

Glial Tümörlerde Proliferasyon Markerlerinin Prognostik Önemi

The Prognostic Importance of Proliferation Markers in Glial Tumors

NAZAN BOZDOĞAN, ESRA ERDEN, PINAR ATASOY, KAAAN TUN, ALİ SAVAŞ

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji ABD (NB, EE,PA) ve
Nöroşirürji ABD (KT, AS)

Geliş Tarihi: 21.10.1999 ⇔ Kabul Tarihi: 12.4.2000

Özet: Bu çalışmada 1991-1996 yılları arasında bölümümüzde glial tümör tanısı alan 100 glial tümör incelenmiştir. Hastalar 3-78 yaş arasında olup, erkek/kadın oranı 2/1 dir. Tümörler 1993 WHO 'ya göre tip ve derecelendirilmiştir. Tümörlerin tamamına AgNOR ve 55'ine de immünohistokimyasal olarak Ki-67 boyası uygulanmıştır. Glial tümörlerin yaş ile doğru orantılı olarak derecesinin arttığı ve en sık derece 4 olarak karşımıza çıktığı gözlenmiştir. Derece yüksekliği ile yaşam süresi ve 2 yıllık yaşam oranı arasında ters ilişki olduğu saptanmıştır. Hasta yaşının ortalama yaşam süresi ve 2 yıllık yaşam oranı ile ters orantılı olduğu izlenmiştir. AgNOR değerleri ile Ki-67 "labelling indeks" (LI) inin de dereceye, yaşam süresine ve 2 yıllık yaşam oranına etkili bir parametre olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: AgNOR, derece, glial tümör, Ki-67

Abstract: A hundred glial tumors, diagnosed between 1991-1996, in our department were examined in this study. The patients' age between 3 to 78 years. Male to female ratio was 2/1. Histopathological typing and grading was made according to the WHO (1993) classification. All tumors stained with AgNOR and 55 of them were stained with Ki-67 by immunohistochemical technique, respectively. There was a linear relationship between the patients' age and grade of the tumors. Most common grade was 4 in our group. There was a reverse relationship between grade of the glioma and the survival time. There was a reverse relationship between patients' age, mean survival time, 2-years survival ratio. Also there was a statistically significant correlation between grade of the tumor, mean survival time, 2 year survival ratio and AgNOR value and Ki-67 labelling index (LI).

Key Words: AgNOR, grade, glial tumor, Ki-67

GİRİŞ

Glial tümörler primer beyin tümörleri içinde en sık görülen grubu oluşturur. Bunlar nöroektodermden gelişir ve nöroglial orijinlerine göre başlıca; astrositom, oligodendrogliom ve ependimom olarak ayrılır.

Glial tümörlerde prognostik faktörler çok çeşitlidir. Bunlar içinde özellikle tümörün

histopatolojik derecesi önemli bir yer tutmaktadır (4,10,14). Prognozu belirlemede son yıllarda üzerinde durulan konulardan birisi tümörün proliferasyon potansiyelinin belirlenmesidir. Bu amaçla PCNA, Ki-67 ve AgNOR gibi çeşitli markerler ile proliferasyon gösterilmeye çalışılmaktadır.

Ki-67, Ig G ailesinden, ilk kez 1983 yılında geliştirilmiş bir antikordur ve hücre siklusunda G₀

dışındaki tüm fazlarda eksprese edilmektedir. Bunun parafin dokularda kullanılanlabilen MIB-1 ve MIB-3 antikörleri bulunmaktadır. Hücre proliferasyon aktivitesini ölçmede, Ki-67 değeri, glial tümörleri de içeren pek çok tümörde çalışılmış ve anlamlı sonuçlar çıkmıştır (1,7,14).

NOR (Nucleolar Organizer Region)'lar hücre siklusunda gözlenen DNA halkaları olup, rRNA genlerini taşırlar. NOR'lar non-histon ve kısmen arjirofilik proteinlerle birlikte bulunurlar ve gümüş boyasıyla gösterilebilir. Bunlar "argyrophilic nucleolar organizer region proteins" (AgNOR's) olarak adlandırılır (11,13). Bu yöntem histopatolojide ilk kez 1987'de kullanılmıştır (7). Gümüşle boyanan NOR'ların sayısı ile tümörlerin biyolojik davranışı arasında ilişki olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (11,12,13).

Bu çalışmanın amacı değişik klinik ve histopatolojik parametreler ile üzerinde daha önce de çalışılmış ama kesin sonuçlar elde edilememiş hücre proliferasyonu belirleyicileri olan Ki-67 "Labelling İndeks" (LI) ve AgNOR değerlerinin prognozla ilişkisini saptamaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada bölümümüzde Ocak 1991- Aralık 1996 tarihleri arasında glial tümör tanısı alan ve klinik bilgilerine ulaşılabilen 100 tümör incelenmiştir. Hastalarda izlem süresi 6-131 aydır. Her olguda, hastaların yaşı yanında, tümörlere ait H&E boyalı preparatlar, 1993 WHO sınıflamasına göre yeniden tiplendirilmiş ve derecelendirilmiştir (8). Seçilen 100 olguya AgNOR, 55'ine Ki-67 boyanması uygulanmıştır.

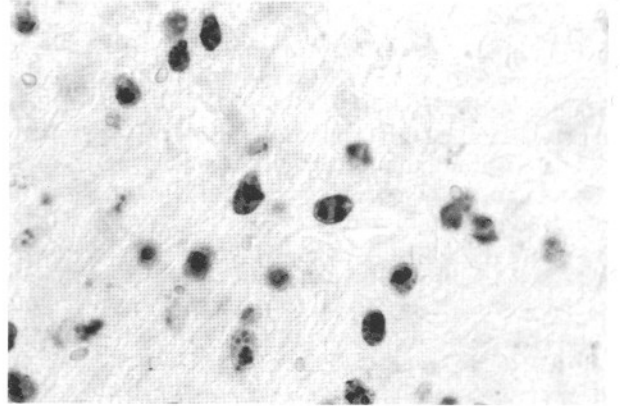
Ki-67 boyanması için parafin bloklardan 5µm'lik kesitler alınmış, deparafinizasyon ve rehidratasyondan sonra Antijen Retrieval Solusyonu içerisinde 700 watt'lık mikrodalga fırında iki kez 10'ar dakikalık sikluslar şeklinde ısıtılmıştır. Soğuduktan sonra % 3'lük H₂O₂ 'de 5 dakika işlem görüp kullanıma hazır MIB-1 antikoru (YLEM) ile bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra sekonder antikor ile streptavidin-biotin kompleksi 30'ar dakika uygulanmıştır (DAKO). AEC kromojen ile 25 dakika inkübe edilen kesitler Mayers hematoksilende 1 dakika bırakılmıştır.

Ki-67 ile boyanan kesitlerde tümörlerin tip ve derecesi bilinmeksizin en çok nükleer boyanmanın olduğu alanlar seçilerek 1000 tümör hücresi sayılmıştır.

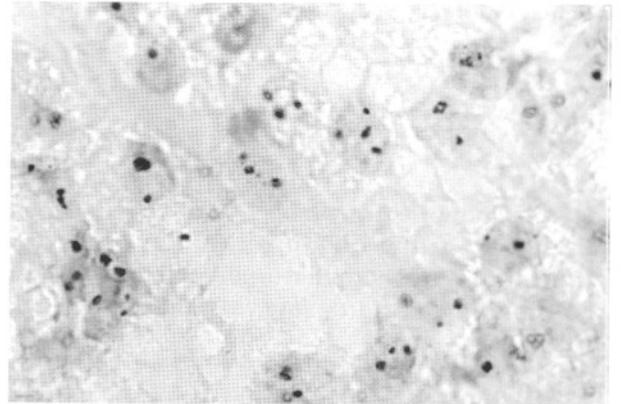
ve boyanan hücrelerin yüzdesi bulunmuştur. Boyanma gösteren her hücre boyanma şiddeti dikkate alınmadan (+) olarak değerlendirilmiştir. 1000 hücre içinde boyanma gösteren hücre sayısı oranlanarak Ki-67 "labelling indeks" (LI) bulunmuştur.

AgNOR yöntemi için parafin dokulardan 5mm'lik kesitler hazırlanmış, deparafinizasyon ve rehidratasyondan sonra 100 ml distile su içinde çözölen 1 gr formik aside 2 gr. jelatin katılarak çözönməsi sağlanmış ve AgNOR çözöltisi hazırlanmıştır. Başka bir kapta 500 ml distile su içerisinde 250 gr gümüş nitrat çözözümlenerek, %50'lik gümüş solusyonu hazırlanmıştır. Karanlık ortamda AgNOR çözöltisinden 1, gümüş nitrat çözöltisinden 2 ölçü karıştırılarak kullanıma hazır hale getirilmiştir. Bu solusyon içerisinde kesitler 35 dakika bekletildikten sonra deiyonize su ile yıkanmış, ksilol ile rehidrate edilmiştir.

AgNOR sayımı için 1000 büyütmede 100 tümör hücresi sayılmıştır. Tümör hücrelerinde nükleus içerisinde boyanan tüm siyah- kahverengi



Şekil 1: Bir astrositik tümörde Ki-67 boyanması. X400



Şekil 2: Bir astrositik tümörde AgNOR boyanması. X400

noktacıklar sayıma dahil edilmiştir. Nükleol içerisindeki seçilebilen noktacıklar da sayılmıştır. Her tümör hücresi içinde sayılan tüm noktalar toplanmış ve hücre başına düşen ortalama AgNOR sayısı hesaplanmıştır (3).

İstatistiksel olarak Mann Whitney-U ve Spearman korelasyon testi ile parametrelerin birbirleriyle ilişkisi değerlendirilmiştir. Kaplan-Meier yaşam analizi ve log-rank testi ile yaşam durumları incelenmiştir.

SONUÇLAR

İncelenen 100 glial tümörün 77'sinin astrositom (71 astrositom, 5 gemistositik astrositom, 1 pleomorfik ksantoastrositom) olduğu saptanmış, bunların 5 tanesinin derece 1, 24'ünün derece 2, 15'inin derece 3, 33 tanesinin ise derece 4 olduğu gözlenmiştir. Olgular ayrıca 11 oligodendrogliom, 8 ependimom ve 4 mikst oligoastrositom da içermekte olup oligodendrogliomların 10 tanesinin derece 2, 1 tanesinin ise derece 3 olduğu, ependimomların tamamının ise derece 2 özelliğinde bulunduğu dikkati çekmiştir. Tümör tipleri homojen dağılım göstermediğinden, ve oligodendrogliomların 10 tanesi, ependimomların tamamı derece 2 özelliğinde olduğundan bunlar arasında prognoz tayini yapılamamıştır.

Tümör büyüklüğü ve Karnofsky Performans skalası (KPS) konusunda her hastada çelişkili ve sağlıklı olmayan veriler bulunduğundan bu parametreler değerlendirme dışı tutulmuştur.

Gros total rezeksiyon yapılan olgular ile subtotal rezeksiyon yapılanlar arasında prognoz açısından anlamlı farklılık gözlenmemiştir.

Tümör nüksü ve hasta cinsiyetinin prognoza etkili olmadığı saptanmıştır.

Yaşı 3-78 arasında olan ve glial tümörü bulunan hastalar izlenmiştir. Bu olguların % 45'inin 21-40 yaşlar arasında olduğu gözlenmiştir.

Hastalarda yaş arttıkça sağkalım süresinin düştüğü izlenmiştir. Bu sonuçlar Kaplan-Meier yaşam analizi, log rank testine göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P=0.0003). Bu sonuçlar Tablo I'de gösterilmiştir.

Serimizde derece 1 tümörlü hastaların tümü yaşamakta olup tümör derecesi arttıkça sağkalım süresi ve 2 yıllık sağkalım oranı belirgin olarak

Tablo I: Glial tümörlerde yaş gruplarına göre yaşam durumları

YAŞAM DURUMU	0-40 Yaş	41-60 Yaş	61-80 Yaş
ORT. YAŞAM	39.1 AY	12 AY	4.8 AY
2 YIL YAŞAM ORANI	% 63.7	%14.9	%0.0

azalmaktadır (Kaplan-Meier yaşam analizi, log rank testi, P=0.0002). Bu sonuçlar Tablo II'de gösterilmiştir. Ayrıca yapılan multivariate analizinde derecenin prognoza etkili bağımsız bir parametre olduğu saptanmıştır.

Glial tümörlerde Tablo III'de gösterildiği gibi derece arttıkça Ki-67 LI ve AgNOR sayısının arttığı izlenmiştir. Bu değerler Mann-Whitney U, Wilcoxon Rank Sum W test'ine göre anlamlı kabul edilmiştir (P=0.004 ve P=0.0001).

Astrositik tümörlerde Ki-67 LI ve AgNOR değerleri arttıkça ortalama yaşam süresi azalmakta ve 2 yıllık yaşam oranı düşmektedir (Tablo IV). Bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Kaplan-Meier yaşam analizi, log rank testi P=0.0005, P=0.002).

Tablo II: Glial tümörlerde dereceye göre ortalama yaşam ve 2 yıllık yaşam oranları

DERECE ↓	ORTALAMA YAŞAM	2 YIL YAŞAM %
DERECE 1	-	100
DERECE 2	97.7 AY	84
DERECE 3	49.2 AY	65
DERECE 4	10.9 AY	13

Tablo III: Glial tümörlerde Derece ile Ki-67 ve AgNOR ilişkisi

DERECE ↓	KI-67 (%)	AGNOR
DERECE 1	17.00± 3.46	4.10±0.84
DERECE 2	16.56± 15.12	4.38±1.62
DERECE 3	22.85±21.91	5.06±1.60
DERECE 4	35.93±18.65	5.90±1.60

Tablo IV: Astrositomalarda Ki-67 ve AgNOR değerleri ile yaşam ilişkisi

YAŞAM DURUMU	Ki-67 LI			AGNOR		
	%0-10	%10.1-20	%20↑	0-4.5	4.6-6	6↑
ORT.YAŞAM	44.2 AY	33.3AY	16.8 AY	46 AY	23 AY	21 AY
2 YIL YAŞAM	% 88	% 88	% 25	% 72	% 33	% 30

Tablo V' de gösterildiği gibi glial tümörlerde yaş ile Ki-67 ve AgNOR ilişkisine bakılmış, yaş arttıkça Ki-67 indeksinin artış gösterdiği saptanmıştır. Bu artış istatistiksel olarak "p" değeri açısından düşük derecede anlamlılık göstermesine rağmen korelasyon değeri 0.3 den düşük olduğu için aralarındaki ilişkinin çok zayıf olduğu ve değer taşımadığı düşünülmüştür (P=0.034, korelasyon değeri= 0.28). AgNOR değerleri ile yaş arasında ise ilişki saptanamamıştır (P=0.087) (Spearman korelasyon testi).

Tablo V: Yaş artışı ile Ki-67 ve AgNOR değerleri arasındaki ilişki

YAŞ	Ki-67	AGNOR
0-20 YAŞ	19.35±14.2	4.12±0.9
21-40 YAŞ	20.84±17.1	5.16±1.9
41-60 YAŞ	30.01±20.9	5.12±1.6
61-80 YAŞ	46.00±18.7	5.39±1.7

Oligodendrogliomlar ve ependimomlarda hem hasta sayısı daha az, hem de ölen hasta sayısı çok az olduğundan sağlıklı bir yaşam analizi yapılamamıştır.

TARTIŞMA

Intrakranial tümörlerin büyük kısmını oluşturan glial tümörlerde prognostik faktörler çok değişkendir. Lokalizasyon, yaş gibi klinik faktörlerin yanında tümörün tipi, büyüklüğü, histopatolojik derecesi prognosta önem taşımaktadır. Serimizde de klasik bilgilerle uyumlu olacak şekilde hasta yaşı arttıkça ortalama yaşam süresi ve 2 yıllık yaşamın azaldığı saptanmıştır. Bununla birlikte prognozu belirlemede daha objektif kriterlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada Ki-67 LI ve AgNOR sayısı gibi proliferasyonu değerlendirmede göreceli olarak daha objektif yöntemler kullanılarak bunların prognostik önemi araştırılmıştır. Gerek farklı histopatolojik tipteki tümörler arasında gerekse tüm glial tümörler birlikte ele alındığında, histopatolojik

derecenin, sağkalım süresinin en önemli belirleyicisi olduğunu gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır. Hatta bazı araştırmacılar derecenin yaşam süresi ve sağkalıma etkili en önemli parametre olduğunu göstermişlerdir (2,4,10,14). Bizim çalışmamızda da bunlarla uyumlu olacak şekilde derecenin yaşam süresine etkili bir parametre olduğu gösterilmiştir. Derece 2-3-4 tümörlerin yaşam süresi ve 2 yıllık yaşam oranlarının derece artışı ile belirgin korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Derece 1 tümörlerinin izlem süresi boyunca tamamının yaşadığı dikkati çekmektedir. Ayrıca yapılan multivariate analizinde serimizde derecenin diğer tüm parametrelerden bağımsız olarak sağkalıma etkili en önemli faktör olduğu gözlenmiştir.

Değişik santral sinir sistemi tümörlerinde Ki-67 LI'nin ölçüldüğü çalışmalarda derece 3 ve derece 4 astrositomaların yüksek LI gösterdiği gözlenmiştir (5,7). Serimizde de derece 4 astrositomaların en yüksek ortalama Ki-67 LI gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca yine serimizdeki glial tümörlerde derece artışı ile paralel olarak Ki-67 LI'nin ve AgNOR değerlerinin arttığı dikkati çekmiştir.

Ki-67 LI'nin tek başına veya diğer prognostik parametrelerle birlikte prognoza etkisi çeşitli çalışmalarla araştırılmıştır (1,5,7,14). Bununla birlikte geniş olgu sayısı içeren seriler çok fazla değildir. Bizim çalışmamızda da Ki-67 ekspresyonu artışı ile 2 yıllık yaşam ve ortalama yaşam sürelerinin azaldığı saptanmış olup ayrıca oldukça geniş bir seri olması bakımından da önemlidir.

SSS tümörlerinde yapılan çok sayıda çalışmada AgNOR değerlerinin direkt prognoza ve prognozu etkileyen diğer parametrelerle ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Bu parametrelerden özellikle derece ile AgNOR ilişkisi önem kazanmaktadır (6,11,12). Çalışmamızda da derece'den bağımsız olarak AgNOR değerindeki artış ile ortalama yaşam süresi ve 2 yıllık yaşam oranlarının azaldığı saptanmıştır. Ayrıca serimizde glial tümörlerde derece arttıkça AgNOR değerinin artmış olduğu gözlenmiştir. Özellikle derece 2-3 ile derece 3-4 astrositomalar arasında AgNOR değerleri açısından

istatistiksel olarak anlamlı fark tesbit edilmiştir. Bu sonuçlarımız doğrultusunda derecesine karar verilemeyen ya da arada kalnan tümörlerde prognoz ve dereceyi tayin etmek açısından AgNOR uygulamasının anlamlı olacağı düşünülebilir.

SSS tümörlerinde yapılan çeşitli çalışmalarda proliferasyon markerlerinin birbirleriyle ilişkilerine bakılmış ve bunlar arasında bir korelasyon bulunduğu dikkat çekilmiştir (9,11,12). Literatürle uyumlu olacak şekilde serimizde Ki-67 ve AgNOR değerlerinin derece ile paralel artış gösterdiği izlenmiştir. Bu nedenle daha kolay bir yöntem olan ve immünohistokimyanın uygulanmadığı yerlerde tek başına AgNOR'un kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak bu çalışmada daha önce yapılan pek çok çalışmada gösterildiği gibi glial tümörlerde prognozu etkileyen en önemli parametrenin tümör derecesi olduğu saptanmıştır. Ayrıca bir kısım literatürde ilişkisi olduğu gösterilen ancak henüz kesin sonuçlara ulaşamayan proliferasyon belirleyicilerinin de (Ki-67 ve AgNOR) prognoza etkisi olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışma TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Grubunun Alt Yapı Destekleme Fonundan sağlanan finans ile gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışma 1998 yılında yapılan "2. Balkan Oncology" kongresinde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Yazışma Adresi: Nazan Bozdoğan
06600 Aydoğmuş Sk. 8/1
Kurtuluş-Ankara
E-MAİL: uplpa@superonline.com

KAYNAKLAR

1. Brown DC, Gatter KC: Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 17: 489-503, 1990
2. Brunner JM: Neuropathology of malignant gliomas. *Semin Oncol* 21: 126-138, 1994
3. Crocker J, Nar P: Nucleolar organizer region in lymphomas. *J Pathol* 151: 111-118, 1987
4. Forsyth PA, Shaw EG, Scheithauer BW, O'Fallon JR, Layton DD, Katzmann JA: Supratentorial pilocytic astrocytomas. *Cancer* 72: 1335- 1342, 1973
5. Giangaspero F, Doglioni C, Rivano MT, Pileri S, Gerdes J, Stein H: Growth fraction in human brain tumors defined by the monoclonal antibody Ki-67. *Acta Neuropathol* 74: 179-182, 1987
6. Kajiwara K, Nishizaki T, Orita T, Nakayama H, Aoki H, Ito H: Silver colloid staining technique for analysis of glioma malignancy. *J Neurosurg* 73: 113-117, 1990
7. Karamitopoulou E, Perentes E, Diamantis I, Maraziotis T: Ki-67 immunoreactivity in human central nervous system tumors: a study with MIB-1 monoclonal antibody on archival material. *Acta Neuropathol* 87: 47-54, 1994
8. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW: The new WHO classification of brain tumors. *Brain Pathol* 3: 255-268, 1993
9. Korkolopoulou P, Christodoulou P, Papanikolaou A, Thomas-Tsagli E: Proliferating cell nuclear antigen and nucleolar organizer region in CNS tumors. Correlation with histological type and tumor grade. *Am J Surg Pathol* 17: 912-919, 1993
10. Macdonald DR: Low grade gliomas, mixed gliomas and oligodendrogliomas. *Semin Oncol* 21: 236-248, 1994
11. Maier H, Morimura T, Öffner D, Hallbrucker C, Kitz K, Budka H: Argyrophilic nucleolar organizer region proteins (AgNORs) in human brain tumors: relation with grade of malignancy and proliferation indices. *Acta Neuropathol* 80: 156-162, 1990
12. Nicoll JAR, Candy E: Nucleolar organizer region and post-operative survival in glioblastoma multiforme. *Neuropathol Appl Neurobiol* 17: 17-20, 1991
13. Plate KH, Rüschoff J, Mennel HD: Cell proliferation in intracranial tumors: selective silver staining of nucleolar organizer regions (AgNORs). Application to surgical and experimental neurooncology. *Neuropathol Appl Neurobiol* 17: 121-132, 1991
14. Wakimoto H, Aoyagi M, Nakayama T, Nagashima G, Yamamoto S, Tamaki M, Hirakawa K: Prognostic significance of Ki-67 labelling indices obtained using MIB-1 monoclonal antibody in patients with supratentorial astrocytomas. *Cancer* 77: 373-380, 1996