

## Overin Benign, “Borderline” ve Malign Epitelyal Tümörlerinde Ki-67 Ekspresyonu ve Prognostik Parametrelerle İlişkisi

Müberra Seğmen Yılmaz<sup>1</sup>, Dilek Yavuzer<sup>2</sup>, Nimet Karadayı<sup>2</sup>, Nagehan Özdemir Barışık<sup>2</sup>, Gözde Kır<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ümraniye Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Patoloji Kliniği, İstanbul

<sup>2</sup>Kartal Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Patoloji Kliniği

**Yazışma Adresi:** ümraniye eğitim ve araştırma hastanesi patoloji kliniği 34 766 istnabul - Türkiye

İş Tel: 0 216 618 32 32 Cep Tel: 0533 241 74 93 e-mail: muberrasegmen@gmail.com

### ÖZET:

**Amaç:** Yalnızca proliferatif hücre siklusunda tesbit edilen protein yapıdaki Ki-67 antijeni tümörün büyüme hızını ve progresyonunu göstermektedir. Yaptığımız bu çalışmada; benign, borderline, malign seröz ve müsinöz over tümörlerindeki Ki-67 ekspresyonu, Ki-67 'nin malign progresyonla ilişkisi, seröz ve müsinöz tümör tipleri arasında Ki-67'nin ekspresyonunun karşılaştırılması, Ki-67 'nin borderline ve malign tümörlerde prognostik parametre olarak anlamlılığı, serum Ca 125 değerleri ve diğer prognostik parametrelerle ilişkisi araştırılmıştır.

**Materyal ve Metod:** 38'i malign, 15'i borderline, 34'ü benign over tümörü ve 5'i overde endosalpingiozis tanısı almış olan toplam 92 olgunun parafin bloklarından elde edilen kesitlere Ki-67 (RTU - Ki-67 MM Novo-Castra) kullanıma hazır monoklonal antikoru immünohistokimyasal boyama prosedürü uygulandı.

**Bulgular:** Ki-67 ile benign olguların %35,3'ünde %1 üzerinde pozitif nükleer boyanma izlenirken, borderline olguların %80'ninde, malign olguların ise %89,5'inde %1 üzerinde pozitif nükleer boyanma saptanmıştır. Benign, borderline, malign seröz ve müsinöz over tümörlerinde ve overde endosalpingiozis olgularında Ki-67 ekspresyonu açısından ileri derecede anlamlı farklılıklar bulunmuştur ( $p < 0,01$ ). Malign tümörlerde Ki-67 boyanma derecesi ile yaş, evre, grade, Ca 125 değerleri ve tümör tipi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ( $P > 0,05$ ). Malign tümörlerde Ki-67 boyanma derecesi borderline tümörlere göre anlamlı derecede yüksek saptanmıştır ( $p < 0,05$ ).

**Sonuç:** Bu çalışmada seröz ve müsinöz over tümörlerinde malign transformasyonun artmasıyla Ki-67 ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. Seröz ve müsinöz over karsinomlarında Ki-67 ekspresyonu ile evre ve tümör grade'i arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Seröz tümör tipinde müsinöz tümör tipine göre Ki-67 ekspresyonunda anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

**Anahtar kelimeler:** Ki-67, overin epitelyal tümörleri

### SUMMARY:

**Expression of Ki-67 in benign, borderline and malignnat epithelial tumors of the ovary, its relationship with prognostic parameters**

**Objektive:** Ki-67 is a proteinous antigene functioning in only cell proliferation cyclus .It also indicates the tumoral growing and progression. In our study we evaluated expression frequency of Ki-67 in benign, borderline, malign serous and mucinous tumors of ovary. Consequently we compared Ki-67 expression frequency between serous and mucinous groups, as a predictor of malign progression and as a prognostic parameter in malign and borderline tumours. Furthermore Ki-67 expressions of tumors and serum levels of Ca 125 are assesed in order to find a probable relation between them.

**Materials and Methods:** We applied 92 parrafın sections stained with Ki-67 (RTU – Ki-67 MM Novo-Castra) ready to use monoclonal antibody immünohistochemically. These sections of 92 cases including 38 malign ,15 borderline ,34 benign ovarian tumors and 5 endosalpingiosis.

**Results:** While 35,3% of benign cases revealed more than 1% positive nuclear staining, 80% of borderline tumors and 89,5% of malign tumors showed more than 1% positive nuclear staining. As a result we found significant differences of Ki-67 expression between benign, borderline, malign serous and mucinous ovarian tumors and endosalpingiosis cases ( $p < 0,01$ ).

We couldn't find significant relationship between Ki-67 staining frequency and some other parametres ; age,stage,grade, serum Ca 125 and tumor type ( $p > 0,05$ ). In malign tumors we found a higher Ki-67 staining frequency than borderline group ( $p < 0,05$ )

**Conclusion:** In this study we proved that by the increasing of malign transformation in ovarian serous and mucinous tumors, a concomitant

*increase in Ki-67 expression occurs. There is no significant relationship between Ki-67 expression and stage, grade of ovarian serous and mucinous tumors. There had been no significant difference of Ki-67 expression in case of comparing the serous and mucinous tumor types.*

**Key words:** *Ki-67, ovarian epithelial tumors*

## GİRİŞ

Ki-67 yalnızca proliferatif hücre siklusunda tesbit edilen molekül ağırlığı 395-345 kDa olan protein yapıdaki bir antijendir(1,2,3,4,5,6). Ekspresyonu 10. kromozomda lokalize tek gen tarafından kontrol edilir(7).Ki-67 antijeninin immünojen rekombinant parçası monoklonal antikör MIB1 ve MIB3'dür. Rutin immünohistokiyasal reaksiyonlarda monoklonal Ki-67 (MIB1) kullanılır(2). Ki-67 marker'ı tümör hücrelerindeki proliferasyonu, tümörün büyüme hızını ve progresyonunu gösterir (1,2,3,4,5,8,9,10)). Over tümörlerinde yapılan çalışmalarda benign seröz ve müsinöz tümörlerde Ki-67 labelling indeksinin borderline tümörlere göre daha düşük, borderline tümörlerde de karsinoma göre daha düşük olduğu görülmüştür. Seröz karsinomlarda Ki-67 ekspresyonu tümör grade'i ile korele bulunurken, borderline tümörlerde Ki-67 indeksinin prognostik parametreler ve sağkalım ile ilişkisi gösterilememiştir(2,4). Biz yaptığımız çalışmada seröz ya da müsinöz benign ,borderline ve malign over tümörleri ile overde endosalpingiozis olgularında Ki-67'nin epitelyal over tümörlerindeki ekspresyonu, tümör tipleri arasında Ki-67 ekspresyon farkının olup olmadığı ,borderline ,malign tümörlerde prognostik parametre olarak anlamlılığı, serum Ca 125 değerleri ve diğer prognostik parametrelerle ilişkisini araştırdık.

## MATERYAL VE METOD

Mart 1999 ve Eylül 2003 yılları arasında ..... Patoloji Kliniğinde tanı alan 34'ü seröz papiller karsinom, 4'ü müsinöz kistadenokarsinom, 9'u borderline seröz tümör, 6'sı borderline müsinöz tümör, 19'u seröz kistadenom, 15'i müsinöz kistadenom ve 5'i overde endosalpingiozis olmak üzere toplam 92 vaka çalışmaya dahil edildi. Bunların 43'ü

TAH+BSO, 41'i unilateral ooferektomi, 8'i bilateral ooferektomi piyesi idi.Olguların yaşları 18 ile 82 arasında değişmekte olup, ortalama yaş 47.98±16.60'tır. Malign olgularda ortalama yaş 54,74±15,20; borderline olgularda ortalama yaş 47,47±18,05; benign olgularda ortalama yaş 40,03±14,41 ve endosalpingiozisli olgularda ortalama yaş 52,20±16,80'dir.

Ki-67 ekspresyonunu belirlemek amacıyla parafin bloklara gömülü dokulardan 4 mikrometre kalınlığında kesit "Poly-L-Lysine "li lamlara alındı.Hazırlanan kesitlere Ki-67(RTU-Ki-67-MM,Novo-Castra) kullanıma hazır monoklonal antikoru üretici firma prospektüsüne uygun olarak immünohistokimyasal boyama prosedürü uygulandı. Deparafinize edilen kesitler 15'şer dakika ksilende ve absolü alkolde bırakıldı PBS(phosphate buffer saline) ile yıkanarak 1/10 oranında distile su ile sulandırılan antijen retrivel(sitrat buffer) aşaması sonrası %3'lük hidrojen peroksit ile nemli ortamda inkübe edildi. PBS ile yıkanan kesitler 5 dakika ultra V blok ile nemli ortamda inkübe edildi Ki-67 uygulama prosedürüne göre pirimer antikör aşamasında Ki-67 monoklonal antikoru uygulanarak 60 dakika inkübe edildi ve HRP-AEC yöntemiyle rutin boyama işlemi tamamlandı. Pozitif kontrol için tonsil kullanıldı.

Ki-67 boyanma paterni değerlendirilirken Akira Furudoı ve arkadaşları, S. Terlikowski ve arkadaşları ile Emile Darai ve arkadaşlarının yöntemleri esas alındı(1,2,4). Benign, borderline, malign tümör hücrelerinin ve endosalpingiozisteki epitel hücrelerinin nükleer boyanmaları pozitif kabul edildi. Her vakada en sıcak seçilen üç 400'lük büyütme alanındaki pozitif hücre ve total hücre sayısı belirlenerek **LI(labelling indeks):** pozitif hücre sayısı/total hücre sayısıx100 formülü ile her bir alan için Ki-67 labelling indeksi hesaplandı ve bu üç alanın ortalaması alındı. Malign ve borderline tümörlerde yaş, evre, grade, Ca 125 değerleri, tümör tipi ile Ki-67 ekspresyonu karşılaştırılırken Ki-67 indeksinin ortanca(medyan) değeri alınarak bu değerler üzerindeki boyanmalar yüksek dereceli boyanma, bu değerler altındaki boyanmalar ise düşük dereceli boyanma olarak değerlendirildi.

Benign, borderline, malign tümörler ve gendosalpingiozis olgularının Ki-67 ekspresyonu karşılaştırılırken Emile Darai ve arkadaşlarının yöntemine göre Ki-67 indeksi %1'in altındakiler (-), %1'in üzerindeki değerler ise (+) kabul edildi(4)(Tablo I).

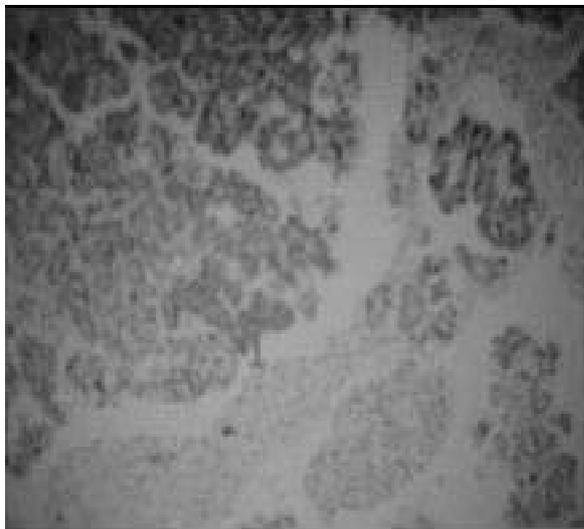
### İstatistiksel İncelemeler

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 10.0 programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart sapma) yanısıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında normal dağılım göstermeyen parametrelerimiz Kruskal Wallis analizi ile ve Mann Whitney U test ile değerlendirildi; normal dağılım gösteren parametrelerde ise Student t test kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Ki-Kare testi kullanıldı. Sonuçlar %95'lik güven aralığında, anlamlılık  $p < 0,05$  düzeyinde değerlendirildi.

### BULGULAR

Çalışmamızdaki Ki-67 değerlendirmesinde benign, borderline ve malign olgularda Ki-67 ekspresyonunda Ki-67 boyanma pozitifliği (%1 ve üzerinde boyanma) (**Resim 1**) ve negatifliği (%1 ve altında boyanma) açısından istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı farklılıklar bulunmuştur. ( $p < 0,01$ ) (**Tablo I**)

**Resim 1:** Seröz papiller kistadenokarsinom olgusunda Ki-67 nükleer boyanması (Ki-67x100)



**Tablo I:** Gruplara göre KI-67 değerlendirmesi

		Benign	Borderline	Malign	Endosal.	p
KI-67	(%1 +)	12 (%35,3)	12 (%30,0)	34 (%89,5)	2 (%40,0)	0,0001**
	(%1 -)	22 (%64,7)	3 (%20,0)	4 (%10,5)	3 (%60,0)	

\*\*  $p < 0,01$  ileri düzeyde anlamlı

Malign+Borderline olgularda 40 yaş altı ve üstü olan olgular arasında KI-67 sınıflamasına göre anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p > 0,05$ ). Ayrıca KI-67 değerine göre tümör tipleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. ( $p > 0,05$ ). (**Tablo II**)

**Tablo II:** Malign+Borderline grubunda KI-67'ye göre yaş, tümör tipi değerlendirmesi

		Malign+Borderline KI-67 (Medyan 3,6)		p
		Yüksek	Düşük	
Yaş grubu	40 yaş altı	6 (%18,2)	6 (%37,5)	0,140
	40 yaş ve üstü	27 (%81,8)	10 (%62,5)	
Tümör tipi	Seröz	26 (%78,8)	14 (%87,5)	0,460
	Musinoz	7 (%21,2)	2 (%12,5)	
Ca 125	Malign	1763,95±2259,7	1281,46±1449,1	0,706
	Borderline	41,79±37,9	84,50±71,3	0,180

\* $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı

Malign olgularda KI-67'ye göre 60 yaş üzeri ve altında olan olgular arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p > 0,05$ ). KI-67'ye göre evre, grade düzeyleri ve tümör tipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p > 0,05$ ). KI-67 değeri 3.6 medyan değerinden düşük ve yüksek olan olguların Ca 125 ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p > 0,05$ ). (**Tablo III**)

**Tablo III:** Malign tümürlü olgularda KI-67'ye göre yaş, stage, Ca 125, tümör tipi ve grade değerlendirmesi

		Malign tümörler KI-67 (Medyan 3,6)		p
		Yüksek	Düşük	
Yaş grubu	60 yaş altı	12 (%46,2)	5 (%55,6)	0,711
	60 yaş ve üstü	14 (%53,8)	4 (%44,4)	
Stage	I+II	5 (%19,2)	4 (%44,4)	0,192
	III+IV	21 (%80,8)	5 (%55,6)	
Tümör tipi	Musinoz	1 (%3,8)	2 (%22,2)	0,156
	Seröz	25 (%96,2)	7 (%77,8)	
Ca 125 (Ortalama)		1763,95±2259,7	1281,46±1449,1	0,706
Grade	İyi dif.	3 (%11,5)	4 (%44,4)	0,090
	Orta derecede dif.	17 (%65,4)	3 (%33,3)	
	Az dif.	6 (%23,1)	2 (%22,2)	

Tümörün malign veya borderline olmasına göre ortanca Kİ-67 düzeyleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktadır ( $p<0,01$ ). Malign olguların %74,3'ünde Ki-67 değeri medyan değerinden yüksekken, borderline olguların %50'sinde Ki-67 değeri medyan değerinden düşüktür (**Tablo IV**).

**Tablo IV:** Malign ve Borderline olgularda Kİ-67 değerlendirmesi

		Malign	Borderline	p
Kİ-67	Yüksek ( $>3,6$ )	26 (%74,3)	7 (%50,0)	
	Düşük ( $<3,6$ )	9 (%25,7)	7 (%50,0)	

\*\*  $p<0,01$  ileri düzeyde anlamlı

## TARTIŞMA

Epitelyal over tümörleri benign, borderline ve malign olarak sınıflandırılırlar. Borderline tümörler düşük malign potansiyele sahip tümörlerdir. Tüm epitelyal over tümörleri içinde en sık seröz, ikinci sıklıkla ise müsinöz tümörler görülür(11,12,13). Borderline ve malign epitelyal over tümörlerinde sağkalım açısından önemli olan prognostik parametreler arasında; yaş, stage, asit varlığı, tümörün borderline veya invaziv oluşu, tümör tipi ve grade'i, serum Ca 125 değerleri sayılmaktadır(14). P53 ve c-erbB-2'nin kuvvetli ekspresyonu da yine prognostik parametreler arasında yer almaktadır.(12,14). Biz çalışmamızda seröz ve müsinöz over tümörlerinde, epitelyal over tümörlerinde prognostik açıdan önemi gittikçe vurgulanan Ki-67 ekspresyonunu ve bunun bilinen prognostik parametrelerle ilişkisini araştırmaya çalıştık. Ki-67 yalnızca proliferatif hücre siklusunda tesbit edilen 345-395 kDa molekül ağırlıklı protein yapıdaki bir antijendir(1,2,3,4,5,6). Yapılan bir çok çalışmada epitelyal ve nonepitelyal tümörlerde, tümörün progresyonuyla ilişkili olduğu görülmüştür(1,2,3,4,5). Frudoi A ve arkadaşları kolorektal karsinomlarda Ki-67 ile yaptıkları bir çalışmada. Ki-67 indeksi ile histolojik grade, invazyon derinliği, lenfatik invazyon, lenf nodu metastazı ve Duke's Stage arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu bildirmişlerdir. (1) Darai E ve arkadaşları borderline over tümörlerinde Ki-67 ile yaptıkları bir çalışmada Ki-67 ekspresyonunu

klonopatolojik parametrelerle karşılaştırmışlardır. Benign, borderline ,malign tümörler arasında Ki-67 ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bildirmişlerdir. Ancak Ki-67 ile stage,yaş ve tümör tipi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamışlardır(4).Çalışmamızda Ki-67 ortalaması benign vakalarda %1,99±1,27, borderline vakalarda %8,98±13,3, malign vakalarda %13,60±1196, endosalpingiozis olgularında%1,80±1,13 olarak tesbit edilmiştir. Benign, borderline ve malign olgularda Ki-67 ekspresyonunda Ki-67 boyanma pozitifliği (%1 ve üzerinde boyanma) ve negatifliği (%1 altında boyanma) istatistiksel açıdan ileri derecede anlamlı farklılıklar göstermiştir( $p<0,01$ ) (Tablo I).Seröz ve müsinöz over karsinomlarında Ki-67 boyanma derecesi ile yaş, stage, tümör tipi, tümör grade'i ve Ca 125 ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunamamıştır ( $p>0,05$ ) (**Tablo IV**). Ancak malign ve borderline olgular Ki-67 ekspresyonu açısından karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılıklar bulunmuştur ( $p<0,05$ ) (**Tablo IV**). Sonuç olarak seröz ve müsinöz over tümörlerinde malign transformasyonun artmasıyla Ki-67 ekspresyonu artmaktadır. Seröz ve müsinöz over karsinomlarında Ki-67 ekspresyonu ile evre ve tümör grade'i arasında korelasyon saptanmamıştır. Malign+ borderline olgularda seröz tümör tipinde müsinöz tümör tipine göre Ki-67 ekspresyonunda anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Bu sonuçlar gözönüne alındığında Ki-67 ekspresyonu seröz ve müsinöz over tümörlerinde malign transformasyonla korele olmasına rağmen malign tümörlerde prognostik açıdan anlamlı bulunmamıştır.Tümör tipleri arasında da anlamlı bir ekspresyon farkı görülmemiştir. Ancak Ki-67 borderline ve malign tümörlerin ayırımında, ara olgularda boderline tümörlerde invaziv fokusu yakalamada yararlı bir marker olabilir. Bu tarz kullanımı için daha geniş serilerle ,yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

1- Furudoï A, Tanaka S, Haruma K, et al: Clinical significance of human erythrocyte glucose transporter 1 expression at the deepest invasive site of advanced colorectal carcinoma. *Oncology* 2001; 60:162-169.

- 2- Terlikowski S, Sulkowski S, Lenczewski A, et al: Study of borderline and invasive mucinous ovarian tumors using Ki-67(MIB 1) antibodies and nucleolar organizer region (NOR) staining. *Arch Gynecol Obstet* 1999; 263: 29-33.
- 3- Brustmann H: Apoptotic bodies as a morphological feature in serous ovarian carcinoma : Correlation with nuclear grade, Ki-67 and mitotic indices. *Pathol Res Pract* 2002; 198: 85-90.
- 4- Darai E, Walker-Combrouze F, Dauge-Geoffroy MC, et al: Ki-67 expression in 35 borderline ovarian tumours: Relations with clinicopathologic parameters and ploidy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998; 76: 175-180.
- 5- Heinsen CV, Meyberg R, Axt-Flidner R, et al: Immunohistochemical analysis of 1,25-Dihydroxy vitamin-D3-receptors, estrogen and progesterone receptors and Ki-67 in ovarian carcinoma . *Anticancer Research* 2002; 22: 2261-2268.
- 6- Scopa CD, Tsamandas AC, Zolota V, et al: Potential role of bcl-2 and Ki-67 expression and apoptosis in colorectal carcinoma a clinicopathologic study. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 1990-1997.
- 7- Folpe AL, Gown AM: Immunohistochemistry for Analysis of Soft Tissue Tumours, Chapter 8. In: *Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumours*, ed. Weiss SW, Goldblum JR, St Louis Mosby, 2001 4th ed.: 199-247.
- 8- Santos L, Amaro T, Costa C, et al: Ki-67 index enhances the prognostic accuracy of the orothelial superficial bladder carcinoma risk group classification. *Int J Cancer* 2003; 105: 267-272.
- 9- oskin PJ, Sibtain A, Daley FM, et al: Glut 1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in bladder cancer: relationship with vascularity and proliferation as predictors of outcome of ARCON. *Br J Cancer* 2003; 6:1290-1297.
- 10- Anttila M, Kosma VM, Ji H, et al: Clinical significance of alpha catenin collagen IV, and Ki-67 expression in epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2591-2600.
- 11- Crum CP: *The Female Genital Tract*, Chapter 24. In: *Robbins Pathologic Basis of Disease*, ed. Cotran RS, Kumar V, Collins T,W.B. Saunders Company, Tokyo, 2000 6th ed.: 1035-1093.
- 12- Clement PB: *Anatomy and Histology of the Ovary*, Chapter 15, *Diseases of the Peritoneum*, Chapter 17, Seidman JD, Russel P, Kurman RJ: *Surface Epithelial Tumours of the Ovary*, Chapter 18. In: *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*, ed. Kurman RJ, Springer, 2002 5th ed.:649-675, 729-791, 791-905.
- 13- Zaloudek C: *Tumors of the Ovary*, Chapter 13, Part C. In: *Diagnostic Histopathology of Tumours* , ed. Fletcher CDM, Churchill Livingstone, 2000 second ed.:567-642.
- 14- Rosai J: *Female Reproductive System*, Chapter 19. In: *Ackerman's Surgical Pathology*, ed. Rosai J, St Louis Mosby, 1996 8th ed.: 1319-1565