

## Meme Kanserinde Ki67 İndeks Ölçümlerinin Manuel ve Dijital Yöntemler Açısından Kıyaslanması

Zuhal KUŞ SİLAV\*

### Öz

**Amaç:** Meme kanserinde immunhistokimyasal biyobelirteç olarak umut vaat eden Ki67 proteini, mitoz döngüsünün tüm aktif fazlarında bulunduğundan hücre proliferasyon değerlendirmelerinde kullanılır. Ki67 indeksi meme kanserli hastalarda prediktif ve prognostik değerdedir. Manuel değerlendirme (MD) ile Ki67 sayımı gözlemciler arası değişkenliğe hassas ve zaman alıcıdır. Son yıllarda, dijital görüntü analizinin (DGA) Ki67 ölçümleri için hızlı ve objektif olduğunu belirten çalışmalar artmaktadır ancak bu yöntemin rutin uygulamaya girmesi ileri çalışmaları gerektirmektedir. Bu çalışmada 85 invaziv meme kanseri vakasında MD, DGA ve GK (göz kararı) Ki67 ölçümlerini kıyaslanmıştır.

**Yöntem:** Tümör moleküler tipleri, mitoz sayıları, GK, MD ve DGA ile ölçülmüş Ki67 değerleri ve korelasyonları saptandı. DGA analizleri ViraPath (Virasoft Yazılım, İstanbul, Türkiye) yazılımıyla, parametreler arasında istatistik korelasyonlar NCSS (Number Cruncher Statistical System, 2020) ile incelendi.

**Bulgular:** Her üç farklı metotla belirlenmiş Ki67 indeks değerlerinin yaş, histolojik derece, mitoz sayıları ve moleküler tip açısından korelasyon ve farklılıkları literatür ile uyumlu bulundu. DGA ve MD ile sayılmış Ki67 indeksleri arasında sınıf içi korelasyon katsayısı 0,974 olarak ölçüldü ve Bland Altman analizleri ile MD ve DGA sayımları arasındaki fark sifra yakın saptandı.

**Sonuç:** DGA sayımları MD'nin yerini alacak güvenilirlikte sonuçlar vermektedir. Çok merkezli ve metot standartlarını optimize edecek çalışmalarla patoloji pratiğine zamansal katkı ve yüksek hassasiyet kazandırılabilir.

**Anahtar Sözcükler:** Meme kanseri, Ki67, manuel sayım, dijital görüntü analizi.

---

### Özgün Araştırma Makalesi (Original Research Article)

**Geliş / Received:** 18.05.2023 & **Kabul / Accepted:** 11.07.2023

**DOI:** <https://doi.org/10.38079/igusabder.1299072>

\* Dr. Öğr. Üyesi, Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Bölümü, İstanbul, Türkiye.

E-posta: [zuhalsilavkus@gmail.com](mailto:zuhalsilavkus@gmail.com) **ORCID** <https://orcid.org/0000-0002-6586-8092>

---

**ETİK BİLDİRİM:** Çalışma Helsinki Bildirgesi'nin en son revize edilmiş etik kriterlerine uygun planlanmış ve çalışmanın yürütüldüğü Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden 09.01.2023 tarih ve 2023-01-14 sayılı etik onam alınmıştır.

## Comparison of Ki67 Index Measurements in Breast Cancer with Manual and Digital Methods

### Abstract

**Aim:** Ki67 protein, which shows promise as an immunohistochemical biomarker in breast cancer, is used in cell proliferation assessments since it is present in all active phases of the mitotic cycle. Ki67 index has predictive and prognostic value in patients with breast cancer. Ki67 counting with manual assessment (MD) is sensitive to interobserver variability and is time consuming. In recent years, studies indicating that digital image analysis (DGA) is fast and objective for Ki67 measurements have been increasing, but the routine application of this method requires further studies. In this study, we compared MD, DGA and GK Ki67 measurements in 85 invasive breast cancer cases.

**Method:** Tumor molecular types, mitotic numbers, Ki67 values measured by GK, MD and DGA and their correlations, were determined. DGA analyses were analyzed with ViraPath (Virasoft Yazılım, Istanbul, Turkey) software, and statistical correlations between parameters were analyzed with NCSS (Number Cruncher Statistical System, 2020).

**Results:** The correlations and differences of Ki67 index values determined by all three different methods in terms of age, histological grade, mitotic numbers, and molecular type were found to be compatible with the international literature. The intraclass correlation coefficient between Ki67 indices counted with DGA and MD was measured as 0.974, and the difference between Bland Altman analysis and MD and DGA counts was found to be close to zero.

**Conclusion:** DGA counts give reliable results to replace MD. With multicenter studies that optimize method standards, time savings and high sensitivity can be brought to the practice of pathology.

**Keywords:** Breast cancer, Ki67, manual counting, digital image analysis.

### Giriş

Her yıl yaklaşık 2,1 milyon kadın meme kanserine yakalanır ve sadece 2018'de yaklaşık 627000 kadın bu nedenle yaşamını yitirmiştir<sup>1</sup>. Meme kanserinde en uygun tedavi kararı için patoloji ve hücre çoğalması analiz metotlarının optimizasyonu aralıksız devam etmektedir. Günümüzdeki meme kanseri tedavisi Luminal A, Luminal B, HER2-pozitif ve triple negatif moleküler tümör tip sınıflamasını temel alır<sup>2</sup>. Ancak, östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR)-pozitifliği ve HER2 negatifliği ile tanımlanan luminal meme kanserinin optimal tedavisi tartışmalıdır<sup>3</sup>. Bu noktada tedavileri farklı olan luminal A ve B tümör tipi ayrımında Ki67 indeksi anahtar biyobelirteç değerindedir. Ki67 proteini, Go fazı hariç hücre devrinin tüm fazlarında nükleusta ifade edildiğinden tümörler için proliferasyon belirteçidir. Ki67 indeksi nükleusları pozitif boyanan tümör hücre sayısının sayılan toplam tümör hücre sayısına bölümü ile hesaplanır<sup>4,5</sup>. St. Gallen Mutabakat Toplantısı, düşük ve yüksek Ki67 değerlerini sırasıyla luminal A ve B tipinin göstergesi olarak önermiş ve sadece luminal B için adjuvan kemoterapi tavsiye etmiştir<sup>6</sup>. Ancak bu tavsiye ile ilgili görüş ayrılıkları pek çok nedenle sürmektedir. Örneğin manuel değerlendirme

(MD) ile Ki67 sayımının patoloğlar arası değişkenliği, luminal tip ayrımı eşik değerleri (%14 veya %20) ve değerlendirilecek büyütme alan sayısının standart olmayışı, Ki67 sonuçlarının tutarlı olmadığı aralığın hastaların daha çok kümelendiği orta düzey proliferasyonda (%15-%30) oluşu belirsizlikleri arttırmaktadır<sup>1,3</sup>. Ki67 indeks değerleri, 500-1000 tümör hücresi sayılarak 3-10 büyük büyütme alanında veya tüm lezyonda ortalama olarak belirlenir ancak her iki yöntem de zaman alıcıdır<sup>7</sup>. Patoloğun göz kararı ile Ki67'yi belirlemesi kullanılabilir ancak tahmini veriler daha fazla belirsizlik taşır<sup>2</sup>. Son dönemde, daha hızlı ve hassas Ki67 sayımları için dijital görüntü analizi (DGA) önerilmektedir<sup>3</sup>. Ancak bu uygulamanın rutin uygulamaya girmesi için farklı merkezlerde validasyonu gerekir. Bu nedenle, bu çalışmamızda 85 invaziv meme kanseri vakasında MD, DGA ve GK ile saptanmış Ki67 indeks değerlerinin uyumunu incelenmiştir.

## **Gereç ve Yöntem**

### **Çalışma Dizaynı**

Bu çalışma Helsinki Bildirgesinin en son revize edilmiş etik kriterlerine uygun planlanmış ve çalışmanın yürütüldüğü Bakırköy Dr Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden 09.01.2023 tarih ve 2023-01-14 sayılı etik onam alınmıştır. Etik onayın alındığı kurumun patoloji departmanında Ağustos ve Aralık 2022 tarihleri arasında laboratuara gönderilen mastektomi materyalinde veya meme tru-cut biyopsilerde Ki67 değerlendirmeleri yapılmış 85 meme karsinom olgusu aynı patoloğ tarafından değerlendirilmiştir. Dahil edilme kriterleri olarak rezeksiyon (32 vaka) ya da tru-cut biopside (53 vaka) invaziv meme kanseri tanısı verilmiş, reseptör profilleri ve Ki67 değerleri immunhistokimyasal (IHK) olarak tanımlı hastalar, dışlama kriterleri olarak yeterli tümör yükü taşımayan mikroinvaziv karsinom vakaları ve in situ karsinomu olan vakalar belirlenmiştir. Neoadjuvan tedavi sonrası rezidü tümörü bulunmayan ya da yeterli tümör hücresi içermeyen minimal rezidü olgular da dışlanmıştır.

### **Histopatolojik Değerlendirme**

Tümörlerin histolojik derecelendirmesinde "Nottingham" histolojik skorlama kriterleri kullanılmıştır, bu kriterler nükleus pleomorfizmi, asiner/tubular diferansiyasyon ve mitoz sayılarını esas alır. Moleküler tipleme için tümörlerin ER, PR ve HER2 (cErb2) ifadeleri IHK ile belirlenmiştir. Luminal A tip ER-pozitif, PR-pozitif, aynı zamanda Ki67 proliferasyon indeksi düşük ve HER2-negatif tümörler olarak; Lüminal B tip ER-pozitif, PR-negatif/düşük pozitif ve/veya Ki67 proliferasyon indeksi yüksek olarak; HER2-pozitif tip HER2 amplifiye ya da overekspresye olarak; triple negatif tip ER-negatif, PR-negatif ve HER2-negatif olarak tanımlanmıştır. IHC'deki HER2 skoru 2+ olan 5 vaka, in situ hibridizasyon yapılmadığı için belirsiz olarak tanımlanmıştır. Lüminal tip sınıflaması için, Ki67 indeksi eşik değeri %20 olarak kabul edilmiştir<sup>1,3</sup>. Mitoz sayımları 0,237 mm<sup>2</sup>'lik mikroskop alanında ve 10 büyük büyütme alanı sayılarak değerlendirilmiştir. Çalışmaya dahil edilmiş vakaların hepsi için GK, MD ve DGA Ki67 ölçümleri uygulanmıştır. Her olguya ait Ki67 IHC-boyalı lamlarda hot spot (boyanmanın en

yoğun olduğu) alanlar mikroskopta manuel olarak işaretlenerek bu alanlardaki indeks önce GK ile belirlenmiştir. Daha sonra aynı alanlar fotoğraflanarak MD ile 40 büyük büyütme alanındaki indeks hesaplanıp kaydedilmiştir. DGA için biyopsi slaytları, Leica Aperio AT2 Dijital Tam Slayt Tarayıcı (Leica Biosystems, Tokyo, Japonya) kullanılarak taranmış ve SVS dosya formatında kaydedilmiştir. Tüm slayt görüntüleri ViraPath (Virasoft Yazılım, İstanbul, Türkiye) uygulaması ile DGA sayımları için değerlendirilmiş ve MD sırasında seçilmiş alanlarda kesit görüntüsü farklı büyütmelerde incelenmiştir. Bu dijital patoloji uygulamasında kullanılan algoritmada daire, kare ya da el ile çizim seçenekleri seçilebilir. Uygulama pozitif kahverengi ve negatif mavi çekirdekleri tespit etmektedir. Boyama yoğunluğuna göre kahverengi çekirdekler koyu, orta ve açık olmak üzere üç gruba ayrılır ve koyu, orta, açık veya artefakt seçimleri manuel olarak düzenlenebilir. Her gruptaki kahverengi çekirdekler ve mavi çekirdekler sayılarak pozitiflik indeksi bu sayılara göre hesaplanır. Hücre çekirdeği boyutlarına göre düzenlemeler yapılabilir, küçük boyutlu çekirdekler elimine edilebilir (lenfositler ve artefaktlar). Eşik değerlerinde düzenlemeler yapılarak düşük yoğunluklu çekirdeklerin bulunması sağlanabilir. Stromal çekirdek kontrolü sayesinde stromal hücreler tanımlanabilir ve analizden çıkarılabilir ve bu özellikler sayesinde Ki67 pozitiflik indeksleri (%) optimal düzeyde tanımlanabilir. Çalışmamızda da lenfositler gibi tümör olmayan hücrelerin yoğun bulunduğu alanlardan kaçınılmış, bu hücre tiplerinin tümör olarak tanındığı örnek alanları manuel olarak hariç tutulmuştur. Taralı lamlarda işaretli hot spot alanların Ki67 indeksi (yapay zeka algoritmaları ile geliştirilmiş) DGA ile değerlendirilip, Ki67 pozitif ve negatif hücre sayıları kaydedilmiştir.

### **İstatistik Analiz**

İstatistik analiz için NCSS (Number Cruncher Statistical System, 2020) Statistical Software (Utah, USA) programı kullanılmıştır. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğunu saptamak için Shapiro Wilk testi, normal dağılım göstermeyen parametrelerin karşılaştırmalarında Kruskal Wallis test ve farklılığa neden olan grup tespitinde Dunn test uygulanmıştır. Ki67 indeks değerleri arasındaki uyumlar ICC (Intraclass Correlation Coefficient) ve Bland Altman testleri ile incelenmiş, anlamlılık  $p < 0,05$  düzeyinde belirlenmiştir.

### **Bulgular**

Hastaların tanımlayıcı bulguları Tablo 1'de özetlenmektedir.

**Tablo 1.** Hastaların tanımlayıcı bulguları

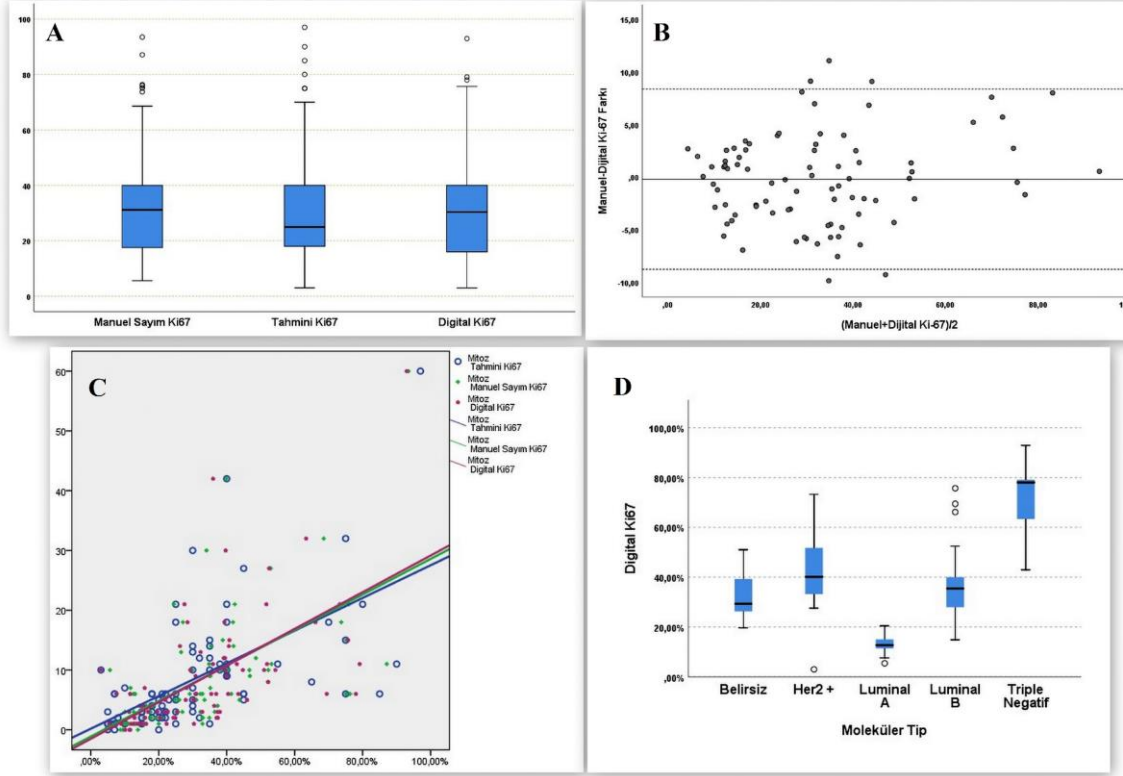
		<b>n (%)</b>
<b>Yaş</b>	<b>Ort±SD</b>	53,45±11,94
	<b>Medyan (Min-Mak)</b>	52 (26-81)
<b>Histolojik Derece</b>	<b>G1</b>	8 (9,4)
	<b>G2</b>	49 (57,6)
	<b>G3</b>	28 (32,9)
<b>Moleküler tip</b>	<b>Belirsiz</b>	5 (5,9)
	<b>Luminal A</b>	22 (25,9)
	<b>Luminal B</b>	41 (48,2)
	<b>Her 2+</b>	12 (14,1)
	<b>Triple Negatif</b>	5 (5,9)
<b>HER2 Skoru</b>	<b>S0</b>	35 (41,2)
	<b>S1</b>	33 (38,8)
	<b>S2</b>	5 (5,9)
	<b>S3</b>	12 (14,1)
<b>Histopatolojik Tip</b>	<b>IDK-NST</b>	63 (74,1)
	<b>IDK-NST, müsinöz farklılaşma</b>	3 (3,5)
	<b>IDK, medüller patern</b>	1 (1,2)
	<b>İnvaziv Ca, apokrin farklılaşma</b>	1 (1,2)
	<b>ILK</b>	7 (8,2)
	<b>ILK+IDK-NST</b>	4 (4,7)
	<b>IMPK</b>	1 (1,2)
	<b>IMPK-IDK-NST</b>	5 (5,9)
<b>Mitoz Sayısı</b>	<b>Ort±SD</b>	8,44±9,61
	<b>Medyan (Min-Mak)</b>	6 (0-60)

IDK: İnvaziv Duktal Karsinoma, ILK: İnvaziv Lobüler Karsinoma, IMPK: İnvaziv Mikropapiller Karsinoma, NST: Nospecial Type/Tanımlanmamış Tip. Ort: Ortalama, SD: Standart Deviasyon, Min: Minimum, Mak: Maksimum

İncelenen 85 vakada ortalama yaş 53,45±11,94 yıldır. En fazla olgu (n=63) invaziv duktal karsinom-no special (tanımlanmamış) patolojik tip olmuş, bunu 7 vaka ile invaziv lobüler karsinom izlemiştir. Diğer histopatolojik tipler Tablo-1’de sıralıdır. Histolojik derece 1 olan 8 olgu, derece 2 olan 49 olgu ve derece 3 olan 28 olgu gözlenmiştir. Moleküler tipte en yüksek oranda

%48,2 ile Luminal B tip ve azalan oranlarda %25,9 ile Luminal A, %14,1 ile HER2 pozitif tip ve %5,9 ile triple negatif tip izlenmiştir. HER2 skorları da tabloda sıralıdır.

**Şekil 1. 1a-** Farklı metotlar ile belirlenmiş Ki67 indeksi değerlerinin dağılımı. **1b-** MD ve DGA (grafikte dijital tanımlı) Ki67 sayım değer ortalamalarının yatay, iki sayım farkının dikey eksenini oluşturduğu Bland Altman grafiği. **1c-** Mitoz sayısı ile farklı metotlar ile belirlenmiş Ki67 değerleri arasındaki korelasyonların grafiği. **1d-** DGA ile sayılmış (grafide dijital tanımlı) Ki67 değer dağılımlarının farklı moleküler alt tiplere göre sınıflaması



Şekil 1a farklı metotlar ile belirlenmiş Ki67 değerlerini göstermektedir. MD ile sayılmış Ki67 değerleri 5,64 ile 93,48 arasında ve ortalaması  $32,21 \pm 19,47$ 'dir. DGA ile sayılmış Ki67 değerleri 2,96 ile 92,94 arasında ve ortalaması  $32,43 \pm 18,80$ 'dir. GK ile belirlenmiş Ki67 değerleri 3 ile 97 arasında ve ortalaması  $30,19 \pm 20,89$ 'dur. MD ve GK Ki67 değerleri arasındaki uyum düzeyine ait sınıf içi korelasyon katsayısı (ICC: Intraclass Correlation Coefficient)  $0,963$  ( $0,994-0,976$ )'tür ( $p < 0,01$ ). MD ve DGA değerleri arasındaki ICC düzeyi  $0,974$  ( $0,960-0,983$ )'tür ( $p < 0,01$ ). GK ve DGA Ki67 değerleri arasındaki ICC düzeyi  $0,943$  ( $0,913-0,962$ )'tür ( $p < 0,01$ ). MD ve DGA (grafide dijital tanımlı) Ki67 değerlerine ait ortalamaların yatay, iki sayım farkının dikey eksenini oluşturduğu Bland Altman grafiği Şekil-1b'de verilmiştir. Bland Altman analizlerinde MD ve DGA Ki67 sayım farkı ortalama  $0,21$  birim, uyuşma limitleri (limits of agreement)  $-8,78$  ve  $8,36$  olarak saptanmıştır. İki sayım arasındaki farkın sifra yakın olduğu gözlenmiştir ( $p > 0,05$ ) ve bu iki yöntemin birbirinin yerine kullanılabileceği belirlenmiştir. Aynı analizlerle, MD ve GK için sayım

farkı ortalama 2,00 birim, uyuşma limitleri -8,7 ve 12,74 olarak ölçülmüştür. Bu iki değerlendirme metodu arasındaki fark da sifıra yakındır ( $p>0,05$ ) ve bu nedenle bu metotların da birbirinin yerini alabileceği düşünülebilir, ancak tartışmada GK ölçümlerinin neden uygun olmayabileceği açıklanmıştır. Mitoz sayısı ile her üç metoda ait Ki67 değerleri arasında çok iyi düzeyde pozitif korelasyon gözlenmiş ve bu korelasyonlar grafik olarak Şekil-1c'de gösterilmiştir. Bu korelasyonların "r" (Spearman korelasyon katsayı) değerleri, MD, DGA ve GK metotları için sırayla 0,695, 0,680 ve 0,700 olup, hepsi için anlamlılık düzeyi  $p<0,01$ 'dir. Olguların yaşları ile her 3 yonteme ait Ki67 değerleri arasında zayıf düzeyde ancak anlamlı negatif korelasyon saptanmıştır. Bu korelasyonların r değerleri, MD, DGA ve GK metotları için sırayla -0,237, -0,233 ve -0,235 olup, hepsi için anlamlılık düzeyi  $p<0,05$ 'dir. Histolojik derece ile her üç metoda ait Ki67 değerleri iyi düzeyde pozitif korelasyon göstermiştir. Bu korelasyonların r değerleri, MD, DGA ve GK metotları için sırayla 0,600, 0,605 ve 0,610 olup, hepsi için anlamlılık düzeyi  $p<0,01$ 'dir. HER2 skorları ile 3 farklı metot ile saptanmış Ki67 değerleri arasında anlamlı korelasyon bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Farklı metotlarla saptanmış Ki67 değerlerinin moleküler tiplere göre dağılımı Tablo 2 ve Şekil 1'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.** MD, DGA ve GK Ki67 Değerlerinin Moleküler Tiplere Göre Dağılımı

		<b>MD Ki67</b>	<b>GK Ki67</b>	<b>DGA Ki67</b>
<b>1Belirsiz</b>	<i>Ort±SD</i>	34,83±0,13	32,00±0,09	33,08±0,12
	<i>Medyan (Min-Mak)</i>	39,07 (12,7-46,7)	32 (18-40)	29,28 (19,6-51)
<b>2Her2 +</b>	<i>Ort±SD</i>	39,50±0,17	35,92±0,19	40,83±0,17
	<i>Medyan (Min-Mak)</i>	39,14 (5,6-76)	35 (3-80)	40,17 (3-73,3)
<b>3Luminal A</b>	<i>Ort±SD</i>	13,19±0,04	11,09±0,06	13,13±0,04
	<i>Medyan (Min-Mak)</i>	13 (7,4-19,2)	9 (5-21)	12,69 (5,4-20,4)
<b>4Luminal B</b>	<i>Ort±SD</i>	34,98±0,15	32,83±0,16	35,5±0,13
	<i>Medyan (Min-Mak)</i>	32,9 (9,2-75,2)	30 (10-75)	35,46 (14,9-75,7)
<b>5Triple Negatif</b>	<i>Ort±SD</i>	72,98±0,21	77,00±0,23	71,28±0,19
	<i>Medyan (Min-Mak)</i>	76,32 (39,4-93,5)	85 (38-97)	78 (43-92,9)
	<b>P</b>	<b>0,001**</b>	<b>0,001**</b>	<b>0,001**</b>
<b>Post Hoc test sonuçları</b>		3<1, 2, 4, 5 4<5	3<1, 2, 4, 5 4<5	3<1, 2, 4, 5 5>1, 4

Ort: Ortalama, SD: Standart Deviasyon

Tüm metotlarda da saptanmış en yüksek ortalama Ki67 değeri triple-negatif grupta, daha sonra azalan sırayla HER2 pozitif, lüminal B, HER2-belirsiz ve lüminal A tipte saptanmıştır. Moleküler tipe göre sınıflandırmada her 3 farklı Ki67 metodu için de  $p < 0,01$  seviyesinde gruplar arası fark gözlenmiş ve anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığı “post hoc” analizler ile saptanmıştır. Her üç metot için de Luminal A tip Ki67 değerleri, HER2 belirsiz, HER2+, Luminal B ve triple negatif tümör tipi değerlerinden anlamlı düzeyde düşüktür (tüm metotlar için  $p < 0,001$ ). Yine her üç metotta da Luminal B tip Ki67 değeri triple negatif tipten anlamlı düzeyde düşüktür (tüm metotlar için  $p < 0,05$ ). Çalışmada 14 vakada (%16,5) MD ve DGA Ki67 sayım farkı %5’ten fazladır, bu fark 6 vakada %6 düzeyinde, 1 olgudaki fark ise %11,6’dır. MD ve DGA sayımları en sık fark gösteren moleküler tümör tipleri azalan sıraya göre 8 olgu ile Luminal B, 3 olgu ile HER2+, 2 olgu ile HER2+ ve 1 olgu ile triple negatif tiptir. Düşük Ki67 indeksli Luminal A tip vakaların hiçbirinde %5’i aşan farklılık gözlenmemiş, bunların sadece ikisinde MD ile eşik düzeyin altında (%17-18) ve DGA ile eşik düzeyin üstünde (%20-21) değerler sayılmıştır.

### Tartışma

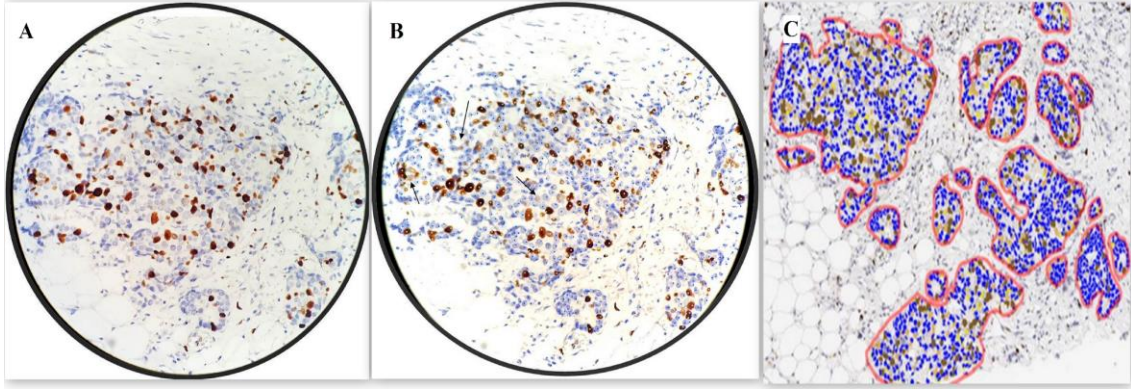
Çalışmada tüm metotlarla ölçülmüş Ki67 değerlerinin yaş ile negatif korelasyonu, meme kanserinin yaşlıda daha az agresif seyri ve gençlerde daha az tümör diferansiyasyonu ve daha yüksek Ki67 değerleri gözlenmesine dair kanıtlara paraleldir<sup>8,9</sup>. Tüm metotlarla saptanmış Ki67 değerlerinin histolojik derece ile iyi düzeydeki pozitif korelasyonu histolojik dereceleme için kullanılan üç parametreden birinin, Ki67 gibi hücre çoğalmasını gösteren mitoz sayısı olmasına atfedilebilir<sup>10</sup>. Tüm metotlarla belirlenmiş Ki67 değerlerinin mitoz sayısı ile yüksek korelasyonu Ki67 proteinin Go dönemi hariç hücre devrinin her aşamasında nükleusta bulunması ile paraleldir<sup>4,5</sup>. Ayrıca Ki67 proteini mitoz sırasında perikromozomal tabaka oluşumu için mutlaka gereklidir<sup>11</sup>. Bu nedenle zaten çok yüksek olması gereken bu korelasyonun çalışmada bu şekilde saptanması, Ki67 ve mitoz sayımlarının sağlıklı oluşuna işarettir; çünkü her çalışma Ki67 ve mitoz arasında çok yüksek korelasyon göstermeyebilir, örneğin piknotik nükleuslu hücrelerin mitoz gibi değerlendirilmesi korelasyonları etkileyecektir<sup>12</sup>. Çalışmada saptanmış Ki67 değerlerinin moleküler tümör tipleri açısından farkları da uluslararası literatürle tam uyum içerisindedir. Luminal B tipin, luminal A tipe göre daha yüksek Ki67 değerleri taşıdığı konusunda görüş birliği mevcuttur<sup>6,13</sup>. Geniş bir meme kanseri kohortunda (1951 vaka) en yüksek Ki67 değeri triple-negatif alt tipte, sonra HER2+ alt tipte ve ardından lüminal B alt tipte gözlenmiştir<sup>14</sup>.

Bulgular bu gözlemlerle tamamen uyumludur. Çalışmada MD ve DGA Ki67 değerleri arasında %5’in üzerinde fark olan olgular geriye dönük incelediğinde, nükleusta zayıf Ki67 boyamalarının gözden kaçırılması, üst üste binmiş tümör hücrelerinin eksik sayımı, stromal ve inflamatuvar hücrelerin ya da lenfositik infiltrat içindeki Ki67-pozitif hücrelerin sayıma katılması, iğsileşen tümör hücrelerinin değerlendirilememesi gibi nedenler saptanmıştır. Şekil 2’de bir invaziv duktal karsinoma vakasında değerlendirme yapılmamış alan (a), dijital sayım alanı (b) ve dijital sayım



için alan işaretleme (c) gösterilmiştir; b'de düşük yoğunluklu boyama nedeni ile manuel sayımda gözden kaçan hücreler okla işaretlidir.

**Şekil 2.** Bir invazif duktal karsinom-NCT vakasının mikroskopik görüntüsü **a-** Analiz edilmemiş alan (x400 büyütme) **b-** Dijital metotla sayım alanı. Oklar manuel sayımda düşük boyama nedeni ile gözden kaçan Ki67-pozitif hücreleri göstermektedir (x400 büyütme). Sadece mavi boyanan hücreler Ki67-negatif, nükleusları sarı-kahverengi tonda boyanan hücreler Ki67-pozitif hücrelerdir. **c-** Dijital sayım için alan seçimi ve işaretlenmesi



MD ve DGA uyumsuzluğu açısından literatürde benzer sorunlar raporlanmış, tümör ya da tümör olmayan hücrelerin sayımlardan yanlış çıkarılması veya sayımlara yanlış katılması, pleomorfik hücrelerin birden fazla sayımı, büyük veya halter şeklindeki hücreler, fiksasyon nedeniyle tümör hücrelerinin iğsi şekle bürünmesi gibi faktörlerin yanıltıcı rolü vurgulanmıştır<sup>15</sup>. Deneyimli gözlerde MD'de stromal ve inflamatuvar hücrelerin daha rahat ayrılabilmesi ile birlikte, zayıf boyamalar gibi teknik sorunlar için iyi bir yazılımla gerçekleştirilen DGA'nın daha yüksek avantaj taşıması mümkündür. Bu nedenle Ki67 ölçümlerinde MD ve DGA'nın birbirine üstün olabileceği farklı noktalar bulunmaktadır.

Çalışmada DGA ve MD Ki67 sayımları arasında çok yüksek korelasyon ve Bland Altman analizinde iki sayım farkını sifıra yakın gözlemlenmiştir. Bu bulgular, eşdeğer ileri seviyelerde olmasa da yüksek korelasyonlar göstermiş araştırmalar ile paraleldir<sup>2,16</sup>. Ancak aynı düzeyde yüksek korelasyon bildirmemiş gözlemler de vardır<sup>3,17</sup>. Çalışmada DGA ve MD'nin yüksek uyumu, lenfositler gibi tümör olmayan hücrelerin yoğunlaştığı bölgelerin her iki metotta da çok dikkatli dışlanması, uygun alanların deneyimli bir patolog tarafından seçimi ve uygulanan yazılım kalitesi ile ilgili olabilir. Çalışmada GK ve MD metotları arasında da yüksek korelasyon bulunması yine patolog deneyimi ve uygun alan seçimindeki tecrübeye bağlanabilir. İlerleyen çalışmalar ile MD ve DGA metotları arasındaki korelasyonun artabileceği öngörülebilir. Örneğin, DGA hassasiyetini bozabilecek tümör olmayan hücrelerin dışlanması için, sadece tümörü işaretleyen sitokeratin ve Ki67 ile dual boyama uygulamak ve boyaların üst üste binen kromojenlerinin sonuçları

değiştirmemesi için seri kesitlerin dijital hizalandığı ikili sanal boyamalar yapmak umut vadetmektedir<sup>3,17,18</sup>. MDA ve DGA açısından zaman ve maliyet kazançları önemlidir. Bu deneyimde MD'de 500 hücrenin sayımı 11-12 dakika arası süre almaktadır. Hücre sayımları özellikle lenfositler ve stromal alanlardan zengin tümörlerde daha çok zaman alır ve patoloğun zaman eksikliği ölçümleri sınırlayıcıdır. Ki67 değerleri moleküler tip ayrımında kullanıldığından özellikle eşik sınırlı Ki67 değerlerinde hassas sayım yapılması büyük öneme sahiptir. MD ve DGA maliyet karşılaştırmalarına dair analizler sınırlıdır. Pankreas tümörlerinde DGA ile Ki67 sayımı en maliyetli yöntem olarak raporlanmış, ancak bir meme kanseri çalışması DGA sayımını kost-efektif değerlendirmiştir<sup>19,20</sup>. Burada her yeni teknolojinin ilk uygulama döneminde çok pahalı olduğu fakat yaygınlıkları arttıkça maliyetlerin düştüğü de dikkate alınmalıdır.

Meta-analizler, yüksek Ki67 değeri ölçülen meme kanserlerinde daha sık nüks ve daha kötü sağkalım ancak bununla birlikte kemoterapiye daha yüksek patolojik tam yanıt belirlemiştir<sup>21</sup>. Dolayısı ile Ki67'nin kemoterapi için karar verdirici olması beklenebilir, ancak Ki67 ölçüm standardizasyonu için süren belirsizlikler hastaların toksik kemoterapileri gereksizce almasına veya yararlı bir tedaviden dışlanmasına neden olabilir<sup>3</sup>. Bu sebeple, IKWG (International Ki67 in Breast Cancer Working Group) 2021 kılavuzuna göre Ki67 değeri sadece T1-2, No-1, ER-pozitif ve HER2-negatif hastalarda prognoz tahmini için kullanılabilir<sup>22</sup>. Ancak yine de, sınırlı bir meme kanseri grubunda (hormon reseptörü-pozitif, HER2-negatif, lenf nodu-pozitif erken evre), yüksek (>20%) Ki67 değeri endokrin tedaviye "amebaciclib" ekleme kriteri olarak onaylanmıştır<sup>23</sup>. Gelecekte derin öğrenme metotlarının daha ileri gelişimi ile DGA hassasiyeti ve merkezler arası tutarlılık artabilir ve evrensel standardizasyon sağlanabilir. Böylelikle, tedavi seçiminde Ki67 değerlerinin tedavi kararlarında daha yaygın kullanımı yeniden gündeme gelebilecektir. Çalışmanın sınırlı noktaları incelenen hasta sayısının görece azlığı ve luminal sınıflamanın tek Ki67 eşik değerine (%20) göre yapılmış olmasıdır. Çalışmanın güçlü noktaları, ölçümlerin meme vakalarında tecrübeli aynı patoloj tarafından gerçekleştirilmesi sayesinde heterojenliğin azalması ve stromal alanlar gibi sayımları etkileyecek faktörlerin dijital ve manuel metotlarda dikkatle elenmesidir.

## **Sonuç**

DGA ve MD değerleri arasında tama yakın korelasyon saptamanın önemli olduğunu ve kendi laboratuvar koşullarımızda DGA'nın güvenle kullanılabileceği düşünülmektedir. Gelecekte farklı merkezlerde ileri validasyon çalışmaları yürütülerek, DGA'nın hızlı ve hassas bir Ki67 ölçüm metodu olarak rutin kullanıma gireceğini öngörülmektedir.

**Teşekkür:** Yazar, dijital Ki67 taramalarında sağladıkları teknik destek ve Virapath yazılımını ücretsiz hibe etmesi nedeni ile Virasoft firmasına teşekkür eder.

**KAYNAKLAR**

1. Gered RS, Sivanandarajah A, Brouwer ER, et al. piNET-An automated proliferation index calculator framework for KI67 breast cancer images. *Cancers (Basel)*. 2020;13(1):11.
2. Arun I, Venkatesh S, Ahmed R, Agrawal SK, Leung SCY. Reliability of Ki67 visual scoring app compared to eyeball estimate and digital image analysis and its prognostic significance in hormone receptor-positive breast cancer. *APMIS*. 2021;129(8):489-502.
3. Ayad E, Soliman A, Anis SE, Salem AB, Hu P, Dong Y. Ki 67 assessment in breast cancer in an Egyptian population: A comparative study between manual assessment on optical microscopy and digital quantitative assessment. *Diagn Pathol*. 2018;13(1):63.
4. Marwah N, Batra A, Marwah S, Gupta V, Shakya S, Sen R. Correlation of proliferative index with various clinicopathologic prognostic parameters in primary breast carcinoma: A study from North India. *J Cancer Res Ther*. 2018;14(3):537-542.
5. Zhong F, Bi R, Yu B, Yang F, Yang W, Shui R. A comparison of visual assessment and automated digital image analysis of Ki67 labeling index in breast cancer. *PLoS One*. 2016;11(2):e0150505.
6. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: Highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. *Ann Oncol*. 2011;22(8):1736-47.
7. Ács B, Madaras L, Kovács KA, et al. Reproducibility and prognostic potential of Ki-67 proliferation index when comparing digital-image analysis with standard semi-quantitative evaluation in breast cancer. *Pathol Oncol Res*. 2018;24(1):115-127.
8. Parks RM, Alfarsi LH, Green AR, Cheung KL. Biology of primary breast cancer in older women beyond routine biomarkers. *Breast Cancer*. 2021;28(5):991-1001.
9. Zhu JW, Charkhchi P, Adekunle S, Akbari MR. What is known about breast cancer in young women? *Cancers (Basel)*. 2023;15(6):1917.
10. Ignatiadis M, Sotiriou C. Understanding the molecular basis of histologic grade. *Pathobiology*. 2008;75(2):104-11.
11. Sun X, Kaufman PD. Ki-67: More than a proliferation marker. *Chromosoma*. 2018;127(2):175-186.
12. Ibrahim A, Lashen A, Toss M, Mihai R, Rakha E. Assessment of mitotic activity in breast cancer: revisited in the digital pathology era. *J Clin Pathol*. 2022;75(6):365-372.
13. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(10):736-50.

14. Hashmi AA, Hashmi KA, Irfan M, et al. Ki67 index in intrinsic breast cancer subtypes and its association with prognostic parameters. *BMC Res Notes*. 2019;12(1):605.
15. Kwon AY, Park HY, Hyeon J, et al. Practical approaches to automated digital image analysis of Ki-67 labeling index in 997 breast carcinomas and causes of discordance with visual assessment. *PLoS One*. 2019;14(2):e0212309.
16. Wang M, McLaren S, Jeyathevan R, et al. Laboratory validation studies in Ki-67 digital image analysis of breast carcinoma: A pathway to routine quality assurance. *Pathology*. 2019;51(3):246-252.
17. Morioka T, Niikura N, Kumaki N, et al. Comparison of Ki-67 labeling index measurements using digital image analysis and scoring by pathologists. *Breast Cancer*. 2018;25(6):768-777.
18. Koopman T, Buikema HJ, Hollema H, de Bock GH, van der Vegt B. Digital image analysis of Ki67 proliferation index in breast cancer using virtual dual staining on whole tissue sections: Clinical validation and inter-platform agreement. *Breast Cancer Res Treat*. 2018;169(1):33-42.
19. Reid MD, Bagci P, Ohike N, et al. Calculation of the Ki67 index in pancreatic neuroendocrine tumors: A comparative analysis of four counting methodologies. *Mod Pathol*. 2015;28(5):686-94.
20. Gándara-Cortes M, Vázquez-Boquete Á, Fernández-Rodríguez B, et al. Breast cancer subtype discrimination using standardized 4-IHC and digital image analysis. *Virchows Arch*. 2018;472(2):195-203.
21. Tao M, Chen S, Zhang X, Zhou Q. Ki-67 labeling index is a predictive marker for a pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(51):e9384.
22. Nielsen TO, Leung SCY, Rimm DL, et al. Assessment of Ki67 in Breast cancer: Updated recommendations from the international Ki67 in Breast Cancer Working Group. *J Natl Cancer Inst*. 2021;113(7):808-819.
23. Muller K, Jorns JM, Tozbikian G. What's new in breast pathology 2022: WHO 5th edition and biomarker updates. *J Pathol Transl Med*. 2022;56(3):170-171.