

P R A C E O R Y G I N A L N E  
ginekologia

## Znaczenie ekspresji antygenu Ki-67 ocenianej metodą mikromacierzy tkankowych dla rokowania u chorych z gruczolakorakiem endometrialnym endometrium

The value of Ki-67 antigen expression in tissue microarray method in prediction prognosis of patients with endometrioid endometrial cancer

Leszek Gottwald<sup>1</sup>, Robert Kubiak<sup>2</sup>, Piotr Sęk<sup>3</sup>, Janusz Piekarski<sup>3</sup>, Jarosław Szwalowski<sup>4</sup>, Grażyna Pasz-Walczak<sup>2</sup>, Michał Spych<sup>1</sup>, Jacek Suzin<sup>5</sup>, Wiesław Tyliński<sup>5</sup>, Arkadiusz Jeziorski<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Zakład Radioterapii, Katedra Onkologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polska

<sup>2</sup> Zakład Patomorfologii, Katedra Onkologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polska

<sup>3</sup> Klinika Chirurgii Onkologicznej, Katedra Onkologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polska

<sup>4</sup> Pracownia Histopatologiczna, Olympus Consilio Sp. z o.o. w Łodzi, Polska

<sup>5</sup> Klinika Ginekologii Operacyjnej i Onkologicznej, I Katedra Położnictwa i Ginekologii Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polska

### Streszczenie

**Cel pracy:** Celem pracy była ocena znaczenia rokowniczego obecności i wielkości ekspresji antygenu Ki-67 ocenianej metodą mikromacierzy tkankowych (TMA) dla przeżycia wolnego od choroby (DFS) oraz przeżycia ogólnego (OS) chorych z gruczolakorakiem endometrialnym endometrium (GEE).

**Materiał i metody:** Grupę badaną stanowiło 159 chorych. Wykorzystując metodę TMA, oceniono zależność między obecnością i wielkością ekspresji Ki-67 a DFS i OS.

**Wyniki:** Okres obserwacji wynosił 3-60 miesięcy (51,42±15,87). DFS i OS wynosiły odpowiednio 80,50% i 79,88%. Brak ekspresji Ki-67 stwierdzono w 37 przypadkach (23,27%), a obecność ekspresji Ki-67 u 122 chorych (76,73%;  $p<0,001$ ). Wystąpiła dodatnia korelacja zwiększonej ekspresji Ki-67 ze wzrostem zaawansowania GEE ( $p<0,001$ ). U chorych bez wznowy GEE ekspresja Ki-67 była obecna w 7,63±7,57% komórek GEE, u chorych ze wznową było to 23,06±22,93% komórek GEE ( $p<0,001$ ). W analizie jednoczynnikowej występowała ujemna korelacja między wzrostem odsetka komórek Ki-67 (+) w GEE z DFS ( $p<0,010$ ) oraz OS ( $p=0,01$ ). W analizie wieloczynnikowej gorszy DFS był związany z wyższym zaawansowaniem GEE ( $p<0,001$ ) i wzrostem ekspresji Ki-67 ( $p<0,001$ ). W modelu wieloczynnikowym gorszy OS był związany z wyższym zaawansowaniem GEE ( $p<0,001$ ). Wielkość ekspresji Ki-67 nie korelowała z OS. Wiek chorych i zróżnicowanie histologiczne GEE nie wpływały na DFS i OS.

**Wnioski:** Wielkość ekspresji antygenu Ki-67 w GEE może być istotnym dodatkowym elementem wpływającym na decyzje terapeutyczne u części chorych na GEE. Wysoka ekspresja Ki-67 zwiększa ryzyko wznowy GEE. Metoda TMA stanowi dobre narzędzie dla oceny ekspresji antygenu Ki-67 w projektach badawczych u chorych z GEE, znacznie ułatwiając prowadzenie badań na dużych grupach chorych.

### Adres do korespondencji:

Leszek Gottwald

Zakład Teleradioterapii, Wojewódzki Specjalistyczny Szpital im. M. Kopernika w Łodzi

ul. Paderewskiego 4, 93-509 Łódź, Polska

tel: +48 42 689 55 51; fax: +48 42 689 55 52

e-mail: lgottwald@wp.pl

Otrzymano: 13.01.2013

Zaakceptowano do druku: 15.05.2013

Słowa kluczowe: **rak endometrium endometrialny / antygen Ki-67 / rokowanie / mikromacierz tkankowa /**

## Abstract

**Objectives:** To assess the prognostic significance of Ki-67 expression in the tissue microarray method (TMA) for disease free survival (DFS) and overall survival (OS) in endometrioid endometrial cancer (EEC).

**Material and methods:** The study examined 159 consecutive patients aged 37-86 (62.82±9.95) with EEC stages I-III according to FIGO, treated surgically at the Pirogow Memorial Hospital of Lodz between 2000 and 2007. Afterwards they were subsequently treated and examined at the Regional Cancer Center, Copernicus Memorial Hospital of Lodz. Tissue cores 2 mm in size, in duplicate, were taken from the formalin-fixed and paraffin-embedded tissue donor blocks from surgery, and constructed into the TMA recipient blocks. Using TMA method, the relationship between Ki-67 expression, DFS and OS was examined. DFS was defined as a period from primary surgery until relapse. OS was defined as a period from primary surgery until the end of the follow-up (60 months) or until the death of the patient. The study was approved by the Ethics Committee of the Medical University of Lodz (RNN/82/11/KE; KE/1673/12).

**Results:** The follow-up time varied between 3 - 60 months (51.42±15.87). In 31 patients (19.50%) the relapse of was diagnosed 1-59 months (24.97±16.08) after commencement of the treatment. During follow-up 32 patients (20.12%) died. DFS and OS were 80.50% and 79.88%, respectively. The lack of Ki-67 expression was found in 37 cases (23.27%) while in 122 patients (76.73%) the expression was present ( $p < 0.001$ ). The expression of Ki-67 in 1-10%, 11-20% and >20% was present in 76 cases, 26 cases and 20 cases, respectively. Positive correlation between the expression of Ki-67 and staging was present ( $r = 0.353$ ;  $p < 0.001$ ). In EEC patients with no relapse diagnosed during follow-up the expression of Ki-67 was present in 7.63±7.57% of EEC cells, when compared to 23.06±22.93% in EEC patients in relapsed disease ( $p < 0.001$ ). The relationship between increased Ki-67 expression and increased grading was not statistically significant ( $r = 0.149$ ;  $p = 0.061$ ). The expression of Ki-67 did not depend on patient age ( $r = 0.040$ ;  $p = 0.617$ ). In univariate analysis negative correlation was found between the expression of Ki-67 and DFS ( $p < 0.001$ ) and OS ( $p = 0.01$ ). In multivariate analysis worse DFS was related to higher staging of EEC ( $p < 0.001$ ) and increased expression of Ki-67 ( $p < 0.001$ ). Worse OS was related to higher staging in multivariate analysis ( $p < 0.001$ ). Ki-67 expression was not related to OS in multivariate analysis. Age of patients and grading of the EEC were not related to DFS and OS.

**Conclusions:** The expression of the Ki-67 can significantly affect therapeutic decisions in selected EEC patients. The high Ki-67 expression in EEC patients is related to increased risk of relapse. The TMA technique is a good method for the assessment of the Ki-67 in studies conducted in EEC patients and makes it easier to carry out immunohistochemistry in large populations of patients.

Key words: **endometrioid endometrial cancer / Ki-67 antigen / prognosis / tissue microarray /**

## Wstęp

Według danych z Krajowego Rejestru Zachorowań na Nowotwory Złośliwe w 2010 roku odnotowano w Polsce 5125 nowych zachorowań na nowotwory złośliwe trzonu macicy i 1042 zgony nimi spowodowane [1]. Najczęstszym nowotworem złośliwym w tej lokalizacji jest rak endometrium. Na podstawie kryteriów klinicznych i histologicznych wyróżnia się dwa jego główne typy: typ pierwszy - rak endometrialny (GEE) i typ drugi - rak nie-endometrialny. Około 70-90% przypadków raka endometrium dotyczy GEE [2, 3].

Przy ocenie rokowania u chorych na GEE, oprócz czynników klinicznych, coraz istotniejszego znaczenia nabiera analiza parametrów fizykochemicznych dotyczących biologii nowotworu [4]. Do dobrze poznanych już czynników rokowniczych, jak zaawansowanie (ang. *staging*), zróżnicowanie histologiczne (ang. *grading*), głębokość naciekania ściany macicy przez GEE, zajęcie przestrzeni naczyniowych, wiek i stan ogólny chorych,

czy też ekspresja receptorów dla hormonów sterydowych, obecnie dołącza się także obecność mutacji w genie p53, a według niektórych autorów także ocenę VEGF, HIF-1 $\alpha$  oraz ekspresję antygenu jądrowego Ki-67 [5-12].

Antygen Ki-67 jest niehistonowym białkiem jądrowym obecnym we wszystkich fazach cyklu komórkowego, poza fazą G0 [13]. Liczba komórek Ki-67 (+) obrazuje pulę komórek dzielących się, czyli tzw. fazę wzrostową, będąc wykładnikiem aktywności proliferacyjnej nowotworu [14]. Znaczenie ekspresji antygenu Ki-67 dla prognozowania przeżycia u chorych potwierdzono już dla licznych nowotworów, w tym nowotworów narządów płciowych [15], jednak w odniesieniu do GEE wyniki dotychczasowych analiz nie są jednoznaczne [6, 9, 10, 12, 16, 17].

Stale unowocześniana technika mikromacierzy tkankowych (ang. *tissue microarray*, TMA), w swej obecnej formie została opisana przez Kononena i wsp. w 1998 roku [18]. Do jej podstawowych zalet zalicza się redukcję kosztów i czasu prowadzenia

Leszek Gottwald et al. Znaczenie ekspresji antygenu Ki-67 ocenianej metodą mikromacierzy tkankowych dla rokowania u chorych z gruczolakorakiem endometrialnym endometrium.

badan immunohistochemicznych oraz możliwość analizy nawet kilkuset przypadków przy zużyciu zaledwie kilku mikrolitrów przeciwciała. Obecnie technika ta zyskuje coraz większe uznanie przy prowadzeniu badań w onkologii [19, 20, 21, 22].

## Cel pracy

Celem pracy była ocena znaczenia rokowniczego ekspresji antygenu Ki-67 ocenianej metodą TMA dla przeżycia wolnego od choroby (DFS) i przeżycia ogólnego (OS) chorych z GEE.

## Materiał i metody

### Materiał badawczy

Retrospektywnym badaniem objęto 171 chorych z GEE. Po wykonaniu TMA w preparatach mikroskopowych zidentyfikowano tkanki GEE od 159 z tych chorych w stopniach zaawansowania klinicznego I-III wg FIGO, w wieku 37-86 (62,82±9,95) lat, które zakwalifikowano do dalszych badań. Oceniono zależność pomiędzy wielkością ekspresji antygenu Ki-67, a DFS i OS. DFS zdefiniowano jako czas od zabiegu operacyjnego do stwierdzenia wznowy nowotworu, lub w przypadku jej braku – do zakończenia obserwacji. OS zdefiniowano jako czas od zabiegu operacyjnego do zakończenia obserwacji po upływie 60 miesięcy, lub wcześniej w przypadku zgonu chorej. Oceny zaawansowania GEE dokonano wg klasyfikacji FIGO z 2009 roku [23]. Zróżnicowanie histologiczne GEE ustalono w oparciu o kryteria WHO z 2003 roku [3].

Ekspresję antygenu Ki-67 zbadano metodą TMA. Do badań wykorzystano bloki parafinowe z tkankami chorych z GEE z macicy usuniętej podczas laparotomii w Wojewódzkim Specjalistycznym Szpitalu im. M. Madurowicza (obecnie im. M. Pirogowa) w Łodzi w latach 2000-2007. Leczenie uzupełniające oraz kontrolę chorych po zakończonym leczeniu onkologicznym prowadzono w Regionalnym Ośrodku Onkologicznym w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym im. M. Kopernika w Łodzi. Charakterystykę grupy badanej przedstawiono w tabeli I.

Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Komisji Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr RNN/82/11/KE z poprawką KE/1673/12.

Wyselekcjonowano bloki tkankowe zawierające reprezentatywne tkanki nowotworu. Z każdego bloku-dawcy, urządzeniem Tissue-Tek Quick-Ray Tissue Microarray System (Sakura Finetek USA, Inc. Torrance, CA 90501 USA), igłą o średnicy 2 mm, pobrano po dwie próbki tkankowe z miejsc wskazanych przez histopatologa na preparacie zabarwionym hematoksyliną i eozyną (H+E). Pobrane próbki tkankowe umieszczono w układzie „szachownicy” w gotowych blokach parafinowych (Tissue-Tek Quick-Ray Recipient Block, Sakura Finetek USA, Inc. Torrance, CA 90501 USA), tworząc TMA zawierającą biopaty z 20 bloków-dawców z tkankami GEE. Aby uniknąć pomyłek przy identyfikacji poszczególnych próbek tkankowych, w dwóch dokładnie opisanych pozycjach bloku TMA umieszczono tkanki śledziona. Kolejne etapy wytwarzania TMA zobrazowano na Rycinie 1.

Z każdej TMA, po uprzednim zatopieniu w formalinie, skrojono za pomocą mikrotomu po 2 skrawki grubości 4 µm. Skrawki te umieszczono na szkiełkach Super-Frost (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany). Pierwszy skrawek wybarwiono H+E, a kolejny skrawek posłużył do oceny ekspresji antygenu Ki-67.

### Wykonanie i interpretacja odczynów immunohistochemicznych ekspresji antygenu Ki-67 w tkankach GEE

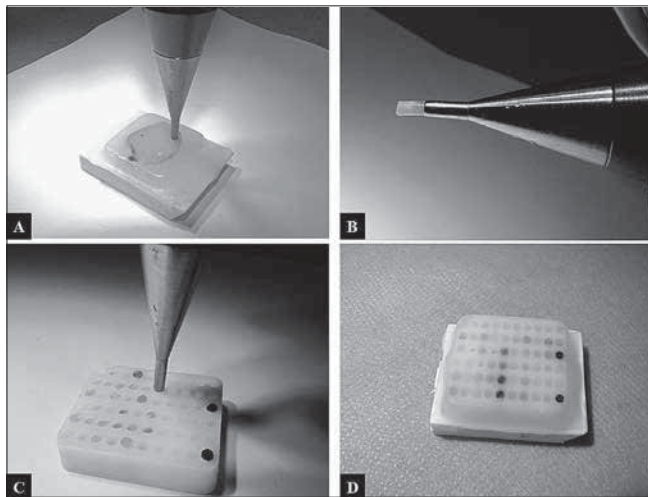
Użyto komercyjnego przeciwciała monoklonalnego FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, klon MIB-1 (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) rozcieńczonego 1:150. Dla oceny zależności pomiędzy odsetkiem komórek GEE wykazujących ekspresję Ki-67 a DFS i OS, wyróżniono 4 grupy GEE: z brakiem ekspresji Ki-67, z ekspresją obecną w 1-10%, 11-20% i w powyżej 20% komórek GEE. Na rycinie 2 przedstawiono preparaty mikroskopowe GEE z brakiem ekspresji Ki-67 (A), słabą ekspresją Ki-67 (B) oraz silną ekspresją Ki-67 (C, D).

Tabela I. Kliniczna i histopatologiczna charakterystyka grupy badanej.

Grupa badana chorych z GEE		n	%
razem chorych		159	100
wiek chorych	≤50 lat	20	12,58
	51-70 lat	96	60,38
	>70 lat	43	27,04
zaawansowanie kliniczne GEE (staging)	I	108	67,92
	II	24	15,09
	III	27	17,01
	IV	0	0
zróżnicowanie histologiczne GEE (grading)	G 1	59	37,11
	G 2	82	51,57
	G 3	18	11,32
zabieg operacyjny	zabieg radykalny	159	100
	operacja cytoredukcyjna	0	0
	zwiądowcza laparotomia	0	0
wznowa GEE	bez wznowy	128	80,50
	tylko miejscowa	7	4,40
	tylko odległa	20	12,58
	miejscowa i odległa	4	2,52

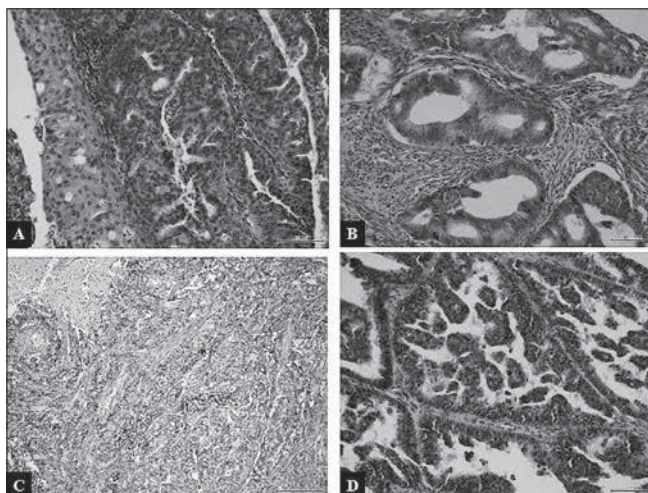


Leszek Gottwald et al. Znaczenie ekspresji antygenu Ki-67 ocenianej metodą mikromacierzy tkankowych dla rokowania u chorych z gruczolakorakiem endometrialnym endometrium.



**Rycina 1.** Wytwarzanie TMA:

A – technika biopsji parafinowego bloku-dawcy,  
B – 2 mm próbka tkankowa pobrana z bloku-dawcy,  
C – technika umieszczenia próbek tkankowych w otworach bloku – biorcy,  
D – gotowy parafinowy blok TMA.

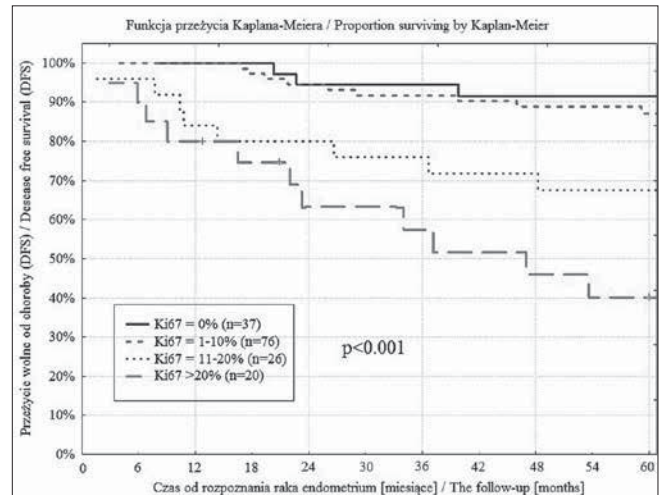


**Rycina 2.** Ekspresja Ki-67 w GEE w metodzie TMA:

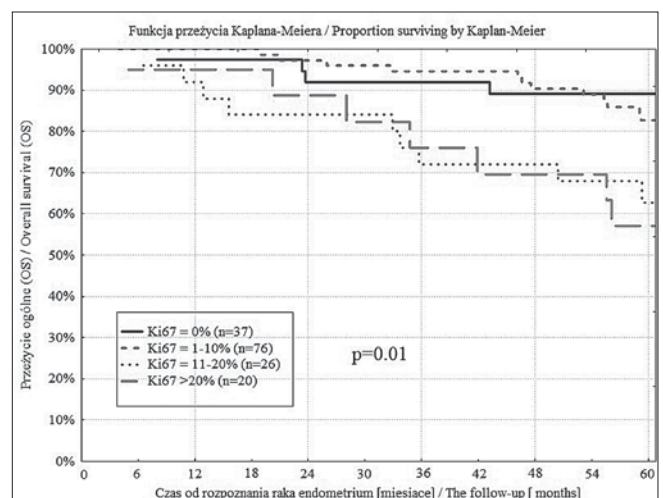
A – brak ekspresji Ki-67 (powiększenie 200X),  
B – słaba ekspresja Ki-67 (powiększenie 200X),  
C – silna ekspresja Ki-67 (powiększenie 100X),  
D – silna ekspresja Ki-67 (powiększenie 200X).

### Analiza statystyczna

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu programu Statistica 10.0 PL (Statsoft Inc., Tulsa, OK., USA). W celu porównania danych parametrycznych zastosowano test t-Studenta. Przy analizie danych nieparametrycznych wykorzystano test  $\chi^2$  oraz test dokładny Fishera. Ocenę korelacji dokonano obliczając współczynnik korelacji r-Pearsona. Zależności pomiędzy DFS i OS a wielkością ekspresji Ki-67 poddano analizie jednoczynnikowej i wieloczynnikowej. Analizę jednoczynnikową wykonano z użyciem testu log rank dla zmiennych nominalnych lub metodą regresji Coxa dla zmiennych ciągłych. Krzywe DFS oraz OS wyznaczono w oparciu o metodę Kaplana-Meiera. Analizę wieloczynnikową zmiennych związanych z prawdopodobieństwem OS lub DFS przeprowadzono za po-



**Rycina 3.** DFS u chorych z GEE w zależności od ekspresji Ki-67.



**Rycina 4.** OS u chorych z GEE w zależności od ekspresji Ki-67.

mocą regresji Coxa. W modelu wieloczynnikowym oceniono wpływ na DFS i OS dodatkowo także wieku chorych, zaawansowania nowotworu i zróżnicowania histologicznego GEE. Poziom istotności przyjęto jako  $p < 0,05$ .

### Wyniki

Okres obserwacji chorych wynosił 3-60 miesięcy ( $51,42 \pm 15,87$ ). U 128 chorych (80,50%) nie wystąpiła w tym okresie progresja, ani wznowa nowotworu. U pozostałych 31 chorych (19,50%) stwierdzono wznowę nowotworu w okresie 1 – 59 miesięcy ( $24,97 \pm 16,08$ ) od rozpoczęcia leczenia. W okresie obserwacji 32 chore zmarły (20,12%), w tym 26 osób (16,35%) w wyniku choroby nowotworowej i 6 osób z innych przyczyn (3,77%). Pięć chorych (3,15%), u których rozpoznano wznowę GEE żyło w momencie zakończenia obserwacji. DFS i OS wynosiły odpowiednio 80,50% i 79,88%.

Brak ekspresji Ki-67 stwierdzono w 37 przypadkach (23,27%). U pozostałych 122 chorych (76,73%) ekspresja Ki-67 była obecna ( $p < 0,001$ ). W 76 przypadkach GEE ekspresję

Leszek Gottwald et al. Znaczenie ekspresji antygenu Ki-67 ocenianej metodą mikromacierzy tkankowych dla rokowania u chorych z gruczolakorakiem endometrialnym endometrium.

Ki-67 stwierdzano w 1-10% komórek, u 26 chorych w 11-20%, u 20 chorych w powyżej 20% komórek GEE. Wystąpiła dodatnia korelacja pomiędzy zwiększoną ekspresją Ki-67 i wzrostem zaawansowania klinicznego GEE ( $r=0,353$ ;  $p<0,001$ ). Zależność pomiędzy zwiększoną ekspresją Ki-67 i wzrostem zróżnicowania histologicznego GEE nie nosiła cech znamienności statystycznej ( $r=0,149$ ;  $p=0,061$ ). Nie wystąpiła korelacja wielkości ekspresji Ki-67 z wiekiem chorych ( $r=0,040$ ;  $p=0,617$ ).

W grupie chorych, u których w okresie obserwacji nie wystąpiła wznowa nowotworu, ekspresja Ki-67 była obecna średnio w  $7,63\pm 7,57$  komórek GEE, natomiast u chorych ze wznową GEE było to  $23,06\pm 22,93$  komórek GEE ( $p<0,001$ ). W analizie jednoczynnikowej stwierdzono ujemną korelację między wzrostem odsetka komórek GEE wykazujących ekspresję Ki-67 a DFS ( $p<0,010$ ; Rycina 3) i OS ( $p=0,01$ ; Rycina 4). Gorszy DFS w modelu wieloczynnikowym był związany z wyższym zaawansowaniem GEE ( $p<0,001$ ) i ze wzrostem ekspresji Ki-67 ( $p<0,001$ ). W modelu wieloczynnikowym nie wpływały na DFS wiek chorych ( $p=0,220$ ) i zróżnicowanie histologiczne GEE ( $p=0,434$ ). W modelu wieloczynnikowym gorszy OS był związany z wyższym zaawansowaniem GEE ( $p<0,001$ ). Wiek chorych ( $p=0,280$ ), zróżnicowanie histologiczne GEE ( $p=0,148$ ) oraz wielkość ekspresji Ki-67 ( $p=0,229$ ) nie wpływały na OS w modelu wieloczynnikowym.

## Dyskusja

Chociaż w ostatnich latach ukazało się wiele publikacji opisujących coraz to nowsze czynniki, które z różną siłą mogą wpływać na rokowanie u chorych w onkologii, ocena indeksu Ki-67 nadal pozostaje podstawową metodą stosowaną w celu określenia proliferacji nowotworów [24,25]. W piśmiennictwie, wśród licznych prac analizujących znaczenie ekspresji Ki-67 w ginekologii onkologicznej, znajdują się także i te poświęcone wartości Ki-67 dla oceny stopnia złośliwości nowotworów trzonu macicy [16,26-28]. Według Mayerhofer i wsp. indeks Ki-67 może być użyteczny dla ustalenia agresywności guzów wywodzących się z warstwy mięśniowej ściany macicy [27]. Obserwacje Yamachi i wsp. wskazują na podobną relację także u chorych z GEE, jednak tutaj opinie różnych autorów są podzielone [17, 28]. Wyniki naszych badań także nie pozwalają na jednoznaczne wnioskowanie o zależności pomiędzy wielkością ekspresji Ki-67, a zróżnicowaniem histologicznym GEE. Obserwowana tendencja do występowania wysokiej ekspresji Ki-67 w przypadkach nisko zróżnicowanych GEE znajdowała się bowiem na granicy istotności statystycznej.

Wysokiemu indeksowi Ki-67 w przeprowadzonym przez nas badaniu towarzyszyło wyższe zaawansowanie GEE w momencie rozpoznania choroby, a więc pośrednio także większa agresywność nowotworu w stosunku do chorych z brakiem lub niskim indeksem Ki-67. Nie wszyscy autorzy zgadzają się z taką opinią [16, 26, 29, 30]. Kędzia i wsp. w swoim materiale nie stwierdzili korelacji pomiędzy indeksem Ki-67 w raku endometrium, a zaawansowaniem nowotworu (bez podziału na podtypy histologiczne) [16]. Podobnie Mariani i wsp. nie zaobserwowali związku między obecnością przerzutów raka endometrium w węzłach chłonnych miednicznych i/lub około aortalnych, a wielkością indeksu Ki-67 w guzie pierwotnym [29]. Dodatnią korelację pomiędzy wzrostem ekspresji Ki-67 i zwiększeniem się prawdopodobieństwa inwazji nowotworu do przestrzeni na-

czyniowych opisano już natomiast dla mięsaków trzonu macicy [15].

Chociaż u większości chorych, u których rozpoznawany jest GEE, diagnoza ma miejsce we wczesnych stopniach klinicznych gdy nie występują odległe przerzuty, to jednak nawet w tych sytuacjach może dochodzić do wznowy nowotworu. W naszym materiale miało to miejsce u 31 chorych (19,50%). Średni odsetek komórek GEE wykazujących ekspresję Ki-67 w tej grupie wyniósł ponad 23% i był trzykrotnie wyższy, niż u chorych, u których nie doszło do wznowy GEE. Uzupełnieniem tych obserwacji jest analiza DFS i OS, która pokazała, że całkowity brak ekspresji Ki-67 w komórkach GEE był związany z niższym ryzykiem wznowy nowotworu i większym całkowitym przeżyciem, niż w przypadkach z ekspresją Ki-67. Prezentowane wyniki potwierdzają obserwacje Stefansson i wsp. w grupie 237 chorych z GEE, a także innych autorów, którzy stwierdzili zwiększone ryzyko wznowy nowotworu w przypadkach wysokiej ekspresji Ki-67 [30, 31]. Z kolei wyniki analizy pięcioletnich przeżyć w grupie 147 chorych z GEE przeprowadzone przez Geissler i wsp. wskazują na ekspresję Ki-67 jako kolejny obok zaawansowania GEE i zajęcia naczyń chłonnych niezależny czynnik rokowniczy [26]. W świetle uzyskanych wyników oraz na podstawie przeglądu piśmiennictwa można więc przyjąć, że wielkość ekspresji antygenu Ki-67 w GEE może być istotnym dodatkowym elementem wpływającym na strategię postępowania u części chorych, jednak podstawowe znaczenie nadal posiada indywidualna ocena całości obrazu klinicznego.

W opisywanym badaniu wykorzystaliśmy metodę TMA z własną modyfikacją układu tkanek w bloku biorcy, w sposób opisany już przez nas uprzednio na łamach *Ginekologii Polskiej* [32]. Dotychczasowe nasze obserwacje pokazują, że taki sposób przygotowania bloku biorcy umożliwia uzyskanie reprezentatywnego materiału tkankowego w bloku TMA od ponad 90% przypadków GEE, wstępnie kwalifikowanych do badań [33]. W jednorodnych histologicznie nowotworach, do których należy GEE, pozwala to na uzyskiwanie wiarygodnych wyników badań immunohistochemicznych [32]. Należy jednak mieć na uwadze, że w sytuacjach nowotworów wysoce niejednorodnych, zastosowanie zamiast klasycznych „dużych” preparatów histologicznych metody TMA, pozwalającej na analizę zaledwie kilku 1-2 mm fragmentów guza nowotworowego, może w sposób znaczący obniżyć precyzję uzyskiwanych wyników [20, 34]. Rozwiązaniem tej kwestii mogłoby być pobranie u tych chorych większej liczby biopsji z bloku-dawcy, lub zwiększenie średnicy pobieranych fragmentów tkankowych. W obu jednak przypadkach ceną za poprawę efektywności metody TMA byłoby większe uszkodzenie, lub nawet całkowite zniszczenie parafinowego bloku-dawcy [20, 35].

## Wnioski

1. Wielkość ekspresji antygenu Ki-67 w GEE może być istotnym dodatkowym elementem wpływającym na decyzje terapeutyczne u części chorych na GEE.
2. Wysoka ekspresja Ki-67 zwiększa ryzyko wystąpienia wznowy GEE.
3. Metoda TMA stanowi dobre narzędzie dla oceny ekspresji antygenu Ki-67 w projektach badawczych u chorych z GEE, znacznie ułatwiając prowadzenie badań na dużych grupach chorych.

Leszek Gottwald et al. Znaczenie ekspresji antygenu Ki-67 ocenianej metodą mikromacierzy tkankowych dla rokowania u chorych z gruczolakorakiem endometrialnym endometrium.

## Piśmiennictwo

- Zakład Epidemiologii i Prewencji Nowotworów Centrum Onkologii – Instytut w Warszawie. Krajowa baza danych nowotworowych. <http://www.onkologia.org.pl>
- Benedet J, Bender H, Jones H 3rd, [et al.]. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines for gynaecological cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. *Int J Gynaecol Obstet.* 2000, 70, 209-262.
- Silverberg S, Kurman R, Nogales F, [et al.]. Epithelial tumours and related lesions. In: World Health Organization Classification of tumors. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. Eds. Tavassoli F, Devilee P. Lyon: *IARC Press*, 2003, 221-232.
- Steinbakk A, Gudlaugsson E, Aasprong O, [et al.]. Molecular biomarkers in endometrial hyperplasias predict cancer progression. *Am J Obstet Gynecol.* 2011, 204, 357.e1-12.
- Jeon Y, Part I, Kim Y, [et al.]. Steroid receptor expressions in endometrial cancer: clinical significance and epidemiological implication. *Cancer Lett.* 2006, 239, 198-204.
- Ikawa S, Sano T, Furumoto H, [et al.]. Multidirectional differentiation of endometrial carcinoma with special reference to tumor aggressiveness evaluated by Ki-67 expression. *Gynecol Oncol.* 1999, 72, 323-330.
- Markova I, Duskova M, Lubusky M, [et al.]. Selected immunohistochemical prognostic factors in endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2010, 20, 576-582.
- Shabani N, Kuhn C, Kunze S, [et al.]. Prognostic significance of oestrogen receptor alpha (ERalpha) and beta (ERbeta), progesterone receptor A (PR-A) and B (PR-B) in endometrial carcinomas. *Eur J Cancer.* 2007, 43, 2434-2444.
- Stoian S, Simionescu C, Mărgăritescu C, [et al.]. Endometrial carcinomas: correlation between ER, PR, Ki67 status and histopathological prognostic parameters. *Rom J Morphol Embryol.* 2011, 52, 631-636.
- Chakravarty D, Gupta N, Goda J, [et al.]. Steroid receptors HER2/neu and Ki 67, in endometrioid type of endometrial carcinoma: correlation with conventional histomorphological features of prognosis. *Acta Histochem.* 2010, 112, 355-363.
- Steiner E, Eicher O, Sagemüller J, [et al.]. Multivariate independent prognostic factors in endometrial carcinoma: a clinicopathologic study in 181 patients: 10 years experience at the Department of Obstetrics and Gynecology of the Mainz University. *Int J Gynecol Cancer.* 2003, 13, 197-203.
- Schimp V, Ali-Fehmi R, Solomon L, [et al.]. The racial disparity in outcomes in endometrial cancer: could this be explained on a molecular level? *Gynecol Oncol.* 2006, 102, 440-446.
- Cattoretti G, Becker M, Key G, [et al.]. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol.* 1992, 168, 357-363.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, [et al.]. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 1984, 133, 1710-1715.
- Mayerhofer K, Lozanov P, Bodner K, [et al.]. Ki-67 and vascular endothelial growth factor expression in uterine leiomyosarcoma. *Gynecol Oncol.* 2004, 92, 175-179.
- Kędzia W, Rutkowski R, Jankowska A, [i wsp.]. Markery proliferacji oraz parametry morfo immunologiczne w ocenie czynników rokowniczych w rakach błony śluzowej macicy. *Ginekol Pol.* 1997, 68, 199-205.
- Oreskovic S, Babic D, Kalafatic D, [et al.]. A significance of immunohistochemical determination of steroid receptors, cell proliferation factor Ki-67 and protein p53 in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2004, 93, 34-40.
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, [et al.]. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* 1998, 4, 844-847.
- Cimbaluk D, Rotmensch J, Scudiere J, [et al.]. Uterine carcinosarcoma: immunohistochemical studies on tissue microarrays with focus on potential therapeutic targets. *Gynecol Oncol.* 2007, 105, 138-144.
- Hassan S, Ferrario C, Mamo A, [et al.]. Tissue microarrays: emerging standard for biomarker validation. *Curr Opin Biotechnol.* 2008, 19, 19-25.
- Huang G, Arend R, Li M, [et al.]. Tissue microarray analysis of hormonal signaling pathways in uterine carcinosarcoma. *Am J Obstet Gynecol.* 2009, 200, 457.e1-5.
- Jongen V, Briët J, de Jong R, [et al.]. Expression of estrogen receptor-alpha and -beta and progesterone receptor-A and -B in a large cohort of patients with endometrioid endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2009, 112, 537-542.
- Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix and endometrium. *Int J Gynaecol Obstet.* 2009, 105, 103-104.
- Dahmoun M, Boman K, Cajander S, Böckström T. Intratumoral effects of medroxy-progesterone on proliferation, apoptosis, and sex steroid receptors in endometrioid endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol.* 2004, 92, 116-126.
- Engelsen I, Akslen L, Salvesen H. Biologic markers in endometrial cancer treatment. *APMIS.* 2009, 117, 693-707.
- Geisler J, Geisler H, Miller G, [et al.]. MIB-1 in endometrial carcinoma: prognostic significance with 5-year follow-up. *Gynecol Oncol.* 1999, 75, 432-436.
- Mayerhofer K, Lozanov P, Bodner K, [et al.]. Ki-67 expression in patients with uterine leiomyomas, uterine smooth muscle tumors of uncertain malignant potential (STUMP) and uterine leiomyosarcomas (LMS). *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2004, 83, 1085-1088.
- Yamauchi N, Sakamoto A, Oozaki H, [et al.]. Immunohistochemical analysis of endometria adenocarcinoma for bcl-2 and p53 in relation to expression of sex steroid receptor and proliferative activity. *Int J Gynecol Pathol.* 1996, 15, 202-208.
- Mariani A, Sebo T, Katzmann J, [et al.]. Endometrial cancer: can nodal status be predicted with curettage? *Gynecol Oncol.* 2005, 96, 594-600.
- Geisler J, Wiemann M, Zhou Z, [et al.]. Proliferation index determined by MIB-1 and recurrence in endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 1996, 61, 373-377.
- Stefansson I, Salvesen H, Immervoll H, [et al.]. Prognostic impact of histological grade and vascular invasion compared with tumour cell proliferation in endometrial carcinoma of endometrioid type. *Histopathology.* 2004, 44, 472-479.
- Gottwald L, Sęk P, Kubiak R, [i wsp.]. Efektywność zastosowania techniki mikromacierzy tkankowych do oceny ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych w gruczolakoraku endometrialnym endometrium - doniesienie wstępne. *Ginekol Pol.* 2012, 83, 342-346.
- Gottwald L, Sęk P, Piekarski J, [et al.]. Construction of a tissue microarray with 2 mm-size cores in endometrioid endometrial cancer – factors affecting quality of the recipient block. *Biotech Histochem.* 2012, 87, 512-518.
- Egervari K, Szollosi Z, Nemes Z. Tissue microarray technology in breast cancer HER2 diagnostics. *Pathol Res Pract.* 2007, 203, 169-177.
- Gulmann C, O'Grady A. Tissue microarrays: an overview. *Curr Diagn Pathol.* 2003, 9, 149-154.