

Ependimomalarda Antiapoptik (BCL-2) Protein ve Tümör Supressör (P53) Protein İfadesi ve Proliferatif İndeks (Ki-67) ile Histolojik Tipler ve Derecelerin İlişkisi

Serdar Altınay¹, Aydın Sav², Özlem Yapıcıer³, İlhan Elmacı⁴

¹Sağlık Bakanlığı Bağıcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye

²Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Nöroşirürji Bölümü, İstanbul, Türkiye

³Anadolu Sağlık Merkezi, Patoloji Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye

⁴Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroşirürji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı ependimomaların MIB-1 (aynı zamanda Ki-67 olarak bilinen) işaretleyicisi ile hem proliferatif aktivitesini belirlemek hem de p53 ve bcl-2 proteinlerinin immunohistokimyasal analizi ile ependimoma subtipleri ve tümör derecesi arasında ilişki olup olmadığını değerlendirmektir.

Metod: Marmara Üniversitesi Nörolojik Bilimler Enstitüsü Nöropatoloji Bölümünde ependimal tümör olarak kayıtlı 33 hastanın spinal kord ve beyin biyopsi örneklerine ait formalinle fikse parafin blokları tekrar incelendi. Çalışmaya histopatolojik özelliklerini gösteren 2 subependimoma, 3 mikso-papiller ependimoma (Grade I), 13 ependimoma (Grade II), ve 15 anaplastik ependimoma (Grade III) alındı.

Bulgular: Grade I ve Grade II ependimomalar düşük proliferatif aktivite gösterdi. Tüm p değerleri atipide p=0.00034, nekrozda p=0.0011, mitozda p=0.00447 ve dansitede p=0.0000 anlamlı idi. MIB-1 proliferatif indeksi anaplastik ependimomalarda %78 oranında görüldü. Bcl-2 protein ekspresyonu özellikle mikso-papiller ependimomalarda belirgin olmak üzere bütün ependimoma subtiplerinde ve gradelerinde tespit edildi. 7 tümör (%21.2) farklı boyanma yüzdelerinde nükleer p53 pozitivitesi gösterdi. Pozitivite anaplastik ependimomalarda anlamlı idi (%33.4). Supratentorial ve infratentorial ependimomaların LI değerleri arasında anlamlı ilişki bulundu (Mann-Whitney-U testi, p=0.0012) 18 yaş altı ve üstü hastaların Ki-67 LI değerleri arasında da aynı testle korelasyon tespit edildi (p=0,0018).

Sonuç: Bu veriler yüksek MIB-1 ve p53 değerlerinin yüksek dereceli ependimomalarda belirleyici olabileceğini düşündürdü. Ependimomalarda komplet, uzun süreli klinik takipli çok sayıda hastayı ve bcl-2, p53 ekspresyonu, MIB-1 hücre kinetik çalışmalarını içeren ilave araştırmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar sözcükler: ependimoma, p53 gen, MIB-1, bcl-2

EPENDYMAL TUMORS: CORRELATION OF PROLIFERATIVE (MIB-1), TUMOR SUPPRESSOR (P53) AND ANTI-APOPTOTIC (BCL-2) INDICES WITH HISTOLOGIC TYPES AND GRADING

ABSTARCT

Background: The objectives of this study are to investigate both proliferative activity of ependymomas as determined by MIB-1 (also known as Ki-67) labeling index (LI) and p53 and bcl-2 proteins by immunohistochemical analysis to assess their expressivity and to correlate findings with ependymoma subtypes and tumor grades.

Methods: We investigated routinely formalin-fixed, paraffin-embedded brain and spinal cord biopsy tissues from 33 patients with ependymal neoplasms retrieved from the files of the Neuropathology division, Institute of Neurological Sciences, Marmara University. This study covers 33 tumors with the histological features of 2 subependymomas, 3 myxopapillary ependymomas (Grade I), 13 ependymomas (Grade II), and 15 anaplastic ependymomas (Grade III).

Results: Grade I and Grade II ependymomas showed low proliferative activity. P values were significant for atypia p=0.00034, for necrosis p=0.0011, for mitosis p=0.00447, for density p=0.0000. MIB-1 immunexpressivities were seen in 78% of anaplastic ependymomas. Protein expression of bcl-2 was detected in all of ependymoma subtypes and grade, specifically prominent in myxopapillary ependymomas. Seven tumors (%21.2) showed nuclear p53 positivity with different percentages with staining of nuclei. Positivity was significant in anaplastic ependymomas (%33.4). We found LI values with significant correlation between supratentorial and infratentorial ependymomas (Mann-Whitney-U test, p=0.012) Ki-67 LI values and patients with >18 years old and <18 years old were significant by the same test (p=0,0018).

Conclusions: These data suggest that high MIB-1 and p53 immunolabeling might be objective indicators of high grade ependymomas. Additional experiments involving larger numbers of cases with complete and long term clinical follow-up are needed to determine the clinical relevance of bcl-2 and p53 expression and MIB-1 cell kinetic studies in ependymomas.

Key words: ependymoma, p53 gene, MIB-1, bcl-2

Ependimal tümörler spinal kordun santral kanalını ve ventrikülleri döşeyen hücrelerden kaynaklanan nadir malignitelere aittir. Tüm nöroepitelial tümörlerin %3-9'unu oluşturan ependimomaların prognozu için klinik ve histolojik kriterler bilinse de biyolojik davranışı önceden belirleyebilecek immüno-morfolojik parametreler henüz oluşturulmamıştır (1-4). Bununla birlikte nöropatolojide SSS (santral sinir sistemi) malignitelerinin gelişim hızını ve prognozunu tespit etmede hücre siklusunu araştırmaları çok önemli bir yer tutmaktadır.

Monoklonal antikor olan Ki-67, Go fazı hariç tüm hücrelerde immünreaktiviteyi gösteren bir nükleoproteindir. Bu nedendir ki Ki-67 antikorunun tespiti tümörlerin gelişme fazlarında iyi bir belirteç olarak kullanılmıştır. SSS (santral sinir sistemi) tümörlerinde Ki-67 immünohistokimyası temel alınarak histolojik grade ve MIB-1 indeksi için yapılan çok sayıda çalışma vardır (5-12). Ancak glial tümörlerin malign biyolojik davranışı sadece proliferatif potansiyele değil aynı zamanda hasta yaşına, histolojik dereceye, tümör lokalizasyonuna, invazivlik potansiyeline, anjiogeneze, apoptozise, tedavi tipi ve postoperatif komplikasyonlara bağlıdır (1-4,13-15). Çalışmamızda bu amaçla nükleer atipi, mitoz, nekroz ve dansiteyi içeren histopatolojik parametreler ile Ki-67 LI arasındaki ilişki test edildi.

Dokuların yapısı ve bütünlüğünün korunması proliferasyon ve programlı hücre ölümü arasındaki dengenin kontrolü sonucudur. Apoptozisin tümör gelişiminde ve tedaviye cevapta önemli bir belirleyici faktör olduğu bilinmektedir (1,4,14,16,27). Bcl-2 onkogeni 18. kromozomun uzun koluna lokalize 239 aa dizimli hücrenin iç mitokondrial membranına, perinükleer membrana ve endoplazmik retiküluma lokalize 26 kD luk bir proteini kodlayan ve programlı hücre ölümünü önleyen bir anti-apoptotik genidir (1-4). Proliferasyonun ne zaman olacağı, programlı hücre ölümü ya da diferansiye olmak gibi seçenekler otonom olaylar olmayıp, çevredeki hücrelerin de etkisiyle düzenlenen bir etkileşim zinciridir. Glial tümörlerde bcl-2 veya epidermal growth faktör reseptörlerinin (EGFR) deregülasyonu, normal p53 gen fonksiyonunun kaybı gibi büyüme kontrol genlerinin düzenlenmesindeki bozukluk tedaviye direncin gelişiminde ilişkili olabilir. P53 geni ise hücrelerin kontrol edilemeyen çoğalmalarını önleyerek tümör gelişiminde temel rol oynar. P53 geninin fonksiyonunun kaybolması ya da azalması SSS'ni de içeren çoğu neoplazilerin gelişiminde büyük öneme sahiptir (1-4,18,19).

Gendeki nokta mutasyonları 24 saat gibi daha uzun ömre ve normal değerlerden 10-100 kat gibi daha yüksek hücresel seviyelere ulaşan, fonksiyon görmeyen mutant formlarının ekspresyonuna yol açar ki bunlar immünohistokimyasal olarak saptanabilir. Bu veriler ışığında çalışmamızda; ependimomaların MIB-1 immünohistokimyası ile tespit edilen proliferatif aktivitesinin sonuçları, ilave olarak p53 ve bcl-2 protein ekspresyonunun ependimoma grade ve subtipleriyle ilişkisi araştırıldı.

Materyal ve metodlar

1- Tümör materyali

Çalışmaya Marmara Üniversitesi Nörolojik Bilimler Enstitüsü nöropatoloji laboratuvarına gelen 33 ependimoma olgusu alındı. %10 nötral formalinle fikse edilmiş parafin bloklar ve lamlar arşivden çıkarıldı. İki nöropatolog olmak üzere 3 patoloji uzmanı tarafından revize edilen tümörlerin WHO 2000 sınıflamasına göre histolojik subtipleri ve gradeleri belirlendi (20). İmmünohistokimyasal boyanma için özellikle tümör morfolojilerini en iyi yansıtan ve az nekroz içeren bir adet parafin blok seçildi. Üçü primer antikor biri H&E boyası için 3'er mikron kalınlığında 4 kesit alındı. Ki-67 ve bcl-2 için lenf nodu, p53 için meme karsinomu kontrol doku olarak kullanıldı.

2- İmmünohistokimyasal çalışma

(i) Ki-67 ve bcl-2

Ki-67 ve bcl-2 proteininin immünohistokimyasal boyanmasında antijen retrieval metodu uygulandı. Parafin bloklardan elde edilen 3 mikron kalınlığındaki kesitlerden her olguya ait ikişer lam bir gece oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 60 C'de bir saat inkübatör içinde tutulduktan sonra üç kez beşer dakika ksilen ile deparafinize edildi. İki kez 10'ar dakika süreyle %100 alkol ve distile su ile hidrate edildi. Peroksid blokajı preparatların %3'lük hidrojen peroksid içinde 20 dakika tutulması ile yapıldı. Daha sonra PBS solüsyonu ile iki kez beşer dakika yıkandı. Olguların birer kesitine primer antikor olarak S.S. Mouse Anti Ki-67 (SP6, RM 9106 Biogen, 1:100) diğer kesitine ise S.S Mouse Anti bcl-2 (RB-1151 Biogen, 1:40) primer antikor kullanıldı. 37 C'de iki saat bekletildi, PBS yıkamasından sonra sekonder Biotnylated anti-mouse antikor kullanıldı. İki kez beşer dakika süreyle PBS yıkaması yapılan örnekler üzerine peroxidase conjugated streptavidine (label) damlatıldı. Enzimatik reaksiyondan sonra Mayer's hematoksilenle nükleus boyaması yapıldı.

(ii) P53

P53 immünohistokimyası için avidin-biotin kompleksi (ABC) metodu uygulandı. Poly-L lysine kaplı lamlara alınan 3 mikron kalınlığındaki kesitler ksilene alındıktan sonra dereceli alkolde dehidrate edildi. Endojen peroksit blokajı %1 hidrojen peroksit solüsyonunda absolut metanol ile yapıldı. Nonspesifik bağlanma lamların PBS solüsyonlarında 20 dakika kalması ile bloke edildi. Kesitlerin gece boyunca +4 C'de primer poliklonal antikorla (wild type p53 RP-9333 Biogen,1:1000 dilüsyon) ilk inkübasyona tabi tutulmasını takiben sekonder biotinli anti-rabbit antikor (1:100 dilüsyon) ve ABC uygulandı. İşlemin her aşamasında PBS ile yıkandı. H&E boyamasından sonra kapatıldı.

3- İmmünreaktivitenin analizi**(i) Ki-67**

Değerlendirme x10 büyütmede hemoraji-nekroz içermeyen, kesit periferinden uzak olan, proliferatif aktivitenin yüksek olduğu, hücre yoğun alanlar (hot-spot) seçilerek yapıldı. X40 büyütmede 1000 neoplastik hücre sayılarak bunların içinden boyanma yoğunluğuna bakılmaksızın Ki-67 eksprese eden nükleuslar seçildi. Tümörün vasküler komponentini oluşturan hücreler dışlandı. Pozitif boyanan hücrelerin sayısı tüm hücre sayısına bölünerek Ki-67 labelling indeksi hesaplandı.

(ii) Bcl-2 ve p53

Aşağıdaki kriterler esas alınarak 4 kategoride yapıldı;

0 veya nadir hücre boyanması 0,

Tümör hücrelerinin < 1/3 boyanması 1+,

Tümör hücrelerinin 1/3-2/3 arasında boyanması 2+,

Tümör hücrelerinin >2/3 boyanması 3+ kabul edildi. Bcl-2 için sitoplazmik, p53 için nükleer boyanmalar değerlendirilmeye alındı.

4- Histopatolojik analiz

Her olgu SSS tümörlerinin 2000'de yapılan WHO sınıflamasına göre incelendi. Nükleer pleiomorfizm, nekroz, mitotik aktivite (mitoz sayısı/10 büyük büyütme alanı), vasküler proliferasyon ve hücre dansitesine göre derecelendi. Ependimoma subtipleri ise belirgin yapısal paternle uyumluluğa göre mikropapiller ve subependimoma (WHO grade 1), sellüler, berrak hücreli, klasik (WHO grade 2), anaplastik varyant (WHO grade 3) olarak sınıflandırıldı.

Nekroz az ya da geniş alanda koagülasyon nekrozu şeklinde bulunmasına göre -/+ şeklinde değerlendirildi. İzole nekrotik hücreler anlamlı sayılmadı. Nükleer atipide pleomorfizm esas alındı. Hücre dansitesi ve nükleer atipi üçlü nümerik değerlendirme ile yapıldı.

0; düşük dansite/atipi, 1+; orta dansite/atipi, 2+; yüksek dansite/atipi

Mitotik aktivite 10 büyük büyütmede sellüler alanlarda değerlendirildi; 0; 0 ya da bir mitotik figür, 1+; 2-3 mitoz, 2+; >3 mitoz

5- Klinik veri analizi

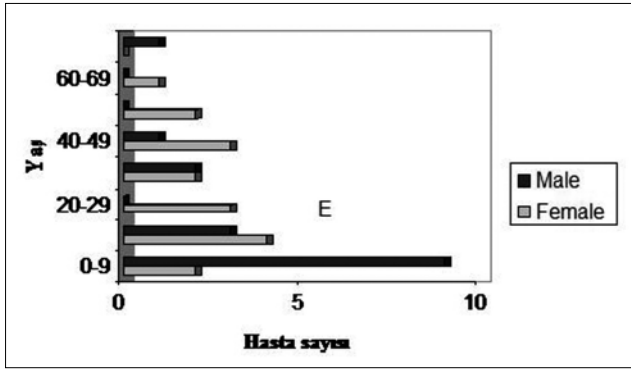
Klinik verilere hasta yaşı, cinsiyeti ve tümör lokalizasyonu dahil edildi. Postopreatif RT,KT ve sağkalım bilgileri toplandı.

6- İstatiksel analiz

İstatistiksel değerlendirmenin amacı ependimoma subtiplerini WHO grade ile uyumlu olacak şekilde sınıflandırmak ve değişkenlerle ilişkisini saptamaktır. İstatistik analizler SPSS programında yapıldı. Her gradenin kendi içindeki ve gruplar arasındaki homojenitesi Bolette homojenite testi ile araştırıldı. P<0.05 değeri anlamlı kabul edildi. Temel kategoride grade, Ki-67 LI, p53, bcl-2, nükleer atipi, hücre dansitesi, mitotik aktivite ve nekrozun varlığı/yokluğu değişkenler arası ilişkisi incelendi. Ayrıca yaş, lokalizasyon, sağkalım ve Ki-67 LI değerleri karşılaştırıldı. P53 değeri ile gradeler Chi-Square testinde kıyaslandı. Ki-67 ve grade eşleştirmesinde non parametrik Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Ki-67 LI ve mitoz, dansite, atipi gibi histopatolojik özellikler arasındaki ilişki Kruskal-Wallis testi ile MIB-1 LI ve nekroz kıyaslaması Mann-Whitney-U Wilcoxon Rank Sum W testi ile yapıldı. 4 histolojik parametrenin her biri ile grade arasındaki ilişkide Chi-Square testinden faydalanıldı. Sağ kalanlar ve ölenler arasındaki korelasyon t testi ile yapıldı. Supratentorial ve infratentorial yerleşimli tümörlerin Ki-67 LI değerleri ve 18 yaş altı-üstü hastaların Ki-67 LI değerleri arasında ilişki Mann-Whitney-U testi ile ölçüldü.

Bulgular**1- Klinik veriler**

Hastalarımızın yaş aralığı 1-70 olup ortalama 24 idi. 33 hastanın 17'sini (%51) erkekler, 16'sını (%49) kadınlar oluşturmaktaydı (E/K=1,06 Grafik 1). Çalışmaya 5 (%15) grade 1 ependimoma, (subependimoma %6, mikropapiller ependimoma %9), 13(%40) grade 2 ependimoma ve 15(%45) grade 3 ependimoma olgusu alındı.



Grafik 1. Ependimomalarda yaş ve cinsiyete göre dağılım. Erkeklerde 9 yaş altında belirgin bir yükselme mevcut.

2- Histopatolojik analiz

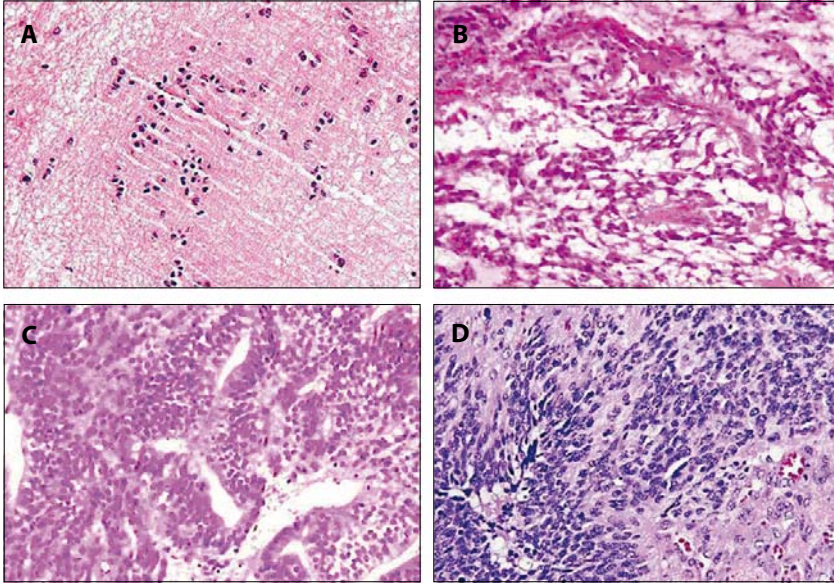
Olgularımıza ait tüm veriler Tablo 1'de listelendi. Grade 1 ependimomalar nekroz, sellülarite ve mitoz sergilemez iken orta derecede atipi gösterdi. Atipi subependimomalarda %50 oranında iken miksoependimomalarda %67 idi. 13 grade 2 ependimomada sellülarite %77 olup altı tanesi sellüler ependimoma idi. Elong ve belirgin fibriler görünümdeki bir olgu tanistik ependimoma tanılı idi. İki olgu hariç grade 2 tümörlerin hepsi düşük mitotik aktivite sergiledi. 15 anaplastik ependimoma hastamızın tümünde orta derecede ya da şiddetli nükleer atipi izlendi

Tablo 1. 33 ependimoma olgusunun klinikopatolojik ve immünohistokimyasal verileri.

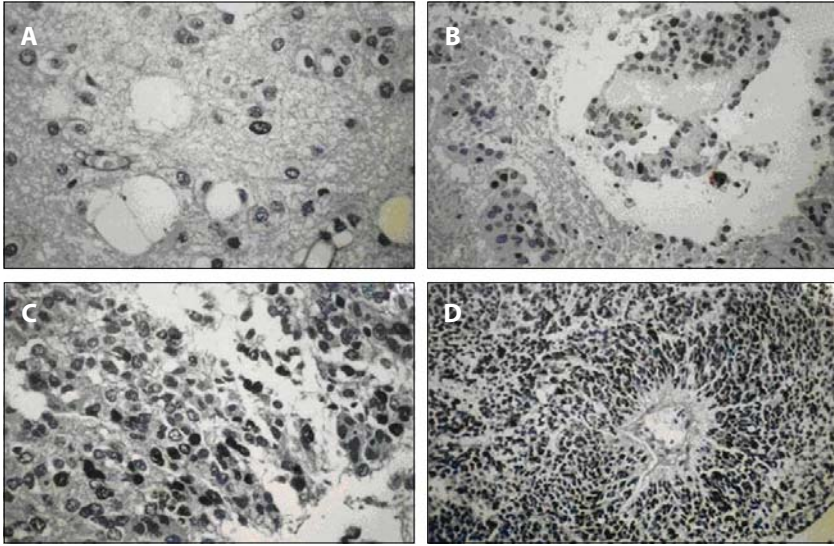
Sıra	Yaş/cinsiyet	Lokalizasyon	Grade	Operasyon	RT	KT	Ki-67 LI	Bcl-2	p53	Sağkalım / hafta
1	15/K	L4-5	I	GTR	-		0	3+	0	146
2	47/K	supratent.	I	GTR			0,1	3+	0	109
3	19/E	T12-S3	I	GTR			0,3	3+	0	
4	24/K	cauda eq.	I	GTR	+		7,2	3+	0	22*
5	50/K	lat.vent.	I	SR			1,2	1+	0	
6	11/E	4th vent	II	SR			0,8	3+	0	39
7	19/K	post.fossa	II	SR			0	1+	0	
8	12/E	post.fossa	II	GTR	+		2,5	2+	0	
9	38/K	sol temp.	II	GTR			0	3+	0	
10	42/K	C7-T5	II	SR			0,5	3+	0	
11	25/K	C3-T1	II	GTR			0,6	3+	0	80
12	5/E	post.fossa	II	SR	+		4,7	1+	1+	
13	43/K	spinal	II	SR			0	3+	0	
14	29/K	lat.vent.	II	SR			3	1+	1+	
15	53/K	T13-L1	II	SR			0	3+	0	
16	1/K	tmp-pr-ok	II	SR		8 cur	0,2	3+	0	
17	37/E	C4-6	II	GTR	-		1,2	2+	0	67
18	70/K	spinal	II	SR			0	3+	0	
19	6/E	post.fossa	III	SR	+		56	3+	3+	30*
20	9/E	frontal	III	SR			0,5	3+	1+	
21	7/E	pons	III	SR	+		17,6	2+	1+	
22	60/K	T8-9	III	SR			0	3+	0	
23	41/E	vent-crblm.	III	SR			6	3+	1+	
24	11/K	sağ temp	III	SR		+	19,5	3+	0	
25	5/E	post.fossa	III	SR	+		0	0	0	
26	6/E	post.fossa	III	SR	+		22	2+	1+	
27	9/K	tmp-pr-ok	III	SR			Nonsp	3+	0	
28	6/E	post.fossa	III	SR	+	+	33,2	2+	0	75
29	37/K	ponto-md	III	SR	+		0,6	2+	0	14*
30	14/K	İK	III	SR	+		2,5	3+	0	70
31	6/E	post.fossa	III	SR			18,2	0	0	
32	31/K	post.fossa	III	SR			0	3+	0	
33	3/E	İK	III	SR			22,4	3+	0	

(GTR: Gros total rezeksiyon. SR: Subtotal rezeksiyon, RT: Radyoterapi, KT: Kemoterapi

* İşaretili hastalar hastalıkları nedeniyle ölmüştür.)



Şekil 1. Ependimoma subtiplerine ait H&E örnekler; subependimoma (x200-A), mikropapiller ependimoma (x400-B), grade 2 ependimoma (x400-C), anaplastik ependimoma (x400-D).



Şekil 2. Ki-67 immünreaktivitesi; subependimoma (x400-A), mikropapiller ependimoma (x400-B), grade 2 ependimoma; (++) boyanma (x400-C), anaplastik ependimoma; (+++) boyanma (x200-D).

Tablo 2. Ependimoma subtiplerinin histopatolojik özellikleri.

Tümör tipi	atipi%	nekroz%	mitoz% a*	dansite% a**
Subep.	50	0	0	0
Myx. Ep.	67	0	0	0
Grade II	92	38	30	10
Anap. Ep.	100	86	86	11

(a*: minimum bir mitoz / büyük büyütme, a**: 2+ sellülarite)

Tablo 3. Ependimoma subtiplerinde Ki-67 LI

Grade	n	oran	ort. LI
Sub.ep.	2	0.1-1.2	0.65
Myx.ep.	3	0-7.2	2.5
Grade II	13	0-4.7	1.03
Grade III	15	0-56	14.17
Total	33	0-56	6.9

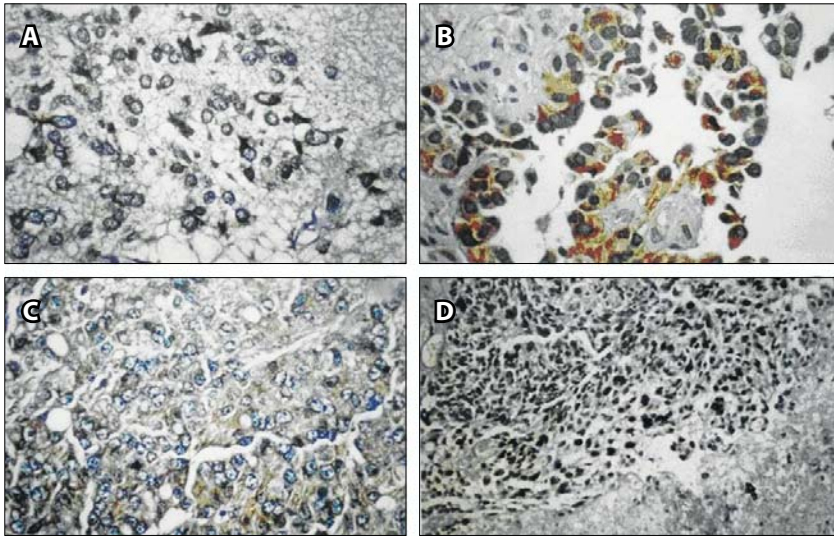
(Şekil 1). Mitoz oranı değişkenlik göstermekle birlikte çoğunda (%86) mevcuttu. Ependimoma subtiplerinin histopatolojik verilerle kıyaslaması Tablo 2'de özetlendi.

3- İmmünohistokimyasal analiz

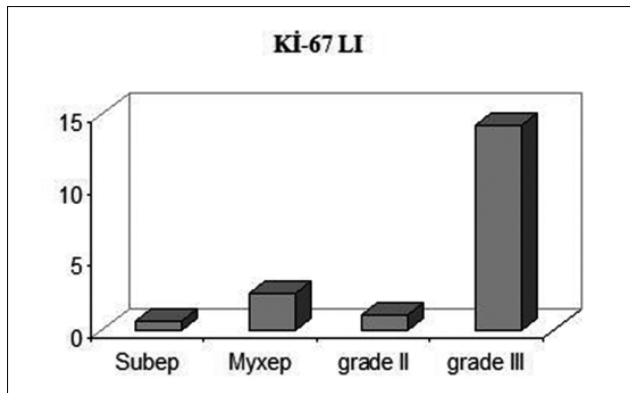
(i) Ki-67 (MIB-1) Labeling İndeks

Histolojik subtiplerin boyanma yoğunluğuna göre dağılımı Tablo 3'de gösterildi. Buna göre 33 ependimoma

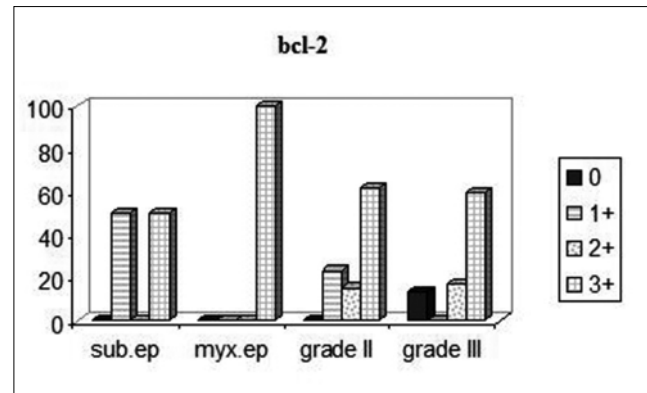
olgusunun 23 tanesinde (%71) Ki-67 immünekspresyonu görüldü. Dokuz tanesinde pozitiflik saptanmazken bir tanesinde nonspesifik zemin boyanması mevcuttu. Grade 1 tümörlerden Ki-67 boyanması gösteren 4 olgu (%80) var iken grade 2 tümörlerde 8 olgu (%62) vardı. Anaplastik ependimomalarda MIB-1 immünekspresyonu %78 olarak tespit edildi (Şekil 2). 27 nolu hasta yaygın



Şekil 3. Bcl-2 immünreaktivitesi; subependimoma; (+) boyanma (x400-A), mikso-papiller ependimoma; (+++) boyanma (x400-B), grade 2 ependimoma; (+++) boyanma (x400-C), anaplastik ependimomada (+ + +) p53 boyanması (x200-D) ok=geniş nekroz alanı.



Grafik 2. Ependimoma subtiplerinde ortalama LI değerleri.



Grafik 3. Ependimoma subtiplerinde hücre yoğunluğu temelinde bcl-2 boyanması.

zemin boyanması nedeniyle değerlendirmeye alınmadı. Ortalama Ki-67 LI 6,9 olup en yüksek değer 14,17 ile grade 3 tümörlerde bulundu (Grafik 2).

(ii) Bcl-2 İmmünohistokimyasal analiz bulguları

Tümör hücrelerindeki boyanmalar intrasitoplazmik, hafif veya kuvvetli yoğunlukta kahverenkli idi (Şekil-3A-B-C). Bcl-2 ile pozitif boyanma geniş sitoplazmaya sahip tümör hücrelerinde daha çarpıcı izlendi. Damar ya da ependimal tubullerin çevresinde kuvvetli boyanma mevcuttu. 33 ependimoma olgumuzun 21 (%64) tanesi, mikso-papiller ependimomaların tümü ve bir tane subependimoma güçlü bcl-2 pozitifitesi gösterirken diğer subependimoma olgusu 1+ immünreaktivite verdi (Grafik 3). Grade 2 ependimomaların 3 tanesinde 1+ sitoplazmik boyanma mevcut iken anaplastik ependimomaların 2 tanesi 0 ya da çok az boyanma gösterdi (Tablo 4).

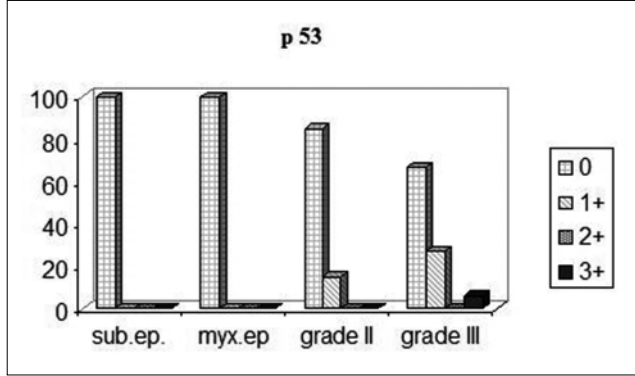
Tablo 4. Ependimoma subtiplerinde Bcl-2 pozitifitesi.

Grade	n	0	1+	2+	3+
Sub.ep.	2	0	1	0	1
Myx.ep.	3	0	0	0	3
Grade II	13	0	3	2	8
Grade III	15	2	0	4	9
Total %		6.1	12.1	18.2	63.6

(iii) p53 İmmünohistokimyasal analiz bulguları

Tümör hücrelerindeki boyanmalar intranükleer, hafif veya kuvvetli yoğunlukta kahverenkli idi. Grade 2 tümörlerin %15,4'ü 1+ immünekspresyon gösterirken grade 3 ependimomalarda %6.7 oranında 3+ boyanma (Şekil 3D), %26.7 oranında 1+ olmak üzere toplam %33.4 immünreaktivite saptandı (Grafik 4). Genel olarak immünreaktif

hücrelerin tümörün herhangi bir alanına rastgele dağıldığı spesifik yapılarla ilişkili olmadığı gözlemlendi. P53 boyanmasının yoğunluğu Tablo 5'de özetlendi.



Grafik 4. Ependimoma subtiplerinde hücre yoğunluğuna göre p53 boyanma dağılımı.

Tablo 5. Ependimoma subtiplerinde hücre yoğunluğu temelinde p53 boyanma dağılımı. Grade I tümörlerin tümünde ve grade II'lerin çoğunda immünreaktivite yok.

Grade	n	0	1+	2+	3+
Sub.ep.	2	2	0	0	0
Myx.ep.	3	3	0	0	0
Grade II	13	11	2	0	0
Grade III	15	10	4	0	1
Total %		78.8	18.2	0	3

4- İstatistiksel analiz bulguları

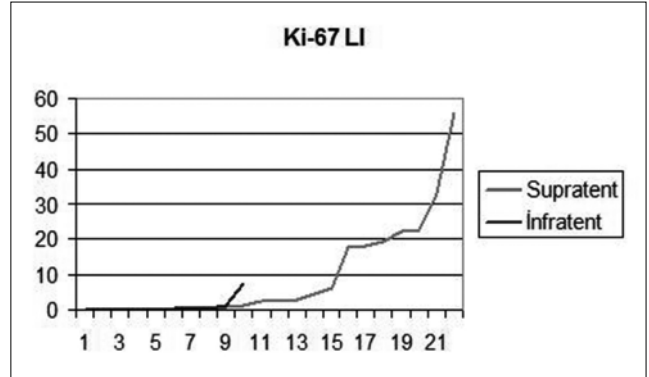
P53 değeri ile gradeler arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.496$). Ki-67 ve grade eşleştirmesinde $p=0.064$ değeri zayıf da olsa anlamlı kabul edildi. Ki-67 LI ve mitoz, dansite, atipi gibi histopatolojik özellikler arasındaki ilişkide p değeri mitoz ve atipi için anlamlı idi (Tablo 6) ancak dansite korelasyon göstermedi. MIB-1 LI ve nekroz kıyaslamasında da ilişki bulunmadı. Atipi, nekroz, mitotik aktivite ve dansite ile grade arasındaki ilişkide tüm p değerleri anlamlı bulundu (Tablo 7). Postoperatif klinik bilgisine ulaşabildiğimiz on hastanın sağ kalım süreleri 39-146 hafta arasında değişmekte idi. En kısa ölüm süresi 14, en uzun ise 30 hafta olduğu görüldü. Sağ kalanlar ve ölenler arasındaki korelasyon anlamlı bulundu ($p=0.0176$). Supratentorial ve infratentorial yerleşimli tümörlerin Ki-67 LI değerlerinin kıyaslaması anlamlı bulundu ($p=0.0012$ /Grafik 5). Aynı test ile yapılan 18 yaş altı-üstü hastaların Ki-67 LI değerleri arasında ilişki saptandı ($p=0.0018$ /Grafik 6).

Tablo 6. Ki-67 LI ve histolojik parametreler arasındaki P değerleri

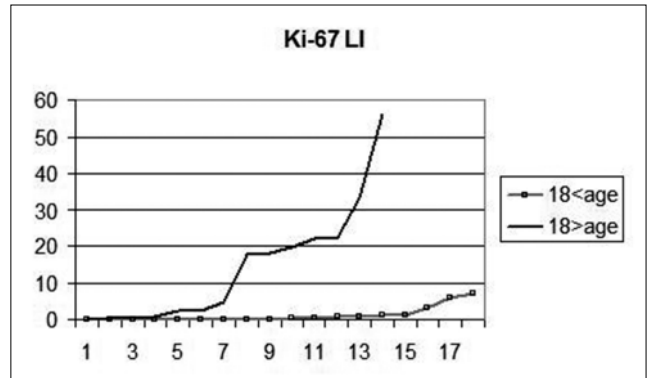
Histolojik parametreler	p değeri
Atipi	0.0163
Mitoz	0.0486
Nekroz	0.2216
Dansite	0.7916

Tablo 7. Histolojik parametreler ve grade arasındaki P değerleri

Histolojik parametreler	p değeri
Atipi	0.0003
Nekroz	0.0011
Mitoz	0.0044
Dansite	0.0000



Grafik 5. Supratentorial ve infratentorial ependimomaların LI değerleri. Supratentorial neoplazmlar yüksek LI değeri gösteriyor



Grafik 6. 18 yaş altı/üstü hastaların LI değerleri. 18 yaş altı hastalarda yüksek LI değeri dikkati çekmekte.

Tartışma

Ependimal neoplazmlar ventriküler sistemin her yeriyile ilişkili olabilen, morfolojik olarak farklı şekillerde ortaya çıkan sık görülmeyen tümörlerdir. Çocuklarda daha sık olmakla birlikte erişkinler de etkilenebilir (1-5,13). Histolojik subtiplerle prognoz arasındaki ilişkinin varlığı ependimomaların biyolojik heterojen bir grup olduğunu

desteklemektedir. Histolojik gradeleme, prognoz tahmininde ve tedavi planı oluşturmada değerli bilgiler sağlar. Fakat, borderline lezyonlar ile küçük steriotaksik biyopsilerin doğru tanımlanmasında ve derecelendirmesinde proliferatif indeks gibi daha objektif kriterlere ihtiyaç vardır (5-12).

Çalışmamızı 2 subependimoma, 3 mikropapiller ependimoma, 13 grade 2 ependimoma ve 15 anaplastik ependimoma olmak üzere toplam 33 hasta oluşturmaktadır. Olgularımız 1-70 yaşları arasında olup 24 yaş ortalaması ve K/E=1.06 oranını Zülch ve Schiffer'in serileri ile uyumluluk göstermektedir (2,5). Anaplastik varyant yayınlarda en fazla %25 oranında iken bizde %46 gibi çok yüksek bir değerdedir. Bunun nedeni Nörolojik Bilimler Enstitüsü'nün tüm ülke çapındaki beyin tümörü olgularına cevap veren bir merkez konumunda olması ve hastaların sosyoekonomik, kültürel seviyelerinden dolayı hastalıklarının son aşamalarında gelmeleri olabilir.

Bir çok araştırmacı Ki-67 proliferatif indeks ve grade arasında istatistiksel olarak ilişki tespit etmişler, bazı yazarlar prognoz ile korelasyon saptarken bir kısmı böyle bir korelasyon bulamamışlardır (6-12,21-29). Prayson ve arkadaşları (9) 61 ependimoma olgusuna uygulanan MIB-1 immünohistokimya çalışmasında; MIB-1 indeksinin tümörün biyolojik davranışında önceden belirleyici olmadığını, mitotik figür, sellülarite, vasküler proliferasyon ve nekrozun agresif davranışta daha yardımcı olduğunu, MIB-1 seviyesinin dördün üzerinde olan hastalarda fatalite ve rekürrensini daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Olgularımızda Ki-67 LI %0-56 arasında olup ortalama 6.90'dır. grade 1 ve grade 2 arasında ortalama Ki-67 LI değeri 14.17'dir. Subependimomalar ortalama 0.65 LI değeriyle diğer serilerle (6,7) uyumluluk gösterirken, anaplastik ependimomalarda farklı sonuçlar vardır. Ortalama Ki-67 LI değeri Eva Karamitopolou ve arkadaşlarının (6) çalışmasında 6.89, Rushing ve arkadaşlarının (13) çalışmasında %14, Schröder ve arkadaşlarının (14) %9.5 olarak bildirilmiştir. Ancak grade 3 hasta sayıları incelendiğinde sırasıyla 1,2 ve 4 olduğu görülmektedir. Onbeş grade 3 ependimoma olgumuz göz önüne alındığında sonuçlarımızın daha tutarlı ve istatistiksel olarak daha anlamlı olduğu inancındayız. Kruskal-Wallis non parametrik testi ile yapılan grade 3 ependimoma ve Ki-67 LI korelasyonunda bulduğumuz $p=0.0646$ değeri sınırda bir anlam ifade etmekle birlikte grade 1 ve Ki-67 LI arasında ilişki bulunamadı. Bunun nedeni olasılıkla grade 1 tümörün sınırlı sayıda olmasıdır.

Subependimoma ve mikropapiller ependimomalar WHO sınıflamasına göre grade 1 ile uyumlu olup biyolojik olarak benign kabul edilir. Patologlar arasında bu neoplazmların agresif davranışını yönlendirecek, anaplastik özelliği önceden kestirecek kriterler üzerinde genel bir görüş yoktur.

Mikropapiller ependimoma olgularımızın Ki-67 LI %0-7.2 arasında olup ortalama 2.5 LI değeriyle subependimomaların dört katıdır. Dikkat çekicidir ki, Ki-67 LI 7.2 olan 24 yaşındaki bir kadın hastamız operasyon sonrası 22. haftada hastalığı nedeniyle hayatını kaybetmiştir. İmmünekspresyon göstermeyen diğer mikropapiller ependimoma hastası halen sağ olup 146 haftalık sağ kalımla hala hayattadır. Prayson ve arkadaşlarının (29) yaptığı on dört olgulu mikropapiller ependimoma çalışması MIB-1 LI'nin tümör rekürrensini önceden kestirmede faydalı olmayacağını göstermiştir.

Çalışmamızda MIB-1 LI ile mitotik aktivite ve nükleer atipi arasında güçlü korelasyon saptarken, nekroz ve dansiteyi içeren histopatolojik özellikler arasında anlam bulunamadı. Rushing ve arkadaşlarının (7) çalışmasında her dört parametre ile MIB-1 LI arasında ilişki mevcuttur. Sellülarite ile MIB-1 LI arasında ilişki kurulamayışı fokal proliferatif aktivite ile açıklanabilir. Nekroz ile MIB-1 LI uyumsuzluğu belki de biyolojik davranış farklılığından kaynaklanmaktadır.

Toplam 33 ependimoma olgumuzun dokuz tanesi Ki-67 immünreaktivitesi göstermedi. Bir olgu yaygın nonspesifik zemin boyanması nedeni ile çalışmaya dahil edilmedi. Ki-67 LI değerlerindeki değişkenliğin (%0-56) bu kadar yüksek olması tümörlerdeki proliferatif aktivite ile açıklanabilir.

Otuzüç olgumuzun yalnızca on tanesinin postoperatif sağkalım bilgisine ulaşılabildiği olup her gradede yeterli sayı bulunmadığından sağkalım analizi yapılamadı. Gliomların malign biyolojik davranışı sadece proliferatif potansiyele bağlı değildir. Bu amaçla yaş ve lokalizasyona göre MIB-1 LI değerleri ve 18 yaş altı-üstü hastaların Ki-67 LI değerleri karşılaştırıldı. Proliferatif aktivite supratentorial lokalizasyonda ve 18 yaş altı çocuklarda Schröder ve arkadaşlarının (8), Nazar ve arkadaşlarının (28) sonuçlarıyla uyumlu olarak çok yüksekti. Jaing ve arkadaşları (26) cerrahi rezeksiyon boyutu ve yaşın istatistiksel olarak anlamlı prognostik faktörler olduğunu gösterdi. Ancak bazı hastaların kemoterapiye iyi cevap verip vermemeleri ya da adjuvan terapiye ihtiyaç duyup duymamaları açık değildir. Bu soruların cevabı için daha ileri araştırmalar gerekmektedir.

Wolfsberger ve arkadaşları (11) Ki-67 LI'nin intrakranial ependimomalı hastalarda bağımsız bir prognostik faktör

olduğunu ve seyrin doğru tahmininde önemli olduğunu gösterdi. Nitekim ölen ve sağ kalan olgular arasındaki farklılık ölçüldüğünde anlamlı sonuç bulundu ($p=0.0176$). Ama uzun dönem takibini yapabileceğimiz her gradede yeterli sayıda hastaya ihtiyacımız olduğu aşikardır.

Bcl-2 proteini hücre ömrünü uzatan ve apoptozisi azalttığı bilinen bcl-x, bax, mcl-1 ve A-1 içeren protoonkogen ailesinin bir üyesidir. Beyin tümörlerinde bcl-2 sıklıkla ekspresyon edilir. Ekspresyonun sıklığı tümör hücrelerinin nonneoplastik kompartmanının nötral koruyucusu ile doğru orantılıdır. Örneğin ependimal hücreler ve Schwann hücreleri normalde bcl-2 ekspresyon ederler ve aynı dokuların neoplastik lezyonlarında da sıklıkla bcl-2 pozitifdir. Koroid pleksus papillomları da genellikle bcl-2 pozitifdir. Astrositik tümörler ve meningiomlar gibi diğer beyin tümörleri nisbeten daha düşük bcl-2 pozitifitesi gösterirler. Bu durum normal astrosit ve meningotelyal hücrelerin negatif bcl-2 yapısını yansıtır. Dikkate değer bir nokta da reaktif astrositler ve araknoid kistteki bazı meningotelyal hücrelerde bcl-2 bulunmasıdır. Mekanizması bilinmese de bcl-2 negatif bir kısım hücre en azından özel durumlarda (iskemik beyin hasarı) protein ekspresyon edebilecek bir potansiyele sahiptir (2,3,14,17).

Bcl-2 ekspresyonu gliomlarda malignite ile doğru orantılıdır.. Çalışmamızda grade ile bcl-2 ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki saptanamadı ($p=0.271$).

Rushing (7) ve Nakasu (16) önderliğindeki araştırmalarda da korelasyon bulunmadığı rapor edilmiştir. Dikkatimizi çeken bir başka nokta grade 1 ependimomaların düşük proliferasyon oranına (ortalama LI %1.76) sahipken güçlü bcl-2 ekspresyonu gösterdiğiidir. Bu yolla düşük gradedeki ependimal hücreler devamlılıklarını sürdürebilmek için aşırı bcl-2 ekspresyonuna yol açarak kendilerini apoptozdan koruyor olabilirler.

Bcl-2 proteini, neoplastik hücreleri radyoterapi ve kemoterapinin neden olduğu apoptozdan korurlar. Bu da tümörün tedaviye vereceği cevabı büyük ölçüde etkiler. Nitekim bcl-2 değeri 3+ olan kauda equina lokalizasyonlu bir hastamız radyoterapi almış ve yirmiiki hafta sonra ölmüştür. Bcl-2 ekspresyon eden malign gliomlar hem tedaviye dirençlidir hem de erken rekürrens gösterirler. Rekürren tümörlerdeki bcl-2 ekspresyonu ilk tümöre göre artmıştır. Bunun muhtemel nedeni; ya başlangıçta bcl-2 vardır ya da tedavi bcl-2 nin artmasına yol açıyordur (16). Bu nedenle rutin olarak glial tümörlerde bcl-2 ekspresyonunun tespiti tedaviyi yönlendirmede ve dolaylı olarak prognozu tahmin etmede yararlı olabilir.

Sıklıkla astrositik tümörlerde mutant gen olarak tespit edilen p53'ün insan kanserlerinin bir çoğunun gelişmesinde kritik rol oynadığı bilinir ama ependimomaların tümörogenesinde kesin olmayan bir rol oynar. Rushing (7), Suzuki (10), Saini (30) ve arkadaşları malignitenin histolojik derecesi ile p53'ün ilişkili olduğunu gösterdi. Bizim çalışmamız ependimomalarda p53 ekspresyonunun varlığını doğruladı ancak daha önceki araştırmaların sonuçlarından farklı idi. Biz p53 ekspresyonunu anaplastik ependimomalarda %33.4, tüm olgularımızda ise %21 tespit ettik. Grade 1-2 ve p53 arasında istatistiksel anlam yoktu, çünkü p53 her gradede genelde 0 değerinde kümelenmişti. Kaybedilen 2 tane anaplastik ependimoma olgusunun p53 değerlerinin 3+ ve 0, sağkallımlarının ise sırasıyla 30 hafta ve 14 hafta olması bize bu tümörlerin biyolojik olarak farklı davranış biçimlerinde olabileceğini düşündürdü. Korshunov ve arkadaşları (31) grade, hasta yaşı, lokalizasyon ve tümörlerin diferansiasyonuna göre gen ekspresyon paternlerini gösterdi. Çalışmanın sonuçları biyokimyasal yollarda özellikle ependimomaların patogenezinde yeni bakış sağladı ve moleküler olarak farklı hastalıklardan oluştuğunu destekledi. Beyin tümör kayıtlarına göre 103 olguluk Japon serisinde on yıllık sağ kalım ependimomalar için %68.3, anaplastik ependimomalar için ise %9.5 olarak raporlandı (32).

Ependimomaların onkogenezi henüz astrositik tümörler kadar aydınlanmış değildir. P53 gen mutasyonu anaplastik astrositlerde %35, GBM'de %24, oligodendrogliomlarda %1.1, medulloblastomlarda %0.8 olarak bulunmuştur (33). Ling-Ling ve arkadaşları (19) ependimomalarda diğer SSS tümörleri gibi sık p53 mutasyonu tespit etmediklerini bunun da ependimal tümörlerin patogenezinde ve progresyonunda tanımlanmayan yolların varlığını desteklediğini raporladılar.

Bizim sonuçlarımız yüksek MIB-1 ve p53 immünekspresyonunun high grade ependimomalarda objektif bir indikatör olabileceğini gösterdi. Bu bulgular literatürle uyumlu idi ve ependimomaların biyolojik davranışına ileride ışık tutabilecek veriler içermekteydi. Aynı zamanda intrakranial ependimomalarda Ki-67 indeksinin değerlendirilmesinin rutin tanı sonrasında hastalığın seyrini tahminde faydalı olabileceğini de gösterdi.

Teşekkür

Yazarlar eşsiz istatistik analizleri için Nural Bekiroğlu'na ve immünohistokimya eksperliği için Eser Ömeroğlu'na teşekkür ederler.

Kaynaklar

1. Duncan JA, Hoffman HJ, Kaye AH, Lows ERJ. Intracranial ependymomas. In: Brain Tumors. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1995:493-504
2. Zülch KJ. Brain Tumors. In: Their Biology and Pathology. 3rd edition Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1986:228-247
3. Black PM, Loeffler JS. Pathogenic Mechanisms of Nervous System. In Cancer of the Nervous System, Blackwell Science Inc, Edinburgh, 1997:703-743
4. Schiffer D. Brain Tumors Biology, Pathology and Clinical References, 2nd edition Springer, Berlin 1997:112-146
5. Schiffer D, Chio A, Giordana MT, Migheli A, Palma L, Pollo B, Histologic, prognostic factors in ependymoma. Child Nerv Sys 1991;7:177-182
6. Karamitopoulou E, Perentes E, Diamantis I, Maraziotis T, Ki-67 immunoreactivity in human central nervous tumors. a study with MIB-1 monoclonal antibody an archival material. Acta Neuropathol 1994;87:47-54
7. Rushing E, Brown D, Hladik C, Risser R, Mickey B, White C. Correlation of bcl-2, p53 and MIB-1 expression with ependymoma grade and subtype. Mod Pathol 1998;5:464-470
8. Schröder R, Planer C, Ernetes R. The growth potential of ependymomas with varying grades of malignancy measured by the Ki-67 LI and MI. Neurosurgery Rev,1993;16:145-150
9. Prayson RA. Clinicopathologic study of 61 patients with ependymoma including MIB-1 immunohistochemistry. Ann Diag Pathol. 1999;3:11-18
10. Suzuki S, Oka H, Kawano N, Tanaka S, Utsuki S, Fujii K. Prognostic value of Ki-67 (MIB-1) and p53 in ependymomas. Brain Tumor Pathol.2001;2:151-154.
11. Wolfsberger S, Fischer I, Hoftberger R, Birner P, Slavc I, Dieckmann K et al. Ki-67 immunolabeling index is an accurate predictor of outcome in patients with intracranial ependymoma. Am J Surg Pathol. 2004;7:914-920.
12. Suri VS, Tatke M, Singh D, Sharma A. Histological spectrum of ependymomas and correlation of p53 and Ki-67 expression with ependymoma grade and subtype. Indian J Cancer. 2004;2:66-71.
13. Feltbower RG, Picton S, Bridges LR, Crooks DA, Glaser AW, McKinney PA. Epidemiology of central nervous system tumors in children and young adults (0-29 years), Yorkshire, United Kingdom. Pediatr Hematol Oncol. 2004;7:647-660.
14. Fisher DE. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. Cell 1994;78:539-542
15. Chamberlain MC. Ependymomas. Curr Neurol Neurosci Rep. 2003;3:193-199.
16. Nakasu S, Nakasu L, Nioka H. Bcl-2 protein expression in tumors of the central nervous system. Acta Neuropathol.(Berl)1994;88:520-526
17. Keer JFR, Winterford CM and Horman BV. Apoptosis. Cancer 1994; 73:2013-2025
18. Hallstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. Science 1991;253:49-53
19. Ling Ling H, Chang-Feng H, Li-Yu W, Chien-Jen C. p53 gene mutations in brain tumors in Taiwan. Cancer Letters 1994;78:25-32
20. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. Histological Typing of Tumors of the CNS. WHO International Histological Classification of Tumors 2000. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York
21. Figarella-Branger D, Civatte M, Bouvier-Labit C, Gouvernet J, Gambarelli D, Gentet JC et al. Prognostic factors in intracranial ependymomas in children. Neurosurg. 2000; 4:605-613.
22. Korshunov A, Golanov A, Timirgaz V. Immunohistochemical markers for prognosis of ependymal neoplasms. J Neurooncol. 2002;3:255-270.
23. Paulino AC, Wen BC, Buatti JM, Hussey DH, Zhen WK, Mayr NA et al. Intracranial ependymomas: an analysis of prognostic factors and patterns of failure. Am J Clin Oncol. 2002;2:117-122.
24. Van V-Vincent ML, Pierre-Kahn A, Kalifa C, Sainte-Rose C, Zerah M, Thorne J et al. Ependymoma in childhood: prognostic factors, extent of surgery, and adjuvant therapy. J Neurosurg. 2002;4:827-835.
25. Zamecnik J, Snuderl M, Eckschlager T, Chanova M, Hladikova M, Tichy M et al. Pediatric intracranial ependymomas: prognostic relevance of histological, immunohistochemical, and flow cytometric factors. Mod Pathol 2003;10:980-991
26. Jaing TH, Wang HS, Tsay PK, Tseng CK, Jung SM, Lin KL et al. Multivariate analysis of clinical prognostic factors in children with intracranial ependymomas. Neurooncol. 2004;3:255-261.
27. Korshunov A, Golanov A, Sycheva R, Timirgaz V. The histologic grade is a main prognostic factor for patients with intracranial ependymomas treated in the microneurosurgical era: an analysis of 258 patients. Cancer 2004;6:1230-1237
28. Nazar GB, Hoffman HJ, Becker LE. Infratentorial ependymomas in childhood: prognostic factors and treatment. J Neurosurg. 1990;72:408-417
29. Prayson RA, Myxopapillary ependymomas: a clinicopathologic study of 14 cases including MIB-1 and p53 immunohistochemistry. Mod Pathol Apr 1997;10:4, 304-310
30. Saini Y, Niemela A, Kamel D, Herva R, Bloigu R, Paakko P. p53 immunohistochemical positivity as a prognostic marker in intracranial tumors. APMIS 1994;102:786-92
31. Korshunov A, Neben K, Wrobel G, Tews B, Benner A, Hahn M et al. Gene expression patterns in ependymomas correlate with tumor location, grade, and patient age. Am J Pathol. 2003;163:1721-1727.
32. The Committee of Brain Tumor Registry of Japan (1993) Brain Tumor Registry of Japan, Vol 8: National Cancer Center, Tokyo
33. Tominigo T, Kayama T, Kumabe T, Sonado Y, Yashimoto T. Anaplastic ependymomas clinical features and tumor suppressor gene p53 analysis. Acta Neurochir. (Wien)1995;135:163-170