

Prognostičko značenje ekspresije Ki-67 antigena u bolesnika s uvejalnim melanomom

Predictive power of Ki-67 antigen expression in patients with uveal melanomas

Ana Krvavica*

Sažetak

Cilj ove kratke studije bio je utvrditi izražajnost Ki-67 kao čimbenika proliferacije u stanicama melanoma srednje očne ovojnice, ispitati je li intenzitet izražajnosti povezan s morfološkim tipom stanica, te utvrditi je li intenzitet izražajnosti u svezi sa stupnjem invazije, što bi moglo imati prognostički značaj.

Za ispitivanje jačine izražajnosti Ki-67 proteina indirektnom peroksidaza-antiperoksidaza metodom i monoklonalnim antitijelom za Ki-67 protein pregledano je 30 melanoma srednje očne ovojnice. Jačina izražajnosti reakcije je obilježena semikvantitativnom metodom kao: negativna, slabo pozitivna, umjereno i jako pozitivna. Imunološka reakcija je bila negativna u 3 melanoma vretenastih stanica i jednom epiteloidnih stanica, slabo pozitivna u 3 tumora vretenastih stanica; umjereno pozitivna u 6 tumora vretenastih stanica, 6 miješane građe i 3 epiteloidnih stanica. Reakcija je bila najjačeg intenziteta u jednom melanomu vretenastih stanica, 6 miješane građe i jednom epiteloidne građe.

U našem uzorku tumora pT2 stadija većina tumora pokazala je umjereno jaku reakciju (30%), a manji broj slabo pozitivnu (6,6%), ali u pT3 stadiju 26,7% tumora je pokazalo najjači intenzitet reakcije.

Ključne riječi: Ki-67 onkogen, melanocitna proliferacija, melanomi uveje, tumorski biljezi

Summary

The aim of this short study was to investigate the expression of Ki-67 immunocomplex in uveal melanoma cells, to examine if the expression intensity corellates with the morphologic cell type, to establish if the expression intensity corellates with the invasion levels which would result in prognostic significance.

30 uveal melanomas were examined in order to test the presence of Ki-67 protein by indirect peroxidase-antiperoxidase method and monoclonal antibody for Ki-67 protein. The intensity of the reaction was marked negative, weakly positive, moderately positive or strongly positive by the semiquantitative method. The immunoreaction was found to be negative in 3 spindle cell melanomas and 1 epitheloid; weakly positive in 3 spindle cell melanomas, moderately positive in 6 spindle cell melanoma, 6 of mixed cellularity and 3 of epitheloid type. The intensity was strongest in 1 spindle cell, 6 tumors of mixed cellularity and one epitheloid. In our samples from the pT2 stage most tumors were moderately positive (30%), and a minor number of cases were weakly positive (6,6%), but in the pT3 stage 26,7% of tumors showed the strongest intensity of reaction.

Key words: Ki-67 oncogen, melanocyte proliferation, uveal melanoma, tumor markers

Med Jad 2008;38(3-4):93-98

Uvod

Uvejalni melanomi građeni su od dva različita tipa stanica: epiteloidnih i vretenastih. Posljedica toga je različito biološko ponašanje. Tumori sastavljeni isključivo od vretenastih stanica su manje agresivni, nemaju sklonost metastaziranju i omogućuju 75%-tno preživljavanje do 15 godina. Nasuprot tome epiteloidni melanomi imaju postotak preživljavanja 35% do 15 godina unatoč ranoj enukleaciji i relativno kasnom metastaziranju.

* **Opća bolnica Zadar**, Odjel patologije i sudske medicine (Dr. sc. Ana Krvavica, dr. med., spec. patolog)

Adresa za dopisivanje / *Correspondence address:*
Dr. sc. Ana Krvavica, dr. med., Opća bolnica Zadar, Odjel patologije i sudske medicine, Bože Peričića 5, 23000 Zadar, e-mail: ana.krvavica@zd.htnet.hr

Primljeno / *Received* 2007-09-24; Ispravljeno / *Revised* 2008-02-21, Prihvaćeno / *Accepted* 2008-03-15

Stanična građa uvejalnih melanoma je bitan prognošički čimbenik vezan uz mortalitet. U novoj modifikaciji Callenderove klasifikacije rijetki su melanomi građeni od vretenastih stanica tipa A shvaćeni kao nevusi. Pojava gnijezda epiteloidnih stanica u tumoru vretenastih stanica znači lošiju prognozu nego u tumoru miješane građe. Dodatni prognošički parametri uključuju veličinu tumora, inverziju standardne devijacije nukleolarne regije i pT klasifikaciju. Usprkos sličnoj morfološkoj građi s drugim melanomima, poznato je da biološki uvejalni melanomi imaju daleko bolju prognozu od melanoma drugih lokalizacija. Upravo stoga pretpostavlja se da bi određivanje Ki-67 kao čimbenika proliferacije u stanicama uvejalnih melanoma moglo protumačiti njihovo povoljnije biološko ponašanje. Zatim bi ispitivanje korelacije s pT klasifikacijom i morfološkim tipom stanica melanoma, kao i uspoređivanje postignutih nalaza s nalazima drugih tkiva prema literaturnim podacima moglo dati uvid u postojeću biološku razliku uvejalnih melanoma i melanoma drugih lokalizacija.

Ki-67 antitijelo reagira na nuklearni antigen proliferirajućih stanica različitih humanih malignih tumora. Ekspresija Ki-67 započinje u G1 fazi staničnog ciklusa, pojačava se kroz S, G2 i M fazu, a nema je u G0 fazi. To je dobra metoda za određivanje broja stanica u rutinski pripremljenom fiksiranom formalinu i parafinu u uklopljenom tkivu. Intenzitet ekspresije pokazuje visoku podudarnost s MFI (mitotičkim indeksom) i dobar je pokazatelj staničnog rasta, jer je prisutan u svim fazama staničnog ciklusa.

Materijal i metode

U cilju ispitivanja ekspresije antijela Ki-67 nakon rutinske dijagnostike (HE) retrospektivnom analizom pregledano je 30 uvejalnih melanoma. Svi su slučajevi dijagnosticirani u Zavodu za kliničku patologiju "Ljudevit Jurak" Kliničke bolnice "Sestara milosrdnica" u Zagrebu.

13 melanoma je bilo u stadiju pT₂, a ostalih 17 u stadiju pT₃. Svaka od ove dvije grupe melanoma je podijeljena u podgrupe, prema morfološkom tipu stanica tumora (epiteloidne, vretenaste i miješane).

Navedeni podaci tabelarno su prikazani (Tablice 1a i 1b), te statistički obrađeni Fisherovim egzaktnim testom.

Priprema materijala za imunohistokemijsku analizu

Za imunohistokemijsku detekciju Ki-67 proteina korištena je metoda trofazne reakcije (PAP) prema Sternbergeru. Korišten je serum tvrtke DAKO u razrjeđenju 1:200. Parafinski blokovi izrezani su na rezove debljine 3-4 μ na Reichert-Yung mikrotomu. Rezovi su potom postavljeni na predmetnice obložene 0,5% želatinom, osušeni preko noći u termostatu na 60°C, deparafinirani dva sata u ksilenu, te rehidrirani u seriji razrjeđenja etilnog alkohola.

Intenzitet reakcije ispitivanog antitijela je prikazan semikvantitativnom metodom:

- negativna reakcija (-)
- pozitivna reakcija u manje od 50% stanica (+)
- pozitivna reakcija u 50% stanica (++)
- pozitivna reakcija u više od 50% stanica (+++).

Tablica 1a. Prikaz bolesnika po spolu i dobi

Table 1a. Patients according to sex and age

	Muškarci / Men (M)	Žene / Women (F)
Starost / Age	38-79	42-73
Prosječno / Mean age	58,5	57,5
Broj / Number	13	17

Tablica 1b. Prikaz bolesnika po stadiju uvejalnih melanoma

Table 1b. Patients in pT₂ and pT₃ uveal melanoma stages

	pT ₂	%	pT ₃	%	Ukupno / Total
Muškarci / Men (M)	6	20,0	7	23,3	13 43,3%
Žene / Women (F)	7	23,3	10	33,3	17 56,6%
Ukupno / Total	13	43,3	17	56,6	30 100,0%

Rezultati

Od melanoma pT₂ stadija:

- 3 imaju epiteloidni tip stanica
- 7 ima vretenasti tip stanica
- 3 su miješane građe.

Od melanoma pT₃ stadija

- 2 imaju epiteloidni tip stanica
- 6 imaju vretenasti tip stanica
- 9 su miješane građe. (Tablica 2.)

I.) Ekspresija Ki-67 proteina prema tipu stanica melanoma

Ki-67 protein je bio (Tablica 3.):

- negativan u 3 melanoma vretenastih stanica i 1 epiteloidne građe
- pozitivan s + u 3 melanoma vretenastih stanica
- pozitivan s ++ u 6 melanoma vretenastih stanica, 6 miješane građe, 3 melanoma epiteloidnih stanica
- pozitivan s +++ u jednom melanomu vretenastih stanica; 6 miješane građe, 1 epiteloidnih stanica.

Tablica 2. Zastupljenost morfološkog tipa stanica u uvejalnim melanomima pT₂ i pT₃ stadija

Table 2. Presence of morphologic cell type in p T₂ and p T₃ stages of uveal melanomas

Tip stanica / Cell type	Broj Number	%	Broj Number	%	Ukupno / Total	
					Broj / Number	%
Vretenaste (V)	7	23,3	6	20,0	13	43,3
Miješane (M)	3	10,0	9	30,0	12	40,0
Epiteloidne (E)	3	10,0	2	6,7	5	16,7
Ukupno / Total	13	43,3	17	56,7	30	100,0

Usporedbom tipa stanica i stadija melanoma nisu nađene statistički značajne razlike (Fisher's Exact Test $P > 0,05$) / Comparing pT₂ and pT₃ stages of uveal melanomas according to morphologic cell type not showing statistically significant correlation (Fisher's Exact test $P > 0,05$)

Tablica 3. Ekspresija Ki-67 proteina u odnosu na tip stanica melanoma

Table 3. Ki-67 expression according to cell type of uveal melanomas

Ki-67	V		M		E		Ukupno / Total	
	Broj / Number	%	Broj / Number	%	Broj / Number	%	Broj / Number	%
-	3	10,0			1	3,3	4	13,3
+	3	10,0					3	10,0
++	6	20,0	6	20	3	10,0	15	50,0
+++	1	3,3	6	20	1	3,3	8	26,7
Ukupno / Total	13	43,3	12	40	5	16,7	30	100,0

Usporedbom ekspresije Ki-67 proteina i tipa stanica nisu nađene statistički značajne razlike (Fisher's Exact Test $P > 0,05$) / Expression of Ki-67 protein not showing statistically significant correlation with morphologic cell type (Fisher Exact test $P > 0,05$)

II.) Ekspresija Ki-67 proteina u pT₂ i pT₃ stadiju melanoma

Ki-67 protein je bio (Tablica 4.):

- negativan u 2 melanoma pT₂ stadija, 2 melanoma pT₃ stadija

- pozitivan s + u 2 melanoma pT₂ stadija, jednom melanomu pT₃ stadija
- pozitivan s ++ u 9 melanoma pT₂ stadija, 6 melanoma pT₃ stadija
- pozitivan s +++ u 8 melanoma pT₃ stadija.

Tablica 4. Ekspresija Ki-67 proteina prema pT₂ i pT₃ stadiju uvejalnih melanoma

Table 4. Ki-67 expression according to pT₂ and pT₃ stages of uveal melanomas

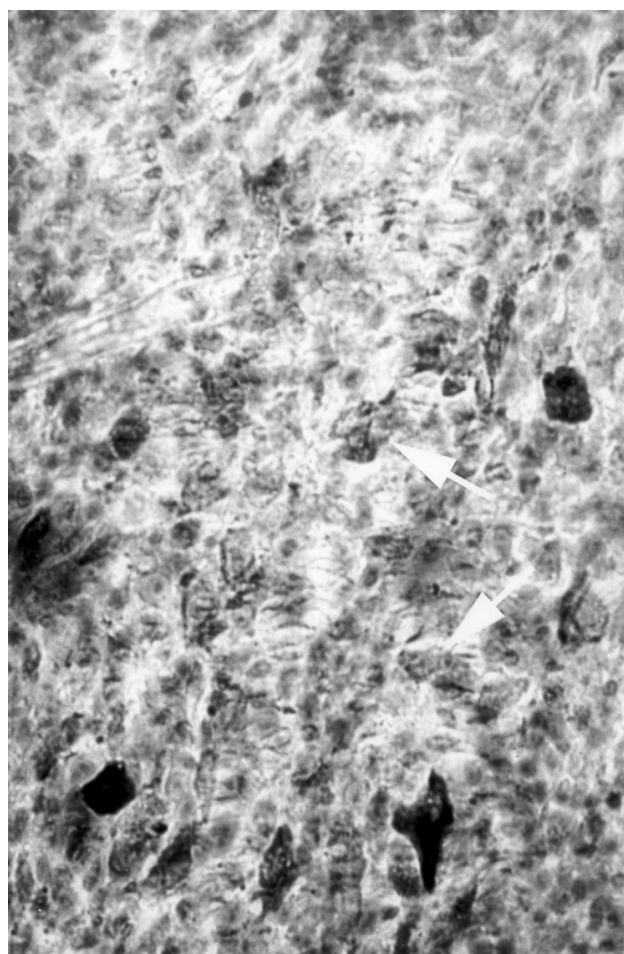
Ki-67	pT ₂		pT ₃		Ukupno / Total	
	Broj / Number	%	Broj / Number	%	Broj / Number	%
-	2	6,6	2	6,6	4	13,0
+	2	6,6	1	3,3	3	10,0
++	9	30,0	6	20,0	15	50,0
+++			8	26,7	8	26,7
Ukupno / Total	13	43,3	17	56,6	30	100,0

Usporedbom ekspresije Ki-67 proteina i stadija melanoma nađene su statistički značajne razlike (Fisher's Exact Test $P < 0,05$) / Ki-67 protein expression showig statistically significant correlation with tumor stages pT₂ and pT₃ (Fischer's Exact test $P < 0,05$)



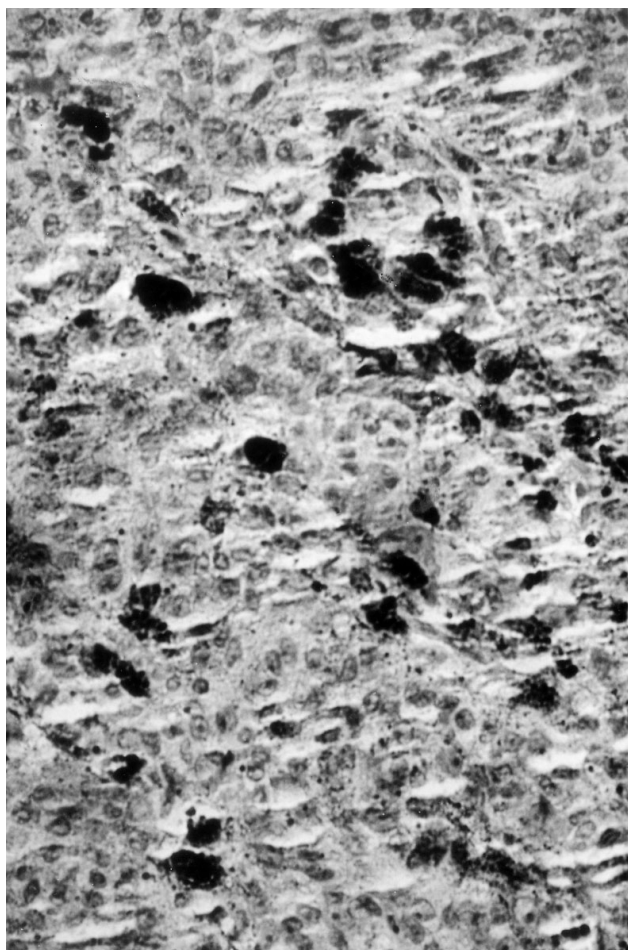
Slika 1. Slučaj br. 28 – melanom miješanog tipa stanica, pT₃ stadija (Ki-67, 400x), reaktivnost ekspresije umjereno izražena (++)

Picture 1. Case 28 – melanoma of mixed cellularity in pT₃ stage (Ki-67, 400x), reactivity moderately positive (++)



Slika 2. Slučaj br. 13 – melanom miješanog tipa stanica, pT₂ stadija (Ki-67, 400x), reaktivnost ekspresije umjereno izražena (++)

Picture 2. Case 13 – melanoma of mixed cellularity in pT₂ stage (Ki-67,400x), reactivity moderately positive (++)



Slika 3. Slučaj br. 21 – melanom vretenastih stanica, pT₃ stadija (Ki-67, 400x), reaktivnost umjereno izražena (++)

Picture 3. Case 21 – melanoma of spindle cells in pT₃ stage (Ki-67, 400x), reactivity moderately positive (++)

Rasprava i zaključci

Zbog podjednake morfološke građe uvejalnih melanoma s melanomima drugih lokalizacija, ali različitog biološkog ponašanja, ispitana je ekspresija Ki-67 proteina kao čimbenika proliferacije u stanicama uvejalnih melanoma. U morfološkoj građi prevladavaju dva tipa stanica: epiteloidne i vretenaste. Tumori građeni od heterogenih staničnih nakupina skloniji su rastu, nego oni građeni samo od vretenastih stanica koje su čvrsto povezane.¹ Ranije studije pripisivale su više značaja morfološkoj građi, veličini tumora, ograničenosti rubova i dubini invazije, kao provjerenim prognostičkim parametrima. Noviji autori traže nove, pouzdanije parametre, kao što su: vaskularizacija tumora: površina tumora u kontaktu s bjeloočnicom, mitotički indeks, inverzija standardne devijacije

nukleolarne regije, određivanje S-faze frakcije, te imunohistokemijski biljezi.²⁻⁷

Ekspresija Ki-67 proteina u našem uzorku pokazuje manje varijacije između pT₂ i pT₃ stadija. Najjači intenzitet reakcije zabilježen je u pT₃ stadiju (26,7% od ukupnog broja melanoma).

Nije nađena statistički značajna razlika u reaktivnosti biljega prema tipu stanica. Rezultati se ne slažu s rezultatima Mooy i sur.,⁸ gdje je Ki-67 bio pozitivan u velikom broju uvejalnih melanoma i dokazana je statistički značajna povezanost jačine ekspresije s epiteloidnim tipom stanica i brojem apoptotičnih tjelešaca. Razlika je vjerojatno nastala jer su statistički obrađene dvije podgrupe tumora: jednu su činili tumori vretenastih stanica, a drugu tumori miješane građe i epiteloidni tumori.

Iz literature je jasno da reaktivnost ispitivanih biljega raste s pT stadijem tumora, te je u korelaciji s veličinom tumora, a ne s tipom stanica.

Ki-67 protein ne može poslužiti kao samostalni indikator maligne preobrazbe, već u kombinaciji s drugim biljezima predstavlja prognostički indikator preživljavanja i sposobnosti razvoja metastaza.^{9,10,11}

Literatura

1. Coleman K, Baak JP, Van Diest PJ, Mullaney J. Prognostic value of morphometric features and the Callender classification in uveal melanomas. *Ophthalmology*. 1996;103:1634-41.
2. Luyten GP, Mooy CM, Post J, Jensen OA et al. Metastatic uveal melanoma. A morphologic and immunohistochemical analysis. *Cancer*. 1996;78:1967-71.
3. Hagen EC, Vanegor C, Schlingemann RO et al. Correlation of histopathological characteristics with staining patterns in human melanoma assessed by monoclonal antibodies reactive on paraffin sections. *Histopathology*. 1986;10:689-700.
4. Costa MJ et al. Immunohistochemistry demonstrates a possible molecular basis for the poor histopathologic prediction of clinical behaviour. *Human Pathol*. 1996;27:274-81.
5. Weidner N et al. Correlation of Ki-67 Antigen expression with mitotic figure index and tumor grade in breast carcinomas using the novel paraffin reactive MIB-1 antibody. *Hum Pathol*. 1994;25:337-40.
6. Gerdes J, Lemke H, Baisch et al. Cell cycle analysis of a cell- proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 1984;133:1710-5.
7. Sternberger LA, Hardy Jr PH, Cuculis JJ, Mayer HG. The unlabelled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen- antibody complex (horse radish peroxidase-antihorse radish peroxidase) and its use in

- identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem.* 1970;18:15-33.
8. Mooy CM, Luyten GPM, De Jong PTVM, Luider TM, Stijnen T, Van de ham F, Van Vroonhoven CCJ, Bosman PT. Immunohistochemical and prognostic analysis of apoptosis in uveal melanomas. *Am J Pathol.* 1995;147:1097-10.
 9. Vogt T, Zippeper KH, Vogt A, Holzel D, Landthaler M, Stolz V. p-53 protein and Ki-67 antigen expression are both reliable biomarkers of prognosis in thick stage I nodular melanomas of the skin. *Histopathology.* 1997;30:57-63.
 10. Chowers I, Folberg R, Livni N, Pe'er J. p-53 Immunoreactivity, Ki-67 expression, and microcirculation patterns in melanoma of the iris, ciliary body and choroid. *Current Eye Research.* 2002;24:105-8.
 11. Stanec S, Stanec Z i sur. *Melanom.* Zagreb: Medicinska naklada; 2006, str. 13-15, 321-335.