalni	0.003	0.064
mikrocistični-fibroblastični	0.752	1.000
mikrocistični-psamomatozni	0.719	1.000
mikrocistični-tranzicionalni	0.341	1.000
mikrocistični-sekretorni	0.389	1.000
mikrocistični-meningotelijalni	0.201	1.000
fibroblastični-psamomatozni	0.901	1.000
fibroblastični-tranzicionalni	0.373	1.000
fibroblastični-sekretorni	0.473	1.000
fibroblastični-meningotelijalni	0.203	1.000
psamomatozni-tranzicionalni	0.667	1.000
psamomatozni-sekretorni	0.648	1.000
psamomatozni-meningotelijalni	0.419	1.000
tranzicionalni-sekretorni	0.869	1.000
tranzicionalni-meningotelijalni	0.474	1.000
sekretorni-meningotelijalni	0.738	1.000

Tabela 26: Rezultati ispitivanja razlike u ekspresiji SUFU između različitih histoloških podtipova meningioma gradusa 1.

Histološki podtipovi meningioma gradusa 1	p vrednost bez korekcionog faktora (Bonferoni)	p vrednost sa korekcionim faktorom (Bonferoni)
psamomatozni-fibroblastični	0.809	1.000
psamomatozni-sekretorni	0.369	1.000
psamomatozni-tranzicionalni	0.107	1.000
psamomatozni-meningotelijalni	0.043	0.903
psamomatozni-angiomatozni	0.029	0.609
psamomatozni-mikrocistični	0.032	0.671
fibroblastični-sekretorni	0.385	1.000
fibroblastični-tranzicionalni	0.035	0.736
fibroblastični-meningotelijalni	0.015	0.305
fibroblastični-angiomatozni	0.006	0.126
fibroblastični-mikrocistični	0.016	0.346
sekretorni-tranzicionalni	0.576	1.000
sekretorni-meningotelijalni	0.253	1.000
sekretorni-angiomatozni	0.197	1.000
sekretorni-mikrocistični	0.165	1.000
tranzicionalni-meningotelijalni	0.318	1.000
tranzicionalni-angiomatozni	0.205	1.000
tranzicionalni-mikrocistični	0.205	1.000
meningotelijalni-angiomatozni	0.913	1.000
meningotelijalni-mikrocistični	0.626	1.000
angiomatozni-mikrocistični	0.672	1.000

#### 4.15. Korelacije između markera *Hedgehog* signalnog puta

Ispitivanjem korelacije elemenata *Hedgehog* signalnog puta, GLI2, GLI3 i SUFU uočena je statistički značajna pozitivna korelacija između GLI2 i GLI3 (koeficijent korelacije 0,201, p manje od 0,001), kao i statistički značajna pozitivna korelacija između ekspresije SUFU i GLI2 u celoj kohorti meningioma (koeficijent korelacije 0,239, p manje od 0,001).

## 5. Diskusija

U ovom istraživanju ispitivali smo ulogu senescencije i elemenata *Hedgehog* signalnog puta u meningiomima, na kohorti od 318 meningioma, među kojima se nalaze meningiomi histološkog gradusa 1, 2 i 3, koristeći tkivne mikronizove i imunohistohemiju.

Senescencija je ispitivana primenom najčešće korišćenih markera senescencije SA- $\beta$ -GAL, p16 i p21 (62). Uočeno je povećanje ekspresije dva od tri primenjena markera senescencije, SA- $\beta$ -GAL i p16, kod meningioma gradusa 2, u poređenju sa meningiomima gradusa 1, što ukazuje na aktivaciju senescencije sa porastom gradusa meningioma. Ekspresija SA- $\beta$ -GAL je pozitivno korelirala sa godinama starosti pacijenata. Ekspresija markera senescencije nije bila u korelaciji sa lokalizacijom meningioma (95).

Senescencija je izuzetno kompleksan proces za čije istraživanje i detekciju je neophodna primena većeg broja markera, kao što je učinjeno u našem istraživanju (62,96). Problematika ispitivanja senescencije ogleda se u činjenici da nijedan od markera koji se može primeniti, poput markera korišćenih u ovom istraživanju nije niti specifičan, niti senzitivn samo za proces senescencije, već se detektuje i okviru drugih bioloških i biohemijskih, kako fizioloških, tako i patoloških procesa unutar ćelija (62,96).

Najnovija istraživanja predlažu razmatranje tradicionalnih parametara koji se analiziraju prilikom gradiranja meningioma (broj mitoza, invazija moždanog parenhima i dr.) i uvođenje markera senescencije p16, kao surogata homozigotne delecije CDKN2A/B u gradiranju meningioma. Na ovakav predlog ukazuju brojna skorašnja istraživanja, sprovedena različitim sofisticiranim metodama molekularne biologije (reakcija lančane polimerizacije, sekvencioniranje nove generacije i sl.), koje pokazuju da je kod meningioma agresivnog biološkog ponašanja, nezavisno od histološkog gradusa i njegove lokalizacije, detektovana homozigotna delecija CDKN2A/B (97–101).

Iako se meningiomi češće sreću kod žena, nije uočena statistički značajna razlika u ekspresiji p16 između polova kako u ovom istraživanju, tako i u prethodnim istraživanjima (20,98,99). Senescencija je proces koji može i ne mora biti povezan sa procesom starenja (62). Odsustvo korelacije ekspresije markera p16 sa uzrastom pacijenata u ovom istraživanju ukazuje da je p16 (produkt gena CDKN2A/B, lokalizovanog na hromozomu 9) nezavisni marker senescencije u tkivu meningioma u svim uzrastima. Sa druge strane, treba imati u vidu da su uzrast pacijenata i abnormalnosti hromozoma 14, koji su uočeni u pojedinim radovima, nezavisni prognostički faktori dužeg preživljavanja kod pacijenata lečenih od meningioma (102,103).

Jedan od markera senescencije p16, je dobro poznat inhibitor ciklin zavisne kinaze koji dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G1 fazi. Smatra se da je senescencija primarno uzrokovana aktivacijom pomenutog markera (104). Povećanjem inteziteta i ekstenzivnosti imunohistohemijske pozitivnosti na p16 ukazuje na povećanje aktivnosti ovog markera i tendenciju tumorskog tkiva da zaustavi ćelijski ciklus i potencijalno aktivira senescenciju. Sa druge strane, smanjenje aktivnosti markera senescencije p16 ukazuje na smanjenje aktivnosti gena uključenih u regulaciju senescencije i SASP, što dovodi do inhibicije procesa senescencije (105). Pored pomenutog, gubitak ekspresije p16 bi se mogao posmatrati i kao surogat delecije/mutacije gena CDKN2A, vodeći ka nemogućnosti zaustavljanja ćelijskog ciklusa, promovišući progresiju tumora u viši gradus i na taj način zaobilazeći aktivaciju senescencije (106,107). Istraživanje koje je sprovedeno u okviru ove doktorske disertacije je pokazalo statistički značajan porast ekspresije p16 kod meningioma gradusa 2, u poređenje sa meningiomima gradusa 1. Takođe je uočena slabo pozitivna korelacija između ekspresije p16 i gradusa meningioma, što je u skladu sa skorašnjim istraživanjem u kome je pokazano da su meningiomi gradusa 1 većinom p16 negativni, većina meningioma gradusa 2 su p16 pozitivni, a da se maligna



transformacija u meningiome gradusa 3, praćena veoma agresivnim biološkim ponašanjem karakteriše ponovnim gubitkom pozitivnosti na p16 marker senescencije (106). Odsustvo statistički značajne razlike u ekspresiji p16 između meningioma gradusa 1 i gradusa 3, kao i između meningioma gradusa 2 i gradusa 3 bi mogla pre svega biti objašnjena vrlo malim brojem meningioma gradusa 3 u ovom istraživanju. Dominantan razlog za mali broj meningioma gradusa 3 u ovom istraživanju je što su oni izuzetno retki, uprkos velikom broju operacija meningioma, ne samo na klinici za neurohirurgiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije, kao najvećeg centra za neurohirurgiju u Srbiji, nego i na svetskom nivou (17,108). Pozitivnost markera p16 kod meningioma gradusa 2 bi mogla biti objašnjena aktivacijom senescencije sa ciljem onemogućavanja progresije tumora ka višem gradu, tj. malignoj transformaciji. Uticaj inaktivacije i/ili blokade senescencije u malignoj transformaciji meningioma se može uočiti kroz negativno bojenje na p16 u malignim meningiomima (meningiomi gradusa 3). Ovaj podatak podržava i stav da se imunohistohemijsko bojenje na p16 može koristiti kao surogat homozigotne delecije CDKN2A (106). Budući da su se kriterijumi za gradiranje meningioma promenili, a da neki od njih nisu dostupni u materijalu za histopatološku analizu (ovaj podatak se naročito odnosi na prisustvo sitnih fragmenata moždanog parenhima i njegovu invaziju meningiomom), imunohistohemijsko bojenje na p16 bi u tom slučaju moglo biti korisno kod meningioma gradusa 1 koji nisu u potpunosti hiruški resektabilni. Ova pozitivnost bi ukazivala na potencijal takvog tumora ka malignoj transformaciji, kao i na potrebu za intenzivnim praćenjem i češćim kontrolama kod takvih pacijenata.

Marker senescencije SA- $\beta$ -GAL je prvi prepoznati marker senescencije za čiju detekciju je primarno korišćeno histohemijsko bojenje (109). Istovremeno, SA- $\beta$ -GAL pozitivnost se fiziološki uočava u tkivu starijih osoba što otežava razlikovanje senescencije od starenja, još jednom stavljajući akcenat na međusobnu isprepletanost i udruženost dva procesa, senescencije i starenja. Vođeni prethodno pomenutim, pozitivnost SA- $\beta$ -GAL u ovom istraživanju bi se mogla objasniti i aktivacijom senescencije i uzrastom (starošću) pacijenata. SA- $\beta$ -GAL pozitivnost je bila intenzivnija u meningiomima gradusa 2, u poređenju sa meningiomima gradusa 1, što ukazuje na inaktivaciju senescencije. Slični rezultati su dobijeni i u skorašnjem istraživanju na ćelijskim kulturama malignih meningioma (92,110). Istovremeno, u ovom istraživanju je uočena pozitivna korelacija ekspresije SA- $\beta$ -GAL sa starošću pacijenata, što ukazuje da je i proces starenja povezan sa SA- $\beta$ -GAL ekspresijom. Ispitivanje pozitivnosti SA- $\beta$ -GAL u meningiomima bi moglo imati značaj u proceni potencijalnih terapijskih efekata, imajući u vidu da su pojedini senolitički agensi konjugovani sa SA- $\beta$ -GAL. Ovakav terapijski pristup bi mogao dovesti do smrti ćelija u kojima je aktiviran proces senescencije (71). Na značaj markera SA- $\beta$ -GAL u aktivaciji senescencije kod meningioma ukazuje i rezultat ovog istraživanja o pozitivnoj korelaciji ekspresije SA- $\beta$ -GAL sa gradusom meningioma. Slično kao i sa p16 i p21, nije uočena statistički značajna razlika u ekspresiji SA- $\beta$ -GAL između polova, što ukazuje da je SA- $\beta$ -GAL još samo jedan od brojnih faktora kojim se ne može objasniti veća incidenca meningioma kod žena i češće agresivno biološko ponašanje meningioma kod muškaraca (111). Odsustvo korelacije ekspresije SA- $\beta$ -GAL sa lokalizacijom meningioma ukazuje na to da aktivacija senescencije najverovatnije nije povezana sa njihovom lokalizacijom, kao što je to slučaj sa brojnim drugim genskim alteracijama (112,113).

Marker p21 je dobro poznati inhibitor CDKN. Ova njegova funkcija dolazi do izražaja u procesu senescencije, tako što inhibira progresiju ćelijskog ciklusa (114,115). U ovom istraživanju je uočen blag porast ekspresije p21 u meningiomima gradusa 2 u poređenju sa meningiomima gradusa 1, no pomenuta razlika nije dostigla statističku značajnost, što ne govori u prilog aktivacije senescencije preko p21 puta. Rezultati ove disertacije su u skladu sa prethodnim istraživanjima u pogledu ekspresije p21 u meningiomima, u kojima je zaključeno da se p21 pozitivnost retko opaža u meningiomima gradusa 2 (116,117). Interesantan je podatak da je u prethodno navedenim studijama uočena povezanost rekurencije meningioma i gubitka p21 pozitivnosti, što bi moglo da objasni protektivni efekat aktivacije senescencije kod meningioma gradusa 2. Meta analiza ukazuje na slične rezultate, da je slabija ekspresija p21 u meningiomima povezana sa kraćim periodom bez rekurencije

meningioma, nezavisno od njihovog gradusa (118). Odsustvo razlike u ekspresiji p21 u meningiomima između polova bi moglo da ukaže da p21 nije uključen u mehanizme koji dovode do češćeg biološki agresivnog ponašanja meningioma kod muškaraca (119–121). Odsustvo korelacije uzrasta pacijenata sa ekspresijom p21 upućuje da bi se p21 mogao posmatrati kao isključivi marker senescencije, za razliku od SA- $\beta$ -GAL, čija ekspresija u brojnim tkivima, kako fiziološki, tako i patološki, može biti uzrokovana starenjem (122). Odsustvo korelacija ekspresije p21 i broja mitozata je pomalo neočekivan rezultat, budući da je p21, kao inhibitor ciklin zavisne kinaze uključen u regulaciju ćelijskog ciklusa i broja mitozata. Ipak, ćelijski ciklus je izuzetno kompleksan fenomen koji zavisi od velikog broja faktora, tako da bi se moglo zaključiti da u tkivu meningioma dinamika ćelijskog ciklusa, sagledana kroz mitotsku aktivnost, najverovatnije nije povezana sa p21 (123,124). Već je pomenuto da meningiome različitih lokalizacija karakteriše različit spektar genetskih alteracija (125). Rezultati ovog istraživanja ukazuju da p21 pozitivnost ne korelira sa lokalizacijom meningioma, što je u skladu sa ranijim istraživanjima gde je uočeno da alteracije gena CDKN1A, čiji je produkt p21, ne spadaju u alteracije koje karakterišu meningiome određenih lokalizacija (126,127).

Senescencija je veoma kompleksan proces za čiju detekciju je neophodna primena većeg broja markera (62). U ovom istraživanju, u kome su korišćena tri markera senescencije, bi se moglo zaključiti da dolazi do aktivacije senescencije u meningiomima gradusa 2, budući da je statistički značajno pojačana ekspresija dva od tri primenjena markera senescencije u meningiomima gradusa 2 u poređenju sa meningiomima gradusa 1. Kao što je prethodno pomenuto, potencijalna aktivacija senescencije u meningiomima gradusa 2 bi se mogla posmatrati kao pokušaj zaustavljanja agresivnog biološkog ponašanja tumora u svojoj transformaciji u malignu formu tumora tj. meningiom gradusa 3. Iz ovog razloga, imunohistohemijska detekcija senescencije u meningiomima gradusa 2 dijagnostikovanim prema SZO kriterijumima bi mogla da se koristi kao prediktivni marker koji govori u prilog manje agresivnog biološkog ponašanja tumora. Ovo zapažanje se naročito odnosi na neresektabilne tumore, imajući u vidu da je gubitak ekspresije pojedinih markera senescencije primećen kod meningioma sa agresivnim biološkim ponašanjem nezavisno od njihovog gradusa (106).

Imunohistohemija je dostupna i relativno jeftina metoda koja se koristi u svakodnevnoj praksi u patologiji. Analiza teragnostičkih markera metodom imunohistohemije je takođe svakodnevna praksa (128,129). Imajući u vidu skorašnju ekspanziju primene senolitičkih agenasa i ciljane senolitičke terapije u brojnim sistemima organa, kao i činjenicu da senescencija može biti indukovana u ćelijama malignih meningioma u ćelijskim kulturama, detekcija senescencije metodom imunohistohemije bi mogla u budućnosti imati teragnostički značaj, naročito kod neresektabilnih meningioma i/ili kod meningioma kod kojih i nakon hirurškog tretmana dolazi do pojave recidiva (71). Ovakvim terapijskim pristupom bi se mogla indukovati nekroza ili apoptoza ćelija meningioma sa aktiviranim procesom senescencije, što bi dovelo do redukcije volumena tumora (72,130–132).

Ispitivanje korelacija ekspresije markera je od velikog značaja prilikom analiziranja procesa koji se detektuju pomoću više markera. Prethodno smo pomenuli, da detekcija senescencije isključivo zavisi od primene većeg broja markera (62). U ovom istraživanju je uočena značajna pozitivna korelacija najstarijeg markera senescencije SA- $\beta$ -GAL sa druga dva primenjena markera, p16 i p21, kada je analizirana cela kohorta. Interesantno je napomenuti da kada su analizirane korelacije markera senescencije po gradusima meningioma, pozitivna korelacija između SA- $\beta$ -GAL i p16 je jedina koja je očuvala statističku značajnost, dok je korelacija između SA- $\beta$ -GAL i p21 bila blizu statističke značajnosti. Ovi rezultati ukazuju na veliki značaj uzajmnog dejstva između SA- $\beta$ -GAL sa jedne strane i p16 i p21 sa druge strane u održavanju senescencije u meningiomima. Takođe je interesantno, da nije uočena statistički značajna korelacija između p16 i p21, što takođe potvrđuje i naglašava značaj upotrebe većeg broja markera u procesu prepoznavanja aktivacije senescencije (62). Razlike u genetskim alteracijama i mutacijama između meningioma lokalizovanih parasagitalno, na bazi mozga i spinalno je dobro dokumentovana i poznata (20,133). Sa tim u vezi bitno je naglasiti, da nisu

uočene statistički značajne razlike u ekspresiji markera senescencije između meningioma lokalizovanih na bazi lobanje, meningioma moždanih konveksiteta i spinalno lokalizovanih meningiomima. Ovakvi rezultati ukazuju, da aktivacija senescencije najverovatnije ne zavisi od lokalizacije tumora, kao što je to slučaj sa genetskim alteracijama.

Kriterijumi za gradiranje meningioma su se značajno promenili u najnovijoj klasifikaciji SZO, u poređenju sa prethodnim izdanjem (18–20). Među kriterijumima se ističe mitotska aktivnost, čiji su značaj i vrednosti zadržane u poslednjoj (aktuelnoj) SZO klasifikaciji. Bitno je nagasiti da je mitotska aktivnost nezavisan parametar za gradiranje meningioma, za razliku od bestrukturnog rasta, fokusa spontane tumorske nekroze, fokusa sitnoćelijske komponente i prominentnih nukleolusa, koji se moraju uočiti u većem broju da bi meningiom dobio gradus 2. Dodeljivanje gradusa 3 meningiomu isključivo zavisi od njegove mitotske aktivnosti (18–20). Sa aspekta aktivacije senescencije, smanjena mitotska aktivnost se može uzeti u obzir kao jedan od značajnih faktora u aktivaciji senescencije, iako još uvek nije prepoznat pouzdan marker za identifikaciju zaustavljanja ćelijskog ciklusa u procesu senescencije (61,63,134,135). Rezultati ovog istraživanja, u kome su dva od tri primenjena markera senescencije (SA- $\beta$ -GAL i p16) bila u pozitivnoj korelaciji sa mitotskom aktivnošću, ne ukazuju da bi broj mitozama mogao biti sagledan kao marker aktivacije senescencije u meningiomima. Ipak, rezultati ovog istraživanja bi mogli delimično biti objašnjeni saznanjima brojnih naučnih radova, da ćelije u kojima je aktivirana ćelijska senescencija mogu da zaobiđu stanje ireverzibilnog zaustavljanja ćelijskog ciklusa i posledično aktiviraju ćelijski ciklus (53,136–142).

Većina do sada objavljenih istraživanja i iz njih proisteklih naučnih radova koji su ispitivali aktivaciju senescencije u meningiomima je bio sproveden na ćelijskim kulturama (92,110,143,144). Posledično, značaj ovog istraživanja se ogleda u tome što je ono sprovedeno na tkivu meningioma humanog porekla. Ovim istraživanjem je uočena aktivacija senescencije u tkivu meningioma gradusa 1 što naglašava potencijalnu upotrebu senolitičkih agenasa kod hiruški neresektibilnih meningioma. Ipak, treba imati u vidu i nedostatak ove studije, koji se ogleda u malom broju malignih meningioma, tj. meningioma gradusa 3, što je onemogućilo pouzdanu analizu aktivacije senescencije u pomenutim, malignim meningiomima.

Jedna od osnovnih histoloških karakteristika meningioma, koja istovremeno otežava njihovu patohistološku dijagnostiku je izuzetna morfološka heterogenost. Ova heterogenost se ogleda u pristvu velikog broja histoloških podtipova meningioma naročito u meningiomima gradusa 1. Uprkos histološkoj heterogenosti, biološko ponašanje svih podtipova meningioma je veoma slično, ako ne i isto. Poređenjem ekspresije sva tri markera senescencije, u ovom istraživanju, p16, p21 i SA- $\beta$ -GAL, koje je sprovedeno između svih histoloških podtipova meningioma nije uočena nijedna statistički značajna razlika. Ovakvi rezultati podržavaju već dobro poznate činjenice i teorije, da histološka građa meningioma gradusa 1 ne utiče na njihovo biološko ponašanje, na koje bi, između ostalog, mogla ukazati i statistički značajna razlika u ekspresiji markera senescencije. Ovo istraživanje predstavlja jedno od veoma retkih istraživanja na temu ispitivanja ekspresije različitih biomarkera senescencije između histoloških podtipova meningioma što mu daje posebno specifičnu težinu i značaj. U jednom od radova je ispitivana ekspresija p16, markera senescencije, u samo nekoliko histoloških podtipova meningioma, gde kao i u našem istraživanju nisu uočene statistički značajne razlike u ekspresiji ovog markera (145).

Rezultati ispitivanja aktivacije elemenata *Hedgehog* signalnog puta u tkivu meningioma ističu značaj GLI3, budući da se njegova ekspresija povećava sa gradusom meningioma, značajno je izraženija kod meningioma pacijenata muškog pola, a razlike u ekspresiji su potencijalno povezane sa lokalizacijom meningioma, budući da su uočene između intrakranijalnih i spinalno lokalizovanih meningioma.

SUFU je glavni negativni regulator *Hedgehog* signalnog puta u humanom materijalu (146). Pored značajne aktivacije tokom embriogeneze, SUFU je uključen i povezan sa tumorigenezom meduloblastoma, glioblastoma i bazocelularnih karcinoma (84,147,148). SUFU svoje efekte na *Hedgehog* signalni put ostvaruje dominantno kroz vezivanje za transkripcione faktore GLI1, GLI2 i GLI3. SUFU se vezuje za GLI proteine svojim visoko konzerviranim C-terminusom, dok se N-terminusom vezuje za C-terminus GLI1 proteina. Vezivanjem za GLI proteine, SUFU onemogućava njihov transport u jedro i promovira njihovu degradaciju (149–151). Gubitak funkcije SUFU, je opisan kod familijarnih slučajeva meningioma koji nastaje kao posledica „germline“ mutacije u delu molekula proteina koji ima tumor-supresorsku funkciju (84). Relativno niska ekspresija SUFU u ovom istraživanju bi se mogla objasniti činjenicom da je gen koji kodira SUFU lokalizovan na dugom kraku hromozoma 10, čija se delecija sreće u oko 10 % meningioma dovodeći do gubitka funkcije SUFU u meningiomima (18–20,152). Bitno je naglasiti da delecija dugog kraka hromozoma 10, na kome se nalazi gen koji kodira SUFU, nije prepoznata kao značajan faktor tumorigeneze meningioma, već kao prognostički faktor (152).

Odsustvo statistički značajne rezlike u ekspresiji SUFU između gradusa meningioma u ovom istraživanju, kao i odsustvo statistički značajne korelacije između gradusa meningioma i ekspresije SUFU nisu u skladu sa skorašnjim istraživanjem u kome je uočen značajno veći broj mutacija SUFU gena kod malignih meningioma (gradusa 3) u poređenju sa meningiomima gradusa 1 i 2 (153). Razlike u rezultatima ove disertacije i navedenog istraživanja bi se pre svega mogle objasniti metodološkim razlikama (153). Metoda sekvenciranja nove generacije spada u visoko sofisticirane metode, dok je imunohistohemija, koja je korišćena u ovoj disertaciji, robustna metoda, koja ne može da detektuje diskretne promene u mutiranim proteinima. Ipak, činjenica da je antitelo anti-SUFU, koje je korišćeno u ovom istraživanju poliklonalno, ne govori u prilog ovog objašnjenja. Poliklonalno antitelo bi trebalo da „pokrije“ sve epitope proteina SUFU i posleđično, bude odraz prisustva mutiranog molekula za koje ne može da se veže poliklonalno antitelo, konstruisano prema eitopima nemutiranog/divljeg gena.

Metilaciono profilisanje svih tumora mozga je preporuka za dijagnostiku većine tumora prema preporukama Svetske zdravstvene organizacije. U slučaju meningioma, metilaciono profilisanje je prepoznato kao značajniji prognostički faktor u poređenju sa prepoznavanjem pojedinih mutacija (154). Poznato je da je metilacija DNK relativno stabilna epigenetička promena koja se događa tokom tumorigeneze i jedan je od moćnijih mehanizama za inhibiciju ekspresije proteina, uprkos odsustvu mutacije gena (155,156). Metilacionim profilisanjem je uočeno prisustvo mutacija SUFU gena u 5-10 % meningioma sa intermedijarnim ili agresivnim biološkim ponašanjem, što nije u skladu sa rezultatima našeg istraživanja, što se takođe može objasniti metodološkim razlikama, kao i u prethodnom pasusu (154–156).

Dodatno objašnjenje nesklada u rezultatima ekspresije SUFU između gore navedenih istraživanja i rezultata ove disertacije je mali broj uzoraka malignih meningioma u ovoj disertaciji (manji nego u prethodno pomenutim istraživanjima) zbog čega statistička analiza prikazuje potencijalno nedovoljno pouzdane rezultate. Navedena istraživanja predstavljaju multicentrične studije u kojima su ciljano sakupljani uzorci anaplastičnih (malignih) meningioma, dok je materijal za ovu disertaciju proistekao iz iskustva isključivo jedne ustanove, Klinike za neurohirurgiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije (157).

Korelacija lokalizacije meningioma i prisustva mutacija je dobro poznata (158,159). Naime, meningiomi lokalizovani na konveksitetima mozga i većina spinalno lokalizovanih meningioma se karakterišu delecijom hromozoma 22q i/ili mutacijama NF2 gena, dok se kod meningioma lokalizovanih na bazi lobanje uočavaju mutacije gena AKT1, TRAF7, SMO i/ili PIK3CA. Rezultati ovog istraživanja ukazuju da učestalost gubitka ekspresije SUFU, koji indirektno oslikava mutaciju ovog proteina, nije povezana sa lokalizacijom meningioma.

Mitotska aktivnost je od velikog dijagnostičkog značaja kod meningioma, budući da njena procena nezavisno od ostalih parametara određuje gradus meningioma (18–20). Odsustvo korelacije broja mitozu i ekspresije SUFU u ovom istraživanju nisu u skladu sa prethodno navedenim istraživanjima u kojima su mutacije SUFU uočene u meningiomima gradusa 3, što ukazuje na njihovo agresivnije biološko ponašanje (158,159). Ovakav nesklad u stavovima ukazuje na potrebu za revidiranjem kriterijuma za gradiranje meningioma koje je u toku (93).

Iako je agresivnije biološko ponašanje meningioma češće kod muškaraca i najčešće se evidentira kroz dijagnostiku meningioma gradusa 2 i 3, dostupni literaturni podaci ne pružaju dodatna objašnjenja u vidu mutacija pojedinih gena (17,98). U skladu sa pomenutim rezultatima su i rezultati ovog istraživanja, gde nije uočena statistički značajna razlika u ekspresiji SUFU između polova (17,98).

Rezultati ovog istraživanja nisu pokazali prisustvo statistički značajne korelacije između uzrasta pacijenata i ekspresije SUFU. Prema dosadašnjoj, nama dostupnoj literaturi, veća učestalost detekcije mutiranog gena u starijoj populaciji u meningiomima je uočena samo kod gena NF2 (160).

Detekcija povećanja aktivacije SUFU ima potencijalni terapijski značaj, budući da su sintetisani lekovi koji deluju na SUFU indirektno dovode do deaktivacije patološki aktiviranog *Hedgehog* signalnog puta u ćelijskim kulturama (161,162).

Poznato je da molekuli GLI1, GLI2 I GLI3 imaju brojne interakcije koje se često nazivaju „GLI kod“. Ove interakcije između proteina zavise od celularnog konteksta, tako da mogu da se ponašaju i kao aktivatori i kao represori koji, zajedničkim delovanjem, dovode do različitih transkripcionih aktivnosti (74,163,164). Aktivnosti GLI2 su dominantno vezane za aktivaciju transkripcije, mada je opisana i njegova represorska uloga (165,166). GLI2 je takođe opisan kao jedan od glavnih elemenata nekanonske aktivacije *Hedgehog* signalnog puta, koja se ostvaruje kroz komunikaciju sa drugim signalnim putevima. Ovaj tip aktivacije je opisan u brojnim malignim tumorima, uključujući melanom, karcinom želuca, karcinom kolona, multipli mijelom, meduloblastom, karcinom pankreasa, glioblastom i osteosarkom (167–172).

Aktivacija *Hedgehog* signalnog puta je prvi put opisana u meningiomima 2010. godine, kada je uočena povećana ekspresija GLI2 u meningiomima svih gradusa, u poređenju sa meningotelnim ćelijama tumorski neizmenjenih moždanica, metodom Real-time kvantitativnog PCR-a (173). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima ove disertacije, budući da nisu uočene statistički značajne razlike u ekspresiji GLI2 između meningioma gradusa 1, 2 i 3. Poređenje ovih studija deluje ohrabrujuće na dalja istraživanja vezana za ekspresiju GLI2 u meningiomima, budući da se primenom različitih metoda došlo do sličnih nalaza. Pozitivan rezultat ove disertacije je da, uprkos odsustvu statistički značajne razlike između gradusa meningioma postoji statistički značajna korelacija ekspresije GLI2 i gradusa meningioma. Poznato je da je procedura histopatološkog gradiranja meningioma kompleksna i da zahteva analizu velikog broja parametara (18–20). Jedan od dominantnih i nezavisnih kriterijuma za procenu gradusa meningioma je njihova mitotska aktivnost. Odsustvo statistički značajne korelacije ekspresije GLI2 i mitotske aktivnosti meningioma, uz istovremenu pozitivnu korelaciju gradusa meningioma i ekspresije GLI2 ukazuje na značaj drugih parametara u gradiranju meningioma (invazija moždanog parenhima, fokusi nekroze, fokusi građeni od sitnih ćelija, bestruktorni rast), ali i potencijalnu potrebu za revizijom načina gradiranja meningioma, a u skladu sa molekularnim parametrima (93). Ovakvi rezultati otvaraju put za daljim istraživanjima, korišćenjem drugih metoda ili nekoliko različitih antitela GLI2 (monoklonska vs poliklonska) za imunohistohemiju. U poređenju ovih studija treba biti oprezan, budući da je kohorta prethodno opisane studije sadržala relativno mali broj meningioma (36), u kojima su dominirali meningiomi gradusa 1, dok su u manjem broju bili prisutni meningiomi gradusa 2 i 3 (173). Sa druge strane, deficit istraživanja ove disertacije je odsustvo kontrolne grupe u vidu tkiva meningotelnih ćelija tumorski neizmenjenih moždanica, čime bi se mogla izvršiti verifikacija rezultata prethodne studije, da je GLI2

jedan od faktora tumorigeneze meningioma. Osvešćenje ovakvih razlika pobuđuje ambiciju za daljnim istraživanjima na ovu temu.

Prisustvo određenih mutacija u meningiomima različite lokalizacije je opisano u aktuelnoj klasifikaciji meningioma Svetske zdravstvene organizacije, a prepoznato godinama ranije (158,159). Kod meningioma lokalizovanih na konveksitetima i meningioma spinalne lokalizacije dominantne su delecija hromozoma 22q i/ili mutacije NF2 gena. Mutacije gena AKT1, TRAF7, SMO i/ili PIK3CA su često prisutne u meningiomima lokalizovanim na bazi lobanje. Odsustvo statistički značajne razlike u ekspresiji GLI2 između meningioma moždanih konveksiteta, meningioma baze lobanje i spinalno lokalizovanih meningioma podržava ranija istraživanja i ukazuje da aktivacija ovih elementa *Hedgehog* signalnog puta u meningiomima nije povezana sa lokalizacijom tumora.

Poznato je da se meningiomi češće dijagnostikuju kod žena (18–20). Istovremeno, meningiomi dijagnostikovani kod muškaraca pokazuju agresivnije biološko ponašanje (17). Jedno od objašnjenja ovakve distribucije meningioma po polovima je prisustvo PR receptora u tkivu meningioma. Skorašnje studije predočavaju da je prognoza pacijenata sa meningiomima zavisna od prisustva progesteronskog receptora, nezavisno od pola pacijenata (174). Rezultati ovog istraživanja ukazuju da ekspresija i aktivnost GLI2 nije uslovljena polom pacijenata, budući da nije uočena statistički značajna razlika između polova po pitanju ovog markera. Dalja istraživanja bi mogla da budu usmerena ka ispitivanju korelacije ekspresije progesteronskog receptora i elemenata *Hedgehog* signalnog puta.

Dokazano je na primerima brojnih tumora, uključujući meningiome da rizik od obolevanja od tumora raste sa starenjem (175). Rezultati ovog istraživanja ukazuju da GLI2 ekspresija najverovatnije nije jedan od elemenata koji doprinosi većoj učestalosti meningioma u starijoj populaciji, budući da nije uočena statistički značajna korelacija između ekspresije GLI2 i uzrasta pacijenata u relativno velikoj kohorti.

Cilj i suština interesovanja za ispitivanje aktivacije *Hedgehog* signalnog puta u eksperimentu ove doktorske disertacije je potencijal kreiranja specifične terapije koja bi, potencijalno, zaustavila rast tumora ukoliko bi se pokazalo da je neki ili više markera ključan u tumorigenezi i progresiji tumora. Pozitivni terapijski efekti anti GLI2 terapije u osteosarkomima, karcinomima pluća i karcinomu prostate, u ćelijskim kulturama su opisani u literaturi (162,176). Istraživanje ove doktorske disertacije ukazuje na potrebu za sličnim ispitivanjima, pre svega na ćelijskim kulturama, budući da je GLI2 prepoznat kao značajan faktor tumorigeneze meningioma, a čija aktivacija u tumoru bi mogla biti detektovana relativno jednostavnim i jeftinim metodom imunohistohemije.

Poznato je da GLI3 reguliše različite biološke procese koji su važni za nastanak i progresiju kancera. U nekoliko studija su detektovano da GLI3 reguliše nezavisan rast, proliferaciju i migraciju u kulturama ćelija kancera, pre svega skvamocelularnog karcinoma usne duplje i karcinoma mokraćne bešike (177–179). Međutim, GLI3 takođe može imati i supresorsku ulogu, što je identifikovano u ćelijama meduloblastoma i akutne mijeloidne leukemije (180,181). Statistički značajna razlika u poređenju ekspresije GLI3 između meningioma gradusa 1, 2 i 3 ukazuje na značaj detekcije proteina GLI3 u tumorigenezi meningioma. Statistički značajne razlike u pojedinačnim komparacijama meningioma gradusa 1 i 2, kao i komparacije gradusa 1 i 3, koje su rezultat povećanja procenta tumorskih ćelija pozitivnih na GLI3 ukazuju da GLI3 kod meningioma ima ulogu u povećanju gradusa tumora i, posledično, povećanju agresivnosti njegovog biološkog ponašanja. U prilog ove tvrdnje ide još jedan rezultat istraživanja ove disertacije: postojanje statistički značajne pozitivne korelacije između broja mitoze i gradusa meningioma. Na značaj ovog rezultata ukazuje dobro poznata činjenica da je povećana mitotska aktivnost jedan od nezavisnih kriterijuma za gradiranje meningioma, zbog čega ima veliki prognostički značaj (18–20). Posledično, stiče se utisak da GLI3 u tkivu meningioma ima ulogu u tumorigenezi meningioma, čime se potencijalno otvara mogućnost

ispitivanja delovanja anti GLI3 terapije, koja se pokazala uspešnom u terapiji mokraćne bešike, cerviksa, retinoblastoma, nazofaringealnog karcinoma (179,182–185). U prilog ove pretpostavke govori i statistički pozitivna korelacija između ekspresije GLI3 i gradusa meningioma koja je, prema trenutno dostupnoj literaturi, po prvi put opisana u istraživanju ove disertacije. Iako bi, teorijski, terapijski pristup anti GLI3 terapijskim agensima bio od velikog značaja, naročito za hirurški neresektabilne meningiome, trebalo bi biti oprezan u tumačenju rezultata GLI3 ekspresije i izbora dostupne terapije, budući da je uočeno da u ćelijama karcinoma pankreasa ekspresija GLI3 ukazuje na rezistenciju na terapiju ciklopaminom promovisući preživljavanje tumorskih ćelija (186).

Prema dosadašnjim litaraturnim podacima, meningiomi lokalizovani na konveksitetima mozga se karakterišu bialelnim gubitkom NF2 gena, mutacijama SMARCB1, povećanjem broja u broju kopija gena, povećanom mitotskom aktivnošću, kao i češćom dijagnostikom meningioma gradusa 2 i 3 (187–192). Istovremeno, kod meningioma baze lobanje su detektovane aktivacije PIK3K i *Hedgehog* signalnog puta, mutacije TRAF7, POLR2A i KLF4, dok je bialelni gubitak NF2 gena značajno ređi u poređenju sa meningiomima supratentorijalne lokalizacije. Iako spinalno lokalizovani meningiomi imaju hromozomske alteracije i mutacije slične meningiomima moždanih konveksiteta i meningiomima baze lobanje (kao što su delecije NF2 gena, AKT1 mutacije, FAT2 mutacije i SMARCB1 mutacije), kod njih je detektovano 35 genskih alteracija i mutacija koje nisu detektovane kod meningioma drugih lokalizacija, po čemu se izdvajaju od meningioma moždanih konveksiteta i meningioma baze lobanje (193). Rezultati istraživanja ove doktorske disertacije pokazuju statistički značajne razlike u ekspresiji GLI3 između meningioma lokalizovanih na moždanim konveksitetima, meningioma baze lobanje i spinalno lokalizovanih meningioma. Interesantno je da prilikom direktnog poređenja ekspresije GLI3 između meningioma lokalizovanih na konveksitetima i na bazi lobanje nisu uočene statistički značajne razlike, što se delom ne uklapa sa rezultatima ranijih studija, koje ukazuju na izraženu aktivaciju *Hedgehog* signalnog puta kod meningioma baze lobanje. U tumačenju ovih rezultata treba imati u vidu kompleksnost *Hedgehog* signalnog puta, kao i kanonske i nekanonske puteve aktivacije, u kojima je GLI3 samo jedan od mnogobrojnih faktora (74,194). Interesantne su i takođe vredne pažnje statistički značajne razlike u ekspresiji GLI3 između spinalno lokalizovanih meningioma, sa jedne strane i meningioma moždanih konveksiteta i meningioma baze lobanje sa druge strane. Iako se statistička značajnost izgubila nakon primene Bonferonijevog korekcionog faktora prilikom poređenja spinalnih meningioma i meningioma moždanih konveksiteta, razlika u ekspresiji GLI3 između spinalno lokalizovanih i intrakranijalnih meningioma pobuđuje pažnju na razlike u tumorigenezi, kao i na potencijalna objašnjenja češće dijagnostike pojedinih tipova meningioma na pojedinim lokalizacijama. Takođe, odsustvo statistički značajne razlike u ekspresiji GLI3 između meningioma lokalizovanih na moždanim konveksitetima i meningioma baze lobanje ukazuje da u njihovoj tumorigenezi pored brojnih genetskih razlika postoje i sličnosti, koje se barem ogledaju u sličnom obrascu ekspresije GLI3.

Agresivnije biološko ponašanje meningioma kod muškarca, koje je dobro poznato u kliničkoj praksi (18–20). Ono se delimično može objasniti povećanom mitotskom aktivnošću u meningiomima muškaraca, koje je uočeno i u rezultatima ovog istraživanja i ranije opisano u literaturi (195). Pored povećane mitotske aktivnosti, agresivnije biološko ponašanje meningioma muškaraca se takođe delimično može objasniti i manjom ekspresijom PR receptora u meningiomima muškaraca nego kod meningioma žena (174). Rezultati istraživanja ove disertacije ukazuju na još jedan, prema dostupnoj literaturi do sada neopisan faktor, koji dodatno opisuje razlike između meningioma kod muškaraca i žena, a to je razlika u ekspresiji GLI3. Statistički značajno veća ekspresija GLI3 kod muškaraca nego kod žena u istraživanju ove disertacije potencijalno ukazuje da GLI3, koji najverovatnije ima ulogu u tumorigenezi meningioma, bi mogao imati ulogu i u agresivnijem biološkom ponašanju meningioma muškaraca. Ovi rezultati, dobijeni metodom imunohistohemije, bi trebalo da budu verifikovani drugim, sofisticiranijim metodama molekularne patologije u cilju verifikacije ovih rezultata i objašnjenja delovanja GLI3 na tumorigenezu meningioma.

Dobro poznata činjenica da verovatnoća pojave tumora, uključujući meningiome, raste sa uzrastom pacijenata nije potkrepljena dodatnim objašnjenjima rezultatima ove disertacije po pitanju ekspresije GLI3, budući da nije uočena korelacija GLI3 i uzrasta pacijenata sa meningiomima, nezavisno od gradusa tumora (175). Ipak, i negativni rezultati daju doprinos naučnoj zajednici u smislu da ne inspirišu dalja istraživanja i da sugerišu da odgovor na pitanja povećanja incidencije tumora sa starenjem najverovatnije ne treba tražiti u ovom elementu *Hedgehog* signalnog puta.

Meningiomi su tumori koji se karakterišu velikom morfološkom heterogenošću unutar istog gradusa, što je prouzrokovalo prepoznavanje velikog broja histoloških podtipova. Ova velika morfološka heterogenost ponekada dijagnostiku meningioma čini izazovnom, iziskujući upotrebu imunohistohemije u cilju verifikacije meningotelog porekla tumora (18–20). Rezultati istraživanja ove disertacije ukazuju na potencijalni uticaj GLI2 i SUFU na morfogenezu pojedinih podtipova meningioma gradusa 1, budući da su uočene statistički značajne razlike u ekspresiji GLI2 između angiomatoznih meningioma, sa jedne strane i meningotelijalnih i tranzicionalnih meningioma, sa druge strane. Takođe, potencijalni uticaj na heterogenost morfologije meningioma pokazuje i ekspresija SUFU, u kojoj su uočeni statistički značajne razlike između psamomatoznih meningioma, sa jedne strane i meningotelijalnih, angiomatoznih i mikrocističnih meningioma sa druge strane, kao i između fibroznih meningioma, sa jedne strane, i tranzicionalnih, meningotelijalnih, angiomatoznih i mikrocističnih meningioma, sa druge strane. Opisane razlike imaju akademski značaj i ukazuju na potencijalne uzroke različitosti morfologije. Stiče se utisak da opisane razlike nemaju prognostički značaj, budući da su uočene između meningioma gradusa 1. Ipak, imajući u vidu tendencije u promeni načina gradiranja meningioma i procene njihovog potencijalnog agresivnog biološkog ponašanja ovi rezultati pružaju stimulaciju za dalja istraživanja (93).

Poznato je da je *Hedgehog* signalni put izuzetno kompleksan kako u fiziološkim, posebno u patološkim uslovima tumorigeneze, kao i da se njegova kompleksnost i interakcija između elemenata razlikuju između pojedinih tumora (74). Statistički pozitivne korelacije između GLI2 i GLI3, kao i između SUFU i GLI2 u rezultatima istraživanja ove disertacije ukazuju na intenzivnu interakciju ovih elemenata *Hedgehog* signalnog puta. Takođe, rezultati ukazuju da bi potencijalni terapijski efekat anti GLI2, anti GLI3 i anti SUFU terapije mogli imati međusobno zavisni, lančani efekat, što bi potencijalno pozitivno uticalo na ishod terapije (161,182–185). Ove spekulacije iziskuju dodatna istraživanja, pre svega na ćelijskim kulturama.

Stiče se utisak da molekularna dijagnostika meningioma poprima sve veći prognostički značaj, budući da je nedavno pokazano da gubitak hromozoma 1p u samo 5 % tumorskih ćelija meningioma ukazuje na visok rizik od rekurencije meningioma, nezavisno od njegove lokalizacije i gradusa (196).

Statistički značajne razlike u ekspresiji GLI3 između meningioma gradusa 1 i 3, kao i između meningioma gradusa 1 i 2 ukazuju na potrebu ispitivanja terapijskog dejstva anti- GLI3 agenasa.

Pozitivne korelacije između p16 i GLI3 sa brojem mitozu ukazuje na potencijalni prognostički značaj ovih markera u dijagnostici i zahtevaju dalja ispitivanja u vidu prospektivnih studija sa višegodišnjim praćenjem pacijenata paralelno sa primenom i procenom p16 i GLI3 u svakom uzorku tkiva meningioma.

Statistički značajna razlika u ekspresiji GLI3 između polova je inspiracija na dalja istraživanja u smislu objašnjenja ovog fenomena i njegove potencijalne povezanosti sa agresivnijim biološkim ponašanjem meningioma i nižom incidencijom meningioma kod muškaraca.



## 6. Zaključci

Na osnovu procene ekspresije markera senescencije (p16, p21 i SA- $\beta$ -GAL) u tkivu meningioma metodom imunohistohemije zaključano je da:

- Značajno povećanje ekspresije p16 i SA- $\beta$ -GAL u meningiomima gradusa 2 u odnosu na meningiome gradusa 1 potencijalno ukazuje na aktivaciju senescencije u meningiomima gradusa 2.
- Nisu uočene razlike u ekspresiji p21 između gradusa meningioma 1, 2 i 3, što sugeriše da ekspresija p21 nije povezana sa aktivacijom senescencije u meningiomima.

Na osnovu procene ekspresije markera *Hedgehog* signalnog puta (GLI2, GLI3 i SUFU) u meningiomima metodom imunohistohemije zaključeno je da:

- Odsustvo statistički značajnih razlika u ekspresiji GLI2 i SUFU između meningioma gradusa 1, 2 i 3 ukazuje na potencijalno odsustvo uticaja ovih elemenata *Hedgehog* signalnog puta u progresiji tumora.
- Statistički značajna razlika u ekspresiji GLI3 između meningioma gradusa 1 i 2, kao i između meningioma gradusa 1 i 3 ukazuje na GLI3 kao ključni element *Hedgehog* signalnog puta u progresiji meningioma.

Na osnovu ispitivanja povezanosti ekspresije markera senescencije i markera *Hedgehog* signalnog puta sa gradusom, lokalizacijom, histološkim podtipom i mitotskom aktivnošću meningioma, kao i polom pacijenata zaključeno je da:

- Na aktivaciju senescencije sa porastom gradusa meningioma ukazuju statistički značajne razlike u ekspresiji dva od tri primenjena markera senescencije (p16 i SA- $\beta$ -GAL) između meningioma gradusa 1 i 2. Na nepostojanje uticaja p21 na aktivaciju senescencije u meningiomima ukazuje odsustvo statistički značajne razlike u ekspresiji ovog markera između meningioma gradusa 1, 2 i 3. Među markerima *Hedgehog* signalnog puta se najviše izdvojio GLI3, kao marker čija se ekspresija značajno razlikuje između gradusa i ukazuje na potencijalni uticaj na progresiju tumora. Ekspresija GLI2 i SUFU nije pokazala značajne razlike u odnosu na gradus meningioma.
- Ekspresija GLI3 se značajno razlikuje između intrakranijalnih i spinalno lokalizovanih meningioma, što ukazuje na povezanost aktivacije ovog markera *Hedgehog* signalnog puta sa lokalizacijom meningioma. Ekspresija svih ispitivanih markera senescencije (p16, p21 i SA- $\beta$ -GAL), kao i preostala dva ispitivana markera GLI2 i SUFU *Hedgehog* signalnog puta ne koreliraju sa lokalizacijom meningioma.
- Statistički značajne razlike u ekspresiji elemenata *Hedgehog* signalnog puta GLI2 i SUFU između pojedinih morfoloških tipova meningioma (dominantno angiomatozni, fibrozni i meningotelijalni) ukazuju na njihov potencijalni značaj u morfogenezi meningioma, čija heterogenost je dobro poznata. Na odsustvo uticaja senescencije na morfogenezu meningioma ukazuje potpuno odsustvo statistički značajnih razlika u ekspresiji primenjenih markera senescencije između morfoloških podtipova meningioma.

- Ekspresija p16 i GLI3 bi mogla imati prediktivni značaj u dijagnostici meningioma, na šta ukazuje pozitivna korelacija između ekspresije ovih markera i broja mitozâ. Ekspresija preostalih primenjenih markera senescencije i *Hedgehog* signalnog puta (SA- $\beta$ -GAL, GLI2 i SUFU) nije pokazala statistički značajnu korelaciju sa mitotskom aktivnošću meningioma.
- Jedini primenjeni marker u čijoj ekspresiji je uočena statistički značajna korelacija sa uzrastom pacijenata je SA- $\beta$ -GAL, dok je kod preostalih primenjenih markera senescencije i markera *Hedgehog* signalnog puta (GLI2, GLI3 i SUFU) izostala ova korelacija.
- Jedini primenjeni marker u čijoj ekspresiji u meningiomima je uočena statistički značajna razlika između polova je GLI3, što bi moglo biti još jedno od potencijalnih objašnjenja manje incidence i agresivnijeg biološkog ponašanja meningioma kod muškaraca. U ekspresiji preostala dva markera *Hedgehog* signalnog puta (GLI2 i SUFU) i primenjenih markera senescencije (p16, SA- $\beta$ -GAL i p21) nisu uočene značajne razlike između polova.

## 7. Literatura

1. Huntoon K, Toland AMS, Dahiya S. Meningioma: A Review of Clinicopathological and Molecular Aspects. *Front Oncol* [Internet]. 2020 Oct 23 [cited 2024 Nov 17];10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33194703/>
2. Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, Patil N, Waite K, Kruchko C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro Oncol* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2024 Nov 17];21(Suppl 5):V1–100. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31675094/>
3. Weller RO. Microscopic morphology and histology of the human meninges. *Morphologie* [Internet]. 2005 [cited 2024 Nov 17];89(284):22–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15943078/>
4. Nabeshima S, Reese TS, Landis DMD, Brightman MW. Junctions in the meninges and marginal glia. *J Comp Neurol* [Internet]. 1975 [cited 2024 Nov 17];164(2):127–69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/810497/>
5. Li J, Fang L, Meyer P, Killer HE, Flammer J, Neutzner A. Anti-inflammatory response following uptake of apoptotic bodies by meningotheial cells. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2014 Feb 24 [cited 2024 Nov 17];11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24565420/>
6. Li J, Fang L, Killer HE, Flammer J, Meyer P, Neutzner A. Meningotheial cells as part of the central nervous system host defence. *Biol Cell* [Internet]. 2013 Jul [cited 2024 Nov 17];105(7):304–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23634770/>
7. Hemion C, Li J, Kohler C, Scholl HPN, Meyer P, Killer HE, et al. Clearance of neurotoxic peptides and proteins by meningotheial cells. *Exp Cell Res* [Internet]. 2020 Nov 15 [cited 2024 Nov 17];396(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33068559/>
8. The meninges in human development - PubMed [Internet]. [cited 2024 Nov 17]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3746345/>
9. Dasgupta K, Jeong J. Developmental biology of the meninges. *Genesis*. 2019 May 1;57(5).
10. DeSisto J, O'Rourke R, Jones HE, Pawlikowski B, Malek AD, Bonney S, et al. Single-Cell Transcriptomic Analyses of the Developing Meninges Reveal Meningeal Fibroblast Diversity and Function. *Dev Cell* [Internet]. 2020 Jul 6 [cited 2024 Nov 17];54(1):43-59.e4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32634398/>
11. Siegenthaler JA, Ashique AM, Zarbalis K, Patterson KP, Hecht JH, Kane MA, et al. Retinoic acid from the meninges regulates cortical neuron generation. *Cell* [Internet]. 2009 Oct 30 [cited 2024 Nov 17];139(3):597–609. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19879845/>
12. BJ M, D M, J C, S B, A T, SA S, et al. Basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta-1 expression in the developing dura mater correlates with calvarial bone formation. *Plast Reconstr Surg* [Internet]. 1999 Aug [cited 2024 Nov 17];104(2):435–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10654687/>
13. Jiang X, Iseki S, Maxson RE, Sucov HM, Morriss-Kay GM. Tissue origins and interactions in the mammalian skull vault. *Dev Biol* [Internet]. 2002 Jan 1 [cited 2024 Nov 17];241(1):106–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11784098/>
14. Kalamarides M, Stemmer-Rachamimov AO, Niwa-Kawakita M, Chareyre F, Taranchon E, Han ZY, et al. Identification of a progenitor cell of origin capable of generating diverse meningioma histological subtypes. *Oncogene* [Internet]. 2011 May 19 [cited 2024 Nov 17];30(20):2333–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21242963/>
15. Perry A, Gutmann DH, Reifenberger G. Molecular pathogenesis of meningiomas. *J Neurooncol* [Internet]. 2004 Nov [cited 2024 Nov 17];70(2):183–202. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15674477/>

16. Preusser M, Brastianos PK, Mawrin C. Advances in meningioma genetics: novel therapeutic opportunities. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2024 Nov 17];14(2):106–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29302064/>
17. Ho VKY, Anten MM, Garst A, Bos EM, Snijders TJ, Eekers DBP, et al. Epidemiology of adult meningioma: Report from the Dutch Brain Tumour Registry (2000–2019). *Eur J Neurol* [Internet]. 2023 Oct 1 [cited 2024 Oct 23];30(10):3244–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37433563/>
18. Figarella-Branger D, Appay R, Metais A, Tauziède-Espariat A, Colin C, Rousseau A, et al. The 2021 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Ann Pathol*. 2022 Oct 1;42(5):367–82.
19. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol* [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2024 Oct 25];23(8):1231–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34185076/>
20. Komori T. [The 2021 WHO Classification of Tumors, 5th edition, Central Nervous System Tumors: A Short Review]. *Brain Nerve* [Internet]. 2022 Jun [cited 2024 Oct 25];74(6):803–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35676215>
21. Johnson MD, Abu-Farsakh S. Clinicopathologic features of incidental meningiomas: A review of the literature and the University of Rochester autopsy experience. *Clin Neuropathol* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2024 Nov 18];38(3):118–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30686285/>
22. Nakasu S, Hirano A, Shimura T, Llena JF. Incidental meningiomas in autopsy study. *Surg Neurol* [Internet]. 1987 [cited 2024 Nov 18];27(4):319–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3824137/>
23. Phillips D, Auguste KI, Gupta N. Meningiomas in children. *Handb Clin Neurol* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2024 Nov 18];169:253–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32553293/>
24. Thevandiran D, Nga V, Chang KTE, Ng LP, Seow WT, Low DCY, et al. Paediatric meningiomas in Singapore - Case series of a rare entity. *J Clin Neurosci* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2024 Nov 18];73:62–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32067824/>
25. Mahajan S, Suri V, Sahu S, Sharma MC, Sarkar C. World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System 5 th Edition (WHO CNS5): What's new? *Indian J Pathol Microbiol*. 2022 May 1;65(5):S5–13.
26. Yoda RA, Cimino PJ. Classification and Grading of Central Nervous System Tumors According to the World Health Organization 5th Edition. *Semin Neurol* [Internet]. 2023 Dec 14 [cited 2024 Oct 25];43(6):833–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37949117/>
27. Sahm F, Schimpf D, Stichel D, Jones DTW, Hielscher T, Schefzyk S, et al. DNA methylation-based classification and grading system for meningioma: a multicentre, retrospective analysis. *Lancet Oncol* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2024 Oct 25];18(5):682–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28314689/>
28. Abedalthagafi MS, Merrill PH, Bi WL, Jones RT, Listewnik ML, Ramkissoon SH, et al. Angiomatous meningiomas have a distinct genetic profile with multiple chromosomal polysomies including polysomy of chromosome 5. *Oncotarget* [Internet]. 2014 [cited 2024 Oct 25];5(21):10596–606. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25347344/>
29. Louis DN, Hamilton AJ, Sobel RA, Ojemann RG. Pseudopsammomatous meningioma with elevated serum carcinoembryonic antigen: a true secretory meningioma. Case report. *J Neurosurg* [Internet]. 1991 [cited 2024 Oct 25];74(1):129–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1984492/>
30. Lal A, Dahiya S, Gonzales M, Hiniker A, Prayson R, Kleinschmidt-Demasters BK, et al. IgG4 overexpression is rare in meningiomas with a prominent inflammatory component: a review

- of 16 cases. *Brain Pathol* [Internet]. 2014 [cited 2024 Oct 25];24(4):352–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24467316/>
31. Zaidi A, Chatterjee D, Radotra B, Mohindra S. Lymphoplasmacyte-Rich Meningioma or IgG4-Related Disease: Walking the Thin Line. *Neurol India*. 2023 Sep 1;71(5):1007–10.
  32. Budohoski KP, Clerkin J, Millward CP, O’Halloran PJ, Waqar M, Looby S, et al. Predictors of early progression of surgically treated atypical meningiomas. *Acta Neurochir (Wien)* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2024 Oct 25];160(9):1813–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29961125/>
  33. Choy W, Ampie L, Lamano JB, Kesavabhotla K, Mao Q, Parsa AT, et al. Predictors of recurrence in the management of chordoid meningioma. *J Neurooncol* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2024 Oct 25];126(1):107–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26409888/>
  34. Zhang H, Ma L, Shu C, Dong L qiang, Ma Y qun, Zhou Y. Spinal Clear Cell Meningiomas: Clinical Features and Factors Predicting Recurrence. *World Neurosurg* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2024 Oct 25];134:e1062–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31765868/>
  35. Li B, Tao B, Bai H, Zhong J, Wu X, Shi J, et al. Papillary meningioma: an aggressive variant meningioma with clinical features and treatment: a retrospective study of 10 cases. *Int J Neurosci* [Internet]. 2016 Oct 2 [cited 2024 Oct 25];126(10):878–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26299848/>
  36. Vaubel RA, Chen SG, Raleigh DR, Link MJ, Chicoine MR, Barani I, et al. Meningiomas With Rhabdoid Features Lacking Other Histologic Features of Malignancy: A Study of 44 Cases and Review of the Literature. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 2016 Mar 4 [cited 2024 Oct 25];75(1):44–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26705409/>
  37. Wu YT, Ho JT, Lin YJ, Lin JW. Rhabdoid papillary meningioma: a clinicopathologic case series study. *Neuropathology* [Internet]. 2011 Dec [cited 2024 Oct 25];31(6):599–605. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21382093/>
  38. Pugazenthi S, Patel B, English CW, Leidig WA, McGeehan KP, McCornack CR, et al. Multiomic and clinical analysis of multiply recurrent meningiomas reveals risk factors, underlying biology, and insights into evolution. *Sci Adv* [Internet]. 2024 Oct 25 [cited 2024 Nov 17];10(43):eadn4419. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39441930/>
  39. Nowak-Choi K, Palmer JD, Casey J, Chitale A, Kalchman I, Buss E, et al. Resected WHO grade I meningioma and predictors of local control. *J Neurooncol* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2024 Nov 17];152(1):145–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33420897/>
  40. Barresi V, Lioni S, Caliri S, Caffo M. Histopathological features to define atypical meningioma: What does really matter for prognosis? *Brain Tumor Pathol* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2024 Nov 17];35(3):168–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29671247/>
  41. Loewenstern J, Shuman W, Rutland JW, Kessler RA, Kohli KM, Umphlett M, et al. Preoperative and Histological Predictors of Recurrence and Survival in Atypical Meningioma After Initial Gross Total Resection. *World Neurosurg* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2024 Nov 17];128:e148–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30995555/>
  42. Patel AJ, Wan YW, Al-Ouran R, Revelli JP, Cardenas MF, Oneissi M, et al. Molecular profiling predicts meningioma recurrence and reveals loss of DREAM complex repression in aggressive tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2019 Oct 22 [cited 2024 Nov 17];116(43):21715–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31591222/>
  43. Lucas CHG, Mirchia K, Seo K, Najem H, Chen WC, Zakimi N, et al. Spatial genomic, biochemical and cellular mechanisms underlying meningioma heterogeneity and evolution. *Nat Genet* [Internet]. 2024 Jun 1 [cited 2024 Nov 17];56(6):1121–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38760638/>
  44. Magill ST, Vasudevan HN, Seo K, Villanueva-Meyer JE, Choudhury A, John Liu S, et al. Multiplatform genomic profiling and magnetic resonance imaging identify mechanisms

- underlying intratumor heterogeneity in meningioma. *Nat Commun* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2024 Nov 17];11(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32968068/>
45. Sahm F, Schrimpf D, Stichel D, Jones DTW, Hielscher T, Schefzyk S, et al. DNA methylation-based classification and grading system for meningioma: a multicentre, retrospective analysis. *Lancet Oncol* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2024 Oct 24];18(5):682–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28314689/>
  46. Domen A, Deben C, Verswyvel J, Flieswasser T, Prenen H, Peeters M, et al. Cellular senescence in cancer: clinical detection and prognostic implications. *J Exp Clin Cancer Res* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2024 Nov 17];41(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36575462/>
  47. Sun Y, Coppé JP, Lam EWF. Cellular Senescence: The Sought or the Unwanted? *Trends Mol Med* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2024 Nov 17];24(10):871–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30153969/>
  48. Calcinotto A, Kohli J, Zagato E, Pellegrini L, Demaria M, Alimonti A. Cellular senescence: Aging, cancer, and injury. *Physiol Rev*. 2019 Apr 1;99(2):1047–78.
  49. Kritsilis M, Rizou S V., Koutsoudaki PN, Evangelou K, Gorgoulis VG, Papadopoulos D. Ageing, Cellular Senescence and Neurodegenerative Disease. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2024 Nov 17];19(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30261683/>
  50. Yousefzadeh MJ, Flores RR, Zhu Y, Schmiechen ZC, Brooks RW, Trussoni CE, et al. An aged immune system drives senescence and ageing of solid organs. *Nature* [Internet]. 2021 Jun 3 [cited 2024 Nov 17];594(7861):100–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33981041/>
  51. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* [Internet]. 1961 [cited 2024 Nov 17];25(3):585–621. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13905658/>
  52. Xiong J, Dong L, Lv Q, Yin Y, Zhao J, Ke Y, et al. Targeting senescence-associated secretory phenotypes to remodel the tumour microenvironment and modulate tumour outcomes. *Clin Transl Med* [Internet]. 2024 Sep [cited 2024 Nov 17];14(9):e1772. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39270064/>
  53. Dong Z, Luo Y, Yuan Z, Tian Y, Jin T, Xu F. Cellular senescence and SASP in tumor progression and therapeutic opportunities. *Mol Cancer*. 2024 Dec 1;23(1).
  54. Thangavelu L, Altamimi ASA, Ghaboura N, Babu MA, Roopashree R, Sharma P, et al. Targeting the p53-p21 axis in liver cancer: Linking cellular senescence to tumor suppression and progression. *Pathol Res Pract* [Internet]. 2024 Nov 1 [cited 2024 Nov 17];263:155652. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39437639/>
  55. Ghosh P, Fontanella RA, Scisciola L, Taktaz F, Pesapane A, Basilicata MG, et al. Obesity-induced neuronal senescence: Unraveling the pathophysiological links. *Ageing Res Rev* [Internet]. 2024 Nov 1 [cited 2024 Nov 17];101. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39368666/>
  56. Bhat AA, Moglad E, Afzal M, Thapa R, Almalki WH, Kazmi I, et al. Therapeutic approaches targeting aging and cellular senescence in Huntington’s disease. *CNS Neurosci Ther* [Internet]. 2024 Oct 1 [cited 2024 Nov 17];30(10):e70053. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39428700/>
  57. Grootaert MOJ. Cell senescence in cardiometabolic diseases. *npj aging* [Internet]. 2024 Dec 1 [cited 2024 Nov 17];10(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39433786/>
  58. Demirci D, Dayanc B, Mazi FA, Senturk S. The Jekyll and Hyde of Cellular Senescence in Cancer. *Cells* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2024 Nov 17];10(2):1–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33494247/>
  59. Lau L, David G. Pro- and anti-tumorigenic functions of the senescence-associated secretory phenotype. *Expert Opin Ther Targets* [Internet]. 2019 Dec 2 [cited 2024 Nov 17];23(12):1041–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30616404/>

60. Liu Y, Lomeli I, Kron SJ. Therapy-Induced Cellular Senescence: Potentiating Tumor Elimination or Driving Cancer Resistance and Recurrence? *Cells* [Internet]. 2024 Aug 1 [cited 2024 Nov 17];13(15). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39120312/>
61. González-Gualda E, Baker AG, Fruk L, Muñoz-Espín D. A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. *FEBS Journal*. 2021 Jan 1;288(1):56–80.
62. Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, Bennett DC, Bischof O, Bishop C, et al. Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*. 2019 Oct 31;179(4):813–27.
63. Kudlova N, De Sanctis JB, Hajdуч M. Cellular Senescence: Molecular Targets, Biomarkers, and Senolytic Drugs. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Apr 10 [cited 2024 Oct 24];23(8). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35456986>
64. Tufail M, Huang YQ, Hu JJ, Liang J, He CY, Wan WD, et al. Cellular Aging and Senescence in Cancer: A Holistic Review of Cellular Fate Determinants. *Aging Dis* [Internet]. 2024 [cited 2024 Nov 17];0. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38913050/>
65. Chambers CR, Ritchie S, Pereira BA, Timpson P. Overcoming the senescence-associated secretory phenotype (SASP): a complex mechanism of resistance in the treatment of cancer. *Mol Oncol* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2024 Nov 17];15(12):3242–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34137158/>
66. Takasugi M, Yoshida Y, Hara E, Ohtani N. The role of cellular senescence and SASP in tumour microenvironment. *FEBS J* [Internet]. 2023 Mar 1 [cited 2024 Nov 17];290(5):1348–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35106956/>
67. Malaquin N, Rodier F. Dynamic and scalable assessment of the senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Methods Cell Biol* [Internet]. 2024 Jan 1 [cited 2024 Nov 17];181:181–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38302239/>
68. Thompson EL, Pitcher LE, Niedernhofer LJ, Robbins PD. Targeting Cellular Senescence with Senotherapeutics: Development of New Approaches for Skin Care. *Plast Reconstr Surg* [Internet]. 2022 Oct 1 [cited 2024 Nov 17];150(2 4S):12S-19S. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36170431/>
69. Zhang L, Pitcher LE, Prahalad V, Niedernhofer LJ, Robbins PD. Targeting cellular senescence with senotherapeutics: senolytics and senomorphics. *FEBS J* [Internet]. 2023 Mar 1 [cited 2024 Nov 17];290(5):1362–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35015337/>
70. Zhang L, Pitcher LE, Yousefzadeh MJ, Niedernhofer LJ, Robbins PD, Zhu Y. Cellular senescence: a key therapeutic target in aging and diseases. *J Clin Invest* [Internet]. 2022 Aug 1 [cited 2024 Nov 17];132(15). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35912854/>
71. Robbins PD, Jurk D, Khosla S, Kirkland JL, Lebrasseur NK, Miller JD, et al. Senolytic Drugs: Reducing Senescent Cell Viability to Extend Health Span. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* [Internet]. 2021 Jan 6 [cited 2024 Oct 24];61:779–803. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32997601/>
72. Xu M, Pirtskhalava T, Farr JN, Weigand BM, Palmer AK, Weivoda MM, et al. Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2024 Oct 24];24(8):1246–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29988130/>
73. Zhu Y, Dornebal EJ, Pirtskhalava T, Giorgadze N, Wentworth M, Fuhrmann-Stroissnigg H, et al. New agents that target senescent cells: the flavone, fisetin, and the BCL-XL inhibitors, A1331852 and A1155463. *Aging* [Internet]. 2017 [cited 2024 Nov 17];9(3):955–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28273655/>
74. Sigafoos AN, Paradise BD, Fernandez-Zapico ME. Hedgehog/GLI Signaling Pathway: Transduction, Regulation, and Implications for Disease. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2021 Jul 2 [cited 2024 Nov 13];13(14). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34298625/>
75. Jiang J. Hedgehog signaling mechanism and role in cancer. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2022 Oct 1 [cited 2024 Nov 17];85:107–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33836254/>

76. Niewiadomski P, Niedziółka SM, Markiewicz Ł, Uśpiński T, Baran B, Chojnowska K. Gli Proteins: Regulation in Development and Cancer. *Cells* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2024 Nov 17];8(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30754706/>
77. Briscoe J, Théron PP. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2013 [cited 2024 Nov 17];14(7):418–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23719536/>
78. Shen D, Yuwei XIA, Yuhan FU, Qiaochang CAO, Chen W, Ying ZHU, et al. Hedgehog pathway and cancer: A new area (Review). *Oncol Rep* [Internet]. 2024 Sep 1 [cited 2024 Nov 17];52(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38994763/>
79. Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* [Internet]. 2004 Nov 18 [cited 2024 Nov 17];432(7015):324–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15549094/>
80. Wicking C, Smyth I, Bale A. The hedgehog signalling pathway in tumorigenesis and development. *Oncogene* [Internet]. 1999 Dec 20 [cited 2024 Nov 17];18(55):7844–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10630637/>
81. Hui CC, Angers S. Gli proteins in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* [Internet]. 2011 [cited 2024 Nov 17];27:513–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21801010/>
82. Jia J, Kolterud Å, Zeng H, Hoover A, Teglund S, Toftgård R, et al. Suppressor of Fused inhibits mammalian Hedgehog signaling in the absence of cilia. *Dev Biol* [Internet]. 2009 Jun 15 [cited 2024 Nov 17];330(2):452–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19371734/>
83. Chai JY, Sugumar V, Alshawsh MA, Wong WF, Arya A, Chong PP, et al. The Role of Smoothened-Dependent and -Independent Hedgehog Signaling Pathway in Tumorigenesis. *Biomedicines* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2024 Nov 17];9(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34572373/>
84. Aavikko M, Li SP, Saarinen S, Alhopuro P, Kaasinen E, Morgunova E, et al. Loss of SUFU function in familial multiple meningioma. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2012 Sep 7 [cited 2024 Nov 13];91(3):520–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22958902/>
85. Humke EW, Dorn K V., Milenkovic L, Scott MP, Rohatgi R. The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins. *Genes Dev* [Internet]. 2010 Apr 1 [cited 2024 Nov 17];24(7):670–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20360384/>
86. Kasper M, Regl G, Frischauf AM, Aberger F. GLI transcription factors: mediators of oncogenic Hedgehog signalling. *Eur J Cancer* [Internet]. 2006 [cited 2024 Nov 17];42(4):437–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16406505/>
87. Chen MH, Wilson CW, Li YJ, Law KK Lo, Lu CS, Gacayan R, et al. Cilium-independent regulation of Gli protein function by Sufu in Hedgehog signaling is evolutionarily conserved. *Genes Dev* [Internet]. 2009 [cited 2024 Nov 17];23(16):1910–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19684112/>
88. Lauth M, Bergström Å, Shimokawa T, Toftgård R. Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2007 May 15 [cited 2024 Nov 17];104(20):8455–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17494766/>
89. Hyman JM, Firestone AJ, Heine VM, Zhao Y, Ocasio CA, Han K, et al. Small-molecule inhibitors reveal multiple strategies for Hedgehog pathway blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2009 Aug 18 [cited 2024 Nov 17];106(33):14132–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19666565/>
90. Infante P, Mori M, Alfonsi R, Ghirga F, Aiello F, Toscano S, et al. Gli1/DNA interaction is a druggable target for Hedgehog-dependent tumors. *EMBO J* [Internet]. 2015 Jan 14 [cited 2024 Nov 17];34(2):200–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25476449/>



91. Wang JZ, Nassiri F, Mawrin C, Zadeh G. Genomic Landscape of Meningiomas. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2023 [cited 2024 Nov 17];1416:137–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37432625/>
92. Yamamoto M, Suzuki S, Togashi K, Sugai A, Okada M, Kitanaka C. Gemcitabine Cooperates with Everolimus to Inhibit the Growth of and Sensitize Malignant Meningioma Cells to Apoptosis Induced by Navitoclax, an Inhibitor of Anti-Apoptotic BCL-2 Family Proteins. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2022 Apr 1 [cited 2024 Oct 24];14(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35406478/>
93. Sahm F, Aldape KD, Brastianos PK, Brat DJ, Dahiya S, von Deimling A, et al. cIMPACT-NOW Update 8: Clarifications on molecular risk parameters and recommendations for WHO grading of meningiomas. *Neuro Oncol* [Internet]. 2024 Aug 30 [cited 2024 Nov 13]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39212325/>
94. Adekanmbi A, Youngblood MW, Karras CL, Oyetunji EA, Kalapurakal J, Horbinski CM, et al. Clinical Management of Supratentorial Non-Skull Base Meningiomas. *Cancers (Basel)*. 2022 Dec 1;14(23).
95. Mijajlović V, Miler M, Ilić R, Rašić D, Dunderović D, Raičević S, et al. Oncogene-induced senescence in meningiomas-an immunohistochemical study. *J Neurooncol* [Internet]. 2024 Jan 1 [cited 2024 Feb 22];166(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38117375/>
96. Adekanmbi A, Youngblood MW, Karras CL, Oyetunji EA, Kalapurakal J, Horbinski CM, et al. Clinical Management of Supratentorial Non-Skull Base Meningiomas. Vol. 14, *Cancers*. MDPI; 2022.
97. Khan AB, English CW, Chen WC, Athukuri P, Bayley JC, Brandt VL, et al. Even heterozygous loss of CDKN2A/B greatly accelerates recurrence in aggressive meningioma. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2023 Apr 1 [cited 2024 Oct 24];145(4):501–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36729132/>
98. Sievers P, Hielscher T, Schrimpf D, Stichel D, Reuss DE, Berghoff AS, et al. CDKN2A/B homozygous deletion is associated with early recurrence in meningiomas. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2024 Oct 24];140(3):409–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32642869/>
99. Wang JZ, Patil V, Liu J, Dogan H, Tabatabai G, Yefet LS, et al. Increased mRNA expression of CDKN2A is a transcriptomic marker of clinically aggressive meningiomas. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2023 Jul 1 [cited 2024 Oct 24];146(1):145–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37093270/>
100. Driver J, Hoffman SE, Tavakol S, Woodward E, Maury EA, Bhave V, et al. A molecularly integrated grade for meningioma. *Neuro Oncol* [Internet]. 2022 May 1 [cited 2024 Oct 24];24(5):796–808. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34508644/>
101. Wach J, Basaran AE, Arlt F, Vychopen M, Seidel C, Barrantes-Freer A, et al. CDKN2A/B deletions are strongly associated with meningioma progression: a meta-analysis of individual patient data. *Acta Neuropathol Commun* [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2024 Oct 24];11(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38017560/>
102. Ahmeti H, Borzikowsky C, Hollander D, Röcken C, Jansen O, Synowitz M, et al. Risks and neurological benefits of meningioma surgery in elderly patients compared to young patients. *J Neurooncol* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2024 Oct 24];154(3):335–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34472015/>
103. Maíllo A, Orfao A, Sayagués JM, Díaz P, Gómez-Moreta JA, Caballero M, et al. New classification scheme for the prognostic stratification of meningioma on the basis of chromosome 14 abnormalities, patient age, and tumor histopathology. *J Clin Oncol* [Internet]. 2003 Sep 1 [cited 2024 Oct 24];21(17):3285–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12947064/>
104. Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*

- [Internet]. 2006 [cited 2024 Oct 23];444(7119):633–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17136093/>
105. Buj R, Leon KE, Anguelov MA, Aird KM. Suppression of p16 alleviates the senescence-associated secretory phenotype. *Aging* [Internet]. 2021 Feb 15 [cited 2024 Oct 23];13(3):3290–312. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33550279/>
  106. Tang V, Lu R, Mirchia K, Van Ziffle J, Devine P, Lee J, et al. Loss of p16 expression is a sensitive marker of CDKN2A homozygous deletion in malignant meningiomas. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2023 Apr 1 [cited 2024 Oct 23];145(4):497–500. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36723772/>
  107. Carreno G, Guiho R, Martinez-Barbera JP. Cell senescence in neuropathology: A focus on neurodegeneration and tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2024 Oct 23];47(3):359–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33378554/>
  108. Ho VKY, Anten MM, Garst A, Bos EM, Snijders TJ, Eekers DBP, et al. Initial management of newly diagnosed WHO grade 2-3 adult meningioma following surgery: results from the Dutch Brain Tumour Registry (2016-2021). *J Neurooncol* [Internet]. 2024 Oct 1 [cited 2024 Oct 23];170(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39207626/>
  109. Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, et al. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* [Internet]. 2006 Apr [cited 2024 Oct 24];5(2):187–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16626397/>
  110. Yamamoto M, Sanomachi T, Suzuki S, Togashi K, Sugai A, Seino S, et al. Gemcitabine radiosensitization primes irradiated malignant meningioma cells for senolytic elimination by navitoclax. *Neurooncol Adv* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2024 Oct 24];3(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34765973/>
  111. Viaene AN, Zhang B, Martinez-Lage M, Xiang C, Tosi U, Thawani JP, et al. Transcriptome signatures associated with meningioma progression. *Acta Neuropathol Commun* [Internet]. 2019 Apr 30 [cited 2024 Oct 24];7(1):67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31039818/>
  112. Landry AP, Yefet LS, Wang JZ, Zadeh G, Nassiri F. Methylation profiling in the contemporary management of meningioma. *J Neurooncol* [Internet]. 2024 [cited 2024 Oct 24]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39306649/>
  113. Wang JZ, Landry AP, Raleigh DR, Sahm F, Walsh KM, Goldbrunner R, et al. Meningioma: International Consortium on Meningiomas consensus review on scientific advances and treatment paradigms for clinicians, researchers, and patients. *Neuro Oncol* [Internet]. 2024 Oct 3 [cited 2024 Oct 24];26(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38695575/>
  114. Mijit M, Caracciolo V, Melillo A, Amicarelli F, Giordano A. Role of p53 in the Regulation of Cellular Senescence. *Biomolecules* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2024 Oct 24];10(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32182711/>
  115. Engeland K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death Differ*. 2022 May 1;29(5):946–60.
  116. Kim MS, Kim KH, Lee EH, Lee YM, Lee SH, Kim HD, et al. Results of immunohistochemical staining for cell cycle regulators predict the recurrence of atypical meningiomas. *J Neurosurg* [Internet]. 2014 Nov 1 [cited 2024 Oct 24];121(5):1189–200. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25148008/>
  117. Korshunov A, Shishkina L, Golanov A. Immunohistochemical analysis of p16INK4a, p14ARF, p18INK4c, p21CIP1, p27KIP1 and p73 expression in 271 meningiomas correlation with tumor grade and clinical outcome. *Int J Cancer* [Internet]. 2003 May 10 [cited 2024 Oct 24];104(6):728–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12640680/>
  118. Aung TM, Ngamjarus C, Prongvitaya T, Saengboonmee C, Prongvitaya S. Biomarkers for prognosis of meningioma patients: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* [Internet]. 2024 May 1 [cited 2024 Oct 24];19(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38758750/>

119. Bayley JVC, Hadley CC, Harmanci AO, Harmanci AS, Klisch TJ, Patel AJ. Multiple approaches converge on three biological subtypes of meningioma and extract new insights from published studies. *Sci Adv* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2024 Oct 24];8(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35108039/>
120. Nassiri F, Liu J, Patil V, Mamatjan Y, Wang JZ, Hugh-White R, et al. A clinically applicable integrative molecular classification of meningiomas. *Nature* [Internet]. 2021 Sep 2 [cited 2024 Oct 24];597(7874):119–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34433969/>
121. Sun T, Plutynski A, Ward S, Rubin JB. An integrative view on sex differences in brain tumors. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2015 Sep 12 [cited 2024 Oct 24];72(17):3323–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25985759/>
122. Mohamad Kamal NS, Safuan S, Shamsuddin S, Foroozandeh P. Aging of the cells: Insight into cellular senescence and detection Methods. *Eur J Cell Biol* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2024 Oct 24];99(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32800277/>
123. Phan TG, Croucher PI. The dormant cancer cell life cycle. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2024 Oct 24];20(7):398–411. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32488200/>
124. Jamasbi E, Hamelian M, Hossain MA, Varmira K. The cell cycle, cancer development and therapy. *Mol Biol Rep* [Internet]. 2022 Nov 1 [cited 2024 Oct 24];49(11):10875–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35931874/>
125. Toland A, Huntoon K, Dahiya SM. Meningioma: A Pathology Perspective. *Neurosurgery* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2024 Oct 24];89(1):11–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33588439/>
126. Bi WL, Abedalthagafi M, Horowitz P, Agarwalla PK, Mei Y, Aizer AA, et al. Genomic landscape of intracranial meningiomas. *J Neurosurg* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2024 Oct 24];125(3):525–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26771848/>
127. Okano A, Miyawaki S, Hongo H, Dofuku S, Teranishi Y, Mitsui J, et al. Associations of pathological diagnosis and genetic abnormalities in meningiomas with the embryological origins of the meninges. *Sci Rep* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2024 Oct 24];11(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33772057/>
128. Jain D, Nambirajan A, Borczuk A, Chen G, Minami Y, Moreira AL, et al. Immunocytochemistry for predictive biomarker testing in lung cancer cytology. *Cancer Cytopathol* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2024 Oct 24];127(5):325–39. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31050216/>
129. Mino-Kenudson M, Schalper K, Cooper W, Dacic S, Hirsch FR, Jain D, et al. Predictive Biomarkers for Immunotherapy in Lung Cancer: Perspective From the International Association for the Study of Lung Cancer Pathology Committee. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2024 Oct 24];17(12):1335–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36184066/>
130. Saul D, Kosinsky RL, Atkinson EJ, Doolittle ML, Zhang X, LeBrasseur NK, et al. A new gene set identifies senescent cells and predicts senescence-associated pathways across tissues. *Nat Commun* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2024 Oct 24];13(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35974106/>
131. Kirkland JL, Tchkonja T. Senolytic drugs: from discovery to translation. *J Intern Med* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2024 Oct 24];288(5):518–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32686219/>
132. Wissler Gerdes EO, Zhu Y, Tchkonja T, Kirkland JL. Discovery, development, and future application of senolytics: theories and predictions. *FEBS J* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2024 Oct 24];287(12):2418–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32112672/>
133. Al-Rashed M, Foshay K, Abedalthagafi M. Recent Advances in Meningioma Immunogenetics. *Front Oncol* [Internet]. 2020 Jan 8 [cited 2024 Oct 24];9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31970090/>

134. Hernandez-Segura A, de Jong T V., Melov S, Guryev V, Campisi J, Demaria M. Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Curr Biol* [Internet]. 2017 Sep 11 [cited 2024 Oct 24];27(17):2652-2660.e4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28844647/>
135. Regulski MJ. Cellular Senescence: What, Why, and How. *Wounds*. 2017 Jun 1;29(6):168–74.
136. Galanos P, Vougas K, Walter D, Polyzos A, Maya-Mendoza A, Haagenen EJ, et al. Chronic p53-independent p21 expression causes genomic instability by deregulating replication licensing. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2016 Jun 28 [cited 2024 Oct 24];18(7):777–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27323328/>
137. Milanovic M, Fan DNY, Belenki D, Däbritz JHM, Zhao Z, Yu Y, et al. Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature* [Internet]. 2018 Jan 4 [cited 2024 Oct 24];553(7686):96–100. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29258294/>
138. Medema JP. Escape from senescence boosts tumour growth. *Nature*. 2018 Jan 4;553(7686):37–8.
139. Dou Z, Berger SL. Senescence Elicits Stemness: A Surprising Mechanism for Cancer Relapse. *Cell Metab*. 2018 Apr 3;27(4):710–1.
140. Patel PL, Suram A, Mirani N, Bischof O, Herbig U. Derepression of hTERT gene expression promotes escape from oncogene-induced cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2016 Aug 23 [cited 2024 Oct 24];113(34):E5024–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27503890/>
141. Saleh T, Tyutyunyk-Massey L, Murray GF, Alotaibi MR, Kawale AS, Elsayed Z, et al. Tumor cell escape from therapy-induced senescence. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2024 Oct 24];162:202–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30576620/>
142. Saleh T, Tyutyunyk-Massey L, Gewirtz DA. Tumor Cell Escape from Therapy-Induced Senescence as a Model of Disease Recurrence after Dormancy. *Cancer Res* [Internet]. 2019 [cited 2024 Oct 24];79(6):1044–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30803994/>
143. L'Hôte V, Mann C, Thuret JY. From the divergence of senescent cell fates to mechanisms and selectivity of senolytic drugs. *Open Biol*. 2022 Sep 21;12(9).
144. Takeda H, Okada M, Kuramoto K, Suzuki S, Sakaki H, Sanomachi T, et al. Antitumor activity of gemcitabine against high-grade meningioma in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 2017;8(53):90996–1008.
145. Tse JYM, Ng HK, Lo KW, Chong EYY, Lam PYP, Ng EKO, et al. Analysis of cell cycle regulators: p16INK4A, pRb, and CDK4 in low- and high-grade meningiomas. *Hum Pathol* [Internet]. 1998 [cited 2024 Nov 13];29(11):1200–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9824096/>
146. Svärd J, Henricson KH, Persson-Lek M, Rozell B, Lauth M, Bergström Å, et al. Genetic elimination of Suppressor of fused reveals an essential repressor function in the mammalian Hedgehog signaling pathway. *Dev Cell* [Internet]. 2006 Feb [cited 2024 Nov 13];10(2):187–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16459298/>
147. Cai E, Barba MG, Ge X. Hedgehog Signaling in Cortical Development. *Cells* [Internet]. 2023 Jan 1 [cited 2024 Nov 13];13(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38201225/>
148. Han B, Wang Y, Yue S, Zhang YH, Kuang L, Gao B Bin, et al. Increasing Sufu gene dosage reveals its unorthodox role in promoting polydactyly and medulloblastoma tumorigenesis. *JCI Insight* [Internet]. 2024 [cited 2024 Nov 13];9(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38358805/>
149. Barnfield PC, Zhang X, Thanabalasingham V, Yoshida M, Hui CC. Negative regulation of Gli1 and Gli2 activator function by Suppressor of fused through multiple mechanisms. *Differentiation* [Internet]. 2005 [cited 2024 Nov 13];73(8):397–405. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16316410/>
150. Stone DM, Murone M, Luoh SM, Ye W, Armanini MP, Gurney A, et al. Characterization of the human suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli. *J*

- Cell Sci [Internet]. 1999 [cited 2024 Nov 13];112 ( Pt 23)(23):4437–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10564661/>
151. Yang F, Wynn DT, Shen C, Ayad NG, Robbins DJ. Multiprotein GLI Transcriptional Complexes as Therapeutic Targets in Cancer. *Life (Basel)* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2024 Nov 13];12(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36556332/>
  152. Wang JZ, Nassiri F, Landry AP, Patil V, Liu J, Aldape K, et al. The multiomic landscape of meningiomas: a review and update. *J Neurooncol* [Internet]. 2023 Jan 1 [cited 2024 Nov 13];161(2):405–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36840836/>
  153. Mawrin C, Koch R, Waldt N, Sandalcioglu IE, Braunsdorf WEK, Warnke JP, et al. A new amplicon-based gene panel for next generation sequencing characterization of meningiomas. *Brain Pathol* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2024 Nov 13];32(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35213080/>
  154. Berghoff AS, Hielscher T, Ricken G, Furtner J, Schrimpf D, Widhalm G, et al. Prognostic impact of genetic alterations and methylation classes in meningioma. *Brain Pathol* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2024 Nov 13];32(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35213082/>
  155. Olar A, Wani KM, Wilson CD, Zadeh G, DeMonte F, Jones DTW, et al. Global epigenetic profiling identifies methylation subgroups associated with recurrence-free survival in meningioma. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2024 Nov 13];133(3):431–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28130639/>
  156. Kim M, Costello J. DNA methylation: an epigenetic mark of cellular memory. *Exp Mol Med* [Internet]. 2017 Apr 7 [cited 2024 Nov 13];49(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28450738/>
  157. Savic D, De Angelis M, Grujicic D. The Clinic of Neurosurgery at the Clinical Center of Serbia in Belgrade--building on the past. *World Neurosurg* [Internet]. 2014 [cited 2024 Nov 13];82(1–2):e15–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23994133/>
  158. Ren L, Xie Q, Deng J, Chen J, Yu J, Wang D, et al. Association of frequent NF2 mutations with spinal location predominance and worse outcomes in psammomatous meningiomas. *J Neurosurg* [Internet]. 2024 Sep 1 [cited 2024 Nov 13];141(3):593–601. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38552238/>
  159. Soni N, Ora M, Bathla G, Szekeres D, Desai A, Pillai J, et al. Meningioma: Molecular Updates from the 2021 World Health Organization Classification of CNS Tumors and Imaging Correlates. *AJNR Am J Neuroradiol* [Internet]. 2024 Jun 6 [cited 2024 Nov 13];ajnr.A8368. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38844366/>
  160. Dullea JT, Chaluts D, Vasani V, Rutland JW, Gill CM, Ellis E, et al. NF2 mutation associated with accelerated time to recurrence for older patients with atypical meningiomas. *Br J Neurosurg* [Internet]. 2023 [cited 2024 Nov 13]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37096420/>
  161. Zheng W, Lu S, Cai H, Kang M, Qin W, Li C, et al. Deguelin inhibits proliferation and migration of human pancreatic cancer cells in vitro targeting hedgehog pathway. *Oncol Lett* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2024 Nov 13];12(4):2761–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27698853/>
  162. Xu F, Li H, Hu C. LIFR-AS1 modulates Sufu to inhibit cell proliferation and migration by miR-197-3p in breast cancer. *Biosci Rep* [Internet]. 2019 Jul 8 [cited 2024 Nov 13];39(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31127025/>
  163. Ruiz i Altaba A, Mas C, Stecca B. The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2007 Sep [cited 2024 Nov 13];17(9):438–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17845852/>
  164. Nguyen V, Chokas AL, Stecca B, Ruiz i Altaba A. Cooperative requirement of the Gli proteins in neurogenesis. *Development* [Internet]. 2005 Jul [cited 2024 Nov 13];132(14):3267–79. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15983404/>

165. Matissek SJ, ElSawa SF. GLI3: a mediator of genetic diseases, development and cancer. *Cell Commun Signal* [Internet]. 2020 Apr 3 [cited 2024 Nov 13];18(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32245491/>
166. Pan Y, Bai CB, Joyner AL, Wang B. Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2006 May 1 [cited 2024 Nov 13];26(9):3365–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16611981/>
167. Stecca B, Mas C, Clement V, Zbinden M, Correa R, Piguet V, et al. Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2007 Apr 3 [cited 2024 Nov 13];104(14):5895–900. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17392427/>
168. Seto M, Ohta M, Asaoka Y, Ikenoue T, Tada M, Miyabayashi K, et al. Regulation of the hedgehog signaling by the mitogen-activated protein kinase cascade in gastric cancer. *Mol Carcinog* [Internet]. 2009 Aug [cited 2024 Nov 13];48(8):703–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19142899/>
169. Mazumdar T, DeVecchio J, Agyeman A, Shi T, Houghton JA. The GLI genes as the molecular switch in disrupting Hedgehog signaling in colon cancer. *Oncotarget* [Internet]. 2011 [cited 2024 Nov 13];2(8):638–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21860067/>
170. Liu Z, Li T, Reinhold MI, Naski MC. MEK1-RSK2 contributes to Hedgehog signaling by stabilizing GLI2 transcription factor and inhibiting ubiquitination. *Oncogene* [Internet]. 2014 Jan 2 [cited 2024 Nov 13];33(1):65–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23208494/>
171. Ji Z, Mei FC, Xie J, Cheng X. Oncogenic KRAS activates hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2007 May 11 [cited 2024 Nov 13];282(19):14048–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17353198/>
172. Jing J, Wu Z, Wang J, Luo G, Lin H, Fan Y, et al. Hedgehog signaling in tissue homeostasis, cancers, and targeted therapies. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2024 Nov 13];8(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37596267/>
173. Laurendeau I, Ferrer M, Garrido D, D'Haene N, Ciavarelli P, Basso A, et al. Gene expression profiling of the hedgehog signaling pathway in human meningiomas. *Mol Med* [Internet]. 2010 [cited 2024 Nov 13];16(7–8):262–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20386868/>
174. Armocida D, Rizzo F, Zancana G, Cofano F, Pesce A, Frati A, et al. The Prognostic Impact of Progesteron-Receptor Expression in Surgical Intracranial Meningioma on Performance Status and Quality of Life: A Single-Center Observational Study. *World Neurosurg* [Internet]. 2024 Oct 1 [cited 2024 Nov 13];190. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39181243/>
175. Walsh KM, Price M, Raleigh DR, Calabrese E, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS, et al. Grade-stratified meningioma risk among individuals who are Non-Hispanic black and interactions with male sex. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2024 Oct 11 [cited 2024 Nov 13]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39392420/>
176. Du W, Li D, Xie J, Tang P. miR-367-3p downregulates Rab23 expression and inhibits Hedgehog signaling resulting in the inhibition of the proliferation, migration, and invasion of prostate cancer cells. *Oncol Rep* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2024 Nov 13];46(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34278506/>
177. Fu L, Wu H, Cheng SY, Gao D, Zhang L, Zhao Y. Set7 mediated Gli3 methylation plays a positive role in the activation of Sonic Hedgehog pathway in mammals. *Elife* [Internet]. 2016 May 5 [cited 2024 Nov 16];5(MAY2016). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27146893/>
178. Rodrigues MFSD, Miguita L, De Andrade NP, Heguedusch D, Rodini CO, Moyses RA, et al. GLI3 knockdown decreases stemness, cell proliferation and invasion in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* [Internet]. 2018 [cited 2024 Nov 16];53(6):2458–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30272273/>

179. Li J, Qiu M, An Y, Huang J, Gong C. miR-7-5p acts as a tumor suppressor in bladder cancer by regulating the hedgehog pathway factor Gli3. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2018 Sep 10 [cited 2024 Nov 16];503(3):2101–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30100065/>
180. Miyahara H, Natsumeda M, Yoshimura J, Ogura R, Okazaki K, Toyoshima Y, et al. Neuronal differentiation associated with Gli3 expression predicts favorable outcome for patients with medulloblastoma. *Neuropathology* [Internet]. 2014 Feb [cited 2024 Nov 16];34(1):1–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23889567/>
181. Chaudhry P, Singh M, Triche TJ, Guzman M, Merchant AA. GLI3 repressor determines Hedgehog pathway activation and is required for response to SMO antagonist glasdegib in AML. *Blood* [Internet]. 2017 Jun 29 [cited 2024 Nov 16];129(26):3465–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28487292/>
182. Zhang J, Li S, Li Y, Liu H, Zhang Y, Zhang Q. miRNA-218 regulates the proliferation and apoptosis of cervical cancer cells via targeting Gli3. *Exp Ther Med* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2024 Nov 16];16(3):2433–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30210595/>
183. Wen SY, Lin Y, Yu YQ, Cao SJ, Zhang R, Yang XM, et al. miR-506 acts as a tumor suppressor by directly targeting the hedgehog pathway transcription factor Gli3 in human cervical cancer. *Oncogene* [Internet]. 2015 Feb 5 [cited 2024 Nov 16];34(6):717–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24608427/>
184. Zhao D, Cui Z. MicroRNA-361-3p regulates retinoblastoma cell proliferation and stemness by targeting hedgehog signaling. *Exp Ther Med* [Internet]. 2019 Dec 6 [cited 2024 Nov 16];17(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30679988/>
185. Zhang HQ, Sun Y, Li JQ, Huang LM, Tan SS, Yang FY, et al. The expression of microRNA-324-3p as a tumor suppressor in nasopharyngeal carcinoma and its clinical significance. *Onco Targets Ther* [Internet]. 2017 Oct 11 [cited 2024 Nov 16];10:4935–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29066913/>
186. Steg A, Amm HM, Novak Z, Frost AR, Johnson MR. Gli3 mediates cell survival and sensitivity to cyclopamine in pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther* [Internet]. 2010 Nov 1 [cited 2024 Nov 16];10(9):893–902. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20814245/>
187. Brastianos PK, Horowitz PM, Santagata S, Jones RT, McKenna A, Getz G, et al. Genomic sequencing of meningiomas identifies oncogenic SMO and AKT1 mutations. *Nat Genet* [Internet]. 2013 Mar [cited 2024 Nov 16];45(3):285–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23334667/>
188. Clark VE, Harmancl AS, Bai H, Youngblood MW, Lee TI, Baranoski JF, et al. Recurrent somatic mutations in POLR2A define a distinct subset of meningiomas. *Nat Genet* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2024 Nov 16];48(10):1253–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27548314/>
189. Youngblood MW, Duran D, Montejo JD, Li C, Omay SB, Özduman K, et al. Correlations between genomic subgroup and clinical features in a cohort of more than 3000 meningiomas. *J Neurosurg* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2024 Nov 16];133(5):1345–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31653806/>
190. Youngblood MW, Miyagishima DF, Jin L, Gupte T, Li C, Duran D, et al. Associations of meningioma molecular subgroup and tumor recurrence. *Neuro Oncol* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2024 Nov 16];23(5):783–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33068421/>
191. Abedalthagafi M, Bi WL, Aizer AA, Merrill PH, Brewster R, Agarwalla PK, et al. Oncogenic PI3K mutations are as common as AKT1 and SMO mutations in meningioma. *Neuro Oncol* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2024 Nov 16];18(5):649–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26826201/>
192. Clark VE, Erson-Omay EZ, Serin A, Yin J, Cotney J, Özduman K, et al. Genomic analysis of non-NF2 meningiomas reveals mutations in TRAF7, KLF4, AKT1, and SMO. *Science*

- [Internet]. 2013 Mar 1 [cited 2024 Nov 16];339(6123):1077–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23348505/>
193. Sayagués JM, Taberero MD, Maíllo A, Trelles O, Espinosa AB, Sarasquete ME, et al. Microarray-based analysis of spinal versus intracranial meningiomas: different clinical, biological, and genetic characteristics associated with distinct patterns of gene expression. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 2006 May [cited 2024 Nov 16];65(5):445–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16772868/>
  194. Pietrobono S, Gagliardi S, Stecca B. Non-canonical Hedgehog Signaling Pathway in Cancer: Activation of GLI Transcription Factors Beyond Smoothed. *Front Genet* [Internet]. 2019 [cited 2024 Nov 16];10(JUN). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31244888/>
  195. Wagle PR, Loeschner D, Rosahl S, Brodhun M, Gerlach R. A comprehensive correlation of the KI-67 proliferation index to patient's, imaging and tumor features and its value in predicting long-term course of patients with newly diagnosed intracranial meningiomas. *Neurosurg Rev* [Internet]. 2024 Dec 1 [cited 2024 Nov 16];47(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38806958/>
  196. Maas SLN, Hielscher T, Sievers P, Hovestadt V, Suwala AK, Acker T, et al. Loss over 5% of chromosome 1p is a clinically relevant and applicable cut-off for increased risk of recurrence in meningioma. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2024 Dec 1 [cited 2024 Nov 16];148(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39115604/>



Lista skraćenica korišćenih u doktorskoj disertaciji:

CD34 – (eng. cluster of differentiation 34)  
CDKN – ciklin zavisna kinaza (eng. cyclin-dependent kinase, CDKN)  
CEA – (eng. carcinoembryonic antigen, CEA)  
CK7 – (eng. cytokeratin 7, CK7)  
CKAE/AE3 – (eng. cytokeratin, CKAE1/AE3)  
CNS – centralni nervni sistem (eng. central nervous system, CNS)  
CSF – (en. cerebrospinal fluid, CSF)  
DAB – (diaminobenzidin)  
EMA – (eng. epithelial membrane antigen, EMA)  
GFAP – (eng. glial fibrillary acidic protein, GFAP)  
GLI – (eng. glioma associated oncogene, GLI)  
OLIG2 – (eng. oligodendrocyte transcription factor 2, OLIG2)  
p16 – (eng. p16<sup>INK4a</sup>)  
p21 – (eng. p21<sup>W1/Cip1</sup>)  
PAS – (eng. periodic acid schiff, PAS)  
PR – progesteronski receptor (eng. progesterone receptor, PR)  
PTCH1 – (eng. protein patched homolog 1, PTCH1)  
PVU – (polje velikog uveličanja)  
S-100 – (family of low molecular weight proteins, S-100)  
SA-β-GAL – (eng. senescence-associated beta-galactosidase, SA-β-GAL)  
SASP – (eng. senescence associated secretory phenotype, SASP)  
SMO – (eng. smoothened, SMO)  
SOX10 – (Sry-related HMg-Box gene 10, SOX10)  
SSTR2A – (eng. somatostatin receptor 2, SSTR2)  
STAT6 – (eng. signal transducer and activator of transcription, STAT6)  
SUFU – (eng. suppressor of fused, SUFU)  
SZO – (Svetska zdravstvena organizacija)  
TMN – (tkivni mikroniz)



---

## *Curriculum vitae*

Vladimir S. Mijajlović, rođen je 6.6.1988. godine u Beogradu, gde je završio osnovnu i srednju školu. Godine 2007. upisuje Medicinski fakultet, Filozofski fakultet – odsek Istorija umetnosti i Stomatološki fakultet, ali odlučuje da nastavi studije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu diplomirao je 13.12.2013. godine sa prosečnom ocenom 9,00. Godine 2024., nakon obaveznog šestomesečnog lekarskog staža polaže stručni ispit za doktora medicine i stiče licencu za rad.

U junu 2014. godine započinje volonterski staž na Institutu za digestivne bolesti (odeljenje za gastrointestinalnu, hepatobiliopankreatičnu, neuroendokrinu i urgentnu patologiju) Univerzitetskog kliničkog centra Srbije. Školske 2014/2015 upisuje Specijalističke akademske studije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu (tema specijalističkog akademskog rada „Citološki i molekularni aspekti organogeneze bubrega“). U junu 2015. godine zasniva radni odnos (na neodređeno vreme) na Institutu za digestivne bolesti Univerzitetskog kliničkog centra Srbije, na poziciji kliničkog lekara na odeljenju za gastrointestinalnu, hepatobiliopankreatičnu, neuroendokrinu i urgentnu patologiju u okviru Službe za patologiju, patohistologiju i medicinsku citologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije. U oktobru 2015. započinje specijalizaciju iz patologije na Institutu za patologiju Prof. dr Đorđe Joannović na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Iste godine postaje član Udruženja patologa i citologa Srbije (UPCS). Od početka specijalizacije aktivno počinje da se bavi urološkom patologijom. U oktobru 2018. upisuje Doktorske studije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu (modul Biologija tumora i oksidativna oboljenja) pod mentorstvom prof. dr Silvija De Luke i prof. dr Emilije Manojlović Gačić.

U junu 2019. godine prelazi na odeljenje urološke i nefrološke patologije Klinike za urologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije. Specijalistički ispit iz patologije položio je 2020. godine sa vrlo dobrim uspehom (predsednik ispitne komisije prof. dr Dimitrije Brašanac). Iste godine postaje član Evropskog udruženja patologa (ESP). Doktorska teza pod nazivom „Ispitivanje uloge senescencije i elemenata *Hedgehog* signalnog puta u meningiomima“ odobrena mu je 28.11.2023. godine na Veću naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu. Godine 2024. postaje član projekta COST CA23119 *SENESCENCE 2030: Targeting Cell Senescence to Prevent Age – Related Diseases*. Od jula meseca 2024. godine obavlja funkciju načelnika odeljenja urološke i nefrološke patologije Klinike za urologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije. Školske 2024/2025 godine upisuje užu specijalizaciju (modul klinička patologija). Planirano istraživanje u okviru uže specijalizacije bazirano mu je na tumorima testisa.

Uža oblast kojom se aktivno bavi u okviru patologije je urološka patologija, sa posebnim osvrtom na neoplastična oboljenja testisa i bubrega. Sekundarna oblast interesovanja i bavljenja istom (prvih 5 godina od početka profesionalne karijere) mu je gastrointestinalna, hepatobiliopankreatična, neuroendokrina i urgentna patologija. Za sebe kaže da je umetnik u duši, a lekar po opredeljenju. Aktivno govori engleski i portugalski jezik, pored kojih se služi španskim, italijanskim i nemačkim jezikom. Živi i radi u Beogradu.

## Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. Mijajlović V, Miler M, Ilić R, Rašić D, Dunđerović D, Raičević S, Soldatović I, De Luka S, Manojlović-Gačić E. Oncogene-induced senescence in meningiomas-an immunohistochemical study. *J Neurooncol.* 2024 Jan;166(1):143-153. doi: 10.1007/s11060-023-04532-y. Epub 2023 Dec 20. PMID: 38117375.
2. Mijajlović V, De Luka S, Manojlović-Gačić E. Senescencija: definicija, mehanizmi nastanka i detekcija u tkivima. *Medicinski podmladak* 2024. DOI 10.5937/mp75-46623

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора            Владимир Мијајловић

Број индекса                        5139/2018

Изјављујем да је докторска дисертација под насловом

Испитивање улоге сенесценције и елемената *HEDGEHOG* сигналног пута у менингиомима

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

У Београду, 26.12.2024

**Потпис аутора**

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора	Владимир Мијајловић
Број индекса	5139/2018
Студијски програм	Биологија тумора и оксидативна обољења
Наслов рада	Испитивање улоге сенесценције и елемената <i>HEDGEHOG</i> сигналног пута у менингиомима
Ментор	проф. др Силвио Де Лука
Коментор	проф. др Емилија Манојловић Гачић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**. Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 26.12.2024.

**Потпис аутора**

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Испитивање улоге сенесценције и елемената *HEDGEHOG* сигналног пута у менингиомима која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Београду, 26.12.2024.

**Потпис аутора**

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.