

T1276



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

BENİGN, BORDERLINE VE MALİGN EPİTELYAL OVER TÜMÖRLERİNDE PROLİFERATİF AKTİVİTENİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL (Ki-67, PCNA) VE DNA PLOİDİ ("FLOW CYTOMETRY") İLE BİRLİKTE KLİNİKOPATOLOJİK PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ

T1276/1-1

UZMANLIK TEZİ

Dr. Semra PAKER KARABURUN

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Şeyda KARAVELİ

"Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonunca 99.01.0103.03 Proje No ile Desteklenmiştir"

"Tezimden Kaynakça Gösterilerek Yararlanılabilir"

Antalya, 1999

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
Merkez Kütüphanesi

TEŞEKKÜR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında uzmanlık eğitimim süresince ilgi ve desteklerini esirgemeyen saygıdeğer hocalarıma, tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız ve tez hocam Sayın Prof.Dr.Şeyda KARAVELİ'ye,

Birlikte çalışmaktan zevk ve gurur duyduğum öğretim görevlisi, uzman ve asistan arkadaşlarıma,

Patoloji Anabilim Dalının tüm idari ve laboratuvar çalışanlarına,

Sonsuz teşekkürler.

Dr.Semra PAKER KARABURUN

Antalya, 1999

İÇİNDEKİLER

Sayfa No :

Giriş	1 - 14
Gereç ve Yöntem	15 - 18
Bulgular	19 - 39
Tartışma	40 - 51
Sonuçlar	52 - 55
Özet	56 - 59
Kaynaklar	60 - 74

GİRİŞ

Over karsinomları, gelişmiş cerrahi, radyoterapi ve / veya kemoterapi protokollerinin uygulanmasına karşın kadınlarda en sık ölüme neden olan jinekolojik kanser olmaya devam etmektedir (11,30,94,97,113) ABD'lerinde kadınlarda ölüm nedenleri arasında over karsinomları beşinci sırada yer almakta ve genital sistemden kaynaklanan kanserler arasında ise en sık ölüme neden olmaktadır (11,41). 1995 yılında ABD'de 26.600 kadına over karsinomu tanısı konulmuş ve 14 500 kadın bu hastalıktan kaybedilmiştir (110). 1998 yılında Landis'in kanserlere yakalanma ve bu kanserlere bağlı tahmini ölüm oranlarını içeren istatistiksel çalışmasında over karsinomlarına yakalanma insidansı % 4.2 ve over karsinomlarına bağlı tahmini ölüm oranı % 5.3 olarak belirtilmiştir (22). Farklı tedavi modellerinin geliştirilip uygulamaya sokulmasına karşın, over karsinomlu olguların yaşam sürelerinde çok az bir iyileşme sağlanabilmiştir (9,20,41,94).

Etiyolojisi halen tam olarak anlaşılamamasına karşın over karsinomlarının erken menarş, geç menapoz, nullipar ve doğurganlığı uyarıcı ilaç kullananlarda daha fazla; bir ya da daha fazla süresini tamamlamış gebelik, uzun süren laktasyon, oral kontraseptif kullananlarda daha az görülmesi, over karsinomlarının gelişiminde, ovulasyonu takiben yara iyileşmesiyle birlikte olan hızlı hücre çoğalması siklusunun önemli rol oynadığı yönündeki spekülasyonları desteklemektedir (7,8,42,110).

Over karsinomları oldukça çeşitlidir. Bu çeşitlilik normal overi oluşturan üç hücre tipinin varlığı ile açıklanabilir: Çölomik yüzey epiteli, germ hücreler, ve over stroması. Over tümörlerinin sınıflandırılmasında tam bir fikir birliğine varılamamıştır (23). Bununla birlikte biz bu çalışmada Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) sınıflamasını kullandık. Burada isimlendirme

hücre tipi ve büyüme şekli baz alınarak yapılmıştır. Buna göre over tümörleri şu ana başlıklar altında gruplanmıştır (100):

I.Epitleyal Over Tümörleri:

-Seröz tümörler

-Müsinöz tümörler, Endoservikal ve İntestinal Tip

-Endometrioid tümörler

-Berrak hücreli tümörler

-Transisyonel Hücreli Tümörler

-Mikst Epitleyal Tümörler

-Undiferansiye Karsinom

-Sınıflandırılamayan Epitleyal Tümörler

II. Seks Kord Stromal Tümörler

III. Lipid Hücreli Tümörler

IV. Germ Hücreli Tümörler

V. Gonadoblastom

VI. Overe Özgül Olmayan Yumuşak Doku Tümörleri

VII. Sınıflandırılamayan Tümörler

VIII. Metastatik Tümörler

IX. Tümör Benzeri Lezyonlar

Bu oldukça uzun olan listede, en büyük görülme yüzdesi yaklaşık % 90 ile yüzey epitel hücrelerinden kaynaklanan gruba aittir (21,97,98).

Over karsinomlarına özgü spesifik tümör belirteçleri ve klinik semptomların olmaması nedeniyle erken tanı zordur ve hastaların büyük çoğunluğu ileri dönemde yakalanabilmektedir (113). Oysa hastaların yaşam süresini etkileyen faktörler arasında erken tanı ve prognozun belirlenmesi önemli rol oynar. Bu nedenle bütün ilgi olguların erken tanısı ve prognoz

tayini için spesifik belirteçlerin bulunmasına yöneltmiştir (41). Over karsinomlarında tümör stage'i, histolojik grade, histolojik alt tip ve tedavi sonrası kalan tümör miktarı ile son zamanlarda tanımlanan Cerb-B2 (Her/neu) proteini en önemli prognostik belirleyiciler olarak görülmektedir (6,9,33,37,39,41,72,105). Bu prognostik faktörlerin çoğu subjektif olup araştırmacılar arasında farklı yorumlanabilmektedirler (37,59). Bu problem Baak ve arkadaşlarının over karsinomlarının histolojik grade'lemesi sırasında belirgin biçimde görülmüştür (37). Kanser hücrelerinin malign potansiyellerini yansıtacak yeni, objektif, tekrarlanabilir, basit ve güvenilir değişkenlerin bulunması, her bir hasta için uygun tedavi modellerinin seçilmesinde klinik öneme sahiptir (37,56,59,106). Yeni tedavi modellerini belirlemek hastalığın doğal seyrini, biyolojik davranışını ve prognozunu daha iyi anlamayı gerektirir (48). Patolojide tümörün büyüme hızının, biyolojik davranışını belirlediği düşüncesi yaygındır. Bu nedenle de tümör proliferasyonunu yansıttığı düşünülen çeşitli değişkenlerin değerlendirilmesi yönünde yoğun çaba harcanmaktadır. Bu değişkenlerin metastaz hızı, tümör rekürrensi ve mortalite ile korelasyonu pek çok çalışmanın ana fikrini oluşturmaktadır. Bir prognostik faktör şu ön koşulları taşımalıdır:

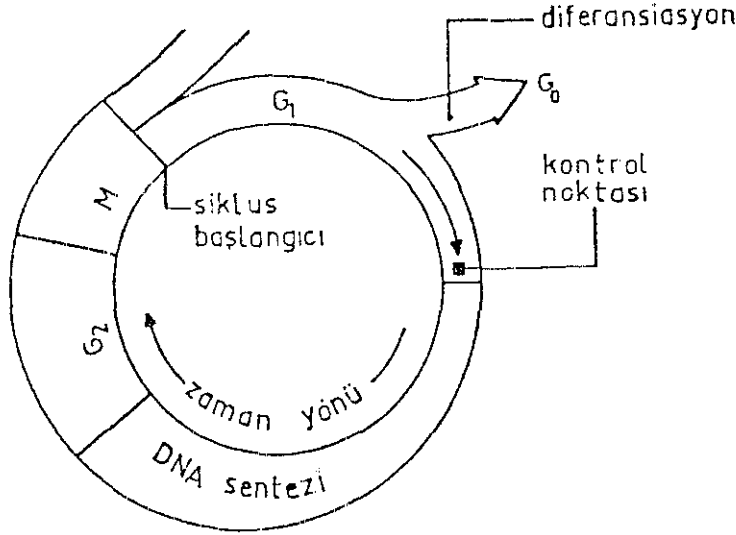
..Anlamlı bağımsız bir prognostik faktör olmalı

..Yöntem tekrarlanabilir olmalı

..Diğer prognostik faktörlerle uyum göstermelidir (70,90,103).

Normal doku ile koordine olmayan aşırı büyüme, neoplazinin temel özelliklerinden biridir. Tümör hücrelerinin siklusu da nontümöral hücrelerdeki gibi Go, G1, S, G2 ve M fazlarından oluşur (Şekil 1). Yapılan çalışmalarda, pek çok tümörde total hücre siklusunun, normal hücrelerle aynı veya onlara göre uzun olduğu görülmüştür. Tümör popülasyonunda bulunan hücrelerden proliferatif olanlar tümörün büyüme fraksiyonunu belirler. Tümörlerin erken evrelerinde tümör hücrelerinin büyük bir çoğunluğu

proliferatif havuzda iken daha büyük boyutlarda büyüme fraksiyonu azalır. Tümörün büyüme hızını hücre proliferasyonu ve hücre kaybı arasındaki denge belirler. Küçük hücreli akciğer karsinomları, lösemi ve lenfomada büyüme fraksiyonu yüksek, diğer solid tümörlerde düşüktür (103).



Şekil 1. Hücre Siklusu Şeması.

Tümör proliferasyon fraksiyonunun ölçümünde kullanılan mevcut yöntemleri şu şekilde sıralamak mümkündür:

Mitoz Sayısı: On büyük büyütme alanında yapılan mitoz sayımı yıllardır tümör patolojisinde tanısal ve prognostik belirleyici olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem lenfoma, malign melanom, yumuşak doku sarkomları ve özellikle düz kas tümörleri gibi pek çok tümörde faydalı bilgiler sağlamaktadır. Ancak bu yöntemin kullanımı sırasında pek çok potansiyel problemlerle karşılaşmakta, mitozun ayırımı zor olabilmektedir; piknotik nükleuslu ve şüpheli hücreler sayılmamalıdır (46). Günümüzde mitoz sayımının tümörün proliferatif aktivitesinin göstergesi olması fikri tartışmalıdır. Büyük büyütme alanlarındaki rakamsal farklılıklar, doku fiksasyonunun gecikmesi, gözlemci deneyimi, kesit kalınlıkları gibi nedenler

standardizasyonu ve tekrarlanabilirliği konuları bu yönteme karşı geliştirilen eleştirilerin başında gelir (103).

Timidin İşaretleme İndeksi (TLI): Bu yöntemle S fazındaki ekirdek DNA'sına bağlanma yapılarak S fazındaki hücrelerin oranı belirlenir (90). Radyoaktif olarak işaretlenmiş DNA prekürsörü kullanılır ve bu prekürsörün proliferen olan hücreye entegrasyonu saptanır. TLI hücre siklusunun S fazındaki hücre yüzdesinin bir ölçüsüdür. Taze doku kullanımı, radyoaktivite ile çalışma, örnekleme hataları, gözlemcinin pozitif hücre yorumundaki n yargısı kullanımını kısıtlayan nedenlerdir (46,70,103).

Bromodeoksiüridin (BrdU) İşaretleme indeksi: S faz, işaretleme indeksi bromodeoksiridin kullanılarak da ölçülebilir. Bromodeoksiüridin bir primidin analogu olup, S fazı işaretlenme indeksini vermektedir. In vivo verilmesi gerekliliği uygulama güçlüğü yaratarak özellikle retrospektif çalışmayı olanaksız kılması nedeniyle kullanım kısıtlılığı yaratır (46,70,90, 103).

AgNOR: NOR (nükleer organizasyon bölgeleri) rRNA'yı kodlayan DNA parçalarıdır ve insanda 13, 14, 15, 21 ve 22 kromozomların kısa kollarında yer alır. AgNOR sayımı ile gerçekte neyin ölçüldüğü tam olarak bilinmemektedir. AgNOR sayımının gerçek bir sayım olmadığı, NOR asosiyen proteinlerin hücre içindeki saılmışlığının ölçütü olduğu düşünülmektedir. AgNOR sayımının rRNA ve protein sentezinin bir göstergesi olması nedeniyle proliferasyon hızı ile korelasyon gösterdiği ileri sürülmektedir. AgNOR sayımı benign ve malign ayırımında anlamlı iken borderline lezyonlarda yararlı olamamaktadır (41,90).

İmmünohistokimyasal işaretleyiciler: Monoklonal antikorların kullanımı ile yapılan immünohistokimyasal proliferasyon çalışmaları, proliferasyonla ilişkili proteinlerin statik olarak saptanmasıdır; gerçek proliferasyon hızı değildir (70).

Ki-67, MIB 1-3: Ki-67 ilk olarak Hodgkin hastalıklı hücre dizisi olan L428'in nükleer fraksiyonuna karşı geliştirilmiş IgG1 sınıfından, sıçan monoklonal antikorudur (15,70,117) Gerek Ki-67 gerek MIB 1-3 Gerdes tarafından üretilmiştir. Bu antikorların tanıdığı nükleer antijen proliferan hücrelerde bulunur. Ki-67, 395 ve 345 kD'luk hücre siklusunun tümünde mevcut olan non-histon tipte nükleer bir proteindir (40,90,103).

Pek çok araştırmacı Ki-67 ve diğer tekniklerle elde ettikleri hücre proliferasyon sonuçları arasında anlamlı korelasyon olduğunu rapor etmişlerdir. İlk çalışmalar Ki-67 pozitifliği ile non-Hodgkin lenfomanın histolojik grade'i arasında korelasyon olduğunu göstermiştir (90). Ki-67 tümör büyüme fraksiyonunun prognozla olan ilişkisi birçok tümörde araştırılmıştır ve araştırılmaktadır. Lenfoproliferatif hastalıklar çalışmalarının en yoğun olduğu gruptur. Ki-67 ile belirlenen tümör büyüme fraksiyonu ile histolojik grade arasında güçlü bir uyum izlenmiştir. Hall tarafından yapılan bir çalışmada Ki-67 pozitifliği ile 91 lenfomalı hastanın klinik seyri karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmada tümörün % 20'den fazlasının pozitif olduğu birinci grubun Kiel sınıflamasına göre yüksek grade'li lenfoma olduğu, % 20'den az pozitiflik izlenen ikinci grubun ise Kiel sınıflamasına göre düşük grade'li lenfomalar olduğu görülmüştür. Ayrıca histolojik olarak düşük grade'de olup proliferasyon skoru yüksek olan hastaların düşük proliferasyon skorlu hastalara göre daha kötü prognoz gösterdikleri görülmüştür. Histolojik grade'i ve proliferasyon skoru yüksek olan hastaların aynı grade de olup proliferasyon skoru daha düşük olan hastalara göre daha

iyi prognoz gösterebilmesi ise yüksek grade'li hastalardaki proliferen olan hücre topluluğunun kemoterapiye daha iyi cevap vermesi ile açıklanmıştır (15).

Gerdes ve arkadaşları lenf düğümü pozitif meme kanseri olgularında, lenf düğümü negatif meme kanseri olgularına göre Ki-67 pozitifliğinin yüksek olduğunu fakat artan pozitif lenf düğümü sayısı ile Ki-67 boyanma oranı arasında ters ilişki olduğunu görmüşlerdir (90).

Sheperd ve ark. 108 kolorektal karsinomlu hasta üzerinde yaptıkları çalışmada, Ki-67 pozitifliği ile Dukes sınıflamasını da içeren bilinen prognostik parametreler arasında korelasyon bulamamışlardır. Franklin ve ark. aktif ve inaktif ülseratif kolit olguları üzerinde yaptıkları karşılaştırmalı çalışmalarında aktif ülseratif kolitli olgularda daha yüksek boyanma izlemişlerdir (90).

Nakano ve ark. 45 servikal kanserli hastada radyoterapinin proliferen olan hücre proliferasyonunda Ki-67 indeks ve mitotik indeksle belirlenen büyüme fraksiyonuna etkisini araştırmışlardır. Ki-67 indeksi %33 ve üzeri olan proliferatif aktivitesi yüksek hastalar radyoterapiye daha iyi cevap vermişlerdir. Buna ek olarak Ki-67 indeksi ile mitotik indeks arasında radyoterapiye yanıt açısından ters prognostik ilişki olması her iki indeksin bağımsız değerler olduğunu düşündürmüştür (81).

Burger ve ark. 40 sinir sistemi tümörlü olguda yaptıkları çalışmada Ki-67 boyanma paterninin tümörün biyolojik davranışını tahmin etmede yardımcı olabileceğini göstermişlerdir (16).

Isola ve ark. 29 over karsinomlu olguda yaptıkları çalışmalarında immünohistokimyasal olarak saptanan östrojen reseptör ve Ki-67 düzeyinin prognozla ilişkili olduğunu göstermişlerdir (54). Henriksen ve ark. 47 epitelyal over tümörlü olguda yaptıkları çalışmalarında, Ki-67 ekspresyonunun malignite ile ilişkili olduğunu izlemişlerdir. Çalışmalarında,

45 malign epitelyal over tümöründen 36 tanesinde ve 9 borderline tümörden 7 tanesinde Ki-67 pozitifliği izlenmiştir; 11 benign tümörden ise yalnız 2 tanesinde pozitiflik görmüşlerdir. Normal over dokusunda Ki-67 ile boyanma izlenmemiştir (51). Aynı araştırmacılar 76 epitelyal over tümörlü olguda yaptıkları başka bir çalışmada rezidü tümör miktarı, hastalığın yaygınlığı, p53 ve Ki-67 pozitifliğinin prognozu olumsuz yönde etkilediğini izlerken; S faz fraksiyonu ve DNA ploidi'nin prognozla ilişkisini gösterememişlerdir (52). Morimura ve ark. 8 berrak hücreli over karsinomu olgusunda MIB1 boyanma oranı ile prognoz arasındaki ilişkiyi araştırmışlar ve yüksek oranda boyanma gösteren olgularda prognozun daha kötü olduğunu görmüşlerdir (77).

Bazı yazarlar hücre döngüsünün fazına bağlı olmak üzere proliferen hücrelerin çekirdeklerindeki Ki-67 miktarının değiştiğini söylemektedirler. Sasaki ve arkadaşları hücre döngüsü ilerledikçe Ki-67 antijenik ifadesinin arttığını, S fazının son yarısı boyunca yükselerek G2 ve M fazlarında zirveye ulaştığını bulmuşlardır (77,81,90).

Ki-67 antijeninin rekombinan kısımlarını immünojen olarak kullanarak Gerdes ve ark. MIB 1-3 isimli yeni bir monoklonal antikor üretmişlerdir. Bu antikorlar parafin kesitlerde, yeni antijen açığa çıkartma yöntemi ile çalışabilmektedir (103). Böylece arşiv materyalleri üzerinde çalışmak mümkün olabilmektedir.

PCNA: 36 kD'luk non histon nükleer bir protein olan PCNA, DNA polimeraz delta için bir kofaktördür. Çalışmalar hücrelerin çoğalma fazında ortaya çıkan bir protein olarak bilinen siklin ile PCNA'nın özdeş olduğunu göstermiştir. Bu faktör hücre siklusunun geç G1 fazında izlenir, G1/S interfazında pik yapar (13,38,41,88,92). Farklı PCNA antikorları farklı PCNA epitoplarını tanırlar. Stabil PCNA mRNA dinlenme fazındaki hücrelerde yoktur. Bu PCNA'yı kodlayan gen de intron 4'ün varlığına bağlıdır. Bu

intronun ortadan kalkmasıyla proliferen olan hücrelerde PCNA mRNA yüksek düzeylerde birikir (87).

Pekçok farklı organ malignitesinde PCNA ekspresyonunu araştıran çalışma yapılmıştır ve bazı neoplazmlarda PCNA ekspresyon derecesi ile prognoz arasında korelasyon olduğu görülürken, bazılarında anlamlı bir birliktelik izlenmemiştir.

PCNA başlangıçta yalnız frozen kesitlere uygulanabiliyordu. Daha sonra parafin bloklarda PCNA'nın farklı epitoplarını tanıyan monoklonal antikorlar üretildi. PC10 bunlardan biridir. Meme ve pankreas tümörleri, non-hodgkin lenfomalar, hücre kültürleri (insan epidermal keratinositleri ve insan periferik kan mononükleer hücreleri) ve normal dokularda Hall ve ark. tarafından PC10 monoklonal antikorı ile geniş bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada normal dokularda PC10 boyanmasının çekirdekte sınırlı, diffüz ya da granüler tarzda olduğu, nadiren sitoplazmik boyanma da olabildiği görüldü. Hücre proliferasyonu fazla olan normal dokularda beklenebileceği gibi PCNA boyanması izlendi (lenfoid dokuların germinal merkezleri ve dağınık olarak parakorteks, çok katlı yassı epitelin bazal hücreleri, kıl kökü hücrelerinin çoğu, mide, ince barsak ve kolonun proliferatif alanları, proliferatif faz endometriumun epitelyal ve stromal hücreleri, testiste spermatogoniaların çoğu). Yetişkin santral ve periferik sinir sisteminde, iskelet düz kas ve kalp kasında, hepatositlerde hiç boyanma izlenmezken, böbrekte çok az, pankreasda normal asiner ve duktal hücrelerde nadir olarak PCNA ile çekirdek boyanması izlenmiştir (45).

Bruce ve ark. 64 malign organ tümöründe yaptıkları çalışmada PCNA ile boyanma sonuçlarının malignitenin tipi, histolojik grade'i ve mitotik indeksle korele olduğunu bulmuşlardır (92).

Mayer ve ark. 82 kolorektal adenokarsinom ve 18 lenf düğümü metastazına immünohistokimyasal olarak PCNA uygulamışlar ve PCNA

pozitif hücrelerin yüzdesi ile yaşam süresi arasında ters ilişki bulmuşlardır. Proliferatif aktivitesi yüksek olgularda kemoterapiye yanıt daha iyi olduğundan PCNA pozitif hücre yüzdesini bilmek kemoterapi ile tedavi kararı almada önemli bir kriterdir (73).

Kawai ve ark. 165 akciğer karsinomlu (84 yassı epitel hücreli, 62 adeno karsinom, 15 büyük hücreli, ve 4 küçük hücreli) olgu üzerinde yaptıkları çalışmada PCNA pozitifliğinin tümör stage'i, sellülarite ve DNA indeksi ile korelasyon gösterdiğini ve bu parametrelerin prognozla ilişkili olduğunu görmüşlerdir (60). Ebina ve ark. 123 küçük hücreli dışı akciğer karsinomu olgusunda yüksek PCNA indeksinin kısa yaşam süresi ile birlikteliğini göstermişlerdir (27). Fontanini ve ark. 40 periferik lenf düğümü negatif küçük hücreli dışı akciğer karsinomu olgusunda PCNA immünreaktivitesinin önemini göstermelerine rağmen, P Korkopoulou ve ark. 61 akciğer karsinomlu hasta üzerinde yaptıkları çalışmada PCNA indeksi ile lenf düğümü metastazı ve prognoz arasında ilişki görememişlerdir (32,65).

Haerslev ve ark. 490 primer meme karsinom olgusunda yaptıkları çalışmada, p53 pozitifliği, kötü diferansiasyon, östrojen reseptör negatifliği ve yüksek PCNA skorunun kötü prognozla birlikte olduğunu görmüşlerdir (44). Slitonen ve ark. 109 primer meme kanserli olguda yaptıkları çalışmada PCNA skorunun bağımsız prognostik faktör olduğunu ve adjuvan kemoterapiye alınacak hastaların tespitinde kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir (102).

Lous ve ark. 27 sinir sistemi tümörü olgusunda yaptıkları çalışmada yüksek grade'li astrositomlarda düşük ve orta grade'li gliomlarla karşılaştırıldığında PCNA reaktivitesinin daha yüksek olduğunu görmüşlerdir (71).

Thomas ve ark. 98 epitelyal over karsinomlu olguda yaptıkları çalışmada yüksek PCNA değerine sahip olgularda prognozun daha kötü olduğunu görmüşlerdir (108). Hartmann ve ark. 92 yüksek grade'li epitelyal

over karsinomlu olgu üzerinde yaptıkları çalışmada proliferatif indeks ve 5 yıllık yaşam süresi arasında ilişki olduğunu; proliferatif indeksi yüksek olan tümörlerde 5 yıllık yaşam süresinin daha yüksek, düşük olan olgularda ise daha düşük olduğunu izlemişler ve bunun nedenini, proliferasyonu fazla olan tümörlerin kemoterapiye daha iyi yanıt verebilmeleri ile açıklamışlardır (47). Kuwata ve ark. 68 primer epitelyal over karsinomlu olgu ile yaptıkları çalışmalarında PCNA ile belirlenen proliferatif aktivitenin tümörün histolojik grade'i ile korele olduğunu; ancak histolojik tip ve stage'i ile korelasyon göstermediğini bulmuşlardır (67). Minguillon ve ark. 78 over karsinomlu olguda yaptıkları çalışmada, PCNA ekspresyonunun figo stage'i, histolojik tümör tipi, lenf düğümü tutulumu ve EGF-R durumu ile ilişkili olmadığını ancak, rezidü tümör miktarı ile korele olduğunu izlemişlerdir (76). Nakano ve ark. 31 berrak hücreli over karsinomlu olguda yaptıkları çalışmada pozitif p53 yüzdesi ve yüksek proliferatif aktivitenin kötü prognozla birlikte olduğunu görmüşlerdir (80). Khalifa ve ark. ise epitelyal over tümörlerinde malignite derecesi ile Ki-67, PCNA ve P-glikoprotein ile boyanma paterni arasında anlamlı bir ilişki bulamamışlardır (62).

DNA Ploidi: Yeni tedavi modelleri belirlemek hastalığın doğal seyrini, biyolojik davranışını ve prognozunu daha iyi anlamakla mümkündür. Kemoterapotik ajanlara direnç, tümörün yayılma özelliği, hücresel proliferasyon hızı ve metastatik potansiyeli gibi genetik bilgiler tümörün DNA'sında kayıtlıdır. Normalden fazla kromozom içeren anöploid tümörlerdeki genler bu tümöral gelişim ve metastatik modelden sorumlu olabilirler (48).

Akım sitometri ile solid tümörlerin DNA analizi son yıllarda üzerinde en çok çalışılan konulardan biridir. Sitometri, hücrelerin ya da diğer biyolojik partiküllerin fiziksel ve / veya kimyasal özelliklerinin ölçülmesidir. Sıklıkla

hücre veya çekirdekten DNA içeriğini ölçmek amacıyla kullanılır İlk olarak 1960'lı yıllarda çalışılmaya başlanmış ancak daha sonra teknolojik gelişme ile klinikte yaygın kullanım alanı bulmuştur (112) Akım sitometri ile tümör hücrelerinin DNA içeriği incelenip tümörün ploidi durumu ve proliferatif indeksinin nicel tespiti saptanabilir. Tümör ploidi, malign olmayan hücrenin G0/ G1 fazına göre malign hücrenin G0/ G1 fazındaki DNA içeriği ile belirlenir. Tümör hücrelerinin DNA içeriği normal referans hücreden farklı değilse diploid, farklı ise anöploiddir. Tümör hücrelerinin G0/ G1 fazındaki ortalama DNA içeriğinin normal hücrenin G0/ G1 fazındaki ortalama DNA içeriğine sayısal oranı ise DNA indeksini (DI) verir (5,75,113,114).

Anormal DNA içeriği ya da anöploidi pekçok solid tümörde görülür ve prognostik öneme sahiptir. Ancak anöploid hücre popülasyonunun bulunması yalnızca malign tümörlerde izlenen bir özellik değildir. Benign lezyonların da anöploidi gösterebildikleri bilinmektedir. Bunun gibi malign lezyonlarda da diploid patern izlenebilir (112).

Pek çok solid organ tümöründe DNA ploidinın prognozla olan ilişkisini araştıran çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bunlardan bazılarında anöploidinın kötü prognozla birlikte olduğu gösterilirken, bazılarında böyle bir birliktelik izlenmemiştir. Aynı zamanda benign olup da anöploid patern gösteren olgular da vardır (112).

Thorud ve ark. 59 meme karsinomlu hasta üzerinde yaptıkları çalışmada anöploid ve diploid olgular arasında tekrarlama oranı açısından anlamlı bir fark görememişlerdir. Ploidi paterni ile klinik stage arasında da anlamlı bir ilişki izlememişlerdir (109). Mc. Divitt ve ark.'nın 168 serilik çalışmalarında da % 55'i anöploid paterne sahip olgularda S faz fraksiyonu ile aksiller lenf düğümü ve östrojen reseptör durumu arasında korelasyon bulunmamıştır (74). Bununla birlikte anöploidi ile kötü prognoz birlikteliğini gösteren çalışmalar da vardır (89,112).

Akciğer karsinomlu olgularda yapılan çalışmalarda benzer sonuçlar elde edilmiştir. Odd ve ark. 112 küçük hücreli dışı akciğer karsinomlu olguda ploidi durumu ile hasta yaşam süresi arasında anlamlı bir ilişki bulamamıştır (78). Yine Van Bodegam ve ark. stage 1 yassı epitel hücreli akciğer karsinomlu olguyu 6 yıl boyunca izlemişler ve ploidi paterninin prognoza etkisi olmadığını görmüşlerdir (116). Bunun yanında Şahin ve ark. 158 küçük hücreli dışı akciğer karsinomlu olguda ploidi ve klinikopatolojik parametreler arasında anlamlı ilişki olduğunu saptamışlardır (95). Tirindelli-Danesi ve ark.'nın 101 akciğer karsinomlu olguda yaptıkları çalışmada da akciğer karsinomlarında ploidi paterni ile prognoz ilişkili bulunmuştur (111).

Over karsinomlu olgularda yapılan çalışmaların çoğu ploidi tipinin prognozla ilişkili olduğunu göstermişse de bunun aksini gösteren çalışmalar da yok değildir (28,29,33,34,36,59). Freidlender ve ark. 128 epitelyal over tümörlü olguda yaptıkları çalışmada, DNA içeriği ve Figo stage'nin en önemli bağımsız prognostik belirleyiciler olduğunu görmüşlerdir (33). Aynı araştırmacı 91 ileri dönem over karsinomlu olguda tümör ploidisinin bağımsız prognostik değişken olduğunu diploid tümörlü olguların anöploid olgulardan belirgin oranda daha uzun süre yaşadığını izlemişlerdir (34). İversan ve ark. 51 over karsinomlu olguda ploidi ile hastalık seyrinin ilişkili olduğunu diploid olgularda operasyon sonrası hastalıksız yaşam süresinin daha uzun olduğunu; anöploid olguların ise daha agresif seyrettiğini görmüşlerdir (56). Gajewski ve ark. da 87 epitelyal over tümörlü olguda DNA içeriğinin bağımsız prognostik değişken olduğunu göstermişlerdir (37). Erba ve ark. ise 101 over karsinomlu olgudan hazırladıkları 155 örneği kullanarak akım sitometri çalışmışlar ve DNA indeksi ile S faz fraksiyonunun bağımsız prognostik değişkenler olmadıklarını bulmuşlardır (28).

Bu çalışmanın amacı, son zamanlarda tek tek hastaların yönlendirilmesinde değerli prognostik bilgiler verebileceği düşünülen akım

sitometri ve immünohistokimyasal proliferasyon işaretleyicileri (Ki-67, PCNA) ile klinikopatolojik parametreler (tümör stage'i, histopatolojik alt tip, diferansiyasyonu) gibi bilinen prognostik öneme sahip belirteçler arasında ilişkiyi araştırmak ve bu parametrelerin hasta yaşam süresi üzerindeki etkilerini değerlendirmektedir

GEREÇ VE YÖNTEM

Olgular; çalışmaya 1987- 1999 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na gelen formalin ile fikse edilip, parafine gömülü olarak arşivde saklanan ve bölümümüzde epitelyal over tümörü tanısı almış olgular arasından seçildi. Dünya Sağlık Örgütü'nün sınıflamasına göre 27 benign (15 müsinöz ve 12 seröz), 3 borderline müsinöz ve Üniversitemiz Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'nce takibi yapılan 37 malign epitelyal over tümörü (15 seröz, 8 müsinöz, 10 endometrioid, 3 berrak hücreli ve 1 Brenner tümörü) olgusu çalışmaya alındı.

Arşiv kayıtları incelenerek olguların yaş ve operasyon tarihleri saptandı. Ayrıca karsinom olgularında, FIGO ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ne göre stage ve grade belirlenip; Hematoksilen- Eosin (HE) kesitlerinde tümör tipi saptandı (3,96).

Olgulara ait doku örneklerine immünohistokimyasal olarak "Streptoavidin- Biotin Kompleks" yöntemi ile PCNA (PC10) ve Ki-67 (MIB-1) uygulandı (Tablo- 1).

Tablo 1: Kullanılan Antikorların Özellikleri

	Klon No	Kaynak	Dilüsyon	Boyanma Bölgesi	Pozitif Kontrol
PCNA	PC-10	DAKO	1/100	Çekirdek	Lenf düğümü
Ki-67	Rabbit Anti-Human Ki-67 Antigen Code No. A 0047 Lot 117	DAKO	1/50	Çekirdek	Lenf düğümü

İmmunohistokimyasal olarak boyanacak doku seri kesitleri, “DAKO chemMatetTM 500 capillary Gap Microscope slides (75 micro μ)” isimli lamalar üzerine 4- 4.5 mikron kalınlığında olacak şekilde kesilerek alındı. 56°C’de etüvde yaklaşık 1.5 saat kurutulup ksilolde iki kere 5’er dakika bırakılarak deparafinize edildi. Daha sonra azalan derecelerde alkollerden geçirilip, distile suya alınarak hidrate edildi. Daha sonra da doku kesitlerine antijenlerin yeniden kazandırılması amacıyla mikrodalga fırında ısıtma esasına dayanan “Antijen Retrieval” işlemi uygulandı. PCNA için hazırlanan kesitler 0.01 molar ve pH 6 olarak hazırlanan sitrat (trisodyum sitrat) solüsyonu içinde mikrodalga fırında sıvı seviyesi lamaların üzerini kapatacak ve kesitler kurumayacak şekilde 90°C’de 10 dakika “antijen geri kazanım”işlemine tabi tutuldu. Bu işlem PCNA için yeterli oldu. Ki-67 İmmünohistokimya boyanmasında iyi sonuç alınamadı. Bunun üzerine farklı yöntemler denendi.

Ki-67 antikoru ile hazırlanan kesitlerin kaynatılmasında 10 dakika ısıtma süresi ile kontrol olarak kullanılan lenf düğümünde ve olgularımızda başarılı boyanma elde edilemedi. Isıtma süresi kademeli olarak arttırıldı ve ancak süre 20 dakikaya çıkarıldığında boyanma sağlanabildi. Bu durumda ise kesitlerin lamlardan dökülme sorunu ortaya çıktı. Kesitlerin kaynatılmasında 1 litrelik cam şale içine oturtulmuş plastik şale kullanıldı. Cam şale içine işlem sırasında yeniden eklemeyi gerektirmeyecek kadar sitrat tampon dolduruldu. İşleme cam şale içindeki sitrat tamponun 90°C’ye kadar ısıtılması ile başlandı. Bu ısıya 10 dakika kaynatma süresi ile ulaşıldı. Daha sonra sitrat tampon doldurulmuş ve kesitler yerleştirilmiş olan plastik şale cam şale içine konuldu. Her 5 dakikada bir kaynatmaya 30 saniye ara verip ısıyı kontrol ederek (90°C’yi geçmeyecek şekilde) kaynatma süresi toplam 20 dakikaya tamamlandı. Bu süre ile kontrol olarak kullanılan lenf düğümünde ve çoğu malign epitelyal over tümörü olgularında boyanma görüldü.

Kaynatma sonunda preparatlar sitrat solüsyonu içerisinde oda ısısında 20 dakika soğumaya bırakıldı. Daha sonra DAKO chemMateM 500/1000 otomatik immünohistokimya cihazında Streptoavidin- Biotin tekniğine uygun MISP programında PCNA ve Ki-67 antibody'leri kullanılarak boyama işlemi gerçekleştirildi. Cihazda boyanma yaklaşık 2.5 saat sürdü. Preparatlar kapatıldı ve ışık mikroskobunda değerlendirildi. Değerlendirmede nükleusda izlenen kahverengi renk reaksiyonu pozitif olarak kabul edildi.

Ki-67 ve PCNA immün boyanmalarının skorlanması Mayer ve arkadaşlarının uyguladıkları şekilde yapıldı. Ki-67 ve PCNA ile boyanmış lamalar değerlendirildi. Zeiss, Axioskop ışık mikroskobu ve standart objektifler kullanıldı. Kesitlerde düşük ve orta büyütmelerde yoğun ve uniform boyanma alanları seçildi. Çekirdek boyanması görülen hücreler boyanma derecesine bakılmaksızın pozitif kabul edildi. Her bir malign olguda x400 büyütmede 500 hücre sayıldı; benign olgulardan bazılarında hücre sayısı yeterli olmadığı için bunlarda değerlendirme 400 hücre sayılarak yapıldı.

DNA akım sitometrisi için immunohistokimyasal boyama yapılan bloklardan iki kez 50'şer mikron kalınlığında kesitler alındı. Her bir kesit arasında tümör dokusunun devamlılığını görmek amacı ile bir tane HE boyama için kesit alındı ve değerlendirildi. Modifiye Hedley yöntemi ile çalışıldı (49,50). Akım sitometri için alınan kesitler lamalar üzerinde 60°C'de bir saat bekletildi. Daha sonra iki kez 15 dakikalık sürelerle sıcak ksilolde bekletilip derecesi azalan alkollerden (%90, 70, 50) geçirildi ve suda yıkanıp; içlerinde saf su bulunan petri kutularında bir gece bekletildi. Ertesi gün petri kabındaki kesitler kapağa alınıp yaklaşık 5 dakika süreyle bistüri ile iyice parçalanıp ufalandıktan sonra iki dakika doku homojenatı aletinde süspansiyon haline getirildi. Hazırlanan süspansiyon otomatik pipetle pepsin (% 0.1) içeren tüplere konuldu. Tüpler 37°C'de 45-60 dakika su banyosunda enkübe edildi. Enkübasyon sırasında tüpler onar dakikada bir vortekslendi. Enkübasyondan sonra 500 devirde 10 dakika süreyle santrifüj edilip üstte kalan sıvı döküldü ve üzerlerine 1 cc PBS konulup yıkandı; bu işlem iki kez tekrarlandı ve yıkama işlemi tamamlandı. Daha sonra tüplerdeki solüsyonlar

naylon wool'dan geçirilerek başka bir tüpe süzüldü. Tüplerden 100 mikrolitre sıvı alınıp plastik tüplere konuldu. Bu hücre süspansiyonları DNA-prep'te RNA'az ile işlenip "propidium iodide" ile boyandı ve 15 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra Epics profile II (Coulter, Hialeh, FL) ile incelendi. Alet doğrusallık (linearity) kontrolü standart "Flow check" ile yapıldı. Standart diploid hücre topluluğu olarak insan lenfositleri kullanıldı. Her bir olguda ortalama 10000 hücre sayıldı. Elde edilen histogramların varyasyon katsayısı ortalama 12 idi. Histogramlar Multicycle Software (Phoenix Flow system, San Diego, CA) programı ile değerlendirildi. Histogram analizlerinde olguların içerdikleri DNA miktarlarına göre DNA indeksi (DI), DNA içeriği, (diploid, anöploid, tetraploid, multiploid) belirlendi. DI incelenen hücre süspansiyonunun G0/G1 pikinin bulunduğu kanal sayısının, standart hücre topluluğunun (insan lenfositleri) G0/G1 pikinin ortalama kanal sayısına oranı ile belirlendi. Analizlerde histogramda tek bir pik izlenen ve $DI = 1.0$ olan örnekler diploid; histogramlarda ikinci bir belirgin G0/G1 piki izlenen ve $1 > DI > 1$ olan örnekler anöploid, diploid pike ek olarak birden fazla anöploid pik bulunan örnekler multiploid; total hücre popülasyonunun %20'den fazlası $4n$ (G2/M) pikinde izlenen ve $DI = 2.0$ olan olgular tetraploid olarak değerlendirildi. DNA miktarı analizi için değerlendirmeye alınan olguların varyasyon katsayısı (CV) ortalama %12 olarak bulundu. Sentez fazındaki hücrelerin yüzde oranı (SPF) ise Multicycle programında Gaussian yöntemi ile hesaplandı.

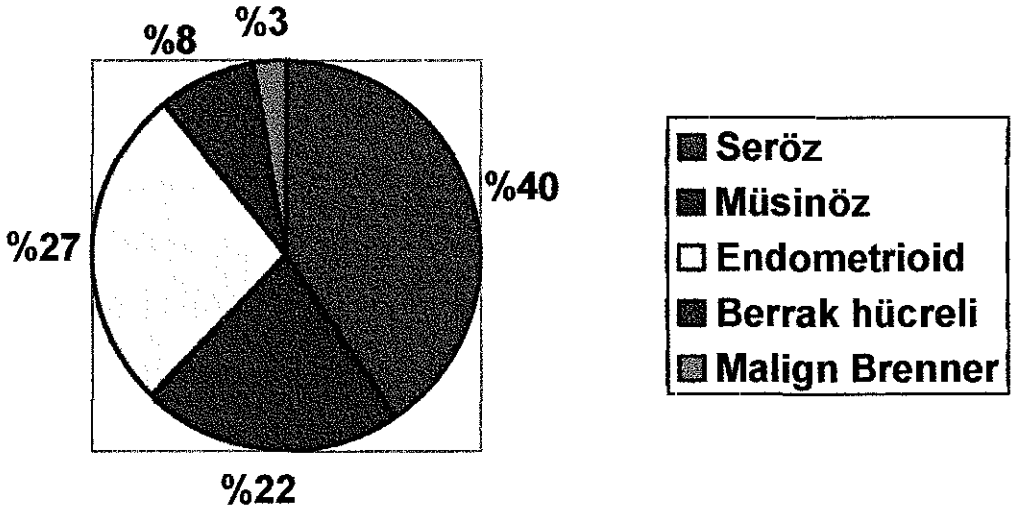
İstatistiksel olarak elde edilen sonuçları değerlendirirken, Student t testi, Mann Whitney U testi, Kruskal-Wallis varyans analizi, Fisher'in ki-kare testi ve Kaplan Mayer testi kullanıldı ve p değeri saptandı. Fotoğraflar Zeiss-Axioskop mikroskopta otomatik olarak 100 ASA Gold renkli film kullanılarak çekildi.

BULGULAR

Klinikopatolojik Bulgular:

Benign over tümörlü olgulardan seröz tip olarak değerlendirilen olgularda, yaş aralığı 25-70 (ortalama 44.3) olup 12 olgudan 3 tanesi 50 yaşın üstünde idi; yaş aralığı müsinöz tip de olanlarda 23-60 (ortalama 34.6) olarak bulunurken 15 olgudan 2 tanesinin 50 yaşından büyük olduğu görüldü.

Malign epitelyal over tümörlü olgu sayısı 37 idi. Bunların 15 tanesi malign seröz (%40.6), 8 tanesi malign müsinöz (%21.6), 10 tanesi endometrioid (%27), 3 tanesi berrak hücreli (%8.1), 1 tanesi malign Brenner (%2.7) tümörlü olgudan oluşmaktaydı (Grafik 1).



Grafik 1: Malign epitelyal over tümörlü olguların histopatolojik tiplere göre dağılımı.

Malign olguların yaş aralığı 21-85 (ort 56.9) olarak bulundu. Bu olguların 28 tanesi 50 ve üzeri yaştaydı. 3 müsinöz borderline olgunun yaş aralığı ise 27-65 olup ortalama 49 olarak izlenirken 3 olgudan 2 tanesinin 50 yaşın üzerinde olduğu görüldü.

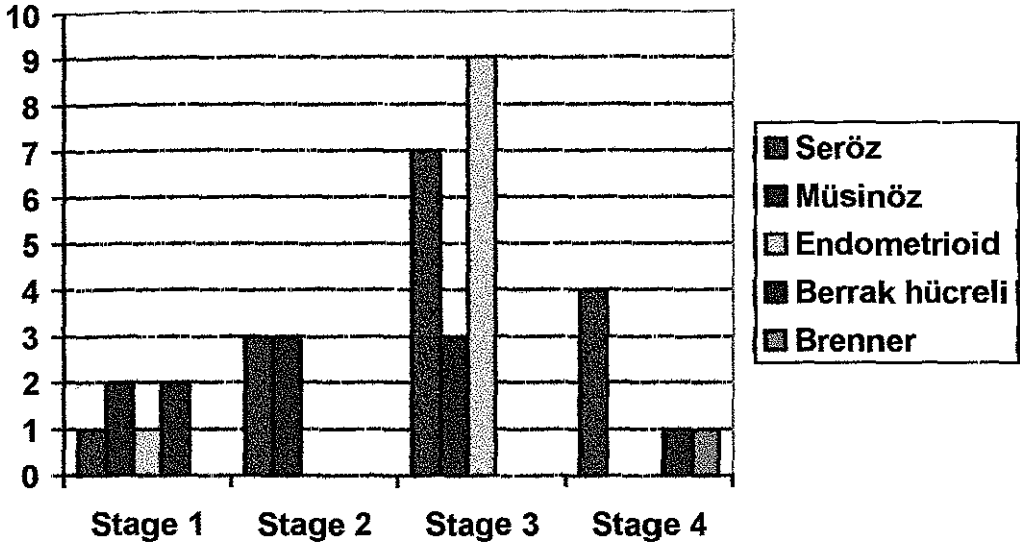
Tablo 2’de benign, borderline ve malign epitelyal over tümörlü olguların yaş gruplarına göre dağılımı verilmiştir.

Tablo 2: Benign, borderline ve malign epitelyal over tümörlü olgularda yaş gruplarına göre dağılım

	n	Yaş aralığı / Ortalama yaş	50 yaşından küçük	50 ve üzeri yaş grubu
Benign	27	23-70 (38.7)	22	5
Borderline	3	27-65 (49)	1	2
Malign	37	21-85 (56.9)	9	28

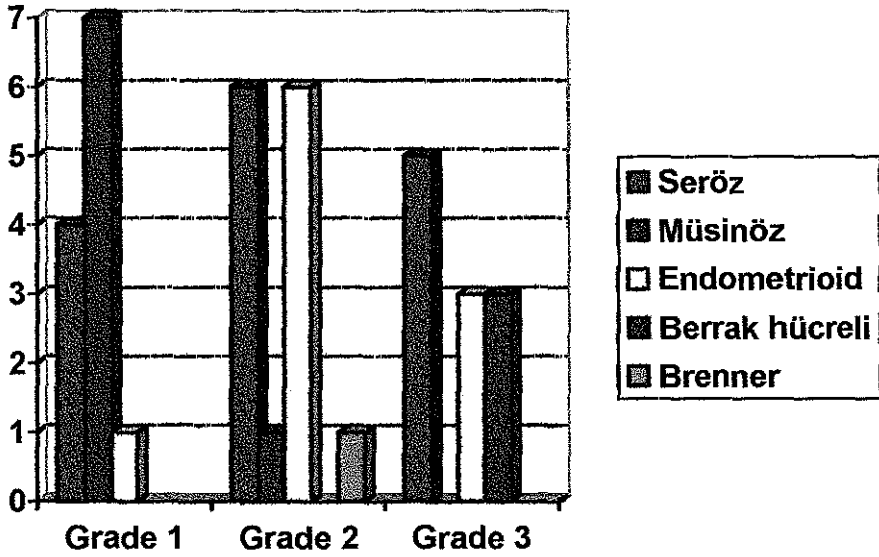
Benign ve malign over tümörlü olgular karşılaştırıldığında malign olgularda yaş ortalaması daha yüksek bulundu ($p= 0.0001$)

FİGO sınıflamasına göre malign olguların 6 (%16.2) tanesi overlerde sınırlı olup, stage 1 (1 seröz, 2 müsinöz, 1 endometrioid, 2 berrak hücreli karsinom); 6 (%16.2)’sı pelvik yayılım gösterdiği için stage 2 (3 seröz, 3 müsinöz karsinom); 19 (%51.4) tanesinde peritoneal implantasyon, lenf düğümü tutulumu ya da omentum tutulumu bulunduğundan dolayı stage 3 (7 seröz, 3 müsinöz, 9 endometrioid karsinom) ve 6 (%16.2) olgu da uzak metastaz izlendiği için stage 4 (4 seröz, 1 berrak hücreli ve 1 Brenner tümörü) olarak değerlendirildi (Grafik 2).



Grafik 2: Malign epitelyal over tümörlü olgularda histopatolojik tip ve bulundukları stage.

Histopatolojik olarak 12 (%32.4) olgu grade 1 (4 seröz, 7 müsinöz, 1 endometrioid karsinom); 14 (%37.8) olgu grade 2 (6 seröz, 1 müsinöz, 6 endometrioid, ve 1 Brenner tümörü), ve 11(%29.8) olgunun grade 3 (5 seröz, 3 endometrioid ve 3 berrak hücreli tümör) olduğu görüldü (Grafik 3).



Grafik 3: Malign epitelyal over tümörlü olgularda histopatolojik tip ve grade.

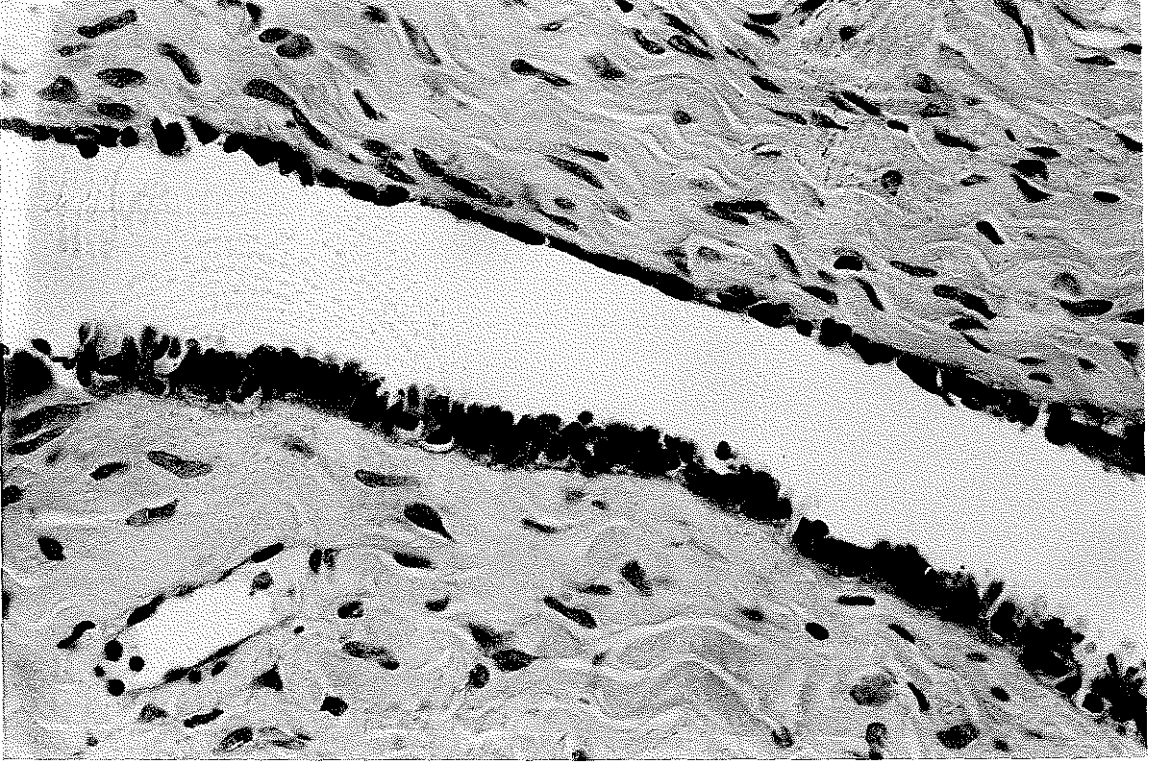
Bu bulgulara göre over karsinomlu olgularda stage ile histopatolojik grade arasında anlamlı bir ilişki görülmedi ($p>0.05$) (Tablo:3).

Tablo 3: Malign epitelyal over tümörlerinde stage ve grade ilişkisini gösteren tablo.

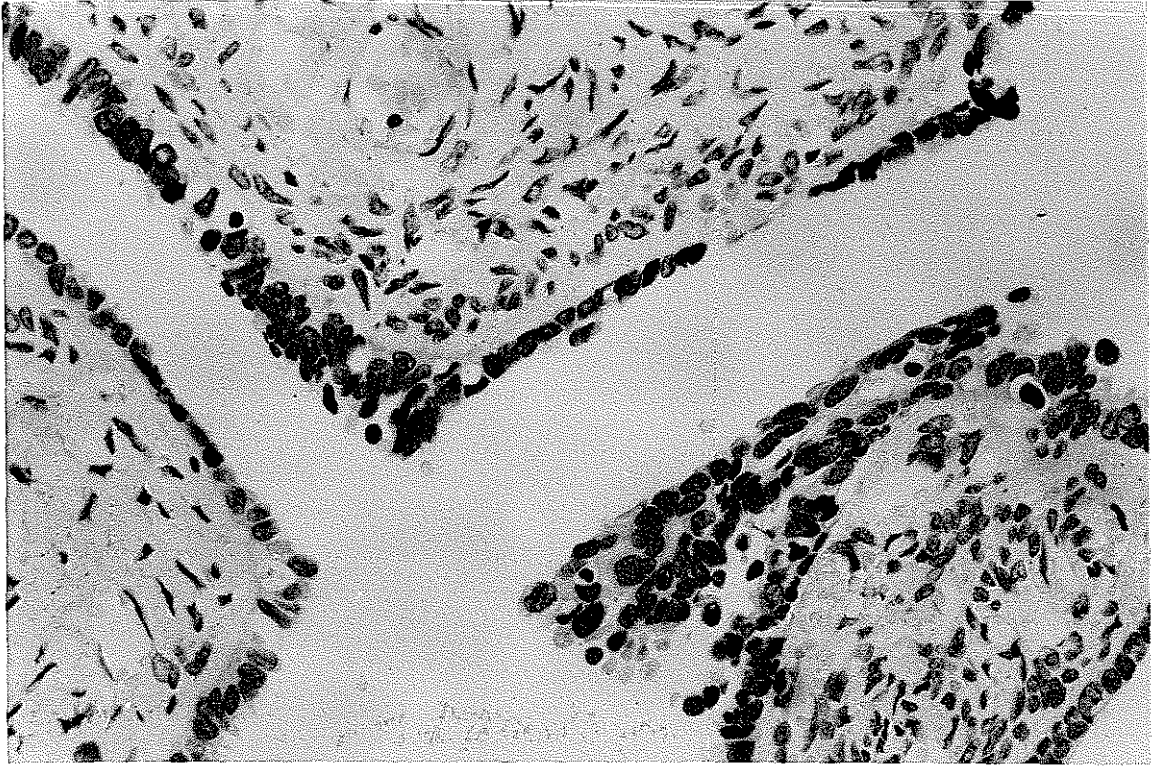
Olgu sayısı (%) grade (%) stage	stage 1	stage 2	stage 3	stage 4
Grade 1	3 %25 %50	4 %33.3 %66.7	5 %41.7 %26.3	
Grade 2	1 %7.7 %16.7	1 %7.7 %16.7	9 %69.2 %47.4	3 %15.4 %50
Grade 3	2 %20 %33.3	1 %10 %16.7	5 %50 %26.3	3 %20 %50

İmmunohistokimyasal Bulgular:

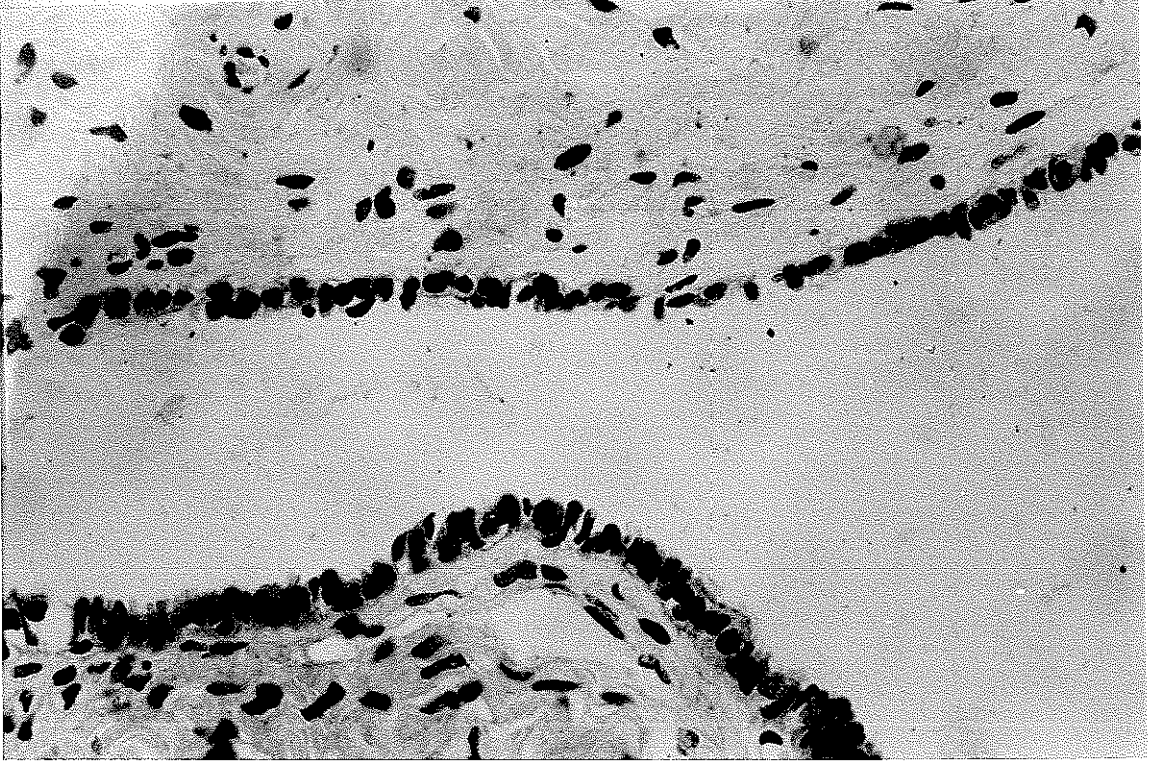
Ki-67 ile benign over tümörlü olgulardan 1'i (%3.7) dışında çekirdek boyanması izlenmezken, PCNA immunboyası ile 27 olgudan 18'inde (%66.6) pozitif çekirdek boyanması izlendi (Resim 1-5). Malign olgularda ise Ki-67 ile 37 olgunun 29'unda (%78.3); PCNA ile ise tüm malign olgularda (%100) pozitif çekirdek boyanması görüldü (Resim: 6- 17). İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.005$).



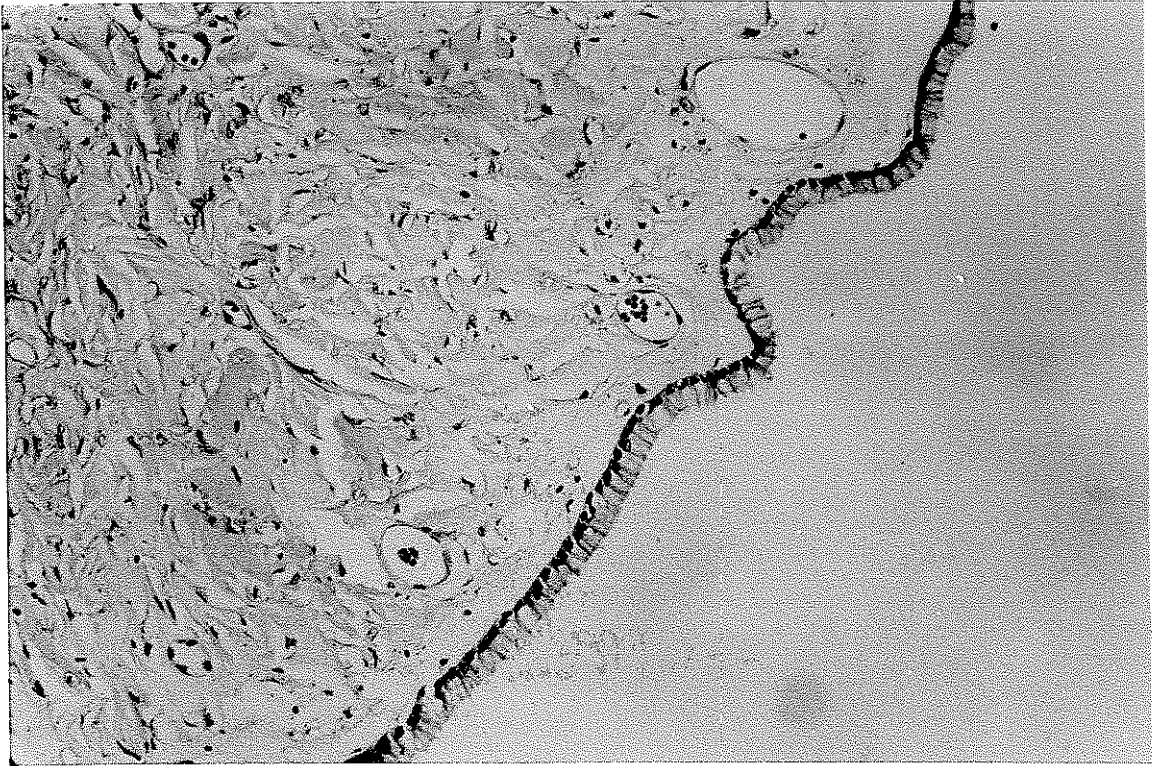
Resim 1: Benign seröz epitelyal over tümörü olgusu (HEX 40 objektif)



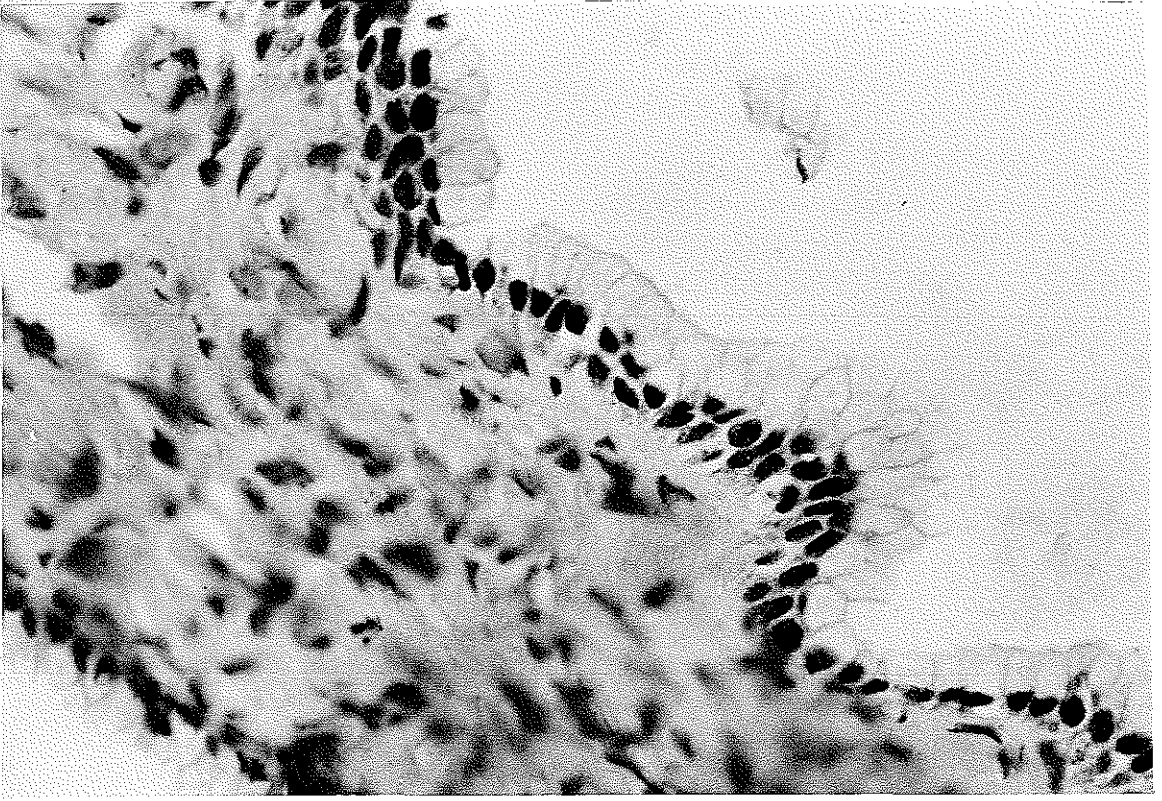
Resim 2: Benign seröz epitelyal over tümörlü olguda Ki-67 immünohistokimyasal boyama yöntemi ile pozitif çekirdek boyanması (Ki-67X40 objektif).



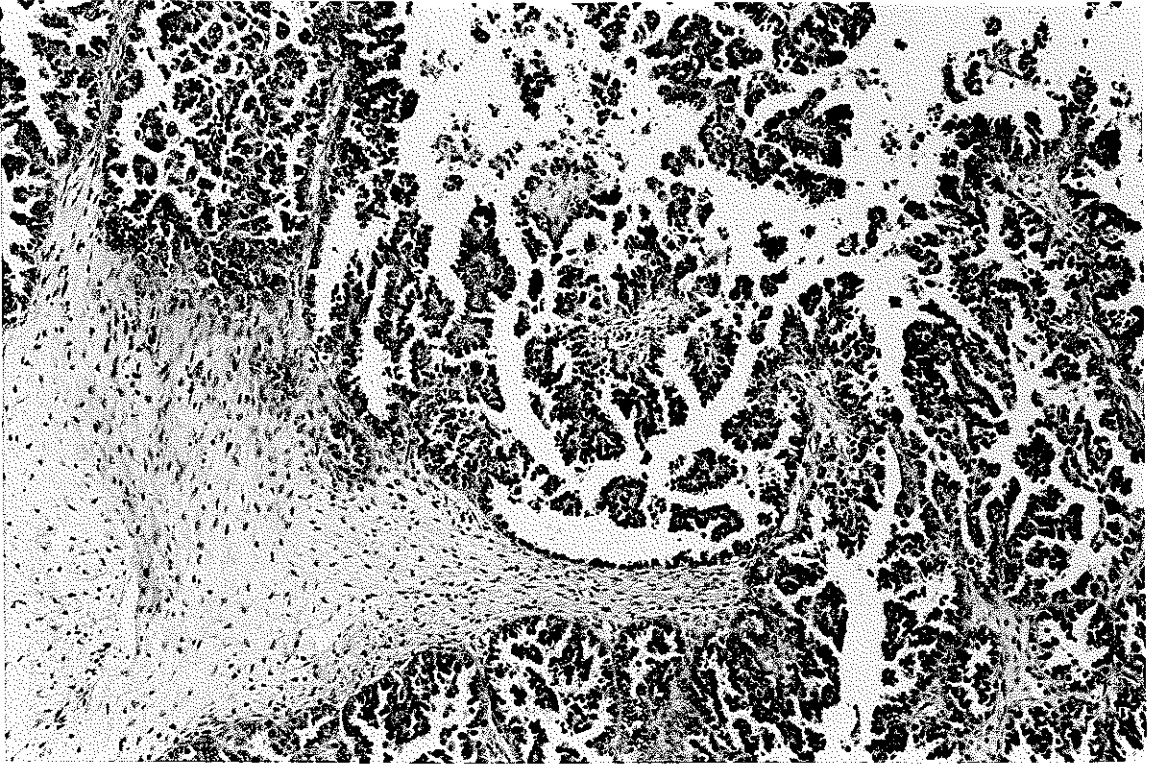
Resim 3: Benign seröz epitelyal over tümörlü olguda PCNA immünohistokimyasal boyama yöntemi ile pozitif çekirdek boyanması (PCNAX40 objektif).



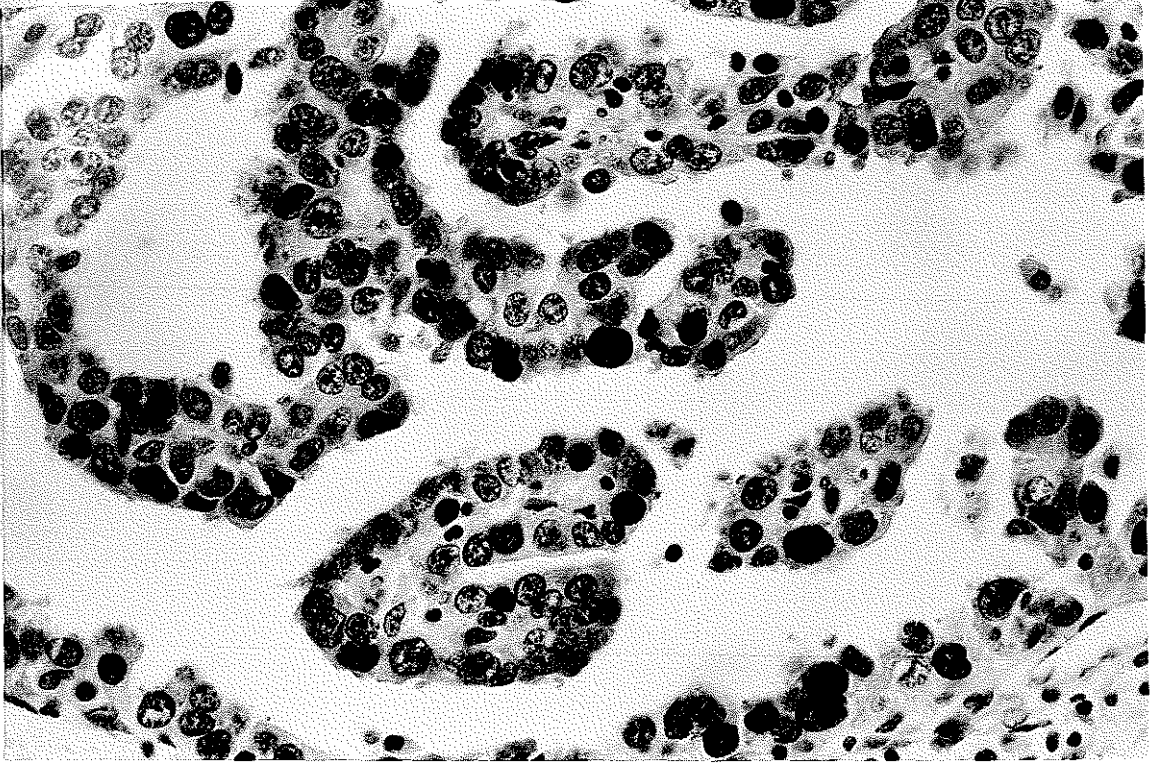
Resim 4: Benign müsinöz epitelyal over tümörü olgusu (HEX20 objektif).



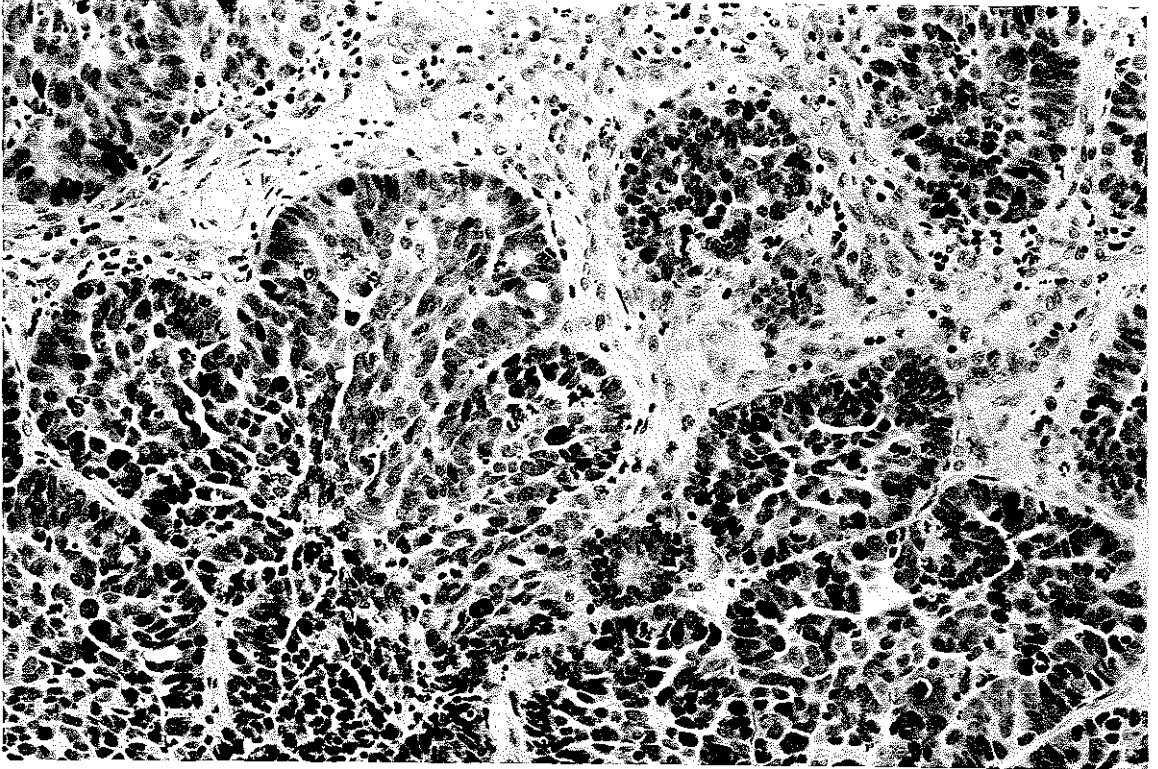
Resim 5: Benign müsinöz epitelyal over tümörlü olguda PCNA immünohistokimyasal boyama yöntemi ile pozitif çekirdek boyanması (PCNAX40 objektif).



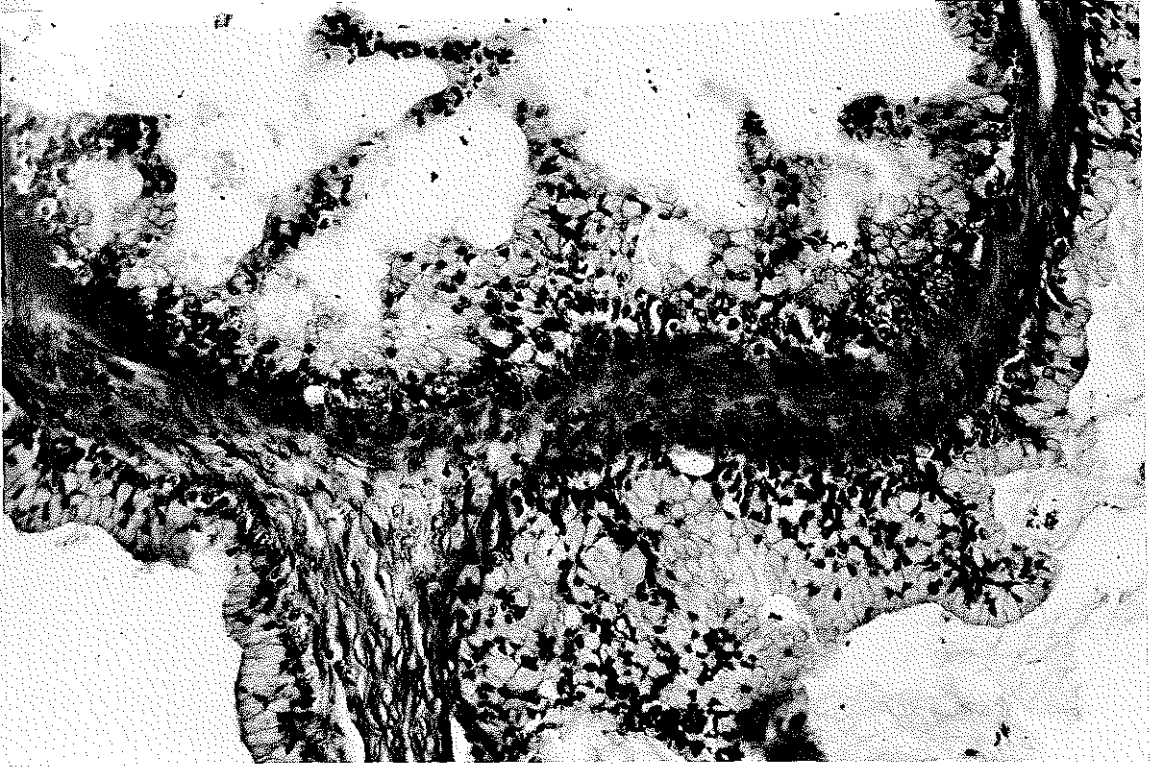
Resim 6: Malign seröz epitelyal over tümörü olgusu (HEX10 objektif)



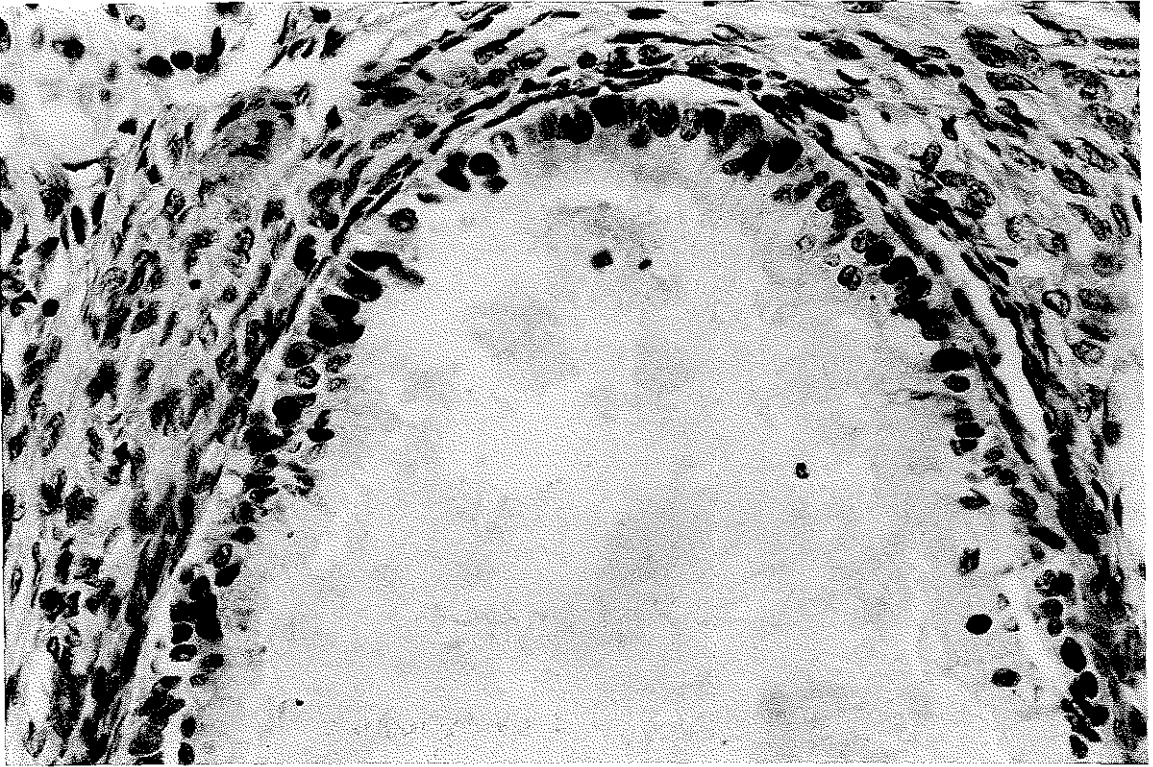
Resim 7: Malign seröz epitelyal over tümörlü olguda PCNA immünohistokimyasal boyama yöntemi ile pozitif çekirdek boyanması (PCNAX40 objektif).



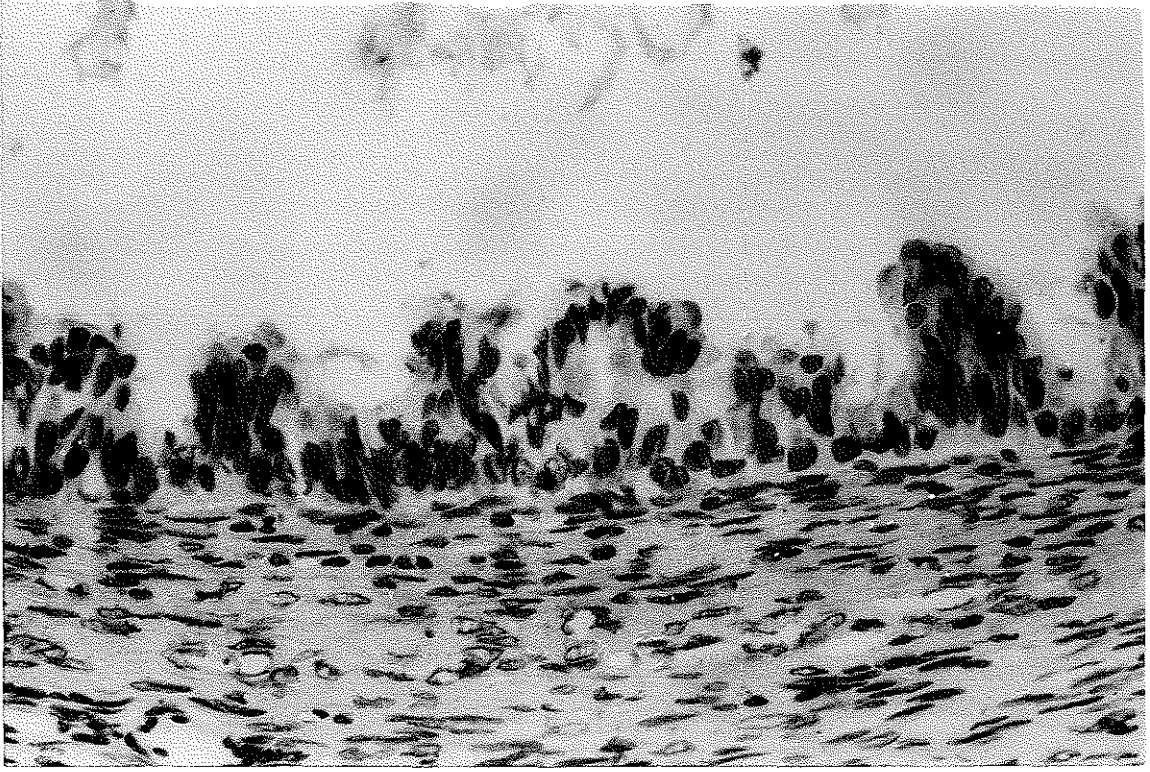
Resim 8: Malign seröz epitelyal over tümörlü olguda Ki-67 immünohistokimyasal boyama yöntemi ile pozitif çekirdek boyanması (Ki-67X20 objektif).



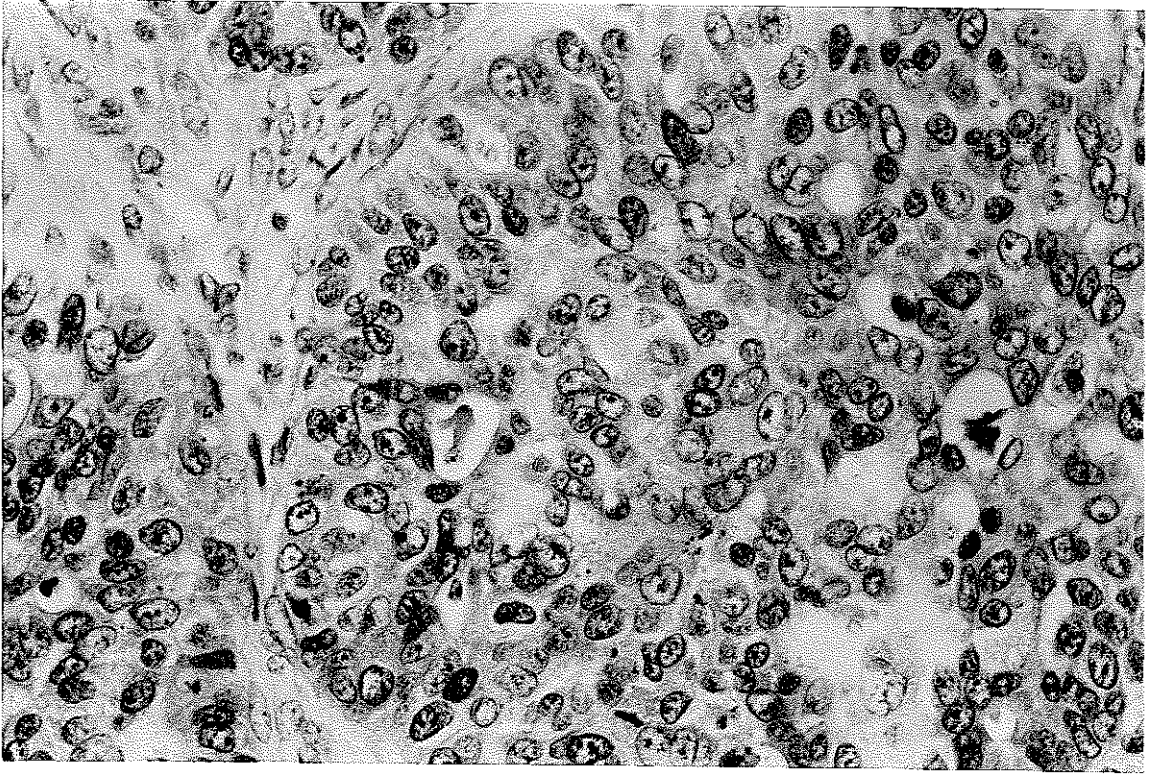
Resim 9: Malign müsinöz epitelyal over tümörü olgusu (HEX40 objektif).



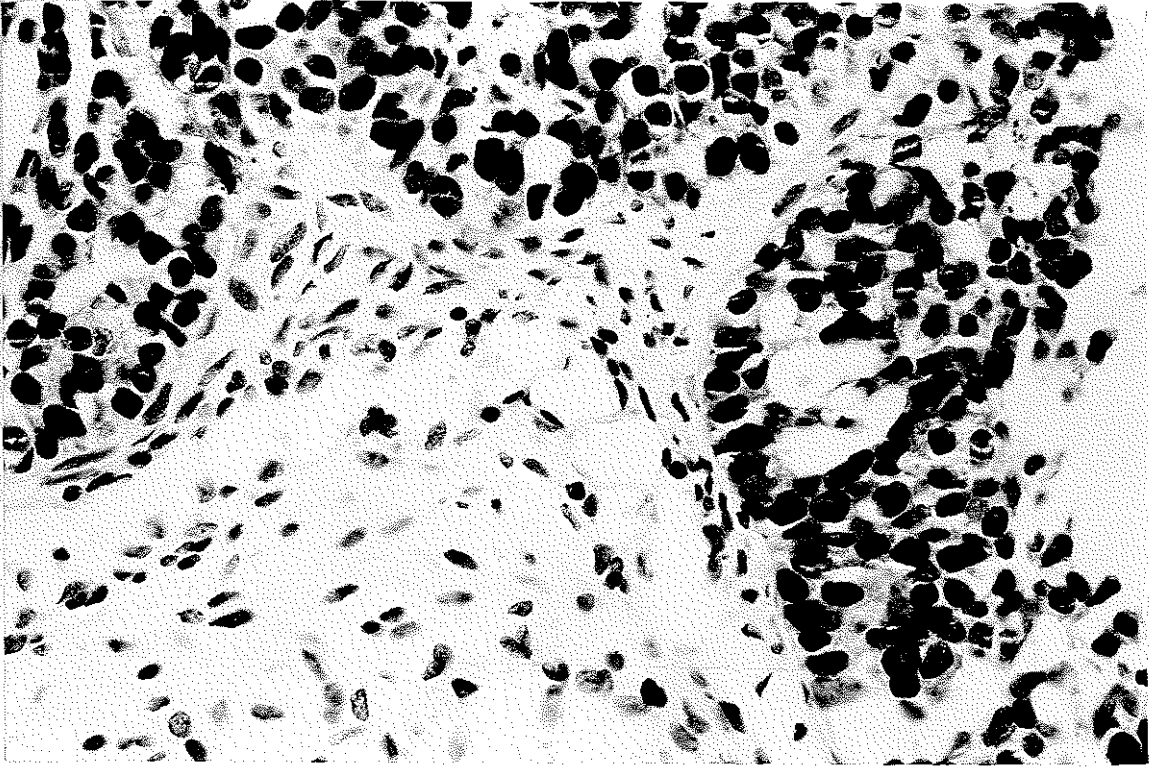
Resim 10: Malign müsinöz epitelyal over tümürlü olguda PCNA immünohistokimyasal boyama yöntemi ile pozitif çekirdek boyanması (PCNAX40 objektif).



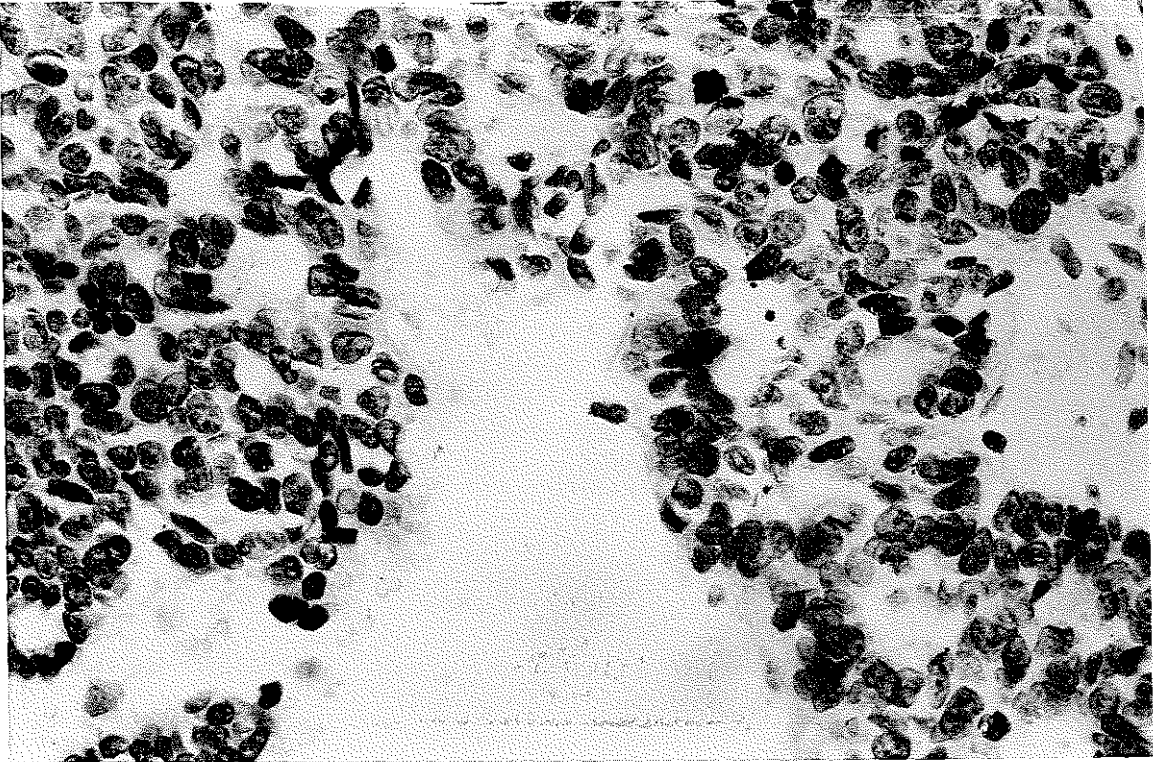
Resim 11: Malign müsinöz epitelyal over tümörlü olguda Ki-67 immünohistokimyasal boyama yöntemi ile pozitif çekirdek boyanması (Ki-67X40 objektif).



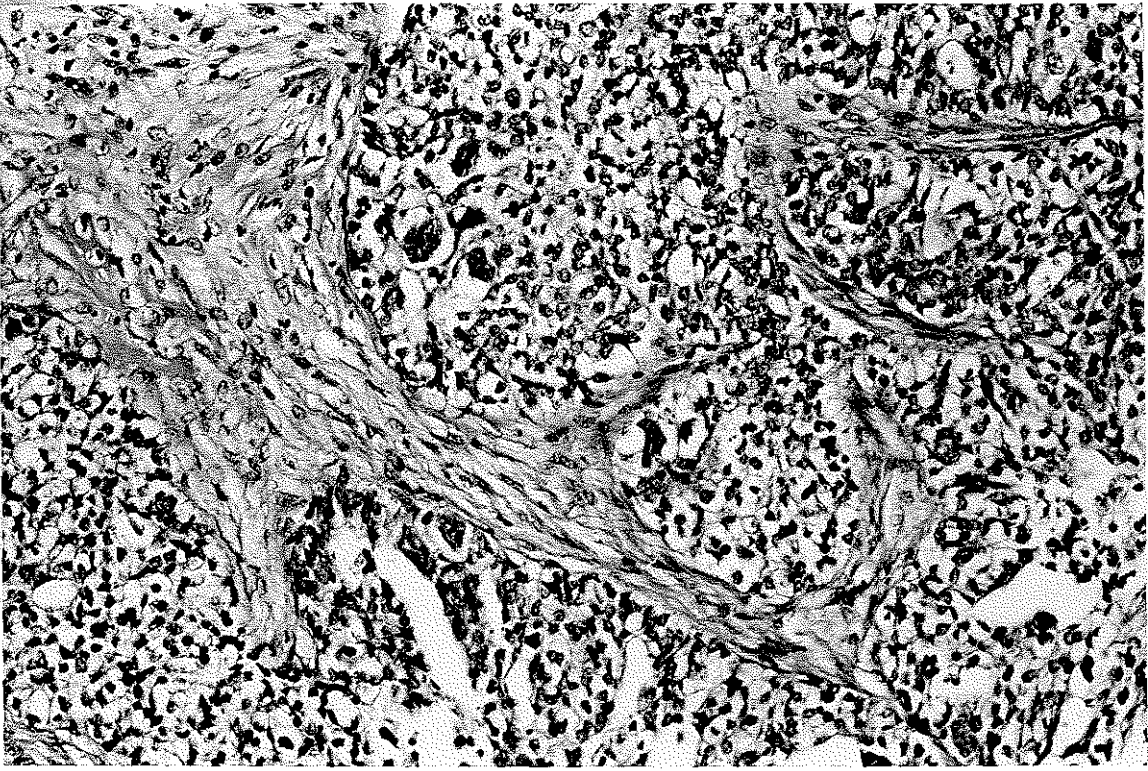
Resim 12: Endometrioid tip malign epitelyal over tümörü olgusu (HEX40 objektif).



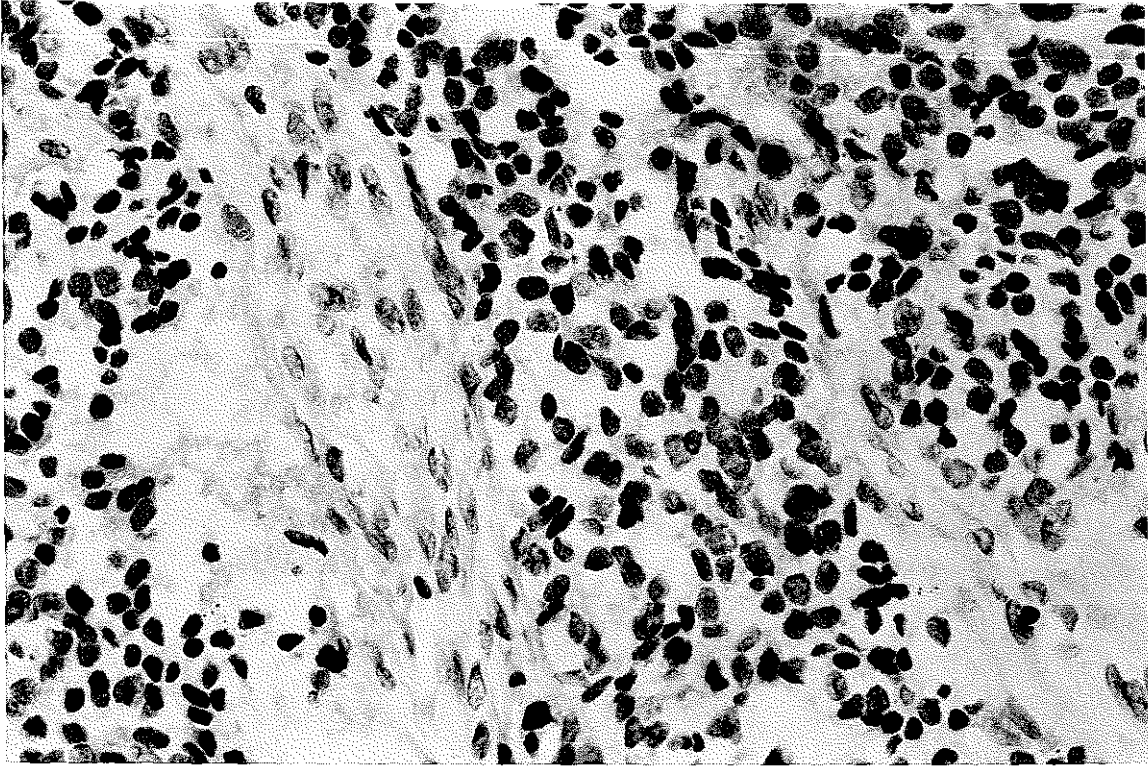
Resim 13: Endometrioid tip malign epitelyal over tümörlü olguda PCNA immünohistokimyasal boyama yöntemi ile pozitif çekirdek boyanması (PCNAX40 objektif).



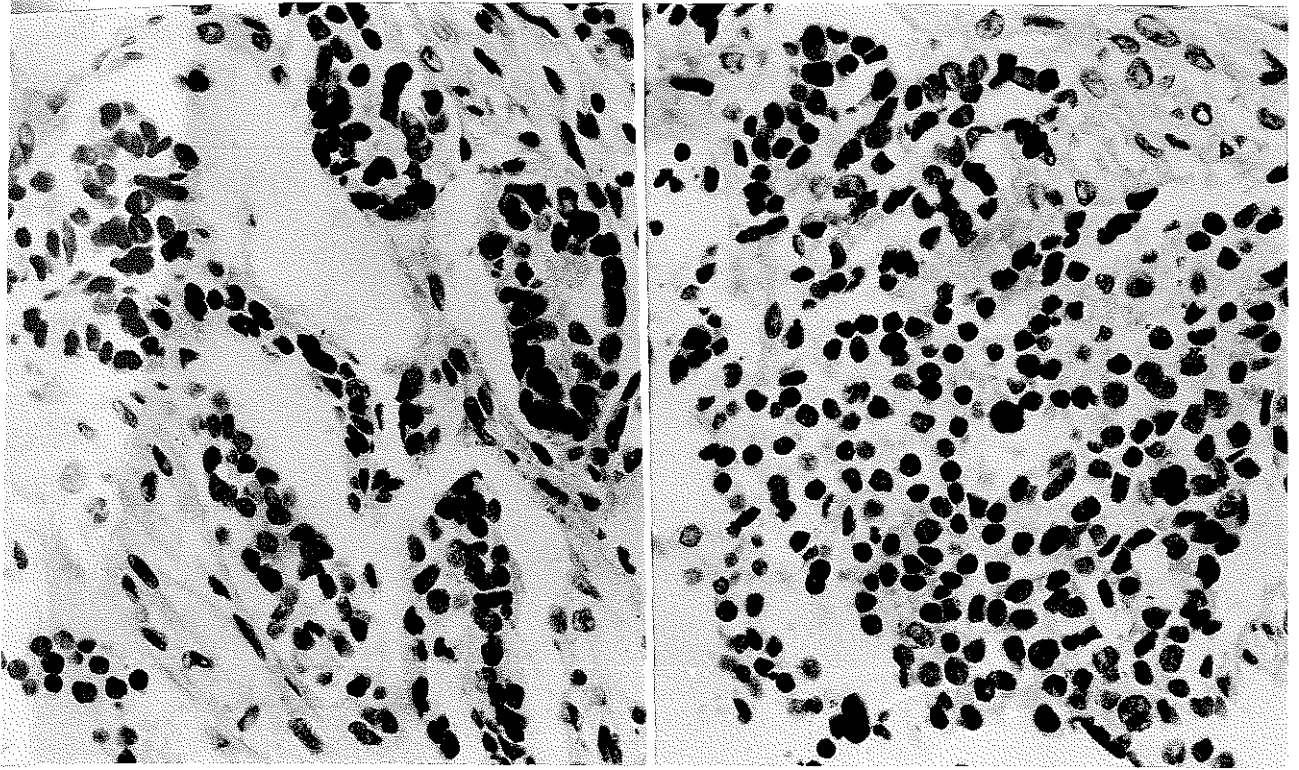
Resim 14: Endometrioid tip malign epitelyal over tümörlü olguda Ki-67 immünohistokimyasal boyama yöntemi ile pozitif çekirdek boyanması (Ki-67X40 objektif).



Resim 15: Berrak hücreli tip malign epitelyal over tümörü olgusu (HEX20 objektif).

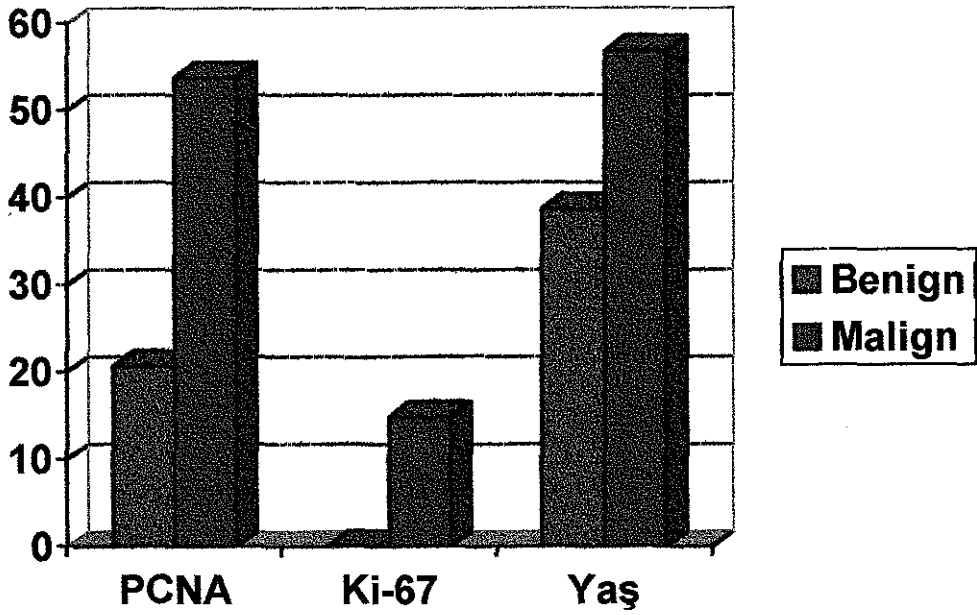


Resim 16: Berrak hücreli tip malign epitelyal over tümörlü olguda PCNA immünohistokimyasal boyama yöntemi ile pozitif çekirdek boyanması (PCNAX40 objektif).



Resim 17: Berrak hücreli tip malign epitelyal over tümörlü olguda Ki-67 immünohistokimyasal boyama yöntemi ile pozitif çekirdek boyanması (Ki-67X40 objektif).

Her bir olguda 500 hücre sayıldı. Sayılan hücrelerin toplam sayısına göre pozitif olanların yüzdesi proliferasyon indeksi olarak belirlendi (107). Elde edilen ortalama proliferasyon indeksi benign olgularda PCNA için 20.7 (ss:27.1); malign olgularda 53.8 (ss: 26.2) olarak izlenirken; Ki-67 için bu değerler benign olgularda 0.14 (ss: 0.76); malign olgularda 14.9 (ss:12.3) olarak bulundu. Malign ve benign olgularda Ki-67 ve PCNA için hesaplanan proliferasyon indeksleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p=0.0001$) (Grafik 4).



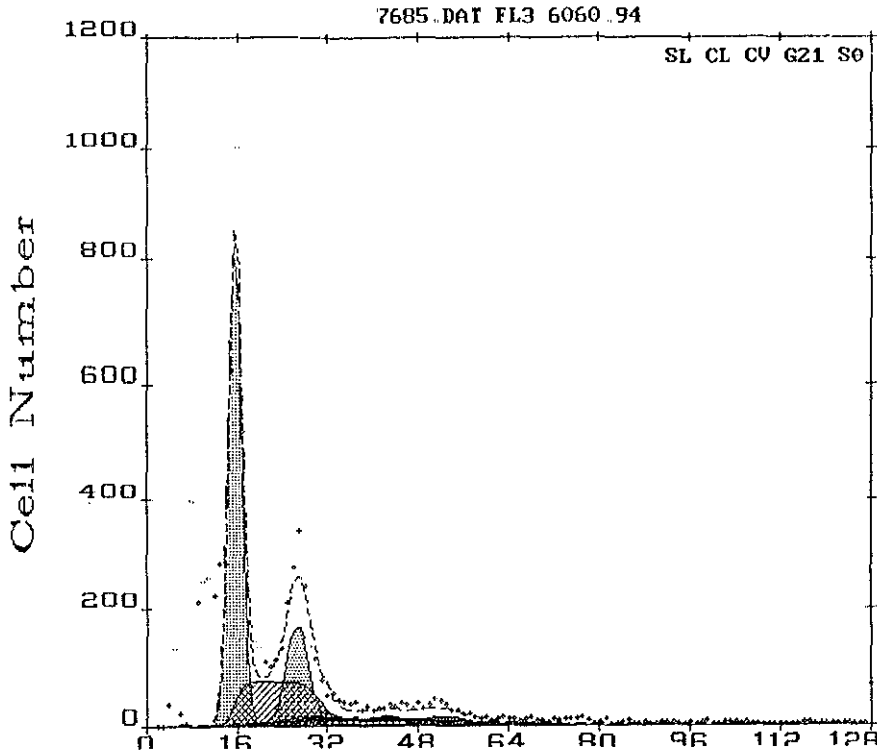
Grafik 4: Benign ve malign epitelyal over tümörlü olgularda yaş ortalaması ile PCNA ve Ki-67 proliferasyon indekslerindeki fark izlenmektedir.

Ki-67 ile PCNA boyanma indekslerinin uyumluluğu araştırıldığında; benign ve malign epitelyal over tümörlerinde Ki-67 ve PCNA boyanma indeksleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu görüldü ($p=0.002$) ancak bu ilişki yalnızca malign epitelyal over tümörlü olgularda çalışıldığında anlamlı bulunmadı.

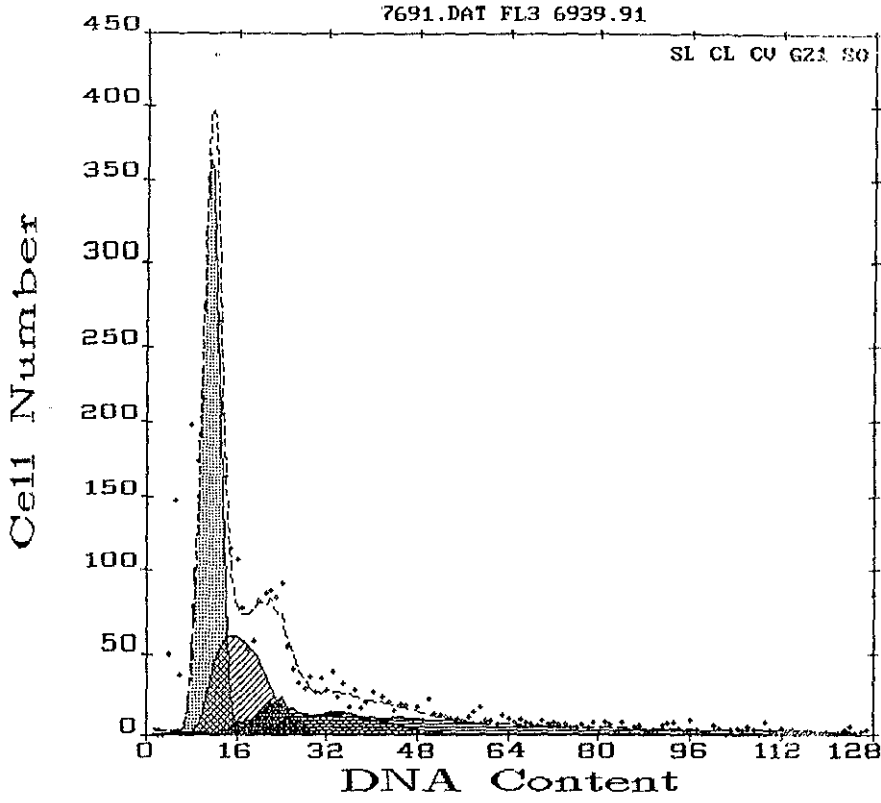
Malign epitelyal over tümörlerinde morfolojik bulgular ile Ki-67 ve PCNA ile belirlenen proliferasyon indekslerinin ilişkisi araştırıldığında; Tümör tipi, histolojik grade ve stage ile Ki-67 ve PCNA ile belirlenen tümör proliferasyon indeksleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p>0.05$).

DNA Akım Sitometri Bulguları

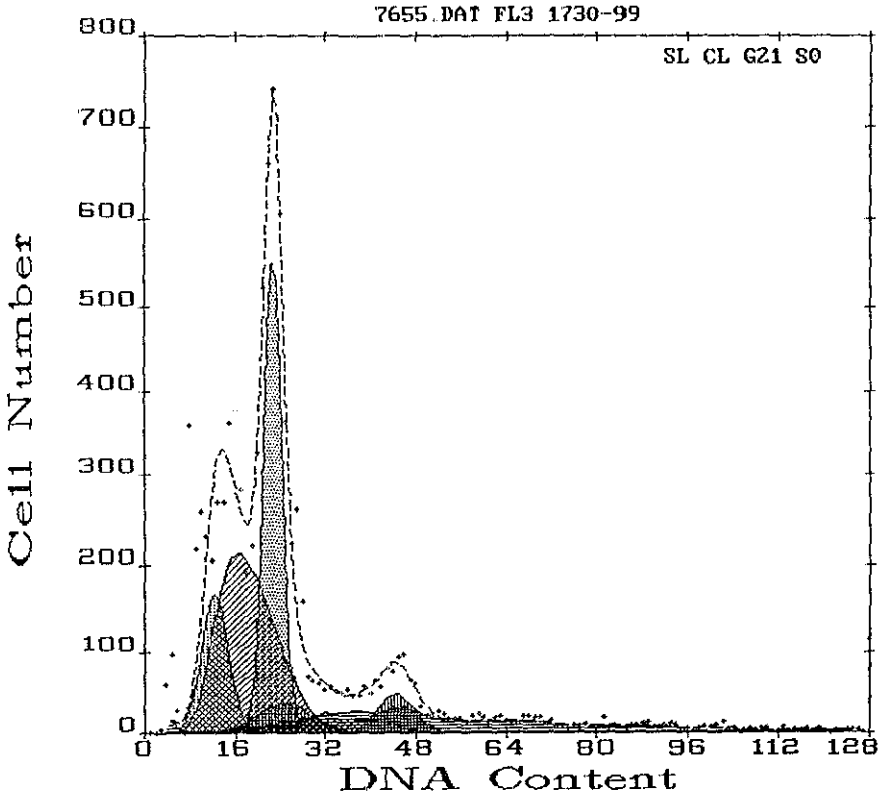
DNA akım sitometri yalnızca malign ve borderline epitelyal over tümörlü olgularda çalışıldı ve histogram analizlerinde olguların içerdikleri DNA miktarına göre DNA içeriği belirlendi. 37 malign ve 3 borderline olmak üzere toplam 40 olgu çalışıldı. Malign olgulardan 5 tanesinde hücre sayısı yeterli olmadığı için uygun histogram elde edilemedi ve bu olgular çalışma dışı bırakıldı. Malign epitelyal over tümörlü olgularda histopatolojik tip ve ploidi durumunu Tablo 4’de özetlenmiştir (Histogram 1-4). Çalışmaya alınan 3 borderline tümör olgusunun tamamında diploid DNA paterni izlendi. Ayrıca olgularda sentez fazındaki hücrelerin yüzde oranı (SPF) hesaplandı.



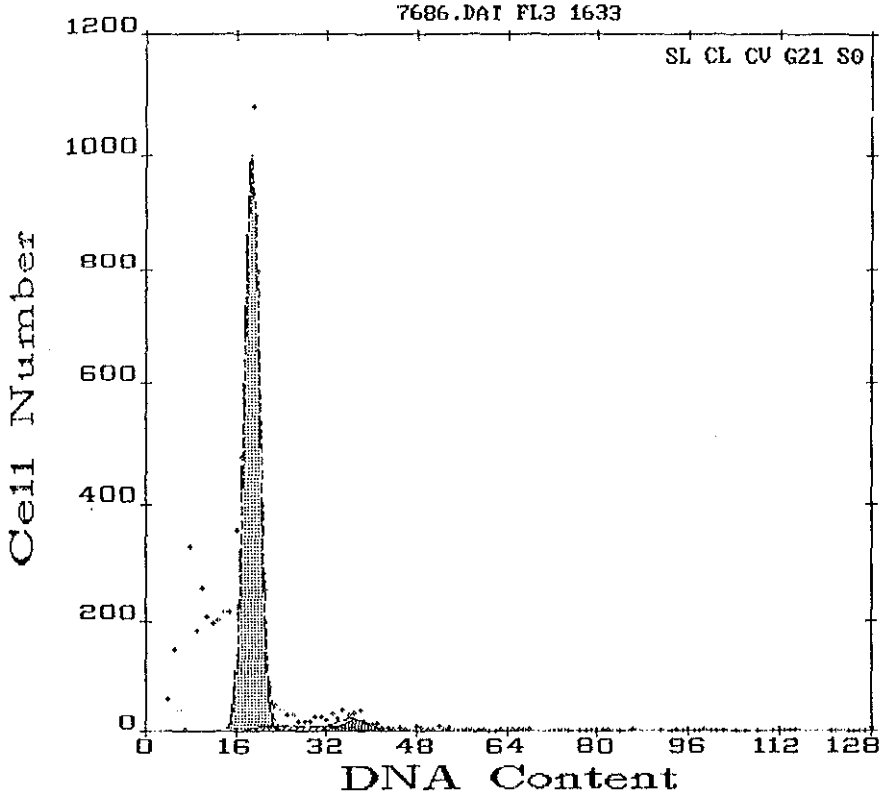
Histogram 1: DNA içeriği anöplöid olan histogram örneği (DI=1.7)



Histogram 2: DNA içeriği tetraploid olan histogram örneği (DI=2.0)



Histogram 3: DNA içeriği multiploid olan histogram örneği (DI=1.8, 3.5)



Histogram 4: DNA içeriği diploid olan histogram örneği (DI=1.0)

Malign olgularda morfolojik bulgular ile ploidi tipi ve SPF'nu arasındaki ilişki araştırıldığında; tümörlerin histopatolojik tipi, histolojik grade'i ve stage'i ile tümörlerin ploidi durumu ve SPF arasında anlamlı bir ilişki görülemedi ($P>0.05$). Yine aynı olgularda 50 yaşın altındaki hastalar ile 50 ve üzeri yaştaki hastalarda ploidi paterni ya da SPF'u arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilemedi ($p>0.05$)

Malign olgularda immunohistokimyasal bulgular ile ploidi paterni ve SPF'nu arasındaki ilişki araştırıldığında; PCNA boyanma indeksi ve Ki-67 boyanma indeksi ile ploidi paterni ya da SPF arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p>0.05$).

Tablo 4: Malign epitelyal over tümörlü olgularda histopatolojik tip ve DNA ploidi durumunu gösteren tablo

	Malign seröz	Malign Müsinöz	Endometrioid	Berrak hücreli	Brenner
Anöploid	4 (%33.3)	2 (%28.6)	2 (%22.2)		1 (%100)
Multiploid	1 (%8.3)			1 (%33.3)	
Tetraploid	4 (%33.3)	1 (%14.3)			
Diploid	3 (%25)	4 (%57.1)	7 (%77.8)	2 (%66.7)	

Malign epitelyal over tümörlü olgularda histopatolojik, immünohistokimyasal ve akım sitometri bulgularının prognoz üzerine etkileri araştırıldığında; malign epitelyal over tümörlerinde DNA ploidi, SPF, PCNA ve Ki-67 proliferasyon indeksi, tümörün diferansiyasyonu, stage'i ve hastaların 50 yaşın altında ya da üzerinde olmasının hasta yaşam süresi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olduğu görülemedi. Epitelyal over tümörlü olguların histopatolojik, immünohistokimyasal ve akım sitometri bulguları Tablo 5'de gösterilmiştir.

Tablo 5: Epitelyal over tümörlerinin histopatoloji, immunohistokimya ve akım sitometri bulguları

No	Tanı	Yaş	PCNA	Ki-67
1	Benign seröz epitelyal Over tümörü	30	68	4
2	Benign seröz epitelyal Over tümörü	67	22	0
3	Benign seröz epitelyal Over tümörü	36	4	0
4	Benign seröz epitelyal Over tümörü	34	31	0
5	Benign seröz epitelyal Over tümörü	50	21	0
6	Benign seröz epitelyal Over tümörü	47	6	0

No	Tanı	Yaş	PCNA	Ki-67
7	Benign seröz epitelyal Over tümörü	43	23	0
8	Benign seröz epitelyal Over tümörü	43	0	0
9	Benign seröz epitelyal Over tümörü	25	10	0
10	Benign seröz epitelyal Over tümörü	70	0	0
11	Benign seröz epitelyal Over tümörü	43	0	0
12	Benign seröz epitelyal Over tümörü	53	71	0
13	Benign müsinöz epitelyal over tümörü	30	0	0
14	Benign müsinöz epitelyal over tümörü	29	10	0
15	Benign müsinöz epitelyal over tümörü	25	0	0
16	Benign müsinöz epitelyal over tümörü	43	6	0
17	Benign müsinöz epitelyal over tümörü	27	0	0
18	Benign müsinöz epitelyal over tümörü	27	0	0
19	Benign müsinöz epitelyal over tümörü	28	0	0
20	Benign müsinöz epitelyal over tümörü	60	20	0
21	Benign müsinöz epitelyal over tümörü	37	70	0
22	Benign müsinöz epitelyal over tümörü	28	100	0
23	Benign müsinöz epitelyal over tümörü	23	4	0
24	Benign müsinöz epitelyal over tümörü	36	18	0
25	Benign müsinöz epitelyal over tümörü	46	32	0
26	Benign müsinöz epitelyal over tümörü	57	40	0
27	Benign müsinöz epitelyal over tümörü	23	0	0

İd	Tanı	Yaş	Grade	Stage	PCNA	Ki-67	DNA Ploidi	SPF	Yaşam
28	Borderline müsinöz Epitelyal over tümörü	65			45	0	Diploid	20	
29	Bordeline müsinöz Epitelyal over tümörü	27			53	12	Diploid	18	
30	Borderline müsinöz Epitelyal over tümörü	55					Diploid	29	

31	Malign seröz Epitelyal over tümörü	21	1	3	19	6			110
32	Malign seröz Epitelyal over tümörü	65	3	3	89	33			70
33	Malign seröz Epitelyal over tümörü	57	2	2	48	12	Multi-ploid	19	21
34	Malign seröz epitelyal over tümörü	44	2	4	26	0	Anö-ploid	29	29 (öldü)
35	Malign seröz epitelyal over tümörü	60	1	2	27	16	Diploid	4	76
36	Malign seröz epitelyal over tümörü	58	2	3	44	32	Tetra-ploid	29	19 (öldü)
37	Malign seröz epitelyal over tümörü	51	2	3	37	0	Anö-ploid	24	1 (öldü)
38	Malign seröz epitelyal over tümörü	62	2	3	39	0	Tetra-ploid	36	11
39	Malign seröz epitelyal over tümörü	51	1	1	97	16	Diploid	35	9
40	Malign seröz epitelyal over tümörü	64	1	3	73	26	Tetra-ploid	26	29
41	Malign seröz epitelyal over tümörü	50	3	4	56	16	Diploid	21	35 (öldü)
42	Malign seröz epitelyal over tümörü	63	3	2	95	5			38
43	Malign seröz epitelyal over tümörü	65	2	4	57	17	Anö-ploid	5	10
44	Malign seröz epitelyal over tümörü	61	3	3	67	18	Anö-ploid	21	23 (öldü)
45	Malign seröz epitelyal over tümörü	61	3	4	49	9	Tetra-ploid	31	86
46	Malign müsinöz epitelyal over tümörü	65	1	1	36	8	Diploid	11	13
47	Malign müsinöz epitelyal over tümörü	85	1	1	49	8			21

o	Tanı	Yaş	Grade	Stage	PCNA	Ki-67	DNA Ploidi	SPF	Yaşam
8	Malign müsinöz epitelyal over tümörü	61	1	2	16	19	Tetra-ploid	25	31
9	Malign müsinöz Epitelyal over tümörü	47	1	2	23	0	Diploid	27	62
0	Malign müsinöz Epitelyal over tümörü	82	1	2	33	0	Diploid	13	3 (öldü)
1	Malign müsinöz Epitelyal over tümörü	55	1	3	50	17	Anö-ploid		17
2	Malign müsinöz Epitelyal over tümörü	48	2	3	32	25	Anö-ploid	6	11
3	Malign müsinöz Epitelyal over tümörü	50	1	3	24	37	Diploid	20	12
4	Endometrioid tip malign Epitelyal over tümörü	49	2	3	83	0	Diploid	19	85
5	Endometrioid tip malign Epitelyal over tümörü	38	2	3	44	20	Diploid	17	20
6	Endometrioid tip malign Epitelyal over tümörü	76	2	3	87	12	Diploid	15	22
7	Endometrioid tip malign Epitelyal over tümörü	40	2	3	58	0	Anö-ploid	3	13
8	Endometrioid tip malign Epitelyal over tümörü	69	3	3	52	29	Diploid	18	16
9	Endometrioid tip malign Epitelyal over tümörü	51	3	3	35	17	Diploid	10	9
0	Endometrioid tip malign Epitelyal over tümörü	70	2	3	96	17	Diploid	20	19
1	Endometrioid tip malign Epitelyal over tümörü	41	3	3	36	52	Anö-ploid	19	108
2	Endometrioid tip malign epitelyal over tümörü	63	1	3	98	17			15
3	Endometrioid tip malign epitelyal over tümörü	57	2	1	98	9	Diploid	20	8
4	Berrak hücreli tip malign epitelyal over tümörü	51	3	1	57	0	Multi-ploid	12	5
5	Berrak hücreli tip malign epitelyal over tümörü	67	3	4	96	33	Diploid	1	22
6	Berrak hücreli tip malign epitelyal over tümörü	72	3	1	19	16	Diploid	12	18
7	Brenner Tümörü	36	2	4	46	12	Anö-ploid		

TARTIŞMA

İnsan dokularında normal büyüme, hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki hassas denge ile düzenlenir. Bu düzenleyici mekanizmalardan herhangi birinde meydana gelen bozukluk benign ve malign yönde anormal büyüme ile sonuçlanır (10). Normal doku ile koordine olmayan aşırı büyüme, neoplazinin temel özelliklerinden biridir. Tümör popülasyonunda bulunan hücrelerden proliferatif olanlar tümörün büyüme fraksiyonunu belirler (4, 103). Tümör proliferasyon fraksiyonunu ölçmek için geliştirilmiş bir çok yöntem vardır (mitoz sayısı, Timidin işaretleme indeksi, Bromodeoksiüridin işaretleme indeksi, AgNOR ve immünohistokimyasal işaretleyiciler). Literatürde bu yöntemlerin birbirlerine karşı üstünlüklerini karşılaştıran çok sayıda yayın vardır (2,19,24,58,69) Biz proliferatif aktivitenin saptanmasında rutinde kolay uygulanabilir olması ve parafin bloklarda da çalışılabilme avantajından dolayı immünohistokimyasal işaretleyicilerden Ki-67 ve PCNA ile çalıştık.

Over karsinomlarının prognozu kötüdür. Bunun nedeni geç tanınmaları ve tedavi sonrası tekrarlama risklerinin yüksek olmasıdır (104). Farklı tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmiş olmasına karşın over karsinomları en sık ölüme neden olan jinekolojik kanser olmaya devam etmektedir. Over karsinomları içinde en büyük bölümü % 90'lık görülme oranı ile yüzey epitelinden kaynaklanan grup oluşturmaktadır (122). Over karsinomlarına özgü spesifik tümör belirteçleri ve klinik semptomlar yoktur. Bu nedenle erken tanı zordur ve olguların büyük çoğunluğu ileri dönemlerde yakalanabilmektedir (113). Oysa erken tanı yaşam süresini etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Bu nedenle bütün ilgi erken tanı ve prognoz tayini için spesifik belirteçlerin bulunmasına yöneltilmiştir (41).

Biz bu çalışmada, benign, borderline ve malign epitelyal over tümörlerinde prognostik öneme sahip olduğu kabul edilen yaş, histolojik tip, histolojik grade ve tümör stage'i ile daha objektif ve güvenilir olduğu düşünülen ve hastaların tedavi yöntemlerinin tayininde değerli prognostik bilgiler verebileceğine inandığımız, akım sitometri ve proliferasyon işaretleyicileri (Ki-67, PCNA) arasında ilişkiyi araştırdık. Daha sonra her bir parametrenin hasta yaşam süreleri üzerine olan etkilerini değerlendirdik.

Over karsinomları özellikle postmenapozal kadınların hastalığıdır. Yapılan çalışmalarda 40 yaşın altında over tümörlü olgu sayısı % 3-17 olarak bulunmuştur (26). Kısa bir süre önce FIGO 40 yaşın altında borderline ve invaziv tümör görülme oranını sırasıyla % 31.8 ve 8.7 olarak belirtmiştir (17). Biz çalışmaya aldığımız 27 benign epitelyal over tümörlü olgunun yaş aralığını 23-60 (ort. 39.4) olarak bulduk. Çalışmamızdaki 3 borderline tümör olgusunun yaş aralığı 27-65 (ortalama 49) idi. Malign olgularda ise yaş aralığı 21-85 (ortalama 56.9) değişmekteydi. Malign olgulardan 4 tanesi 40 yaş ve altında bulunurken (% 10.8); 3 borderline tümör olgusundan bir tanesi 40 yaşın altında bulundu (% 33.3).

PCNA monoklonal antikorı ile immünohistokimyasal boyama yöntemi arşiv materyalinde çalışılabilen, kompleks donanım gerektirmeyen bir yöntemdir. Birçok antikor için rutin takip edilen materyallerde mikrodalga fırında antijen geri kazanım işlemi boyanmayı arttırdığı için, bu çalışmada da aynı yöntem uygulandı. Benign epitelyal over tümörü tanısını almış 27 olgudan 18 tane (% 66.6)'sinde ve 37 malign epitelyal tümör olgusunun tümünde (% 100) pozitif çekirdek boyanması görüldü.

Monoklonal MIB-1 antikorı ile immünohistokimyasal boyama yöntemi de parafin kesitlerde, yeni antijen açığa çıkarma yöntemi ile çalışılabilmektedir (103). Çalışmamızda Ki-67 ile 27 benign epitelyal over

tümörlü olgudan yalnızca 1 (% 3.7) tanesinde pozitif çekirdek boyanması izlendi. 37 malign epitelyal over tümörü olgusunun ise 29 (% 78.3) tanesinde pozitif boyanma görüldü. Ki-67 immünohistokimyasal boyama yönteminin uygulanması sırasında antijen geri kazanım işlemi için uygulanan mikrodalga fırında 10 dakika kaynatma süresi yeterli olmadı. Materyallerin formalin içinde uzun süre bekletilmesi aşırı çapraz bağlanmanın oluşumuna neden olabilmektedir. Bunun sonucunda immünboya ile zayıf boyanma ya da hiç boyanmama sorunu ile karşılaşılabilir. Bu etki kullanılan antijenin duyarlılığına bağlı olarak her bir immünboya için farklıdır ve bazen meydana gelen zarar geri dönüşümsüz olabilir. Antijen geri kazandırılması işleminde, doku kesitlerine uygulanan ısı formaldehit fiksasyonu sırasında meydana gelen çapraz bağların kırılmasında gerekli olan enerjiyi sağlar (120). Çalışmamızda antijen geri kazandırılması işlemi için mikro dalga fırında kaynatma süresi arttırıldığında lam üzerinden doku dökülmesi olmadan, ideal kaynatma süresi 20 dakika olarak bulundu.

PCNA ve Ki-67 antikorlarının uygulanması sırasında, PCNA ile daha kısa sürede, daha kolay ve daha homojen boyanma sağlandığı; Ki-67 ile daha detaylı ve titiz çalışma gerektiği görülmüştür. İmmün boyanmanın kalitesi antikor kalitesinin yanında şu üç faktörün de titizlikle uygulanmasına bağlıdır (120):

- 1-Doku tespit ve takip basamakları
- 2-Antikor tanıma bölgelerinin serbestleştirilmesi
- 3-Kullanılan yöntem

PCNA ve monoklonal Ki-67 antikorları ile boyanan olgularımızı değerlendirirken boyanan çekirdek pozitif ve boyanmayan çekirdek negatif olarak kabul edildi. Homojen ve yoğun boyanan alanlarda sayılan benign olgularda 400 ve malign olgularda 500 hücre içindeki pozitif boyanan

çekirdek sayısı kaydedildi. Benign olgularda PCNA için proliferasyon indeksi 20.7 (ss:27.1) malign olgularda 53.8 (ss:26.2) olarak izlenirken; Ki-67 için bu değerler benign olgularda 0.14 (ss:0.76) malign olgularda 14.9 (ss:12.3) olarak bulundu. Malign ve benign olgularda Ki-67 ve PCNA ile boyanma farklılığı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.0001$). Aynı zamanda benign ve malign epitelyal over tümörlü olgularda PCNA ile Ki-67 boyanma indeksleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu görüldü ($p=0.002$). Ancak yalnızca malign olgularda çalışıldığında bu iki değişken arasındaki ilişki anlamlı bulunmadı. Daha sonra Ki-67 ve PCNA için hesaplanan proliferasyon indeksleri ile malign epitelyal over tümörlerinde histolojik grade, histolojik tip ve stage arasındaki ilişki araştırıldı. Bu değişkenler arasındaki ilişki de istatistiksel olarak anlamlı değildi. Proliferasyon indekslerinin hasta yaşam süresi üzerine olan etkisi araştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir sonuca ulaşılamadı. Literatürde bu konuda yapılmış çalışmalarda da farklı sonuçlar elde edilmiştir. Seröz epitelyal over tümörlü olgularda yapılmış olan bir çalışmada, benign ve malign olgularda PCNA boyanma farklılığını istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Aynı çalışmada PCNA boyanma indeksi ile histolojik grade ve stage arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu izlenmiş; ancak hasta yaşam süresi ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu gösterilememiştir. Başka bir çalışmada ise ileri dönem epitelyal over karsinomlarında PCNA ekspresyonu ile hasta yaşam süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olduğu gösterilmiştir (41). Hartmann ve ark. daha önce tedavi görmemiş 92 ileri dönem epitelyal over karsinomlu olgu ile yaptıkları çalışmada PCNA proliferasyon indeksi ile hasta yaşam süresi arasında anlamlı bir ilişki olduğunu; ortalamanın üstünde PCNA PI'ne sahip olgularda 5 yıllık yaşam süresi %44 iken PI'i düşük olgularda bu oranın %15 olduğunu bulmuşlardır. Bu sonucu, proliferasyon hızı yüksek olguların

kemoterapiye cevabının daha iyi olmasına bağlamışlardır (47). Kuwata ve ark. 68 primer epitelyal over tümörlü hasta üzerinde yaptıkları çalışmada, PCNA proliferasyon indeksi ile histolojik grade arasında anlamlı bir ilişki olduğunu ancak stage ve histolojik tip ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığını izlerken; Minguillon ve ark. PCNA proliferasyon indeksi ile yalnızca rezidü tümör arasında anlamlı bir ilişki olduğunu görmüşlerdir (67, 76). Nakano ve ark. ise 31 berrak hücreli over karsinomlu olguda PCNA boyanma indeksi yüksek olan olgularda prognozun daha kötü olduğunu görmüşlerdir (80). Nakopoulou ve ark.'nın 34 benign ve 40 malign epitelyal over karsinomlu olgu üzerinde yaptıkları araştırmada benign ve malign olgularda PCNA ile boyanma farklılığının istatistiksel olarak anlamlı olduğu izlenmiştir. Yüksek proliferasyon indeksine sahip olguların daha çok ileri stage'de olduğu görülmüş ancak PCNA boyanma indeksi yüksek olan grup ile düşük olan grup arasında yaşam süreleri bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır (82).

Ki-67 proliferasyon indeksi'nin epitelyal over tümörlü olgulardaki prognostik önemini araştıran çalışmalarda da elde edilen sonuçlar arasında farklılıklar izlenmektedir. Marx ve ark.'nın 251 epitelyal over karsinomlu olguda yaptıkları çalışmada, histolojik grade ile Ki-67 proliferasyon indeksi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu izlenirken; histolojik tip ve stage ile anlamlı bir ilişki varlığı gösterilememiştir. Aynı araştırmada yüksek proliferasyon indeksine sahip olgularda prognozun daha kötü olduğu görülmüştür (72). Viale ve ark. 120 epitelyal over karsinomlu olguda yaptıkları çalışmada p53 ve MIB-1 proliferasyon indeksinin epitelyal over karsinomlarında bağımsız prognostik belirteçler olduğu sonucunu bulmuşlardır (118). Morimura ve ark. 8 berrak hücreli over karsinomlu olguda yaptıkları çalışmada da yüksek Ki-67 proliferasyon indeksi ile kötü prognoz arasında anlamlı bir ilişki olduğunu görmüşlerdir (77). Kerns ve ark.'nın

yaptığı çalışmada ise Ki-67 proliferasyon indeksi ile stage arasında ilişki olduğu ve yüksek proliferasyon indeksine sahip olgularda yaşam süresinin daha kısa olduğu izlenirken; histolojik grade ve rezidü tümör miktarı ile proliferasyon indeksi arasındaki ilişki anlamlı bulunmamıştır (61). Jordan ve ark ileri dönem over karsinomlu olgularda yaptıkları çalışmada yüksek Ki-67 proliferasyon indeksine sahip olgularda yaşam süresinin daha kısa olduğunu izlemişlerdir (57).

Over karsinomları dışında akciğer karsinomları, serviks karsinomları, kolorektal karsinomlar, hepatosellüler karsinomlar, Hodgkin hastalığı, meme tümörleri gibi pek çok organ tümöründe proliferatif aktivitenin tayini ve kabul edilmiş prognostik belirleyicilerle ilişkisini araştıran PCNA ile yapılmış çok sayıda çalışma vardır (27,31,32,44,63,65,73,99,101,102,121) Bunun yanı sıra serviks yassı epitel hücreli karsinom, gastrik lenfoma, yumuşak doku sarkomları, serebral gliomlar ve kolorektal karsinomlarda Ki-67 immünohistokimyasal yönteminin kullanılması ile hesaplanan proliferatif aktivitenin prognostik değerini araştıran çalışmalar da yapılmıştır (66,79,81,85,115).

Proliferatif aktivitenin değerlendirilmesinde kullanılan PCNA ve Ki-67 immünohistokimyasal yöntemlerinin birbirleriyle olan ilişkilerini karşılaştıran çalışmalarda da birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Rosa ve arkadaşlarının gastrik karsinomlarda proliferatif aktivitenin ölçülmesi ve Ki-67 ile PCNA immün yöntemlerinin karşılaştırılmasını konu alan çalışmalarında, histolojik grade ile Ki-67 ve PCNA boyanma indekslerinin ilişkili olduğu görülmüş ancak Ki-67 ve PCNA arasında korelasyon bulunmamıştır. Araştırmacılar bunun nedenini şu şekilde açıklamışlardır: 1-Gastrik karsinomlarda inter ve intra tümör heterojenitesi yüksek standart sapma değerine neden olmaktadır, 2-Ki-67 immünboyasının taze dokuda çalışılırken PCNA'nın parafin bloklarda çalışılması, 3-PCNA ile hücre

siklusunu henüz terketmiş hücrelerin de sayılabilmesi (93). Bununla birlikte Dervan ve arkadaşları parafin bloklarda PCNA ve taze dokuda Ki-67 kullanarak yaptıkları karşılaştırmalı çalışmada PCNA ve Ki-67 immünohistokimya sonuçlarının birbirlerinden farklı olmadığını ve belirgin bir korelasyon bulunduğunu göstermişlerdir (25). Louis ve arkadaşları beyin tümörlerinde Ki-67 ve PCNA immünohistokimyasal yöntemlerinin değerlendirilmesini içeren çalışmalarında, Ki-67 immünohistokimyasal yöntemi ile düşük ve orta dereceli astrositomların farklı boyandığını ve bu farklı boyanma örneğinin bu iki lezyonun ayırımında yardımcı olabileceğini görmüşlerdir. Ancak PCNA boyanma farklılığının düşük ve orta dereceli astrositomlarda anlamlı olmadığını izlemişlerdir (71).

Hücresinin davranışını belirleyen tüm genetik bilgiler DNA'da kayıtlıdır. Normalden fazla kromozom içeren anöplöid tümörlerdeki genler tümöral gelişim ve metastatik modelden sorumlu olabilirler (48). Nükleer DNA içeriği tümörlerde tanı, prognoz tahmini ve tedavi protokollerinin düzenlenmesinde yardımcı bilgiler sağlayabilir (18). Akım sitometri ile tümör hücresinin DNA içeriği incelenip tümörün ploidi durumu ve proliferatif indeksi nicel olarak saptanabilir. Pek çok solid organ tümöründe DNA ploidi prognozla olan ilişkisini araştıran çok sayıda çalışma vardır. Ancak anöplöidi yalnızca malign olgularda izlenen ve her zaman kötü prognoz göstergesi olan bir bulgu değildir (70, 86).

Çalışmamızda akım sitometri ile DNA içeriği yalnızca malign ve borderline epitelyal over tümörlü olgularda çalışıldı. Çalışmaya 37 malign ve 3 borderline tümör olmak üzere 40 olgu dahil edildi. Malign epitelyal over tümörlü olgulardan 5 tanesinde hücre sayısı yeterli olmadığı için uygun histogram elde edilemedi ve bu olgular çalışma dışı bırakıldı. Çalışmaya alınan 3 borderline epitelyal over tümörü olgusunun tamamında diploid DNA izlendi. 32 malign olgunun 9 tanesinde anöplöidi, 2 tanesinde multiploidi, 5

tanesinde tetraploidi ve 16 tanesinde diploidi izlendi. Malign epitelyal over tümörlü olgularda histopatolojik tip ve ploidi durumu tablo 4'de özetlenmiştir. Histopatolojik tipler arasında en fazla anöploidi durumu malign seröz epitelyal over tümörlü olgularda (%33.3) izlenirken diploidi paterninin en sık izlendiği grup endometrioid tip malign epitelyal over tümörleri (%77.8) idi. Ancak plodi tipi ile histolojik tip arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ayrıca olgularda sentez fazındaki hücrelerin yüzde oranı (SPF) hesaplandı. Malign olgularda histolojik grade ve stage ile DNA ploidi durumu arasındaki ilişki araştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmadı. Aynı zamanda bu değişkenlerle SPF arasında da anlamlı bir ilişki varlığı gösterilemedi. Daha sonra DNA ploidi durumu ve SPF'nunun yaşlı ve daha genç hastalardaki durumu araştırıldı. 50 yaşın altındaki ve 50 ve üzeri yaştaki kadınlarda ploidi paterni ve SPF arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). DNA ploidi durumu ve SPF ile hasta yaşam süreleri arasındaki ilişki araştırıldığında da anlamlı bir sonuç bulunamadı.

Literatürde over tümörlerinde DNA ploidi durumunun histolojik tip, histolojik grade, stage ve yaş gibi kabul edilmiş prognostik değişkenlerle ilişkisini araştıran çalışmalardan elde edilen sonuçlar her zaman aynı olmamıştır. Barnabei ve ark. 115 over karsinomlu olgu ile yaptıkları çalışmada hastalık stage'i, yaş, SPF ve DNA ploidi durumunun hasta yaşam süresi ile ilişkisini araştırmışlardır. DNA ploidi durumunun hasta yaşam süresi ile ve SPF'nunun tümör tekrarlama zamanı ile ilişkili olduğunu görmüşlerdir (6). Friedlander ve Erba ve ark. yaptıkları çalışmalarda ploidi ve tümör stage'i arasında anlamlı ilişki olduğunu göstermişlerdir. Erba ve ark. histolojik grade ile de ploidi durumu arasında anlamlı bir ilişki olduğunu izlerken Friedlander ve arkadaşlarının çalışmasında böyle bir ilişkinin varlığı gözlenmemiştir (28,35). Resnik ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise ploidi

ile histolojik tip, grade ve hasta yaşam süresi arasında anlamlı bir ilişki izlenmemiştir (91).

Friedlander ve ark. 91 ileri dönem epitelyal over karsinomlu olguda ploidi durumunun bağımsız prognostik belirleyici olduğu sonucunu bulmuşlardır. Diploid olgularda (%31) hasta yaşam süresinin anöploid olgulardan (%69) anlamlı derecede uzun olduğunu görmüşlerdir (34). İversan ve ark. 51 ve 112 over karsinomlu olguda yaptıkları ileriye dönük iki ayrı çalışmada ploidi durumunun hastalığın seyrini etkilediğini görmüşlerdir (55, 56). Diploid olgularda birincil tedaviden sonra hastalığın seyri belirgin olarak iyi iken anöploid olguların daha kötü seyrettiğini izlemişlerdir. Gajewski, Brescia ve Volm ve ark.'nın yaptıkları çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (14,37,119). Braly ve arkadaşlarının over karsinomlarının akım sitometrik değerlendirilmesini konu alan çalışmalarında akım sitometrinin bu grup hastaların prognozlarının tayini ve tedavilerinin düzenlenmesindeki önemi üzerinde durulmuştur (12). Nictolis ve ark. 44 seröz borderline over tümörlü olguda yaptıkları çalışmada stage, implantasyonların varlığı ve non-diploid olgularda prognozun daha kötü olduğunu görmüşlerdir (63).

Klemi 153 epitelyal over karsinomu olgusunda yaptığı çalışmada rezidü tümör miktarı, DNA indeksi (DI) ve SPF'nunu en önemli bağımsız değişkenler olduğunu görmüşlerdir. SPF'nu düşük olgularda yaşam süresinin daha uzun olduğunu izlemişlerdir (64).

Kolon, akciğer, meme, baş-boyun, prostat, mide, tiroid vb gibi diğer organ tümörlerinde de DNA ploidi'nin prognostik değerini araştıran çok sayıda çalışma yapılmıştır (1,53,74,78,95,109,111,112,116).

Çalışmamızın daha sonraki aşamasında immünohistokimyasal olarak saptadığımız Ki-67 ve PCNA proliferasyon indeksleri ile tümörün ploidi

durumu ve SPF arasındaki ilişkiyi araştırdık. Ancak istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulamadık.

Isola ve ark. 1990 yılında 29 over karsinomlu olgu ile yaptıkları çalışmalarında kanserli olgular ile normal over dokusundaki steroid reseptör durumunu ve Ki-67 immünreaktivitesini araştırmışlar ve bulgularını DNA akım sitometri bulguları ile karşılaştırmışlardır. Ki-67 ile pozitif boyanma oranı ile DNA akım sitometri yöntemi ile hesaplanan SPF arasında anlamlı bir birliktelik olduğunu izlemişlerdir. Aynı zamanda yüksek Ki-67 ve S faz seviyesinin ileri dönemdeki hastalarda bulunduğunu ve hasta yaşam süresi ile ilişkili olduğunu görmüşlerdir (54). Henriksen ve ark. 1994 yılında 7 normal, 11 benign, 9 borderline ve 47 malign over tümörlü olguda Ki-67 ve DNA akım sitometri'nin epitelyal over tümörlerindeki prognostik önemini araştırmışlardır. Ki-67 , SPF ve DNA ploidi durumunun hasta yaşam süresi üzerinde etkili olduğunu görmüşlerdir. Aynı zamanda yüksek Ki-67 boyanma yüzdesi ile anöploidi arasında anlamlı birliktelik olduğunu izlemişlerdir (26).

Nordstöm ve ark. 384 endometrium karsinomlu olguda yaptıkları çalışmalarında proliferasyon işaretleyicileri ve DNA akım sitometri ile saptanan SPF ile DNA ploidi durumunun prognoza etkisini ve birbirleri ile olan ilişkilerini araştırmışlardır. PCNA ve Ki-67 proliferasyon indeksi ile histopatolojik tip ve stage arasında bağlantı olmadığını ancak histopatolojik tip ile ilişkilerinin anlamlı olduğunu görmüşlerdir. Her iki immünohistokimyasal yöntemle hesaplanan proliferasyon indeksinin akım sitometri ile saptanan SPF ile de istatistiksel olarak anlamlı bir birliktelik gösterdiklerini izlemişlerdir. Aynı zamanda Ki-67 boyanma yüzdesi ve SPF ile DNA ploidi durumu arasındaki ilişkinin de istatistiksel olarak anlamlı olduğunu bulmuşlardır (84). Linden ve ark. daha önce diploid DNA içeriğine sahip oldukları bilinen kolorektal karsinom olgularında İmmünohistokimyasal olarak hesaplanan Ki-67 ve PCNA proliferasyon indeksleri ile SPF arasındaki

ilişkiyi araştırmışlardır. Bu değişkenler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir bağlantı bulamamışlardır. Ancak, DNA diploid olup akım sitometri ile yüksek SPF'nuna sahip olgularda Ki-67 boyanma yüzdesinin daha yüksek olduğunu görmüşlerdir (69). Tannapfel ve ark. renal hücreli karsinomlarda proliferasyon markerları ve ploidi durumunun prognoza etkilerini araştıran çalışmalarında Ki-67, PCNA ve AgNOR yöntemi ile saptanan nükleer pozitivite oranının tümör grade'i ile ilişkili olduğunu; Ki-67 proliferasyon indeksinin ileri dönemdeki olgularda daha yüksek bulunduğunu görmüşlerdir. Ayrıca Ki-67, PCNA ve AgNOR arasında anlamlı bir birliktelik izlemişlerdir. Ancak akım sitometri bulguları ile prognoz arasında ve diğer değişkenler arasında ilişki görmemişlerdir (107).

Günümüzde ölüm nedenleri arasında büyük bir oranı elinde bulunduran “kanser” gelişim sürecini anlama isteği ile yapılan ve yapılmakta olan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Tümör gelişimi hakkında genel kabul gören bir kavrama göre, tümörler bir genetik-somatik süreçle oluşur; yani çoğalmayı uyaran mutasyonlar hücrede birikir ve sonra bu mutasyona uğramış hücrenin klon halinde büyümesini sağlayan seleksiyon süreçleri gerçekleşir (21). Normal doku ile koordine olmayan aşırı büyüme neoplazinin temel özelliklerinden biridir. Patolojide tümörün büyüme hızının, biyolojik davranışını belirlediği düşüncesi yaygındır. Bu nedenle de tümör proliferasyonunu yansıttığı düşünülen çeşitli değişkenlerin değerlendirilmesi yönünde yoğun çaba harcanmaktadır. Bu değişkenlerin metastaz hızı, tümör tekrarlama oranı ve mortalite ile korelasyonu pek çok çalışmanın ana fikrini oluşturmaktadır. Biz çalışmamızda, jinekolojik kanserler arasında kadınlarda en sık ölüme neden olan over tümörlerinde immünohistokimyasal olarak belirlenen (Ki-67, PCNA) proliferatif aktivitenin ve akım sitometri ile belirlenen SPF ve DNA ploidi durumunun over karsinomları için prognostik önemi kabul edilmiş değişkenlerle (histolojik tip, histolojik grade, stage, yaş)

ilişkisini araştırdık. İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, düşük stage'li olgular ile yüksek stage'li olgular arasında boyanma oranı farklı idi; stage 1-2 olgularda Ki-67 için hesaplanan boyanma indeksi ortalama 7.33 iken stage 3-4 olan olgularda bu oran 17.79 olarak bulundu. PCNA immünohistokimya yönteminde ise böyle bir fark izlenmedi. Bununla birlikte, PCNA boyanma indeksinin grade 1 olgularda daha düşük (ort: 45.41) iken grade 2-3 olgularda daha yüksek (ort: 58.4) olduğu görüldü. Ancak bu farklılık da istatistiksel olarak anlamlı değildi. Daha sonra bu değişkenlerin hasta yaşam süreleri üzerine etkisini inceledik ancak istatistiksel olarak anlamlı bir sonuca ulaşamadık. Yalnızca malign ve benign epitelyal over tümörü olgularındaki Ki-67 ve PCNA boyanma indeksleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gördük. Malign epitelyal over karsinomlu olgu sayısının az olması, gruplar arasında histolojik tip, grade ve stage açısından homojen bir dağılımın sağlanamamış olması ve olgularda takip süresinin kısa olması nedeniyle bu tür çalışmaların daha geniş serilerde yapılmasının proliferatif aktivite ve DNA ploidi durumunun over karsinomlu olgularda prognoza etkisinin tahmin edilmesinde daha değerli bilgiler vereceğine inanıyoruz.

SONUÇLAR

Çalışmamıza 12 seröz ve 15 müsinöz olmak üzere 27 benign, 3 borderline müsinöz ve 37 malign epitelyal over tümörlü olgu dahil edildi. Malign olguların 15 tanesi malign seröz epitelyal (%40.6), 8 tanesi malign müsinöz epitelyal (%21.6), 10 tanesi endometrioid tip malign epitelyal(%27), 3 tanesi berrak hücreli tip malign epitelyal (%8.1), 1 tanesi malign Brenner (%2.7) tümörlü olgudan oluşmaktaydı. Çalışmamızda benign, borderline ve malign epitelyal over tümörlerinde immünohistokimyasal olarak belirlenen (Ki-67, PCNA) proliferatif aktivitesini ve akım sitometri ile belirlenen SPF ve DNA ploidi durumunu klinikopatolojik parametrelerle (histolojik tip, histolojik grade, stage ve yaş) karşılaştırdık ve over karsinomları için prognostik önemini araştırdık. Bu çalışmanın sonunda aşağıdaki bulguları elde ettik:

- 1- Malign olguların yaş aralığı 21-85 (ort. 56.9) olarak bulundu. Bu olguların 28 tanesi 50 ve üzeri yaştaydı. 3 müsinöz borderline olgunun yaş aralığı ise 27-65 olup ortalama 49 olarak izlenirken 3 olgudan 2 tanesinin 50 yaştan üzerinde olduğu görüldü. Benign olguların yaş aralığı 23-70 (ort.38.7) arasında idi. 27 benign over tümörü olgusundan yalnızca 5 tanesi 50 yaştan üzerinde bulundu. Benign ve malign over tümörlü olgular karşılaştırıldığında malign olgularda yaş ortalaması daha yüksek bulundu. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0.0001$)

- 2- FIGO sınıflamasına göre malign olguların 6 (%17.1) tanesi overlerde sınırlı olup, stage 1; 6 (%17.1)'sı pelvik yayılım gösterdiği için stage 2; 19 (%54.3) tanesinde peritoneal implantasyon, lenf düğümü tutulumu ya da omentum tutulumu bulunduğundan dolayı stage 3 ve 4 (%11.4) olgu da uzak metastaz izlendiği için stage 4 olarak değerlendirildi.
- 3- Histopatolojik olarak 12 (%34.3) olgu grade 1; 13 (%37.1) olgu grade 2 ve 10 (%28.6) olgunun grade 3 olduğu görüldü. Bu bulgulara göre over karsinomlu olgularda stage ile histopatolojik grade arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmedi ($p>0.05$).
- 4- Ki-67 ile benign over tümörlü olgulardan 1 tanesi (%3.7) dışında çekirdek boyanması izlenmedi. Malign olgularda ise 37 olgunun 29 tanesinde (%78.3) pozitiflik görüldü. Benign ve malign olgular arasında Ki-67 ile boyanma farklılığı istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.005$).
- 5- PCNA immünohistokimya yöntemi ile ise 27 benign tümör olgusundan 18 (%66.6) tanesinde pozitif çekirdek boyanması izlenirken malign olguların tamamında (%100) pozitiflik görüldü. Benign ve malign olgular arasında pozitif boyanma oranları farkı istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.005$).

- 6- Ki-67 ve PCNA boyanma indekslerinin uyumluluğu araştırıldığında, benign ve malign epitelyal over tümörü olgularında her iki yöntemle hesaplanan boyanma indeksleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu görüldü ($p=0.002$). Ancak yalnızca malign olgularda çalışıldığında anlamlı bir ilişki varlığı görölmedi.
- 7- Malign epitelyal over tümörlerinde, Ki-67 boyanma indeksi ile histolojik tip, yaş, histolojik grade ve stage arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.005$). Ancak düşük stage'li olgular ile yüksek stage'li olgular arasında boyanma yüzdesi farklı bulundu. Stage 1-2 olgularda Ki-67 için hesaplanan boyanma indeksi ortalama 7.33 iken stage 3-4 olgularda bu oran 17.79 olarak hesaplandı.
- 8- Malign epitelyal over tümörlü olgularda PCNA boyanma indeksi ile histolojik tip, yaş, histolojik grade ve stage arasındaki ilişki de istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.005$). Bununla beraber PCNA boyanma indeksinin grade 1 olgularda daha düşük (or.45.41), yüksek grade'li olgularda daha yüksek olduğunu (or. 58.4) gördük.
- 9- Malign ve bordeline epitelyal over tümörlerinde akım sitometri ile ploidi durumu araştırıldığında 3 borderline olgunun hepsinin diploid DNA paternine sahip olduğu görüldü. Malign olgularda ise en sık diploid patern

endometrioid tip over karsinomlarında izlenirken (%77.8); en sık anöploid % 33.3'lük görülme oranı ile seröz tip epitelyal over karsinomlarında idi. Ancak ploidi durumu ve histopatolojik tip arasındaki bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Ploidi durumu ile stage ve grade arasındaki ilişki de istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).

10- Akım sitometri ile hesaplanan SPF ile histolojik tip, histolojik grade ve stage arasında anlamlı bir ilişki görülmedi. ($p>0.05$).

11- Malign olgularda immünohistokimyasal olarak hesaplanan proliferasyon indeksi ile SPF arasında istatistiksel olarak anlamlı bir birliktelik görülmedi.

12- Epitelyal over tümörlerinde ploidi durumu ile PCNA ve Ki-67 ile hesaplanan proliferasyon indeksleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p>0.05$).

13- Epitelyal over tümörlerinde, immünohistokimyasal olarak belirlenen Ki-67 ve PCNA boyanma indeksleri ve akım sitometri yöntemi ile belirlenen SPF ve DNA ploidi durumunun prognostik önemi, daha geniş serilerde ve olguların uzun yıllar takibi sonucunda elde edilecek verilerle değerlendirildiğinde anlamlı sonuçlar verebilir.

ÖZET

Normal doku ile koordine olmayan aşırı büyüme, neoplazinin temel özelliklerinden biridir. Tümör popülasyonunda bulunan hücrelerden proliferatif olanlar tümörün büyüme fraksiyonunu belirler. Patolojide tümörün büyüme hızının, biyolojik davranışını belirlediği düşüncesi yaygındır. Bu nedenle de tümör proliferasyonunu yansıttığı düşünülen çeşitli değişkenlerin değerlendirilmesi yönünde yoğun çaba harcanmaktadır. Bu değişkenlerin metastaz hızı, tümör tekrarlama oranı ve mortalite ile korelasyonu pek çok çalışmanın ana fikrini oluşturmaktadır. Tümör proliferasyon fraksiyonunu ölçmek için geliştirilmiş bir çok yöntem vardır (mitoz sayısı, Timidin işaretleme indeksi, Bromodeoksiüridin işaretleme indeksi, AgNOR ve immünohistokimyasal işaretleyiciler). Bu yöntemlerden her birinin diğerine göre üstünlükleri ve yetersizlikleri bulunmaktadır.

Hücresinin davranışını belirleyen tüm genetik bilgiler DNA'da kayıtlıdır. Normalden fazla kromozom içeren anöploid tümörlerdeki genler tümöral gelişim ve metastatik modelden sorumlu olabilir. Nükleer DNA içeriği tümörlerde tanı, prognoz tahmini ve tedavi protokollerinin düzenlenmesinde yardımcı bilgiler sağlayabilir. Akım sitometri ile tümör hücrelerinin DNA içeriği incelenip tümörün ploidi durumu ve proliferatif indeksi nicel olarak saptanabilir. Ancak anöploidi yalnızca malign olgularda izlenen ve her zaman kötü prognoz göstergesi olan bir bulgu değildir.

Biz bu çalışmada, benign, borderline ve malign epitelyal over tümörlerinde prognostik öneme sahip olduğu kabul edilen yaş, histolojik tip, histolojik grade ve tümör stage'i ile daha objektif ve güvenilir olduğu

l         ve hastaların tedavi yöntemlerinin tayininde değerli prognostik bilgiler verebileceğine inandığımız, akım sitometri ile DNA içeriği ve proliferasyon işaretleyicileri (Ki-67, PCNA) arasındaki ilişkiyi araştırdık. Daha sonra her bir parametrenin hasta yaşam süreleri üzerine olan etkilerini değerlendirdik

Çalışmaya 27 benign (12 seröz ve 15 müsinöz), 3 borderline ve 37 malign (15 seröz, 8 müsinöz, 10 endometrioid, 3 berrak hücreli ve 1 Brenner tümörü) epitelyal over tümörü olgusu dahil edildi. Malign olguların yaş aralığı 21-85 (ort. 56.9) olarak bulundu. Bu olguların 28 tanesi 50 ve üzeri yaştaydı. 3 müsinöz borderline olgunun yaş aralığı ise 27-65 olup ortalama 49 olarak izlenirken 3 olgudan 2 tanesinin 50 yaşın üzerinde olduğu görüldü. Benign olguların yaş aralığı 23-70 (ort.38.7) arasında idi. 27 benign over tümörü olgusundan yalnızca 5 tanesi 50 yaşın üzerinde bulundu. Benign ve malign over tümörlü olgular karşılaştırıldığında malign olgularda yaş ortalaması daha yüksek bulundu. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0.0001$).

Olgulara ait doku örneklerine immünohistokimyasal olarak "Streptoavidin- Biotin Kompleks" yöntemi ile PCNA (PC10) ve Ki-67 (MIB-1) uygulandı. PCNA ve monoklonal Ki-67 antikorları ile boyanan olgularımızı değerlendirirken boyanan çekirdek pozitif ve boyanmayan çekirdek negatif olarak kabul edildi. Homojen ve yoğun boyanan alanlarda sayılan benign olgularda 400 ve malign olgularda 500 hücre içindeki pozitif boyanan çekirdek sayısı kaydedildi. Benign olgularda PCNA için proliferasyon indeksi 20.7 (ss:27.1) malign olgularda 53.8 (ss:26.2) olarak izlenirken; Ki-67 i in bu değerler benign olgularda 0.14 (ss:0.76) malign olgularda 14.9 (ss:12.3) olarak bulundu. Malign ve benign olgularda Ki-67 ve PCNA ile boyanma farklılığı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.0001$). Aynı zamanda benign ve malign epitelyal over tümörlü olgularda PCNA ile

Ki-67 boyanma indeksleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu görüldü ($p=0.002$). Ancak yalnızca malign olgularda çalışıldığında bu iki değişken arasındaki ilişki anlamlı bulunmadı. Daha sonra Ki-67 ve PCNA için hesaplanan proliferasyon indeksleri ile malign epitelyal over tümörlerinde histolojik grade, histolojik tip ve stage arasındaki ilişki araştırıldı. İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, düşük stage'li olgular ile yüksek stage'li olgular arasında boyanma oranı farklı idi; stage 1-2 olgularda Ki-67 için hesaplanan boyanma indeksi ortalama 7.33 iken stage 3-4 olan olgularda bu oran 17.79 olarak bulundu. PCNA immünohistokimya yönteminde ise böyle bir fark izlenmedi. Bununla birlikte, PCNA boyanma indeksinin grade 1 olgularda daha düşük (ort: 45.41) iken grade 2-3 olgularda daha yüksek (ort: 58.4) olduğu görüldü. Proliferasyon indekslerinin hasta yaşam süresi üzerine olan etkisi araştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuca ulaşılamadı.

Çalışmamızda akım sitometriyi yalnızca malign ve borderline epitelyal over tümörlü olgularda çalıştık. Çalışmaya 37 malign ve 3 borderline tümör olmak üzere 40 olgu dahil edildi. Malign epitelyal over tümörlü olgulardan 5 tanesinde hücre sayısı yeterli olmadığı için uygun histogram elde edilemedi ve bu olgular çalışma dışı bırakıldı. Çalışmaya alınan 3 borderline epitelyal over tümörü olgusunun tamamında diploid DNA paterni izlendi. 32 malign olgunun 9 tanesinde anoploidi, 2 tanesinde multiploidi, 5 tanesinde tetraploidi ve 16 tanesinde diploidi izlendi. Histopatolojik tipler arasında en fazla anoploidi durumu seröz papiller over karsinomlarında (%33.3) izlenirken diploidi paterninin en sık izlendiği grup endometrioid tip over karsinomları (%77.8) idi. Ancak ploidi paterni ile histolojik tip arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ayrıca olgularda sentez fazındaki hücrelerin yüzde oranı (SPF) hesaplandı. Malign olgularda histolojik grade ve stage ile DNA ploidi durumu arasındaki ilişki araştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmadı. Aynı zamanda bu değişkenlerle SPF arasında da anlamlı bir

ilişki varlığı gösterilemedi. Daha sonra DNA ploidi durumu ve SPF'nunun yaşlı ve daha genç hastalardaki durumu araştırıldı. 50 yaşın altındaki ve 50 ve üzeri yaştaki kadınlarda ploidi paterni ve SPF arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). DNA ploidi durumu ve SPF ile hasta yaşam süreleri arasındaki ilişki araştırıldığında da anlamlı bir sonuç bulunamadı.

Sonuçta, epitelyal over tümörlerinde, immünohistokimyasal olarak belirlenen Ki-67 ve PCNA boyanma indeksleri ve akım sitometri yöntemi ile belirlenen SPF ve DNA ploidi durumunun prognostik önemi, daha geniş serilerde ve olguların uzun yıllar takibi sonucunda elde edilecek verilerle değerlendirildiğinde daha anlamlı sonuçlar verebilir.

KAYNAKLAR

1. Akbulut H, Dinçol D, Aydınтуğ O, İçli F, Karaoğuz H, Demirkazık A, Çay F, Aydın F. "The prognostic significance of flow cytometric cellular DNA content determination in patients with colorectal carcinoma". Turkish Journal of Cancer 1998;28(2):51-57.
2. Atkin SL, Green BSc, Hipkin L, Landolt AM, Foy PM, Jaffreys RV, White MC." A comparison of proliferation indices in human anterior pituitary adenomas formalin-fixed tissue and in vitro cell culture". J Neurosurg 1997;87: 85-88.
3. Averette HE, Donato DM. "Ovarian carcinoma: Advances in diagnosis, staging, and treatment". Cancer 1990;65:703-708.
4. Baisch H, Gerdes J. "Simultaneous staining of exponentially growing versus plateau phase cells with the proliferation-associated antibody Ki-67 and Propidium iodide: analysis by flow cytometry". Cell Tissue Kinet. 1987; 20: 387-391.
5. Barlogie B, Raber MN, Schumann J, Johnson TS, Drewinko B, Swartzendruber DE, Göhde W, Andreeff M, Freireich EJ. "Flow cytometry in clinical cancer research". Cancer Research 1983; 43:3982-3997.
6. Barnabei VM, Miller DS, Bauer KD, Murad TM, Rademaker AW, Lurain JR. "Flow cytometric evaluation of epithelial ovarian cancer". Am J Obstet Gynecol 1990;162:1584-1592.
7. Bast RC, Boyer CM, Xu FJ, Wiener J, Dabel R, Woolas R, Jacobs I, Berchuck A. "Molecular approaches to prevention and detection of epithelial ovarian cancer". J Cell Biochem, supp. 1995;23:219-222.

3. Berchuck A. 'Biomarkers in the ovary' J Cell Biochem, supp 1995; 23:223-226.
9. Blumenfeld D, Braly PS, Ben-Ezra J, Klevecz RR. 'Tumor DNA content as a prognostic feature in advanced epithelial ovarian carcinoma'. Gynecol Oncol 1987;27: 389-398.
10. Bonkhoff H, Fixemer T, Hunsicker I, Remberger K. 'Simultaneous detection of DNA fragmentation (apoptosis) , cell proliferation (MIB-1), and phenotype markers in routinely processed tissue sections'. Virchows Arch 1999; 434:71-73.
11. Borresen AL. 'Oncogenesis in ovarian cancer'. Acta Obstet Gynecol Scand 1992;71 suppl 155:67-74.
12. Braly PS, Klevecz RR. 'Flow cytometric evaluation of ovarian cancer'. Cancer 1993;71:1621-1628.
13. Bravo R, Frank R, Blundell PA 'Cyclin/PCNA is the auxilliary protein of DNA polymerase delta'. Nature 1987;326;515-517.
14. Brescia RJ, Barakat RA, Beller U, Frederickson G, Suhrland MJ, Dubin N, Demopoulos RI 'The prognostic significance of nuclear DNA content in malignant epithelial tumors of the ovary'. Cancer 1990;65:141-147.
15. Brown DC, Gatter KC. 'Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology'. Histopathol 1990;17: 489-503.
16. Burger PC, Shibata T, Kleihues P. "The use of the monoclonal antibody Ki-67 in the identification of proliferating cells: Application to surgical neuropathology." American Journal Surg. Pathol. 1986 10(9): 611-617.
17. Carter J, Fowler J, Carlsen J, Carson L, Twiggs LB 'Borderline and invasive epithelial ovarian tumors in young women'. Obstet Gynecol 1993;82:752-756.

18. Cohen C. 'Image cytometric analysis in pathology'. Hum Pathol 1996;27:482-493.
19. Cohen MB, Waldman FM, Carroll PR, Kerschmann R, Chew K, Mayall BH. 'Comparison of five histopathologic methods to assess cellular proliferation in transitional cell carcinoma of urinary bladder'. Hum Pathol 1993;24:772-78.
20. Coon JS, Landay AL, Weinstein RS. 'Biology of disease: Advances in Flow cytometry for diafnostic pathology'. Lab Invest 1987;57(5): 453-479.
21. Cornelisse CJ, Bonsing BA, Abeln EA, Koopman L, Corver WE. 'Potentialities of multiparameter flow cytometry for studying phenotypic and genetic tumour cell heterogeneity'. Flow cytometry symposium in 17th European congress of pathology in Barcelona 1999.
22. Cotran RS, Kumar V, Collins T 'Neoplasia". In: Robins pathologic basis of disease 6th Ed. W.B.Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania 1999; 260-328.
23. Crum CP. 'The female genital tract". In: Cotran RS, Kumar V, Collins T: Robins pathologic basis of disease. 6th Ed W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania 1999;1035-1092.
24. Cunningham JM, Kimmel DW, Scheithauer BW, O'flon JR, Novotny PJ, Jenkins RB, 'Analysis of proliferation markers and p53 expression in gliomas of astrocytic origin: relationships and prognostic value". J Neurosurg 1997;86: 121-130.
25. Dervan PA, Magee HM, Carney DN. 'Proliferating cell nuclear antigen counts in formalin-fixed paraffin-embedded tissue correlate with Ki-67 in fresh tissue". Am J Clin Pathol 1992; 97(suppl 1):S21-S28.

6. Duska LR, Chang C, Flynn S, Chen A, Goodman A, Fuller A, Nikrui N. 'Epithelial ovarian carcinoma in the reproductive age group'. *Cancer* 1999;85:2523-2629
17. Ebina M, Steinberg SM, Mulshine JL, Linnoila RI. Relationship of p53 overexpression and up-regulation of proliferating cell nuclear antigen with the clinical course of non-small cell lung cancer *Cancer Research* 1994; 54:2496-2503.
28. Erba E, Ubezio P, Pepe S, Vaghi S, Marsoni S, Torri W, Mangioni C, Landoni F, D'Incalci M. 'Flow cytometric analysis of DNA content in human ovarian cancers'. *Br J Cancer* 1989;60:45-50.
29. Erba E, Vaghi M, Pepe S, Amato G, Bistolfi M, Ubezio P, Mangioni C, Landoni F, Morasca L. 'DNA index of ovarian carcinomas from 56 atients: in vivo in vitro studies' *Br J Cancer* 1985;52: 565-573.
30. Erhardt K, Auer G, Björkholm E, Forsslund G, Moberger B, Silfversward C, Wicksell G, Zetterberg A. 'Prognostic significance of nuclear DNA content in serous ovarian tumors'. *Cancer Research* 1984; 44:2198-2202.
31. Esposito V, Baldi A, Luca Ad, Micheli P, Mazzarella G, Baldi F, Caputi M, Giordano A. 'Prognostic value of p53 in non-small cell lung cancer: relationship with proliferating cell nuclear antigen and cigarette smoking'. *Hum Pathol* 1997;28:133-137.
32. Fontanini G, Macchiarini P, Pepe S, Ruggiero A, Hardin M, Bigini D, Vignati S, Pingitore R, Angeletti A. 'The expression of proliferating cell nuclear antigen in paraffin sections of peripheral, node-negative non-small cell lung cancer'. *Cancer* 1992;70:1520-1527.
33. Friedlander ML, Hedly DW, Swanson C, Russell P. 'Prediction of long-term survival by flow cytometric analysis of cellular DNA content in patients with advenced ovarian cancer'. *J Clin Oncol* 1988;6: 282-290.

34. Friedlander ML, Hedly DW, Taylor IW, Russell P, Coates AS, Tattersall MHN. 'Influence of cellular DNA content on survival in advanced ovarian cancer'. *Cancer Research* 1984; 44:397-400.
35. Friedlander ML, Taylor IW, Russell P, Musgrove EA, Hedly DH, Tattersall MHN. 'Ploidy as a prognostic factor in ovarian cancer'. *Int J Gynecol pathol* 1983; 2:55-63.
36. Friedlander ML, Taylor IW, Russell P, Tattersall MHN. 'Cellular DNA content-a stable feature in epithelial ovarian cancer'. *Br J Cancer* 1984;49:173-179.
37. Gajewski WH, Fuller AF, Pastel-Ley C, Flotte TJ, Bell DA. 'Prognostic significance of DNA content in epithelial ovarian cancer'. *Gynecol Oncol* 1994;53:5-12.
38. Garcia RL, Coltrera MD, Gown AM. 'Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues'. *Am J Pathol* 1989;134: 733-739.
39. Gargano G, Catino A, Correale M, Lorusso V, Abbate I, Izzi G, Cramarossa A, Picciariello M, Paradiso A, De Leonardis A. 'Prognostic factors in epithelial ovarian cancer'. *Gynaecol Oncol* 1992; 31 (1suppl):45-55.
40. Gerdes J, lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. 'Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by monoclonal antibody Ki-67'. *The J Immunol*.1984, 133(4); 1710-15.
41. Ghazizadeh M, Sasaki Y, Araki T, Konishi H, Aihara K. 'Prognostic value of proliferative activity of ovarian carcinoma as revealed by PCNA and AgNor Analyses'. *Am J Clin Pathol* 1997;107:451-458.
42. Godwin AK, Testa JR, Hamilton TC. 'The biology of ovarian cancer development'. *Cancer* 1993;71:530-536.

43. Guerrieri C, Högberg T, Wingren S, Fristedt S, Simonsen E, Boeryd B. 'Mucinous borderline and malignant tumors of ovary: A clinicopathologic and DNA ploidy study of 92 Cases". *Cancer* 1994;74:2329-1340
44. Haerslev T, Jacobsen GK. 'An immunohistochemical study of P53 with correlations to histopathological parameters, c-erbB-2, proliferating cell nuclear antigen, and prognosis". *Hum Pathol* 1995;26: 195-301.
45. Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC-W, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Camplejohn R, Dover R, Waseem NH, Lane P. 'Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms". *J Pathol* 1990; 162:285-294
46. Hall PA, Levison DA. Review: Assessment of cell proliferation in histological material *J Clin Pathol*. 1990, 43(3); 184-92.
47. Hartmann LC, Sebo TJ, Kamel NA, Podratz KC, Cha SS, Wieand HS, Keeney GL, Roche PC. 'Proliferating cell nuclear antigen in epithelial ovarian cancer: relation to results at second-look laparotomy and survival". *Gynecol-Oncol* 1992; 47(2):191-195.
48. Hastürk Serap 'Akım sitometri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerindeki prognostik önemi". *The Turkish J of Pathol* 1996; 12-2: 64-68.
49. Hedley DW. 'Flow cytometry using paraffin-embedded tissue: Five years on". *Cytometry* 1989;10:229-241.
50. Hedly DW. 'DNA analysis from paraffin-embedded blocks".

51. Henriksen R, Strang P, Wilander E, Bacckstrom T, Tribukait B, Öberg K. 'Ki-67 immunostaining and DNA flow cytometry as prognostic factors in epithelial ovarian cancers'. *Anticancer Research* 1994; 14: 603-608.
52. Henriksen R, Strang P, Wilander E, Bacckstrom T, Tribukait B, Öberg K. p53 expression in epithelial ovarian neoplasms: Relationship to clinical and pathological parameters, Ki-67 expression and flow cytometry". *Gynecol Oncol* 1994; 53: 301-306.
53. Isobe H, Miyamoto H, Shimizu T, Haneda H, Hashimoto M, Inoue K, Mizuno S, Kawakami Y. 'Prognostic and Therapeutic significance of the flow cytometric nuclear DNA content in Non-small cell lung cancer". *Cancer* 1990;65:1391-1395.
54. Isola J, Kallioniemi OP, Korte JM, Wahlström T, Aine R, Helle M, Helin H. 'Steroid receptors and Ki-67 reactivity in ovarian cancer and in normal ovary: Corelation with DNA flow cytometry, biochemical receptor assay, and patient survival". *J Pathol* 1990;162:295-301.
55. Iversan OE, Skaarland E. 'Ploidy assessment of benign and malignant ovarian tumors by flow cytometry". *Cancer* 1987;60:82-87.
56. Iversan OE. 'Prognostic value of the flow cytometric DNA index in human ovarian carcinoma" *Cancer* 1988;61:971-975.
57. Jordan PA, Kerns BM, Pence JC, Kohler MF, Bast RC, Kinney RB, Berchuck A. 'Determination of proliferation index in advanced ovarian cancer using quantitative image analysis". *Am J Clin Pathol* 1993;99:736-740.
58. Jussila T, Stenback F. "Cell proliferation markers and growth factors in ovarian cancer" *Ann Med* 1995 (27) 87-94.

59. Kallioniemi OP, Punnonen R, Mattila J, Lehtinen M, Koivula T 'Prognostic significance of DNA index, multiploidy, and S-phase fraction in ovarian cancer". *Cancer* 1988;61:334-339.
60. Kawai T, Suzuki M, Kono S, Shinomiya N, Rokutanda M, Takagi K, Ogata T, Tamai S. 'Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in lung carcinoma". *Cancer* 1994;74:2468-2475.
61. Kerns BJO, Jordan PA, Faerman LL, Berchuck A, Bast RC, Layfield LJ 'Determination of proliferation index with MIB-1 in advanced ovarian cancer using quantitative image analysis". *Am J Clin Pathol* 1994; 101: 192-197.
62. Khalifa MA, Lacher DA, Lage JM, Mannel RS, Walker JL, Angros LH, Min KW. 'Immunohistochemical assessment of proliferation markers and altered gene expression in archival specimens of ovarian epithelial tumors". *Cancer Detect Prev* 1997; 21(6):532-539.
63. Kitamoto M, Nakanishi T, Kira S, Kawaguchi M, Nakashio R, Suemoru S, Kajiyama G, Asahara T, Dohi K. 'The assesment of proliferating cell nuclear antigen immunohistochemical staining in small hepatocellular carcinoma and its relationship to histologic characteristics and prognosis". *Cancer* 1993;72:1859-65.
64. Klemi PJ, Joensuu H, Maenpaa J, Kiilholma P. 'Influence of cellular DNA content on survival in ovarian carcinoma". *Obstet Gynecol* 1989;74: 200-204.
65. Korkolopoulou P, Oates J, Crocker J, Edwards C. "p53 expression in oat and non-oat small cell lung carcinomas: correlations with proliferating cell nuclear antigen". *J Clin Pathol* 1993;46:1093-96.
66. Kubota Y, Petras RE, Easley KA, Bauer TW, Tubbs RR, Fazio VW. 'Ki-67 determined growth fraction versus standard staging and grading parameters in colorectal carcinoma". *Cancer* 1992;70:2602-2609

57. Kuwata T, Kitagawa M, Takemura T, Hirokawa K 'Proliferative activity and p53 over-expression of ovarian epithelial tumors". Gen Diagn Pathol 1995; 141(2):131-139.
58. Lam KY, Law SYK, So MKP, Fok M, Ma LT, Wong J. 'Prognostik implication of proliferative markers MIB-1 and PC10 in Esophageal squamous cell carscinoma". Cancer 1996;77:7-13.
69. Liden MD, Ma CK, Kubus J, Brown RD, Zarbo RJ. 'Ki-67 and Proliferating cell nuclear antigen tumor proliferative indices in DNA diploid colorectal adenocarcinoma". Am J Clin Pathol 1993; 100:206-212.
70. Linden MD. 'Clinical application of morphologic and immuno-cytochemical assessments of cell proliferation". Am J Clin Pathol 1992;97 (5):4-13.
71. Louis DN, Edgerton S, Thor AD, Hedly-Whyte ET, 'Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 Immunohistochemistry in brain tumors: a comperative study". Neuropathol 1991;81:675-679.
72. Marx D, Meden H, Brune T, Kron M, Korabiowska M, Kuhn W, Schuber A. 'Mib-1 evaluated proliferative activity in ovarian cancer with respect to prognostic significance". Anticancer Reseach 1997;17:775-780.
73. Mayer A, Takimoto M, Fritz E, Schellander G, Kofler K, Ludwig H 'The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and mdr gene expression in colorectal cancer". Cancer 1993;71:2454-1460.
74. Mcdivit RW, Stone KR, Craig B, Palmer JO, Meyer JS, Bauer WC. 'A proposed classification of breast cancer based on kinetic information". Cancer 1986;57:269-276.

75. Merkel DE, McGuire WL. 'Ploidy, proliferative activity and prognosis'. *Cancer* 1990;65:1194-1205.
76. Minguillon C, Schonborn I, Reles A, Bartel U, Lichtenegger W. 'EGF-R and PCNA expression in ovarian carcinomas: Correlation with classic prognostic factors'. *Gen Diagn Pathol* 1996; 141(3-4):197-201
77. Morimura Y, Hoshi K, Hang XL, Takano Y, Ohishi M, Honda T, Yamada Y, Sato A. 'Evaluation with MIB-1 antibody of proliferative activity in ovarian clear cell adenoma' *Int J Gynecol Pathol* 1996;15:315-319.
78. Morkve O, Halvorsen OJ, Skjaerven R, Stangeland L, Gulsvik A, Laerum OD. 'Prognostic significance of p53 protein expression and DNA ploidy in surgically treated non-small cell lung carcinoma'. *Anticancer Research* 1993;13:571-578.
79. Nakamura S, Akazawa K, Yao T, Tsuneyoshi M. 'Primary gastric lymphoma: A clinicopathologic study of 233 cases with special reference to evaluation with the MIB-1 index'. *Cancer* 1995;76:1313-1324.
80. Nakano T, Enoki K, Nakashima M, Ishikawa H, Ametani Y, Ohta S, Ahkuchi A, Satake S, Kojima Y, Funamoto H, Tateno M, Miwa A. 'Survival in patients with clear cell carcinoma of ovary' *Gan To Kagakuryoho* 1998;25(1):67-73
81. Nakano T, Oka K. 'Differential values of Ki-67 indeks and mitotic indeks of proliferating cell population'. *Cancer* 1993;72:2401-2408.
82. Nakopoulo L, Janinis J, Panagos G, Comin G, Davaris P. 'The immunohistochemical expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA/ cyclin) in malignant and benign epithelial ovarian neoplasms and correlation with prognosis'. *Eur J Cancer* 1993; 29A(11):1599-1601.

83. Nictolis M, Montironi R, Tommasoni S, Carinelli S, Ojeda B, Matias-Guiu X, Prat J. 'Serous borderline tumors of the ovary'. *Cancer* 1992;70:152-160
84. Nordström B, Srang P, Bergström R, Nilsson S, Tribukait B. 'A comparison of proliferation markers and their prognostic value for woman with endometrial carcinoma'. *Cancer* 1996; 78:1942-51.
85. Onda K, Davis RL, Shibuya M, Wilson CB, Hoshino T. 'Correlation between the bromodeoxyuridine labeling index and MIB-1 and Ki-67 proliferating cell indices in cerebral gliomas'. *Cancer* 1994;74:1921-1926.
86. Orfao A, Ciudad J, Lopea A. 'Clinical impact of flow cytometric DNA analysis of solid tumors'. *Flow Cytometry Symposium in 17th European Congress of Pathology in Barcelona, 1999*.
87. Ottavio L, Chang CD, Rizzo MG, Travali S, Casadevall C, Baserga R. 'Importance of introns in the growth regulation of mRNA levels of the proliferating cell nuclear antigen gene'. *Mol Cell Biol* 1990 Jan;10(1):303-309.
88. Perlich G, Tan CK, Kostura M, Mathews MB, So AG, Downey KM, Stillman B. 'Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase delta auxiliary protein'. *Nature* 1987;326:517-520.
89. Pich A, Margaria E, Chiusa L, Ponti R, Geuna M. 'DNA ploidy and p53 expression correlate with survival and cell proliferative activity in male breast carcinoma'. *Hum Pathol* 1996; 27:676-682.
90. Quinn CM, Wright NA. 'The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: Evaluation of methods and applications as prognostic variables'. *J Pathol* 1990;160:93-102.

91. Resnik E, Trujillon YP, Taxy JB. 'Long term survival and DNA ploidy in advanced epithelial ovarian cancer". J Surg Oncol 1997;64(4): 299-303.
92. Robbins BA, Ogata DVK, Tan EM, Nakamura RM. 'Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignencies". Arc Pathol Lab Med 1987;11:841-845.
93. Rosa JC, Mendes R, Filipe MI, Morris W. 'Measurement of cell proliferation in gastric carcinoma: comperative analysis of Ki-67 and proliferative cell nuclear antigen (PCNA)". Histochem J 1992;24:93-101.
94. Rutgers DH, Wils IR, Schaap AHP, Van Lindert ACM. 'DNA flow cytometry, histological grade, stage, and age as prognostic factors in human epithelial ovarian carcinomas". Path. Res. Pract. 1987; 182:207-213.
95. Sahin AA, Ro JY, El-Naggar AK, Lee JS, Ayala AG, Teague K, Hong K. 'Flow cytometric analysis of the DNA content of non-small cell lung cancer". Cancer 1990;65:530-537.
96. Schueler JA, Cornelisse CJ, Hermans J, Trimpos JB, Van der Burg MEL, Fleuren GJ. 'Prognostic factors in well-differentiated early-stage epithelial ovarian cancer". Cancer 1993;71:787-795.
97. Schwartz PE, Chambers JT, Taylor KT. 'Early detection and screening for ovarian cancer". J Cell Biochem,supp.1995; 23:233-237.
98. Scully RE. 'Pathology of ovarian cancer precursors". J Cell Biochem, supp.1995; 23:208-218.
99. Serdaroğlu E, Atlihan F, Ortaç R. 'Proliferating cell nuclear antigen and its prognostic significance in childhood Hodgkin's disease:preliminary study". Turkish Journal of Cancer 1998;28(2):59-67.

100. Serov SF, Scully RE. "Histological Typing of Ovarian Tumours. In": Serov SF: International Histological Classification of Tumours. No:9. WHO, Geneva 1973;17-21.
101. Shurbaji MS, Brook SK, Thurmond TS. 'Proliferating cell nuclear antigen immunoreactivity in cervical intraepithelial neoplasia and benign cervical epithelium'. Am J Pathol 1993;100:22-26.
102. Siitonen SM, Kallioniemi OP, Isola JJ. 'Proliferating cell nuclear antigen immun-histochemistry using monoclonal antibody 19A2 and new antigen retrieval technique has prognostic impact in archival paraffin-embedded node negative breast cancer" Am J Pathol 1993;142: 1081-1089.
103. Söylemezoglu F, Ayhan A. 'Tümör prognozunda hücre proliferasyonunun morfolojik ve immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi". Ank Patol. Bülten 1995; 12(2):66-69.
104. Spano JP, LucchiE, Sezeur A, Lhomme C. 'Epithelial ovarian cancers". Bull Cancer 1998;Suppl 2:5-23.
105. Swenerton KD, Hislop TG, Spinelli J, LeRiche JC, Yang N, Boyes DA. 'Ovarian carcinoma: a multivariate analysis of prognostic factor". Obstet Gynecol 1985; 65(2):264-270.
106. Swenerton KD. 'Prognostic indices in ovarian cancer". Acta Obstet Gynecol Scand 1992;71 suppl 155:67-74.
107. Tannapfel A, Hahn HA, Katalinic A, Fietkau RJ, Kühn R, Wittekind CW. 'Prognostic value of ploidy and proliferation markers in renal cell carcinoma". Cancer 1996(77); 164-171.
108. Thomas H, Nasim MM, Sarraf CE, Alison MR, Love S, Lambert HE, Price P. 'Proliferating cell nuclear antigen immunostaining: A prognostic factor in ovarian cancer" Br J Cancer 1995;71(2): 357-362

109. Thorud E, Fossa SD, Vaage S, Kaalhus O, Knudsen OS, Bormer O, Shoaib MC. 'Primary breast cancer : Flow cytometric DNA patern in relation to clinical and histologic characteristics". *Cancer* 1986;57: 808-811.
110. Tortolero-Luna G, Mitchell MF. 'The epidemiology of ovarian cancer". *J Cell Biochem Suppl* 1995;23:200-207.
111. Trindelli-Danesi D, Teodori L, Mauro F, Modini C, Botti C, Cicconetti F, Stipa S, 'Prognostic significance of flow cytometry in lung cancer". *Cancer* 1987;60:844-851.
112. Trope C and Makar A. 'Unsettled question regarding ovarian cancer". *Acta Obstet Gynecol Scand* 1992;71 suppl 155:7-18.
113. Trope C, Kaern J. 'Editorial: DNA ploidy in epithelial ovarian cancer:A new independent prognostic factor". *Gynecol Oncol* 1994;53:1-4.
114. Trope C, Kaern J. 'DNA flow cytometry as a new prognosric factor in ovarian malignancies". *Acta Obstet Gynecol Scand* 1992;71 suppl 155:95-97.
115. Ueda T, Aozasa K, Tsujimoto M, Ohsawa M, Uchida A, Aoki Y, Ono K, Matsumoto K. 'Prognostic significance of Ki-67 reactivity in soft tissue sarcomas". *Cancer* 1989;63:1607-1611.
116. Van Bodegom PC, Baak JPA, Galen CS, Schipper NW, Wisse-Brekelmans ECM, VanDerschueren RGJRA, Wagenaar SSC. 'The percentage of aneuploid cells is significantly correlated with survival in accurately staged patients with stage 1 resected squamous cell lung cancer and long-term follow up". *Cancer* 1989;63:143-147.
117. Verheijen R, Kuijpers HJH, Schlingemann RO, Boehmer ALM, Dril R, Brakenhoff GJ, Ramaekers FCS. "Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen". *J Cell Science* 1989, 92: 123-130.

118. Viale G, Maisonneuve P, Bonoldi E, Bacco A, Bevilacqua P, Panizzoni GA, Radaelli U, Gasparini G. "The combined evaluation of p53 accumulation and of Ki-67 (MIB-1) labelling index provides independent information on overall survival of ovarian carcinoma patients". *Ann Oncol* 1997;8(5):469-476.
119. Volm M, Brüggemann A, Günter M, Kleine W, Pfeiderer A, Vogtschaden M. "Prognostic relevance of ploidy, proliferation and resistance-predictive tests in ovarian carcinoma". *Cancer Research*; 45: 5180-5185.
120. Werner M. "Advances in standardization of immunohistochemistry". *Rev Esp Pathol* 1999; 32(3):355-361.
121. Yang HB, Hsu P, Chan SH, Lee JC, Shin JS, Chow NH. "Growth kinetics of colorectal adenoma-carcinoma sequence: An immunohistochemical study of proliferating cell nuclear antigen expression". *Hum Pathol* 1996;27(10): 1071-1076.
122. Young BH, Clement PB, Scully E. "The Ovary". In: Sternberg SS: *Diagnostic Surgical Pathology*. 3rd Ed. Lippincott Williams, Wilkins, Philadelphia: 1999;2307-2394.

ARMENIZ (P. 118)
M. 118