

# İntradermal Melanositik Nevüs, Displastik Nevüs ve Malign Melanomanın Ayırıcı Tanısında Ki-67'nin Önemi ve Ki-67'nin Malign Melanomada Prognostik Faktörlerle Karşılaştırılması

## The Importance of Ki-67 in Differential Diagnosis of Intradermal Melanocytic Nevus, Dysplastic Nevus and Malignant Melanoma, and Comparison of Ki-67 with Prognostic Factors of Malignant Melanoma

Dr. Elmas ÖZGÜN,<sup>a</sup>  
Dr. Selda SEÇKİN,<sup>a</sup>  
Dr. Salih ERGÖÇEN<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Patoloji Kliniği,  
Ankara Numune Eğitim ve  
Araştırma Hastanesi,  
<sup>b</sup>Biyostatistik AD,  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Ankara

Geliş Tarihi/Received: 30.03.2009  
Kabul Tarihi/Accepted: 17.09.2009

*Bu çalışma, 19. Ulusal Patoloji  
Kongresi (7-11 Ekim 2009, Kıbrıs)'nde  
poster olarak sunulmak üzere özet  
şeklinde gönderilmiştir.*

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Dr. Elmas ÖZGÜN  
Ankara Numune Eğitim ve  
Araştırma Hastanesi,  
Patoloji Kliniği, Ankara,  
TÜRKİYE/TURKEY  
elmasozgun@yahoo.com.tr

**ÖZET Amaç:** Çalışmanın amacı intradermal melanositik nevüs (İMN), displastik nevüs (DN) ve malign melanoma (MM)'da Ki-67 proliferasyon indeksini belirlemek ve bu indeksin bu lezyonların ayırıcı tanısında katkısı olup olmadığını değerlendirmektir. Bir diğer amaç da MM olgularında Ki-67 proliferasyon indeksinin prognostik bir belirleyici olarak kullanılabilirliğini ortaya koymaktır. **Gereç ve Yöntemler:** Çalışmaya 24 İMN, 13 DN ve 28 MM olgusuna ait 69 lezyon dahil edildi. Her olgu için yaş, cinsiyet, lezyon lokalizasyonu belirlendi. Ayrıca MM grubunda tümör tipi, Breslow İndeksi, Clark Level, ülserasyon, mitoz (mm<sup>2</sup>), lenfositik infiltrasyon tespit edildi. İmmünohistokimyasal yöntem ile Ki-67 çalışıldı ve her grupta Ki-67 indeksi üzerinden değerlendirme yapıldı. **Bulgular:** Ki-67 ile boyanma İMN ve DN'de genel olarak lezyon yüzeyindeki hücrelerde izlenirken, MM'da heterojen dağılım mevcuttu. Ki-67 indeksi, MM'de İMN ve DN'ye göre daha yüksek olarak bulundu. Ki-67 indeksi için kesim noktası 5.83 olarak belirlendi. Ki-67 indeksi açısından 5.83 üzerindeki değere sahip olan olguların, %96.4 duyarlılık ve %93.1 özgüllük düzeyi ile MM tanısı aldığı gösterildi. Ki-67 indeksi DN'de, İMN'ye göre daha yüksek olarak saptandı. Ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. MM'de, Breslow İndeksi 2< mm olan olgularda, Clark Level V olan olgularda, ülserasyon izlenen olgularda, mitozun 6s olduğu olgularda ve erkeklerde Ki-67 indeksinin daha yüksek olma eğiliminde olduğu izlendi. Ayrıca şiddetli lenfositik infiltrasyon izlenen olgularda daha düşük Ki-67 indeksi saptandı. Tümör tipi, lokalizasyonu ve yaş ile Ki-67 indeksi arasında bir ilişki bulunmadı. **Sonuç:** MM'nin, İMN'den ve DN'den ayırtılmasında Ki-67 indeksinin anlamlı olduğu gösterildi. Ayrıca bulgular biyolojik spektrumda DN'nin, MM ile İMN arasında yer almakta olduğunu ve Ki-67'nin, MM'de prognozu kötü yönden etkilediği bilinen faktörler ile ilişkili olabileceğini gösterir nitelikte idi.

**Anahtar Kelimeler:** Melanoma, nevüs, Ki-67 antijeni

**ABSTRACT Objective:** The aim of the study is to find Ki-67 proliferation index in intradermal melanocytic nevus (IMN), dysplastic nevus (DN) and malignant melanoma (MM), and to evaluate whether this index has given any idea about the differential diagnosis of these lesions or not. Besides we aimed to find out if Ki-67 index can be a useful marker as a prognostic factor in MM or not. **Material and Methods:** Twentyfour IMN, 13 DN and 28 MM totally 69 cases were included in the study. Age, gender, localization of the lesion were noted in each case. Tumor type, Breslow index, Clark level, ulceration, mitosis (mm<sup>2</sup>), lymphocytic infiltration in MM group were established. Immunohistochemically Ki-67 was stained and Ki-67 proliferation index was calculated. **Results:** In DN and IMN, cells labelled by Ki-67 were on the surface of the lesions whereas they were heterogeneously distributed in MM. The Ki-67 index of MM was found higher than DN and IMN. For Ki-67 index, the cut-off point was found as 5.83 and the cases, which had values over 5.83, were observed to be diagnosed as MM with the %93,1 spesifity and %96,4 sensitivity. The Ki-67 index was determined higher in DN than IMN. But the difference was not significant statistically. Ki-67 index tends to be higher in mostly male MM cases that has Breslow index 2< mm, Clark level V, ulceration, mitosis 6s. On the other hand, the cases, that has brisk lymphocytic infiltration, were proved to have low Ki-67 index. There hasn't been any correlation between Ki-67 index and age, localization and tumor type. **Conclusion:** For differentiating MM from DN and IMN, the Ki-67 index was shown to be significant. Furthermore, the findings were suggestive of DN is to be placed between MM and IMN in biological spectrum. Besides, Ki-67 might have a relation with the clinicopathological factors that have adverse influence on the prognosis of MM.

**Key Words:** Melanoma; nevus; Ki-67 antigen

**M**align melanoma (MM), günümüzde insanlarda görülen bütün malignitelerin %3'ünü oluşturmaktadır. Genel olarak insidans artışı yılda %4-6 arasındadır.<sup>1</sup> Endüstriyel toplumlarda deri kanserine bağlı ölüm nedenlerinin başında MM gelmektedir.<sup>2</sup> Bu nedenle yüksek mortalite ve morbiditeye sahip olan MM'yi diğer benign melanositik nevüslerden ayırt etmek önem kazanmaktadır.

MM ve benign melanositik nevüsler arasındaki ayırımı, her zaman konvansiyonel histopatoloji ile mümkün olamamaktadır. Böyle durumlarda, ayırıcı tanı bu lezyonların biyolojik davranışlarını da gösteren ek tanı işaretleyicileri kullanılabilir. <sup>2,3</sup> Birçok neoplazmda tümör hücresinde proliferatif aktivite artışı, malignite ile birliktelik göstermekte ve önemli prognostik işaretleyici olarak kullanılmaktadır.<sup>4</sup> Son yıllarda melanositik lezyonların biyolojik spektrumunda proliferatif aktivite analizinin ayırıcı tanı ve prognostik açıdan uygulanabilirliği üzerinde durulmaktadır.<sup>5</sup> Bu amaçla proliferasyon işaretleyicisi olarak Ki-67 (MIB-1), "proliferating cell nuclear antigen (PCNA)", survivin ve siklinler gibi moleküller üzerinde çalışılmaktadır.<sup>1-7</sup>

İlk kez Gerdes tarafından tanımlanan Ki-67 antijeni, normal ve neoplastik hücrelerde hücre siklusunun G1, M, G2 ve S fazlarında gösterilmiştir.<sup>2-6,8</sup> Monoklonal antikör MIB-1, Ki-67 antijenini tanıır. MIB-1, orijinal Ki-67 antikörünün tersine formolde fikse, parafin kesitlerde boyanabilir özelliğindedir.<sup>9</sup> Proliferatif aktivite derecesini değerlendirmede, en kolay ve güvenilir yöntemlerden biri olan Ki-67 proliferasyon indeksi yaygın biçimde kullanılmaktadır. Bu indeks hücre siklusunda G1, M, G2 ve S fazındaki Ki-67 eksprese eden hücre yüzdesi olarak tanımlanmaktadır.<sup>2,4-6</sup>

Biz bu çalışmada, İMN, displastik nevüs (DN) ve MM'da Ki-67 proliferasyon indeksini belirledik ve bu indeksin bu lezyonların ayırıcı tanısında katkısı olup olmadığını araştırdık. Ayrıca MM olgularında Ki-67 proliferasyon indeksinin, bilinen prognostik faktörler ile olan ilişkisini inceledik.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmaya, 2000 ile 2008 yılları arasında, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patolo-

ji Bölümünde İMN tanısı almış 24 olgu, DN tanısı almış 13 olgu ve MM tanısı almış 28 olguya ait toplam 69 biyopsi materyali dahil edildi. DN tanısı almış 2 olgunun birden fazla biyopsisi mevcuttu. Klinik bilgiler bölüm arşivi kayıtlarından ve rapor örneklerinden elde edildi.

Her bir biyopsi materyaline ait formalin fikse, parafine gömülü bloklardan hazırlanan H&E boyalı preparatlar tekrar incelendi. İMN, DN ve MM için cinsiyet, yaş, lezyon lokalizasyonu kaydedildi. MM'de lezyon lokalizasyonu baş-boyun, ekstremitte ve gövde olarak üç kategoride değerlendirildi. Sadece bir olguda lezyon gövde yerleşimli olduğu için, bu lezyon ekstremitte grubuna dahil edildi. Ayrıca MM'de tümör tipi, Breslow İndeksi, Clark Level, ülserasyon, mitoz (mm<sup>2</sup>), lenfositik infiltrasyondan oluşan histopatolojik parametreler değerlendirildi.

Tümör tipi akral lentiginöz melanoma (ALM), lentigo maligna melanoma (LMM), nodüler melanoma (NM) ve yüzeysel yayılan melanoma (YYM) olarak belirlendi. LMM ve ALM tanısı alan 1'er olgu olduğu için bu iki olgu birlikte "diğerleri" olarak gruplandırıldı. Breslow İndeksi  $\leq 2$  mm ve  $2 <$  mm olmak üzere iki grupta incelendi. Clark Level, tümörün derideki anatomik invazyon derinliğine göre değerlendirildi. Bu çalışmada Clark Level I olan olgu yoktu ve Clark Level II olan olgu sayısı (2/28) az olduğu için Clark Level III ile bir grup halinde değerlendirildi. Ülserasyon, tümör yüzeyinde intakt bir epidermisin bulunup bulunmamasına göre (+) ya da (-) olarak belirtildi. Mitotik oran, tümörde mitotik olarak en aktif alanda, milimetre karedeki mitoz sayısı olarak hesaplandı. Olgular mitoz sayısı  $< 6$  ve  $6 \leq$  olarak iki grupta toplandı. Tümörü infiltre eden lenfositler (TIL) üç kategoride incelendi: inflamasyon bulunmaması, hafif inflamasyon, şiddetli inflamasyon. Eğer tümör tabanı tamamen lenfositlerce infiltre ise ve/veya tümör içinde diffüz infiltrasyon mevcut ise şiddetli inflamasyon, tümör tabanı boyunca ya da tümör içinde fokal alanlarda infiltrasyon var ise hafif inflamasyon olarak değerlendirildi. İnflamasyon bulunmaması ise, tümörü infiltre eden hiç lenfosit infiltrasyonu bulunmaması şeklinde kabul edildi.

Tümörü en iyi temsil eden bloklar belirlendi. Seçilen her bloktan 3-4 mikron kalınlığında kesitler adezivli lamlara alındı. İmmünohistokimyasal yöntemle Ki-67(monoklonal mouse anti-human Ki-67 antijeni (clone MIB-1, DAKO)) çalışıldı. Yoğun melanin pigmentinin izlendiği kesitler immünohistokimyasal boyama aşamasındaki teknik nedenlerden dolayı çalışmada kullanılmadı. Pozitif kontrol olarak tonsilden hazırlanan kesitler kullanıldı. Nükleer boyanma dikkate alındı. İmmünohistokimyasal değerlendirmede Ki-67 boyanma yüzdesi saptandı. Her lezyonda boyanmanın en yoğun olduğu yerde 300 tümör hücresi üzerinden sayım yapıldı. Boyanan tümör hücre yüzdesi hesaplandı. Bu Ki-67 indeksi olarak değerlendirildi. Ayrıca Ki-67 boyanmasının lezyonda dağılım yoğunluğuna bakıldı.

Değerlendirilen parametreler sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizi için "SPSS for Windows 11,5" paket programı kullanıldı. Sürekli ölçümlü değişkenlerin dağılımının normale uygun olup olmadığı Shapiro Wilk testi ile araştırıldı. Bağımsız gruplar arasında Ki-67 boyanma yüzdesi ortancaları yönünden farkın önemliliği bağımsız grup sayısı iki olduğunda Mann-Whitney U testi ile, bağımsız grup sayısı ikiden fazla olduğunda Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi. Kruskal-Wallis test istatistiği sonucunun önemli bulunduğu durumlarda anlamlı farka neden olan grupları tespit etmek amacıyla çoklu karşılaştırma testi yapıldı. MM'yi öngörmeye Ki-67 boyanma yüzdesinin belirleyici olup olmadığı ROC eğrisi altında kalan alan hesaplanarak değerlendirildi. Eğri altında kalan alanın önemli bulunması halinde MM'yi öngörmeye Ki-67 boyanma yüzdesine ilişkin en iyi kesim noktası Youden İndeks kullanılarak saptandı. Ayrıca, bu noktaya ilişkin duyarlılık, seçicilik, pozitif ve negatif tahmini değerler hesaplandı.  $p < 0.05$  için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

Çalışmaya katılan olguların yaş aralığı 13-82 arasında değişmekte olup olguların çoğunluğunu (%41.27) ve en yaşlı grubu (ort. 62.23) MM tanısı alan olgular oluşturmaktadır. Olguların %58.5'i kadın, %41.5'i erkek idi. İMN ve MM tanısı alan olgularda lezyonların büyük kısmı (sırası ile %91.3,

%53.6) baş-boyun yerleşimi göstermekte iken DN olgularında lezyonların büyük kısmı (%82.4) gövde yerleşimli idi (Tablo 1).

MM tanısı alan 15 erkek ve 13 kadından oluşan toplam 28 olgudan 16'sında tümör tipi YYM ve 10'unda NM iken 1'er olguda LMM ve ALM idi. Olgularda tespit edilen Breslow İndeksi 0.35-16.00 mm arasında değişmekte olup, Breslow İndeksi  $\leq 2$  olan olgu sayısı 8, Breslow İndeksi  $2 <$  olan olgu sayısı 20 idi. Clark Level II-V arasında değişmekte idi. MM olgularının çoğunluğunda ülserasyon yoktu, mitoz ( $\text{mm}^2$ )  $6 \leq$  idi ve lenfositik infiltrasyon mevcuttu (sırası ile %67.86, %67.86 ve %64.29) (Tablo 2).

İMN ve DN olgularında boyanma lezyonun yüzeyel alanlarında izlenirken, MM'li olgularda boyanma lezyonun her yerinde heterojen dağılım göstermekte idi (Resim 1-6). Ki-67 indeksi İMN'de 0.33-4.67, DN'de 1.00-6.67 ve MM'de 1.33-84.00 arasında saptandı. MM'de Ki-67 indeksi (ortanca 17,50), DN'e ait Ki-67 indeksine (ortanca 2.67) ve İMN'e ait Ki-67 indeksine (ortanca 1.84) göre daha yüksek olarak bulundu. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı idi ( $P < 0.001$ ). DN'ye ait Ki-67 indeksi (or-

**TABLO 1:** İntradermal melanositik nevüs, displastik nevüs ve malign melanoma olgularının klinik verileri.

Klinik Özellikler	Tanı			
	İMN	DN	MM	Toplam
<b>Hasta Sayısı (%)</b>	24 (38.09)	13 (20.64)	26 (41.27)	63 (100)
<b>Yaş</b>				
ort.	40.25	28.62	62.23	46.92
min.-maks.	13-66	14-71	36-82	13-82
<b>Cinsiyet</b>				
Erkek sayı	8	4	15	27
%	33.3	30.8	53.6	41.5
Kadın sayı	16	9	13	38
%	66.7	69.2	46.4	58.5
<b>Lokalizasyon</b>				
Baş-Boyun sayı	21	0	15	36
%	91.3	0	53.6	52.9
Ekstremiteler sayı	0	3	12	15
%	0	17.6	42.9	22.1
Gövde sayı	2	14	1	17
%	8.7	82.4	3.6	25

İMN: İntradermal melanositik nevüs, DN: Displastik nevüs, MM: Malign melanoma  
ort.: Ortalama, min.: Minimum, maks.: Maksimum.

**TABLO 2:** Malign melanoma olgularında prognostik parametreler ile Ki-67 indeksinin karşılaştırılması.

Prognostik Parametreler	Sayı (%)	Ortalama	Ki-67 indeksi			p
			Ortanca	Minimum	Maksimum	
<b>Cinsiyet</b>						
Erkek	15 (53.57)	30.56	18.67	6.00	84.00	0.316
Kadın	13 (46.43)	19.28	17.00	1.33	45.67	
<b>Lokalizasyon</b>						
Baş-boyun	15 (53.57)	22.69	17.67	1.33	84.00	0.964
Ekstremitte-gövde	13 (46.43)	28.36	17.00	6.00	84.00	
<b>Tümör Tipi</b>						
NM	10 (35.72)	31.93	16.67	6.00	84.00	0.813
YYM	16 (57.14)	22.00	17.50	1.33	77.00	
Diğerleri (LMM+ALM)	2 (7.14)	18.83	18.83	18.67	19.00	
<b>Breslow İndeksi (mm)</b>						
≤2	8 (28.57)	16.25	14.67	6.67	36.67	0.150
2<	20 (71.43)	28.95	18.83	1.33	84.00	
<b>Clark Level</b>						
II+III	8 (28.56)	19.21	14.67	6.67	42.67	0.490
IV	10 (35.72)	23.47	18.00	6.67	77.00	
V	10 (35.72)	32.07	20.50	1.33	84.00	
<b>Ülserasyon</b>						
Yok	19 (67.86)	25.60	17.33	1.33	84.00	0.595
Var	9 (32.14)	24.74	18.67	9.00	77.00	
<b>Mitoz</b>						
<6	9 (32.14)	16.52	14.67	1.33	36.67	0.105
6≤	19 (67.86)	29.49	18.67	6.00	84.00	
<b>Lenfositik infiltrasyon</b>						
Yok	10 (35.71)	17.50	17.83	1.33	36.67	0.381
Hafif	11 (39.29)	36.24	17.67	10.33	84.00	
Şiddetli	7 (25.00)	19.33	14.67	6.67	45.67	

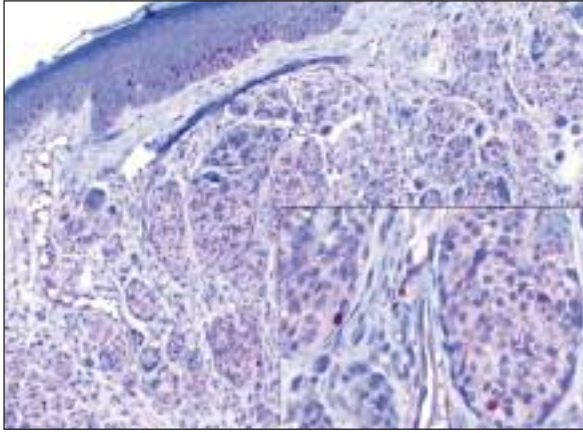
NM: Nodüler melanoma, YYM: Yüzeysel yayılan melanoma, LMM: Lentigo maligna melanoma, ALM: Akral lentiginöz melanoma.

tanca 2.67) ile İMN'e ait Ki-67 indeksi (ortanca 1,84) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p=0.371$ ). Ancak İMN ile DN'ye ait Ki-67 indeks değerlerinin birbirlerine oldukça yakın olduğu tespit edildi (Tablo 3). Şekil 1'de "box-plot" ile İMN, DN ve MM'da Ki-67 indeks değerleri gösterilmektedir. Buna göre intradermal melanositik nevüs ve DN'de saptanan Ki-67 indeksi, MM'ye ait Ki-67 indeksinden çok düşüktü. Ancak intradermal melanositik nevüs ile DN'ye ait Ki-67 indeks değerlerinin birbirlerine oldukça yakın olduğu tespit edildi.

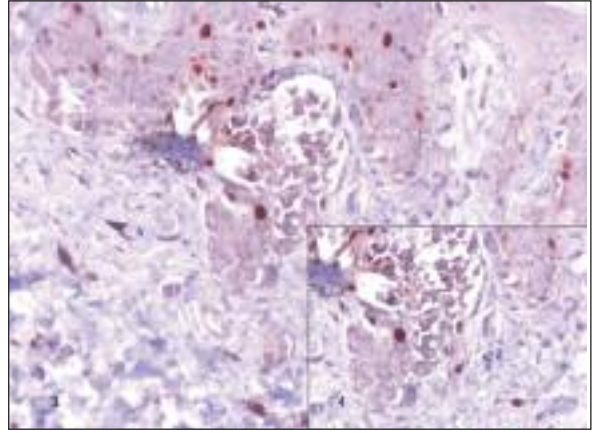
Ki-67 indeksinin MM'yi İMN veya DN'den ayırt etmedeki duyarlılık ve özgüllükleri ROC eğrisi ile değerlendirildi (eğri altında kalan alan (EAKA) (mavi çizginin altındaki alan)= 0.97;  $P<0.001$ ;

%95 güven aralığı; 0.914-1.000). %96,4 duyarlılık, %93.1 özgüllük düzeyinde kesim noktası 5.83 olarak bulundu (Şekil 2). Yani Ki-67 indeksi açısından 5.83 üzerindeki değere sahip olan olgular yukarıda belirtilen duyarlılık ve özgüllük düzeyi ile MM tanısı almakta, bu değerinin altında ölçüm saptanan olgular bu duyarlılık ve özgüllük ile DN ya da İMN tanısı almaktadır.

MM'de Ki-67 indeksi ile yaş karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmadı. MM'de erkeklerin Ki-67 indeksi (ortanca 18.67), kadınların Ki-67 indeksinden (ortanca 17.00) daha yüksekti. Baş-boyun yerleşimli tümörlerde Ki-67 indeksine ait ortanca değer 17.67, ekstremitte-gövde yerleşimli tümörlerdeki Ki-67 indeksine ait ortanca değer 17.00 olarak bulundu.



**RESİM 1,2:** İMN'de Ki-67 ile lezyon yüzeyinde seyrek nükleer boyanma (x40, x200).



**RESİM 3,4:** DN'de dermoepidermal bileşkedeki hücrelerde ve bazal keratinositlerde seyrek Ki-67 ekspresyonu (x100, x200).

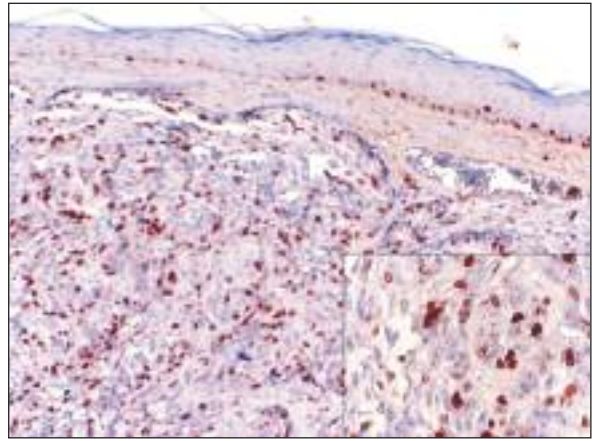
YYM tanısı alan olgularda Ki-67 indeksi (ortanca 17.50), NM tanısı alan olgularda saptanan Ki-67 indeksinden (ortanca 16.67) yüksekti. LMM ve ALM'den oluşan grupta Ki-67 indeksi (ortanca 18.83) diğer iki gruba göre daha yüksekti. Ancak bu bulgular istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Breslow İndeksi  $2 <$  mm olan olgularda Ki-67 indeksi (ortanca %18.83), Breslow İndeksi  $\leq 2$  mm olan olgulardaki Ki-67 indeksine (ortanca %14.67) göre daha yüksekti. Bu sonuç; Breslow İndeksi ve Ki-67 indeksi arasında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte korelasyon olabileceğini düşündürdü ( $p=0.150$ ).

MM'de Ki-67 indeksi Clark Level ile karşılaştırıldığında Clark Level V olgulardaki Ki-67 indeksi ortanca 20.50, Clark Level IV olan olgulardaki Ki-67 indeksi ortanca 18.00, Clark Level II+III olgulara ait Ki-67 indeksi ortanca 14.67 idi. Ki-67 indeksi en yüksek olarak Clark Level V olan olgularda mevcuttu.

Ülserasyon izlenen olgularda Ki-67 indeksi (ortanca 18.67), ülserasyon izlenmeyen olgulara ait Ki-67 indeksine (ortanca 17.33) göre, mitoz ( $\text{mm}^2$ )  $6 \leq$  olan olgularda Ki-67 indeksi (ortanca 18.67), mitoz ( $\text{mm}^2$ )  $<6$  olan olgularda izlenen Ki-67 indeksine (ortanca 14.67) göre daha yüksek olarak bulundu.

Lenfositik infiltrasyon bulunmayan olgulardaki Ki-67 indeksi (ortanca 17.83), hafif lenfositik infiltrasyon bulunan olgulardaki Ki-67 indeksine



**RESİM 5,6:** NM'de Ki-67 ile tümör hücrelerinde ve bazal keratinositlerde yaygın nükleer immünreaksiyon (x100, x400).

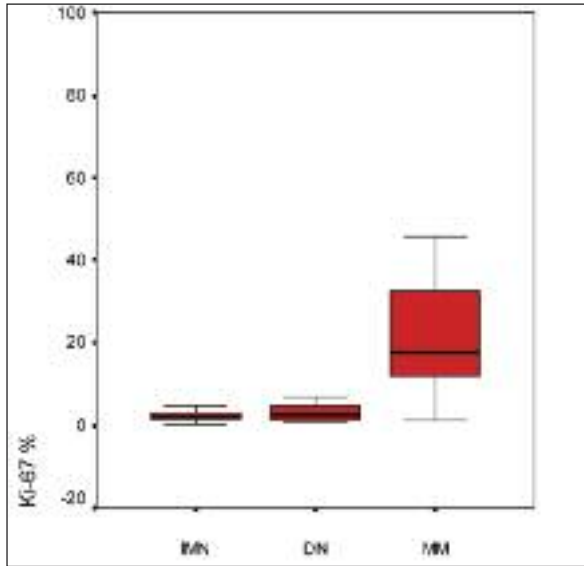
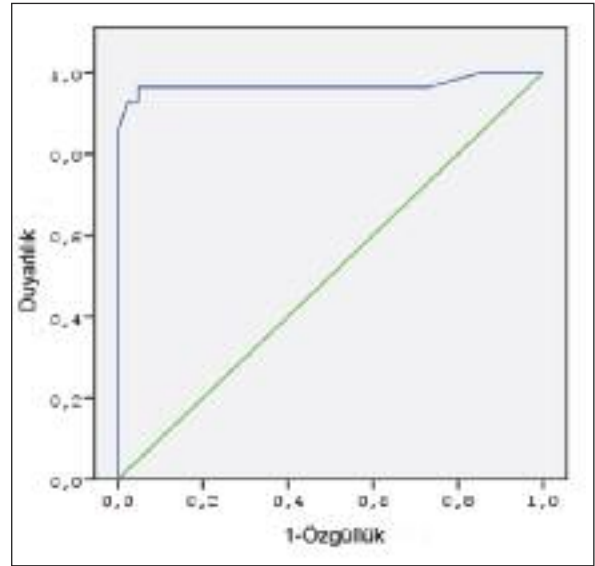
(ortanca 17.67) yakın bir değerdi. Hafif lenfositik infiltrasyon bulunan olgulardaki Ki-67 indeksi (ortanca 17.67) şiddetli lenfositik infiltrasyon gösteren olgulardaki Ki-67 indeksine (ortanca 14.67) göre yüksek olarak bulundu. Ancak bulgular istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 2).

## TARTIŞMA

Endüstriyel toplumlarda deri kanserine bağlı ölüm nedenlerinin başında gelen MM, biyolojik davranışı önceden tahmin edilemeyen bir tümördür.<sup>2,10</sup> Bu nedenle yüksek mortalite ve morbiditeye sahip olan MM'yi benign melanositik lezyonlardan ayırt etmek önem kazanmaktadır.<sup>2,3</sup> Ayrıca MM riski taşımaları ve takip modalitelerinin farklı olması nedeni ile benign spektrumda yer alan DN'lerin

**TABLO 3:** İntradermal melanositik nevüs, displastik nevüs ve malign melanomada Ki-67 indeksinin karşılaştırılması.

Tanı	Sayı (%)	Ki-67 indeksi			
		Ortalama	Ortanca	Minimum	Maksimum
İntradermal Melanositik Nevüs	24 (34.78)	2.22	1.84	0.33	4.67
Displastik Nevüs	17 (24.64)	3.12	2.67	1.00	6.67
Malign Melanoma	28 (40.58)	25.32	17.50	1.33	84.00
<b>Toplam</b>	<b>69 (100)</b>	<b>11.82</b>	<b>4.33</b>	<b>0.33</b>	<b>84.00</b>

**ŞEKİL 1:** İntradermal melanositik nevüs (İMN), displastik nevüs (DN) ve malign melanoma (MM)'da Ki-67 indeks değerlerinin "box-plot" ile gösterilmesi.**ŞEKİL 2:** Ki-67 indeksi için ROC eğrisi.

melanositik nevüslerden ayırt edilmesi de oldukça önemlidir.<sup>11</sup> Tümör hücrelerinin artmış proliferatif aktivitesi hem malignite ile ilişkilidir hem de pek çok kanser çeşidinde önemli bir prognostik işaretleyici olarak kullanılmaktadır.<sup>5,8,12,13</sup> Hücre proliferasyonunu değerlendirmek için en yaygın kullanılan immünohistokimyasal işaretleyici Ki-67 antikorudur.<sup>4</sup>

Çalışmamızda, MM'deki Ki-67 indeksinin, hem DN'ye hem de İMN'ye ait Ki-67 indeksinden anlamlı olarak daha yüksek olduğunu saptadık. Bu sonuç, artmış proliferatif aktiviteyi gösteren Ki-67 indeksinin malignite ile ilişkili olduğunu göstermekte idi. Ayrıca Ki-67 ile İMN'de ve DN'de özellikle lezyonun yüzeyinde boyanma izlenirken, MM'de lezyonun her yerinde heterojen boyanma

mevcuttu. Bu da, nevüs hücrelerindeki matürasyon sürecini kanıtladığı gibi diğer taraftan MM'de tümör hücrelerinin hızlı klonal değişimine bağlı oluşan tümör heterojenitesini de göstermekte idi.<sup>3</sup>

Korabiowska ve ark., Smolle ve ark. ile Li ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmalarda bizim elde ettiğimiz sonuçlara benzer şekilde melanositik lezyonların malign olanlardan ayırt edilmesinde Ki-67 boyanması anlamlı bulunmuştur.<sup>3,5,14</sup> Bunlardan farklı olarak çalışmalarına Ki-67'ye ek olarak ayrı ayrı PCNA ile p53'ü de dahil eden çalışmalar da mevcuttur. Bu çalışmalarda da Ki-67 değerlerinin malign lezyonlarda benign lezyonlara göre daha yüksek olduğu saptanmıştır.<sup>15,16</sup> Bundan başka bizim çalışmamızda olduğu gibi Chorny ve ark.'nın çalışmasında da, benign lezyonlarda boyanma yü-

zeyel alanlarda izlenirken, MM'de lezyonun her seviyesinde heterojen boyanma görülmüştür.<sup>16</sup>

Biz çalışmamızda MM'yi, DN ve İMN'den ayırt etmede Ki-67 indeksinin kesim noktasını ("cut-off" değeri) 5.83 olarak saptadık. Ki-67 indeksinin 5.83'ün üzerindeki değerlerde, MM için yüksek duyarlılıkta (%96.4) bir işaretleyici olduğunu gördük. Ayrıca özgüllüğünün %93.1 olması bu işaretleyicinin MM'ye özgün de olduğunu göstermiş oldu.

Nasr ve ark. benign ve malign melanositik lezyonları birbirinden ayırt etmede Ki-67 boyanma indeksi için kesim noktasını, bizim çalışmamızda saptadığımız değere (5.17) yakın olarak (5.0) tespit etmişlerdir.<sup>2</sup> Bu konudaki diğer çalışmalarda ise Ki-67 indeksi için kesim noktası ve Ki-67 boyanma yüzdesi için duyarlılık ve özgüllük değerleri farklılık göstermekte idi.<sup>3,4</sup> Bütün bu çalışmalar Ki-67'nin benign ve malign melanositik lezyonları birbirinden ayırt etmede yardımcı bir teknik olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda DN'ye ait Ki-67 indeksinin, İMN'ye ait Ki-67 indeksinden daha yüksek olduğunu bulduk. Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu bize, benign melanositik lezyonları birbirinden ayırt etmede proliferatif aktivitenin etkisinin olmadığını gösterdi. Ancak DN'de, MM'den daha düşük, İMN'den daha yüksek Ki-67 indeksinin bulunması, melanositik lezyonların biyolojik spektrumunda DN'nin, melanositik nevüs ile MM arasında bir lezyon olduğu ve melanositik lezyonların biyolojik spektrumunda proliferatif aktivitenin anlamlı olduğu görüşünü kanıtlar nitelikte idi. Bunlardan farklı olarak Korabiowska ve ark. ile Lebe ve ark.nın çalışmalarında DN ve melanositik nevüsü birbirinden ayırt etmede Ki-67 ekspresyonunun anlamlı olduğu gösterilmiştir.<sup>4,5</sup> Ancak olgu sayısındaki sınırlılık yanı sıra Ki-67 boyanma yüzdesini değerlendirmede kullandığımız teknik farklılıklar nedeni ile biz çalışmamızda, İMN ve DN ayırımında Ki-67'nin etkisini saptayamamız olabiliriz.

Melanositik lezyonlarda bir malignite işaretleyicisi olduğu düşünülen Ki-67'nin, MM'de prognostik faktör olarak da değeri tartışma

konusudur.<sup>5,6,8,12-15,17-22</sup> MM grubunda prognostik faktörler ile Ki-67 indeksi arasındaki ilişkiyi de araştırdığımız bu çalışmada MM'de sağkalımı en iyi öngören prognostik parametre olan Breslow İndeksi, iki grup halinde değerlendirildiğinde 2 mm < olan olgulardaki Ki-67 indeksi Breslow İndeksi ≤2 mm olan olgulara ait Ki-67 indeksinden daha yüksek olarak bulundu. Bu korelasyon istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte MM olgularında prognoz daha kötü olabileceğini öngörmeye Ki-67'nin kullanılabilirliğini desteklemekte idi.

Literatürde yer alan diğer çalışmalarda da Ki-67 boyanması ile Breslow İndeksi arasında korelasyon varlığını görmekteyiz.<sup>6,12,15,20</sup> Soyer'in bu konuda yapmış olduğu çalışmada Ki-67 boyanmasının Breslow İndeksi yanında Clark Level ve mitotik oran ile, Rieger ve ark.nın yapmış oldukları çalışmada da Ki-67 boyanmasının hem Breslow İndeksi hem de mitotik oran ile anlamlı korelasyonu gösterilmiştir.<sup>12,15</sup> Literatürde bir çalışmada MM'ye bağlı ölen 5 hastanın 4'ünde yüksek %Ki-67 değerleri saptanmıştır. Dikkat çeken nokta ölen olgulardan 1'inin ince melanoma grubunda yer alan, Breslow kalınlığı 0.3 mm ve Clark Level II olan hasta olması olup bu da bir kez daha Ki-67 boyanmasının prognostik açıdan önemine dikkat çekici niteliktedir.<sup>20</sup>

Çalışmamızda anatomik invazyon seviyesi (Clark Level) arttıkça Ki-67 indeksinde artış olduğu da gösterildi. Bu korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bunun da özellikle Clark Level II ve Clark Level III olan olgu sayısındaki sınırlılıktan kaynaklandığı düşünüldü. Yapılan çalışmalar invazyon seviyesi (Clark Level) ile Ki-67 boyanması arasında anlamlı korelasyon olduğunu göstermiştir.<sup>5,6</sup> Karobiowska ve ark. Ki-67 indeksi ile anlamlı korelasyonun, sadece Clark Level II ile III arasında ve Clark Level IV ile V arasında olduğunu göstermişlerdir.<sup>5</sup>

Çalışmamızda ülserasyon izlenen olgularda Ki-67 indeksi ülserasyon izlenmeyen olguların Ki-67 indeksine göre daha yüksek bulundu. Literatürde bir çalışmada da aynı sonuç saptanmış ancak bizim çalışmamızda olduğu gibi burada da istatistiksel anlamlılık bulunamamıştır.<sup>6</sup> Bunlardan farklı olarak Hazan ve ark. çalışmalarında bu farkın anlamlı ol-

duğunu göstermişlerdir.<sup>19</sup> MM'da sağ kalım üzerinde ve artmış nodal metastaz riski açısından prediktif değeri yüksek olan ülserasyon, farklı mekanizmalar üzerinden gelişebilmektedir. Bu mekanizmalar tümörün infiltratif etkisi, travma ve artifisyel nedenlerdir. Bunlar içinde travma ve artifisyel nedenlerin prognostik değeri yoktur. Ancak bu ayrımı yapmak her zaman mümkün olamamaktadır. Bizim çalışmamızda da Ki-67 indeksi ile ülserasyon arasında anlamlı korelasyonun saptanamaması, olgulardaki muhtemel ülserasyon mekanizmasını ayırt edemememize bağlı olabilir.

Mitotik oran ve MM'lerde Ki-67 pozitivitesi arasındaki korelasyon çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir.<sup>6,12,21</sup> Çalışmamızda mitotik oranı  $6 \leq$  olan olgulardaki Ki-67 indeksi mitotik oranı  $<6$  olan olguların Ki-67 indeksinden daha yüksekti. Aradaki fark, literatürde yer alan bazı çalışmalarda da olduğu gibi istatistiksel olarak anlamlı değildi.<sup>6</sup> <sup>21</sup> Ancak Soyer ve ark.nın yaptığı bir çalışmada 72 primer MM olgusunda Ki-67 ile mitoz arasında anlamlı korelasyon gösterilmiştir.<sup>12</sup>

Literatürden farklı olarak konağın immün cevabını gösteren lenfositik infiltrasyonun, Ki-67 indeksi ile ilişkisini de değerlendirdiğimiz bu çalışmada, şiddetli lenfositik infiltrasyonun izlendiği olgularda daha düşük Ki-67 indeksi saptandı. Bu da prognostik açıdan Ki-67 indeksinin değerine dikkat çekici idi. Ancak bu korelasyonda anlamlı sonuç alınamaması lenfositik infiltrasyonu değerlendirmenin oldukça subjektif bir parametre olması yanı sıra olgu sayısındaki sınırlılıktan olduğu düşünüldü.

Biz bu çalışmada YYM tanısı alan olgulardaki Ki-67 indeksinin NM tanısı alan olgularda saptanan Ki-67 indeksinden yüksek olduğunu bulduk. Aynı zamanda LMM ve ALM'den oluşan gruba ait Ki-67 indeksi de diğer iki gruba göre daha yüksekti. Ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bunun özellikle LMM ve ALM'den oluşan grubun olgu sayısındaki sınırlılıktan kaynaklandığı düşünülebilir. Kaleem ve ark.nın 253 melanositik lezyon üzerinde yapmış oldukları çalışmada Ki-67 boyanması ile MM subtipleri arasında anlamlı farklılık olduğu gösterilmiştir.<sup>18</sup> Vertikal büyüme fazı gösteren NM'de en yüksek boyanma oranı el-

de edilmiştir. Geniş seride yapılan bu çalışmadaki anlamlı korelasyon, Ki-67 boyanmasının tümör progresyonu ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Ayrıca benign ve malign melanositik lezyonlar arasındaki ayırmada Ki-67 sadece morfolojiye yardımcı bir teknik olarak kullanılabilir.<sup>18</sup>

Ki-67 indeksi ile lokalizasyon arasında ilişkiyi de değerlendirdiğimiz bu çalışmada Moretti ve ark.nın çalışmalarında<sup>20</sup> olduğu gibi herhangi bir korelasyon saptanmadı.

Çalışmamızda erkeklerde Ki-67 indeksi kadınların Ki-67 indeksinden daha yüksekti. Ancak fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Hazan ve ark. erkeklerde daha yüksek Ki-67 boyanma indeksi olduğunu göstermişlerdir.<sup>19</sup> Moretti ve ark. ile Talve ve ark. ise yaptıkları çalışmalarda cinsiyet ile Ki-67 arasında korelasyon saptamamışlardır.<sup>13,20</sup> Erkeklerde kadınlara göre prognoz daha kötü olduğu göz önüne alındığında, Hazan ve ark.nın yapmış oldukları çalışma sonucu ve istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bizim, erkeklerde Ki-67 indeksini daha yüksek olarak bulmamız, yüksek Ki-67 indeksinin MM'da kötü prognoz ile ilişkili olabileceğini destekler niteliktedir.

MM'de yaşlı hastalar, genç hastalara göre daha kötü prognozludur. Bunun da özellikle yaş ile birlikte immün sistemdeki yetersizlik yanı sıra bu hastaların geç tanı almalarından kaynaklandığı belirtilmektedir.<sup>1,23-25</sup> Çalışmamızda, Moretti ve ark.nın çalışmalarında olduğu gibi Ki-67 indeksi ile yaş karşılaştırıldığında istatistiksel olarak korelasyon saptanmamıştır.<sup>20</sup>

## SONUÇ

Ki-67 ile İMN ve DN'de boyanan hücreler yüzeye yakın olarak izlenirken MM'de lezyonun her yerinde heterojen dağılım gösteren boyanma mevcuttu. MM, İMN ve DN'de Ki-67 indeksinin ayırıcı tanıdaki yerini değerlendirdiğimiz bu çalışmada Ki-67 indeksinin 5.83'ün üzerinde olduğu değerlerde, yüksek duyarlılık (%96.4) ve yüksek özgüllük (%93.1) düzeyi ile MM tanısı vermede yardımcı olabileceği saptandı. Ayrıca Ki-67 indeksi DN'de, İMN'ye göre daha yüksekti. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte bu sonuç, DN'le-



rin biyolojik spektrumunda MM ve İMN arasında yer alan bir lezyon olduğunu kanıtlar nitelikte idi.

İstatistiksel anlamlılık olmamakla beraber Breslow İndeksi  $2 < \text{mm}$  olan, Clark Level V olan, ülserasyon izlenen, mitozu  $6 \leq$  olan olgularda ve erkeklerde daha yüksek Ki-67 indeksi izlenmesi bize Ki-67 indeksinin kötü prognostik faktörlerle

ilişkili bir işaretleyici olabileceği yönünde ipucu vermektedir. Ayrıca şiddetli lenfositik infiltrasyon mevcut olan olgularda Ki-67 indeksinin daha düşük olarak bulunması, konağın immün cevabını yansıtan lenfositik infiltrasyonun prognostik açıdan iyi bir kriter olabileceğini gösterir nitelikte idi.

## KAYNAKLAR

- McKee PH, Calonje E, Granter SR. Melanoma. Pathology of the Skin with Clinical Correlations. Vol 2. 3<sup>rd</sup> ed. China: Elsevier Mosby; 2005. p.1309-55.
- Nasr MR, El-Zammar O. Comparison of pHH3, Ki-67, and survivin immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions. Am J Dermatopathol 2008;30(2):117-22.
- Li LX, Crotty KA, McCarthy SW, Palmer AA, Kril JJ. A zonal comparison of MIB1-Ki67 immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions. Am J Dermatopathol 2000;22(6):489-95.
- Lebe B, Pabuççoğlu U, Ozer E. The significance of Ki-67 proliferative index and cyclin D1 expression of dysplastic nevi in the biologic spectrum of melanocytic lesions. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2007;15(2):160-4.
- Korabiowska M, Brinck U, Middel P, Brinkmann U, Berger H, Radzun HJ, et al. Proliferative activity in the progression of pigmented skin lesions, diagnostic and prognostic significance. Anticancer Res 2000;20(3A):1781-5.
- Henrique R, Azevedo R, Bento MJ, Domingues JC, Silva C, Jerónimo C. Prognostic value of Ki-67 expression in localized cutaneous malignant melanoma. J Am Acad Dermatol 2000;43(6):991-1000.
- Flórenes VA, Faye RS, Maelandsmo GM, Nesland JM, Holm R. Levels of cyclin D1 and D3 in malignant melanoma: deregulated cyclin D3 expression is associated with poor clinical outcome in superficial melanoma. Clin Cancer Res 2000;6(9):3614-20.
- Ohsie SJ, Sarantopoulos GP, Cochran AJ, Binder SW. Immunohistochemical characteristics of melanoma. J Cutan Pathol 2008;35(5):433-44.
- Chowers I, Livni N, Solomon A, Zajicek G, Frucht-Pery J, Folberg R, MIB-1 and PC-10 immunostaining for the assessment of proliferative activity in primary acquired melanosis without and with atypia. Br J Ophthalmol 1998;82(11):1316-9.
- Özgenel GY, Kahveci R, Özcan M, Akın S, Özbek S, Filiz G. [Our treatment principles and results in malignant melanoma]. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2002;28(1):13-6.
- Li LX, Crotty KA, Scolyer RA, Thompson JF, Kril JJ, Palmer AA, et al. Use of multiple cytometric markers improves discrimination between benign and malignant melanocytic lesions: a study of DNA microdensitometry, karyometry, argyrophilic staining of nucleolar organizer regions and MIB1-Ki67 immunoreactivity. Melanoma Res 2003;13(6):581-6.
- Soyer HP. Ki-67 immunostaining in melanocytic skin tumors. Correlations with histologic parameters. J Cutan Pathol 1991;18(4):264-72.
- Talve LA, Collan YU, Ekfors TO. Nuclear morphometry, immunohistochemical staining with Ki-67 antibody and mitotic index in the assessment of proliferative activity and prognosis of primary malignant melanomas of the skin. J Cutan Pathol 1996;23(4):335-43.
- Smolle J, Soyer HP, Kerl H. Proliferative activity of cutaneous melanocytic tumors defined by Ki-67 monoclonal antibody. Am J Dermatopathol 1989;11(4):301-7.
- Rieger E, Hofmann-Wellenhof R, Soyer HP, Kofler R, Cerroni L, Smolle J, et al. Comparison of proliferative activity as assessed by proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 monoclonal antibodies in melanocytic skin lesions. A quantitative immunohistochemical study. J Cutan Pathol 1993;20(3):229-36.
- Chorny JA, Barr RJ, Kyshtoobayeva A, Jakowatz J, Reed RJ. Ki-67 and p53 expression in minimal deviation melanomas as compared with other nevocytic lesions. Mod Pathol 2003;16(6):525-9.
- Vereecken P, Laporte M, Heenen M. Significance of cell kinetic parameters in the prognosis of malignant melanoma: a review. J Cutan Pathol 2007;34(2):139-45.
- Kaleem Z, Lind AC, Humphrey PA, Sueper RH, Swanson PE, Ritter JH, et al. Concurrent Ki-67 and p53 immunolabeling in cutaneous melanocytic neoplasms: an adjunct for recognition of the vertical growth phase in malignant melanomas? Mod Pathol 2000;13(3):217-22.
- Hazan C, Melzer K, Panageas KS, Li E, Kamino H, Kopf A, et al. Evaluation of the proliferation marker MIB-1 in the prognosis of cutaneous malignant melanoma. Cancer 2002;95(3):634-40.
- Moretti S, Massobrio R, Brogelli L, Novelli M, Giannotti B, Bernengo MG. Ki67 antigen expression correlates with tumor progression and HLA-DR antigen expression in melanocytic lesions. J Invest Dermatol 1990;95(3):320-4.
- Ostmeier H, Suter L. The Ki-67 antigen in primary human melanomas--its relationship to mitotic rate and tumor thickness and its stability. Arch Dermatol Res 1989;281(3):173-7.
- Vogt T, Zipperer KH, Vogt A, Hölzel D, Landthaler M, Stolz W. p53-protein and Ki-67-antigen expression are both reliable biomarkers of prognosis in thick stage I nodular melanomas of the skin. Histopathology 1997;30(1):57-63.
- Elder DE, Elenitsas R, Murphy GF, Xu X. Benign pigmented lesions and malignant melanoma. Lever's Histopathology of the Skin. 9th ed. USA: Lippincott Williams&Wilkins; 2005. p.715-804.
- Tas F, Kurul S, Camlica H, Topuz E. Malignant melanoma in Turkey: a single institution's experience on 475 cases. Jpn J Clin Oncol 2006;36(12):794-9.
- Balch CM, Soong S, Ross MI, Urist MM, Karakousis CP, Temple WJ, et al. Long-term results of a multi-institutional randomized trial comparing prognostic factors and surgical results for intermediate thickness melanomas (1.0 to 4.0 mm). Intergroup Melanoma Surgical Trial. Ann Surg Oncol 2000;7(2):87-97.