

ПРОЦЕНА ПРОЛИФЕРАТИВНЕ АКТИВНОСТИ ТУМОРА ОДРЕЂИВАЊЕМ МИТОТСКОГ ИНДЕКСА

Драган МИТРОВИЋ, Витомир ГОВЕДАРОВИЋ, Јасмина МАРКОВИЋ-ЛИПКОВСКИ

Институт за патологију, Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд

КРАТАК САДРЖАЈ

Митотски индекс тумора представља број ћелија у деоби на 100 туморских ћелија. То је најстарији и најчешће коришћен параметар кинетике ћелијске пролиферације тумора, који је, поред многих имунохистохемијских и других показатеља, и даље у рутинској примени као тзв. златни стандард. Одређивање зависи од фиксације ткива, типа фиксатива, начина бојења, дебљине пресека ткива, начина исказивања броја ћелија у деоби, избора узорака ткива и видних поља, као и одабраног поступка бројања. Када се примене истоветне технике бројања, одређивање митотског индекса суштински постаје репродуцибилан метод. За рутинску примену предлаже се да се величина митотског индекса изражава у односу на тзв. стандардно поље, површине од 2 mm^2 . Полазећи од најмање променљивости времена трајања митотске фазе ћелијског циклуса, приказано је неколико оригиналних формула које повезују митотски индекс, добијен стереолошком методологијом, са диференцијалним обликом функције раста тумора. На овај начин могуће је математички повезати структуру тумора с параметрима кинетике раста неоплазми, као што је потенцијално време удвајања. Овакав приступ омогућује испитивање кинетике раста једнократно мерених солидних тумора код људи, узимајући у обзир њихову морфологију. Митотски индекс актуелну примену налази у класификацији, предвиђању биолошког понашања, градирању, прогнози, процени потенцијала рецидивирања, малигне трансформације и метастазирања, као и у одлучивању о терапији тумора и бележењу ефеката лечења. За неке малигне туморе, као што је карцином дојке, он је независан прогностички индикатор.

Кључне речи: тумори; број митоза; кинетика раста; прогноза

УВОД

Митоза је фаза пролиферативног ћелијског циклуса (фаза М) која је прва запажена и једина која се може морфолошки препознати. Током шест морфолошки дефинисаних стадијума (профаза, прометафаза, метафаза, анафаза, телофаза, цитокинеза) нуклеарни и цитоплазматски садржај једнако се расподељује на две новонастале ћелије (Слике 1-4). Одређивање степена митотске активности (митотског индекса, броја митоза) је најстарији метод у кинетици ћелијске пролиферације и најчешће коришћен квантитативни метод у хистопатологији.

Број митоза дуго је био тзв. златни стандард за рутинску процену ћелијске пролиферације неоплазми, јер захтева само стандардно припремљене пресеке ткива обојене хематоксилином и еозином (HE) и способност идентификације „митотских фигура”. То је најстарији, најбржи и најјефтинији метод квантификације пролиферативног капацитета тумора и најчешће коришћен метод за одређивање пролиферативне активности солидних тумора код људи [1]. Актуелан је чак и у експерименталним моделима у култури туморских ћелија. Треба, међутим, подсетити да се неконтролисани раст, као основно својство неоплазми, налази у корелацији са способношћу метастазирања, која зависи од великог броја новостечених својстава малигнућих ћелија, као што је испољавање рецептора мембране за компоненте ванћелијског матрикса [2, 3], или интеракцији са другим ћелијама [4-7], укључујући и молекуле са дејством на даљину [8].

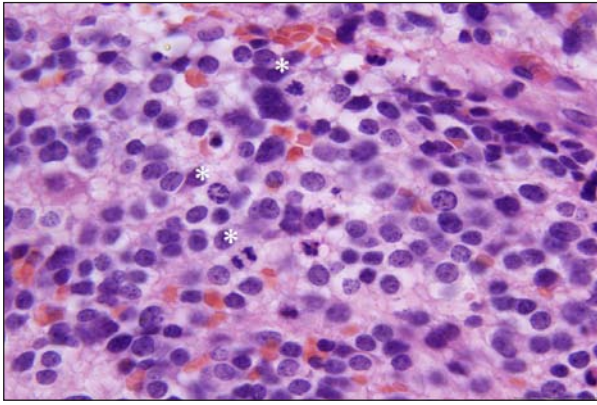
ТРАЈАЊЕ ФАЗА ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА

Циклус људске ћелије која рапидно пролиферише укупно траје приближно 24 сата. Трајање фазе G_1 се највише мења, најкраће време је вероватно око 10 сати, а оне ћелије у којој ова фаза траје данима, недељама и годинама налазе се у стању мировања, изван ћелијског циклуса, односно у фази G_0 (непролиферативни статус ћелије). Фаза S траје 6-12 сати, а фаза G_2 у већини људских ћелија 2-4 сата. Митоза у просеку траје један сат. Време које ћелије исте линије у култури проведу у појединим фазама ћелијског циклуса је променљиво.

ПОКАЗАТЕЉИ МИТОТСКЕ ФАЗЕ ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА

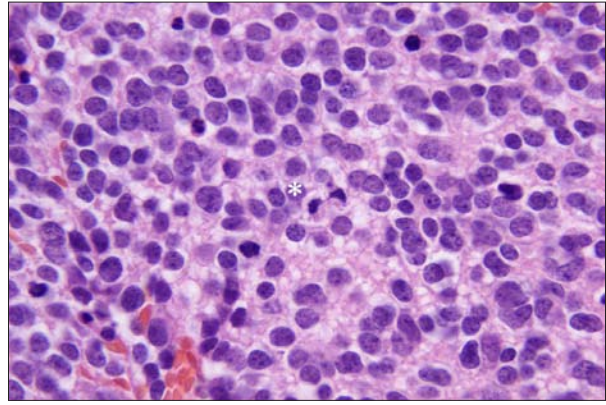
Најчешће замерке упућене класичном начину одређивања броја ћелија у митози односе се на недовољну репродуцибилност и потрошњу времена за бројање [9]. Последњих година произведени су имунохистохемијски показатељи митотске фазе ћелијског циклуса MPM-2 и PNH3, који се употребљавају на ткиву фиксираном формалином, а намењени су бројању митоза [10].

Фосфорилисани хистон H3, протеин који се налази у једру ћелије и који се јавља само у митотској фази ћелијског циклуса, може се открити као антиген антителима који се примењују за препознавање и пребројавање ћелија у митози [11]. Реч је о антителима (зеч-



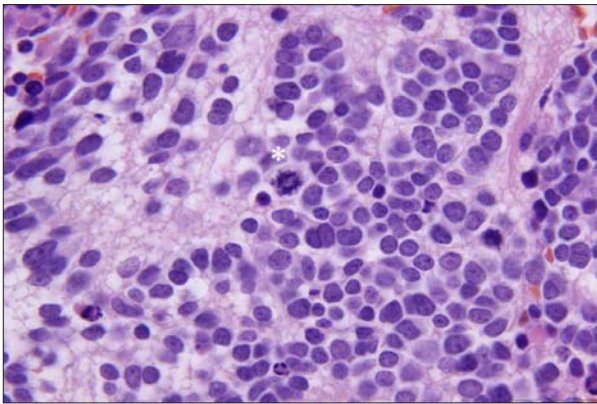
СЛИКА 1. Митотске фигуре профазе и анафазе (звездиче) у метастази неуробластома у лимфном чвору (HE, x1000).

FIGURE 1. Prophase and anaphase (asterix) mitotic figures of metastatic neuroblastoma in lymph node (HE, x1000).



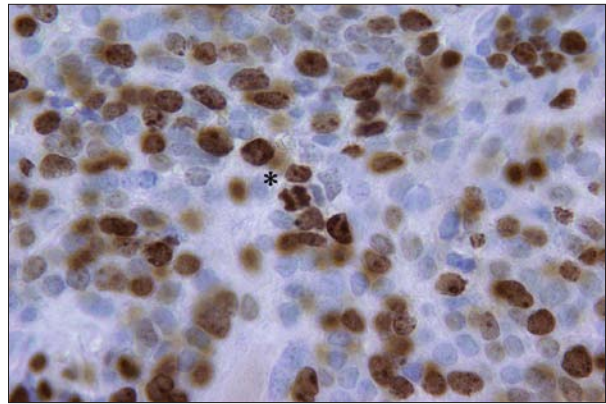
СЛИКА 3. Фаза цитокинезе (звездича) током деобе ћелије метастатског неуробластома (HE, x1000).

FIGURE 3. Cytokinesis (asterix) during tumor cell division in metastatic neuroblastoma (HE, x1000).



СЛИКА 2. Метафазно једро (звездича) у метастази неуробластома у лимфном чвору (HE, x1000).

FIGURE 2. Metaphase nucleus (asterix) of metastatic neuroblastoma in lymph node (HE, x1000).



СЛИКА 4. Ћелије пролиферативног пула метастатског неуробластома чија су једра маркирана антителом *Ki-67*. Звездичом је означено једро у метафазу (PAP, x1000).

FIGURE 4. Cells of proliferating pool in metastatic neuroblastoma whose nuclei were labeled with *Ki-67* antibody. Asterix shows nucleus in metaphase (PAP, x1000).

ја, поликлонска, анти-*PPH3*) одабраним за фосфорилисани серин на десетом месту аминокраја хистона *H3*, који је повезан с митотском кондензацијом хроматина, укључујући профазу. Корелација овог антитела са бројем митотских фигура препознатих бојењем *HE* веома је висока ($r=0,86$; $p<0,0001$) [12]. Антитело *PPH3* узима се за фосфорилисани серин на 28. месту хистона *H3* [10]. У значајној корелацији са бројем митоза је и показатељ ћелијске пролиферације *MCM2* (*minichromosome maintenance protein 2*) [13].

ОДНОС СА ДРУГИМ ПОКАЗАТЕЉИМА ПРОЛИФЕРАЦИЈЕ ЋЕЛИЈЕ

Иако је, као и у већини имунохистохемијских бојења, процена пролиферативне активности тумора антителима *Ki-67* (Слика 4) или *MIB-1* потенцијално корисна у одабраним ситуацијама, у многим случајевима она вероватно не пружа више од пажљивог испитивања митотске активности [14]. С друге стране, познато је да одложена фиксација ткива утиче на откривање митотских фигура, што нема утицаја на процену пролиферативне активности код коришћења екви-

валената *Ki-67* [15]. Ипак, међу еквивалентима *Ki-67*, као што су моноклонска антитела *MIB-1* (*DAKO*) и *MM1* (*Novocastra*), те поликлонски имуноглобулини *NCL-Ki-67p* (*Novocastra*) и *Rah Ki-67* (*DAKO*), највећи индекс обележавања на парафинским узорцима има *MIB-1*, и то у просеку за око 30% већи од осталих, али, на срећу, незначајно [16]. Постоји значајна корелација броја митоза и *Ki-67* позитивности, као и степена постојања нуклеарног антигена ћелија у пролиферацији (*PCNA*) [17].

Код менингеома се препоручује комбинована примена митотског индекса и индекса *Ki-67* позитивних ћелија, јер здружени имају већи значај за прогнозу настанка рецидива тумора [18]. Код карцинома дојке, ради побољшања прогнозе преживљавања болесника, препоручује се комбинована примена проточне цитометрије и митотске активности [19]. Откривање протеина регулатора ћелијског циклуса имунохистохемијским бојењем, као што је *p27*, уз митотски индекс, код карцинома дебелог црева и ректума даје додатне прогностичке информације [20]. Код болесника с позитивним геном за протеин *p73* утврђене су значајно веће вредности митотског индекса у ткиву карцино-

ма дојке у односу на оболеле жене без овог гена [21]. Број митоза епителних ћелија филодних тумора дојке је у значајној корелацији с постојањем естрогенских рецептора у истим ћелијама [22].

ВЕЛИЧИНА ТУМОРА

Величина тумора и митотски индекс остају основни, широко доступни параметри кинетике пролиферације ћелија и раста тумора. Тако, на пример, величина тумора и велики број митоза сврставају туморе (гастроинтестинални стромални тумор) у оне с тзв. високим ризиком, који захтевају примену хемиотерапије, или имају кључни прогностички значај (хемангиоперицитом) [23, 24]. Код гастроинтестиналних стромалних тумора, величина тумора и број митоза представљају независне прогностичке показатеље [25]. Величина тумора и митотски индекс исто тако могу бити основ класификације тумора (гастроинтестинални стромални тумори) [26].

ОДЛОЖЕНА ФИКСАЦИЈА ТКИВА И ТИП ФИКСАТИВА

Број митоза у екстирпираним ткивима које је одложено фиксирано смањује се после три сата за 10-13%, а после 12 сати за 39-40% у односу на вредности у узорцима који су одмах фиксирани [27]. Поређењем применом проточне цитометрије закључено је да узрок није у изласку ћелија из митотске фазе (без уласка нових ћелија у деобу), већ у отежаном препознавању митотских фигура (повећање броја пикнотичких митотских фигура, акумулација нуклеарног дебрија) због аутолитичких промена које се могу успорити чувањем нефиксираног ткива на температури од 4°C [27, 28]. Раствори за фиксирање ткива са ниском вредношћу рН (они који садрже живу, Буенов фиксатив, неадекватно пуферован формалински фиксатив) повећавају скупљање ткива и смањују једра ћелија [29].

КВАЛИТЕТ БОЈЕЊА И ДЕБЉИНА ПРЕСЕКА ТКИВА

Бојење хематоксилином и еозином (HE) може бити узрок отежаног разликовања пикнотичких или хиперхроматичних једара од митотских фигура, па се сугерише бојење муцикармином или Гимзиним методом [30]. У рутинској употреби су, међутим, стандардно обојени хистолошки препарати (HE), те се препоручује примена стриктних морфолошких критеријума за препознавање митотских фигура [31], као и разликовање ћелија у апоптози [1].

Дебљи пресеци ткива дају, с једне стране, повећан број митоза, а с друге отежавају препознавање и бројање [32]. Стандардна дебљина пресека ткива у прак-

си најчешће је 4-5 μm . На увећању објектива од 40 пута „дубина“ видног поља је око 1 μm , тако да митозе на оваквим препаратима треба бројати без промене фокуса, тј. без померања микрометарског завртња микроскопа [1].

БРОЈ ПРОЛИФЕРАТИВНИХ ЋЕЛИЈА

Фракција пролиферације или фракција раста, према дефиницији Менделсона (*Mendelsohn*) из 1960. године, представља однос броја ћелија у пролиферативном циклусу (изван фазе G_0) према укупном броју ћелија исте популације. Ако прихватимо званичну компетентност имунохистохемијског показатеља *MIB-1*, имамо прилику да овај параметар кинетике ћелијске пролиферације одређујемо на нов начин.

У рутинском испитивању стандардних ткивних препарата светлосним микроскопом број ћелија у митози се изражава на одређеном броју тзв. видних поља великог увећања. Међутим, на 26 различитих типова микроскопа пет произвођача измерене су површине видног поља великог увећања у распону од 0,071 до 0,414 mm^2 [33]. Иако је проблем неколико пута изнова уочен [34], и даље се број митоза изражава у односу на то видно поље великог увећања [35]. У последње време, ипак, налазимо примере у којима се број митоза на десет видних поља великог увећања (и даље погрешно називан митотским индексом!) допуњује површином од 0,18 mm^2 тих десет микроскопских видних поља [36].

Прецизнија испитивања захтевају изражавање броја митотских фигура (или на други начин дефинисаних ћелија у фази пролиферације) по јединици површине ткивног пресека (на mm^2) [37], што захтева израчунавање површине видног поља светлосног микроскопа изабраног увећања. Тада настају два методолошка проблема: а) не припадају све ћелије ткивног пресека истој испитиваној ћелијској популацији; б) ћелије и солидни тумори су тродимензионалне структуре, које се испитују у две димензије. Први проблем се решава изражавањем броја маркираних ћелија у односу на 100 испитиваних ћелија исте популације – индекс маркирања (митотски индекс, индекс имунохистохемијски позитивних ћелија) [38], а други стереолошким методима [39]. За рутинску употребу предлаже се да се број митотских фигура изражава у односу на тзв. стандардно поље површине 2 mm^2 [1, 9]. У идеалном случају површина пресека „великог увећања“ била би 0,2 mm^2 , тако да десет оваквих микроскопских видних поља обухвати стандардну површину величине 2 mm^2 . У литератури се могу наћи следећи примери: број митотских фигура на десет видних поља великог увећања означен је као индекс митотске активности [40], број митоза на хиљаду ћелија као митотски индекс [40, 41], а број митоза на 1 mm^2 као стандардизовани митотски индекс [42].

У приказаном примеру метастазе неуробластома у лимфном чвору код петогодишњег дечака (Слике 1-3) забележено је просечно 11 митоза на површини коју захвата 10 случајно одабраних видних поља „великог увељичања”. Прерачунавањем овог броја на стандардну микроскопску површину величине 2 mm^2 добија се просечна вредност од 23 митозе. Истовремено, митотски индекс туморских ћелија у овом случају је 1%, а индекс *Ki-67* позитивних ћелија 49% (Слика 4). Шимадин (*Shimada*) систем међународне патолошке класификације неуробластома (1999), која има прогностички значај, позива се, међутим, и на број митоза на 10 видних поља великог увељичања.

ИЗБОР УЗОРАКА ТКИВА И ВИДНИХ ПОЉА

Макроскопски одабир узорака ткива солидних тумора обично обухвата неколико случајно одабраних подручја изван зона крварења и некрозе, чији је број сразмеран величини тумора. Ако су митотске фигуре хомогено распоређене у тумору, онда се у различитим пресецима може очекивати Пуасонова (*Poisson*) дистрибуција њиховог броја у видном пољу [43]. Не треба, међутим, заборавити да су митозе заиста ретак догађај. Ипак, хетерогеност ћелијских субпопулација и грађе солидних малигних тумора је нешто што се подразумева, док митозе у туморима вишег хистолошког или нуклеарног градуса престају да буду ретак догађај.

При рутинском одређивању митотског индекса требало би имати у виду да је фракција ћелијске пролиферације већа на периферији тумора (*MIB1*) [44] или у близини васкуларизоване строме. За туморе пречника од око 10 mm [1] или веће (за семиоме до 20 mm) [45] може се сматрати да је просторна расподела туморских ћелија у митози хомогена. Хомогеност распореда ћелија у деоби посматрана независно од величине тумора могла се потврдити само у половини од десет различитих карцинома дојке [46], али је зато уочена у свих десет испитиваних карциноида плућа [1], што указује на значај биолошке природе тумора. Ако је циљ испитивање брзине раста солидног тумора као целине, најбоље је у избору јединица посматрања одабрати неки од метода систематског случајног избора узорака (ткивних исечака и микроскопских видних поља) [34].

ПОСТУПЦИ БРОЈАЊА

У свакодневној пракси бројање митоза почиње у подручју највеће митотске активности [1, 47], јер се степен зрелости (диферентности) тумора најчешће одређује према најмалигнијем ћелијском супклону. Практично, то су мање зрели (слабије диферентовани) [1] делови тумора или целуларнија подруч-

ја [48]. Могући су и други приступи: почетак бројања у тзв. активном подручју [49], на периферији тумора [34], на случајно изабраном месту [46], без ознаке где се налази стартно видно поље [50]. Следећа видна поља могу бити суседна (узастопна) [47, 49], случајна [46] или (у извештају) неназначена [34, 50].

Видних поља „великог увељичања” може бити 10 за карциноме дојке [34, 46, 47], с распоном површине бројања (укључујући строму!) од $0,159 \text{ mm}^2$ [47] до $0,274 \text{ mm}^2$ [34]. Код гастроинтестиналних стромалних тумора број видних поља је био од 10 [50] до 200 [51] с површином бројања (укључујући строму), када је била назначена, од $0,159 \text{ mm}^2$ за 10 видних поља [50] до $0,2 \text{ mm}^2$ за 100 видних поља „великог увељичања” [52]. У приказаном примеру (Слике 1-3) видна поља „великог увељичања”, на којима је одређиван број митотских фигура, одговарала су увељичању од 400 пута и имала су површину $0,0962 \text{ mm}^2$. Збрка је потпуна када се погледају коришћене статистичке мере: максималан број [46, 47] и средњи број (просек) [34, 52] митоза у видном пољу, или (укупан) број [50, 51] ћелија у деоби на изабраном броју видних поља.

У основи постоје два поступка бројања митоза: случајан (насуничан, стохастички), који преферирају патолози које занима фундаментални (биолошки и статистички) аспект проблема, и намерно изабран (који није случајан, нестохастичан), који се чешће примењује [1]. Потребно је нагласити да се као недостатак метода бројања митоза на стандардан начин најчешће истицала недовољна репродукцибилност. Међутим, овде није реч о недовољно прецизном препознавању објекта посматрања (митотска фигура), већ о различитим техникама бројања [43], како је у овом и претходним одељцима детаљно приказано. У том смислу, аутори у поновљеном поступку бројања налазе знатну репродукцибилност [53].

МИТОТСКИ ИНДЕКС И КИНЕТИКА РАСТА ТУМОРА

Кинетика раста солидних тумора код људи недовољно је истражена упркос врло богатом материјалу којим располажу патолози и широкој доступности метода бројања митоза на стандардно обојеним хистолошким препаратима, као и мерења запремине хируршки одстрањених тумора. Темељан приступ захтева примену стереолошке методологије и математичког моделирања. Стереолошки методи обезбеђују квантитативни увид у структуру тумора, посебно у удео растуће ћелијске популације. Диференцијални облик изабране функције раста омогућује везу с митотским индексом као непосредно мерљивим параметром кинетике пролиферације ћелије. Ослонац у времену даје врло слаба променљивост трајања митотске фазе ћелијског циклуса.

Првих неколико корака овог поступка приказано је следећим формулама [54]:

$$MI = \frac{N_{vdf}}{N_{vf}} \times 100$$

$$T_{potNf} = \frac{N_{vf}}{N_{vdf}} \times \ln 2 \times 0,5$$

$$\frac{\Delta N_f}{\Delta t} = \frac{N_{vdf} \times V_{vf} \times V}{0,5}$$

У првој формули митотски индекс (MI) представљен је као количник нумеричких густина митотских фигура (N_{vdf}) и једара (N_{vf}) исте ћелијске субпопулације тумора. Друга формула омогућаје израчунавање потенцијалног времена удвајања броја ћелија у сатима (T_{potNf}). Трећа формула користи се за израчунавање прираштаја броја ћелија као прираштаја функције раста помоћу запреминске густине одговарајуће фазе тумора (V_{vf}) и запремине тумора (V).

КЛИНИЧКИ ЗНАЧАЈ

Митотски индекс нашао је своју примену у следећим подручјима онкологије: 1) класификација тумора (гастроинтестинални стромални тумори) [26]; 2) разликовање неоплазми сличне морфологије (неуроендокрини тумори) [55]; 3) предвиђање биолошког понашања новотворина (гастроинтестинални стромални тумори, целуларни фибром јајника, гигантоцелуларни тумори костију) [56-58]; 4) градирање тумора (сквамозелуларни карцином ларинкса или усне дупље, аденокарцином ендометријума) [59-61]; 5) прогноза болести и преживљавање болесника (сквамозелуларни карцином усне дупље, гастроинтестинални стромални тумори, карцином грлића материце, тумор гранулоза ћелија јајника, трофобластни тумор лежишта плаценте, саркоми материце, малигни меланом коже, тумори ендокриног панкреаса, малигни лимфом, малигни мезотелиом, супратенторијални олигодендроглиом) [62-72]; 6) процена потенцијала рецидивирања тумора (лејомиом, синовиосарком, фиброзни тумор можданица, гастроинтестинални стромални тумори) [56, 73-75]; 7) процена могућности малигне трансформације (фиброзни тумор плеуре) [76]; 8) процена вероватноће метастазирања (карцином дојке, колоректални тумори ендокриних ћелија) [77, 78], 9) одлучивање о лечењу тумора (карцином дојке) [79]; 10) посматрање ефеката лечења (сквамозелуларни карцином усне дупље, карцином ректума) [80, 81]; 11) епидемиолошке студије промене агресивности тумора (карцином дојке) [82].

Уз величину тумора, митотски индекс је независни прогностички индикатор у карциному дојке код жена [83] и представља значајни предиктивни фактор двадесетогодишњег преживљавања болесница с карциномом дојке [84]. Код инвазивних карцинома дојке митотски индекс је у инверзном односу са старошћу болесница [85].

ЗАКЉУЧАК

Уз мноштво доступних метода прилагођених условима истраживања, напретку у познавању материје и комерцијалним аспектима, после опсежних и разноврсних анализа може се закључити да повећана пролиферација ћелија, без обзира на примењени метод откривања, снажно корелира с лошом прогнозом инвазивног канцера дојке [86]. Такође, бројање митоза обезбеђује најрепродукцибилније и независне прогностичке резултате [86].

Индекс ћелија у митози остаје незаобилазни параметар кинетике ћелијске пролиферације [66, 87] и у неким случајевима, као што су гастроинтестинални стромални тумори [88], једини независни прогностички индикатор у односу на друге показатеље ћелијске пролиферације, попут $Ki-67$ или циклина $D1$.

ЛИТЕРАТУРА

- Thunnissen FBJM, Ambergen AW, Koss M, Travis WD, O'Leary TJ, Ellis IO. Mitotic counting in surgical pathology: sampling bias, heterogeneity and statistical uncertainty. *Histopathology* 2001; 39:1-8.
- Marković-Lipkovski J, Brašanac D, Muller GA, Muller CA. Cadherins and integrins in renal cell carcinoma: an immunohistochemical study. *Tumori* 2001; 87(3):173-8.
- Brašanac D, Basta-Jovanović G, Mitrović D, Todorović V, Marković-Lipkovski J. Expression of integrins in renal cell carcinoma. *Arch Oncol* 1998; 6(Suppl 2):106.
- Blaschke S, Muller CA, Marković-Lipkovski J, et al. Expression of cadherin-8 in renal cell carcinoma and fetal kidney. *Int J Cancer* 2002; 101(4):327-34.
- Mitrović D, Basta-Jovanović G, Brašanac D, Časar-Borota O, Dragičević D, Marković-Lipkovski J. Expression of cadherins in renal cell carcinoma. *Arch Oncol* 1998; 6(Suppl 2):105.
- Govedarović V, Radojević-Škodrić S, Mitrović D, Müller CA, Müller GA, Marković-Lipkovski J. Ispoljavanje Fas i Fas-L u carcinomu ćelija bubrega. *Srp Arh Celok Lek* 2006; 134(5-6):213-8.
- Brašanac D, Marković-Lipkovski J, Hadži-Djokić J, Muller GA, Muller CA. Immunohistochemical analysis of HLA class II antigens and tumor infiltrating mononuclear cells in renal cell carcinoma. *Neoplasma* 1999; 46(3):173-8.
- Muller CA, Marković-Lipkovski J, Klatt T, et al. Human alpha defensin HNP-1, -2 and -3 in renal cell carcinoma: influence on tumor cell proliferation. *Am J Pathol* 2002; 160(4):1311-24.
- Gal R, Rath-Wolfson L, Rosenblatt Y, Halpern M, Schwartz A, Koren R. An improved technique for mitosis counting. *Int J Surg Pathol* 2005; 13(2):161-5.
- Tapia C, Kutzner H, Mentzel T, Savic S, Baumhoer D, Glatz K. Two mitosis-specific antibodies, MPM-2 and phospho-histone H3 (Ser28), allow rapid and precise determination of mitotic activity. *Am J Surg Pathol* 2006; 30(1):83-9.
- Taylor WR. FACS-based detection of phosphorylated histone H3 for the quantitation of mitotic cells. *Methods Mol Biol* 2004; 281:293-9.
- Bossard C, Jarry A, Colombeix C, et al. Phosphohistone H3-labeling for histoprostic grading of breast adenocarcinoma and computer-assisted determination of mitotic index. *J Clin Pathol*, published on line 3 Feb 2006.
- Sington JD, Freeman A, Morris LS, et al. Minichromosome maintenance protein in myxofibrosarcoma. *Mod Pathol* 2004; 17:235-40.
- Prayson RA. Cell proliferation and tumors of the central nervous system, Part II: Radiolabeling, cytometric, and immunohistochemical techniques. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; 61(8):663-72.
- Torp SH. Proliferative activity in human glioblastomas: Evaluation of different Ki-67 equivalent antibodies. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1997; 50:198-200.
- Lindboe CF, von-der-Ohe G, Torp SH. Determination of proliferation index in neoplasms using different Ki-67 equivalent antibodies.

- APMIS 2003; 111(5):567-70.
17. Barwujuk-Machala M, Musiatowicz B, Cylwik J, Reszec J, Augustynowicz A. AgNOR, Ki-67 and PCNA expression in fibroepithelial tumours of the breast in correlation with morphological features. *Folia Morphol (Warsz)* 2004; 63(1):133-5.
 18. Takahashi JA, Ueba T, Hashimoto N, Nakashima Y, Katsuki N. The combination of mitotic and Ki-67 indices as a useful method for predicting short-term recurrence of meningiomas. *Surg Neurol* 2004; 61(2):149-55.
 19. Michels JJ, Marnay J, Delozier T, Denoux Y, Chasle J. Proliferative activity in primary breast carcinomas is a salient prognostic factor. *Cancer* 2004; 100:455-64.
 20. Prall F, Ostwald C, Nizze H, Barten M. Expression profiling of colorectal carcinomas using tissue microarrays: cell cycle regulatory proteins p21, p27, and p53 as immunohistochemical prognostic markers in univariate and multivariate analysis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004; 12:111-21.
 21. Yamamoto T, Oda K, Kubota T, et al. Expression of p73 gene, cell proliferation and apoptosis in breast cancer: Immunohistochemical and clinicopathological study. *Oncol Rep* 2002; 9(4):729-35.
 22. Tse GM, Lee CS, Kung FY, et al. Hormonal receptors expression in epithelial cells of mammary phyllodes tumors correlates with pathologic grade of the tumor: a multicenter study of 143 cases. *Am J Clin Pathol* 2002; 118(4):522-6.
 23. Cypriano MS, Jenkins JJ, Pappo AS, Rao BN, Daw NC. Pediatric gastrointestinal stromal tumors and leiomyosarcoma. *Cancer* 2004; 101:39-50.
 24. Kaneko K, Shirai Y, Wakai T, Hasegawa G, Kaneko I, Hatakeyama K. Hemangiopericytoma arising in the greater omentum: report of a case. *Surg Today* 2003; 33:722-4.
 25. Fujimoto Y, Nakanishi Y, Yoshimura K, Shimoda T. Clinicopathologic study of primary malignant gastrointestinal stromal tumor of the stomach, with special reference to prognostic factors: analysis of results in 140 surgically resected patients. *Gastric Cancer* 2003; 6:39-48.
 26. Besana-Ciani I, Boni L, Dionigi G, et al. Outcome and long term results of surgical resection for gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Scand J Surg* 2003; 92:195-9.
 27. Donhuijsen K, Schmidt U, Hirche H, van Beuningin D, Budach V. Changes in mitotic rate and cell cycle fractions caused by delayed fixation. *Hum Pathol* 1990; 21:709-14.
 28. Bergers E, Jannink I, van Diest PJ, et al. The influence of fixation delay on mitotic activity and flow cytometric cell cycle variables. *Hum Pathol* 1997; 28:95-100.
 29. Baak JPA, Noteboom E, Koevoets JJM. The influence of fixatives and other variations in tissue processing on nuclear morphometric features. *Anal Quant Cytol Histol* 1989; 11:219.
 30. Donhuijsen K. Mitosis counts: Reproducibility and significance in grading malignancy. *Hum Pathol* 1986; 17:1122-5.
 31. Baak JPA. Mitosis counting in tumors. Editorial. *Hum Pathol* 1990; 21:683-5.
 32. Cross SS, Start RD. Estimating mitotic activity in tumors. *Histopathology* 1996; 29:485-8.
 33. Ellis PSJ, Whitehead R. Mitosis counting – A need for reappraisal. *Hum Pathol* 1981; 12:3-4.
 34. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19:403-10.
 35. Utsugi K, Shimizu Y, Akiyama F, et al. Clinicopathologic features of villoglandular papillary adenocarcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2004; 92:64-70.
 36. Meyer JS, Alvarez C, Milikowski C, et al. Breast carcinoma malignancy grading by Bloom-Richardson system vs proliferation index: reproducibility of grade and advantages of proliferation index. *Mod Pathol* 2005; 18(8):1067-78.
 37. Ikpatt OF, Kuopio T, Collan Y. Proliferation in African breast cancer: biology and prognostication in nigerian breast cancer material. *Mod Pathol* 2002; 15(8):783-9.
 38. Hilsenbeck SG, Allred DC. Improved methods of estimating mitotic activity in solid tumors. *Hum Pathol* 1992; 23:601-2.
 39. Jannink I, van-Diest PJ, Baak JP. Comparison of the prognostic value of four methods to assess mitotic activity in 186 invasive breast cancer patients: classical and random mitotic activity assessments with correction for volume percentage of epithelium. *Hum Pathol* 1995; 26:1086-92.
 40. Medri L, Volpi A, Nanni O, et al. Prognostic relevance of mitotic activity in patients with node-negative breast cancer. *Mod Pathol* 2003; 16:1067-75.
 41. Nicotina PA, Antico F, Caruso C, et al. Primary ovarian leiomyosarcoma. Proliferation rate and survival. *Eur J Gynaecol Oncol* 2004; 25:515-6.
 42. Kronqvist P, Kuopio T, Collan Y. Quantitative thresholds for mitotic counts in histologic grading: Confirmation in nonfrozen samples of invasive ductal breast cancer. *Annals of Diagnostic Pathology* 2000; 4:65-70.
 43. O'Leary TJ, Steffes MW. Can you count on the mitotic index? *Hum Pathol* 1996; 27:147-51.
 44. Connor AJM, Pinder SE, Elston CW, et al. Intratumoural heterogeneity of proliferation in invasive breast carcinoma evaluated with MIB1 antibody. *Breast* 1997; 6:171-6.
 45. Rabes HM, Schmeller N, Hartmann A, et al. Analysis of proliferative compartments in human tumors. II Seminoma. *Cancer* 1985; 55:1758-69.
 46. Jannink I, Risberg B, van Diest PJ, et al. Heterogeneity of mitotic activity in breast cancer. *Histopathology* 1996; 29:421-8.
 47. van-Diest PJ, Baak JP, Matze-Cok P, et al. Reproducibility of mitosis counting in 2469 breast cancer specimens: results from the Multicenter Morphometric Mammary Carcinoma Project. *Hum Pathol* 1992; 23:603-7.
 48. Ambros RA, Trost RC. Cellularity in breast carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1990; 93:98-100.
 49. Ueyama T, Guo KJ, Hashimoto H, Daimaru Y, Enjoji M. A clinicopathologic and immunohistochemical study of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer* 1992; 69:947-55.
 50. Cooper PN, Quirke P, Hardy GJ, Dixon MF. A flow cytometric, clinical, and histological study of stromal neoplasms of the gastrointestinal tract. *Am J Surg Pathol* 1992; 16:163-70.
 51. Haque S, Dean PJ. Stromal neoplasms of the rectum and anal canal. *Hum Pathol* 1992; 23:762-7.
 52. Amin MB, Ma CK, Linden MD, Kubus JJ, Zarbo RJ. Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen index in gastric stromal tumors. Correlation with mitotic count and clinical outcome. *Am J Clin Pathol* 1993; 100:428-32.
 53. Fiets WE, Bellot FE, Struikmans H, Blankenstein MA, Nortier JWR. Prognostic value of mitotic counts in axillary node negative breast cancer patients with predominantly well-differentiated tumours. *Europ J Surg Onc* 2005; 31:128-33.
 54. Mitrović D. Morfometrijska procena parametara kinetike rasta fibroadenoma i filodnih tumora dojke [doktorska disertacija]. Beograd: Medicinski fakultet; 2005.
 55. Megyesi M, Berta M, Khor A. Endobronchial large cell neuroendocrine carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2003; 9:198-200.
 56. Can B, Sokmensuer C. Clinicopathologic features, cellular differentiation, PCNA and P53 expressions in gastrointestinal stromal tumors. *Hepatogastroenterology* 2003; 50(Suppl 2):ccxliiii-cxlviii.
 57. Zanelli M, Cortecchia S, Folicaldi S, Pasquinelli G, Bondi A. Cellular fibroma of the ovary: description of a case. *Pathologica* 2002; 94(4):196-200.
 58. Frincu DL, Francu LL, Chirana A, Calin D, Nitescu A, Crisan-Dabija R. Quantitative histopathological criteria in predicting the giant bone cell tumors's grading. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2002; 106(1):147-53.
 59. Bayazit Y, Bakir K, Ucak R, Mumbuc S, Ozer E, Kanlikama M. Clinical and histopathological correlates of the proliferative activity in squamous cell laryngeal carcinoma. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)* 2002; 123(1):43-6.
 60. Sawair FA, Irwin CR, Gordon DJ, Leonard AG, Stephenson M, Napier SS. Invasive front grading: reliability and usefulness in the management of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2003; 32(1):1-9.
 61. Alkushi A, Abdul-Rahman ZH, Lim P, et al. Description of a novel system for grading of endometrial carcinoma and comparison with existing grading systems. *Am J Surg Pathol* 2005; 29(3):295-304.
 62. Smilek P, Dusek L, Vesely K, Rottenberg J, Kostrica R. Prognostic significance of mitotic and apoptotic index and the DNA cytometry in head and neck cancer. *Neoplasma* 2005; 52(3):199-207.
 63. Langer C, Gunawan B, Schuler P, Huber W, Fuzesi L, Becker H. Prognostic factors influencing surgical management and outcome of gastrointestinal stromal tumours. *Br J Surg* 2003; 90(3):332-9.
 64. Liu SS, Tsang BK, Cheung AN, et al. Anti-apoptotic proteins, apoptotic and proliferative parameters and their prognostic significance in cervical carcinoma. *Eur J Cancer* 2001; 37(9):1104-10.
 65. Sehouli J, Drescher FS, Mustea A, et al. Granulosa cell tumor of the

- ovary: 10 years follow-up data of 65 patients. *Anticancer Res* 2004; 24:1223-9.
66. Hoekstra AV, Keh P, Lurain JR. Placental site trophoblastic tumor: a review of 7 cases and their implications for prognosis and treatment. *J Reprod Med* 2004; 49:447-52.
 67. Malmström H, Schmidt H, Persson PG, Carstensen J, Nordenskjöld B, Simonsen E. Flow cytometric analysis of uterine sarcoma: Ploidy and S-phase rate as prognostic indicators. *Gynecologic Oncology* 1992; 44:172-7.
 68. Oestreicher N, White E, Malone KE, Porter PL. The prognostic importance of tumor mitotic rate confirmed in 1317 patients with primary cutaneous melanoma and long follow-up. *Ann Surg Oncol* 2004; 11:426-33.
 69. Rodallec M, Vilgrain V, Couvelard A, et al. Endocrine pancreatic tumours and helical CT: Contrast enhancement is correlated with microvascular density, histoprognostic factors and survival. *Pancreatology* 2006; 6:77-85.
 70. Tiemann M, Schrader C, Klapper W, et al. Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *Br J Haematol* 2005; 131(1):29-38.
 71. Beer TW, Carr NJ, Whittaker MA, Pullinger N. Mitotic and in situ end-labeling apoptotic indices as prognostic markers in malignant mesothelioma. *Annals of Diagnostic Pathology* 2000; 4:143-8.
 72. Prayson RA, Mohan DS, Song P, Suh JH. Clinicopathologic study of forty-four histologically pure supratentorial oligodendrogliomas. *Annals of Diagnostic Pathology* 2000; 4:218-27.
 73. Williams NP, Williams E, Fletcher H. Smooth muscle tumours of the vulva in Jamaica. *West Indian Med J* 2002; 51(4):228-31.
 74. de Silva MV, McMahon AD, Reid R. Prognostic factors associated with local recurrence, metastases, and tumor-related death in patients with synovial sarcoma. *Am J Clin Oncol* 2004; 27:113-21.
 75. Ogawa K, Tada T, Takahashi S, et al. Malignant solitary fibrous tumor of the meninges. *Virchows Arch* 2004; 444:459-64.
 76. Kanthan R, Torkian B. Recurrent solitary fibrous tumor of the pleura with malignant transformation. *Arch Pathol Lab Med* 2004; 128:460-2.
 77. Susnik B, Frkovic-Grazio S, Bracko M. Occult micrometastases in axillary lymph nodes predict subsequent distant metastases in stage I breast cancer: a case-control study with 15-year follow-up. *Ann Surg Oncol* 2004; 11(6):568-72.
 78. Kumarasinghe MP, Weng EK. Pathological features and their prognostic implications in colorectal endocrine cell tumors: a long-term follow-up study. *Pathology* 2005; 37(3):204-10.
 79. van-Diest PJ, Baak JP. The morphometric prognostic index is the strongest prognosticator in premenopausal lymph node-negative and lymph node-positive breast cancer patients. *Hum Pathol* 1991; 22:326-30.
 80. Noguchi M, Kinjyo H, Miyazaki A, Kubota H, Kohama G. Control of cell proliferation kinetics of tumor in neoadjuvant chemotherapy for advanced oral squamous cell carcinoma and its prognostic implications. *Int J Clin Oncol* 2002; 7(3):138-44.
 81. Farczadi E, Kaszas I, Baki M, Szende B. Changes in apoptotic and mitotic index, bcl2, and p53 expression in rectum carcinomas after short-term cytostatic treatment. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1010:780-3.
 82. Louwman WJ, van-Diest PJ, van-Beek MW, et al. Trends in breast cancer aggressiveness before the introduction of mass screening in southeastern Netherlands 1975-1989. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 73(3):199-206.
 83. Ikpat F, Kuopio T, Erekul A, Collan Y. Apoptosis in breast cancer: Nigerian vs. Finnish material. *Anal Quant Cytol Histol* 2002; 24(2):73-80.
 84. Kato T, Kameoka S, Kimura T, Nishikawa T, Kobayashi M. The combination of angiogenesis and blood vessel invasion as a prognostic indicator in primary breast cancer. *Br J Cancer* 2003; 88(12):1900-8.
 85. Oestreicher N, White E, Malone KE, et al. Hormonal factors and breast tumor proliferation: do factors that affect cancer risk also affect tumor growth? *Breast-Cancer Res Treat* 2004; 85:33-42.
 86. van-Diest PJ, van der Wall E, Baak JP. Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: a review. *J Clin Pathol* 2004; 57:675-81.
 87. Geller JI, Santana VM. Tumor rupture and mitotic index in pediatric sex cord-stromal tumors. *J Clin Oncol* 2004; 22:2032-3; author reply 2033-5.
 88. Wong NA, Young R, Malcomson RD, et al. Prognostic indicators for gastrointestinal stromal tumours: a clinicopathological and immunohistochemical study of 108 resected cases of the stomach. *Histopathology* 2003; 43:118-26.

MITOTIC INDEX IN EVALUATION OF TUMOUR PROLIFERATIVE ACTIVITY

Dragan MITROVIĆ, Vitomir GOVEDAROVIĆ, Jasmina MARKOVIĆ-LIPKOVSKI

Institute of Pathology, School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade

ABSTRACT

Tumour mitotic index represents a number of dividing cells per 100 tumour cells. It is the oldest and most frequently used parameter of cell proliferation kinetics in tumours, which is, in addition to numerous immunohistochemical and other markers, still routinely practised as a golden standard. Determination is dependent on urgent tissue fixation, fixative type, manner and procedure of staining, thickness of tissue sections, statistical expression of mitotic count, tissue and microscopic field sampling as well as a counting protocol. When the identical counting techniques are applied, determination of tumour mitotic index becomes an essentially reproductive method. Proposal for routine usage is to express the number of mitotic figures in standard vision area of 2 mm². Proceeding from minimal variability of mitotic time duration, there were showed a few original formulas which connect mitotic index, acquired by stereological methodology, with differential equation of tumour growth function. In this mathematical way, it is possible to connect structure

of the tumour with tumour growth kinetics parameters, for example with potential doubling time. This approach provides growth kinetic examination of once occurring measured human solid tumours, according to their morphology. Tumour mitotic index has been actually applied in classification, biological behaviour prediction, grading, prognosis, evaluation of relapse potential, malignant transformation and metastasis, treatment decision and therapy effect follow-up. In some malignant tumours, such as breast carcinoma, it is an independent prognostic factor.

Key words: tumour; mitotic count; growth kinetics; prognosis

Dragan MITROVIĆ
Institut za patologiju
Medicinski fakultet
Dr Subotića 1, 11000 Beograd
Tel.: 011 685 559 / lokal 103
E-mail: dramit@med.bg.ac.yu

* Рукопис је достављен Уредништву 2. 11. 2007. године.