

Mide adenokarsinomlarında CD44 ve Ki67 ekspresyonu (klinikopatolojik parametrelerle korelasyon)

CD44 and Ki67 expression in gastric adenocarcinomas (correlation with clinicopathologic parameters)

D. Sema ARICI, Fügen KIVANÇ, Hatice ÖZER, Reyhan EĞİLMEZ, Şahande ELAGÖZ

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

ÖZET

CD44 tümör yayılımı ve metastazında önemli olan bir adezyon molekülüdür. Gastrointestinal sistem tümörleri yanı sıra akciğer, serviks, karaciğer gibi farklı organ tümörlerinde CD44 ekspresyon özelliği araştırılmıştır. Araştırmalar sonucunda CD44'ün prognostik değeri ile ilgili farklı veriler elde edilmiştir. Ki67 ise, hücrelerin proliferatif aktivitesini belirleyen ve tümörlerde prognoz hakkında yardımcı olabilen bir belirleyicidir. Bu çalışmada amaç, CD44 ile Ki67'nin mide kanserindeki ekspresyonlarının yanı sıra grade, invazyon derinliği, lenf bezi metastazı ve damar invazyonu gibi klinikopatolojik parametrelerle olan ilişkilerini araştırmaktır. Mide adenokarsinomu tanısı almış 48 dokuya immünohistokimyasal olarak CD44 boyası uygulanmıştır. Klinikopatolojik parametrelerle CD44 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki tespit edilmezken, grade arttıkça CD44 ve Ki67 ekspresyonunda artış saptanmıştır. CD44 ve Ki67'nin mide kansinomunun diferansiyasyonunu yorumlamada yardımcı olabilecekleri düşünülmekle birlikte kanserin ilerlemesi ve yayılımında rollerinin olmayabileceği düşünülmüştür. Bununla birlikte CD44'ün mide kansinomu ilerlemesi ve yayılımındaki rolünü belirlemek için daha fazla çalışmalara gerek vardır.

Anahtar sözcükler: Mide adenokarsinomu, CD44, Ki67, immünohistokimya

ABSTRACT

CD44, a cell adhesion molecule, has been proposed to be important in promoting tumor progression and dissemination. There are many studies about expression of CD44 in many tumors such as gastrointestinal tract, lung, cervix, and liver. Different data have been found about CD44 expression. Ki67 is an indicator that is used to predict the proliferative capacity as well as the prognosis of tumors. The aim of this study was to investigate the expression of CD44 and Ki67 in gastric carcinoma and their relationship between clinicopathologic parameters such as grade, depth of invasion, lymph node metastases and vascular invasion. Immunohistochemical study for CD44 was carried out in 48 formaldehyde fixed, paraffin embedded sections of gastric carcinoma. The results showed that, CD44 and Ki67 did not correlate with the clinicopathologic parameters except grade. High levels of CD44 and Ki67 expressions observed with higher grades. It is concluded that CD44 and Ki67 may be related with the differentiation of gastric carcinoma however they are not correlated with the tumor progression and dissemination. However further studies are required to understand the role of CD44 in metastases and progression of gastric carcinoma.

Key words: Gastric adenocarcinoma, CD44, Ki67, immunohistochemistry

GİRİŞ

Mide kanserleri sık görülmeleri ve kanserden ölüme ilk sıralarda yer almaları nedeniyle

önemli tümörlerdir. Bu tümörlerin lokal invazyon ve metastaz yapma potansiyelleri yüksektir ve bu özellikleri birçok moleküler olaya bağlıdır (1,2). Son yıllarda gastrointestinal tümörlerde onkogeneze ve metastaz ile ilgili moleküler mekanizmalar üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır (1,3-5).

CD44 ilk kez lenfositler üzerinde belirle-

Bu çalışma 18. Ulusal Patoloji Sempozyumunda (07-11.05.2006, Çeşme) poster bildirisi olarak sunulmuştur.

Yazışma adresi: Dr. D. Sema Arıcı, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, 58140, Sivas

nen ve hücrelerin adezyonu ve göçünde önemli fonksiyonlara sahip hücre membran molekülüdür. İlk 5 eksonu hemopoetik hücreler tarafından eksprese edilir ve ürünleri standart tip olarak bilinir. CD44 standart formu (CD44s) pek çok epitel ve epitel olmayan doku tarafından eksprese edilir. Altıncı eksondan 15'e kadar olanlar ise, CD44 varyantları olarak bilinir ve v1'den v10'a kadar değişen isimlerle tanımlanır. Gerek CD44s, gerekse varyantları birçok tümörde araştırılmış ve tümör invazyon ve metastazı ile ilgili olarak farklı sonuçlar alınmıştır (2,4,5,9). Mide kanserlerinde özellikle normal mide mukozasında CD44s tipinin inflamasyonla ilişkili olarak, varyantlarının ise tümörlerde daha fazla eksprese edildiği belirtilmektedir. Yapılan çalışmalarda akciğer, kolon, özofagus, karaciğer, serviks ve mide kanserlerinde CD44 ekspresyonunun tümörün ilerlemesi ve metastazında ve prognozunda önemi vurgulanmıştır (4,5,7,10,11). Çoğalan hücrelerin daha fazla CD44 eksprese ettiği belirtilmektedir. Özellikle tamir, organogenez, anjiyogenez gibi olaylarda çoğalan hücrelerde daha fazla CD44 ekspresyonu bulunmuştur (4).

Ki67 patolojide sık kullanılan özellikle tümörlerde prognostik değeri araştırılan bir proliferasyon belirleyicisidir. Akciğer, beyin, serviks, prostat ve mide kanserlerinde Ki67'nin prognostik değeri ile ilgili yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar alınmıştır. Bu nedenle Ki67'nin prognostik değeri halen sorgulanmaktadır (12,13).

Bu çalışmada mide tümörlerinde CD44 ve Ki67'nin immünohistokimyasal olarak ekspresyonları araştırılmıştır. Gerek CD44 gerekse Ki67 ekspresyonu ile tümörün grade'i, invazyon derecesi, lenf bezi metastazı, damar invazyonu gibi klinikopatolojik parametrelerle ilişkilerine bakılmıştır. Ayrıca, CD44 ekspresyonu ile Ki67 arasında ilişki olup olmadığı değerlendirilmiştir. Özellikle CD44'ün mide tümörlerinde rutin uygulamada prognoz açısından yol gösterici olup olamayacağı belirlenmeye çalışılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, 2002-2006 yılları arasında Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda gastrektomi materyalinde mide adenokarsinomu tanısı almış 48 olgu dahil edildi. Olgular seçilirken normal mide mukozası ile tümör komşuluğu olan dokular tercih edildi. Olgular grade, lenf bezi metastazı, seroza ve damar invazyonu açısından değerlendirildi.

Parafine gömülü formalinle fikse edilmiş dokular 4µm kalınlığında kesilerek deparafinize ve rehidrate edildikten sonra, mikrodalga yöntemi ile antijen ortaya çıkarma işlemi yapıldı. İmmünohistokimyasal olarak Avidin biyotin peroksidaz yöntemi kullanıldı (Lab Vision, cat: TA-125-UB). Nonspesifik çevre boyanmasının engellenmesi amacıyla 10 dakika %3'lük hidrojen peroksit inkübasyonu yapıldı. Daha sonra 5 dakika süre ile PBS solüsyonu ile yıkama yapıldı. CD44std/HCAM (Lab Vision, Clone 156-3C11) ve Ki67 (Lab Vision, Clone SP6) monoklonal antikoru uygulandı. Tekrar PBS ile yıkamanın ardından sekonder antikor (Lab Vision, TP-125-BN) ve ardından Avidin Biotin Kompleks uygulandı (Lab Vision, TS-125-HR). PBS ile tekrar yıkandıktan sonra AEC kromojen damlatıldı (Lab Vision, TA-060-HA). Tüm kesitlere Mayer Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

CD44 boyanma özellikleri Setala ve ark.'larının kriterleri esas alınarak değerlendirildi (6). Buna göre tümöral hücre membranında pozitiflik varsa CD44 pozitif olarak kabul edildi. %1'den az boyanan tümörler negatif olarak kabul edilirken, CD44 pozitif boyanan hücreler daha sonra pozitif boyanma oranına göre %1-10, %11-50 ve %51-100 şeklinde 3 gruba ayrıldı. %1-10 boyananlar (+), %11-50 olanlar (++), %51'den fazla boyananlar ise (+++) olarak değerlendirildi. Ayrıca, boyanma yoğunluğuna göre zayıf, orta şiddette veya şiddetli olarak değerlendirme yapıldı. Stromada bulunan lenfositlerin boyanması, pozitif internal kontrol olarak alındı. Ki67 indeksini değerlendirmek için boyanma yoğunluğu fazla olan 10 büyük büyütme

alanında (BBA) 1.000 hücre sayıldı.

CD44 ve Ki67 ile grade, damar ve seroza invazyonu, lenf bezi metastazı arasındaki ilişkinin anlamlılığı, istatistiksel olarak Spearman korelasyon testi ile değerlendirildi ve $p < 0.05$ ise ilişki anlamlı kabul edildi.

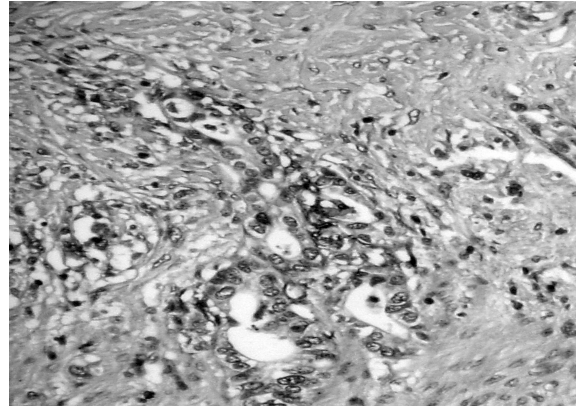
BULGULAR

Olguların 30'u erkek, 18'i kadın hasta olup yaş ortalaması 66,9'du. Histopatolojik inceleme sonucuna göre olguların tümü intestinal tipte adenokarsinom idi. On dört olgu (%29.1) grade 1, 19 olgu (%39.5) grade 2, 15 olgu (%31.2) grade 3 olarak belirlendi. Seroza invazyonu 40 olguda (%83) izlenirken, 8 olgu (%17) mükülaris propriya'da sınırlıydı. Mukozada sınırlı olan olgu yoktu. Lenf bezi metastazı 35 olguda (%72) tespit edilirken, 13 olguda (%28) izlenmedi. Damar invazyonu 23 olguda (%48) pozitifken, 25 olguda (%52) tespit edilmedi.

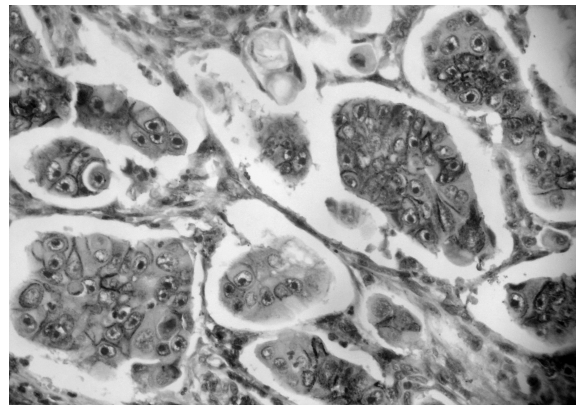
Tüm olgular içerisinde 23 olgu CD44 pozitif olarak boyandı. Bunlardan 15'i (+) oranında boyanma özelliği gösterirken, 8 olguda (++) boyanma izlendi. (+++) şiddetinde boyanma hiçbir olguda izlenmedi. Tümör hücrelerde boyanma genelde orta şiddettedir. Tümöre komşu mukozada glandlarda %1'den az olacak düzeyde hafif soluk boyanma izlenirken, lenfositlerde kuvvetli boyanma tespit edildi. Olguların CD44 pozitif ve negatif boyanma sonuçları ile grade, seroza invazyonu, lenf bezi metastazı

ve damar invazyonu arasındaki sayısal ilişki Tablo 1'de verilmektedir. Buna göre grade 1 olguların 2'si (%14.2) (Resim 1), grade 2 olguların 11'i (%57.9), grade 3 olguların ise 10'u (%66.7) (Resim 2) pozitif boyandı. CD44 ekspresyonu ile grade arasında istatistiksel olarak orta şiddetle anlamlı ilişki saptandı ($r=0.40$, $p < 0.05$). Seroza invazyonu gösteren 40 olgunun 20'sinde (%50) CD44 pozitif boyandı ($r = 0.04$). Lenf bezi metastazı yapan 35 olgunun 18'inde (%51.4) CD44 pozitif ($r=0.13$). Damar invazyonu olan 23 olgunun 10'unda (%43.4) CD44 pozitif boyandı ($r=0.06$). Seroza invazyonu, lenf bezi metastazı ve damar invazyonu ile CD44 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı ($p > 0.05$).

Ki67 indeksi grade 1 olgularda %57, grade



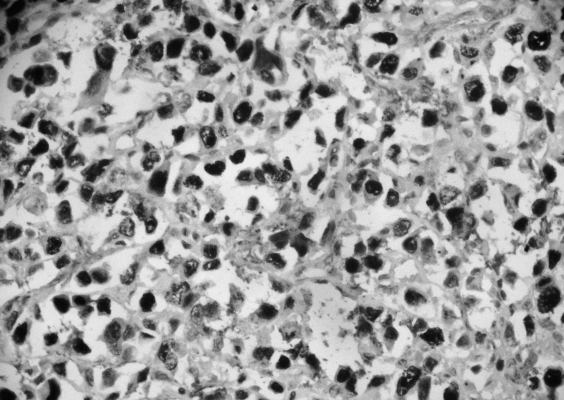
Resim 1. Grade 1 mide adenokarsinomunda glandlarda fokal CD44s pozitifliği (x50).



Resim 2. Grade 3 mide adenokarsinomunda hücrelerde membranöz CD44s pozitifliği (x50).

Tablo 1. Olguların CD44 boyanma oranlarına göre klinikopatolojik parametreler ile ilişkisi

GRADE	(n)	CD44	
		Pozitif	Negatif
	1 14	2 (%14)	12 (%86)
	2 19	11 (%57.9)	8 (%42)
	3 15	10 (%67)	5 (%33)
SEROZA İNVAZYONU			
	Var 40	20 (%50)	20 (%50)
	Yok 8	3 (%37.5)	5 (%62.5)
LENF BEZİ METASTAZI			
	Var 35	18 (%51.4)	17 (%48.5)
	Yok 13	5 (%38.4)	8 (%61.5)
DAMAR İNVAZYONU			
	Var 23	10 (%43)	13 (%57)
	Yok 25	12 (%48)	13 (%52)



Resim 3. Grade 3 mide adenokarsinomunda nükleer Ki67 pozitifliği (x50).

2 olgulara %63 ve grade 3 olgulara %71 (Resim 3) olarak tespit edildi. Ki67 ile grade arasında istatistiksel olarak orta şiddette, anlamlıya yakın ilişki ($r=0.28$, $p=0.05$) tespit edilirken, sırasıyla seroza ve damar invazyonu ve lenf bezi metastazı ile Ki67 arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı ($r=0.06$, $r=0.18$, $r=0.16$, $p>0.05$). CD44 ekspresyonu ile Ki67 arasında da istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edildi ($r=0.40$, $p<0.05$).

TARTIŞMA

CD44, hücre-hücre ve hücre-matriks ilişkisini sağlayan bir transmembran glikoproteinidir. Ekstrasellüler matrikste bulunur ve hyalüronik asit ile iletişime geçerek adezyon özelliklerini yerine getirir. Hyalüronik asit, tümör kitlesi ve konak doku arasındaki yüzeyde sıklıkla bulunan ekstrasellüler matriksin glikozaminoglikan komponentidir. Tümör hücrelerinin invazyonunda önemli rol oynar ve invazyonda birkaç mekanizma aracılık eder. Hyalüronik asitin hidrasyonu sonucu kitlesi artar, ekstrasellüler matriksi gevşetir ve migrasyonu kolaylaştırır. Ayrıca, hyalüronik asitin adezyon molekülü ile etkileşimi sonucu tümör hücre migrasyonu stimüle edilir. CD44, hyalüronik asitin reseptörlerinden biridir. CD44'ün artmış ekspresyonu tümör hücrelerinin hyalüronik asite daha iyi tutunmasını sağlayarak tümör hücresinin implantasyonuna yardım eder. CD44 ekspresyon paterninde olu-

şan değişiklikler epitelde ve mezenkimal yapılarda normal ilişkinin bozulmasına, fonksiyonel ve yapısal düzensizliklere neden olur. Metastatik yolda CD44 molekülü farklı fazlarda etkili olur. Hücrelerin adeziv özelliklerini değiştirebilir, lenfatik veya damarlara olan göçe etki edebilir veya hücrelerin birikimler yapması yoluyla emboli oluşumuna yol açabilir. CD44'ün bütün özelliklerini yerine getiren tek bir tipi tanımlanamamıştır, farklı tipler bu etkileri gerçekleştirir. Tüm tipler için belirtilen ortak tek yol, CD44 ekspresyonunun malign tümörlerde ekspresyon paternini değiştirmesidir. CD44'ün ekspresyonu akciğer, kolon, özofagus, meme, serviks ve karcin ve mide kanserlerinde araştırılmış ve tümörün ilerlemesi ve metastazında önemli olduğu sonucuna varılmıştır (4-7,10,11).

CD44s tipi olarak bilinen standart şeklinin kaybı, birçok organda neoplastik dönüşüm ile ilişkili bulunmuş ve agresif gidişten sorumlu tutulmuştur. CD44s'te kayıp olduğunda tümörlere göre değişebilen farklı varyantlarının ortaya çıktığı çalışmalarda gösterilmiş ve malign hücrelerin bu varyantları eksprese ettiği saptanmıştır. Malign tümörlerde önemli olan ve özellikle prognozun belirleyicisi olarak kabul edilen olay invazyon ve metastazdır ve CD44 bu olayın içinde önemli sayılan adezyon molekülüdür. CD44 kaybı hücre-hücre adezyonunda kayıp, bazal membranda ayrılma ve hücrelerin invazyonu gibi olayları kolaylaştırdığı için malign tümörlerin kötü gidişinden sorumlu tutulmaktadır. Mide kanserlerinde yapılan çalışmalarda da invazyon derinliği arttıkça veya metastatik olaylarda, CD44 pozitifliğinin yüzdesinde de artışın olduğu belirtilmiştir. Özellikle CD44 varyantlarının aslında malign olaylarda daha fazla eksprese edildiği, CD44s tipinin ise daha çok non-neoplastik mukozada eksprese edildiğini ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır. Bunun aksine CD44s'in tümörlerde de eksprese edildiğini, invazyon ve metastaz ile ilişkili olduğunu ortaya koyan araştırmalar da bulunmaktadır (2,4,11). Liu ve ark.'larının çalışmasında ise, CD44'ün hem standart hem de CD44v6 formunun mide

kanserlerinde daha fazla eksprese edildiği ve tümörün oluşumu, metastazı ve klinik agresif davranışla ilişkili olduğu bulunmuştur. Aynı çalışmada kolorektal kanserlerde CD44s, invazyon ve metastaz ile ilişkili bulunmuş, ancak Duke evrelemesi ile ilişkili bulunmamıştır (5). Castella ve ark'ları invazyon derinliği arttıkça CD44s ekspresyonunda artış bulmakla birlikte, bu artış için istatistiksel anlamlı ilişki bulunamamıştır (11).

Burada sunulan çalışmada tümöral dokularda CD44 ekspresyonu tespit edilmiş olmakla birlikte tümörün invazyon derinliği, damar invazyonu ve lenf bezi metastazı ile CD44 ekspresyonu arasında ilişki tespit edilmemiştir. İnvasyon derinliği arttıkça CD44 ekspresyonu hafif yüksek bulunmakla birlikte, istatistiksel anlamlılık bulunamamıştır. Çalışmada normal mukozada zayıf fokal CD44s ekspresyonuna karşılık, tümöral hücrelerde daha kuvvetli ve fazla eksprese edildiği saptanmıştır. Normal mukozada olmayıp tümöral hücrelerde tespit edilmesi nedeniyle, CD44 malign transformasyonda yol gösterici olabilir. Ayrıca, çalışmada olguların grade'i arttıkça CD44s ekspresyonunda artış olması, CD44s'in mide kanserinde grade belirleme açısından da yardımcı olabileceğini düşündürmüştür. Buna karşın invazyon derinliği, damar invazyonu ve lenf bezi metastazı ile CD44 ekspresyonu arasında ilişki bulunmaması, mide adenokarsinomu invazyon ve metastazının CD44s'den bağımsız yollarla gerçekleşebileceği veya CD44'ün farklı varyantlarının etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Çoğalan hücrelerde eksprese edilen Ki67, tümörlerin prognozunu göstermede kullanılan bir proliferasyon belirleyicisidir (12). Ki67 anti-koru siklusun G1, S, G2 ve M fazlarındaki hücrelerin nükleusunda lokalize bir antijen olan Ki67 epitopuna karşı gelişir. Bazı dokularda rejeneratif veya displazi ayırımında kullanılabilmesi yanı sıra, meme tümörlerinde olduğu gibi prognoz tayininde de yardımcı olabilen oldukça geniş kullanım alanına sahip önemli bir belirleyici olması Ki67'yi çalışmaların değişmez anti-

koru haline getirmiştir (12). Mide adenokarsinomunda da prognostik önemi olduğunu ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır (12,13). Bu çalışmada, Ki67'nin grade dışında klinikopatolojik parametreler ile ilişkisi saptanmadı. Bu nedenle mide adenokarsinomunda tek başına Ki67'yi prognoz belirleyici olarak kullanmanın doğru olmadığı düşünüldü.

CD44'ün tümör oluşumundaki rolüne ait pek çok olası teori ileri sürülmektedir. Bu teorilerden biri, CD44'ün aynı zamanda hücre büyüme ve çoğalmasını da teşvik ettiği yönündedir (4). CD44'ün bu özelliği nedeniyle bu çalışmada proliferasyon belirleyicisi olan Ki67 ile CD44s ilişkisi de incelenmiştir. Ki67 ile CD44s arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmıştır ve bu sonuç, CD44'ün çoğalan hücrelerde ekspresyonunun fazla olabileceğini destekler niteliktedir.

Çalışmanın sonunda, CD44s tipinin mide kanserinde invazyon ve metastazı gösterebilecek bir belirleyici olmamakla birlikte midede tümöral gelişim ve diferansiyasyona etki edebilecek adezyon molekülü olduğu düşünülmüştür. Ki67 ise pek çok tümörde olduğu gibi, proliferatif kapasitesiyi belirlemede yardımcıdır. CD44 molekülünün invazyon ve metastaz yolundaki rollerini daha iyi belirleyebilmek için mide kanserlerinde CD44 standart tipi ile birlikte diğer varyantlarının da dahil edildiği kapsamlı çalışmanın gerektiği kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Lauwers GY. Epithelial neoplasms of the stomach. In Odze R, Goldblum JR, Crawford JM eds. Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas. Philadelphia, WB Saunders 2004. p. 409-427.
2. Chen XY, Wang Z, Li H, Cheng XX, Sun Y, Wang XW, et al. Nuclear translocations of beta catenin and TCF4 in gastric cancers correlate with lymph node metastasis but probably not with CD44 expression. Hum Pathol 2005;36:1294-1301.
3. Murai S, Umekiya T, Seiki M, Harigaya K. Expression and localization of membrane type 1 matrix metalloproteinase, CD44 and laminin chain during colorectal carcinoma tumor progression. Virchows Arch 2004;445:271-278.
4. Sneath RJS, Mangham DC. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. J Clin Pathol 1998;51:191-200.

5. Liu Y, Yan S, Jia J. Expression and significance of CD44s, CD44v6 and nm23 mRNA in human cancer. *World J Gastroenterol* 2005;11:6601-6606.
6. Setälä L, Lipponen P, Tammi R, Tammi M, Eskelinen M, Alhava E, et al. Expression of CD44 and its variant isoform v3 has no prognostic value in gastric cancer. *Histopathol* 2001;38:13-20.
7. Khoursheed M, Mathew TC, Makar RR, Sonia L, Abul H, Asfar S, et al. Expression of CD44s in human colorectal cancer. *Pathol Oncol Res* 2002;8:170-174.
8. Joo M, Lee HK, Kang YK. Expression of E cadherin, Beta catenin, CD44s and CD44v6 in gastric adenocarcinoma: relationship with lymph node metastasis. *Anticancer Res* 2003;23:1581-1588.
9. Li H, Guo L, Li JW, Liu N, Qi R, Liu J. Expression of hyaluronan receptors CD44 and RHAMM in stomach cancers: relevance with tumour progression. *Int J Oncol* 2000;17:927-932.
10. Visca P, Nonno F, Botti C, Marandino F, Sebastiani V, Tondo U, et al. Role and prognostic significance of CD44s expression in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2002;22:2671-2676.
11. Castella EM, Ariza A, Pellicer I, Fernandez A, Ojangueren I. Differential expression of CD44v6 in metastases of intestinal and diffuse types of gastric carcinoma. *J Clin Pathol* 1998;51:134-137.
12. Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception. *Histopathol* 2002;40:2-11.
13. Moundhri MS, Nirmala V, Hadabi I, Mawaly K, Burney I, Nabhani M, et al. The prognostic significance of p53, p27kip1, p21waf1, HER-2/neu, and Ki67 proteins expression in gastric cancer: A clinicopathological and immunohistochemical study of 121 Arab patients. *J Surg Oncol* 2005;91:243-252.