

Peran Ekspresi *Minichromosome Maintenance 2 (MCM-2)* dan Ki-67 pada Astrositoma

Dewi Astuti Kurniawati, Dyah Fauziah

Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga
RSUD Dr. Soetomo
Surabaya

ABSTRAK

Latar belakang

Derajat histopatologi berdasarkan klasifikasi WHO pada astrositoma tidak cukup optimal untuk mendukung diagnosis dan prognosis karena subyektivitas penilaian gambaran histopatologi pada beberapa kasus astrositoma. Fungsi Ki-67 sebagai marker proliferasi masih memiliki keterbatasan. Sebaliknya, *Minichromosome maintenance 2 (MCM-2)* memiliki peran penting dalam mengontrol siklus sel, inisiasi dan elongasi replikasi DNA. Tujuan penelitian ini untuk menganalisis ekspresi MCM 2 dan Ki-67 pada derajat histopatologi.

Metode

Rancangan penelitian yang digunakan adalah metode potong lintang. Sampel penelitian adalah semua blok parafin penderita astrositoma pada RSUD Dr Soetomo Surabaya periode 2010-2014. Pada sampel dikelompokkan berdasarkan derajat histopatologi dalam derajat II, derajat III dan derajat IV. Sampel dipulas menggunakan immunohistokimia dengan antibodi monoklonal MCM-2 dan Ki-67. Perbedaan ekspresi MCM-2 dan Ki-67 pada astrositoma derajat II, III, dan IV dianalisa statistika menggunakan uji Kruskal-Wallis. Hubungan antara ekspresi MCM-2 dan Ki-67 pada astrositoma dianalisa menggunakan uji Spearman.

Hasil

Uji Kruskal-Wallis ekspresi MCM-2 antara astrositoma derajat rendah (II) dan derajat tinggi (III) menunjukkan perbedaan bermakna. Uji Kruskal-Wallis ekspresi Ki-67 antara astrositoma derajat rendah (II) dan derajat tinggi (III & IV) menunjukkan perbedaan tidak bermakna. Sedangkan, uji Spearman ekspresi MCM-2, Ki-67 dan derajat histopatologi astrositoma menunjukkan korelasi positif.

Kesimpulan

Ekspresi MCM-2 dapat digunakan untuk membedakan antara astrositoma derajat II dan III. Ekspresi Ki-67 dapat digunakan untuk membedakan astrositoma derajat III dan derajat IV.

Kata kunci : astrositoma, Ki-67, MCM-2.

ABSTRACT

Background

WHO classification of astrocytoma is considered sub optimal to determine diagnosis and prognosis of astrocytoma mainly because of subjective assessment of the histopathological features in some case. Ki-67 as proliferation marker have been, however its function is still unclear and have some limitation. In contrast, the *Minichromosome maintenance 2 (MCM-2)* protein plays crucial role in controlling the cell cycle, initiation and elongation of DNA replication. The objective to analyze the expression of MCM 2 and Ki-67 in grade II, III, and IV astrocytomas, as well as analyzing the correlation between MCM 2 and Ki-67 expressions in astrocytoma.

Methods

Study design is cross sectional. Sample was obtained from paraffin-embedded tissue of astrositoma patients diagnosed at Dr Soetomo Hospital Surabaya between 2010-2014, divided into grade II, grade III and grade IV. Immunohistochemistry with monoclonal antibody of MCM 2 and Ki-67 were performed. The differences of MCM-2 and Ki-67 expression on astrocytoma were analyzed by Kruskal-Wallis test. The correlation between MCM-2 and Ki-67 expression were analyzed by Spearman test.

Results

Kruskal-Wallis test on MCM expression between astrocytoma grade II and III showed significant differences. Kruskal-Wallis test on Ki-67 expression between astrocytoma grade II and III showed no significant differences. Whilst, Spearman test on expression between MCM-2, Ki-67 and histopathological grading showed positive correlation

Conclusion

MCM-2 expression may play role in distinguishing astrocytoma grade II and III. Yet Ki-67 expression play role distinguishing astrocytoma grade III and IV.

Key words : astrocytoma, Ki-67, MCM-2.

PENDAHULUAN

Astrositoma adalah neoplasma yang berasal dari salah satu sel glia yaitu astrosit. Tumor astrosit ini bervariasi, distribusi umur, jenis kelamin, potensi pertumbuhan, tingkat invasi, gambaran morfologi, dan kecenderungan progresif tergantung lokasinya susunan saraf pusat (SSP), sehingga menimbulkan gejala klinis yang berbeda.¹ Insiden glioma setiap tahun sekitar 5 per 100.000 penduduk. Astrositoma merupakan jenis glioma yang paling sering terjadi dan mencakup lebih dari 50% tumor ganas primer di otak;² namun data tentang angka kejadian tumor otak terutama astrocytoma di Indonesia belum ada. Data Departemen Patologi Anatomik RSUD Dr. Soetomo Surabaya menunjukkan bahwa sejak tahun 2010-2014, Departemen Bedah Saraf telah melakukan tindakan bedah pada 79 kasus.³

Sistem klasifikasi WHO membagi astrositoma menjadi empat derajat histopatologi yaitu astrositoma pilositik (derajat I), astrositoma difusa (derajat II), astrositoma anaplastik (derajat III) dan glioblastoma (derajat IV).⁴ Derajat histopatologi merupakan salah satu indikator prognosis yang penting dan mempengaruhi pilihan terapi, namun sistem derajat astrositoma berdasarkan klasifikasi WHO ini memiliki keterbatasan sehingga diperlukan pemeriksaan penunjang dengan tambahan marker lain untuk meningkatkan akurasi diagnosis dan prognosis astrositoma. Metode yang sering digunakan untuk menilai perilaku biologik tumor adalah menilai aktivitas proliferasi.⁵

Marker proliferasi konvensional yang sering digunakan adalah Ki-67. Protein ini terekspresi pada sel yang mengalami proliferasi, namun menghilang segera setelah mitosis dan memiliki waktu paruh yang pendek yaitu 1 jam atau kurang. Sampai saat ini, peran Ki-67 dalam siklus sel belum jelas. Oleh karena itu, penilaian tingkat proliferasi sel membutuhkan marker lain yang berperan langsung pada regulasi siklus sel.^{2,4} Penelitian terdahulu menunjukkan nilai Ki-67 yang tumpang tindih pada masing-masing derajat astrositoma. Nilai Ki-67 pada glioblastoma bisa serendah pada derajat II. Hal ini mengindikasikan bahwa Ki-67 tidak dapat digunakan sebagai marker tunggal untuk menentukan diagnosis dan prognosis.⁶

Kesalahan replikasi DNA adalah syarat utama proliferasi sel yang tidak terkendali.⁷ Replikasi DNA diatur secara ketat, dan hanya

terjadi satu kali pada setiap siklus sel. Protein yang terlibat dalam inisiasi replikasi DNA yaitu *pre-replicative complex* (Pre-RC) memegang peran utama dalam regulasi replikasi DNA. Salah satu protein Pre-RC adalah kompleks protein *minichromosome maintenance* (MCM) yang terdiri dari enam subunit (MCM 2-7). MCM-2 adalah salah satu subunit dari kompleks MCM 2-7 yang berperan mengontrol replikasi DNA. Protein ini diekspresikan pada keseluruhan fase G1, S, G2, dan M siklus sel. MCM juga bertindak sebagai helikase dengan membuka untai ganda DNA pada proses replikasi. Oleh karena peran pentingnya dalam duplikasi genom pada sel yang berproliferasi, deregulasi fungsi protein MCM berperan dalam tumorigenesis. Di samping itu, peran MCM sebagai marker diagnostik dan prognostik telah dilaporkan pada beberapa neoplasma lainnya.^{8,9}

Sampai saat ini, penelitian di Indonesia tentang ekspresi MCM-2 dan Ki-67 pada astrositoma masih jarang dilakukan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menganalisa ekspresi MCM-2 dan Ki-67 pada astrositoma derajat II, III dan IV, serta menganalisis korelasi antara ekspresi MCM-2 dan Ki-67 pada astrositoma.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan observasional analitik dengan metode potong lintang yang dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomik RSUD Dr. Soetomo Surabaya periode Januari 2010-Desember 2014. Sampel berupa blok parafin penderita astrositoma derajat II, III dan IV yang masih memiliki jaringan tumor yang representatif untuk pemeriksaan imunohistokimia.

Pemeriksaan imunohistokimia dilakukan dengan menggunakan antibodi monoklonal MCM-2 (GeneTex, USA) dengan dilusi 1:500 dan antibodi monoklonal Ki-67 (Biocare, USA) dengan dilusi 1:200. Ekspresi MCM-2 dan Ki-67 dikatakan positif bila terpulsa coklat pada inti sel tumor mulai dari intensitas lemah sampai kuat. Penghitungan ekspresi MCM-2 dan Ki-67 dilakukan pada area tumor dengan pulasan terbanyak (*hot spot*), dihitung persentase sel tumor yang positif dari 1000 sel dan dinyatakan dalam *labelling index* (LI).⁸

Data yang terkumpul dianalisis dengan SPSS. Perbedaan ekspresi MCM-2 dan Ki-67 pada astrositoma derajat II, III dan IV dianalisis menggunakan uji statistik Kruskal-Wallis dan jika bermakna dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney.

Korelasi antara ekspresi MCM-2, Ki-67 dan derajat astrositoma dianalisis menggunakan uji statistik Spearman.

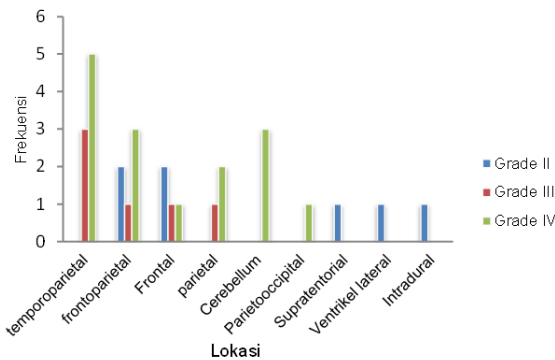
HASIL

Data demografi berupa usia dan jenis kelamin yang didapatkan pada penelitian ini terlihat pada Tabel 1. Penderita astrositoma terbanyak adalah laki-laki sebanyak 18 orang (64,3%) dan perempuan sebanyak 10 orang (35,7%). Usia termuda penderita adalah 3 tahun dan yang paling tua 61 tahun. Usia penderita astrositoma paling banyak berada pada rentang usia 20-<50 tahun (71,4%) dengan kasus terbanyak adalah glioblastoma (15 kasus).

Tabel 1. Karakteristik penderita.

Karakteristik	Frekuensi	Persentase
Jenis kelamin		
Laki-laki	18	64,3%
Perempuan	10	35,7%
Usia		
≤ 20 th	3	10,7%
20-<50 th	20	71,4%
≥ 50 th	5	17,9%
Astrositoma		
Grade II	7	25%
Grade III	6	21,4%
Grade IV	15	52,6%

Data lokasi tumor yang didapatkan pada penelitian ini, paling banyak terdapat di regio temporoparietal (28,6%). Lokasi tumor yang paling jarang terdapat pada *regio parieto occipital*, supratentorial, ventrikel lateral, dan intradural ekstraparadulla yaitu masing-masing sebanyak 1 kasus (3,6%), seperti terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Distribusi astrositoma berdasarkan lokasi.

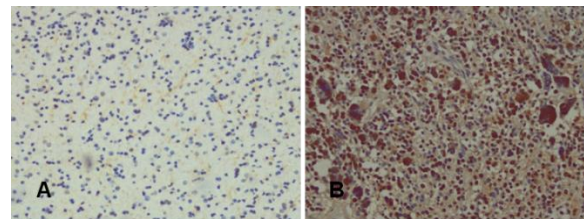
Tabel 2. Nilai ekspresi MCM-2 pada astrositoma.

Grade	n	Ekspresi MCM-2				p
		\bar{x}	SD	Min	Max	
II	7	2,86 ^a	3,77	0	10	0,001*
III	6	18,75 ^b	21,64	2	60	
IV	15	32,80 ^b	21,51	8	85	

Keterangan: *signifikan pada $\alpha=0,05$ (Kruskal-Wallis test)

Pada Tabel 2, uji Kruskal-Wallis ekspresi MCM-2 antara astrositoma derajat II, III dan IV menunjukkan perbedaan bermakna ($p=0,001$). Ekspresi MCM-2 antara astrositoma derajat II dan III, astrositoma derajat III dan IV menunjukkan perbedaan bermakna; sedangkan antara derajat III dan IV menunjukkan perbedaan tidak bermakna. Di samping itu, uji korelasi antara ekspresi MCM-2 dan derajat astrositoma menunjukkan korelasi positif.

Ekspresi MCM-2 yang terpulas positif terlihat pada Gambar 2.



Gambar 2. A. Ekspresi MCM-2 dengan LI rendah pada astrositoma derajat II; B. Ekspresi MCM-2 dengan LI tinggi pada glioblastoma (astrositoma derajat IV).

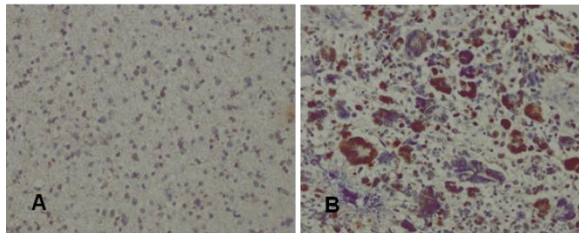
Tabel 3. Nilai ekspresi Ki-67 pada astrositoma.

Grade	n	Ekspresi Ki-67 (%)				p
		\bar{x}	SD	Min	Maks	
II	7	5,64 ^a	7,31	0	20	0,025*
III	6	5,67 ^a	5,71	1	15	
IV	15	22,33 ^b	23,14	0	75	

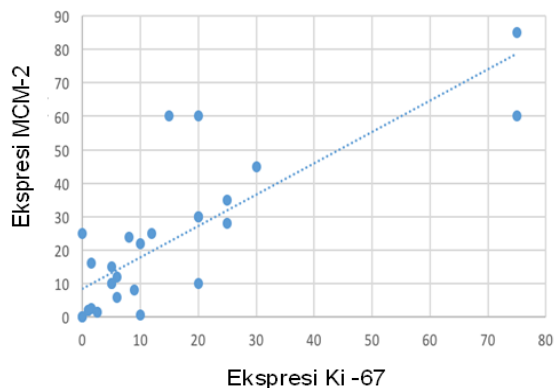
Keterangan: *signifikan pada $\alpha=0,05$ (Kruskal-Wallis test).

Analisis Kruskal-Wallis ekspresi Ki-67 pada astrositoma derajat II, III, IV menunjukkan perbedaan bermakna $p=0,025$ ($p<0,50$) (Tabel 3). Ekspresi Ki-67 antara astrositoma derajat II dan IV, III dan IV menunjukkan perbedaan bermakna; sedangkan antara derajat II dan III menunjukkan perbedaan tidak bermakna.

Pulasan imunohistokimia Ki-67 dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. A. Ekspresi Ki-67 dengan LI rendah pada astrositoma derajat II dan B. Ekspresi Ki-67 dengan LI tinggi pada glioblastoma (astrositoma derajat IV)



Gambar 4. Korelasi ekspresi MCM-2 dan ekspresi Ki-67.

Uji korelasi Spearman antara ekspresi Ki-67 dan derajat astrositoma menunjukkan nilai koefisien korelasi (r_s) koefisien korelasi (r_s)=0,508 dan $p=0,006$ ($p<0,05$), yang artinya terdapat korelasi positif antara ekspresi Ki-67 dan derajat astrositoma. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan ekspresi Ki-67 seiring dengan peningkatan derajat astrositoma.

Uji korelasi antara ekspresi MCM-2 dan Ki-67 menunjukkan hasil positif dengan koefisien korelasi (r_s)=0,841 dan $p=0,000$ ($p<0,005$) (Gambar 4).

DISKUSI

Distribusi usia penderita berada pada rentang 3 sampai 61 tahun dengan usia penderita tumor paling banyak berada pada rentang usia 20-<50 tahun. Hal ini sesuai dengan penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa astrositoma terjadi lebih sering pada usia 20-44 tahun.⁷ Penelitian lain menyatakan bahwa tumor astrositik dapat terjadi pada awal dekade pertama, dengan puncak insidensi astrositoma derajat

rendah (astrositoma difusa) terjadi pada dewasa muda yaitu usia 30-40 tahun. Selain itu, 60% kasus terjadi pada usia 20-45 tahun, 30% kasus terjadi pada usia >45 tahun dan 10% kasus pada usia <20 tahun. Insidensi puncak glioblastoma pada dekade ke-6.^{4,10}

Distribusi astrositoma menurut jenis kelamin didapatkan laki-laki lebih banyak dibandingkan perempuan. Data epidemiologi peneliti terdahulu menyatakan bahwa insiden astrositoma didominasi oleh jenis kelamin laki-laki, namun belum ada penjelasan yang rinci.^{4,11}

Data lokasi tumor pada penelitian ini paling banyak terdapat pada regio temporo-parietal. Hal ini sesuai dengan peneliti terdahulu yang menyatakan bahwa astrositoma derajat rendah paling sering terjadi di regio frontal dan temporal, tapi bisa juga pada batang otak dan *spinal cord*. Begitu juga lokasi glioblastoma sering pada regio frontal, temporal dan parietal.¹²

Sistem derajat histopatologi astrositoma berdasarkan klasifikasi WHO merupakan salah satu kriteria untuk memprediksi prognosis dan respon terhadap terapi. Sistem ini dinilai berdasarkan gambaran atipia, aktivitas mitosis, proliferasi vaskular dan nekrosis.⁴ Penilaian derajat astrositoma berdasarkan klasifikasi WHO ini memiliki keterbatasan dan diperlukan metode tambahan untuk menilai diagnosis dan prognosis tumor.⁹ Saat ini yang digunakan ini untuk menilai perilaku biologis tumor adalah aktivitas proliferasi dan marker proliferasi, dengan menggunakan Ki-67/MIB-1. Protein ini terekspresi pada sel yang mengalami proliferasi selama pertengahan fase G1, meningkat ekspresinya pada fase S dan G2, serta mencapai puncak pada fase M siklus sel. Ki-67 dikatabolisme secara cepat pada akhir fase M dan tidak terdeteksi lagi pada sel yang istirahat (G0 dan awal G1).^{8,9}

Rerata ekspresi Ki-67 pada astrositoma derajat rendah (derajat II) dan astrositoma derajat tinggi (derajat III) pada penelitian ini hampir tidak ada perbedaan. Sebagian besar penelitian antara astrositoma derajat rendah dan derajat tinggi menunjukkan perbedaan bermakna secara statistik. Meskipun sebagian besar penelitian antara astrositoma derajat rendah (derajat II) dan astrositoma derajat tinggi (derajat III dan IV) menunjukkan perbedaan yang bermakna secara statistik, namun nilai ekspresi Ki-67 pada kelompok tumor yang

berbeda menunjukkan variasi.⁶ Penelitian ini juga menunjukkan ekspresi Ki-67 yang bervariasi tiap derajat. Diantara astrositoma derajat tinggi, didapatkan 1 kasus glioblastoma dengan LI Ki-67 cukup rendah yaitu 5% dan 1 kasus astrositoma anaplastik dengan LI 1,5%. Beberapa studi juga menunjukkan adanya nilai Ki-67 yang tumpang tindih antara masing-masing derajat. Nilai Ki-67 pada glioblastoma dapat serendah derajat II. Hal ini dapat dilihat dari penelitian terdahulu yang menunjukkan nilai rata-rata Ki-67 pada glioblastoma sebesar 9,12% dan 24,3%.¹³ Hal ini mengindikasikan bahwa Ki-67 tidak dapat digunakan sebagai marker tunggal untuk menentukan diagnosis dan prognosis.⁶

Pada penelitian ini menunjukkan korelasi positif antara ekspresi Ki-67 dan derajat astrositoma artinya peningkatan ekspresi Ki-67 seiring dengan peningkatan derajat astrositoma. Penelitian terdahulu menunjukkan adanya korelasi positif antara peningkatan ekspresi Ki-67 dan *survival* dan rekurensi dengan nilai *cut off* yang bervariasi antara 1,5% sampai dengan 15,3%; sehingga cukup sulit untuk membandingkan studi satu dengan yang lainnya dan memutuskan nilai *cut off* yang pasti; namun nilai Ki-67 >10% dilihat sebagai nilai pedoman yang layak untuk mengindikasikan tumor astrositik dengan potensi keganasan yang meningkat.⁶

Variasi LI Ki-67 dapat disebabkan oleh beberapa faktor antara lain faktor pemrosesan jaringan, prosedur imunohistokimia dan interpretasi hasil pulasan imunohistokimia. Faktor lainnya diduga disebabkan oleh heterogenitas tumor dan kesalahan pemilihan sampel jaringan.

Protein MCM-2 adalah salah satu subunit dari kompleks MCM 2-7 dan masing-masing subunit memiliki peran yang sama dalam pembentukan Pre-RC untuk memulai replikasi. Protein ini berperan saat inisiasi replikasi DNA dan membatasi replikasi satu kali setiap siklus sel.¹⁴ Ekspresi MCM 2-7 dan perannya dibutuhkan dalam menjaga kestabilan genom. Peningkatan ekspresi dari berbagai subunit protein MCM dilaporkan pada tumor ganas beberapa organ antara lain laring, tiroid, kolon, pankreas, paru, ovarium, prostat, ginjal dan payudara. Di antara subunit protein MCM, yang paling sering diteliti adalah protein MCM-2.¹⁵

Nilai ekspresi MCM-2 pada tiap derajat tumor dalam penelitian ini cukup bervariasi,

sehingga nilai ekspresi MCM-2 tampak tumpang tindih pada tiap derajat astrositoma. Hal ini diduga disebabkan jumlah sampel terbatas dan heterogenitas tumor astrositik.⁵ Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan LI MCM-3 bervariasi pada astrositoma derajat I-IV. Astrositoma derajat I menunjukkan LI <5% dan >10% pada astrositoma derajat II-IV. LI MCM-3 >75% juga ditemukan pada astrositoma derajat III dan derajat IV.¹⁶

Berdasarkan analisis statistik, didapatkan perbedaan ekspresi MCM-2 yang bermakna pada astrositoma derajat II, III dan IV. Perbedaan ini, menunjukkan korelasi yang kuat antara ekspresi MCM-2 dan derajat astrositoma, yang artinya peningkatan ekspresi MCM-2 meningkat seiring peningkatan derajat. Penelitian terdahulu menunjukkan adanya perbedaan ekspresi antara glioma derajat II dan derajat III. Astrositoma derajat III menunjukkan ekspresi yang lebih tinggi dibandingkan derajat II. Kasus oligodendroglioma dengan LI tinggi menunjukkan prognosis lebih jelek.¹⁷

Korelasi positif antara ekspresi MCM-2 dan Ki-67 pada semua derajat astrositoma dalam penelitian menunjukkan adanya peningkatan ekspresi MCM-2 seiring dengan peningkatan ekspresi Ki-67. Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa ekspresi MCM-3 dan Ki-67 pada astrositoma memiliki korelasi yang berbeda bermakna sesuai usia, derajat histopatologi tumor dan rekurensi.¹⁸ Korelasi antara ekspresi MCM-2 dan Ki-67 pada organ lain di antaranya pada lesi jinak dan lesi ganas laring, karsinoma kolon dan payudara menunjukkan hubungan yang berbeda bermakna.¹⁹⁻²¹

Pada penelitian ini, satu sampel astrositoma derajat tinggi (glioblastoma) dengan Ki-67 terpulas negatif, namun dengan MCM-2 terpulas positif 25%. Pola ekspresi MCM dan Ki-67 selama fase siklus sel hampir sama, akan tetapi analisis secara detail menunjukkan ada perbedaan antara kedua protein ini. Protein Ki-67 tidak terekspresi pada fase awal G1, sedangkan MCM yang merupakan marker *pan cell cycle* diekspresikan pada keseluruhan G1, S, G2 dan M siklus sel.²² Peneliti terdahulu menyebutkan bahwa pada sel yang berproliferasi cepat, fase G1 siklus sel menjadi sangat pendek dan sel lebih banyak berada pada fase S, G2 ataupun fase M, namun peran Ki-67 dalam siklus sel belum jelas.²³

Pada penelitian ini didapat satu sampel astrositoma derajat rendah (derajat II) dengan ekspresi Ki-67 dan MCM-2 terpulas negatif. Peneliti sebelumnya menyebutkan bahwa kedua protein ini tidak diekspresikan selama fase G0. Protein MCM juga tidak diekspresikan pada sel yang mengalami diferensiasi dan fase *senescent*. Sel tumor biasanya berproliferasi dengan lambat terutama pada tahapan awal tumorigenesis.²⁴

Korelasi yang kuat antara ekspresi MCM-2 dan ekspresi Ki-67 serta adanya perbedaan yang bermakna pada tiap derajat astrositoma menunjukkan bahwa MCM-2 dapat digunakan sebagai marker proliferasi pada astrositoma.

KESIMPULAN

Ekspresi MCM-2 dapat digunakan untuk membedakan antara astrositoma derajat II dan III. Ekspresi Ki-67 dapat digunakan untuk membedakan astrositoma derajat III dan derajat IV.

DAFTAR PUSTAKA

1. Japardi. Astrocytoma: Insiden dan pengobatannya. *J Ked Trisakti*. 2003; 22: 110-15.
2. Behin A, Hoang Xuan K, Carpentier AF, Delattre. Primary Brain Tumors in Adults. *The Lancet*. Elsevier. 2003; 361: 323-31.
3. Sofiana FD. Studi Retrospektif Tumor Sistem Syaraf Pusat di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo Surabaya Periode 2010-2014. Surabaya: Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga; 2015.
4. Deimling AV, Burger PC, Nakazato Y, Ohgaki H, Kleihues P. Astrocytic Tumours. In WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Lyon: IARC; 2007.
5. Landstrom TV, Varughese RK, Sundstrom S, Torp SH. Expression and Clinical Significance of the proliferation marker Minichromosome Maintenance Protein 2 (MCM 2) in Diffuse Astrocytoma WHO grade II. *Diag Pathol*. 2013; 8: 1-6.
6. Johannessen AN, Torp. The Clinical Value of Ki-67/MIB-1 Labeling Index in Human Astrocytomas. 2006 (cited 2016 June 4). Available from : <http://www.webio.hu/por/>
7. Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nature Clin Prac Neurol J*. 2006; 2: 494-501.

8. Nicholas E, Simon, Schwacha A. The MCM 2-7 Replicative Helicase: Promising Chemotherapeutic Target. *Biomed Res Int*. 2014: 1-14.
9. Lau E, Tsuji T, Guo L, Lu SH, Jiang W. Review: The Role of pre replicative complex pre RC components in oncogenesis. *FASEB J* 2007; 21: 3786-94.
10. Ashkavandi ZJ, Nafjani AD, Tadbir A, Pardis S, Ranjbar MA, Asraf. MCM3 as novel diagnostic marker in benign & malignant salivary gland tumor. *As Pac J Cancer Prev*. 2013; 14: 3479-82.
11. Maiti AK, Ghosh K, Chatterjee U, Chakrobarti S, Chatterjee S, Basu S. Epidermal growth factor receptor and proliferating cell nuclear antigen in astrocytomas. *Neurol India*. 2008; 56: 456-62.
12. Grier JT, Batchelor T. Low grade in adult. *The Oncologist J*. 2006; 11: 681-93.
13. Gines CL, Rosario GB, Daniel M, Jose GD and Miguel CN. Primary glioblastoma with different pattern of EGFR amplification and the relationship with gene expression profile. *Mol Targets CNS Tumors*. 2011; 23: 485-98.
14. Hsu CY, Donald MH, Ching FY. Interobserver reproducibility of MIB-1 labeling in astrocytic tumors using different counting methods. *Mod Pathol*. 2003; 16: 951-57.
15. Cobanoglu U, Mungan S, Gundogdu C, Erzos S, Ozoran Y, Aydin F. 2010. The Expression of MCM-2 in Breast Carcinoma : A Stereolog approach, *Bratisl Lek Listy*. 2011; 111: 45-9.
16. Giaginis C, Vgenopoulou S, Vielh P, Theocaris S. MCM protein as diagnostic and prognostic tumor markers in the clinical setting. *Histol Histopathol*. 2010; 25: 351-70.
17. Solling A, Sackewitz M, Volkmar M, Schaarschmidt D, Jacob R, Holzhausen HJ *et al*. Minichromosome maintenance protein 3 elicits a cancer restricted immune response in patients with brain malignancies and is a strong independent predictor of survival in patients with anaplastic astrocytoma. *Clin Cancer Res*. 2005; 11: 249-58.
18. Warthon SB, Chan KK, Anderson JR, Stoeber K, Williams GH. Replicative MCM-2 protein as a novel proliferation marker in oligodendrogliomas and its relationship to Ki-67 labelling index, Histological grade and prognosis, *Nephropatol Appl Neurobiol*. 2001; 27: 305-13.

19. Chatrath P, Scott IS, Morris LS, Davies RJ, Rushbrook SM, Bird K, *et al.* Aberrant expression of minichromosome maintenance protein-2 and Ki-67 in laryngeal squamous epithelial lesions. *Br J Cancer.* 2003; 89: 1048-54.
20. Giaginis C, Vgenopoulou S, Vielh P, Theocaris S. MCM protein as diagnostic and prognostic tumor markers in the clinical setting. *Histol Histopathol.* 2010; 25: 351-70.
21. Wojnar A, Kobierzycki, Krolicka, Pula B, Okolow MP, Dziegel P. Correlation of Ki-67 and MCM-2 Proliferative Marker Expression with Grade of Histological malignancy (G) in Ductal Breast Cancer. *Folia Histochem Cytobiol.* 2010; 48: 442-6.
22. Hua C, Zhao G, Lie Y, Bie L. Minichromosome maintenance (MCM) family as potential diagnostic and prognostic tumor markers for human glioma. *BMC Centre.* 2014; 14: 526.
23. Shresta P, Kurisu. Usefulness of Ki-67 in the histological evaluation of neoplastic lesions of central nervous system. *J Inst Med.* 2008; 3: 168-71.
24. Tannock, Hill, Bristow, Harrington. *Basic Science of Oncology.* 5th ed. McGraw-Hill Education. 2013.