

## MİDE KARSİNOMLARINDA HÜCRE PROLİFERASYON BELİRLEYİCİSİ OLARAK PCNA, Ki-67 VE AgNOR KULLANIMI

Mustafa Cihat Avunduk\* • Şakir Tavlı\*\* • Serdar Yol\*\* • Lema Tavlı\* • Ayşe Yavuz\*  
Salim Gungör\* • Osman Yılmaz\*

### ÖZET

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda mide adenokarsinomu tanısı alan 30 olgu tespit edildi. Bu olguların tümörlü ve normal mukoza alanlarını aynı preparat üzerinde içeren blokları seçildi. Bu bloklardan hazırlanan kesitlere immünohistokimyasal olarak PCNA ve Ki-67 boyaması ile NOR cisimlerini boyamak için gümüş impregnasyonu uygulandı. Mitoz sayısı ve mitotik indeksi belirlemek için ise Hematoksilen Eozin ile boyalı tanı koydurucu preparatları kullanıldı. Tüm değerlendirmeler mümkün olduğunca aynı alanlar taranarak yapıldı. Olguların elde edilen sonuçları birbirleri ile karşılaştırıldığında mide adenokarsinomlarında, hücresel proliferasyon belirleyicisi olan AgNOR, PCNA ve Ki-67 nin birbirleri ile istatistiksel olarak uyumluluk içerisinde oldukları belirlendi.

**Anahtar kelimeler:** PCNA, Ki-67, AgNOR, Hücresel proliferasyon belirleyicileri, adenokarsinoma, mide

### SUMMARY

**Using of PCNA, Ki-67 and AgNOR as a markers of cell proliferation in adenocarcinomas of stomach.**

We studied 30 consecutive cases with the diagnosis of adenocarcinomas of stomach in histopathologically. The paraffin blocks were investigated if they contained both the normal mucosa and tumour areas in the same preparation. We used PCNA and Ki-67 stains as immunohistochemical staining methods and silver impregnation technique was utilized for staining of NOR bodies. The number of mitosis and mitotic index were established in the Hematoksilen Eosin stained preparations. Searching thoroughly the same areas of different slides performed all evaluations. When the results were compared with each other, we showed that AgNOR, PCNA and Ki-67 staining methods, which were markers of cellular proliferation in stomach carcinoma, were statistically correlated to each other.

**Key words:** PCNA, Ki-67, AgNOR, Cellular proliferation markers, adenocarcinoma, stomach.

Patolojide immünohistokimyanın rutin kullanımı sonucunda, tanısal özelliklerin bildirilmesi yanı sıra, tümörün prognostik özellikleri hakkında da söz söyleyebilmek bir ihtiyaç haline gelmiştir. Prognostik özelliklerin belirlenebilmesi ile hastaya yaklaşımı etkileyecek bilgiler elde edilerek, tedavinin planlanmasında daha geniş bir perspektife sahip olmak amaçlanmaktadır. Bu nedenle de hücresel proliferasyon belirleyicilerinin kullanımı gündeme gelmiştir.

Son zamanlarda kliniko-patolojik özelliklerle tümör proliferasyonu arasındaki ilişkiyi belirlemek için immünohistokimyasal olarak proliferasyon belirleyicisi hücre nükleus antijeni (PCNA) ve Ki-67 kullanımı (1) ile başka bir hücresel proliferasyon belirleyicisi olan gümüş impregnasyonu ile nucleolar organizasyon bölgesi sayımı (AgNOR yöntemi) (2) kullanılır hale gelmiştir.

Biz bu çalışmamızda immünohistokimyasal hücresel proliferasyon belirleyicileri Ki-67 ve PCNA ile birlikte başka bir proliferasyon belirleyicisi olan AgNOR yöntemini mide adenokarsinomları üzerinde uygulayıp karşılaştırmak istedik.

### GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda opere edilen, aynı Üniversitenin Patoloji Anabilim Dalı'nda mide adenokarsinomu tanısı almış 30 olgu incelendi. Çalışmaya; Hematoksilen Eozin (HE) ile boyanmış, önceden tanısı konmuş preparatlar gözden geçirilerek başlandı. Aynı preparatlar içerisinde tümör dokusu ile birlikte normal mukoza alanlarının da yer aldığı bloklar belirlendi. Belirlenen bloklardan hazırlanan kesitlere immünohistokimyasal olarak PCNA, Ki-67 boyaması ile NOR ci-

\* Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

\*\* Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı

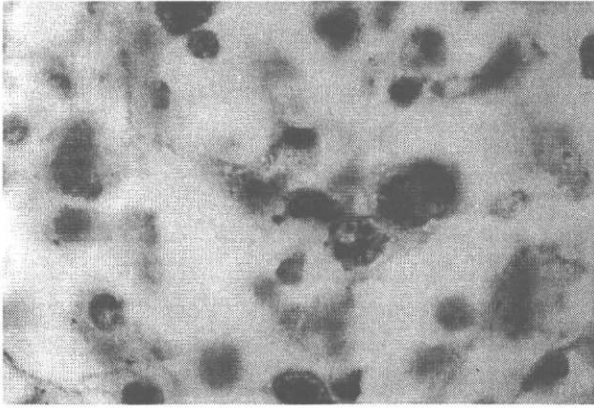
simcikleri için gümüş impregnasyonu (AgNOR) uygulandı.

İmmünohistokimyasal boyamada Streptavidin-Biotin Peroksidaz yöntemi uygulandı. PCNA boyaması için Clone PC10, Dako belirleyicisi; Ki-67 için de Dako tercih edildi. PCNA için pozitif kontrol olarak yoğun lenfoid doku içeren tonsil preparatları, Ki-67 için bazal tabakasında nükleer pozitiflik gösteren epitel dokusu kullanıldı. Negatif kontrol olarak her iki immün boyama için aynı preparatlar primer negatif kontrol ajanı damlatılarak hazırlandı. Preparatların hazırlanmasında DAB kromojen kullanıldı.

Hematoksilen Eozin ve diğer yöntemlerle boyanan preparatlar değerlendirilirken preparat üzerindeki aynı alanlar seçilerek, mümkün olduğunca ideale yakın değerlendirme yapılması amaçlandı.

Mitoz sayısı ve mitotik indeks HE ile boyalı kesitlerde saptandı. Mitoz sayısını belirlerken her olgu için 10 adet büyük büyütme alanındaki mitoz sayısı ortalamaları esas alınırken, mitotik indeks bin tümör hücresi içerisindeki mitoz sayısı olarak belirlendi. Ortalama mitoz sayısı ve ortalama mitotik indeks, tüm olguların mitoz sayısı ve mitotik indekslerin toplamının çalşılan olgu sayısı olan 30 a bölünmesi ile elde edildi.

Olgularımızın AgNOR profillerini belirlerken 100 tümör hücresi içerisindeki NOR benekleri sayılarak, nükleus başına düşen ortalama NOR değerleri AgNOR indeksi olarak verildi. NOR beneklerini sayma işlemi 1000 büyütme ve immersiyon yağı kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 1). Ayrıca normal ve tümöral alanlardaki hücrelerin AgNOR indeksleri toplanıp olgu sayısı olan 30 a bölünerek; normal ve tümöral alanların ortalama AgNOR indeksleri elde edildi.



Şekil 1. Mide adenokarsinomu olgusunda gümüş affinite gösteren NOR cisimcikleri intranükleer olarak immersiyon altında görülmekte (AgNOR; x 1000)

PCNA ve Ki-67 indeksi ise 1000 tümöral hücre içerisindeki pozitif nükleer boyanma gösteren hücrelerin sayısının 1000 e bölümü ile elde edildi. İmmünohistokimyasal incelemede ayrıca grade'leme sistemi de uygulandı. Tümöral hücrelerin %0-25 i pozitif boyanmışsa Grade I, %26-50 si pozitif boyanmışsa Grade II, %51-75 i pozitif boyanmışsa Grade III ve %76-100 ü pozitif boyanmışsa Grade IV olarak kabul edildi. Tüm olguların PCNA ve Ki-67 indeksleri ayrı ayrı toplanıp olgu sayısı olan 30 a bölünerek ortalama PCNA ve Ki-67 indeksleri belirlendi.

Elde edilen sonuçlar Spearman sıra korelasyonu ve Pearson korelasyonu ile istatistiksel olarak karşılaştırıldı. AgNOR indeksi, Ki-67 indeksi ve PCNA indeksi aralarında karşılaştırılırken Pearson korelasyonu kullanıldı. Mitoz sayısı, mitotik indeks, PCNA grade'i ve Ki-67 grade'i Spearman sıra korelasyonu ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

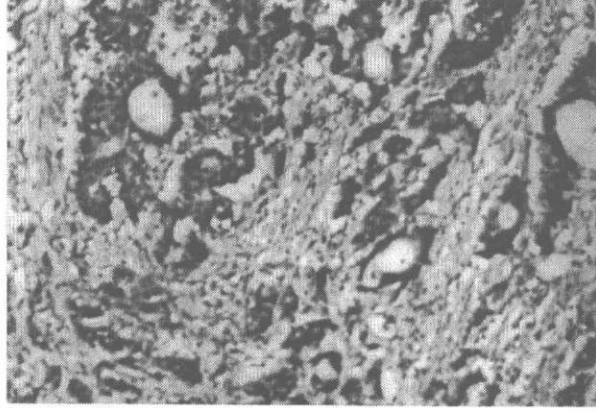
#### BULGULAR

Tüm olgularda bir büyük büyütme alanındaki ortalama mitoz sayısı 5.66, ortalama mitotik indeks ise 12.66 olarak saptandı. Tümör bulundurmeyen normal alanlarda mitoz sayısı yok denecek kadar azdı. Olguların mitoz sayıları ile mitotik indeksleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin varlığı belirlendi ( $r_s=0.75$ ,  $p<0.1$ ).

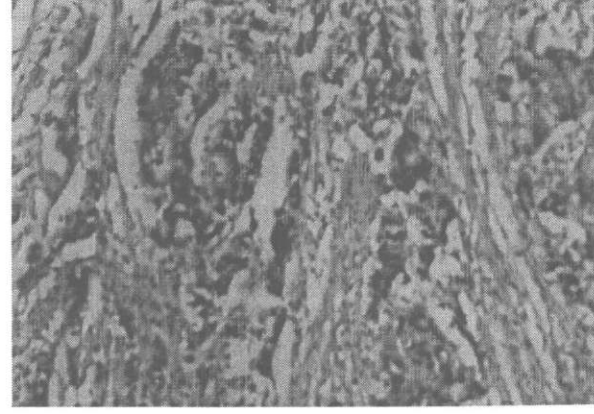
Ortalama AgNOR indeksi tümöral alanlarda 7.26 olarak saptanırken, bu değer tümör bulundurmeyen alanlarda 2.60 olarak tespit edildi.

Tüm olgularda tümöral alanların immünohistokimyasal olarak PCNA ve Ki-67 ile pozitif boyandığı görüldü (Şekil 2, 3). Tümöral alanlarda ortalama PCNA indeksi 0.687, ortalama Ki-67 indeksi ise 0.358 olarak saptandı. Tümöre komşu sağlam mukoza alanlarında immünohistokimyasal boyama sonucu sadece 3 olguda PCNA ve Ki-67 pozitifliği saptanırken diğer olgularda herhangi bir pozitif boyanma görülmedi. Bu 3 olguda ise normal mukoza hücrelerinin %5-15 oranında pozitif boyandığı belirlendi.

Olguların PCNA indeksi ve Ki-67 indeksi karşılaştırıldığında oldukça yüksek oranda bir uyumluluğun varlığı ( $r=0.94$ ,  $p<0.01$ ) görüldü. Ki-67 indeksi ile AgNOR indeksi uyumluluğunun ( $r=0.85$ ,  $p<0.05$ ) PCNA indeksi ile AgNOR indeksi uyumluluğundan ( $r=0.76$ ,  $p<0.1$ ) daha kuvvetli olduğu belirlendi. 30 olgunun mitoz sayıları, mitotik indeksleri, AgNOR indeksleri, Ki-67 indeksleri, Ki-67 grade'leri, PCNA indeksleri ve PCNA grade'leri arasındaki istatistiksel ilişkiyi Tablo 1 de topluca görmekteyiz.



Şekil 2. İmmünohistokimyasal olarak PCNA ile pozitif ekspresyon gösteren tümöral hücreler görülmekte (PCNA; x40)



Şekil 3. Ki-67 ile pozitif nükleer boyanma gösteren tümöral hücreler görülmekte (Ki-67; x40)

Tablo 1. İndeksler ve gradeler arası istatistiksel ilişki

Mitotik İndeks	rs=0.75					
AgNOR İndeksi	rs=0.17	rs=0.35				
Ki-67 İndeksi	rs=-0.06	rs=0.26	r=0.85 (^)			
Ki-67 Grade'i	rs=0.00	rs=0.06	rs=0.77 (-)	rs=0.86 (+)		
PCNA İndeksi	rs=-0.05	rs=0.26	r=0.76 (-)	r=0.94 (*)	rs=0.68 (+)	
PCNA Grade'i	rs=0.17	rs=0.49	rs=0.93(*)	rs=0.93(*)	rs=0.78(-)	rs=0.93 (*)
	Mitoz sayısı	Mitotik indeks	AgNOR indeksi	Ki-67 indeksi	Ki-67 grade'i	PCNA indeksi

P<0.01 (\*)

0.01<p<0.05 (^)

0.05<p<0.1 (-)

0.1<p<0.5 (+)

#### TARTIŞMA

Tümör dokusunda hücrel proliferasyon düzeyini belirlemek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin en kolayı mitoz sayısı ve mitotik indeksi belirlemektir. Ancak mitoz sayısının proliferatif aktiviteyi saptamada kullanılması hala tartışmalıdır (3). Kesit kalınlığına doğrudan bağlı olması, tespitin uzun zaman alması, değişik alanlardaki sayısal farklılıklar, ki-

şisel özellikler tartışmanın başlıca etkenleri olmaktadır. Ayrıca değişik mikroskopla farklı sayılara ulaşılması da sık karşılaşılan bir sonuçtur. Bu nedenlerle mitotik indeksin daha sağlıklı olacağı düşünülmektedir. 30 olgumuzun mitotik indeksi ve mitoz sayılarını karşılaştırdığımızda anlamlı bir ilişkinin varlığını saptadık (rs=0.75, p<0.1). Mitotik indeks ve mitoz sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişkinin bulunmasında aynı alanların aynı kalınlıkta kesilmesinin ve aynı patoloj tarafından değerlendirilmesinin etkili olduğunu düşündük.

Nücleolar organizasyon bölgesi (NOR) belirlenmesi bir başka hücre proliferasyon göstergesidir. NOR ci-

simcikleri bünyesinde ribozomal genleri ve bazı asidofilik proteinleri bulunduran, gümüşe karşı afinitesi olan bir yapıya sahiptir (2). R-RNA'yı kodlayan DNA parçalarıdır. Gümüş impregnasyon metodu ile gösterilebilir ve AgNOR olarak adlandırılır. AgNOR sayımının gerçekte neyi ölçtüğü tam olarak bilinmemektedir. Ancak AgNOR sayımının rRNA protein sentezinin bir göstergesi olması nedeniyle proliferasyon hızı ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir. Benign ve malign ayırımında anlamlı olmakla birlikte, sınır lezyonlarda faydalı olamamaktadır. Bizim çalışmamızda tümöral ve tümör bulundurmayan alanlardaki ortalama AgNOR indeksleri arasında önemli bir farkın varlığını saptadık. Normal alanlardaki AgNOR indeksinin displazik alanlarda ortalama AgNOR indeksinden biraz daha yüksek oluşu dikkatimizi çekti. Ancak tümöral alanlarda elde edilen değerlerle farklılığı kadar çarpıcı değildi. Bu bulgudan; literatürde söz edildiği gibi; AgNOR indeksi ile benign ve displazik alanların ayırımının yapılmasının oldukça güç olduğunu görmekteyiz (4).

30 olguluk çalışma grubumuzda AgNOR indeksi ile mitotik indeks ve mitoz sayısı karşılaştırıldığında, mitotik indeksle AgNOR indeksi arasında ( $r_s=0.35$ ), mitoz sayısına ( $r_s=0.17$ ) nazaran daha kuvvetli bir ilişki olmasına karşın, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki göremedik.

Hücre proliferasyonu aynı zamanda immünohistokimyasal tetkiklerle de gösterilebilir. Bu yöntemlerle hücre büyümesi ve bölünmesi ile ilişkili nükleer antijenler boyanarak mikroskop altında değerlendirilir (5). Son zamanlarda sıkça kullanılmaya başlanan hücre siklusu proteinlerinden PCNA ve Ki-67 benign ve malign dokulardaki hücre kinetiğini kantitatif olarak göstermekte oldukça yardımcı olmaktadır. Yani hücre üreme aktivitelerinden hücre siklus hızını, proliferatif hücre miktarı artışını, S fazında kalan hücre miktarını göstermektedir. Böylelikle konvansiyonel, durağan histopatolojik görünüm yerine hastaya yaklaşımları kolaylaştıran ve tedaviyi planlarken göz önünde tutulacak fonksiyonel görünümü belirleyen bir yöntem olarak kullanılmaktadır (6). Ayrıca tedavi esnasında tümörün cevap verip vermediğini kontrol etme imkanı da sunmaktadır (7).

Ki-67 G-0 ve G-1 fazları haricinde hücre siklusu tüm fazlarında salınan, nükleer antijene karşı geliştirilmiş fare monoklonal antikordur. PCNA ise 36kD ağırlığında hücre siklusu ile ilgili nükleer bir proteindir. Hücre siklusunun geç G-1 ve S fazında hücre nükleusunda bulunur (1). Tümör hücrelerinde PCNA ile boyanmanın Ki-67 ye göre daha fazla oranda olduğu

bildirilmektedir (1, 8). Bizim çalışmamızda da literatür ile uyumlu olarak aynı alandaki tümöral hücrelerin ortalama PCNA indeksini (0.687), ortalama Ki-67 indeksinden (0.358) daha yüksek bulduk. Bu farklı boyanma oranları muhtemelen PCNA ve Ki-67 nin siklusun değişik safhalarındaki nükleusları boyama özelliklerinden ileri gelmektedir. Bunu destekleyen bir bulgu da Ki-67 nin spermatogoniaları, PCNA'nın ise primer spermatositlerin nükleuslarını boyadıklarının gösterilmiş olmasıdır (9). Ortalama indekslerin farklı olmasına karşın 30 vakadaki PCNA ve Ki-67 indeksleri karşılaştırıldığında oldukça yüksek bir oranda istatistiksel uyumun ( $r=0.98$ ,  $p<0.01$ ) varlığını belirledik. Demek ki mide adenokarsinomlarında hücre proliferasyon belirleyicisi olarak PCNA ve Ki-67 aynı derecede uyumluluk göstermektedir.

Ortalama PCNA ve ortalama Ki-67 indeksinden daha yüksek PCNA ve Ki-67 indeksi gösteren 12 olgumuzda midede izlenen tümörün tüm duvar boyunca mideyi tuttuğu ve çevre yağ dokusuna infiltrasyon gösterdiği, ayrıca bu 12 olgunun 9 unda ayıklanan lenf nodlarının yarısından fazlasında tümöral infiltrasyonun mevcut olduğu tespit edildi. Bu olgulardaki AgNOR indeksleri de ortalama AgNOR indeksinden fazla idi. Böylelikle hücre proliferasyonunun yüksek olduğu vakalarda histolojik grade'lerin de yüksek olduğunu literatürle uyumlu olarak gözlemiş olduk (10).

Malignitede artan hücre proliferasyon aktivitesinin, aynı zamanda malign olgularda gözlenen ölçülerde olmasa bile displazi durumlarında ve kuvvetli enfeksiyon hallerinde de arttığı bildirilmektedir (8, 11, 12). Bizim 3 olgumuzda tümöral alan haricinde %5-15 oranında PCNA ve Ki-67 ile tespit ettiğimiz pozitif boyanma alanlarının orta ve ağır derecede displazi bulduklarını gözledik. Ancak malign ve benign tümörler arasında ayırimda kullanılabilecek PCNA ve Ki-67 boyamalarının benign ve borderline lezyonlar arasında anlamlı farklılıklar içermediğinden söz edilmektedir (13). Çalışmamızda normal mide mukoza hücrelerinde hiç boyanma tespit etmemize karşın, displazik alanlarda izlediğimiz %5-15 oranında pozitif boyanmayı dar çalışma grubumuz içerisinde dikkat çekici bulduk.

İmmünohistokimyasal boyamaların değerlendirilmesinde Grade'leme işlemi daha çabuk ve kolay sonuç vermektedir. Büyük büyütme alanlarında izlenen boyanan hücrelerin sayısına göre olgular I ile IV arasında değişen 4 grade'e ayrılıyor. Yani boyanan hücrelerin hangi %25 lik gruba girdiği tespit edilerek grade'leme yapıyor. 1 ile 25 arasında değişen, geniş bir marjındaki hücresel boyamalar aynı grade içerisinde değer-

lendirildiğinden indekse göre daha anlamlı istatistiksel ilişkiler vermektedir. (Tablo 1). Ancak bu durum yanıltıcı olduğu düşünülmektedir. Çünkü indeks belirlerken daha hassas davranılmaktadır. 25 lik hücre grupları değil her boyanan hücre indeksi değerini etkilemektedir.

Sonuç olarak; mide karsinomlarında AgNOR, PCNA indeksi, PCNA grade'i, Ki-67 indeksi, Ki-67

grade'i hücre proliferasyon belirleyicileri olarak birbirleri ile istatistiksel olarak anlamlılık taşımaktadır. Ancak mitotik indeks ve mitoz sayısı kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulundurmamasına rağmen, yukarıda söz edilen hücre proliferasyon belirleyicileri ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulundurmamaktadır.

#### KAYNAKLAR

1. Rosa C, Mendes R, Filipe MI, Morris RW: Measurement of cell proliferation in gastric carcinoma: comparative analysis of Ki-67 and proliferative cell nuclear antigen (PCNA). *Histochemical J.* 1992; 24: 93-101.
2. Crocker J: Nucleolar organiser regions. *Curr Top Pathol* 1990; 82: 91-149.
3. Linden MD, Torest FX, Kubus J, Zarbo RJ: Clinical application of morphologic and immunohistochemical assessments of cell proliferation. *Am J Clin Pathol* 1992; 97(Suppl 1): 4-13
4. Underwood JCE, Giri DD: Nucleolar organiser regions as diagnostic diskriminants for malignancy. *J Pathol* 1998; 41: 1, 62-7.
5. Rosai J: *Ackerman's Surgical Pathology*. Mosby, St Louis, 1996; Eighth ed. Pp47-8.
6. Burugal G: Quantitative microscopy and tumour cell proliferation. *Bul Cancer* 1995; 82: 5, 511-7.
7. Willet CG, Hagan M, Daley W, Warland G et al.: Changes in tumor proliferation of rectal cancer included by preoperative 5-Fluorourasil and irradiation. *Dis Colon Rectum* 1998; 41: 1, 62-7.
8. Miracco C Spina D, Vindigni C Flipe MI et al.: Cell proliferation pattern and p53 expression in gastric dysplasia. *Int J Cancer* 1995; 17: 62(2), 149-54.
9. Steger K, Aleithe I, Behre H, Bergmann M: The proliferation of spermatogonia in normal and pathological human seminiferous epithelium: An immunohistochemical study using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen. *Mol Hum Reprod* 1998; 4:3, 227-33.
10. Jass JR, Ajioka Y, Rodojkovic M, Allison LJ et al.: Failure to detect colonic mucosal hyperproliferation in mutation positive members of a family with hereditary non polyposis colorectal cancer. *Histopathol* 1997; 30: 3, 201-7.
11. Kullmann F, Fadaie M, Gross V, Knuchel R et al.: Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 in dysplasia in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996; 8: 4, 371-9.
12. Terada T, Otha T, Kitamura Y, Ashida K et al.: Cell proliferative activity in intraductal papillary mucinous neoplasms and invasive ductal adenocarcinomas of the pancreas: an immunohistochemical study. *Arch Pathol Lab Med* 1998; 122(1): 42-6
13. Ma CK, Peralta MN, Amin MB, Linden MB et al.: Small intestinal stromal tumors.: a clinicopathologic study of 20 cases with immunohistochemical assesment of cell differentiation and the prognostic role of proliferation antigens. *Am J Clin Patho* 1997; 108: 6, 641-54.