

## Evaluation of the Relationship Between COX-2 and Ki-67 Expression and Tumor Grade and Cox-2, Ki-67 Expression in Astrocytomas

### Astrositomalarda COX-2 ve Ki-67 Ekspresyonu ve Tümör Grade'i ile COX-2, Ki-67 Ekspresyonu Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi

Aysun Gökce<sup>1</sup>, Selda Seçkin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Patoloji, Ankara  
<sup>2</sup>Emekli, Tıbbi Patoloji

Dergiye Ulaşma Tarihi: 19.01.2020 Dergiye Kabul Tarihi:11.02.2020 Doi: 10.5505/aot.2020.67299

#### ÖZET

**GİRİŞ ve AMAÇ:** Bu çalışmada farklı grade'deki astrositomalarda COX-2 ve Ki-67 ekspresyonu incelendi. Bu iki belirtecin grade'ler arasındaki ekspresyon farklılığı ve birbiri ile olan ilişkisi değerlendirildi  
**YÖNTEM ve GEREÇLER:** Çalışmaya retrospektif olarak 20 grade II, 20 grade III, 20 grade IV astrositoma tanısı almış toplam 60 operasyon materyali dahil edildi. İmmünohistokimyasal yöntemle Ki-67 ve COX-2 çalışıldı. Verilerin analizi SPSS for Windows 11.5 paket programında yapıldı. Shapiro Wilk testi, Mann Whitney U testi, Kruskal Wallis testi, çoklu karşılaştırma testi kullanıldı.

**BULGULAR:** Grade II'ye göre grade III ve IV astrositomalı olgularda COX-2 boyanma yaygınlığı daha yüksek olarak bulundu ( $p<0.001$  ve  $p<0.001$ ). Grade III ile grade IV astrositomalı olgular arasında COX-2 boyanma yaygınlığı açısından anlamlı farklılık yoktu ( $p=0.087$ ). Grade II'ye ve grade III'e göre grade IV'te COX-2 ile kuvvetli boyanan olgu sayısı fazla idi ( $p<0.001$  ve  $p=0.030$ ). Grade II ile grade III astrositomalı olgular arasında COX-2 boyanma yoğunluğu açısından anlamlı farklılık yoktu ( $p=0.198$ ). Grade II'ye göre grade III ve grade IV tümörlerde ayrıca grade III'e göre grade IV tümörlerdeki Ki-67 indeksi daha yüksek olarak bulundu ( $p=0.007$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ). COX-2 boyanması olmayan gruba ve zayıf boyanan gruba göre kuvvetli boyanan grubun Ki-67 indeksi daha yüksek olarak bulundu ( $p=0.004$  ve  $p=0.004$ ). Boyanmayan ve zayıf boyanan grup arasında Ki-67 indeksi benzerdi ( $p=0.096$ ).

**TARTIŞMA ve SONUÇ:** COX-2 ekspresyonunun astrositomaların progresyonunda rol oynayabileceği, daha agresif tümörleri yansıtabileceği, astrositomaların tedavisinde COX-2 inhibitörlerinin mevcut tedavi protokollerine ek terapötik role sahip olabileceği, farklı grade'e sahip tümörleri birbirinden ayırt etmede Ki-67'nin kullanılabileceği düşünüldü.

**Anahtar Kelimeler:** Astrositoma, COX-2, Ki-67

#### ABSTRACT

**INTRODUCTION:** In the present study, COX-2 and Ki-67 expression were investigated in astrocytomas of different grade. Difference between the expression levels of these two markers and their relationship with each other were evaluated.

**METHODS:** A total of 60 surgical materials diagnosed as 20 grade II, 20 grade III, 20 grade IV astrocytoma retrospectively were included in the study. Ki-67 and COX-2 were studied by immunohistochemical method. Data analysis was performed using SPSS for Windows, version 11.5. Shapiro Wilk test, Mann Whitney U test, Kruskal Wallis test, and multiple comparison test were used.

**RESULTS:** The prevalence of COX-2 staining was higher in patients with grade III and IV astrocytoma than grade II ( $p < 0.001$  and  $p < 0.001$ ). There was no significant difference between grade III and IV astrocytomas in terms of COX-2 staining prevalence ( $p = 0.087$ ). The number of cases stained with COX-2 in grade IV was higher than those of grade II and grade III ( $p < 0.001$  and  $p = 0.030$ ). There was no significant difference between Grade II and Grade III astrocytomas in terms of COX-2 staining intensity ( $p = 0.198$ ). Ki-67 index was higher in grade III and grade IV tumors compared to grade II and in grade IV tumors compared to grade III ( $p = 0.007$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ). The Ki-67 index of the strongly stained group was higher than the group without COX-2 staining and weak staining group ( $p = 0.004$  and  $p = 0.004$ ). Ki-67 index was similar between unstained and poorly stained groups ( $p = 0.096$ ).

**DISCUSSION AND CONCLUSION:** We conclude that COX-2 expression may play a role in the progression of astrocytomas, may be associated with more aggressive gliomas, and COX-2 inhibitors may have a therapeutic role in addition to the existing treatment protocols of astrocytomas, and Ki-67 immunostaining might be effective in differentiating tumors of different grades.

## GİRİŞ

Beyin tümörlerinin insidansı hafif olarak artmıştır ve prognoz özellikle yüksek grade'li neoplazilerde hala kötüdür (1). Gliomalar santral sinir sisteminin en sık görülen primer tümörleridir ve glial hücrelerden köken alan heterojen bir hastalık grubunu temsil ederler (2). Klinik ve patolojik kriterlerin baz alındığı gliomalı hastalarda sağkalım süresini öngörmek güçtür (3). Histopatolojik grade'leme sistemindeki sınırlamalar sürekli yardımcı diagnostik ve prognostik belirteçler arama ile sonuçlanmıştır (4).

Siklooksijenaz (COX) araşidonik asitten prostaglandin sentezinde rolü olan bir enzimdir (5,6). COX'un COX-1 ve COX-2 olmak üzere iki izoformu tanımlanmıştır. COX-1 ekspresyonu fizyolojik eikasonoid üretimi ile bağlantılıdır. COX-2 ekspresyonu ise karsinojenler, hormonlar, büyüme faktörleri, mitojenler, sitokinler, bakteriyel endotoksinler gibi çeşitli uyarımları takiben indüklenebilir (5-8). Güncel çalışmalar COX-2 ekspresyonundaki artışın kanserlerin gelişiminde rol oynayabileceğini ileri sürmüştür (6,9).

Son zamanlarda astrositik tümörlerde siklooksijenaz-2 (COX-2) ekspresyonunu, farklı grade'deki tümörler arasındaki ekspresyon farklılığını ve prognoz üzerine etkilerini değerlendiren çeşitli çalışmalar yapılmıştır (9-16). COX-2 ekspresyonundaki artış astrositomalar dışında baş-boyun, mide, pankreas, prostat, akciğer, over gibi çeşitli kanserlerde gösterilmiştir (17- 22). Mitotik indeks proliferatif olan tümörlerin tespitini kolaylaştırır. Proliferatif belirteçler proliferatif fazdaki hücrelerin daha kesin değerlendirilmesini sağlarlar (3). Ki-67 büyüme fraksiyonunun hızlı, tekrarlanabilir bir şekilde değerlendirilmesine izin verir (23). Bugüne kadar astrositomalarda Ki-67 boyanma indeksi ile sağ kalım süresi ve farklı grade'e sahip tümörler arasındaki ekspresyon farklılıklarını değerlendiren çok sayıda çalışma yapılmıştır (3,4,24-33).

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümünde değerlendirilen WHO grade II astrositoma,

WHO grade III astrositoma, (anaplastik astositoma), WHO grade IV astrositoma, (glioblastoma) tanısı almış 20'şer olguya ait toplam 60 operasyon materyali dahil edildi. Klinik bulgular bölüm arşivi kayıtlarından ve rapor örneklerinden elde edildi. Her operasyon materyaline ait formalin fikse, parafine gömülü bloklardan hazırlanan hematoksilin-eozin boyalı lamalar yeniden incelendi. Tümörü en iyi temsil eden bloklar belirlendi. Seçilen her bloktan 3-4 mikron kalınlığında kesitler adezivli lamlara alındı. İmmünohistokimyasal yöntemle Ki-67 (clone MIB-1, DAKO) ve COX-2 (Neomarkers) çalışıldı. Pozitif kontrol olarak COX-2 için kolon adenokarsinomu olgularına ait kesitler, Ki-67 için ise tonsilden hazırlanan kesitler kullanıldı. COX-2 için sitoplazmik, Ki-67 için nükleer boyanma dikkate alındı. COX-2 için yapılan değerlendirmede semikantitatif olarak boyanan hücrelerin yaygınlığı ve boyanma yoğunluğu esas alındı. Buna göre boyanma yoğunluğu için 0: Boyanma yok, 1+: zayıf boyanma, 2+: Kuvvetli boyanma; boyanma yaygınlığı için 1+: %0-25 hücrede boyanma, 2+: %26-50 hücrede boyanma, 3+: %51-75 hücrede boyanma ve 4+: %76-100 hücrede boyanma şeklinde skorlama yapıldı. Ki-67 için immünohistokimyasal çalışmada her olguda 1000 tümör hücresi üzerinden sayım yapıldı. Boyanan tümör hücre yüzdesi hesaplandı. Bu Ki-67 indeksi olarak değerlendirildi. Verilerin analizi SPSS for Windows 11.5 paket programında yapıldı. Sürekli değişkenlerin dağılımının normale uygun olup olmadığı Shapiro Wilk testi ile araştırıldı. Tanımlayıcı istatistikler sürekli yaş için ortalama  $\pm$  standart sapma, COX-2 yoğunluk, yaygınlık ve Ki-67 için ortanca (minimum- maksimum) olarak kategorik değişkenler ise vaka sayısı ve (%) olarak gösterildi. Grade grupları arasında yaş ortalaması yönünden farkın önemliliği Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) ve beraberinde post hoc Tukey testi ile cinsiyet dağılımının benzer olup olmadığı ise Pearson'un Kikare testi ile değerlendirildi. Bağımsız gruplar arasında Ki-67 boyanma yüzdesi ortancaları yönünden farkın önemliliği ise bağımsız grup sayısı iki olduğunda Mann Whitney U testi ile bağımsız grup sayısının ikiden fazla olduğu durumlarda ise Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi. Grade grupları

arasında COX-2 yoğunluk, yaygınlık düzeyleri yönünden farkın önemliliği de 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. Ki-67 boyanma yüzdesi ile yaş, COX-2 yoğunluk, yaygınlık düzeyleri arasındaki doğrusal ilişkinin büyüklüğü Spearman'ın rho katsayısı ve önemlilik düzeyi hesaplanarak incelendi. Grade II'yi grade III ve IV'ten ayırt etmede Ki-67 boyanma yüzdesinin etkili olup olmadığı ROC eğrisi altında kalan alan hesaplanarak değerlendirildi. Eğri altında kalan alanın önemli bulunması halinde 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.

## SONUÇLAR

Çalışmamızda retrospektif olarak 20'si grade II, 20'si grade III, 20'si grade IV olmak üzere toplam 60 astrositoma olgusu değerlendirildi. Olguların 34'ü (%56,7) erkek, 26'sı (%43,3) kadındı. Yaş aralığı 2-75 arasında değişmekte idi.

Grade'ler arasında yaş ortalamaları yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ( $p < 0.001$ ). Grade II ile grade III astrositoma olgularında yaş ortalamaları benzer iken ( $p = 0.558$ ), Grade IV astrositomaların yaş ortalaması grade II ve grade III astrositomalara göre daha yüksek bulundu. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı idi ( $p < 0.001$  ve  $p < 0.001$ ).

Grade II, grade III, grade IV astrositomalı olgular arasında cinsiyet dağılımı istatistiksel olarak benzer bulundu ( $p = 0.414$ ) (Tablo 1).

Bu özelliklere sahip olgularda immünohistokimyasal olarak COX-2 ve Ki-67 çalışıldı. Olguların 57'sinde (%95) COX-2 ile boyanma izlendi. Tüm olgularda değişen oranlarda (0,3-43,5) Ki-67 ile boyanma gözlemlendi.

COX-2 ile yapılan immünohistokimyasal çalışmada COX-2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu ayrı ayrı değerlendirildi. Tümör nekrozu çevresindeki alanlarda daha belirgin COX-2 ekspresyonu gözlemlendi. Ek olarak glomerüloid yapıdakileri

de içeren bazı vasküler endotelial hücrelerde, COX-2 pozitivitesi izlendi.

COX-2 yaygınlık skorları grade'e bağlı olarak anlamlı değişim göstermekte idi ( $p < 0.001$ ). Grade II'ye göre grade III ve IV tümörlerde COX-2 yaygınlık skoru daha yüksek bulundu. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı idi ( $p < 0.001$  ve  $p < 0.001$ ). Grade III ile grade IV tümörler arasında COX-2 boyanma yaygınlığı açısından anlamlı farklılık yoktu ( $p = 0.087$ ) (Figür 1).

COX-2 boyanma yoğunluğu grade'e bağlı olarak anlamlı değişim göstermekte idi ( $p = 0.003$ ). Grade II'ye ve grade III'e göre grade IV tümörlerde COX-2 boyanma yoğunluğu çoğu olguda kuvvetli olarak bulundu. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı idi ( $p < 0.001$  ve  $p = 0.03$ ). Grade II ile grade III tümörler arasında COX-2 boyanma yoğunluğu açısından anlamlı farklılık yok idi ( $p = 0.198$ ) (Tablo 2) (Figür 2).

Ki-67 boyanma indeksi grade II tümörlerde 0,3-16,3, grade III tümörlerde 1-40,7, grade IV tümörlerde 16,8-43,5 arasında değişmekte idi. Ki-67 boyanma düzeyi grade'e göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermekte idi ( $p < 0.001$ ). Grade II'ye (ortanca 2,75) göre grade III (ortanca 10,1) ve grade IV tümörlerde (ortanca 28,1) Ki-67 boyanma düzeyi daha yüksek bulundu. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı idi ( $p = 0.007$  ve  $p < 0.001$ ). Ayrıca, grade III'e göre grade IV tümörlerdeki Ki-67 boyanma düzeyi de daha yüksek bulundu. Bu fark da istatistiksel olarak anlamlı idi ( $p < 0.001$ ) (Tablo 3) (Figür 3).

Farklı grade'e sahip tümörleri birbirinden ayırt etmede Ki-67'nin etkili olduğu ROC analizi ile görüldü. Grade II tümörlerin grade III ve grade IV tümörlerden ayırt edilmesinde Ki-67'nin en iyi kesme noktası 16.5 olarak, grade IV tümörleri grade III ve II tümörlerden ayırt etmede ise en iyi kesme noktası 20.5 olarak saptandı (Figür 4).

COX-2 yaygınlığı 4+ olan grubun Ki-67 indeksi, 3+ olan grup, 2+ olan grup ve 1+ olan gruptan daha yüksek idi. 4+ yaygınlığa sahip olan grubun sırasıyla; 1+ ve 3+ olan gruba göre Ki-67 boyanma düzeyi arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ( $p < 0.001$  ve  $p = 0.016$ ). COX-2 yoğunluğu kuvvetli olan grubun Ki-67 indeksi, COX-2 yoğunluğu zayıf olan ve COX-2 ekspresyonu izlenmeyen gruptan daha yüksek idi. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı idi ( $p = 0.004$  ve  $p = 0.004$ ). COX-

2 ile boyanmayan ve zayıf boyanan grup arasında Ki-67 boyanma düzeyleri benzerdi ( $p=0.096$ ). Yaş arttıkça Ki-67 boyanma yüzdesinde de istatistiksel olarak anlamlı artış görülmekte idi ( $p<0.01$ ). Erkeklerde görülen Ki-67 indeksi kadınlarda görülen Ki-67 indeksinden daha yüksekti (Tablo 4).

**Tablo1.** Demografik Veriler

Değişkenler	Grade 2 (n=20)	Grade 3 (n=20)	Grade 4 (n=20)	p
Yaş (yıl)	35.8±12.3 <sup>c</sup>	40.0±13.1 <sup>d</sup>	56.1±11.7 <sup>c,d</sup>	<0.001 <sup>a</sup>
Cinsiyet E/K	9/11	12/8	13/7	0.414 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Tek Yönlü Varyans Analizi

<sup>b</sup> Pearson Ki-Kare testi.

<sup>c</sup> Grade 2 ile Grade 4 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.001$ ).

<sup>d</sup> Grade 3 ile Grade 4 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.001$ ).

**Tablo 2.** COX-2'nin Grade'e Göre Yaygınlık ve Yoğunluk Dağılımı

Değişkenler	Grade 2 (n=20)	Grade 3 (n=20)	Grade 4 (n=20)
<b>COX 2 Yaygınlık</b>			
1+	17 (%85.0)	3 (%15.0)	1 (%5.0)
2+	3 (%15.0)	1 (%5.0)	-
3+	-	4 (%20.0)	-
4+	-	12 (%60.0)	19 (%95.0)
<b>COX 2 Yoğunluk</b>			
Yok	3 (%15.0)	-	-
Zayıf	14 (%70.0)	15 (%75.0)	8 (%40.0)
Güçlü	3 (%15.0)	5 (%25.0)	12 (%60.0)

**Tablo3.** Grade'e Göre Cox 2'nin Yaygınlık, Yoğunluk ve Ki-67 Düzeyleri

Değişkenler	Grade 2 (n=20)	Grade 3 (n=20)	Grade 4 (n=20)	p <sup>a</sup>
Cox 2 Yoğunluk	1 (1-2) <sup>b,c</sup>	4 (1-4) <sup>b</sup>	4 (1-4) <sup>c</sup>	<0.001
Cox 2	1 (0-	1 (1-	2 (0-	0.003

Address for correspondence: Uzm. Dr. Aysun Gökçe Ziraat Mh., Şht. Ömer Halisdemir Blv, Dışkapı - Altındağ 06610 Ankara - Türkiye  
e-mail: [aysungokce80@yahoo.com.tr](mailto:aysungokce80@yahoo.com.tr)  
Available at [www.actaoncologica.turcica.com](http://www.actaoncologica.turcica.com)  
Copyright ©Ankara Onkoloji Hastanesi

Yaygınlık	2) <sup>c</sup>	2) <sup>d</sup>	2) <sup>c,d</sup>	
Ki-67	2.75 (0.3-16.3) <sup>b,c</sup>	10.1 (1.0-40.7) <sup>b,d</sup>	28.1 (16.8-43.5) <sup>c,d</sup>	<0.001

<sup>a</sup> Kruskal Wallis testi.

<sup>b</sup> Grade 2 ile Grade 3 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.01$ )

<sup>c</sup> Grade 2 ile Grade 4 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.001$ )

<sup>d</sup> Grade 3 ile Grade 4 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.05$ )

**Tablo 5.** Cinsiyet, COX-2 Yaygınlık ve Yoğunluğuna Göre Ki-67 Boyanma Yüzdesi

Değişkenler	Ki-67 Ortanca (Min.-Maks.)	p
<b>Cinsiyet</b>		
Erkek	16.1 (0.3-43.5)	0.765 <sup>a</sup>
Kadın	10.0 (1.1-40.7)	
<b>COX-2 Yaygınlık</b>		0.002 <sup>b</sup>
1+	3.8 (0.3-40.7) <sup>c</sup>	
2+	5.4 (1.7-30.5)	
3+	6.3 (1.0-19.3) <sup>d</sup>	
4+	22.8 (1.2-43.5) <sup>c,d</sup>	
<b>COX-2 Yoğunluk</b>		0.010 <sup>b</sup>
Yok	2.6 (0.4-6.6) <sup>e</sup>	
Zayıf	8.2 (0.3-43.5) <sup>f</sup>	
Güçlü	22.5 (3.2-43.2) <sup>e,f</sup>	

<sup>a</sup> Mann Whitney U testi.

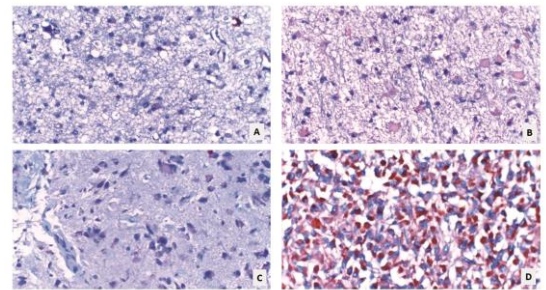
<sup>b</sup> Kruskal Wallis testi.

<sup>c</sup> Cox-2 yaygınlığı 1+ olan grup ile 4+ arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.001$ )

<sup>d</sup> Cox-2 yaygınlığı 3+ olan grup ile 4+ arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ( $p=0.016$ )

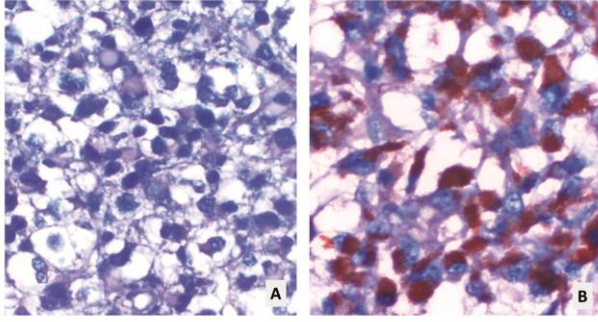
<sup>e</sup> Cox-2 yoğunluğu olmayan grup ile güçlü olan grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ( $p=0.004$ )

<sup>f</sup> Cox-2 yoğunluğu zayıf olan grup ile güçlü olan grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ( $p=0.004$ )

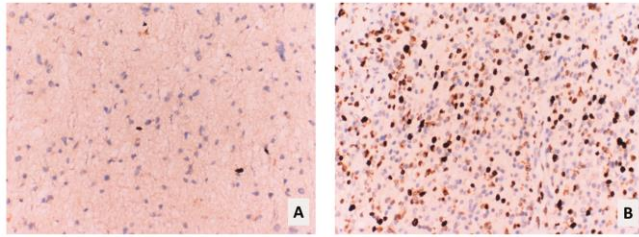


**Figür 1.A:** Grade II astrositomada COX-2 ile 1+ boyanma yaygınlığı (x200), **B:** Grade II astrositomada COX-2 ile 2+ boyanma yaygınlığı (x200), **C:** Grade III astrositomada COX-2 ile 3+ boyanma yaygınlığı (x200), **D:** Grade IV astrositomada COX-2 ile 4+ boyanma yaygınlığı (x200)

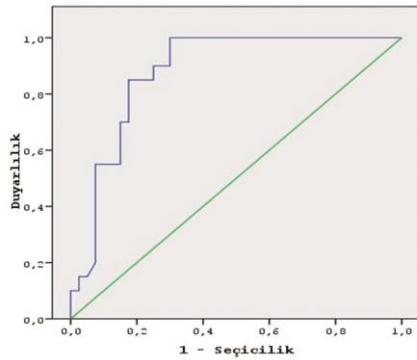




**Figür 2.A:** Grade III astrositomada COX-2 ile zayıf boyanma (x400), **B:** Grade IV astrositomadaki COX-2 ile kuvvetli boyanma (x400)



**Figür 3.A:** Grade II astrositomada düşük Ki-67 immünreaktivitesi (x200), **B:** Grade IV astrositomada Ki-67 ile yaygın nükleer ekspresyon (x200)



**Figür 4:** ROC eğrisi

## TARTIŞMA

Astrositomalarda tek başına grade baz alındığında hastaların klinik gidişini saptamak mümkün değildir. Çünkü aynı grade'deki astrositomalar farklı davranabilirler (32).

Çalışmamıza dahil ettiğimiz toplam 60 olgudan 34'ü (%56,7) erkek, 26'sı (%43,3) kadındı. Beyin tümörlerinin erkeklerde biraz

daha fazla görülme eğiliminde olduğu bilinmektedir. Olgulardaki yaş aralığı 2-75 arasında değişmekteydi. Grade II ile grade III astrositomalı olgularda yaş ortalamaları benzer iken ( $p=0.558$ ), grade IV astrositomalı olguların yaş ortalaması grade II ve grade III astrositomalı olgulara göre daha yüksek olarak bulundu. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı idi ( $p<0.001$  ve  $p<0.001$ ). Glioblastomalı olguların grade II ve grade III olgulara göre daha ileri yaşta görülme eğilimleri olduğu bilinmektedir.

Çalışmamızda grade II'li olguların 17'sinde, grade III ve IV'lü olguların tamamında COX-2 ile boyanma gözlemlendi (%95). Astrositik tümörlerde raporlanan COX-2 immünreaktivitesinin sıklığı %55 ile %100 arasında değişmektedir (12,34). Çalışmamızda elde ettiğimiz oran (%95) Perdiki ve arkadaşları (ark.)nın sonuçları ile aynı (%95) idi ve Joki ve ark.nın çalışma sonuçları ile çok benzerdi (%94) (13,16).

Biriken kanıtlar ile kanserlerin gelişiminde COX-2 yolu ile PG seviyelerindeki artışın önemli olduğu düşünülmektedir (35). Gliomaların progresyon ve formasyonunda COX-2 ve PG'lerin önemi ve tümör grade'i ile artmış PG sentezi arasında korelasyonlar ve gliomalar içinde PG seviyelerinde artış tanımlanmıştır (36).

Bu çalışmada grade II'ye göre grade III ve IV astrositomalı olgularda COX-2 yaygınlık skoru daha yüksek olarak bulundu. ( $p<0.001$  ve  $p<0.001$ ). Grade III ile grade IV astrositomalı olgular arasında COX-2 boyanma yaygınlığı açısından anlamlı farklılık yoktu ( $p=0.087$ ). Lee ve ark., Shono ve ark. yaptıkları çalışmada COX-2 ekspresyon oranı ile hasta sağkalım süresi ve tümörün patolojik grade'i korele bulunmuştur (11,12). Perdiki ve ark. ve El-Sayed grade IV astrositomalarda grade II ve grade III astrositomalarından daha yüksek COX-2 ekspresyonu gözlemiştir (9,13). Joki ve ark.nın çalışmasında da COX-2 yaygınlığı grade ile korele olarak bulunmuştur (16). Zhang F ve ark. grade I-II ile kıyaslandığında grade III-IV olgularda daha yüksek COX-2 ekspresyonu saptamıştır (10).

Bu çalışmada COX-2 boyanma yoğunluğu grade'e bağlı olarak anlamlı değişim göstermekte idi ( $p=0.003$ ). Joki ve ark.nın çalışmasında 15 grade II astrositomanın tamamında zayıf boyanma gözlenirken 10 grade III astrositomanın 9'unda, 25 grade IV

astrositomanın 16'sında COX-2 ile kuvvetli boyanma elde edilmiştir (16). Yüksek grade'li tümörlerde daha yaygın ve daha yoğun COX-2 ekspresyonu izlenmesi nedeniyle astrositomalarda tümör progresyonunda COX-2'nin önemli rol oynayabileceği ve COX-2 ekspresyonunun daha agresif tümörleri yansıtabileceği düşüncesi oluşmuştur.

Diğer organlarda COX-2 ile yapılan çalışmalarda değişik sonuçlar elde edilmiştir. Sung ve ark.nın yaptığı çalışmada kronik aktif gastrit, atrofik gastrit, intestinal metaplazi ve mide adenokarsinomu olguları arasında COX-2 ekspresyonu açısından korelasyon bulunamamıştır (37). Okami ve ark. pankreatik benign kistadenomalarda zayıf, pankreatik karsinomalarda ise kuvvetli COX-2 pozitivitesi izlemiştir (38). Yoshimura ve ark. benign prostat hipertrofisinde zayıf COX-2 ekspresyonu izlerken, prostat karsinomunda belirgin boyanma gözlemişlerdir (39).

Çalışmamızdaki COX-2 pozitif tümör hücreleri tümör dokusunda dağınık olarak izlenmekte idi. Bununla birlikte, tümör nekrozu çevresindeki alanlarda daha belirgin COX-2 ekspresyonu gözlemlendi. Çeşitli çalışmalarda bizim çalışmamızdakine benzer şekilde tümör nekrozu çevresindeki alanlarda belirgin COX-2 ekspresyonu olduğu raporlanmıştır (12,13,15,34). Joki ve ark. ise tümör nekrozu çevresindeki alanlarda COX-2 ekspresyonunda belirginleşme gözlememiştir (16). Çalışmamızda gözlediğimiz tümör nekrozu çevresindeki alanlar da daha belirgin COX-2 ekspresyonu, iskemi ve travmada olduğu gibi hipoksi ya da hipoglisemi tarafından COX-2'nin indüklendiğini gösteriyor olabilir. Bununla beraber, nekroz bulunmayan alanlarda da COX-2 boyanmasının gözlenmesi, COX-2'nin esas olarak tümör hücreleri tarafından eksprese ediliyor olabileceğini akla getirmektedir.

Çalışmamızda glomerüloid yapıdakileri de içeren bazı vasküler endotelial hücrelerde COX-2 pozitivitesi izlendi. Astrositomalarda COX-2 ile yapılan bazı çalışmalarda endotelial hücrelerde COX-2 pozitivitesi izlenmiştir (12,13,14,15,16). Anjiogenezis çoğu neoplazminin gelişim, progresyon ve metastazında esas komponenttir. Tümör anjiogenik peptitler sekrete eder ve bunlar tümör neovaskülarizasyonuna katkıda bulunur. Neovaskülarizasyon ise tümör büyümesi için gerekli kanı sağlar (3).

Anjiogenezis, astrositik gliomaların gelişiminde neovaskülarizasyonu indükleyen ve inhibe eden çeşitli moleküller arasındaki dengeye bağımlı olarak anahtar rol oynar. Astrositik gliomaların büyümesi için öncesinde neoangiogenezis gereklidir. Vasküler proliferasyon ve tümörün agresifliği arasında korelasyon tanımlanmıştır. Anjiogenezis çok kompleks ve çok basamaklı bir durumdur (14). Bir çalışmada COX-2 ekspresyonu güçlü bir şekilde INOS, VEGF ve yüksek MVD ile bağlantılı bulunmuştur. Tek değişkenli analizlerde COX-2 ekspresyonu ve kötü gidiş arasında önemli bağlantı gösterilmiştir. COX-2 ve VEGF bağlantılı anjiogenezis için elde edilen bu bulgular COX-2 yolunun yeni damar yapısını destekleyerek astrositik tümörigenezise katkıda bulunabileceği düşüncesine sebep olmuştur (14). Diğer bir çalışmada da COX-2, VEGF ve MVD arasında pozitif korelasyon bulunmuştur (9). Bizim çalışmamızda hiperplastik endotelial hücrelerde COX-2 ile boyanma olması, angiogeneziste COX-2'nin rol oynayabileceğini düşündürmüştür.

14 primer ve 14 rekürren glioblastoma olgusunun dahil edildiği bir çalışmada immünohistokimyasal olarak COX-2 ve EGFR çalışılmış ve aynı hastanın primer tümörü ve rekürrensi arasında COX-2 ekspresyonu açısından korelasyon bulunamamıştır. Fakat daha yüksek COX-2 ekspresyonu olanlarda daha erken rekürrens görülebildiği saptanmıştır. COX-2 ekspresyonu ve sağkalım süresi arasında korelasyon gösterilememiştir (15). Başka çalışmalarda da COX-2 ekspresyon oranı yüksek olan olgularda sağkalım süresi daha kısa olarak bulunmuştur. Tümör hücrelerindeki yüksek COX-2 ekspresyonu klinik olarak daha agresif gliomalar ile ilişkilidir ve kötü prognozu gösterir sonucuna ulaşmışlardır (10,11). Shono ve ark. glioblastomalı olgularda radyoterapiyi takiben COX-2 pozitif tümör hücreleri %50-100 arasında olanların pozitif tümör hücreleri %0-50 arasında olanlardan daha kısa sağkalım süresine sahip olduklarını göstermiştir. COX-2 ekspresyonunun olguların gidişatının tespitinde güçlü bir gösterge olduğu sonucuna ulaşılmıştır (12). Buccoliera ve ark.nın oligodendrogliomalarda yaptığı bir çalışmada, yüksek grade'li olanlarda düşük grade'lilerden daha yüksek COX-2 ekspresyonu izlenmiştir. COX-2 negatif

olguların, COX-2 pozitif olanlardan daha uzun sağkalım süresine sahip oldukları gözlenmiştir. COX-2 overekspresyonunun prognostik önemi muhtemel olarak bu enzimin tümör büyüme ve progresyonunu stimüle etme kapasitesine dayanır (40). Bizim çalışmamızda yüksek grade'li olgularda düşük grade'li olgulardan daha yüksek COX-2 ekspresyonu izlendi. Grade arttıkça prognozun kötüleştiği göz önüne alınırsa yüksek COX-2 ekspresyonunun kötü prognozu gösterdiği düşünülebilir.

COX-2'nin nasıl bir mekanizma ile kanser gelişimine katkıda bulunduğu hala açık değildir. Biyolojik ve klinik kanıtlar ile COX-2'nin tümör ile ilişkili birkaç süreçte moleküler seviyelerde işin içine karıştığı düşünülmektedir. Tümör süpresör gen olan p53 çoğu kanserde inaktivedir ya da mutasyona uğramıştır. p53 aynı zamanda COX-2 ekspresyonunu inhibe edebilir. Mutant p53 COX-2 seviyelerini azaltamaz (41). p53 mutasyonu yüksek grade'li gliomalarda düşük grade'li gliomalardan daha sık gözlenir (13). p53 ve COX-2 arasındaki bağlantıyı açığa çıkarmak, tümör grade'indeki artış ile COX-2 seviyelerinde niçin artma olduğunu anlamada önemli olabilir.

Selektif COX-2 inhibisyonu glioma hücrelerinde apoptozisi indükler ve proliferasyonu azaltır (13,42). Joki ve ark. bir COX-2 inhibitörü olan NS-398 ile insan glioma hücrelerinde apoptoziste artış, proliferasyon ve invazyonda azalma olduğunu gözlemişlerdir (16). Artmış COX-2 ekspresyonu, antiapoptotik protein olan bcl-2'nin miktarındaki artış ile ilişkilidir (43). Rat intestinal epitel hücrelerinde artmış COX-2 ekspresyonu ile bu hücrelerde apoptoz eğiliminde azalma olduğu yönünde bilgi mevcuttur (12). Sato A ve ark.nın bir çalışmada COX-2 blokajının apoptozisi indüklediği bulunmuştur (42). COX-2 normal dokularda ya hiç ekprese olmaz ya da çok az ekprese olur iken malign dokularda ekspresyonunun arttığından beri, COX-2 bağlantılı yollar terapötik yaklaşımlar için potansiyel hedef olarak tanımlanmıştır (15).

Çalışmamızda grade arttıkça astrositomadaki Ki-67 boyanma indeksinde artma olduğu gözlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda da bizim çalışmamızdakine benzer şekilde astrositomadaki Ki-67 boyanma indeksinin grade arttıkça artma

eğiliminde olduğu gözlenmiştir (3,4,26,27,28,30,33,44,45,46). Bu sonuçlara göre grade ile Ki-67 indeksindeki artış, daha kötü seyirli hastalık ile bağlantılı gözükmektedir.

Çalışmaların bazılarında grade II astrositoma ile grade III astrositoma ve grade II astrositoma ile grade IV astrositoma arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunurken grade III astrositoma ile grade IV astrositoma arasındaki ayırmda farklılık gözlenmemiştir (3,26,27,28,45,46). Bazı araştırmalarda ise bizim çalışmamıza benzer şekilde düşük ve yüksek grade'liler yanısıra grade III astrositoma ve grade IV astrositoma arasında da Ki-67 indeksi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlenmiştir (33,44,47). Bu sonuçlar özellikle küçük biyopsilerde Ki-67 indeksinin histopatolojik, radyolojik ve klinik bulgulara ek tanısal yardımcı metod olarak kullanılabilirliğini düşündürmüştür. Prognostik faktör olarak Ki-67 indeksini değerlendiren çalışmalarda belirlenen 'cut-off' değerleri oldukça değişkendir. Hsu ve ark.nın yapmış olduğu çalışmada Ki-67 indeksi >1,5 bulunanlar daha kötü prognoz ile bağlantılı iken, Schiffer ve ark.nın çalışmasında Ki-67 indeksi >8 olanlar daha kısa survival ile bağlantılı olarak bulunmuştur (26,31). Bir başka çalışmada ise prognostik değer için 'cut-off' noktası 2,8 olarak bulunmuştur (45). Sallinen ve ark.nın yapmış olduğu çalışmada Ki-67 indeksi açısından grade II ile grade III tümörler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar elde edilmiştir. En iyi sensitivite ve spesifiteye Ki-67 indeksi için 'cut-off' değerinin 8 olduğu durumda ulaşılmıştır. Prognostik değer için 'cut-off' noktası ise 15,3 olarak değerlendirilmiştir (48). Bizim çalışmamızda grade II tümörlerin grade III ve grade IV tümörlerden ayırt edilmesinde Ki-67'nin en iyi kesme noktası 16,5 olarak bulundu. Grade IV tümörleri indeksi açısından 16,5'un altındaki değere sahip olgular %100 seçicilik %40 duyarlılık oranında grade II tanısı almaktadır. Ki-67 indeksi açısından 20,5'un üzerindeki değere sahip olgular ise %95 duyarlılık, %75 seçicilik oranında grade IV tanısı almaktadır.

Astrositomalarda Ki-67 indeksini değerlendiren çalışmalarda grade'ler için bulunan ortalama ve ortanca değerler oldukça değişkendir. Hsu ve ark.nın 16 grade II astrositoma, 31 grade III astrositoma, 33 grade



IV astrositoma olgusunu içeren çalışmasında ortalama Ki-67 değerleri sırasıyla; 0,88, 8,75, 9,12 olarak gözlenmiştir (26). Eneström ve ark.nın 6 grade II astrositoma, 9 grade III astrositoma, 7 grade IV astrositoma olgusunda yapmış olduğu bir çalışmada ise ortalama Ki-67 değerleri sırasıyla; 7,6, 13,3, 24,3 olarak izlenmiştir (44). Yani bir çalışmada grade IV astrositoma için gösterilen değer başka bir çalışmadaki grade II astrositomada saptanan değer ile aynı olabilir. Bu da Ki-67 indeksinin tek başına tanı koymada yeri olmadığını, ancak diğer histopatolojik, klinik, radyolojik bulgular ile beraber değerlendirildiğinde anlamlı sonuçlara ulaşabileceğini göstermektedir. Gerek diagnostik gerek prognostik amaçlı belirlenen ortalama Ki-67 düzeyleri oldukça değişkenlik göstermektedir. Yapılan çalışmalar arasında ve hatta aynı tümördeki farklı örneklerde bile ortalama Ki-67 indeksini saptamak hala problemdir. Bu durum, Ki-67 indeksi için standardizasyon kurulmak istenmesine rağmen laboratuvarlar arasındaki farklılığı yansıtıyor olabilir. Bu değişkenlik immünohistokimyasal prosedür ve immün boyamanın yorumundaki farklılıklar, doku seçimi ve tümörün heterojenliğine de bağlı olabilir. Çalışmamızda COX-2 boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu arttıkça Ki-67 boyanma yüzdesinde de istatistiksel olarak anlamlı artış görülmekte idi. Shono ve ark.nın yapmış olduğu çalışmada yüksek COX-2 ekspresyonu artmış histolojik grade ile korele olarak bulunur iken, p53 immün boyanması, bcl-2 ekspresyonu, retinoblastoma (Rb) protein ekspresyonu, p16 kaybı ve yüksek MIB-1 ekspresyonu ile korele bulunmamıştır (12). Perdiki ve ark. ise COX-2 ekspresyonundaki artış ile histolojik grade, proliferatif potansiyel ve bu tümörlerde anjiogenezisi yönlendirdiği bilinen VEGF, anjiogenik faktör HIF-1 $\alpha$  ekspresyonu ve vasküler yüzey alanı ile yakın ilişki saptamışlardır (13). Prayson ve ark. 47 glioblastoma olgusunda immünohistokimyasal olarak MIB1 ve COX-2 boyanması arasındaki korelasyonu değerlendirmiş ve daha yüksek hücre proliferasyon oranına sahip tümörlerin, COX-2 ekspresyonunda artma eğilimi olduğunu göstermiştir (49). Bu çalışmada da Perdiki ve ark. ve Prayson ve ark.nın çalışmasındakine benzer şekilde COX-2 ekspresyonu ve Ki-67 indeksi ilişkili bulunmuştur. Proliferatif aktivitede artış ile COX-2 ekspresyonundaki artış korele olarak

değerlendirilmiştir. Bu durum COX-2 ekspresyonundaki artışın astrositomaların proliferasyonunda rol oynayabileceğini ya da proliferatif aktivitenin COX-2 ekspresyonunda artışa neden olabileceğini düşündürmüştür.

Bu çalışmada yaş arttıkça Ki-67 boyanma yüzdesinde de istatistiksel olarak anlamlı artış görülmekte idi. Astrositomalı olgularda, herhangi bir histolojik grade'e sahip olguda yaş ile sağ kalım ters orantılıdır. Bu sebeple yaş arttıkça tümörlerdeki proliferatif potansiyelin bir göstergesi olan Ki-67 indeksinde de artış olabilir

## SONUÇ

Sonuçlar yüksek COX-2 ekspresyonunun astrositomaların progresyonunda, proliferasyonunda rol oynayabileceğini, daha agresif tümörleri yansıtabileceğini, astrositomaların tedavisinde COX-2 inhibitörlerinin mevcut tedavi protokollerine ek olarak potansiyel bir terapötik role sahip olabileceğini düşündürdü.

Ayrıca farklı grade'e sahip tümörler arasında, Ki-67 indeksi açısından anlamlı farklılıklar olması nedeni ile özellikle küçük biyopsilerde tümörler değerlendirilirken Ki-67 indeksinin ek tanısal yöntem olabileceği düşünülmüştür. Ki-67 indeksindeki artış, daha kötü seyirli hastalık ile de bağlantılı gözükmektedir.

## REFERANSLAR

1. Gholamrezanezhad A, Shooli H, Jokar N, Nemati R, Assadi M. Radioimmunotherapy (RIT) in Brain Tumors. Nucl Med Mol Imaging 2019; 53(6): 374-81.
2. Pessoa IA, Amorim CK, Ferreira WAS, et al. Detection and Correlation of Single and Concomitant TP53, PTEN, and CDKN2A Alterations in Gliomas. Int J Mol Sci 2019; 20(11).
3. McKeever PE, Ross DA, Strawderman MS, Brunberg JA, Greenberg HS, Junck L. A comparison of the predictive power for survival in gliomas provided by MIB-1, bromodeoxyuridine and proliferating cell nuclear antigen with histopathologic and clinical parameters. J Neuropathol Exp Neurol 1997; 56(7): 798-805.
4. Johannessen AL, Torp SH. The clinical value of Ki-67/MIB-1 labeling index in human astrocytomas. Pathol Oncol Res 2006; 12(3): 143-7.





5. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *Faseb j* 1998; 12(12): 1063-73.
6. Taketo MM. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part I). *J Natl Cancer Inst* 1998; 90(20): 1529-36.
7. DuBois RN, Awad J, Morrow J, Roberts LJ, 2nd, Bishop PR. Regulation of eicosanoid production and mitogenesis in rat intestinal epithelial cells by transforming growth factor-alpha and phorbol ester. *J Clin Invest* 1994; 93(2): 493-8.
8. Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 1996; 271(52): 33157-60.
9. El-Sayed M, Taha MM. Immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 in astrocytoma: correlation with angiogenesis, tumor progression and survival. *Turk Neurosurg* 2011; 21(1): 27-35.
10. Zhang F, Chu J, Wang F. Expression and clinical significance of cyclooxygenase 2 and survivin in human gliomas. *Oncol Lett* 2017; 14(2): 1303-8.
11. Lee JM JS, Rhu HH, Kim IY, Lee MC. Cyclooxygenase-2 Expression Predicts Prognosis in Astrocytic Tumors. *J Korean Neurosurg Soc* 2004; 36: 437-42..
12. Shono T, Tofilon PJ, Bruner JM, Owolabi O, Lang FF. Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. *Cancer Res* 2001; 61(11): 4375-81.
13. Perdiki M, Korkolopoulou P, Thymara I, et al. Cyclooxygenase-2 expression in astrocytomas. Relationship with microvascular parameters, angiogenic factors expression and survival. *Mol Cell Biochem* 2007; 295(1-2): 75-83.
14. Hara A, Okayasu I. Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in human astrocytic gliomas: correlation with angiogenesis and prognostic significance. *Acta Neuropathol* 2004; 108(1): 43-8.
15. Sminia P, Stoter TR, van der Valk P, et al. Expression of cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor in primary and recurrent glioblastoma multiforme. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131(10): 653-61.
16. Joki T, Heese O, Nikas DC, et al. Expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) in human glioma and in vitro inhibition by a specific COX-2 inhibitor, NS-398. *Cancer Res* 2000; 60(17): 4926-31.
17. Zweifel BS, Davis TW, Ornberg RL, Masferrer JL. Direct evidence for a role of cyclooxygenase 2-derived prostaglandin E2 in human head and neck xenograft tumors. *Cancer Res* 2002; 62(22): 6706-11.
18. Buskens CJ, Sivula A, van Rees BP, et al. Comparison of cyclooxygenase 2 expression in adenocarcinomas of the gastric cardia and distal oesophagus. *Gut* 2003; 52(12): 1678-83.
19. Molina MA, Sitja-Arnau M, Lemoine MG, Frazier ML, Sinicrpe FA. Increased cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic carcinomas and cell lines: growth inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Res* 1999; 59(17): 4356-62.
20. Liu XH, Yao S, Kirschenbaum A, Levine AC. NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells. *Cancer Res* 1998; 58(19): 4245-9.
21. Brown JR, DuBois RN. Cyclooxygenase as a target in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10(12 Pt 2): 4266s-9s.
22. Erkinheimo TL, Lassus H, Sivula A, et al. Cytoplasmic HuR expression correlates with poor outcome and with cyclooxygenase 2 expression in serous ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63(22): 7591-4.
23. Key G, Becker MH, Baron B, et al. New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. *Lab Invest* 1993; 68(6): 629-36.
24. Alimohammadi E, Bagheri SR, Sadeghsalehi A, Rizevandi P, Rezaie Z, Abdi A. Prognostic factors in patients with glioblastoma multiforme: focus on the pathologic variants. *Acta Neurol Belg* 2019.
25. Ahmadipour Y, Jabbarli R, Gembruch O, et al. Impact of Multifocality and Molecular Markers on Survival of Glioblastoma. *World Neurosurg* 2019; 122: e461-e6.
26. Hsu DW, Louis DN, Efird JT, Hedley-Whyte ET. Use of MIB-1 (Ki-67) immunoreactivity in differentiating grade II and grade III gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56(8): 857-65.
27. Karamitopoulou E, Perentes E, Diamantis I, Maraziotis T. Ki-67 immunoreactivity in human central nervous system tumors: a study with MIB 1 monoclonal antibody on archival material. *Acta Neuropathol* 1994; 87(1): 47-54.
28. Khalid H, Shibata S, Kishikawa M, Yasunaga A, Iseki M, Hiura T. Immunohistochemical analysis of progesterone receptor and Ki-67 labeling index in astrocytic tumors. *Cancer* 1997; 80(11): 2133-40.
29. Reavey-Cantwell JF, Haroun RI, Zahurak M, et al. The prognostic value of tumor markers in patients with glioblastoma multiforme: analysis of 32 patients and review of the literature. *J Neurooncol* 2001; 55(3): 195-204.
30. Giangaspero F, Doglioni C, Rivano MT, Pileri S, Gerdes J, Stein H. Growth fraction in human brain tumors defined by the monoclonal antibody Ki-67. *Acta Neuropathol* 1987; 74(2): 179-82.
31. Schiffer D, Cavalla P, Chio A, Richiardi P, Giordana MT. Proliferative activity and prognosis of low-grade astrocytomas. *J Neurooncol* 1997; 34(1): 31-5.
32. Torp SH, Alsaker M. Ki-67 immunoreactivity, basic fibroblastic growth factor (bFGF) expression, and microvessel density as supplementary prognostic tools in low-grade astrocytomas. An immunohistochemical study with special reference to the reliability of

- different Ki-67 antibodies. *Pathol Res Pract* 2002; 198(4): 261-5.
33. Wakimoto H, Aoyagi M, Nakayama T, et al. Prognostic significance of Ki-67 labeling indices obtained using MIB-1 monoclonal antibody in patients with supratentorial astrocytomas. *Cancer* 1996; 77(2): 373-80.
  34. Deininger MH, Weller M, Streffer J, Mittelbronn M, Meyermann R. Patterns of cyclooxygenase-1 and -2 expression in human gliomas in vivo. *Acta Neuropathol* 1999; 98(3): 240-4.
  35. Taketo MM. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (Part II). *J Natl Cancer Inst* 1998; 90(21): 1609-20.
  36. Castelli MG, Chiabrando C, Fanelli R, et al. Prostaglandin and thromboxane synthesis by human intracranial tumors. *Cancer Res* 1989; 49(6): 1505-8.
  37. Sung JJ, Leung WK, Go MY, et al. Cyclooxygenase-2 expression in Helicobacter pylori-associated premalignant and malignant gastric lesions. *Am J Pathol* 2000; 157(3): 729-35.
  38. Okami J, Yamamoto H, Fujiwara Y, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 in carcinoma of the pancreas. *Clin Cancer Res* 1999; 5(8): 2018-24.
  39. Yoshimura R, Sano H, Masuda C, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in prostate carcinoma. *Cancer* 2000; 89(3): 589-96.
  40. Buccoliero AM, Caldarella A, Arganini L, et al. Cyclooxygenase-2 in oligodendroglioma: possible prognostic significance. *Neuropathology* 2004; 24(3): 201-7.
  41. Subbaramaiah K, Altorki N, Chung WJ, Mestre JR, Sampat A, Dannenberg AJ. Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by p53. *J Biol Chem* 1999; 274(16): 10911-5.
  42. Sato A, Mizobuchi Y, Nakajima K, et al. Blocking COX-2 induces apoptosis and inhibits cell proliferation via the Akt/survivin- and Akt/ID3 pathway in low-grade-glioma. *J Neurooncol* 2017; 132(2): 231-8.
  43. Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 1995; 83(3): 493-501.
  44. Enestrom S, Vavruch L, Franlund B, Nordenskjold B. Ki-67 antigen expression as a prognostic factor in primary and recurrent astrocytomas. *Neurochirurgie* 1998; 44(1): 25-30.
  45. Ralte AM, Sharma MC, Karak AK, Mehta VS, Sarkar C. Clinicopathological features, MIB-1 labeling index and apoptotic index in recurrent astrocytic tumors. *Pathol Oncol Res* 2001; 7(4): 267-78.
  46. Torp SH. Diagnostic and prognostic role of Ki67 immunostaining in human astrocytomas using four different antibodies. *Clin Neuropathol* 2002; 21(6): 252-7.
  47. Di X, Nishizaki T, Harada K, Kajiwara K, Nakayama H, Ito H. Proliferative potentials of glioma cells and vascular components determined with monoclonal antibody MIB-1. *J Exp Clin Cancer Res* 1997; 16(2): 153-7.
  48. Sallinen PK, Haapasalo HK, Visakorpi T, et al. Prognostication of astrocytoma patient survival by Ki-67 (MIB-1), PCNA, and S-phase fraction using archival paraffin-embedded samples. *J Pathol* 1994; 174(4): 275-82.
  49. Prayson RA, Castilla EA, Vogelbaum MA, Barnett GH. Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by immunohistochemistry in glioblastoma multiforme. *Ann Diagn Pathol* 2002; 6(3): 148-53.