



**T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

Kadın Hastalıklar ve Doğum Ana Bilim Dalı

**EVRE 1A EPİTELYAL OVER KANSERLERİNDE
P16 ve P53
EKSPRESYONLARININ PROGNOZA ETKİSİ**

**Uzmanlık Tezi
Dr. Emre Günakan**

ANKARA, 2013



**T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

Kadın Hastalıklar ve Doğum Ana Bilim Dalı

**EVRE 1A EPİTELYAL OVER KANSERLERİNDE
P16 ve P53
EKSPRESYONLARININ PROGNOZA ETKİSİ**

**Uzmanlık Tezi
Dr. Emre GÜNAKAN**

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Ali AYHAN

ANKARA, 2013

TEŞEKKÜR

Uzmanlık tezimde bana yol gösteren, uzmanlık eğitimimde büyük katkıları olan, bana hekimlik ve hayat adına öğrettiklerinden dolayı, öğrenciliğimden bu yana hayranlık ve saygı duyduğum sayın hocam Prof.Dr.Ali Ayhan'a,

Bizlerin her zaman yanında olan sevgi ve emeklerini esirgemeyen sayın bölüm başkanımız Prof. Dr. Esra Kuşçu'ya,

Ayrıca eğitimimdeki katkılarından dolayı sayın hocalarım Prof.Dr.Hulusi B.Zeyneloğlu, Prof.Dr.Filiz Yanık , Doç.Dr.GöğşenÖnalın ve Doç.Dr.Polat Dursun'a,

Tez sürecinde bana yardımlarını esirgemeyen Doç.Dr.Nihan Haberal Reyhan'a,

Berber çalıştığım asistan arkadaşlarıma,

Bölümde çalışan tüm mesai arkadaşlarıma,

Doktorluk hayatımın bu zorlu devresinde yanımda olan dayım ve yengeme,

30 yıldır hep yanımda ve destekçim olan Annem, Babam ve Ablam'a,

Ve bu engebeli yolda elimi hiç bırakmayan ve yolumu aydınlatan hayatımın ışığı eşim Gülnur'a en içten teşekkürlerimi sunarım...

Dr.Emre Günakan

ÖZET

Epitelyal over kanseri (EOK) gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde halen jinekolojik kanserler içinde en öldürücü olanıdır. Ancak erken evrede prognoz daha iyi olup 5 yıllık sağ kalım %90'ın üzerindedir. Bilindiği gibi özellikle ileri evrelerde bazı proteinlerin (örn: p53, p16) prognostik olduğu gösterilmiştir.

Bu bilgiler ışığında çalışmada evre 1a epitelyal over kanseri olan 29 olguda p16 ve p53 ekspresyonlarının prognostik öneminin konvansiyonel prognostik parametrelerle karşılaştırılması planlandı.

Parafin bloklarda uygun örnekler alınarak p16 ve p53 immunhistokimya boyaması yapıldı. Konvansiyonel parametreler olarak yaş, grade ve histolojik tip ele alınarak p16 ve p53 sonuçlarıyla karşılaştırıldı.

Yapılan univaryan ve multivaryan analizler sonucunda p53 ve p16 ekspresyonunun grade ile birlikte arttığı gözlenmiş, ancak vaka sayısının limitli olması nedeniyle diğer konvansiyonel parametrelerle birlikte prognostik olduğu gösterilememiştir. Uniform gruplarda daha geniş vaka serileri literatüre katkıda bulunabilir.

Anahtar Kelimeler: Epitelyal Over Kanseri, Erken Evre, Prognoz, p16, p53

ABSTRACT

Expressions P16 and P53 Phase 1a Prognostic Effect of Epithelial Ovarian Cancers

Epithelial ovarian cancer(EOC) is the most lethal gynecological cancer in developed and developing countries. Whereas at early stages prognosis is better and 5-year overall survival is higher than %90. It is shown that some proteins(eg. P53,p16) are prognostic especially at advanced stages.

Based on this information in this study comparison of p16 and p53 expression's prognostic importance with other conventional parameters in stage Ia 29 EOC cases is planned.

Appropriate examples in paraffin blocks were treated with p16 and p53 immunohistochemical staining. Age, grade and histologic type are the conventional parameters and compared with the p53 and p16 results.

Univariate and multivariate analysis indicated that p16 and p53 expression increased with grade but, due to the limited number of cases, p16 and p53 expression and other conventional parameters haven't been determined as prognostic. Larger case series in uniform patient groups may contribute to the literature.

Key words: Epithelial Ovarian Cancer, Early Stage, Prognosis, p16, p53

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER VE TABLOLAR	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Erken Evre Epitelyal Over Kanserlerinde Prognostik Parametreler	2
2.2. Erken Evre Over Tümörlerinde Cerrahi	3
2.3 Hücre Siklusu ve Epitelyal Over Kanseri.....	5
2.4 P16.....	7
2.5 P53.....	8
3. GEREÇ VE YÖNTEM	10
3.1. Olguların genel özellikleri	10
3.2. İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi ve Değerlendirilmesi.....	11
3.2.1. İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi	11
3.2.2. P16 değerlendirilmesi	11
3.2.3. P53 Değerlendirilmesi	12
3.3. İstatistiksel Değerlendirme	13
4. BULGULAR	14
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	19
KAYNAKLAR	22

KISALTMALAR

EOK	Epitelyal Over Kanseri
BRCA	Breast Cancer
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics
VATS	Video Assisted Thoracoscopic Surgery
SBK	Siklin Bağımlı Kinaz
G	Grade
DFS	disease free survival (hastalıksız sağ kalım)
OAS	overall survival (toplam sağkalım)
Rb	retinoblastom
GOG	Gynecology Oncology Group

ŞEKİLLER VE TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Erken Evre Over Kanserlerinde Prognostik Faktörler	3
Tablo 2.2. Erken Evre Ovaryan Malignitelerde Cerrahi Evreleme Prosedürü	4
Şekil 1. Hücre Siklusu Kontrol Noktaları	7
Şekil 2. P53 ve P16'nın Genom Bütünlüğünü Korumadaki Rolü	8
Tablo 3.1. Hastaların genel özellikleri	10
Şekil 3. P16 dışı vurum paternleri.....	12
Şekil 4. P53 dışı vurum paternleri.....	13
Tablo 4.1. Gruplara göre p53 ve p16 boyanma paternleri.....	14
Tablo 4.2. Histolojiye göre p53 ve p16 boyanma paternleri	14
Tablo 4.3. Tümör grade'ine göre p53 ve p16 boyanma paternleri	15
Tablo 4.4. Prognostik faktörlerin OAS ve DFS'a etkisi.....	16
Tablo 4.5. P53 ve p16 boyanma durumunun OAS ve DFS'a etkisi	17
Tablo 4.6. Histolojik tiplere göre P53 ve p16 boyanma durumunun OAS ve DFS'a etkisi	18

1. GİRİŞ VE AMAÇ

EOK'nin %30-40'ı erken evrede tanı almaktadır. Özellikle evre 1a ve 1b olan olgularda 5 yıllık sağ kalımın %90'ın üzerindedir.

Literatürde erken evre EOK'da prognozla ilgili çalışmalar genellikle evre 1 ve 2 olguları içermektedir. Bu çalışmalarda prognozda hastalığın cerrahi durumu, evresi, derecesi, histolojik tipi, biyolojik markerlar etkili bulunmuştur.

İnsan tümörlerinin yaklaşık %50'sinde p53 mutasyonu vardır. Yapılan çok sayıda çalışmada EOK'inde yüksek oranlarda p53 gen mutasyonu bulunmuştur (22,30,33). Son yıllarda bazı çalışmalarda over seröz adenokarsinomlarında p16 geninde mutasyonlar veya promotor metilasyonu saptanmıştır (27).

Bu çalışmada erken evre EOK'da p53 ve p16 ekspresyonlarının prognoza etkisi ve konvansiyonel parametrelerle prognostik öneminin araştırılması planlandı. Hasta grubunun uniform olması için evre 1a olan olgular değerlendirildi. Tekli ve çoklu değişkenlerle analizler yapılarak değişkenlerin hastalıksız sağ kalım ve toplam sağ kalıma etkisi değerlendirilmesi planlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Erken Evre Epitelyal Over Kanserlerinde Prognostik Parametreler

Erken evre EOK prognozu ileri evreye göre belirgin olarak daha iyidir. 5 yıllık yaşam beklentisi %80-90 civarındadır.

Prognozu belirleyen temel faktör cerrahidir. Subklinik metastazların ekartasyonu ve tam evreleme için önerilen, cerrahinin kapsamlı şelikde yapılmasıdır(8). Cerrahi sonuçları direkt olarak ek tedavi planlamasında etkili olmasının yanında tek başına küratif de olabilir. Suboptimal cerrahi ve evreleme daha yüksek rekürrens ile ilişkilidir(85).

Hastalığın evresi prognoz u belirleyen en önemli faktördür. Evre Ia/Ib olguların prognozu evre Ic ve II'ye oranla daha iyidir. (50)

Histolojik tip diğer bir önemli prognostik faktördür. Endometrioid tip daha erken yakalanma ile ilişkili olarak daha iyi prognoza sahiptir(40). Şeffaf hücreli histoloji diğerlerinden ayrı değerlendirilir ve evreler içinde kötü prognostik kabul edilir(32). Non-clear histolojinin iyi prognostik olduğu(8), tüm histolojilerin ayrı prognostik öneme sahip olduğu(müsimöz ve şeffaf hücrelide daha kötü) çalışmalar mevcuttur(10) ancak bu çalışmalarda hastaların çoğu ileri evrededir. Erken evre hastalıkta seröz histolojinin daha kötü prognozla ilişkili olduğu(78) , histolojinin rekürrensiz ve toplam sağ kalımı etki etmediği(50) çalışmalar da mevcuttur.

Tümörün diferansiasyon derecesi arttıkça prognoz kötüleşir. Tümör grade'i erken evre EOK'de prognozda etkili diğer bir faktördür(8,9,21,39,50).

Hem erken hem ileri evre over kanseri olan yaşlı hastalarda daha kötü prognoza sahiptir(41,50). Bu gerek yaşla birlikte ileri evrede yakalanma oranı, tümör diferansiasyonunun kötüleşmesi gerekse hasta performansında azalma ile ilişkili olabilir.

Erken evrede erken dönemde rekürrens gelişmesi halinde prognoz ileri evreye benzer şekilde kötüdür(26).

Malign periton sitolojisi ve asit kötü prognozla ilişkilidir ancak kapsül rüptürü ve dökülmenin evreyi 1c'ye yükseltme ve prognozdaki rolü net değildir(45). Erken evrede over yüzeyi tutulumu da kötü prognozla ilişkilendirilmiştir(39)

Over kanserinin prognozunda etkili çeşitli moleküler patolojilerin (anormal onkogen ekspresyonu, p53, p16, Her2/neu, PTEN, 21,ki67 vb) prognoza etkisi incelenmiştir. P53 overekspresyonu kötü prognoz(2,51,52,53,56) ve daha yüksek grade(43) ile ilişkilidir. P16 over ekspresyonunun kötü diferansiasyon ve yüksek grade ile ilişkili olduğu(46), daha ileri evre ile ilişkili olduğu(61) ve kötü prognostik faktör(58) olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. DNA ploidi erken evre over kanserinde bağımsız bir prognostik faktördür(7).

Tablo 2.1. Erken Evre Over Kanserlerinde Prognostik Faktörler

• Yaş
• Evre / alt evre grupları
• Kapsül rüptürü
• Çevre dokulara dens yapışıklık
• Asit
• Malign periton sitolojisi
• Erken dönemde rekürrens
• Histolojik tip
• Histolojik grade
• Biyolojik markerlar (S fazı fraksiyonu, Anormal onkogen ekspresyonu, p53, p16, Her2/neu,PTEN,p21,ki67)

2.2. Erken Evre Over Tümörlerinde Cerrahi

Over kanserleri yayılım şekillerine dayanarak cerrahi olarak evrelenir. Erken evre olarak düşünülen over kanserlerinde cerrahi evreleme ile hastalığın overlere veya pelvise sınırlı olup olmadığı belirlenmektedir. Erken evre over kanserlerinde belirgin oranda mikroskopik okült metastazlar vardır. Bu nedenle tümör tek overe sınırlı bile olsa mutlaka cerrahi evreleme yapılmalı ve olası okült metastazlar saptanmalıdır. Erken evrelerde saptanan metastazlar hem hastaların prognostik değerlendirmesinde hem de adjuvant tedavi

gerekliliğine karar vermede önemlidir (18,19). Gözlemsel çalışmalara göre cerrahi sırasında evre I-II olduğu düşünülen hastaların %30'unun daha kapsamlı restaging laparotomi ile daha ileri evre olduğu gösterilmiştir(38). Erken evre hastalıkta klasik evreleme prosedürü yeterlidir ve çoğu olguda cerrahi tek başına küratiftir(38). Cerrahi evreleme midline insizyon ile yapılmalı ve üst abdomen mutlaka tümörün yayılımı açısından inspeksiyon ve palpasyon ile değerlendirilmelidir. Primer evreleme prosedürü histerektomi, bilateral salpingooforektomi, bilateral pelvik ve paraaortik lenf nodu diseksiyonu, infrakolik/total omentektomi, vücut boşluklarından sitoloji alınması, peritoneal yüzeylerden biyopsiler alınması şeklindedir. Özellikle müsinöz tümörlerde apendektomi yapılmalıdır(32).

İleri evrede olgularda tümörün yayılım durumuna göre bağırsak rezeksiyonu, splenektomi, distal pankreatektomi, diyafram rezeksiyonu, peritonektomi ve VATS klasik prosedüre eklenebilir.

Tablo 2.2. Erken Evre Ovaryan Malignitelerde Cerrahi Evreleme Prosedürü

Sitolojik inceleme için varsa asit örnekleme, yoksa
Pelvis, diyafragma ve vücut boşluklarından yıkama örnekleri
Tüm organ ve yüzeylerin sistematik incelenmesi
Peritoneal alanlardan multipl biyopsi örneklemleri
- Pelvik duvarlar
- Rektum ve mesane yüzeyi
- Cul-de-sac
- Lateral abdominal boşluklar
- Diyafragma
İnfrakolik Omentektomi
Pelvik ve Paraaortik Lenfadenektomi
Bilateral Salpingooforektomi*
Histerektomi*

*Fertilite istemi olabilecek seçilmiş hasta grubunda korunabilir

EOK vakalarının yaklaşık % 15'lik kısmı reproduktif çağda ortaya çıkar(15,16,17) ve evre I EOK'nın % 8'i 35 yaş altındaki kadınlarda görülür(14).

Fertilite kaygısı olan seçilmiş olgularda tam yapılmış evrelemede etkilenmiş overin çıkarılıp ve uterus ile diğer overin bırakılması ile fertilite korunabilir. Bırakılacak olan overin mutlaka dikkatli bir şekilde değerlendirilmesi gereklidir çünkü evre I seröz tümörlerde % 33, müsinöz tümörlerde % 15 oranında bilateralite riski mevcuttur(13). Evre I hastalıkta radikal ve fertilite koruyucu cerrahinin 5 yıllık yaşam beklentileri arasında fark yoktur(11,12).

2.3 Hücre Siklusu ve Epiteyal Over Kanseri

Hücrelerin replikasyonu genellikle büyüme faktörleriyle ya da ekstrasellüler matriks komponentlerinin integrinleri uyarmasıyla stimüle olur. DNA replikasyonunun oluşması ve bölünme için hücre, hücre siklusu olarak bilinen yüksek kontrollü döngüye girer.

Hücre siklusunun farklı evreleri süresince hücrelerin düzenli ilerlemesini siklinler, siklin bağımlı kinazlar (SBK) ve bunların inhibitörleri yönetir (22). Hücre siklusu boyunca SBK'lar inaktif formda bulunurlar. Siklinlere bağlanarak fosforile olduktan sonra aktif hal alırlar. Sayıları 15'ten fazladır ve hücre siklusunda sırasıyla siklin D, E, A ve B görülür.

Hücre Siklus İnhibitörleri

SBK inhibitörleri 2 ana sınıfa ayrılır:

Cip/Kip ailesi(p21,p27,p57) : Siklin-SBK komplekslerini denetlerler. p21 aktivasyonu p53 kontrolündedir

INK4/ARF ("inhibitor of kinase 4a/alternative reading frame") 2 proteini kodlar. Bunlar p16INK4a ve p14ARF proteinleridir. p16INK4a, siklin D-SBK4 kompleksini inhibe eder, p14ARF ise p53'ün feedback döngüsünü inhibe ederek p53'ü azalmaktan korur.

Hücre Siklusunda Kontrol Noktaları

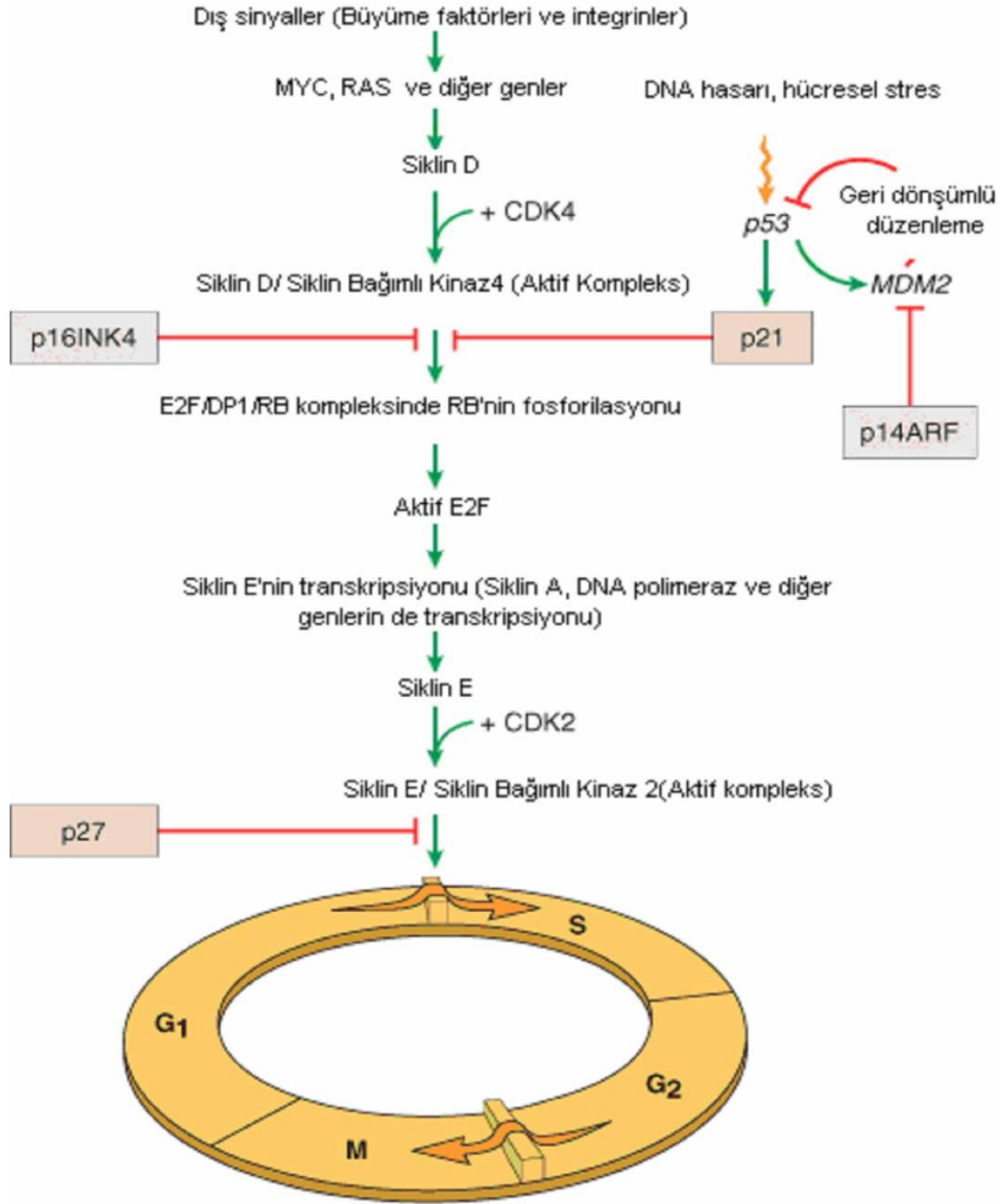
Hücre siklusunun biri G1/S geçiş bölgesinde, diğeri G2/M geçişinde olmak üzere iki temel kontrol noktası bulunur (22). Hücre replikasyona girmeden önce G1/S kontrol noktası DNA hasarını kontrol eder. Eğer DNA hasarı varsa DNA tamir mekanizmaları çalışır ve

siklus durur. Bu p53 kontrolünde gerçekleşir. Hasar tamir edilemezse apoptoz başlar. G2/M kontrol noktası DNA replikasyonunun tamamlanmasını denetler. Burada hücre siklusunun durması p53 bağımlı ve p53 bağımsız mekanizmalarla olur. p16, SBK4 inhibitörüdür. Spesifik olarak siklin D-SBK4/6 kompleksine bağlanarak hücre siklusunu G1/S interfazında RB aracılığı ile kontrol eder (22).

Epitelyal over kanserinde karyotip ve sitogenetik anormalliklere ek olarak spesifik genetik değişikliklerde tanımlanmıştır.

Protoonkogenler çeşitli hücrel mekanizmalarla onkogenlere dönüşebilen genlerdir. Over kanserinde tespit edilen protoonkogenler C-mos, c-fms, c-erbB-1, her-2/neu ve ras genleridir (23-24). Düşük dereceli mikropapiller seröz karsinomlar K-ras,B-raf ve HER2/neu gen mutasyonları ile karakterizedir(4). Endometrioid adenokarsinomların endometriozis ile yakın ilişkisi mevcut olup β -katenin ve PTEN mutasyonları sık görülür(5,6). Şeffaf hücreli karsinomlar da endometriozisle ilgili olup hormon reseptörlerinin azlığı ile karakterizedir (31) ve PI3K'yi aktive eden mutasyonlar yaklaşık yarısında görülür(29). Müsinöz karsinomlarda K-ras ve HER2/neu mutasyonları izlenir.

Tümör süpresör bir gen olan p53'ün baskılanması over hücrelerinde neoplastik değişikliklere yol açabilmektedir. Yüksek dereceli seröz over kanserlerinde p53 mutasyonu sıklıkla izlenir. Özellikle ileri evrede %80'e kadar çıkabilmektedir (4). Yine herediter over kanserlerinin ilerleme göstermek için p53 mutasyonuna ihtiyaç duyan bir moleküler patogeneze sahip olduğu anlaşılmıştır. (42,44)

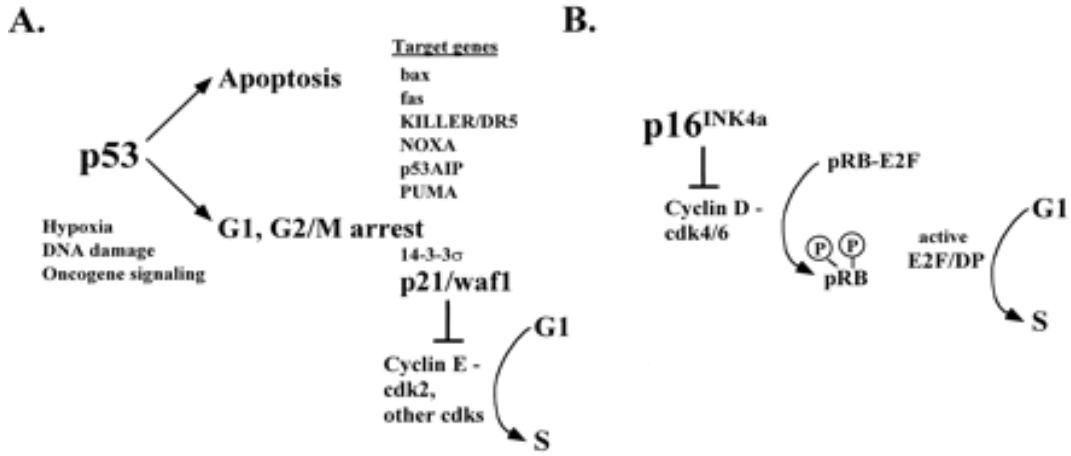


Şekil 2,1. Hücre Siklusu Kontrol Noktaları(22)

2.4 P16

P16, 9. Kromozomda lokalize, hücre siklusu progresyonunda retinoblastoma proteininin fosforile eden siklin bağımlı kinazı(SBK) inhibe ederek yavaşlatan bir SBK inhibitörüdür. Diğer bir etki şekli de SBK4 üzerinden pRb inaktivasyonu yapan siklin D1'in inhibisyonudur.

Hem p16 hem pRb hücre siklus regulasyonunda önemli tümör süpresörlerdir. P16 SBK4 ve SBK6'nın potent bir inhibitörüdür. P16, pRb ve siklin D1 hücre siklusunun en önemli kontrol noktası olan G1'den S fazına geçişte görev alır. Aynı zamanda p16 ve p53 genleri ras ilişkili tümörögenizde gelişen G1 duraklamasında görev alır. p16 birçok kanserde, mutasyon, delesyon, promotorunun hipermetilasyonu mekanizmaları ile inaktive durumdadır (65). Düşük p16 seviyelerine sahip olan over kanser hücrelerinin SBK4/6 inhibisyonuna daha duyarlı olduğu gösterilmiştir(57). Son yıllarda yapılan çalışmalarda seröz over karsinomlarında p16 geninde mutasyonlar ve/veya promotor metilasyonu saptanmıştır (1).



A: p53 tümör supresör yolağı : çeşitli nedenlerle aktive olan p53 proteini ya siklus aresti yapar ya da hücreyi apoptoza götürür
B: p16^{INK4a} supresör yolağı: SBK4 veya 6 ile etkileşerek siklin D üzerinden pRb'nin hipofosforilasyonunu sağlayarak aktive eder ve G1/S geçişinde rol alan E2F/DP inhibe edilmiş olur.

Şekil 2.2. P53 ve P16'nın Genom Bütünlüğünü Korumadaki Rolü(3)

2.5 P53

“**Guardian of the genome**” 1992 yılında Lane'in yaptığı ünlü tanımlamadır. TP53 geni ve kodladığı p53 proteini bereaber olarak p53 olarak bilinir. Gen 17p13 kromozomunda kodlanır. P53 proteini nükleusta lokalizedir ve DNA hasarında tamir mekanizmalarında görev alır. Fosforilasyonla kontrol edilir. Normal hücrede yarı ömrü 20dk olan proteinin hasarlı hücrede ekspresyonu artar. G1'den S fazına geçişte kontrol yapar. İnsan tümörlerindeki en sık genetik değişiklik yeridir(47).

P53 neoplastik transformasyonu 3 şekilde önler;Geçici olarak hücre siklusunu durdurma,kalıcı olarak hücre siklusunu durdurma veya programlı hücre ölümü (apoptozis).

Normal hücrede p53'ün yarı ömrü MDM2,COP1,PIRH2,JNK gibi proteinlerle birlikteliği nedeniyle kısadır. Stres altında çeşitli post-transkripsiyonel değişikliklerle ayrılırlar. Bu durumda p53 yarı ömrü uzar ve aynı zamanda transkripsiyon faktörü olarak aktive hale gelir. Eğer DNA hasarı düzeltilebilirse hücre normale döner ancak düzeltilemezse ve P53 BAX ve PUMA gibi bazı proapoptotik genlerin transkripsiyonunu artırır kalıcı siklus duraklaması veya apoptoz gerçekleşir. Hücre yaşlanması telomer disfonksiyonuna bağlı gelişir ve öncelikle p53 tarafından korunur, p16 ise limitsiz hücre büyümesi için 2. bir dominant bariyerdir(54).

P53'ün miRNA2lar üzerinde mir34 ailesinin transkripsiyonunu sağladığı gösterilmiştir(49). Mir34 ailesinin hedefleri siklinler gibi pro-proliferatif genler ve BCL-2 gibi anti-apoptotik genlerdir. Böylece siklusu durdurur veya hücreyi apoptoza götürürler.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olguların genel özellikleri

Bu çalışmaya Başkent Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Jinekolojik Onkoloji Bilim Dalı'nda 2007 Ocak-2011 Aralık tarihleri arasında tedavisi yapılan, patoloji sonuçları değerlendirilerek elde edilen, FIGO evreleme sistemine(20) göre evre 1a epitelyal over karsinomu tanısı alan 29 olgu alındı. Tüm olgular tam cerrahi evreleme yapıldı, bunlardan 3 olguda fertilite koruyucu yaklaşım uygulanmıştı. Olguların çoğu şeffaf hücreli histolojideydi. Hastalar şeffaf hücreli(grup 1) ve non-şeffaf hücreli (grup 2) olmak üzere 2 grupta incelendi.

Tablo 3.1. Hastaların genel özellikleri

	Sayı(%)
Yaş	
<60	22(75)
>60	7(25)
Histoloji*	
Şeffaf	12(41)
Non şeffaf	17(59)
Endometrioid	4
Müsinöz	8
Seröz	5
Grade**	
1	8(27,5)
2	5(17,5)
3	16(55)
Menapoz durumu	
Premenapozal	14(48)
Postmenapozal	15(52)
Cerrahi	
Radikal	26(89)
Fertilite koruyucu	3(11)
Takip süresi(ay)	
Min	12
Max	70

* Non-şeffaf histoloji grubunda müsinöz, seröz ve endometrioid subtipler mevcuttur.

**Şeffaf hücre histolojisi natürü gereği grade 3 olarak alınmıştır.

Parafin bloklarda uygun örneklerde p16 ve p53 ekspresyonlarına immunohistokimyasal olarak bakıldı. Bu çalışmada Leica BOND-MAX cihazı ile yapılmıştır. Örnekler patoloji bölümünde semikantitatif olarak değerlendirildi. P16 ve p53 ekspresyon durumları sonuç olarak hastalıksız sağ kalım ve overall sağ kalıma göre karşılaştırıldı. Hasta takip süresi ortalama 33,7 ay idi. Sonuçlar SPSS 17.0 programı ile analiz edildi. İstatistiksel önem düzeyi p:0.05 olarak alındı.

3.2. İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi ve Değerlendirilmesi

3.2.1. İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi

Bu çalışma Leica BOND-MAX cihazı ile yapılmıştır. Cihazın çalışma protokolü şöyledir;

Etüvde 60 C’de 30 dk. Dokunun parafinden ayrılmasını sağlar. 3 kez ksilenden geçirir ve lamı parafinden uzaklaştırır. 3 kez alkolden geçer lamdan ksileni uzaklaştırır. PBS (yıkama solüsyonu) ile 3 kez yıkama yapar.(Alkolü uzaklaştırır.). EDTA’da 100 C’de 30 dk. kaynatılır. 3 kez PBS ile yıkanır. 13 dk. peroxide blockta kalır.(Peroxide block:Hidrojen peroksit). 3 kez PbS ile yıkanır.

Antikor damlatılır. 20 dk. antikorda kalır.

P16→ Mouse monoclonal.LOT no: AM5400512 IHC-P

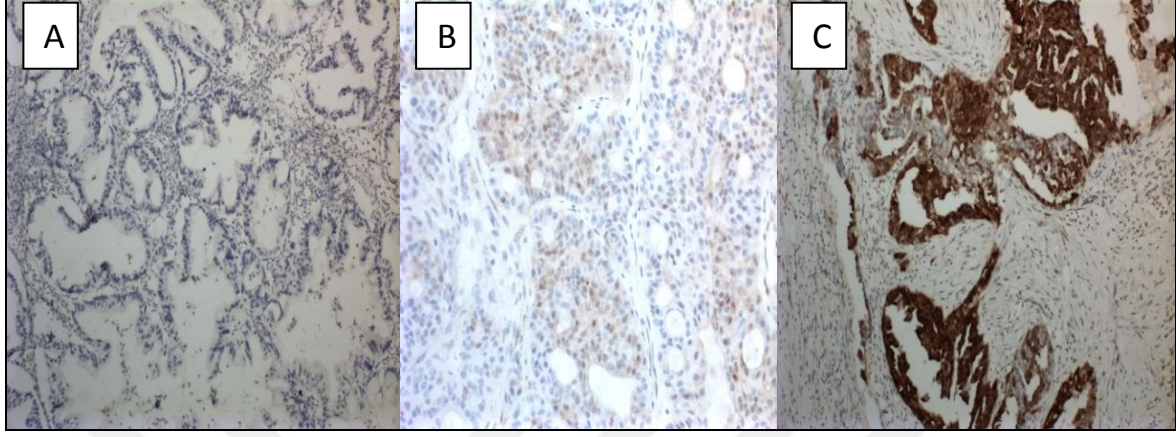
P53→ Mouse monoclonal.LOT no:00044834 IHC-P

3 kez PBS ile yıkanır. 6 dk. Post primary de kalır.(Post primary: Protein blokajı). 3 kez PBS ile yıkanır. 5 dk.Polymer de kalır. 3 kez PBS ile yıkanır. 7 dk. distile su ile yıkanır. 7 dk. DAB(Diaminobenzidin)’ta bekletilir. 1 dk. Distile su ile yıkanır. 5 dk. Hematoksilende kalır. 1 kez distile su ile yıkanır. 1 kez PBS ile yıkanır. 1 kez distile su ile yıkanır.

3.2.2. P16 değerlendirilmesi

Işık mikroskopunda epitel hücrelerinde nükleer ve sitoplazmik boyanma değerlendirildi. Tümör hücrelerindeki boyanmanın yüzdesi yanı sıra boyanma olmayan-hafif-orta-güçlü

olmak üzere boyanma paterni kaydedildi(Şekil 4). Değerlendirme yapılırken boyanma olmayan ile hafif boyanan ve tümör hücrelerinin %10'undan azının boyandığı olgular negatif, diğer olgular pozitif kabul edildi.

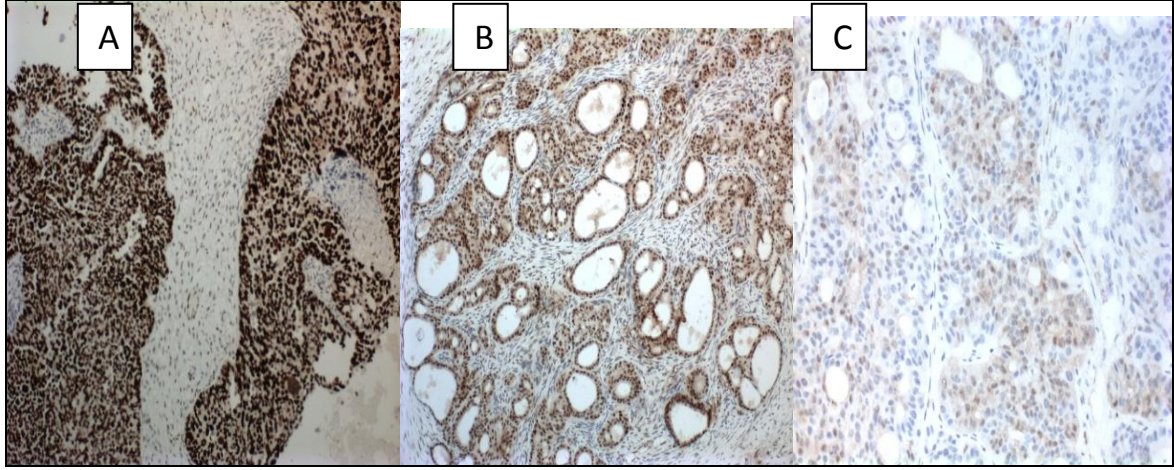


A) p16 belirteci ile zayıf boyanma paterni (x10 HPF), B) p16 belirteci ile orta derecede boyanma paterni (x20 HPF), C) p16 belirteci ile güçlü boyanma paterni (x10 HPF)

Şekil 3.1. P16 dışı vurum paternleri

3.2.3. P53 Değerlendirilmesi

Işık mikroskopunda epitel hücrelerinde nükleer boyanma değerlendirildi. Tümör hücrelerindeki boyanmanın yüzdesi yanı sıra boyanma olmayan-hafif-orta-güçlü olmak üzere boyanma paterni kaydedildi(Şekil 4). Değerlendirme yapılırken boyanma olmayan ile hafif boyanan ve tümör hücrelerinin %10'undan azının boyandığı olgular negatif, diğer olgular pozitif kabul edildi.



A) p53 belirteci ile güçlü boyanma paterni (x10 HPF), B) p53 belirteci ile orta derecede boyanma paterni (x10 HPF), C) p53 belirteci ile zayıf boyanma paterni (x10 HPF)

Şekil 3.2. P53 dışavurum paternleri

3.3. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 17.0 paket programı kullanıldı. Kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, sürekli ölçümlerse ortalama ve standart sapma (gerekli yerlerde ortanca ve minimum - maksimum) olarak özetlendi. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında Ki Kare test ya da Fisher test istatistiği kullanıldı. Gruplar arasında sürekli ölçümlerin karşılaştırılmasında dağılımlar kontrol edildi, değişken sayısına göre normal dağılım gösteren parametreler için Student T test ve ikiden fazla değişken karşılaştırmalarında Anova, normal dağılım göstermeyen parametrelere de Mann Whitney U testi ve ikiden fazla değişken karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi kullanıldı. P16 ve P56'nın OAS'de mortalite üzerine etkisini ölçmek için de Cox Regresyon Analizi kullanıldı. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0.05 olarak alındı.

4. BULGULAR

Çalışmada değerlendirilen 29 hastanın ortalama yaşı $51,4 \pm 13,2$ olarak saptandı. Bu hastaların 14(48,2%)'ü premenapozal ve 15 (%51,8)'i postmenapozal dönemdeydi. Hasta takip süresi ortalama $33,7 \pm 18,9$ (12-70) ay idi. En fazla şeffaf hücreli histolojik tip izlendi. Yaş dağılımı gruplar arasında benzerdi. Hastaların genel özellikleri tablo 3.1' de özetlenmiştir.

Olgularda p16 %55, p53 %93 oranda pozitif boyandı. Grup 1 ve 2 arasında immunohistokimyasal değerlendirme sonuçları arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. (tablo4.1).

Tablo 4.1. Gruplara göre p53 ve p16 boyanma paternleri

Histoloji	P16		P53	
	pozitif	negatif	pozitif	negatif
Grup 1	9(75,0)	3(25,0)	12(100,0)	0(0,0)
Grup 2	9(56,3)	7(43,8)	15(88,2)	2(11,8)
		p:0,498	p: 0,130	

Histolojik tiplere göre değerlendirildiğinde müsinöz tiplerde boyanma olmaması istatistiksel olarak anlamlıdır.(Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Histolojiye göre p53 ve p16 boyanma paternleri

Histoloji	P16		P53		p
	pozitif	negatif	pozitif	negatif	
Şeffaf h	9(75,0)	3(25,0)	12(100,0)	0(0,0)	p: 0,003
Endometrioid	3(75,0)	1(25,0)	4(100,0)	0(0,0)	
Müsinöz	0(0,0)	8(100,0)	6(75,0)	2(25,0)	
Seröz	4(80,0)	1(20,0)	5(100,0)	0(0,0)	

Grade 3 hastalarda hem p53'ün hem de p 16'nın yüksek oranda pozitif olduğu izlendi. Bunlardan p16'nın pozitifliği istatistik olarak anlamlı bulundu.(Tablo 4.3)

Tablo 4.3. Tümör grade'ine göre p53 ve p16 boyanma paternleri

Grade	P53		P16	
	(+)	(-)	(+)	(-)
1	6(22,2)	2(0,0)	3(18,8)	5(38,5)
2	5(18,5)	0(0,0)	1(6,3)	4(30,8)
3	16(59,3)	0(0,0)	12(75,0)	4(30,8)
P	0,060		0,048	

Çalışmada değerlendirilen 29 evre 1a hastadaki konvansiyonel prognostik parametrelerin OAS ve DFS'ye etkisi istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır. (Tablo 4.4)

Tablo 4.4. Prognostik faktörlerin OAS ve DFS'a etkisi

		DFS	OAS
Yaş	<60		
	N	22	22
	Ort±SS	35,8±20,7	36,0±20,4
>60	N	7	7
	Ort±SS	25,6±10,0	26,7±11,5
P		0,224	0,226
Histoloji			
Grup 1	N	12	12
	Ort±SS	39±18,2	39,67±18,2
Grup 2	N	17	17
	Ort±SS	29,3±19,1	29,6±18,8
P		0,182	0,161
Grade			
1	N	8	8
	Ort±SS	26,9±14,0	26,9±14,0
2	N	5	8
	Ort±SS	34,0±22,3	35,0±20,9
3	N	16	16
	Ort±SS	36,3±20,5	36,8±20,6
P		0,536	0,489

P16 ve P53immunhistokimya boyama paternleri multivaryan analizlerle OAS ve DFS ile karşılaştırıldığında p16 ve p53 ekspresyonlarının sağ kalma etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. (Tablo 4.5)

Tablo 4.5. P53 ve p16 boyanma durumunun OAS ve DFS'a etkisi

		DFS	OAS	P
P16				
Pozitif	N	16	16	0,078
	Mean	38,9±19,9	38,9±19,9	
Negatif	N	13	13	0,103
	Mean	26,4±16,1	27,4±16,1	
P53				
Pozitif	N	27	27	0,297
	Mean	34,3±19,3	34,81	
Negatif	N	2	2	0,277
	Mean	19,5±9,1	19,5±9,1	

Yapılan multivaryan analizler wonucuda gruplar arasında P53 ve p16 boyanma paterninin OAS ve DFS'ye etkisi istatistik olarak anlamlı bulunmadı. (Tablo 4.6)

Tablo 4.6. Histolojik tiplere göre P53 ve p16 boyanma durumunun OAS ve DFS'a etkisi

		Grup 1	Grup 2	p
OAS	P53-	-	27,4±16,1	-
	P53+	34,8±19,1	19,5±9,2	0,277
	P16-	29±7	27±6	
	P16+	43±6	33±8	0,660
DFS	P53-	-	26,4±16,1	-
	P53+	34,3±19,3	19,5±9,2	0,297
	P16-	26±5	26±6	
	P16+	43±6	33±8	0,875

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Erken evre over kanserinde prognoz iyi olup 5 yıllık sağ kalım %80-95 arasındadır(32). Literatürde erken evre EOK prognostik faktörleri inceleyen çalışmalar genellikle evre 1 ve 2 olan hastaları beraber değerlendirmiştir. Evre 1a hastalarda evre gereği diğer prognostik parametreler olmadığından cerrahi, evre, histoloji, grade, yaş ve moleküler biyomarkerlar prognozu belirlemektedir.

Yapılan en geniş çalışmalardan bir tanesinde Chan ve arkadaşları 13 yıllık bir periyoda opere edilen 8372 evre I-II(6152-2220) olan hastada prognostik verileri değerlendirmişler lenfadenektomi artışı ile cerrahinin yıllar içinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da DFS'i artırdığını, multivaryan analizlerde daha genç yaş, nonclear histoloji, erken evre, düşük grade, cerrahi ve lenfadenektominin sağ kalımda bağımsız risk faktörleri olduğu belirtilmiştir(8). ICON ve ACTION çalışmaları beraber değerlendirildiğinde evre 1a grade 1-2 hastalarda kemoterapinin tam yapılmış evrelemede kemoterapinin sağkalıma katkısı yoktur(35,36,37). Takada ve arkadaşların yaptığı 2012 yılı çalışmasında evre 1a ve 1c olan 73 şeffaf hücre histolojili hasta kemoterapi alıp almamasına göre karşılaştırılmış ve OAS ile DFS üzerinde kemoterapinin prognostik olmadığı belirtilmiştir(28). Le ve arkadaşlarının yaptığı retrospektif analizde değerlendirilen 138 olguda cerrahi evrelemesi tam olarak yapılan olgularda rekürrens oranının %10 iken evreleme yapılmayan grupta %28 olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada yaş ve yüksek grade'in hem rekürrens hem toplam sağkalımda etkili olduğu belirtilmiştir(25).

Bamias ve arkadaşlarının yaptığı Evre I –II olan 147 hastanın değerlendirildiği çalışmasında seröz histolojinin evre 1 hastalarda nonserözlere göre daha kötü prognoza sahip olduğunu belirtmiştir(9). Bunun yanında bir GOG çalışmasında Chan ve arkadaşları erken evre yüksek riskli(evre I, grade3; evreIC; evre II; şeffaf hücreli) hastaları değerlendirdikleri çalışmada histolojiler arasında herhangi bir fark olmadığını ancak yaş, evre, grade, ve sitolojinin prognostik faktörler olduğunu belirtmişlerdir(50). Yine başka bir GOG çalışmasında yüksek riskli erken evre EOK olan 74 hastada yapılan değerlendirmede erken rekürrens(<24ay) gelişen hastaların prognozunun geç rekürrens gelişen(>24ay) hastalara oranla belirgin olarak daha kötü olduğu ve ileri evre hastalığına benzer prognoz gösterdiği belirtilmiştir(26).

Bondy ve arkadaşları Kanada’da toplum bazlı bir çalışmada 327 evre 1-2 hastanın değerlendirildiği çalışmada yüksek grade ve kapsül tutumlunun kötü prognozla ilişkili olduğunu bunların yanında adezyonların varlığının ve yaşın sağkalımda etkili olduğunu belirtmişlerdir(39).

Over kanserinde moleküler temel gitgide daha çok ilgi çeken bir konu haline gelmektedir. Literatürde ploidi taramaları, tümör supresör gen mutasyonları, onkogen ekspresyonlarının değerlendirildiği çalışmalar mevcuttur.

P53 over kanserinde genelde kötü prognostik bir parametre olarak değerlendirilmiştir. Skirnisdottir ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda FIGO evre 1 ve 2 olarak değerlendirilen 131 olgunun analizinde p53 pozitifliğinin daha düşük DFS ile ilişkili olduğunu ve bu hastalarda prognozun daha kötü gittiğini belirtmiştir(51,52). Darcy ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada erken ve ileri evre EOK olan 289 hastada p53 overekspresyonunun daha kötü PFS ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir(2). Yoo-Kyong Lee ve arkadaşlarının yaptığı 155 erken ve ileri evre EOK olgusunun değerlendirildiği çalışmada kötü prognozla ilişkisi bilinen p53 overekspresyonunun evre,grade ve histoloji ile ilişkili olduğu tespiti edilmiş, OAS ve DFS’ye etkili olmadığı tespit edilmiştir(43). Sagarra ve arkadaşlarının yaptığı erken ve ileri evre EOK 90 olgunun değerlendirildiği çalışmada p53 overekspresyonunun OAS ve DFS’ye etkili olmadığı, FIGO evresi ve rezidü tümörün etkili olduğu tespit edilmiştir(48). Ramirez ve arkadaşlarının yaptığı deneysel çalışmada over kanseri hücrelerine viral yolla p53 transfeksiyonu yapılarak bu hücrelerde apoptozun arttığı gösterilmiştir(60). Graeff ve arkadaşlarının yaptığı 62 çalışmanın değerlendirildiği metaanalizde p53’ün overall sağkalımda etkili olduğunu göstermişlerdir(53). Plisiecka-Halasa ve arkadaşlarının yaptığı 204 ileri evre hastada yapılan prognoz çalışmasında p53’ün diğer biyomarkerların (p21,p27) prognostik değerini belirlediği saptanmıştır(55). Garcia-Velaco ve arkadaşlarının yaptığı 72 hastalık çalışmada p53 ekspresyonunun PFS ile ilişkisi olmadığı gösterilmiştir(56). Chambers ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada mutant p53 içeren olgularda isoform $\Delta 133p53$ ’ün DFS ve OAS’a pozitif etki ettiğini göstermiştir(59).

P16 overekspresyonu genelde serviks kanseri patogenezinde çalışılmış son dönemde over kanserinde de ilgi çekmeye başlamıştır. Khouja ve arkadaşlarının yaptığı 171 over kanseri olgusunun değerlendirildiği çalışmada p16 yüksek ekspresyonunun kötü diferansiasyon ve

yüksek grade ile ilişkili olduğu saptanmıştır(46). Surowiak ve arkadaşlarının yaptığı 73 hasta içeren çalışmada düşük p16 ekspresyonun over kanserinde kötü prognostik faktör olduğu gösterilmiştir(58). Katsaros ve arkadaşlarının yaptığı 249 hastada p16 promoter metilasyonu olanlarda ileri evre ve agresif tümörlerin daha fazla görüldüğü, progresyon ve ölüm riskinin daha fazla olduğu gösterilmiştir(61). Yan ve arkadaşların ın 205 hastada kan örneklerinden p16 subtiplerinin değerlendirildiği çalışmada çeşitli subtiplerin farklı histolojik tiplerde daha fazla eksprese edildiği gösterilmiştir(62). Kusume ve arkadaşlarının 59 hastayı değerlendirdiği çalışmada p16-Cyclin D1/CDK4-pRb (G1 yolağı) değerlendirilmiş ve OAS için bir prognostik faktör olarak değerlendirilebileceği belirtilmiştir(63). Kudoh ve arkadaşları 45 hastada p16 inaktivasyonunun düşük kemoterapi yanıtı ile ilişkili olduğunu gösteren içeren bir çalışma yapmıştır(64).

Bu çalışmada; evre 1a EOK tanısı alan 29 hastanın prognozları ve bunu etkileyen faktörler değerlendirilmiştir. Histolojik gruplar ve yaş arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Yaşa göre sağ kalım değerlendirmesinde OAS ve DFS'yi etkilemediği görüldü.

Histolojik değerlendirmede p53 ve p16 immun histokimya pozitifliğinde anlamlı bir fark bulunamadı. Subtiplerin değerlendirmesinde müsinöz tümörlerde p16'nın negatif olması istatistiksel olarak anlamlıydı. Yüksek grade olan olgularda hem p53'ün hem de p 16'nın yüksek oranda pozitif olduğu izlendi. Bunlardan p16'nın pozitifliği istatistik olarak anlamlıydı. Bunun yanında evre 1a'da histolojik tiplerin OAS ve DFS'a etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Multivaryan analizlerde Gruplar arasında p16 ve p53 immunhistokimya değerlendirmeleri OAS ve DFS ile karşılaştırıldığında sağ kalıma etkisi olmadığı sonucuna ulaşıldı.

Bu çalışmada p53 ve p16 immunhistokimya pozitifliğinin grade ile ilişkili olduğu ancak sağkalıma etkili oldadığı sonucuna varıldı. Bu durum çalışmadaki sayısının limitli olmasına bağlı olabilir. Bu durumun aydınlığa kavuşması için daha geniş vaka serisi bazında yapılacak çalışmalar literatüre katkı yapabilir.

KAYNAKLAR

1. D. Katsaros, W. Cho, R. Singa, S. Fracchioli I. A. Rigault de la Longrais, R. Arisio, M. Massobrio, M. Smith, W. Zheng, J. Glass and H. Yu, Methylation of tumor suppressor gene p16 and prognosis of epithelial ovarian cancer, *Gynecologic Oncology*, Volume 94, Issue 3, September 2004, Pages 685-692) .
2. Kathleen M. Darcy, William E. Brady, John W. McBroom, Jeffrey G. Bell, Robert C. Young, William P. McGuire, R. Ilona Linnoila, Denver Hendricks, Tomas Bonome, John H. Farley1. Associations between p53 overexpression and multiple measures of clinical outcome in high-risk, early stage or suboptimally-resected, advanced stage epithelial ovarian cancers: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic Oncology* 111 (2008) 487–495
3. Maureen E. Murphy. The Battle between Tumor suppressors: Is Gene Therapy Using p16(INK4a) More Efficacious Than p53 for Treatment of Ovarian Carcinoma? : Commentary re: S. C. Modesitt et al., In Vitro and In Vivo Adenovirus-mediated p53 and p16 Tumor Suppressor Therapy in Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res.*, 7: 1765-1772, 2001.
4. Kurman RJShih IeM, Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. *Int J Gynecol Pathol* 2008;Apr;27(2):151-60
5. Obata K, Morland SJ, Watson RH, Hitchcock A, Chenevix-Trench G, Thomas EJ, Campbell IG. Frequent PTEN/MMAC mutations in endometrioid but not serous or mucinous epithelial ovarian tumors. *Cancer Res.* 1998 May 15;58(10):2095-7.
6. Catasús L, Bussaglia E, Rodrguez I, Gallardo A, Pons C, Irving JA, Prat J. Molecular genetic alterations in endometrioid carcinomas of the ovary: similar frequency of beta-catenin abnormalities but lower rate of microsatellite instability and PTEN alterations than in uterine endometrioid carcinomas. *Hum Pathol.* 2004 Nov;35(11):1360-8.
7. Tropé CG, Abeler V, Baekelandt M, Kaern J. [DNA ploidy in epithelial ovarian cancer--an independent prognostic factor]. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 2000 Jan 10;120(1):43-9.
8. Chan J, Fuh K, Shin J, Cheung M, Powell C, Chen LM, Kapp D, Osann K. The treatment and outcomes of early-stage epithelial ovarian cancer: have we made any progress? *Br J Cancer.* 2008 Apr 8;98(7):1191-6. doi: 10.1038/sj.bjc.6604299. Epub 2008 Mar 18
9. Bamias A, Karadimou A, Soupos N, Sotiropoulou M, Zagouri F, Haidopoulos D, Thomakos N, Rodolakis A, Antsaklis A, Dimopoulos MA. Prognostic factors for early-stage epithelial ovarian cancer, treated with adjuvant carboplatin/paclitaxel chemotherapy: a single institution experience. *Gynecol Oncol.* 2011 Oct;123(1):37-42. doi: 10.1016/j.ygyno.2011.06.033. Epub 2011 Jul 18.

10. Bamias A, Sotiropoulou M, Zagouri F, Trachana P, Sakellariou K, Kostouros E, Kakoyianni K, Rodolakis A, Vlahos G, Haidopoulos D, Thomakos N, Antsaklis A, Dimopoulos MA. Prognostic evaluation of tumour type and other histopathological characteristics in advanced epithelial ovarian cancer, treated with surgery and paclitaxel/carboplatin chemotherapy: cell type is the most useful prognostic factor. *Eur J Cancer*. 2012 Jul;48(10):1476-83.
11. Ayhan A, Celik H, Taskiran C, Bozdog G, Aksu T. Oncologic and reproductive outcome after fertility-saving surgery in ovarian cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 2003; 24: 223-232.
12. Colombo N, Chiari S, Maggioni A, Bocciolone L, Torri V, Mangioni C. Controversial issues in the management of early epithelial ovarian cancer: conservative surgery and the role of adjuvant therapy. *Gynecol Oncol* 1994; 55: S47-51.
13. McHale MT, DiSaia PJ. Fertility-sparing treatment of patients with ovarian cancer. *Compr Ther* 1999; 25: 144-150
14. DiSaia PJ. Fertility-sparing treatment of patients with ovarian cancer. *Compr Ther* 1990; 16: 35-42.
15. Duska LR, Chang YC, Flynn CE, et al. Epithelial ovarian carcinoma in the reproductive age group. *Cancer* 1999; 85: 2623-2629
16. Rodriguez M, Nguyen HN, Averette HE, et al. National survey of ovarian carcinoma XII. Epithelial ovarian malignancies in women less than or equal to 25 years of age. *Cancer* 1994; 73: 1245-1250.
17. Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 10-30.
18. Schildkraut JM, Halabi S, Bastos E, Marchbanks PA, McDonald JA, Berchuck A. Prognostic factors in early-onset epithelial ovarian cancer: a population-based study. *Obstet Gynecol*. 2000 Jan;95(1):119-27.
19. Zanetta G, Rota S, Chiari S, Bonazzi C, Bratina G, Torri V, Mangioni C. The accuracy of staging: an important prognostic determinant in stage I ovarian carcinoma. A multivariate analysis. *Ann Oncol*. 1998 Oct;9(10):1097-101.
20. Ayhan A, Reed N, Gultekin M, Dursun P. Prognostic Factors for Gynecologic Cancers, chapter 183, in *Textbook of Gynaecological Oncology*, 2nd ed, Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri; 2011.s.1056-1060
21. Zanetta G, Chiari S, Rota S, et al. Conservative surgery for stage I epithelial ovarian carcinoma in women of childbearing age. *Br. J Obstet Gynecol* 1997; 104: 1030- 1035
22. Kumar V, Abbas A.K, Fausto N; The female genital tract, chapter 22, in *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, 7th ed, Elsevier Saunders, Philadelphia, 1092-1104, 2005.
23. Shih IeM, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol*. 2004 May;164(5):1511-8.

24. Ayhan A, Reed N, Gultekin M, Dursun P. The Origin and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer, chapter 68, in Textbook of Gynaecological Oncology, 2nd ed, Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri; 2011.s.422-428
25. Le T, Adolph A, Krepert GV, Lotocki R, Heywood MS. The benefits of comprehensive surgical staging in the management of early-stage epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2002 May;85(2):351-5.
26. Chan JK, Tian C, Teoh D, Monk BJ, Herzog T, Kapp DS, Bell J. Survival after recurrence in early-stage high-risk epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol.* 2010 Mar;116(3):307-11.
27. D. Katsaros, W. Cho, R. Singa, S. Fracchioli I. A. Rigault de la Longrais, R. Arisio, M. Massobrio, M. Smith, W. Zheng, J. Glass and H. Yu, Methylation of tumor suppressor gene p16 and prognosis of epithelial ovarian cancer, *Gynecologic Oncology*, Volume 94, Issue 3, September 2004, Pages 685-692) .
28. Takada T, Iwase H, Iitsuka C, Nomura H, Sakamoto K, Omatsu K, Takeshima N, Takizawa K. Adjuvant chemotherapy for stage I clear cell carcinoma of the ovary: an analysis of fully staged patients.. *Int J Gynecol Cancer.* 2012 May;22(4):573-8.
29. Ayhan A, Reed N, Gultekin M, Dursun P. Molecular Basis of Gynecologic Cancers , chapter 28, in Textbook of Gynaecological Oncology, 2nd ed, Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri; 2011.s.183-190
30. M E McMenamin, A J O'Neill, and E F Gaffney. Extent of apoptosis in ovarian serous carcinoma: relation to mitotic and proliferative indices, p53 expression, and survival. *Mol Pathol.* 1997 October; 50(5): 242–246).
31. Köbel M, Kalloger SE, Boyd N, McKinney S, Mehl E, Palmer C, Leung S, Bowen NJ, Ionescu DN, Rajput A, Prentice LM, Miller D, Santos J, Swenerton K, Gilks CB, Huntsman D. Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies. *PLoS Med.* 2008 Dec 2;5(12):e232.
32. Ayhan A, Reed N, Gultekin M, Dursun P. Early Stage Epithelial Ovarian Cancer , chapter 69, in Textbook of Gynaecological Oncology, 2nd ed, Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri; 2011.s.429-431
33. Gad Singer, Robert J. Kurman, Hsueh-Wei Chang, Sarah K.R. Cho, and Ie-Ming Shih. Diverse Tumorigenic Pathways in Ovarian Serous Carcinoma. *American Journal of Pathology*, Vol. 160, No. 4, April 2002.
34. Ayhan A, Reed N, Gultekin M, Dursun P. Advanced Stage Epithelial Ovarian Cancers , chapter 70, in Textbook of Gynaecological Oncology, 2nd ed, Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri; 2011.s.432-441
35. Trimbos JB, Vergote I, Bolis G, Vermorken JB, Mangioni C, Madronal C, Franchi M, Tateo S, Zanetta G, Scarfone G, Giurgea L, Timmers P, Coens C, Pecorelli S; EORTC-ACTION collaborators. European Organisation for research and Treatment of Cancer-Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasm. Impact of adjuvant chemotherapy and surgical staging in early-stage ovarian carcinoma: European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasm trial. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Jan 15;95(2):113-25.

36. Colombo N, Guthrie D, Chiari S, Parmar M, Qian W, Swart AM, Torri V, Williams C, Lissoni A, Bonazzi C; International Collaborative Ovarian Neoplasm (ICON) collaborators. International Collaborative Ovarian Neoplasm Trial 1: a randomized trial of adjuvant chemotherapy in women with early-stage ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Jan 15;95(2):125-32.
37. Trimbos JB, Parmar M, Vergote I, Guthrie D, Bolis G, Colombo N, Vermorken JB, Torri V, Mangioni C, Pecorelli S, Lissoni A, Swart AM; International Collaborative Ovarian Neoplasm 1; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Collaborators-Adjuvant ChemoTherapy un Ovarian Neoplasm. International Collaborative Ovarian Neoplasm trial 1 and Adjuvant ChemoTherapy In Ovarian Neoplasm trial: two parallel randomized phase III trials of adjuvant chemotherapy in patients with early-stage ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Jan 15;95(2):105-12.
38. Ronald S. Gibbs, Beth Y. Karlan, Arthur F. Haney, Ingrid E. Nygaard. Ovarian and Tubal Cancers, chapter 61, in Danforth's Obstetrics and Gynecology, 10th Ed, Lippincott Williams & Wilkins, 2008:1023-1060
39. Bondy S, Elit L, Chen Z, Law C, Paszat L. Prognostic factors for women with Stage 1 ovarian cancer with or without adhesions. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2006;27(6):585-8.
40. Seidman JD, Kurman RJ Pathology of ovarian carcinoma.. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2003 Aug;17(4):909-25,
41. Winter WE 3rd, Maxwell GL, Tian C, Carlson JW, Ozols RF, Rose PG, Markman M, Armstrong DK, Muggia F, McGuire WP. Prognostic factors for stage III epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol.* 2007 Aug 20;25(24):3621-7.
42. John Schorge, Joseph Schaffer, Lisa Halvorson, Barbara Hoffman, Karen Bradshaw, F. Cunningham. Epithelial ovarian cancer, chapter 35, in Williams Gynecology, 1st ed, China: the McGraw-Hill Companies, 2008:p716-737
43. Yoo-Kyung Lee, Noh-Hyun Park. Prognostic value and clinicopathological significance of p53 and PTEN in epithelial ovarian cancers. *Gynecologic Oncology* 112 (2009) 475–480
44. Schorge JO, Muto MG, Lee SJ, Huang LW, Welch WR, Bell DA, Keung EZ, Berkowitz RS, Mok SC. BRCA1-related papillary serous carcinoma of the peritoneum has a unique molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 2000 Mar 1;60(5):1361-4.
45. Ayhan A, Reed N, Gultekin M, Dursun P. Prognostic Factors for Gynecologic Cancers, chapter 37, in Textbook of Gynaecological Oncology, 2nd ed, Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri; 2011.s.231-236
46. M. Haysam Khouja, Mark Baekelandt, Jahn M. Nesland, Ruth Holm. The Clinical Importance of Ki-67, p16, p14, and p57 Expression in Patients With Advanced Ovarian Carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*, Vol. 26, No. 4, October 2007
47. Vousden K, Lane D: p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:275.

48. Sagarra RA, Andrade LA, Martinez EZ, Pinto GA, Syrjänen KJ, Derchain SF. P53 and Bcl-2 as prognostic predictors in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2002 Nov-Dec;12(6):720-7.
49. He L, et al: microRNAs join the p53 network—another piece in the tumour-suppression puzzle. *Nat Rev Cancer* 2007; 7:819.
50. John K. Chan, Chunqiao Tian, Bradley J. Monk, Thomas Herzog, Daniel S.
51. Kapp, Jeffrey Bell, Robert C. Young. Prognostic Factors for High-Risk Early-Stage Epithelial Ovarian Cancer. *Prognostic Factors for High-Risk Early-Stage Epithelial Ovarian Cancer*. *CANCER* May 15, 2008 / Volume 112 / Number 10
52. Ingiriður Anna Skirnisdóttir, Bengt Sorbe, Katarina Lindborg, Tomas Seidal. Prognostic Impact of p53, p27, and C-MYC on Clinicopathological Features and Outcome in Early-Stage (FIGO I-II) Epithelial Ovarian Cancer. *International Journal of Gynecological Cancer & Volume 21, Number 2, February 2011*
53. Ingiriður Anna Skirnisdóttir, Tomas Seidal. Prognostic Impact of Concomitant p53 and PTEN on Outcome in Early Stage (FIGO I-II) Epithelial Ovarian Cancer. *International Journal of Gynecological Cancer & Volume 21, Number 6, August 2011*
54. P de Graeff, APG Crijns, S de Jong, M Boezen, WJ Post, EGE de Vries, AGJ van der Zee, GH de Bock. Modest effect of p53, EGFR and HER-2/neu on prognosis in epithelial ovarian cancer: a meta-analysis. *British Journal of Cancer* (2009) 101, 149 – 159
55. Christian M. Beausejour, Ana Krtolica, Francesco Galimi, Masashi Narita, Scott W. Lowe, Paul Yaswen, Judith Campisi. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *The EMBO Journal* Vol. 22 No. 16 pp. 4212–4222, 2003
56. J. Plisiecka-Hańska, G. Karpińska, T. Szymańska, I. Zióbkowska, R. Mądry, A. Timorek, J. Dębniak, M. Ubańska, M. Jędryka, A. Chudecka-Gbuz, M. Klimek, A. Rembiszewska, E. Kraszewska, B. Dybowski, J. Markowska, J. Emerich, A. Pługańska, M. Goluda, I. Rzepka-Górska, K. Urbański, J. Zieliński, J. Stelmachów, M. Chrabowska, J. Kupryjańczyk. P21WAF1, P27KIP1, TP53 and C-MYC analysis in 204 ovarian carcinomas treated with platinum-based regimens. *Annals of Oncology* 14: 1078–1085, 2003
57. Adelaida García Velasco, César Mendiola, Alfonso Sánchez-Muñoz, Claudio Ballestín, Ramón Colomer, Hernán Cortés-Funes. Prognostic value of hormonal receptors, p53, ki67 and HER2/neu expression in epithelial ovarian carcinoma. *Clin Transl Oncol* (2008) 10:367-371
58. Gottfried E. Konecny, Boris Winterhoff, Teodora Kolarova, et al. Expression of p16 and Retinoblastoma Determines Response to CDK4/6 Inhibition in Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res*; 17(6) March 15, 2011
59. Surowiak P, Materna V, Maciejczyk A, Pudielko M, Suchocki S, Kedzia W, Nowak-Markwitz E, Dumanska M, Spaczynski M, Zabel M, Dietel M, Lage H. Decreased expression of p16 in ovarian cancers represents an unfavourable prognostic factor. *Histol Histopathol*. 2008 May;23(5):531-8.

60. Chambers SK, Martinez JD. The significance of p53 isoform expression in serous ovarian cancer. *Future Oncol.* 2012 Jun;8(6):683-6. doi: 10.2217/fon.12.60.
61. Pedro T. Ramirez, David M. Gershenson, Guillermo Tortolero-Luna, Lois M. Ramondetta, Dianne Fightmaster, J. T. Wharton, Judith K. Wolf. Expression of Cell-Cycle Mediators in Ovarian Cancer Cells after Transfection with p16INK4a, p21WAF1/Cip-1, and p53. *Gynecologic Oncology* 83, 543–548 (2001)
62. D. Katsaros, W. Cho, R. Singal, S. Fracchioli, I.A. Rigault de la Longrais, R. Arisio, M. Massobrio, M. Smith, W. Zheng, J. Glass, H. Yu. Methylation of tumor suppressor gene p16 and prognosis of epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 94 (2004) 685–692
63. L. YAN, W. NA, K. SHAN, M. XIAO-WEI, G. WEI, C. SHU-CHENG. p16(CDKN2) gene polymorphism: association with histologic subtypes of epithelial ovarian cancer in China. *Int J Gynecol Cancer* 2008, 18, 30–35
64. Tomoaki Kusume, Hiroshi Tsuda, Masami Kawabata, et al. The p16-Cyclin D1/CDK4-pRb Pathway and Clinical Outcome in Epithelial Ovarian Cancer. *Clinical Cancer Research* Vol. 5, 4152–4157, December 1999
65. Kazuya KUDOH, Yoshihito ICHIKAWA, Sadao YOSHIDA, Misako HIRAI, Yoshihiro KIKUCHI, Ichiro NAGATA, Masanao MIWA and Kazuhiko UCHIDA. INACTIVATION OF p16/CDKN2 AND p15/MTS2 IS ASSOCIATED WITH PROGNOSIS AND RESPONSE TO CHEMOTHERAPY IN OVARIAN CANCER. *Int. J. Cancer*: 99, 579–582 (2002)
66. Özuyar G. , Serviks Biyopsilerinde p16 ve Ki-67 ekspresyonunun ayırıcı tanıdaki yeri, uzmanlık tezi , Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim Hastanesi, Patoloji Kliniği, İstanbul, 2008.