

T.C.

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD

**EPİTELİYAL OVER KANSERLERİNDE APOPTOTİK İNDEKSİN VE
P53 VE BCL-2 GEN EKSPRESYONLARININ SÜRVİV VE
KLİNİKOPATOLOJİK FAKTÖRLERLE OLAN İLİŞKİLERİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Bülent BERKER

Danışman: Prof. Dr. Sevim Dinçer CENGİZ

88373

ANKARA, 1999

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

İhtisas dönemim süresince eğitimimde emekleri bulunan başta tez danışmanım ve Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sevim Dinçer Cengiz olmak üzere tüm Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD. öğretim üyelerine, Patoloji ABD. başkanı Prof. Dr. Selim Erekul'a, immunohistokimyasal boyama ve değerlendirme işlemlerini birlikte gerçekleştirdiğimiz patoloji ABD. öğretim üyesi Doç. Dr. Arzu Ensari'ye ve patoloji ve immunohistokimya laboratuvarları çalışanlarına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. EPİTELYAL OVER KANSERİ	4
2.2. APOPTOZİS.....	9
2.3. APOPTOZİS REGULATOR GENLERİ.....	28
3. MATERYAL VE METOD	36
4. BULGULAR.....	45
5. TARTIŞMA.....	67
6. SONUÇLAR.....	76
7. ÖZET.....	77
8. KAYNAKLAR	79

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Tüm jinekolojik kanserler arasında halen en kötü prognoza sahip olan epitelyal over kanserleridir (EOK) (1). Son yıllarda EOK'nin neoplastik gelişimi ile ilgili moleküler mekanizmalardan bazıları aydınlatılmışsa da bu konudaki bilgiler henüz yetersizdir. Sonuçta tüm bu değişiklikler hücre çoğalmasını uyararak tümoral hücrelere yaşam olanağı sağlamaktadır. Fakat bir dokunun büyümesi sadece hücre çoğalmasına değil aynı zamanda fizyolojik olarak gerçekleşen ve apoptozis olarak adlandırılan programlanmış hücre ölümüne de bağlıdır. Bu nedenle apoptozisi inhibe eden faktörlerin neoplastik büyümelere sebep olabileceği düşünülmektedir.

Apoptozis hücrenin kendi kendisini yokettiği intrensik bir mekanizma, başka bir deyişle programlı hücre ölümü olarak açıklanabilir. Embriyogenezde, hasara uğramış hücrelerin ortadan kalkmasında veya çeşitli patolojik durumlarda anormal hücre çoğalmasını dengelemekte rolü olan fizyolojik bir fenomendir. Apoptozisin indüklenmesi halinde DNA endonükleazlar aktive olmakta ve genetik materyal parçalanmaktadır. Apoptozis morfolojik olarak da saptanabilir. Bu durumda apoptotik hücrelerde kromatin kondensasyonu ve nükleer fragmentasyon görülecektir. Normal dokuda, apoptozis mitozla birlikte normal doku homeostazının sağlanmasında hayati öneme sahiptir. Kanser araştırmalarında geleneksel olarak hücre proliferasyonu üzerinde durulmuştur. Fakat son zamanlarda, karsinogenezle ilgilenen araştırmacıların dikkati apoptozise yönelmiştir. Bazı araştırmalarda, apoptozis oranının survival ve birtakım prognostik faktörler ile ilişkili olduğu görülmüştür; örneğin, yüksek

apoptotik indeksin non-Hodgkin lenfoma, meme kanseri, prostat kanseri gibi birtakım neoplazmlarda kısa surviv, yüksek mitotik indeks, yüksek histolojik grade gibi prognostik faktörlerle pozitif yönde korele olduğu saptanmıştır. Over kanserlerinde apoptozisin önemi konusunda çok fazla bilgi yoktur.

Büyüme ve karsinogenezisde etkili olan bazı onkogen ve supresör genler apoptozisin regulasyonunda da rol oynamaktadırlar. Bu genlerden en önemlileri bcl-2 ve p53'tür.

B-hücreli lösemi/lenfoma-2 (bcl-2) geni kromozom 18q21'de lokalize bir protoonkogendir. Hematolojik hücre serilerinde bcl-2 gen ürününün apoptozisi inhibe eden bir protein olduğunun anlaşılmasından kısa bir süre sonra bcl-2'nin non-hematolojik hücre serilerinde de rol oynadığı görülmüştür. bcl-2 proteinin etki mekanizması henüz tam olarak anlaşılmamakla beraber oksidatif fosforilasyonda ve/veya mitokondrial elektron ve metabolit transferinde rol oynadığı düşünülmektedir. Bcl-2'nin esas etkisi apoptozisi önleyerek hücre yaşamını uzatmasıdır. bcl-2'nin ve apoptozisdeki regulatuar rolünün over kanserlerindeki önemi konusunda henüz yeterli bilgi yoktur.

Tümör supresör gen ailesinin bir üyesi olarak kabul edilen p53 geni, 17.kromozomun kısa kolu üzerinde yerleşmiştir (17p13) (2). Günümüzde sitogenetik, moleküler ve immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak, insan kanserlerinde en sık saptanan gen değişikliğinin p53 tümör supresör geninde olduğu saptanmıştır. Benzer şekilde kadın genital sisteminin birçok malignitesinde de p53 geninde değişiklikler olduğu bildirilmiştir. Epiteyal over tümörlerinde erken evrede % 16-40, ileri evrede % 50 oranında p53 genmutasyonu saptanmıştır (3).

p53 geninin DNA sentezi, onarımı ve programlı hücre ölümünün kontrolünde rol oynadığı bilinmektedir. Bu genin inaktive olması ya da fonksiyonunu kaybetmesi karsinogenezin ilk basamağını oluşturan önemli bir süreçtir (4). Bu çalışmanın amacı; epitelyal over kanserlerinde apoptotik indeksin ve p53 ve bcl-2 gen ekspresyonlarının sürviv ve çeşitli klinikopatolojik faktörlerle olan ilişkilerinin araştırılmasıdır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. EPİTELYAL OVER KANSERİ

Epitelyal kanserler en sık rastlanan over malignitesi olup metastaz yapana kadar asemptomatik seyrettiğinden vakaların 2/3'ünden fazlası ileri evrelerde saptanır. Over kanseri majör bir cerrahi, yoğun ve karışık bir tedavi ve hastanın psikolojik ve fizik gücünü gerektirmektedir. Jinekolojik malignite vakaları arasında en yüksek ölüm oranına sahiptir.

Epitelyal over kanserlerinin % 80'den fazlası postmenopozal kadınlarda görülmektedir. İnsidens 62 yaşında pik yapmaktadır. 45 yaş öncesi bu tümörler nispeten nadirdir. Epitelyal over kanserlerinin %1'den azı 21 yaş öncesi gelişmektedir (5).

Epitelyal over kanserlerinin çeşitli histopatolojik tipleri vardır (Tablo 1).

Tablo 1. Epitelyal Over Kanseri

Seröz	Müsinöz	Endometrioid	Berrak hücreli	Brenner	İndiferansiye
-------	---------	--------------	----------------	---------	---------------

Epitelyal over kanserlerinin % 75'i seröz histolojik tipindedir. Daha az rastlanılanlar arasında müsinöz (% 20), endometrioid (% 2), berrak hücreli, Brenner ve indiferansiye kanserler sayılabilir. Bu son üç histolojik tip kanser hücrelerinin herbiri % 1'den az görülmektedir.

2.1.1. Semptomlar

Epitelyal over kanserli kadınların büyük bir çoğunluğunda uzunca bir süre semptom görülmeyebilir. Gelişen semptomlar da çoğunlukla müphem ve spesifik değildirler. Hasta premenopozal dönemde erken evrelerde düzensiz

kanamalardan şikayetçi olabilir. Pelvisteki kitlenin mesane veya rektuma bası yaptığı durumlarda hastada sık idrara çıkma ve konstipasyon şikayeti görülebilir. Bazen alt karın distansiyonu, disparoni gibi ağrılar hissedilebilir. Rüptür ve torsiyona bağlı akut ağrılar nadirdir.

Hastalığın ileri devrelerinde hastalar çoğu kez asit, omental ve barsak metastazlarına bağlı semptomlardan şikayet ederler. Bu semptomlar arasında abdominal distansiyon, şişkinlik, konstipasyon, bulantı, anoreksi veya erken tokluk sayılabilir. Premenopozal kadınlar düzensiz veya ağır menslerden şikayetçi olurken postmenopozal kadınlarda vaginal kanama olabilir.

2.1.2. Prognostik Faktörler:

Lezyonun evresi ve yapısını da içeren morfolojik ve histolojik patern önemli prognostik faktörlerdir. Histolojik tipin fazla prognostik öneminin olmadığı düşünülmekteydi ise de son zamanlarda bazı araştırmalarda berrak hücreli karsinomların diğer histolojik tiplere oranla daha kötü bir prognoza sahip olduğu bildirilmiştir (6).

Diferansiasyon yapısı veya hücresel anaplazi derecesi ve diferansiye olmamış hücrelerin oranı ile belirlenen histolojik evrenin prognostik önemi vardır. Bununla birlikte, over kanserlerinin evrelemesinin tekrarlanabilirliğinin araştırılması aynı araştırmacının farklı zamanlarda ve araştırmacılar arasında yüksek değişkenliğin bulunduğunu göstermiştir. Tümörlerin belirgin olarak heterojen olması ve gözlem farklılıklarının bulunması histolojik evrelemenin bağımsız bir prognostik faktör olarak değerlendirilebileceğini tam olarak ortaya koyamamıştır. Baak ve arkadaşları (7) özellikle düşük evreli veya sınırdaki

tümörleri diğerlerinden ayırabilen prognoz ile uyumlu morfolometrik analize dayalı standart bir evreleme sistemi öne sürmüşlerdir.

Birçok biyolojik faktörler ile over epitel kanserlerinin prognozu arasında bir ilişki mevcuttur. Friedlander ve arkadaşları (8) flow sitometri kullanarak over kanserlerinin genelde anöploid olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca diğerleri gibi onlar da FIGO sınıflamasındaki evre ile ploidi arasında yüksek bir korelasyon saptamışlardır; bir başka deyişle erken evrelerde diploidi, ileri evrelerde ise anöploidi hakimdir (9). Diploid tümörleri olan hastaların ortalama sürvileri (5 yıl) anöploid tümörlere oranla (1 yıl) belirgin olarak daha uzundur. Çok değişkenli analizler ploidin önemli bir prognostik faktör olduğunu ve sağkalımın en önemli belirteçlerinden biri olduğunu göstermiştir. Flow sitometri analizi aynı zamanda hücre siklusu hakkında bilgi sağlar ve bu tetkikle belirlenen proliferasyon fraksiyonunun (S fazı) bazı çalışmalarda prognozla ilişkisi olduğu saptanmıştır (5).

60'dan fazla proto-onkogen belirlenmiş ve çalışmalar bu genetik lokusların amplifikasyonu veya ekspresyonu ve over kanserinin gelişim ve ilerlemesindeki rollerini belirlemeye yönelmiştir. Örnek olarak Slamon ve arkadaşları (10) epitelyal over tümörlerinin % 30'unda HER-2/neu onkogeninin var olduğu ve bu grubun özellikle 5'ten fazla gen kopyasının bulunduğu hastaların daha kötü prognoza sahip olduklarını bildirmişlerdir (10). Berchuck ve arkadaşları (11) benzer bir HER-2/neu insidansı (% 32) bildirmişlerdir. Serilerinde bu gen ekspresyonlu tümörleri olan hastaların daha kötü bir median sağkalım oranına sahip olduğunu saptamışlardır (15,7 aya karşılık 32,8 ay). Diğer çalışmalarda bu bulguları destekler mahiyettedir. Leary ve arkadaşlarının

yaptığı literatür taramasında (12) HER-2/neu insidansının sadece % 11 olduğu tespit edilmiştir. Bir başka deyişle HER-2/neu geninin over kanserindeki prognostik değeri hala kesin değildir ve ek araştırmalar gerekmektedir.

Evrenin yanında primer cerrahi sonrası kalan rezidü miktarı, asit hacmi, hasta yaşı ve performansı diğer bağımsız prognostik faktörler içerisinde yer alır (13). Dembo ve arkadaşları evre I hastalığı bulunanlarda yaptıkları çok değişkenli analizde tümör grade'i ve pelvik peritoneal yoğun yapışıklıkların prognoz üzerinde belirgin ters etkilerinin bulunduğunu buna karşılık intraoperatif rüptür veya tümör hücrelerinin dökülmesinin bir etkisinin olmadığını saptamışlardır.

2.1.3. Evrelendirme

Epitelyal over maligniteleri Uluslararası Kadın Hastalıkları ve Doğum Federasyonunun (FIGO) sistemine göre evrelendirilmektedir. 1987 evreleme sistemi Tablo 2'de listelenmiştir. FIGO evrelemesi cerrahi eksplorasyon esnasındaki bulgulara dayanmaktadır. Preoperatif değerlendirme ile ekstrapitoneal metastazların olmadığı saptanmalıdır.

Tam bir cerrahi evrelemenin önemi tartışılmaz olup daha sonraki tedavi hastalığın evresine göre belirlenecektir.

Tablo 2. FIGO Primer Over Kanseri Evrelemesi

Evre I: Overlerde sınırlı büyüme	
Ia	Büyüme tek bir overle sınırlı, malign hücre içeren asit yok. Dış yüzeyde tümör yok; kapsül intakt.
Ib	Büyüme her iki overde sınırlı, malign hücre içeren asit yok. Dış yüzeyde tümör yok; kapsül intakt.
Ic	Ia veya Ib'deki tümör ile beraber tek veya her iki over yüzeyinde tümör; veya kapsül rüptüre; malign hücre içeren asit; pozitif peritoneal yıkama.
Evre II: Pelvik yayımlı bir veya iki overi içeren tümoral büyüme	
IIa	Uterus ve/veya tubalara yayılım ve/veya metastaz
IIb	Diğer pelvik dokulara büyüme
IIc	IIa ve IIb tümör ile beraber iki over yüzeyinde tümör; veya rüptüre kapsül; veya malign hücre içeren asit veya pozitif peritoneal yıkama
Evre III: Bir veya iki overi içeren tümör ile birlikte pelvis dışına peritoneal yayılım ve/veya pozitif retroperitoneal veya ingüinal düğümler. Yüzeyel karaciğer, ince barsak veya omentuma histolojik olarak kanıtlanmış malign yayılım mevcuttur.	
IIIa	Tümör büyük oranla gerçek pelvisle sınırlı ve lenf nodu yok ancak histolojik olarak kanıtlanmış abdominoperitoneal yüzeylere yayılım mevcut.
IIIb:	Tek veya her iki over ile birlikte 2 cm'yi geçmeyen peritoneal yüzeylere histolojik olarak kesinleşmiş yayılım bulunan tümör yok.
IIIc:	2 cm'den büyük abdominal yayılım ve/veya pozitif retroperitoneal veya ingüinal lenf nodları.
Evre IV: Uzak metastazlı tek veya iki overi içeren büyüme. Plevral effüzyon mevcut ise, vakayı evre IV olarak değerlendirebilmek için sitolojik test sonuçları pozitif olmalıdır. Parenkimal karaciğer metastazı da Evre IV'dür.	

2.2. APOPTOZİS

Apoptozis (fizyolojik hücre ölümü ya da programlanmış hücre ölümü) biyoloji alanında olduğu kadar temel ve klinik tıp bilimlerinde de yoğun ilgi odağı olan bir konu olarak dikkati çekmektedir. Hücre ölümüne yol açan iki ana mekanizmadan biri olan apoptozis organizmada fizyolojik koşullarda pek çok sistemin homeostazını sağlayan önemli, önemli olduğu kadar da ilginç bir mekanizmadır. Hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri programlı, aktif RNA/protein sentezine ve enerjiye gereksinim gösteren bu fizyolojik ölüm formu, patolojik bir hücre ölümü olan nekrozdan tamamen farklıdır (tablo 3). Embriyogenez ve farklılaşma yanı sıra normal hücre siklusu sırasında da meydana gelen apoptozisi "ekstrasellüler çevreden etkilenen bir biyokimyasal ve genetik olaylar dizisi" olarak tanımlamak yerinde olacaktır.

Apoptozisin önemi, çeşitli biyolojik olaylarda gereksiz, hasarlı ya da zararlı hücrelerin yok edilmesini sağlamasından ve organizmanın iç dengesinin devamlılığına katkıda bulunmasından ileri gelmektedir. Fetal gelişim sırasında morfogenez uğrayan organlarda, uzuvlara ait tomurcuklarda, sinir sisteminde, mezenşimal epitelyal geçişin olduğu metamorfozlarda fizyolojik hücre ölümü karşımıza çıkmaktadır. Hormona duyarlı dokularda hormon etkisi sonucu oluşan doku gerilemelerinde, örneğin androjen eksikliğine bağlı prostat hipoplazisinde yine apoptozisin etkileri yadsınamaz. Apoptozis gelişimde rol oynadığı gibi gastrointestinal sistem, karaciğer ve epidermis gibi devamlı yenilenen ortamlarda da kendini gösteren bir olaydır. B ve T hücrelerinin klonal ayırımını sağlayarak bağışıklık sisteminin çeşitliliğinin artmasına etkili olan apoptozis öze tepkisel hücrelerin yok olmalarını sağlayarak otoimmünite de rol oynamaktadır.

Kerr, Wyllie ve Currie 1972'de fizyolojik koşullar altında gerçekleşen aktif hücre ölümünü tanımlamışlardır. Bu hadise için "nekroz"un uygun olmayan bir terim olduğunu farkederek "apoptozis" terimini öne sürmüşler, doku boyutunun regüle edilmesinde mitozla zıt yöndeki rolünü vurgulamışlardır. Düşen ya da dökülen anlamına gelen ve Homeros tarafından sonbaharda ağaçların dökülmesini tanımlamak için kullanılan apoptozis sözcüğü, Aberdeen Üniversitesi'nde klasik Yunanca profesörü James Cormack tarafından önerilmiştir (14,15).

2.2.1. Morfoloji

Apoptozis, dokularda hücreleri eşzamanlı olmadan etkiler ve karakteristik olarak inflamatuvar değişiklikler gözlenmez. Apoptotik hücre ölümü, temel olarak iki aşamada gerçekleşir; Bunlardan ilki, neticede sağlam organeller içeren membranla çevrelenmiş, birkaç parçaya ayrılacak olan nükleus ve sitoplazmanın kondanzasyonu, ikincisi de apoptotik cisimler olarak adlandırılan bu parçalanmış hücre fragmanlarının komşu hücreler tarafından fagosite edilerek hızlı bir şekilde bozulmasıdır (16).

2.2.2. Elektron mikroskopi:

İlk gözlenen olay, kromatinin keskin bir şekilde yuvarlaklaşmış, uniform şekilde yoğun nükleer katlantıları taşıyan, hilal şeklindeki yoğunlaşmasıdır. Nükleer değişikliklerle aynı anda apoptotik hücreler komşu hücrelerden veya kültür substratından ayrılır. Desmozomları yıkıma uğrar, mikrovililer gibi özelleşmiş yüzey yapıları kaybolur. Hücre hacmi azalır, yoğunluğu artar, sitoplazmik organeller birbirine yaklaşır. Bu arada hücrenin ana hatları

belirgindir. Nükleus çeşitli fragmanlara ayrışabilir ki bu fragmanlar içindeki kromatin ayrışması kalıcıdır.

Bu sıradaki sitoplazmik değişiklikler arasında ise şunlar sayılabilir; sitoskeletal flamanların birleşmesi, ribozomal partiküllerin yığınlar oluşturmaları ve sekretuar hücrelerde kaba endoplazmik retikulumdan kaynaklanan çok sayıda şeffaf vakuolün subplazmalemmal sitoplazma içinde görülmesi. Bu vakuoller plazma membranı ile kaynaşabilirler ve SEM ile görülebilen yüzey kraterleri meydana getirebilirler.

Tanımlanan sitoplazmik ve nükleer değişimlerle çok yakından ilgili olarak bol sitoplazma içeren hücrelerde yaygın yüzey çıkıntıları en iyi SEM ile gösterilebilir. Bu çıkıntılar neticede, plazmalemmanın örtülmesiyle membran ile sınırlı kondanse sitoplazma ve çok sayıda sağlam organel içeren çeşitli boyutlarda apoptotik cisimler oluşturarak ayrılır ve interselüler alanlar boyunca sıkışır.

İn vivo olarak apoptotik cisimler hemen oluşur oluşmaz komşu epitel hücreleri, mononükleer fagositler veya tümör hücreleri tarafından fagosit edilirler. İntraepitelial makrofajlar özel olarak glandüler epitellerde oluşan apoptotik cisimlerin uzaklaştırılmasında önemli rol oynar. Fagosit edilen apoptotik cisimler otofajik vakuollerden kromatin ve sindirici hücreye yabancı organel içermeleri ile, epitelial hücrelerde ise geniş boyutları ile ayırdedilebilirler. Apoptotik cisimler fagositoya uğrar uğramaz sindirici hücreden kaynaklanan lizozomal enzimler ile çözülürler. Apoptosis hızlı olduğunda fagositler bol miktarda, değişken oranda yıkıma uğramış apoptotik cisim içerebilirler. Sonuç olarak bunlar granüler ve amorf, elektron yoğun rezidüel cisimlere indirgenirler.

Luminal glandüler epitellerde değişken oranlarda apoptotik cisimler bez lümeni içine atılırlar. Bu tip cisimler ve kültür ortamında fagositozdan kaçanlar, yaklaşık 1 saat içinde bütünlüklerini kaybederler. Sonuçta şişkinlik, yoğunluk kaybı, membran yırtılması ve organel bozulması ile sekonder nekroz olarak adlandırılan parçalanma gerçekleşir (14,16).

Faz kontrast mikroskopu ile kültür ortamında apoptozise uğrayan hücrelerde hücre büzülmesi ve yüzey konvolüsyonu hızlı başlar. Bunun sonucunda da çıkıntılar tomurcuklanarak apoptotik cisimleri meydana getirirler. Tüm hadise birkaç dakikada meydana gelir. Aksine in vivo olarak kısa bir apoptozis dalgası ile meydana gelen cisimler 1-2 saat histolojik olarak gözle görülebilir halde kalır. Yani apoptozisin eşzamanlı olmadan meydana geldiği dokular içinde tomurcuklanan hücreler nadir görülür. Ancak dejenerasyonun değişik safhalarındaki apoptotik cisimlere rastlanır.

THE UNIVERSITY OF MICHIGAN

Ultrastrüktürel olarak karakteristik hilal şeklindeki kromatin öbekleri 5 mikronluk parafin kesitlerinde ve smearlarda çok nadir gözlenir. Çoğunlukla kromatin, yoğun, uniform bazofilik kitleler halindedir.

Çeşitli dokularda farklı isimlendirilmiş büyük apoptotik cisimlere normal ve patolojik durumlarda rastlanır. Karaciğerdeki Councilman cisimleri, barsak kriptalarındaki karyolitik cisimler, lenf nodüllerinin germinal merkezindeki ve derideki makrofajlarda tingible cisimleri, liken planustaki civatte cisimleri bunlar arasında sayılabilir. Zaman içinde oluşan apoptotik cisimlerin sayısının çok fazla olduğu yerlerde, makrofajlar içindeki yıkımları lipofuskin pigmenti oluşumu ile sonuçlanır ki; bu da en iyi melanosis koli de görülür.

Apoptotik cisimlerin fagositozu makrofajların bir inflamatuvar cevap başlatmalarına neden olmaz. Apoptotik cisimlerin uzaklaştırılmaları sırasında inflamasyonun olmaması ve ortaya çıkan boyut farklılıklarının rezidüel hücreler tarafından kapatılması apoptozisi histolojik olarak nisbeten farkedilemeyecek hale getirir. Bir doku içinde apoptozisteki küçük artışlar bile, kaydadeğer kümülatif hücre kaybını temsil edebilir. Aradaki seviye farklılıklarının rezidüel hücreler tarafından kapatılması doku büzülmesi ile sonuçlanır. Genellikle normal yapıda çok az bir bozulma olur. Yani indüklenmiş atrofinin tamamlanmasına doğru karaciğer ve adrenal glandlar histolojik olarak normal yapıda görülür (14,16).

Tablo 3. Nekroz ve Apoptozisin Karşılaştırması :

ÖZELLİK	NEKROZ	APOPTOZİS
<i>Dağılım</i>	Komşu hücre grupları	Dokuda tek tek dağılmış hücrelerde
<i>Nedenler</i>	Daima patolojik	Fizyolojik-patolojik
<i>Eksüdatif yangı ve nötrofil infiltr.</i>	Genellikle görülür	Yoktur, apoptozis hücre sel immünite ile uyarılmışsa makrofajlar bulunabilir
<i>Işık mikroskopi</i>	Hücre sınırları düzensiz, bazofili kaybı, nükleusta piknoz karyoreksis ve karyolizis	Erken: kromatin kenarda yoğunlaşır, hücre bazılarında nükleus kalıntıları bulunan oval ya da yuvarlak eozinofilik partiküllere dönüşür.
<i>Elektron mikroskopi</i>	Hücre komponentlerinde şişme, organel ve plazma membranında parçalanma kromatin erime ve kaybı	Kromatinin nükleus membranı da yoğunlaşması, sitoplazmik yoğunlaşma, hücre yüzeyinde kabartılar, nükleusun parçalanması, membranda tomurcuklanma ve organel içeren apoptotik cisimciklerin oluşması
<i>Hücre kalıntılarının temizlenmesi</i>	Mononükleer fagositik sistem tarafından fagositik ve parçalanma, temizlenme süresi nekroz alanının genişliği, mikrosirkülasyonun sürekliliği ve fagositlerin miktarına bağlı	Apoptotik cisimler, komşu hücreler tarafından hızla alınır ve parçalanır. EM ile görülen apoptotik cisimlerin çoğunda parsiyel degradasyon vardır. Yangısal reaksiyon yoktur.
<i>Mekanizma</i>	Hücre bütünlüğünü sağlayan mekanizmaların incinme ile bozulmasına bağlı ilerleyici kimyasal ve yapısal parçalanma	Makromolekül sentezini gerektiren aktif hücre sel yıkım olayı

2.2.4. Apoptozisin Biyokimyasal ve Genetik Regölasyonu

Apoptozis, T hücre reseptörü, Fas/Apol, steroid, Transforme edici büyüme faktörü beta (TGF β) ve tümör nekroz faktör (TNF) reseptörleri gibi bir dizi reseptörün stimölasyonuyla başlatılabilir. Timositlerde, self toleransın teşviki sırasında T lenfositlerin klonal silinme mekanizmalarını anlayabilmek için hücresel apoptozise aracılık eden sinyal iletim mekanizmalarına ait, pek çok çalışma yapılmaktadır.

En detaylı olarak bilinen hücre tipi olan timositlerde yapılan bu çalışmalarda, apoptozis sırasında meydana gelen bazı değışiklikler tarif edilmeye çalışılmıştır. Bu modele göre apoptozis, T hücre aktivasyonu veya dolaşımında adenoazin ve glikokortikoid seviyelerinin artırılması ile teşvik edilebilir. Bu fizyolojik programların herbiri apoptozisi stimüle edebilir. Bu farklı indükleyicilerin hücreye sinyal iletim yollarında benzerlikler vardır. (Örneğin; artmış intraselüler Ca²⁺ ve gen ekspresyonunda meydana gelen değışiklikler gibi.) Öte yandan her indükleyicinin sinyal transdüksiyon metodu kendine özgüdür. Yani T hücre reseptör aktivasyonu veya adenoazin muamelesi yoluyla apoptozis indüksiyonu, sitoplazma içinde nükleer değışikliklere yol açan ayrı sinyal transdüksiyon yolları izler. Glukokortikoid sinyali ise nükleusa direkt olarak glukokortikoid reseptör yoluyla transfer edilir, böylelikle bazı sinyal yollarını es geçer. Bu nöbetleşe birbirini izleyen alternatif sinyal yollarına rağmen bu sinyallerin belli bir noktada apoptotik programın ilerlemesine izin veren ortak bir basamak veya basamaklarda bulunduğu öne sürölmüştür. Apoptozisin RNA ve protein sentez inhibitörlerince bloke edildiği timositlerde, bu basamak bir ya da daha fazla genin ekspresyonundaki bir değışim seviyesinde

olabilir. Toksinler ve kanser kemoterapötik ajanlar gibi nonfizyolojik faktörlerin timositlerde apoptozisi indüklemeye yetenekleri, fizyolojik yollarından birini suni olarak stimüle etme yeteneklerine bağlı olabilir. Bu, interselüler Ca^{2+} 'u artırarak, stimülatör PKA (Protein Kinase A) yolunu açarak, PKC (Protein Kinase C) eylemini bloke ederek veya direkt olarak gen ekspresyonunu değiştirerek yapılabilir (16).

Sitozolik iyonize Ca, apoptozisin yapısal değişikliklerine yardım eden latent enzimleri aktive eder. Bu enzimler, kalsiyum bağlı endonükleaz, transglutaminaz ve calpain gibi kalsiyum bağlı proteazlardır.

Hızlı ve düzenli DNA fragmentasyonu uzun zamandır apoptozisin biyokimyasal ayırtedici özelliği olarak kabul edilmektedir. Başlangıçta DNA'nın 300- ardından da 50 kilo base çiftli fragmanlara ayrışması, daha sonra da inter nükleozomal DNA'nın apoptozise uğrayan hücrelerin tümünü değil de çoğunu etkileyen çift bölünmesi vardır (14).

Interleukin-1 β -converting enzyme (ICE) ve granzyme B gibi sitoplazmik proteinazlar apoptozisin çarpıcı hücresel değişikliklerinin oluşturulmasında etkilidir. Endonükleaz, DNA parçalanması ve kromatin kondanzasyonunda; calpain olarak adlandırılan proteaz ise, sitoskeletonun bozulması ve hücre büzülmesinde etkilidir (17). Öte yandan apoptozisin daha ileriki safhalarında aktive olan doku transglutaminazları yüksek oranda çapraz bağlı subplazmalemmal protein iskeletleri oluştururlar ki bunlar apoptotik cisimlerden fagosite edilmesinden önce potansiyel olarak zararlı intraselüler enzimlerin salınımını önler (14).

Komşu hücreler tarafından apoptotik cisimlerin fagosit edilmelerinde, apoptotik cisimlerde tanınmalarını sağlayan, spesifik bazı kimyasal değişimlerin olduğu düşünülmektedir. Fagositoya uğrayan hücrelerin, hızlı bir şekilde ortadan kaldırılması sırasında bir inflamatuvar cevap başlatabilen ve potansiyel olarak zararlı intraselüler bileşenlerin salınması engellenir.

Apoptozis sonucunda hücre yüzey karbonhidratları spesifik değişikliklere maruz kalır. Hücre membranlarında glukoproteinlerin yan zincirlerinden sialik asit rezidüvlerinin bilinmeyen bir mekanizma tarafından kaybıyla normalde maskelenmiş olan N-asetil glukozamin, N-asetil galaktozamin ve galaktoz ortaya çıkar. Bu rezidüvler sayesinde, apoptotik cisimlerin yüzeyi, makrofaj üzerinde varolduğu düşünülen lektinler ile etkileşim için geçerli hale gelir (18).

Apoptotik hücrelerin tanınmasını içeren spesifik mekanizmalar hücre tipi ile değişkenlik gösterebilir. Örneğin, nötrofillerde apoptotik hücrelerin tanınmasında, makrofajların üstünde mevcut olan $\alpha V\beta 3$ vitronektin reseptör integrini aracılık yapar. Makrofaj tarafından salgılanan trombositin CD36 için, bir ligandır ve CD36'ya karşı oluşturulan monoklonal antikor, eozinofiller ve lenfositler tarafından makrofajın tanınmasını önler. Bunun aksine timositlerde membran fosfolipitlerinin asimetrisi ile, fosfatidilserinin açığa çıkması fagositoz ve uzaklaştırma için bir sinyal olabilir. Fagositler üzerinde, $\alpha V\beta 3$ integrin reseptörünü, ve karbonhidrat değişikliklerini tanımak için olduğu kadar apoptotik hücreler üzerindeki fosfatidilserini tanımak için de reseptörler bulunur. Tanıma ve uzaklaştırma mekanizması, hücre tipi ve fagositoya yönelik olabilir (27).

Apoptotik Sinyal İletimi ve Moleküler Mekanizmalar

Apoptoza yol açan uyarı hücreye, yaşamını sürdürücü endokrin, parakrin, otokrin uyarıların kesilmesi (19), çeşitli hasar yapıcı patolojik ve fizyolojik etkenler (20) veya "Fas ligandı" örneğinde olduğu gibi başka hücrelerin yüzeyinde bulunan moleküller şeklinde gelebildiğine göre bu farklı uyarılar ortak ölüm programını nasıl aktif hale getirmektedirler? Apoptotik ölüm programının efektör ve regülatörleri nelerdir? Bu soruların yanıtları ayrıntılı olarak bilinmese de özellikle son birkaç yıldaki çalışmalar aşağıda tartışılacağı gibi olayın ana hatlarının anlaşılmasını sağlamıştır.

Hücre içi sinyal iletiminin moleküler mekanizmaları gene son yıllarda yoğun olarak çalışılmaktadır. Apoptotik sinyal iletimiyle ilgili bugüne kadarki bulgular çoğalma ve farklılaşma gibi başka sinyallerin iletiminde görev alan molekül ve enzimlerden apoptotik sinyal iletiminde de yararlanıldığını göstermektedir. Doğal olarak hücre içi sinyal iletim sisteminin farklı bileşenleri farklı derecelerde kullanılmaktadır.

Kalsiyum

Hücre içi sinyal iletiminde yaygın olarak kullanılan Ca^{++} iyonlarının sitozoldeki konsantrasyonunun apoptoz sırasında yükseldiği pek çok sistemde gözlenmiştir (21). Farklı adenilat siklazları aktive ve inhibe etme yeteneğiyle Ca^{++} , cAMP ve protein kinazlar üzerinden sinyal iletimini etkileme yeteneğindedir. Hücre içi cAMP yükselmesinin farklı hücrelerde apoptozu uyardığı belirtilmektedir (22). Ancak sitozolde Ca^{++} yükselmesinin cAMP'den bağımsız olarak da apoptoz yaratabildiği yolunda bulgular vardır (12). Sitozolde Ca^{++} artışının apoptozu nasıl uyardığı açık değildir. Öne sürülen potansiyel

mekanizmalar arasında Ca^{++} iyonlarının inaktif durumdaki proteaz ve nükleazları aktive etmesi, fosfolipazı aktive ederek mitokondri membran hasarı yaratıp ATP sentezini düşürmesi olasılıkları (21) sayılabilir. Çekirdek DNA'sının apoptotik parçalanmasında görev alan endonükleazın Ca^{++} tarafından aktive edilip proteolizden korunurken, Zn^{++} tarafından inhibe edilmesi Ca^{++} iyonlarının Zn^{++} ile kompetisyona girerek endonükleazı aktifleştirebileceğini düşündürmüştür. Hücre içi Zn^{++} iyonlarının çelasyonunun apoptoz yaratması bu yönden ilginçtir, ancak kanıt olarak değerlendirilemez.

Ca^{++} hücre içinde homojen olarak dağılmamıştır ve normalde endoplazmik retikulum (ER) lümeninde sitozolden daha yüksektir. Bu yükseklik büyük oranda bir Ca^{++} - ATPaz pompa proteininin ATP harcayarak Ca^{++} iyonlarını sitozolden ER lümenine taşımaya bağlıdır. Bu Ca^{++} -ATPaz'ın spesifik inhibitörü olan "Thapsigargin"ın ER Ca^{++} iyonlarını azaltıp sitozolde artırması ve apoptoza neden olması (23) Ca^{++} etki mekanizması yönünden anlamlıdır. Ca^{++} iyonlarının ER lümeninden kaybı başka etkenlerle gelişen apoptotik hücre ölümlerinde de görülmüştür.

Protein Kinaz C

Tümör promotori phorbol esterlerinin protein kinaz C (PKC)'yi uyardıkları bilinmektedir. Phorbol esterlerinin lenfosit ve nöronlarda apoptozu önleyici etki gösterdikleri bulunmuştur. Bu bulgular daha sonra PKC'yi aktive eden farklı tümör promotorlerinin, 7 farklı hücre çeşidinin hepsinde de farklı yollarda uyarılan apoptozu önlediklerinin bulunmasıyla desteklenmiştir. PKC inhibitörlerinin çoğalmakta olan hücrelerde apoptoz yaratmaları (24) gene PKC'nin anti-apoptotik etkisiyle uyumludur.

PKC'nin apoptozu nasıl engellediği açık değildir. C-fos gen ekspresyonunu, dolayısıyla transkripsiyon faktörü AP1 oluşumunu sağlayarak anti-apoptotik etkili başka genlerin ekspresyonuna yol açma olasılığı tartışılmıştır. Diğer taraftan PKC aktivasyonu ile hücre içi daha alkali hale gelirken apoptoz sırasında hücre içinin daha asit hale geçtiği de öne sürülmüştür (24).

Redoks Reaksiyonları

Pro-oksidan maddeler ve oksidatif hasarın çok sayıda farklı hücrede apoptoz yarattığı bulunmuştur. Ayrıca anti-oksidan etkileri bilinen redükte glutatyonun (GSH) hücre içi konsantrasyonunun artırılması sadece oksidatif hasar yarattıkları bilinen uyarılarla gelişen apoptozu değil, hücreye gelen çoğalma faktörlerinin uzaklaştırılmasıyla gelişen apoptozu da önleyebilmiştir. İki bağımsız çalışma Bcl-2'nin antioksidan etki gösterdiğini ve oksidatif hasar gelişimini engelleyebildiğini göstermiştir (25,26). Bir ekspresyon vektörü üzerinden bcl-2 ekspresyonu nöronlarda GSH konsantrasyonunu bazal seviyenin iki katına çıkarmış ve pro-oksidan maddeler tarafından yaratılan apoptozu önleyici etki göstermiştir .

Genetik Regülasyon

Apoptozis en azından başlangıç aşamalarında eksternal veya internal sinyallere karşı spesifik genlerin aktivasyonuna ihtiyaç duyan aktif bir hadisedir. Ancak genetik regülasyonu tam olarak anlaşılmış değildir. Regülasyonda nispeten daha iyi anlaşılmış genler c-myc, p53, bcl-2'dir (28).

Nükleer protoonkogenlerden myc ailesi, hücre gelişimi, diferansiyasyonu ve transformasyonu esnasında kritik rol oynar. Hücresel transformasyona c-

myc'in nasıl yardım ettiği henüz tam olarak bilinmemektedir. c-myc protein ekspresyonu hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonuyla çok yakından alakalı olmasına rağmen c-myc ekspresyonu tüm koşullar altında apoptozisin indüksiyonu için şart değildir (29).

Nitekim c-myc fonksiyonu üzerinde yapılan çalışmalar, mikro çevreye bağımlı olmak kaydıyla myc regülasyonunun proliferasyon ve hücre ölümü arasındaki dengeyi değiştirdiğini göstermiştir. Örneğin, serum ve oksijen azalması durumunda bu denge apoptozisle hücre ölümü lehine bozulur. Oysa ortamda insülin benzeri büyüme faktörü 1 gibi büyüme faktörleri varsa, myc tarafından deregüle olmuş hücrelerin serum ile atılması engellenir ve denge proliferasyon lehine değişir (30).

Günümüzde apoptozisin spesifik supresyonunun bcl-2 tarafından sağlandığı kabul edilmektedir. bcl-2 (B cell lymphoma-leukemia-2 gen), orijinal olarak, t(14:18) translokasyonu taşıyan B hücre lenfomalarının kromozomal kırılma noktasında ayırdd edilir. bcl-2 nin aşırı ekspresyonunun, apoptozisi bloke etmek yoluyla hücresel proliferasyona etki etmeden hücrelerin hayatta kalma sürelerini uzatabildiğı gösterilmiştir (31). bcl-2'nin fonksiyonel bütünlüğü bir bcl-2 proteininin bax proteini ile heterodimerize olması ile sağlanır. Bu bcl-2/bax heterodimeri, hücre ölümünü engelleyen fonksiyonel ünitii meydana getirir. Örneğin yüksek oranda bcl-2 eksprese eden timositlerde apoptozise karşı direnç geliştii görülmüştür. Bu yolla hücre hayatının devamını destekleyen bcl-2 mutasyonları, malign transformasyonu kolaylaştırır. Meme, akciğer ve kolon kansinomlarında bcl-2'nin artmış ekspresyonu tedavi metodlarına cevap verip vermemelerinde etkili olabilir (31).

Farklı lösemi türlerinin ilaç tedavisine hassasiyetlerinin incelendiği bir çalışmada yüksek seviyede bcl-ekspresyonu ile apoptozisi indükleyen birkaç kanser kemoterapetik ilaca karşı kuvvetli direnç göstermeleri arasındaki korelasyon gösterilmiştir (32).

Diğer taraftan bax proteininin aşırı üretimine bağlı olarak, bax dimerleri kendi aralarında dimerize olurlar ve bax/bax homodimerleri meydana getirirler. Bu durumda bcl-2'nin homoloğu olarak bax'ın fonksiyonunda bcl-2'ye göre farklılık meydana gelir. Bu farklılığın apoptozisi tetikleme yönünde değil de yalnızca apoptozis hızına ivme kazandırma yönünde olduğu düşünülmektedir (33).

Normal p53 proteini çok kısa bir yarı ömre sahiptir. Aslında histolojik kesitlerde görülmez. Aksine apoptozisin indüklenmesinde etkisiz olan mutant p53, karsinomların hemen hemen yarısında kolayca saptanabilir. Bunlar arasında sıklıkla kötü prognoza sahip meme, kolon, pankreas karsinomları sayılabilir (34).

İnsan malignitelerinde sıklıkla mutasyona uğrayan p53 tümör süpresör geni, DNA hasarı ardından apoptozisin başlamasında kritik öneme sahiptir. DNA hasarına karşı G1S kontrol noktasında hücre siklusunu durdurur. İyonize radyasyon ardından radyasyona uğrayan hücrelerde p53 proteini seviyeleri artar. DNA tamiri için zaman sağlanır. Şayet tamir mümkün değilse hasarlı hücreler apoptozisle ortadan kaldırılır (34).

Yapılan son çalışmalar, 5-floururacil, etoposide, cisplastin gibi bazı antikanser ajanlar ve iyonize radyasyon tarafından tetiklenen apoptozis indüksiyonunun, wt-p53 (wild type)'e ihtiyaç duyduğunu göstermiştir. Bu yüzden

çok basamaklı karsinogenez sırasında prekanseröz hücrelerde tümör süpresyonunu teşvik edici olarak p53'ün değişmesi p53 bağlı apoptozisin kaybıyla hücrelerde apoptozise karşı direnç gelişir ve hayatta kalma avantajı kazanırlar (29).

2.2.5. Apoptozise Bağlı Olarak Ortaya Çıkan Bazı Fizyolojik Ve Patolojik Olaylar

Apoptozisin fizyolojik ve gelişimsel olaylarda önemli rolü vardır, fakat çeşitli patolojik durumlardaki hücre ölümlerini de açıklar. Aşağıda apoptozisin görüldüğü durumların özeti sunulmaktadır.

Normal Gelişim Sırasında Apoptozis:

Metamorfoz esnasında az gelişmiş omurgalılarda larval organların regresyonu, örneğin bir iribaşın kurbağaya dönüşürken kuyruğunu kaybetmesi gibi, morfolojik olarak tipik apoptozis ile gerçekleşir.

Omurgalılarda birçok vücut sistemlerinin gelişiminde apoptozis devreye girer. Buna birkaç örnek sunulacak olursa; damak yarıklarının füzyonu sırasında füzyon ilerledikçe gereğinden fazla epitel, apoptozise uğrar. Sinir sisteminin gelişimi sırasında meydana gelen hücre ölümü çok yaygın şekilde araştırılmıştır, apoptozis şeklindedir ve astrositler, oligodentrositler ve nöronları içeren çeşitli hücre tiplerini etkiler (35). Nöronların % 50 kadarı hedef hücreleri ile sinaptik bağlanmalar yaptıktan hemen sonra ölürler. Hücre ölümünün nöronların hedef hücrelerden spesifik hayatta kalma faktörlerini alamamalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. İntrauterin hayat esnasında memeli barsak mukozasındaki epitel hücreleri, apoptozise uğrarlar. Böylece lümen genişler ve villuslar oluşur. Normal gelişen sıçan böbreğinde metanefrik

mezenkimal hücreler apoptozis için programlanmıştır. Bunlar üreterik tomurcuk hücrelerinden gelen hayatta kalma sinyallerini alamazlarsa ölürler. Wolffian duktusunun bir dışa uzantısı olan üreterik tomurcuk tarafından mezenkimin işgal edilmesi apoptozisi bloke eder ve mezenkim epitele dönüşerek diferansiye olur.

Apoptozis, immun sistemin hem gelişiminde hem de devamında anahtar rol oynar. Gelişmekte olan timusta, T hücre reseptörü immatür T hücrelerini apoptozise indükler. Self-reaktif T hücreleri bu yolla elimine olur. B hücrelerinin toleransının indüksiyonunda da muhtemelen apoptozis rol alır. Benzer bir hadise ile otoreaktif B hücreleri yok edilir (35).

Yetişkin Dokularda Normal Hücre Siklusu:

Hücrelerin spontan apoptotik silinmesi yavaş ve hızlı proliferen olan memeli hücre popülasyonlarının değişmez bir özelliğidir. Beyin ve kalp gibi predominant olarak postmitotik hücre içeren dokularda normal koşullarda apoptozis saptanmaz.

Yavaş proliferen olan (örneğin, karaciğer, pankreas, prostat ve parotis bezi gibi) dokularda az sayıda apoptotik cisimler bulunur. Karaciğerde bunlar terminal hepatik venülün yanı sıra olan zon 3'te bulunur.

Gastrointestinal epitel gibi hızlı proliferen olan dokularda iyi tanımlanmış proliferasyon ve apoptozis zonları vardır. İnce barsakta apoptotik hücreler en sıklıkla villusların uçlarına doğru görülür.

Lenf nodüllerinde, antijen bağlama yeteneklerine göre seçildikleri için germinal merkez sentrositleri arasında yüksek bir ölüm oranı vardır. Seçilmeyenler apoptozise uğrar ve germinal merkez makrofajlarını gördüğü tingible cisimleri haline dönüştürürler.

Kemik iliğindeki megakaryosit kalıntıları, sitoplazmalarının çoğunu plateletler halinde açığa çıkardıktan sonra apoptozis yoluyla ölür. Yaşlanmış nötrofiller de apoptozise uğrar. Böyle hücreler tanınır ve makrofajlar tarafından fagosite edilir. Böylece bunlar ölürken, lizozomal enzimleri salmaları ve inflamatuvar cevabın büyümesi engellenmiş olur (35).

Birçok hücre popülasyonlarının boyutu, ilgili faktörlerin dolaşım içindeki seviyeleri düştüğü zaman hücre kaybına yol açan büyüme faktörleri ve hormonların kontrolü altındadır. Bu hücre kaybı daima apoptozla olur.

Normal yetişkin insan memesinde duktusun ve duktuler epitel hücrelerinin mitozu, 28 günlük bir menstrual siklusun 25.gününde maksimumdur. Apoptozis ise 28.günde maksimuma ulaşır. Burada apoptotik zirve lobüler epitel içindeki bcl-2 proteininin immun boyanmasındaki keskin düşüşle karşılıklı ilişki halindedir. Apoptotik hücreler glandüler lümenler içine atılmak yerine, komşu epitelial myoepitelial ve intraepitelial makrofajlar tarafından fagosite edilirler (36).

Diğer dokularda involüsyon stimulusu bilinmemektedir. Sürmekte olan dişlerin çevresindeki dokuların rezorbsiyonu da apoptozisi gösterir (4).

Hücre aracılı immünite:

Sitotoksik T hücreleri, K hücreleri ve doğal katil hücreler tarafından teşvik edilen hücre ölümü de apoptozis şeklinde olup, bunlar immun denetiminin bir parçasıdır.

T hücre aracılı apoptotik hücre ölümü, aynı zamanda transplant rejeksiyonu, konağa karşı greft hastalığı, akut ve kronik hepatit, primer bilier siroz ve liken planusta da etkili olabilir (37).

İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV) tarafından CD4+ T hücresi apoptozunun uygun olmayan teşviki, AIDS'nin patogenezinde etkili olabilir. AIDS'te lenfosit azalmasının mekanizması şayet gerçekten apoptozis ise apoptozisteki metabolik bir basamağın bloke edilmesi immün yetmezliğin başlamasını geciktirebilir (38).

2.2.6. Kanserde Apoptozis:

Kanser, DNA'daki değişikliklerin yol açtığı anormal hücre akümüasyonu olarak tanımlanır. Hücre ölümü ile hücre bölünme oranlarının karşılaştırılması hızlı kanser gelişimini açıklar. Bazı tümör hücreleri normal hücrelerden daha yavaş bölünürler, ancak hücrelerin hayatta kalma sürelerinin uzaması kanser gelişiminin devamına neden olur. Birçok karsinogen DNA hasarına neden olur. Bu aşamada hücre bu tür zedelenmeye birkaç değişik yolla cevap verir. Hücre bölünmesi DNA hasarının tamirinden sonraya ertelenir, şayet tamir mümkün değilse hasarlı hücre apoptozise gidebilir ya da hücre aralıksız olarak hücre büyüme siklusu ile bölünmeye devam eder. Bu anlamda apoptozis, genetik lezyonlu hücrelerin ortadan kaldırılmasıyla malign transformasyonu önler.

Multistep karsinogenezis sırasında kanser hücreleri p53 gibi çeşitli genlerde mutasyona maruz kalırlar. Bu genetik değişikliklerin birikimi ile hücreler dış uyarılara tamamen duyarsız, apoptozise dirençli hale gelirler ve kontrolsüz olarak prolifer olurlar. Fakat kanser hücrelerinde ölüm sinyal yolunun hangi genler ve hücresel faktörler tarafından ve nasıl düzenlendiği henüz bilinmemektedir.

Anormal p53 ve bcl-2 ekspresyonu sonucunda ortaya çıkan ve bozulmuş apoptozis indüksiyonu, şüphesiz birçok tümörün oluşum ve ilerlemesine

katılmaktadır. Bunun yanında aslında her malign tümörde bir miktar apoptozis olduğu ve bunun belirgin şekilde tümör büyümesini geciktirdiği düşünülmektedir. Burada muhtemelen orta şiddette iskemi, sitotoksik T lenfositler tarafından infiltrasyon, makrofajlar tarafından salınan $TNF\alpha$ ve apoptozisin intrinsik aktivasyonu olaya katılır. Ayrıca radyoterapi, hipertermi ve kemoterapi en azından apoptozisi teşvik etmeleri ile tümör regresyonunu desteklerler (29). Fakat fonksiyonel p53 içermeyen veya bcl-2 eksprese eden tümörler sıklıkla bu ajanlara dirençlidir. Birçok antikanser ajanın primer hücresel hedefleri tanımlanmış olsa da kanser hücrelerinin selektif hücre ölümüne veya ilaca direncin moleküler bazına ait hadiseler hakkında bilinenler çok azdır. İyonize radyasyon gibi belli stimuluslara karşı apoptotik cevap gelişmesi için p53 şarttır. Fonksiyon gören p53 içermeyen tümör hücre dizileri wt-p53 transfer edilerek apoptozis yapabilir hale getirilebilmektedir (23). Farklı tiplerde tümörlerde devreye giren tümör baskılayıcı gen p53, hem bir gen spesifik transkripsiyon faktörü, hem de belli genlerin transkripsiyonunun spesifik bir inhibitörü olarak fonksiyon görür. wt-p53 eksprese etmeyen tümör hücrelerinin wt-p53 reekspresyonunun iki fizyolojik sonucu vardır: G1 arresti ve apoptozis. p53 tarafından G1 arrestinin mekanizması, apoptozisi tetikleme yeteneğinden daha iyi tanımlanmıştır. Bir transkripsiyon faktörü olarak p53, sikline bağlı kinazların (CDKs) bir inhibitörü olan p21^{WAF/CIP1/Sd11}in ekspresyonunu indükler. Yani G1 arresti sadece p53 tarafından indüklenmiş p21^{WAF/CIP1/Sd11} ekspresyonu ile gelişebilir (34).

Ebstein Barr virüs proteinleri lenfoma hücrelerinde bcl-2 protein ekspresyonunu artırır. Büyüme faktörlerinin ortamdaki eliminasyonu ortadan kaldırılmasından

sonra aşırı bcl-2 eksprese eden hücrelerin normal B lenfositlerle karşılaştırıldığında, hayatta kalma sürelerinin daha uzun olduğu ve iyonize radyasyon ve glukokortikoidlere direnç kazandıkları görülmüştür. bcl-2'nin aşırı ekspresyonu c-myc tarafından indüklenen apoptozisten hücreleri korur (17).

Apoptozisin genetik kontrollerinin ve biyokimsayal mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasıyla hastalık proseslerindeki katılımını modüle eden terapötik stratejilerin geliştirilmesi ümit edilmektedir.

2.3. APOPTOZIS REGULATÖR GENLERİ

2.3.1. Tümör supresör gen, p53

DNA hasarı, onkogen aktivasyonu, çeşitli sitokinler veya sitokin yokluğu, hipoksi ve ısı şoku p53 bağımlı apoptozise yol açar. Bu nedenle p53 hücre hasarının tamirinde yer aldığı gibi karsinojenik potansiyeli de sınırlar.

p53'ün hangi biyokimyasal basamaklarla apoptozisi indüklediği henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Öne sürülen bir mekanizmaya göre p53, bcl-2 gen ailesinden olan bax'ın transkripsiyonunu bcl-2'ye oranla daha fazla artırarak apoptozisi sağlamaktadır. İkinci bir yol bcl-2'nin transkripsiyonunun baskılanması, üçüncü bir yol ise bcl-2 ailesinin diğer üyelerinin etkilerinin modifikasyonudur. Gen ekspresyonu gerektirmeyen diğer bir yol ise p53'ün apoptozisle ilgili proteinle kompleks oluşturmasıdır.

Normal hücreler DNA hasarına maruz kaldıklarında iki şekilde cevap verirler: hücre siklusu aresti veya apoptozis; p53 bunların her ikisinde de yer alır. Bu sonuçlardan hangisinin görüleceği hücre tipi ve etki eden ajana bağlıdır. Mekanizmaları farklı olan bu iki yol arasında çeşitli durumlarda ilişki olabilir (34).

Günümüzde kanser araştırmalarında en büyük çaba, spesifik gen değişiklikleri ile tümörün klinik davranışı arasındaki ilişkiyi araştırmaya yöneliktir. Kanser gelişimine neden olan genetik değişiklikler tek bir basamaktan ibaret olmayıp, kompleks bir olaylar zinciridir. Bu genetik değişikliklerin meydana gelmesinde onkogenlerin hücre proliferasyonunu indüklemesinin yanı sıra, tümör suprese edici genlerin çoğalmayı inhibe edici etkilerinin ortadan kalkması da rol oynamaktadır (3).

Tümör suprese edici genler, normal hücre genomunda varolan heterojen bir gen grubudur. Tümör suprese edici genlerin fizyolojik fonksiyonu, hücre çoğalmasını regüle etmektir. Bu genlerin inaktivasyonu veya kaybı, hücre çoğalmasının regülasyonunda bozukluklara yol açarak kontrolsüz hücre proliferasyonuna ve sonuçta tümöral gelişime neden olur (39).

Günümüzde sitogenetik, moleküler, immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak insan kanserlerinde en sık saptanan gen değişikliğinin, p53 tümör supresör geninde olduğu saptanmıştır. Tümör supresör gen ailesinin bir üyesi olarak kabul edilen p53 geni. 17 kromozomun kısa kolu üzerinde yerleşmiştir (17p13.1). p53 geni ilk olarak 1979 yılında David Lane tarafından tanımlanmıştır (2).

p53 geninin DNA sentezi, onarımı ve programlı hücre ölümünün kontrolünde rol oynadığı bilinmektedir. Bu genin inaktive olması ya da fonksiyonunu kaybetmesi karsinogenezisin ilk basamağını oluşturan önemli bir süreçtir (40).

Akciğer, kolon ve meme kanserleri, glioma, kronik myeloid lösemi, sarkoma, mezotelyoma gibi birçok tümör grubunda p53 mutasyonları tespit

edilmiştir. Benzer şekilde kadın genital sisteminin birçok malignitesinde de p53 geninde değişiklikler olduğu bildirilmiştir. Epitelyal over tümörlerinde erken evrede % 16-40, ileri evrede % 50, endometrium kanserinde % 10-31, serviks tümörlerinde % 5 oranında p53 gen mutasyonu saptanmıştır (3).

p53 geninin fizyolojik aktivitesini kaybetmesi değişik mekanizmalarla olmaktadır. Kromozom 17'de allel kaybı veya mutasyon gelişmesi sonucunda p53 geninin tümör supresör aktivitesi kaybolur. p53 genini diğer tümör supresör genlerden ayıran en önemli özellik, tümör oluşumunu baskılayıcı fonksiyonunun kaybı için hücrede tek bir allelin inaktivasyonunun yeterli olmasıdır. Knudson tarafından ortaya atılan bir hipoteze göre, bir tümör supresör genin fonksiyonunun ortadan kalkması için her iki allelin de inaktivasyonu gerekmektedir. Buna karşın mutant p53 proteininin, hücrel "heat shock protein" (hsc 70) ile oluşturduğu komplekse normal p53 proteinin de dahil olması ile, uzun yarı ömürlü fonksiyon görmeyen kompleksler oluşur. Böylece normal p53 proteini inaktive olur. Sonuçta bir mutant ve bir normal allel taşıyan hücrede, fonksiyonel p53 aktivitesi izlenmez. Bu tip mutasyonlara "dominant negatif" denir, çünkü mutant allel dominant olarak davranır ve normal allelin fonksiyonunu engeller (34).

p53 geninde fonksiyon kaybına neden olabilecek birçok mutasyon tanımlanmıştır. Nokta mutasyonlar, intragenetik delesyonlar vs. bunlar arasındadır. Nokta mutasyonların rastgele olmadığı, yaklaşık % 90'ının genin orta 1/3'ünde lokalize olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda oluşan nokta mutasyonların büyük çoğunluğunda baz insersiyonu veya delesyonundan çok, baz substitusyonu olduğu gösterilmiştir. Bu tip mutasyonlara "sıcak nokta"

mutasyonları adı verilir, bazı tümör gruplarında sıklıkla izlenirken, bazılarında nadiren gözlenirler (34, 41-43).

p53 geninin kodladığı p53 proteini, normal hücrelerde düşük seviyelerde bulunan 393 aminoasitli bir nükleer fosfoproteindir. İlk olarak 1979 yılında Simian Virus-40'ın (SV-40) büyük tümör antijeni ile kompleks oluşturabilme özelliğinden dolayı tanımlanmıştır. 53 kD ağırlığındaki p53 proteini, hücre çoğalmasında bir düzenleyici protein olarak rol oynamaktadır (3,34).

"Wild-tip" olarak da bilinen normal p53 proteini (wt-p53), hücre çoğalması üzerinde negatif regülatör etkiye sahiptir. Bu protein tüm normal hücrelerde düşük seviyelerde mevcuttur. Fizyolojik koşullarda wt-p53 proteininin yarı ömrü 20-30 dakikadır. Bu nedenle normal hücrelerde wt-p53 immunoreaktivitesi izlenmez.

Hücreler kimyasal madde, radyasyon, ultraviyole ışınları gibi mutajenik ajanlara maruz kaldığı zaman wt-p53 proteininde değişiklikler meydana gelir. Normalde çok kısa yarı ömüre sahip olan protein, stabilize olarak hücre nükleusunda birikir. Yarı ömrü uzayarak 24 saate kadar ulaşır ve DNA'nın spesifik bölgelerine bağlanarak hücre siklusunun G1 fazında duraklamasına neden olur. Bu duraklama dönemi ile DNA'daki hasarın giderilmesi için hücreye zaman tanınmış olunur.

Hücre içindeki artmış wt-p53 proteini aynı zamanda, spesifik olarak apoptozisi aktive etme özelliğine sahiptir. Bilindiği gibi apoptozis, toksik maddeler ve DNA hasarına yol açan ajanlara maruz kalan hücrelerin geçirdiği bir kontrol sürecidir. DNA hasarı meydana geldiğinde hücrelerin apoptozis

geçirmeleri için, normal fonksiyon gösteren wt-p53 proteinine ihtiyaç vardır (34, 41-45).

Buna karşın p53 geninde meydana gelen değişiklikler sonucunda, normal p53 proteini bu fonksiyonunu kaybeder. Sonuçta oluşan mutant p53 proteini hücre çoğalmasını inhibe etme ve apoptozisi indüklemeye özelliğine sahip değildir. Aynı zamanda mutant form, normal p53 proteini ile oligomerik kompleksler oluşturarak fonksiyonunu kaybetmesine neden olmaktadır (29,34).

Mutasyonlar sonucunda şekil değişikliğine uğrayan ve stabilitesi artan p53 proteinin yarı ömrü uzar. Bu nedenle, transforme hücrelerde ve tümörlerde immunohistokimyasal olarak tespit edilebilmektedir. Mutant p53 proteini DNA'ya bağlanma özelliğine sahip değildir. Sonuçta DNA hasarını takip eden hücre siklusunun G1 fazında duraklama meydana gelmez ve böylece DNA hasarlı hücreler giderek çoğalırlar. Bu arada ek mutasyonlar ve genetik hasarlar da olaya katılabilir (29,34).

2.3.2. Bcl-2

B-hücreli lösemi/lenfoma -2 (bcl-2) geni kromozom 18q21'de lokalize bir proto-onkogendir ve ilk olarak B-hücreli lösemi ve foliküler non-Hodgkin lenfomada gözlenen t (14;18) kromozom translokasyonu çalışmalarında 1984 yılında saptanmıştır (46). Bu translokasyon sonucunda 18. Kromozomda lokalize gen, 14.kromozomdaki ağır zincir immunglobulin geninin (IgH) yanına yerleşir ve bcl-2/IgH füzyon geni oluşarak artan miktarda bcl-2 ekspresyonu olur.

Bcl-2 ekspresyonunun önceleri sadece t (14;18) translokasyonu gösteren B hücre malignansilerinde görüldüğü düşünülürken daha sonraki çalışmalar,

bcl-2 ekspresyonunun bu kromozomal anormalliği göstermeyen lenfo proliferatif hastalıklarda ve normal lenfoid hücrelerde de olduğunu göstermiştir (47).

Bcl-2, 26 kD büyüklüğünde ve hidrofobik karboksi ucuyla intrasellüler membranlara yerleşen ve geri kalan kısmının sitozolde kaldığı bir membran proteinidir. Subselüler lokalizasyon çalışmaları bcl-2'nin mitokondrial dış membranda, nükleer membran ve endoplazmik retikulumda yerleştiğini göstermiştir (48). bcl-2'nin görevi hücre ölümünü baskılamak ve bu yolla hücre proliferasyonunu etkilemeden yaşam süresini uzatmaktır. Bcl-2 ile homolog sekansa sahip bir grup gen tariflenmiş ve bunlara bcl-2 gen ailesi adı verilmiştir. Bu gen ailesinin en önemli özelliği hücre ölümüyle ilgi olmalarıdır. Bu ailedeki genler fonksiyonel olarak antagonist olan iki gruba ayrılabilirler:

- 1) Hücre ölümünü baskılayanlar : bcl-2, BCL-XL ve MCL-1 gibi,
- 2) Hücre ölümünü destekleyenler : Bax, Bcl-Xs ve Bad gibi.

Bcl-2'nin hücre ölümü ve yaşamı ile ilgili regulatuar rolünün epitelyal diferansiyasyon, morfogenezis ve tümörigenezis için de önemli olduğu giderek artan kanıtlar sayesinde anlaşılmaktadır (49).

Bcl-2'nin apoptozisi engelleyici etkisi ilk olarak B lenfosit çalışmalarında gösterilmiştir. Yaşamak ve büyümek için interlökin (IL-3)'e bağımlı olan B hücre grubunun kullanıldığı bu çalışmada Vaux ve arkadaşları, bcl-2'nin overekspresyonunun IL-3 yokluğunda bu hücrelerin yaşamasına izin verdiğini göstermişlerdir (52). Bcl-2'nin hücre çoğalması üzerinde direkt bir etkisinin olmadığı düşünülmektedir; çünkü bcl-2 overekspresyonu hücre çoğalması ve hücre siklusu paterninde bir değişikliğe sebep olmamaktadır. Bcl-2'nin hücreleri

apoptozisten kurtarması hücre siklusunun herhangi bir fazında olabilir. Fakat kesin mekanizması bilinmemektedir.

Bcl-2 proteininin ekspresyonu sadece hematopoietik dokularla sınırlı değildir; çeşitli embriyonik ve yetişkin nonhematopoietik dokularda da görülmektedir. Bunlar şu şekilde özetlenebilir: 1) Tükrük ve ter bezleri ve pankreası da içeren tüm exokrin salgı bezlerinin duktal hücrelerinde 2) Kök veya çoğalan hücrelerde, bazal keratinositler gibi 3) Hormonal uyarıya cevap veren hücrelerde, uterus düz kas ve bez hücreleri, meme duktal epitelyumu gibi (50).

Çeşitli epitelyal malignansilerde bcl-2 ekspresyonu immunohistokimyasal olarak gösterilmiştir. Örneğin, nazofarengial (% 80), meme (% 79), prostat (% 76) kanserlerinde ve daha düşük oranlarda akciğer, mide ve mesane kanserlerinde (% 10). Normal epiteldeki topografik ekspresyon paterni iyi diferansiye tümörlerde de korunuyor gibi görünmektedir. Örneğin, derinin ve nazofarenksin iyi diferansiye skuamöz kanserlerinde bcl-2 ekspresyonu bazal hücrelerle sınırlıdır (51).

Bcl-2 geni selüler ve viral onkogenlerle işbirliği yaparak hücresel immortalizasyon ve/veya transformasyona yol açabilmektedir. Bu kooperatif etki Vaux ve arkadaşları tarafından lenfoid sistemde bcl-2 ve c-myc arasında gösterilmiştir (52). Çeşitli çalışmaların sonucunda bcl-2 ekspresyonunun hücre yaşamını uzattığı ve böylece hücreleri kromozomal anormallikler, viral enfeksiyonlar gibi risklerle daha fazla maruz bırakarak malign transformasyon veya tümör progresyonuna yol açtığı görüşü belirmiştir.

Son yıllardaki çalışmalar bcl-2 ve bax genlerinin p53 tarafından regüle edildiğini göstermektedir. Bcl-2 gen ailesinden olan bax (bcl-2 associated gene X), bcl-2 ile heterodimerler oluşturarak apoptozisi artırır. P53'ün iki farklı fonksiyonu vardır: G1 fazında hücre siklusu arrestini ve apoptozisi indüklemek. P53 bağımlı apoptozis bcl-2 ekspresyonunun veya fonksiyonunun baskılanması yoluyla gerçekleşir. P53, bax upregulasyonuna veya bcl-2 downregulasyonuna yol açarak hücre ölümünü indükler (31, 53-55).

Bcl-2'nin lokalize olduğu üç organel olan mitokondri, nükleus ve endoplazmik retikulumda kalsiyumun regülasyonu mekanizmalardan birisi olabilir. Fakat bu model, apoptozisin kalsiyum tarafından yürütülmediği durumları açıklamada yetersiz kalmaktadır. Bcl-2 nükleer membranda lokalize olduğundan, nükleazın aktivasyonunun sebep olduğu DNA hasarını engelliyor olabilir (49). Bcl-2 bir antioksidan olarak görev yapabilir. H₂O₂ ve gama-irradiasyonunun indüklediği apoptozisin blokajı buna örnek verilebilir. Fakat bu model de anaerobik koşullarda bcl-2'nin bloke ettiği apoptozisi açıklamada yetersizdir.

Epitelyal tümörler lenfoid malignansilere kıyasla kemoterapi ve radyoterapiye daha dirençlidirler. Bir hipoteze göre prostat kanserinde görüldüğü üzere artmış bcl-2 ekspresyonu bu rezistansın sebebidir. Fakat bcl-2 ile terapötik rezistans ve kötü prognoz arasındaki ilişki henüz diğer malignitelerde gösterilememiştir. Bunun için daha ileri çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. HASTA SEÇİMİ

Bu araştırmada çalışma grubu kapsamına 1990-1997 yılları arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda opere edilmiş 50 epitelyal over kanser (EOK) olgusu alınmıştır. Olgulara total abdominal histerektomi ve bilateral salpingooferektomi, appendektomi ve/veya pelvik-paraaortik lenfadenektomi ve/veya omentektomi yapılmış ve bunun yanısıra kemoterapi uygulanan olgulara ise tedavi rejiminin mutlak plastosin içermesine dikkat edilmiştir.

Hastaların klinik kayıtları incelenerek yaş, cerrahi evre ve takip süreleri hakkında bilgi edinilmiştir. Bu çalışmada EOK tanısı konan olguların ortalama yaşı 53.5 (25-71) olarak hesaplanmıştır. Cerrahi evrelemede FIGO sistemi kullanılmış ve olgular çalışma kapsamı içerisinde evre I-II ve evre III-IV olmak üzere iki ana grup halinde sınıflandırılmışlardır. Bu çalışmada ortalama izlem süresi 45 (10-93) ay olup olguların 11'i (% 22) izlem sürecinde kaybedilmiştir.

3.2. HİSTOPATOLOJİK KONVANSİYONEL İNCELEME:

Çalışmadaki 50 olguya ait AÜTF Patoloji Anabilim Dalı'nda bulunan % 10 formalin ile fikse edilmiş parafin bloklar arşivden çıkartılarak yeniden incelenmiştir. Bu bloklardan yapılan 6µ'luk kesitler Hematoksilen_Eozin (HE) yöntemi ile boyanarak, tümörün histolojik subtipi, grade'i ve mitoz sayısı tek bir patolog tarafından değerlendirilmiştir (Resim 1-6).

Dünya Sağlık Örgütü'nün sınıflandırma sistemine göre tiplendirme ve gradelendirme yapılmıştır. Grade 1 (iyi diferansiye), adenokarsinomda glandüler morfoloji iyi korunmuş ve solid alanlar lezyonun % 10'dan az; grade 2 (orta

derecede diferansiye), solid alanlar lezyonda % 10-50 oranında yer tutuyor; grade 3 (kötü diferansiye), tümörün % 50'den fazlası solid alanlardan oluşuyor. Mitoz sayısı, on adet 400 büyütme mikroskop alanında mitotik hücrenin sayılıp, ortalamalarının alınmasıyla hesaplanmıştır. Çalışmamızdaki olgulara ait ortalama mitoz sayısı değeri 3.23 olarak bulunduğu için olgular, düşük mitoz sayılı (≤ 3.23) ve yüksek mitoz sayılı (> 3.23) olmak üzere iki grupta sınıflandırılmıştır. Olgular histolojik subtiplerine göre seröz ve müsinöz + endometrioid olmak üzere iki gruba ayrılmış ve değerlendirmeler bu gruplandırmaya göre yapılmıştır. Çalışmadaki olguların histolojik tip, grade ve FIGO evresine göre sınıflandırması tablo 4' de belirtilmiştir.

Tablo 4: EOK'li olguların Histolojik Tip, Grade ve FIGO Evresine göre sınıflandırılması

Histolojik Tip	Grade			Cerrahi Evre		Total
	1	2	3	I + II	III + IV	
Seröz	9	20	5	7	27	34
Müsinöz+Endometrioid	6	6	4	7	9	16
Total	15	26	9	14	36	50

3.3. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEME

Tümör dokusundaki p53 ve bcl-2 ekspresyonunu değerlendirmek amacıyla her olguya ait ovaryal tümör dokusu içeren % 10'luk formalin tespitli parafin bloklardan 6µ'lik kesitler, polyisin kaplı lamlar üzerine alınarak hazırlanmıştır. Hazırlanan bu kesitler tablo 5'de belirtilen p53 ve bcl-2 streptavidin biotin peroksidaz immünohistokimyasal boyama yöntemi ile boyanmış ve takiben tüm preparatlar aynı patolog tarafından değerlendirilmiştir.

Tablo 5: İmmunohistokimyasal olarak p53 ve bcl-2 boyama yöntemi

1. DEPARAFİNİZASYON

37° C etüv-12 saat

67° C etüv-1 saat

Ksilen - 3x10 dk (dehidrasyon)

%100 etanol - 2x10 dk (rehidrasyon)

Distile su - 5dk

2. ENDOJEN PEROKSİDAZ AKTİVİTESİNİN BLOKAJİ

% 3 H₂O₂ - 5 dk

PBS (phosphate buffered saline=fosfat tampon solüsyonu) banyosu 5 dk

3. ANTİJEN AÇIĞA ÇIKARMA (RETRİEVAL) İŞLEMİ

"Antigen Retrieval Solution" (Biogenex) 5x5 mikrodalga fırında (750W)

(Her 5 dakikalık seans arasında mikrodalga içinde 1 dk)

Oda sıcaklığında 20 dk

PBS banyosu 5 dk

4. PROTEİN BLOKAJİ

Protein bloke edici solüsyon (Protein Blocking Solution-Zymed) - 20 dk

5. PRİMER ANTİKOR UYGULAMASI

Protein antikor 30 dk

PBS banyosu 5 dk

6. SEKONDER ANTİKOR UYGULAMASI

Sekonder antikor (Biotinylated Second Antibody-Zymed) 30 dk

PBS banyosu 5 dk

7. HRP-STREPTAVIDİN

Streptavidin peroksidaz solüsyonu (zymed) 20 dk

PBS banyosu 5 dk

8. KROMOJEN

AEC kromojen (Aminoethyl Carbazole Substrate Kit) 20 dk

PBS banyosu 5 dk

9. HEMATOKSİLEN

Mayer's hematoksilin 1 dk

Musluk suyu 3 dk

10. KAPATMA

İmmu-mount solüsyonu ile kapatma

Pozitif kontrol olarak p53 için tonsil ve bcl-2 için lenf nodu kullanılmıştır. İmmunohistokimyasal olarak p53 ve bcl-2 değerlendirmesinde ışık mikroskobu (Olympus Bx50) ve 400'lük büyütmeden yararlanılmıştır. Tüm preparatlardaki p53 ve bcl-2 boyanma yaygınlığı % (yüzde) olarak değerlendirilmiştir. Literatüre paralel olarak, incelenen kesitlerdeki tümör hücrelerinin % 10'dan fazlasının immünreaktifliği p53 ve bcl-2 gen ekspresyonu için pozitif kabul edilmiştir (20) (Resim 7-10).

3.4. APOPTOTİK HÜCRELERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Çalışma kapsamındaki olgulara ait overyal tümör dokularındaki apoptotik hücreleri değerlendirmek amacıyla parafin bloklardan 6µ'lik kesitler hazırlanmış ve insitu hibridizasyon yöntemiyle (Apopdetek / Cell Death Assay System Enzo kitiyle boyanarak) değerlendirilmiştir. Bu boya tekniğinin aşamaları tablo 6'de belirtilmiştir.

Tablo 6: İnsitu Hibridizasyon Yöntemiyle Apoptotik Hücrelerin Boyanması

A) Apoptotik Hücrenin İşaretlenmesi

1. Deparafinizasyon
2. Proteinaz-K (ready-to-use) ile proteinazların serbestleştirilmesi
3. % 0.3'lük H₂O₂ ile endojen peroksidaz aktivitesinin blokajı
4. PBS ile materyalin iki kez yıkanması.
5. Dengeleyici tampondan 2 damla eklenerek materyalin 37° C'lik nemli ortamda 5 dakika bekletilmesi
6. 45µl label reagent ve 5µl Terminal transferazdan oluşan Reaction Mixture'den 50µl eklenmesi ve 60 dakika 37° C'deki nemli ortamda bekletilmesi
7. PBS ile banyo 3 dakika.

B) Apoptotik Hücrelerin Belirlenmesi

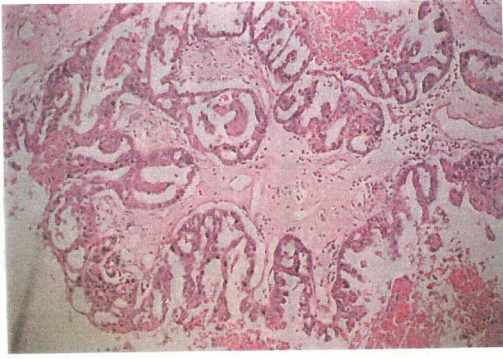
1. PBS banyosu 2 dk
2. Detection Reagent'dan 6-8 damla eklenip materyalin 37° C'de 60 dk inkübasyonu
3. PBS banyosu 1 dk.
4. Substrate Reagent ve DAB Reagent ile Renk Reaksiyonu Karışımının hazırlanması
5. Materyale bu karışımın eklenip 37° C'de 20 dk inkübasyonu
6. PBS banyosu
7. Tüm materyalin çeşme suyu içerisine konması
8. Zemin boyanması için "Blue Counterstain" ile 2 dk inkübasyon
9. Önce PBS sonra distile su ile banyo
10. Suyun mounting medium olarak kullanılıp lamaların kapatılması

Takiben tüm preparatlar ışık mikroskobu (Olympus Bx50) ile 400'lük büyütmede değerlendirilmiştir. Boyanmış preparatlardaki kahverengi depozitler pozitif reaktiviteyi göstermektedir (Resim 11,12).

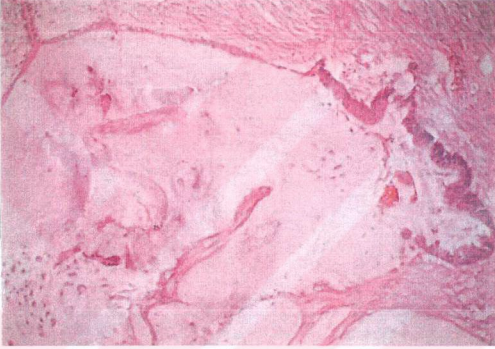
Her olguya ait preparatta 400 büyütmeli on adet mikroskop alanında en az 1000 tümör hücresi değerlendirilerek apoptotik hücreler sayılmış ve ortalamaları alınarak apoptotik indeks (AI) hesaplanmıştır. Çalışmamızdaki ortalama apoptotik hücre sayısı 2.48 olarak bulunduğundan olgular buna göre düşük AI'li (≤ 2.48) ve yüksek AI'li (> 2.48) olmak üzere iki gruba ayrılmışlardır.

3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

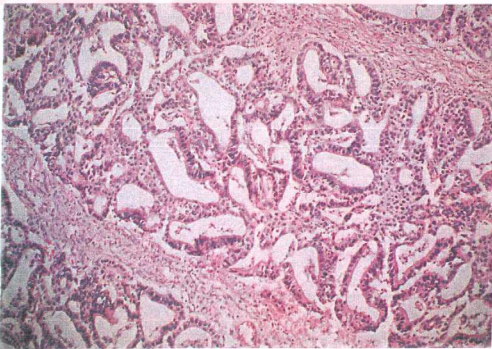
Epitelyal over kanserlerinde apoptotik indeks p53 ve bcl-2 gen ekspresyonunun sürviv ve klinokopatolojik faktörlerle olan ilişkisini araştırdığımız 50 hastadan oluşan bu çalışmamızda elde edilen veriler khi-kare



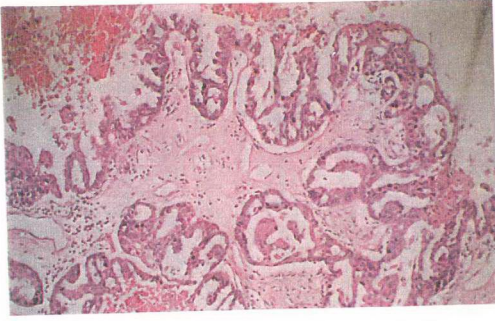
Resim 1. Seröz papiller kist adenokarsinom (H&E ; x100)



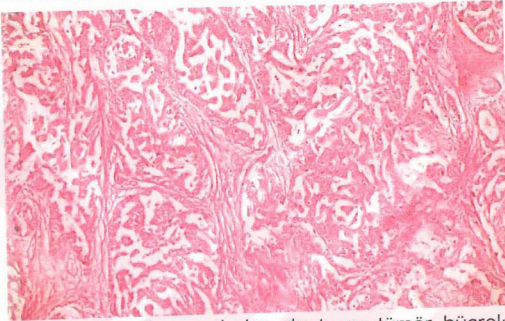
Resim 2. Müsinöz adenokarsinom (H&E ; x 100)



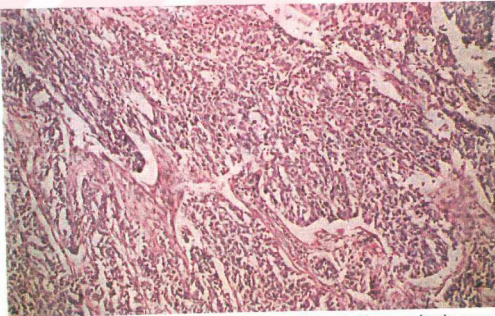
Resim 3. Endometrioid adenokarsinom (H&E ; x 100)



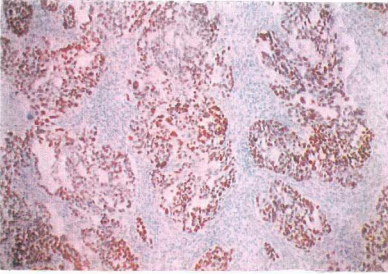
Resim 4. Belirgin papiller yapılar oluşturan tümör hücreleri: grade I, seröz papiller kist adenokarsinom (H&E ; x100)



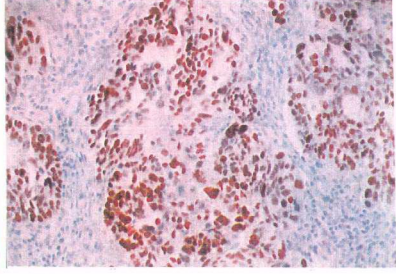
Resim 5. Kribriform sahalar oluşturan tümör hücreleri: grade II, seröz papiller adenokarsinom (H&E ; x 100)



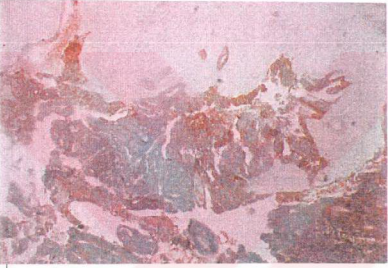
Resim 6. Solid adalar oluşturan tümör hücreleri: grade III, seröz papiller adenokarsinom (H&E ; x 100)



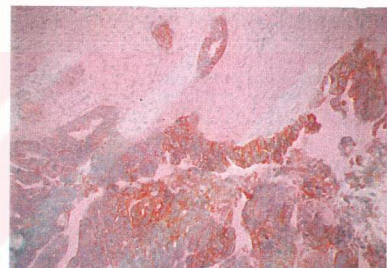
Resim 7. Tümör hücrelerinde kuvvetli nükleer p53 pozitifliği (x 100)



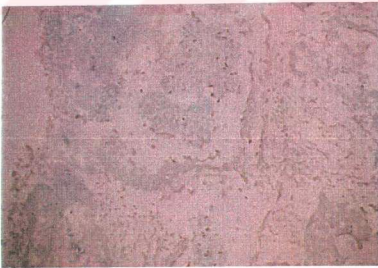
Resim 8. Tümör hücrelerinde kuvvetli nükleer p53 pozitifliği (x 200)



Resim 9. Tümör hücrelerinde perinükleer, stoplazmik bcl-2 pozitifliği (x 100)



Resim 10. Tümör hücrelerinde perinükleer, stoplazmik bcl-2 pozitifliği (x 200)



Resim 11. Apoptotik tümör hücreleri (ISH; x 100)



Resim 12. Apoptotik tümör hücreleri (ISH; x 200, okla pozitif hücreler gösterilmiştir.)

4. BULGULAR

Epitelyal Over Kanserlerinde apoptotik index, p53 ve bcl-2 gen ekspresyonlarının, klinikopatolojik faktörlerle ilişkisini incelemek amacı ile 50 olgu üzerinde yaptığımız bu çalışmada, aşağıdaki sonuçlar elde edilmiş ve bu olgulara ait tüm veriler tablo 7a ve 7b'de belirtilmiştir.

Tablo 7a: Olgulara Ait Klinikopatolojik Veriler

Özellik	Sayı	%
Yaş (yıl)		
Median	53,5	
Ranj	25 – 71	
Ortalama İzlem Süresi (ay)		
Median	45,12	
Ranj	10 -93	
Cerrahi Evre		
I	9	18
II	5	10
III	32	64
IV	4	8
Histolojik Tip		
Seröz	34	68
Müsinöz + Endometrioid	16	32
Histolojik Grade		
1	15	30
2	26	52
3	9	18
Hayatta Kalım		
Yaşayan	39	78
Ex	11	22
Apoptotik İndeks (Ai)		
Median	2,48	
Ranj	0 – 10	
Mitoz Sayısı (MS)		
Median	3,23	
Ranj	0,3 – 15,7	
p53 ekspresyonu		
negatif ($\leq$ %10)	17	34
pozitif ($>$ %10)	33	66
bcl-2 ekspresyonu		
negatif ($\leq$ %10)	26	52
pozitif ($>$ %10)	24	48

Tablo 7b: Olgulara Ait Klinikopatolojik Veriler

pat. NO	İSİM	yaş	evre	Tip	grade	TYS (ay)	Ex	p-53%	bcl-2%	MS	AI
3315	S.S	38	3c	SP	1	76		5	20	0,8	8
16506	N.G	57	3c	SP	3	44		0	10	3,5	0
20714	I.E	45	3c	E	3	77		60	5	15,7	0
16299	S.U	65	3c	E	2	33		5	5	4,6	4
262	S.B	65	3c	SP	2	75		70	5	5,8	4
14010	N.Ö	59	3c	E	3	48		90	0	2,3	4
10292	S.Ö	28	3c	SP	1	25		30	80	0,5	8
2159	D.B	46	3c	SP	2	41	ex	0	5	3,1	0
14533	Z.M	65	3c	SP	1	82		5	0	0,6	3
11468	E.M	48	3c	SP	2	27	ex	60	70	6,7	0
1268	U.Y	52	3c	SP	1	46		90	0	3,7	1
12130	A.Ş	45	3c	SP	2	48		70	40	3,5	3
1390	A.Ö	53	3c	SP	2	72		90	10	3,4	3
14358	F.A	68	3c	SP	2	34		50	10	3,2	3
13562	C.Ç	46	3c	SP	2	23		100	60	0,8	3
11041	H.Y	71	3c	SP	3	26		100	40	1	4
1244	F.E	56	3c	M	1	36		20	40	0,3	1
3038	F.B	63	3c	SP	2	32	ex	80	5	4	2
2359	E.D	67	3c	SP	2	41	ex	90	30	2,6	10
17624	D.E	50	3c	SP	2	32		5	60	0,7	1
16889	D.G	63	3c	SP	1	21		0	0	0,3	7
12679	R.Ö	58	3c	E	3	26		30	20	2,2	2
2848	M.Ç	52	3c	SP	3	67		70	10	4,6	1
10983	S.D	60	4a	M	1	18		70	0	0,7	1
13937	S.U	69	3c	SP	1	24		20	75	1	6
2826	G.Ş	43	1c	M	1	76		5	10	1,2	3
13699	S.B	56	3c	SP	2	36		5	30	0,7	0
1473	M.S	66	3c	SP	3	10	ex	90	5	9,4	1
1087	I.T	64	2a	M	2	84		20	60	0,3	2
2858	Z.Ö	32	1c	M	1	54		50	80	0,9	0
2738	H.Ç	25	1a	SP	2	93		20	50	0,4	0
16094	B.B	51	1b	SP	1	81		5	0	0,7	8
2665	Y.Z	49	2a	M	2	46		90	5	0,6	2
679	A.S	40	1a	M	1	26		90	20	1,2	3
16717	H.Ç	55	2a	E	2	45	ex	80	10	8,3	2
1266	M.T	44	1b	SP	2	68		10	5	1,8	0
17015	Ç.G	53	2a	M	1	59		10	30	0,9	1
1749	N.B	47	2c	SP	2	33	ex	10	10	2,6	0
2589	F.K	39	1b	SP	2	72		90	60	6,8	1
14850	H.B	50	1c	SP	1	65		70	20	1,1	0
17760	N.Ç	58	3c	SP	2	19		80	40	5,9	3
262	S.B	65	1c	SP	2	75		20	10	5,2	6
2643	M.İ	54	3c	SP	3	35		60	10	4,6	0
15774	S.Ş	57	3c	E	2	16	ex	80	60	7,8	0
14016	H.E	61	4	E	3	19	ex	40	40	14,3	2
19712	S.B	66	4	SP	2	25	ex	0	5	2,4	3
17689	B.K	49	3c	M	2	22	ex	10	70	0,4	4
11935	A.S	54	3c	SP	1	62		5	20	0,4	4
2189	H.Ş	47	3c	SP	2	43		5	5	2,9	0
2450	T.P	61	4	SP	2	18		80	10	5,3	0

4.1. Apoptotik İndeksin diğer prognostik ve klinikopatolojik faktörler

ile karşılaştırılması sonucunda elde edilen bulgular:

p53 ve bcl-2 : p53 ve bcl-2 genlerinin apoptozisle ilişkili oldukları bilinmektedir. Bu genlerin ekspresyon ürünleri ile Aİ arasındaki ilişki, çalışmanın bu bölümünde ki-kare testiyle değerlendirilmiştir.

P53 protein ekspresyonu, düşük Aİ'li gruptaki 28 olgunun 20'sinde (% 71.4) ve yüksek Aİ'li gruptaki 22 olgunun 13'de (% 59.1) pozitif saptanmıştır.

Bcl-2 protein ekspresyonu düşük Aİ'li 28 olgunun 13'ünde (% 46.4) ve yüksek Aİ'li 22 olgunun 11'inde (% 50) pozitifdir.

Tüm bu bulgular ışığında, Aİ'n düşük veya yüksek olmasıyla p53 ve bcl-2 protein ekspresyonları arasında istatistiksel anlamlılık ifade eden bir ilişki saptanmamıştır, (tablo 8), ($p>0.05$).

Tablo 8: Aİ ile p53 ve bcl-2 proteinleri arasındaki ilişki

Aİ	p53				Bcl-2			
	negatif ($\leq$ %10)		pozitif ($>$ %10)		negatif ($\leq$ %10)		pozitif ($>$ %10)	
	n/n olgu	%	n/n olgu	%	n/n olgu	%	n/n olgu	%
Düşük ($\leq 2,48$)	8/28	28,6	20/28	71,4	15/28	53,6	13/28	46,4
Yüksek ($>2,48$)	9/22	40,9	13/22	59,1	11/22	50,0	11/22	50,0

$p>0.05$

Evre: I. ve II. evrelerdeki olguların "erken evre", III. ve IV. evrelerdeki olguların ise "ileri evre" olarak sınıflandırıldığı bu çalışmada, Aİ ile evreler arasındaki ilişki ki-kare testi yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Düşük Aİ'li

28 olgudan 10'u (% 35.7) erken evrede iken, 18'i (% 64.3) ileri evrede, yüksek Aİ'li 22 olgudan 4'ü (% 18.2) erken evrede iken 18'i (% 18.8) ileri evrededir.

Bu bulgular göstermektedir ki, Aİ'n düşük veya yüksek olması ile evrenin erken veya ileri olması arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır,(tablo 9), ($p>0.05$).

Tablo 9: EOK'de cerrahi evre ile Aİ arasındaki ilişki

Cerrahi Evre	Aİ			
	Düşük ($\leq 2,48$)		Yüksek ($>2,48$)	
	n/n olgu	%	n/n olgu	%
I + II	10/28	35,7	4/22	18,2
III + IV	18/28	64,3	18/22	81,8

$p>0.05$

Histolojik grade: Histolojik grade tümörün agresifliğini gösteren bir parametre olduğundan dolayı, apoptozis ile aralarında ilişki olduğu düşünülebilir. Bu ilişkiyi ortaya koyabilmek için eldeki veriler yine ki-kare testiyle değerlendirilmiştir.

Düşük Aİ'li 28 olgunun 6'sı (% 21.4) grade I, 15'i (% 53.6) grade II, 7'si (% 25) grade III iken, yüksek Aİ'li 22 olgunun 9'u (% 40.9) grade I, 11'i (% 50) grade II ve 2'si (% 9.1) grade III olarak bulunmuştur. Bu bulgular ışığında, histolojik grade ile Aİ arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır, (tablo 10), ($p>0.05$).

Tablo 10: EOK'de histolojik grade ile Aİ arasındaki ilişki

Grade	Aİ			
	Düşük ($\leq 2,48$)		Yüksek ($> 2,48$)	
	n/n olgu	%	n/n olgu	%
1	6/28	21,4	9/22	40,9
2	15/28	53,6	11/22	50,0
23	7/28	25,0	2/22	9,1

Tümörün histolojik tipi: EOK de, diğer malignitelerde olduğu gibi tümörün histolojik tipi prognozda belirleyici olabilmektedir. Çalışmamızın bu bölümünde tümörün histolojik tipleri ile Aİ arasındaki ilişkiyi araştırdık ve ki-kare testini kullanarak istatistiksel olarak değerlendirdik. Düşük Aİ'li gruptaki hastaların 17'si (% 60.7) serözpapiller, 11'i ise (% 39.3) müsinöz veya endometrioid tipte iken, yüksek Aİ'li gruptaki hastaların 17'si (% 77.3) serözpapiller, 5'i ise (% 22.7) müsinöz veya endometrioid tipte idi. Bu bulgular ışığında, epitelyal over kanserlerinin değişik histolojik tipleri ile apoptoz yoğunluğu arasında ilişki olmadığı ve böylece gruplar arasında istatistiksel anlamlı farkın bulunmadığı sonucuna varılmıştır, (tablo11), ($p>0.05$).

Tablo 11: EOK'de histolojik tip ile Aİ arasındaki ilişki

Histolojik Tip	Aİ			
	Düşük ($\leq 2,48$)		Yüksek ($> 2,48$)	
	n/n olgu	%	n/n olgu	%
Seröz	17/28	60,7	17/22	77,3
Müsinöz+Endometrioid	11/28	39,3	5/22	22,7

$p>0.05$

Yaş: Çalışma grubumuzdaki hastaların yaşları 25-71 arasında değişmekte olup, ortalama yaş 53.5 olarak bulunmuştur. Hastalar bu median yaş değerine göre gruplandırılıp Aİ ile olan ilişki açısından ki-kare testiyle değerlendirildiğinde istatistiki anlamlı farklılık bulunmamıştır, (tablo 12), ($p>0.05$).

Tablo 12: EOK'de yaş ile Aİ arasındaki ilişki

Yaş	Aİ			
	Düşük ($\leq 2,48$)		Yüksek ($> 2,48$)	
	n/n olgu	%	n/n olgu	%
≤ 55	17/28	60,7	10/22	45,5
> 55	11/28	39,3	12/22	54,5

$p>0.05$

Sağkalım: Çalışma grubumuzdaki olguların 39'u (% 78) çalışmanın sona erdirildiği dönemde hayatta iken, 11'i (% 22) ex olmuş idi. Sağkalım ile Aİ arasındaki ilişki ki-kare testiyle araştırılmış istatistiki anlamlı fark bulunmamıştır, (tablo13), ($p>0.05$).

Tablo 13: EOK'de sağkalım ile Aİ arasındaki ilişki

Sağkalım	Aİ			
	Düşük ($\leq 2,48$)		Yüksek ($> 2,48$)	
	n/n olgu	%	n/n olgu	%
Hayatta	20/28	71,4	19/22	86,4
Ex	8/28	28,6	3/22	13,6

$p>0.05$

Mitoz Sayısı: Bilinmektedir ki, tümör hücrelerinin mitotik aktivitesi tümörün agresifliğini göstermesi bakımından önemlidir. Çalışma kapsamındaki olguların mitoz sayısı ile Aİ arasındaki ilişki yine ki-kare testiyle değerlendirilmiştir. Apoptotik index "median değerine göre gruplandırılarak" test edildiğinde mitoz sayısı aralarında bir ilişki saptanmamıştır ($p>0.05$). Buna karşın, olguların apoptotik hücre sayısı değerleri direkt olarak teste dahil edilip bulgular student t testiyle değerlendirildiğinde, istatistiki olarak anlamlı olmamakla birlikte ($p>0.05$), mitoz sayısı arttıkça apoptotik hücre sayısında azalma olduğu dikkat çekicidir, (tablo 14) .

Tablo 14: EOK'de mitoz sayısı ile Aİ arasındaki ilişki

Mitoz Sayısı	Aİ			
	Düşük ($\leq 2,48$)		Yüksek ($> 2,48$)	
	n/n olgu	%	n/n olgu	%
Düşük ($\leq 3,23$)	15/28	53,5	16/22	72,7
Yüksek ($> 3,23$)	13/28	46,5	6/22	27,3

$p>0.05$

4.2. p53 ve bcl-2 gen ekspresyonlarının diğer klinikopatolojik faktörler ile karşılaştırılması sonucunda elde edilen bulgular:

Literatürde p53 ve bcl-2 gen ekspresyonu pozitifliği olarak incelenen kesitlerdeki tümör hücrelerinin % 10'undan fazlasının immünreaktifliği kabul edilmiştir. Bizde çalışmamızda cut-off değeri olarak % 10'un üzerinde immünreaktifliği esas aldık. Buna göre değerlendirildiğinde çalışmamızdaki 50 olgunun 17'sinde (% 34) p53 ekspresyonu negatif, 33'de (% 66) pozitif

bulunmuştur. Yine aynı olgularda bcl-2 gen ekspresyonu 26 (% 52) olgudan negatif, 24 (% 48) olguda pozitif olarak saptanmıştır (tablo 7a).

Evre: p53 ve bcl-2 gen ekspresyonu ile evre arasındaki ilişkinin araştırılması amacıyla elde edilen veriler ayrı ayrı ki-kare testiyle değerlendirilmiş ve şu sonuçlar elde edilmiştir.

P53 ekspresyonu negatif olan 17 olgudan 5'i düşük evrede iken 12'si ileri evrede; pozitif olan 33 olgudan 9'u düşük evrede iken 24'ü ileri evrededir. ($p>0.05$).

Bcl-2 ekspresyonu negatif olan 26 olgudan 7'si düşük evrede iken 19'u ileri evrede; pozitif olan 24 olgudan 7'si düşük evrede, 17'si de ileri evrededir ($p>0.05$). Buna göre p53 ve bcl-2 gen ekspresyonu ile evre arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır, (tablo 15).

Histolojik grade: p53 ve bcl-2 gen ekspresyonu ile histolojik grade arasındaki ilişkiyi ortaya koyabilmek amacıyla bulgular ayrı ayrı ki-kare testiyle değerlendirilmiş ve sonuçta histolojik grade ile p53 ve bcl-2 gen ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır, (tablo 15) ($p>0.05$).

Tümörün histolojik tipi: p53 ve bcl-2 ekspresyonu ile histolojik tip arasındaki ilişki khi-kare testiyle değerlendirildiğinde şu sonuçlar elde edilmiştir: Seröz papiller tümörlü 34 olgunun 13'ünde (%38.2) p53 negatif, 21'inde (%61.8) pozitifdir. Müsinöz ve endometrioid tümörlü gruptaki 16 olgudan 4'ünde (%25) p53 negatifken, 12'sinde (%75) pozitifdir.

Bcl-2 protein ekspresyonu, 34 seröz papiller olgudan 19'unda (%55.9) negatif, 15'inde (%44.1) pozitifdir. Müsinöz ve endometrioid olgularda ise, 16 olgudan 7'sinde (%43.8) negatif, 9'unda (%56.3) pozitifdir.

Bu bulgular ışığında gerek p53 ve gerekse bcl-2 protein ekspresyonlarının pozitif veya negatif olmasıyla tümörün histolojik tipi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır, (tablo 15), ($p>0.05$).

Mitoz sayısı: Çalışmamızdaki olguların mitoz sayısı median değeri 3,23 olarak bulunmuş ve olgular buna göre düşük ve yüksek mitoz sayılı olmak üzere iki grupta sınıflandırılmıştır. Çalışmamızdaki 50 olgudan 31'i (%62) düşük ve 19'u (%38) yüksek mitoz sayılı grupta yer almaktadır.

Mitoz sayısı ile p53 ekspresyonu arasındaki ilişki açısından olgular ki-kare testiyle değerlendirildiğinde şu sonuçlar elde edilmiştir: Düşük mitoz sayılı 31 olgunun 15'de (% 48.4) p53 negatif, 16'sında (% 51.6) p53 pozitif bulunmuştur. Yüksek mitoz sayılı 19 olgununsa 2'sinde (% 10.5) p53 negatif, 17'sinde (% 89.5) p53 pozitifdir. Bu bulguları istatistiksel olarak değerlendirdiğimizde mitoz sayısı median değerden düşük olan olgularda pozitif p53 gözlemi istatistiksel anlamlılık ifade etmez iken , yüksek olan olgularda pozitif p53 ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek saptanmıştır ($p<0.01$). Buna göre mitoz sayısı, median değerden (3.23) yüksek olan olgularda p53 pozitifliği istatistiki olarak anlamlı oranda yüksek saptanmıştır; aralarında pozitif yönlü bir ilişki vardır, (tablo 15).

Mitoz sayısı ile bcl-2 ekspresyonu arasındaki ilişki ki-kare testiyle değerlendirildiğinde düşük mitoz sayılı 31 olgunun 18'de (% 58.1) bcl-2 pozitif iken yüksek mitoz sayılı grupta 6 (% 31.6) olguda bcl-2 pozitifdir ($p=0.06$). İstatistiki olarak anlamlı olmamasına karşın mitoz sayısı ile bcl-2 ekspresyonu arasında negatif yönlü bir ilişkinin varlığı görülmektedir, (tablo 15).

Yaş: Çalışmada yer alan olgular median yaş değerine göre gruplandırılıp p53 ve bcl-2 ekspresyonu açısından ayrı ayrı ki-kare testiyle değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel fark saptanmamıştır ($p>0.05$). (tablo 15).

Yaşama durumu: Eldeki veriler ki-kare testiyle değerlendirildiğinde p53 ve bcl-2 ekspresyonuyla sağ kalım arasında istatistiksel bir ilişki saptanmamıştır, (tablo 15), ($p>0.05$).

Tablo 15: EOK'de klinikopatolojik özellikler ile p53 ve bcl-2 proteinleri arasındaki ilişki

Özellik	p53					bcl-2				
	negatif ($\leq \%10$)		pozitif ($> \%10$)		p	negatif ($\leq \%10$)		pozitif ($> \%10$)		p
	n/17 olgu	%	n/33 olgu	%		n/26 olgu	%	n/24 olgu	%	
Cerrahi evre										
I+II	5	29	9	27	>0,05	7	27	7	29	>0,05
III+IV	12	71	24	73		19	73	17	71	
Histolojik Grade										
1	7	41	8	24	>0,05	6	23	9	38	>0,05
2+3	10	59	25	76		20	77	15	62	
Histolojik Tip										
Seröz	13	76	21	64	>0,05	19	73	15	63	>0,05
Müsinöz + Endometrioid	4	24	12	36		7	27	9	37	
Mitoz Sayısı										
Düşük ($\leq 3,23$)	15	88	16	48	<0,01	13	50	18	75	=0,06
Yüksek ($> 3,23$)	2	12	17	52		13	50	6	25	
Yaş										
≤ 55	11	65	16	48	>0,05	13	50	14	58	>0,05
> 55	6	35	17	52		13	50	10	42	
Sağkalım										
Yaşayan	13	76	26	79	>0,05	20	77	19	79	>0,05
Ex	4	24	7	21		6	23	5	21	

4.3. Mitoz sayısı: Tümörün agresifliğini göstermesi bakımından önemlidir. Dolayısıyla çeşitli klinikopatolojik ve prognostik faktörlerle aralarında bir ilişkinin varlığını düşündürmektedir. Bu düşünce gözönüne alınarak bu çalışmada da elde edilen veriler incelenmiş ve bulgular khi-kare testi yardımıyla değerlendirilmiştir.

Çalışma grubundaki olguların mitoz sayısı median değeri 3.23 olarak bulunmuş ve olgular buna göre düşük ve yüksek mitoz sayılı gruplara ayrılıp evre ile olan ilişkisi değerlendirildiğinde düşük mitoz sayılı gruptaki 31 olgudan 11'inin evresi I veya II (%35.5), 20'sinin evresi III veya IV (%64.5) ve yüksek mitoz sayılı gruptaki 19 olgudan 3'ünün evresi I veya II (%15.8), 16'sının evresi ise III veya IV (%84.2) olarak bulunmuştur. Her iki grupta da olguların çoğunun evresinin 3 ve 4 olmasına rağmen mitoz sayısının median değerden düşük veya yüksek olması ile cerrahi evrenin erken veya ileri olması arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır, tablo (16), ($p>0.05$).

Tablo 16: EOK'da cerrahi evre ile mitoz sayısı arasındaki ilişki

Cerrahi Evre	Mitoz Sayısı			
	Düşük ($\leq 3,23$)		Yüksek ($> 3,23$)	
	n/n olgu	%	n/n olgu	%
I+II	11/31	35,5	3/19	15,8
III+IV	20/31	64,5	16/19	84,2

$p>0.05$

Histolojik grade ile olan ilişkisi açısından incelendiğinde görülmüştür ki düşük mitoz sayılı gruptaki olgulardan grade II ve III'tekilerin sayısı 17 (% 54.9) iken yüksek mitoz sayılı grupta bu sayı 18 (54.9) iken yüksek mitoz sayılı grupta bu sayı 18 (% 94.8) dir. Düşük mitoz sayısı ile karşılaştırıldığında yüksek mitoz

sayılı grupta daha fazla oranda grade II ve III tümör görülmesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur, (tablo 17), ($p<0.01$).

Tablo 17: EOK'da histolojik grade ile mitoz sayısı arasındaki ilişki

Histolojik Grade	Mitoz Sayısı			
	Düşük ($\leq 3,23$)		Yüksek ($>3,23$)	
	n/n olgu	%	n/n olgu	%
1	14/31	45,2	1/19	5,3
2	14/31	45,2	12/19	63,2
3	3/31	9,7	6/19	31,6

$p<0.01$

Histolojik tümör tipiyle mitoz sayısı arasındaki ilişki khi-kare testiyle değerlendirildiğinde düşük mitoz sayılı 31 olgudan 20'sinin seröz papiller ve 11'inin müsinöz veya endometrioid; yüksek mitoz sayılı 19 olgudan 14'ünün seröz papiller ve 5'inin müsinöz veya endometrioid tümör olduğu görülmüştür, (tablo 18). Gruplar arasında istatistiksel fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

Tablo 18: EOK'da histolojik tip ile mitoz sayısı arasındaki ilişki

Histolojik Tip	Mitoz Sayısı			
	Düşük ($\leq 3,23$)		Yüksek ($>3,23$)	
	n/n olgu	%	n/n olgu	%
Seröz	20/31	64,5	14/19	73,7
Müsinöz+Endometrioid	11/31	35,5	5/19	26,3

$p>0.05$

Çalışma grubumuzdaki olguların histolojik tipleri, yaşları ve sağ kalım durumları ile mitoz sayısı arasında istatistiksel bir ilişki gösterilmemiştir ($p>0.05$).

4.4. EOK'li olguların bazı klinikopatolojik özellikleri Spearman Sıra

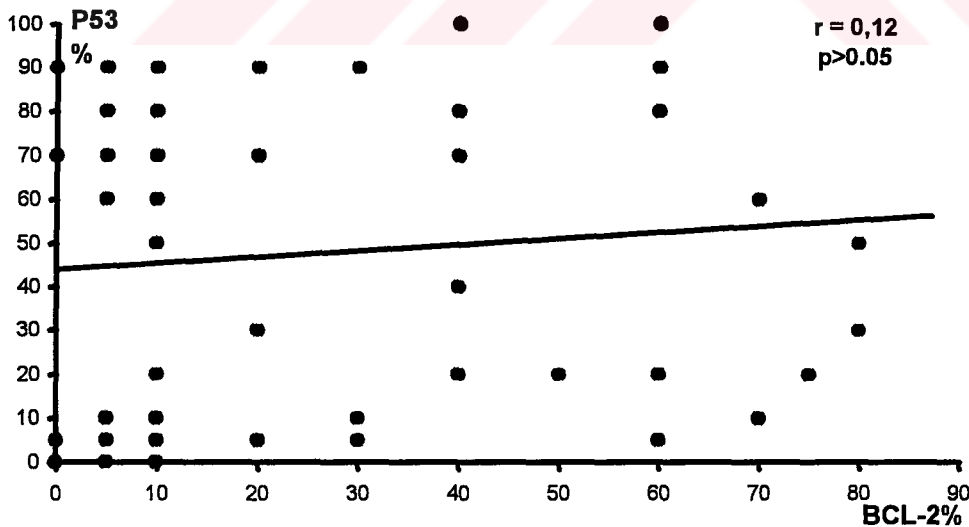
Korelasyon Analizi ile değerlendirildiğinde şu sonuçlar elde edilmiştir:

P53 ile bcl-2 ekspresyonlarının birbiriyle olan ilişkisi değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır, (grafik 1), ($p>0.05$, $r=0.12$).

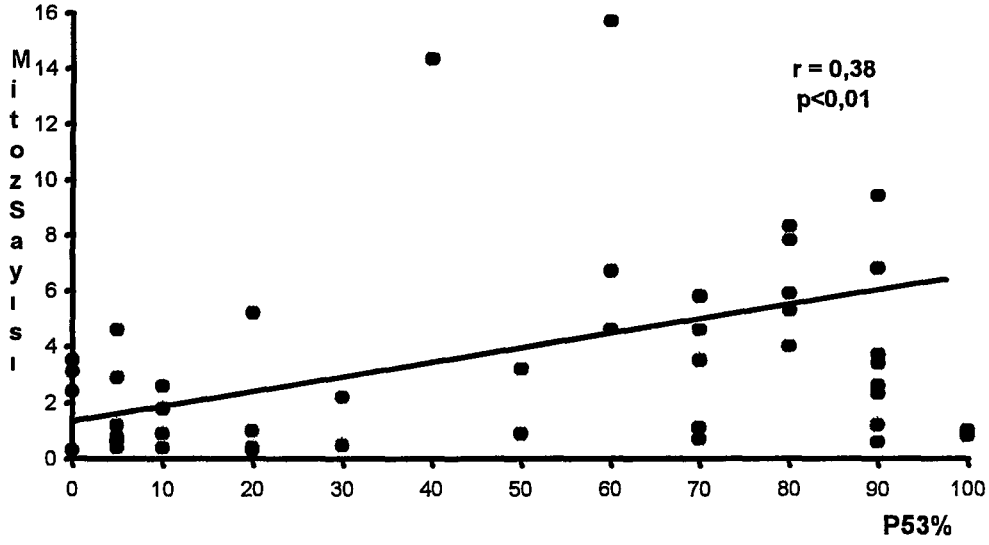
P53 ekspresyonu ile mitoz sayısı arasındaki ilişki incelendiğinde p53 ekspresyonu arttıkça mitoz sayısının da arttığı gözle çarpılmaktadır, (grafik 2), ($p<0.01$, $r=0.38$).

Apoptotik indeks ile mitoz sayısı arasındaki ilişki değerlendirildiğinde ise Aİ arttıkça mitoz sayısında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte azalmanın olduğu dikkati çekmektedir, (grafik. 3), ($p=0.07$, $r=-0.26$).

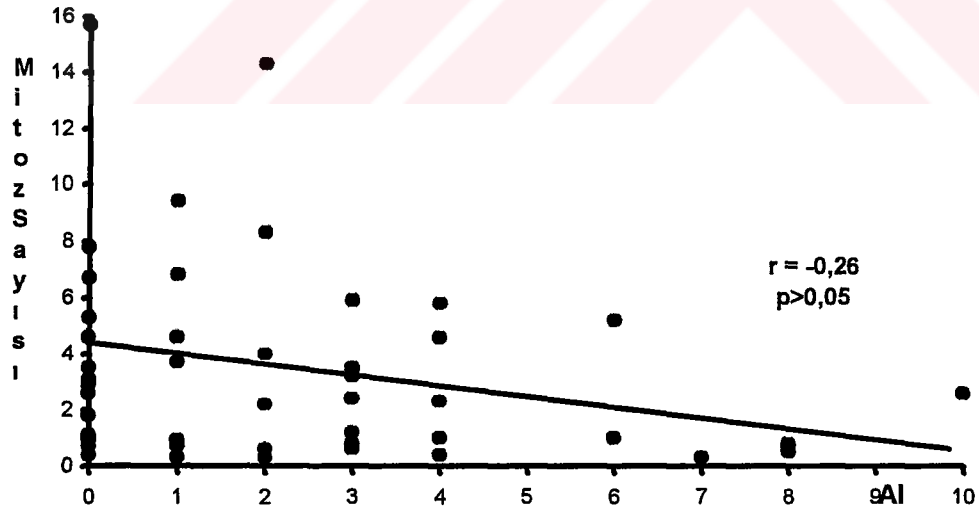
Grafik 1. P53 % ile BCL-2 % ilişkisi.



Grafik 2. P53 % ile Mitoz Sayısı İlişkisi.



Grafik 3. Apoptotik İndex ile Mitoz Sayısı İlişkisi.



4.5. Bu çalışmada epitelyal over kanserlerinin prognostik faktörler ve klinikopatolojik özelliklerine göre median yaşam sürelerinin dağılımları kaplan-maier yaşam analizi ve log-rank testi ile değerlendirildi. Kaplan-maier yaşam analizi ile yaşam olasılıkları hesaplanırken, log-rank testi ile gruplar arasında karşılaştırma yapıldı. Elde edilen sonuçlar şunlardır: Çalışmada yer alan olgular için 24 ay için sağ kalım (yaşam) olasılığı % 92, 36 ay için % 82 ve 48 ay için % 72 olarak bulunmuştur. Median sağ kalım 75.41 aydır.

p53 ve bcl-2 ekspresyonu: Apoptozisde regülör fonksiyonu olan p53 ve bcl-2 gen ürünlerinin median sağ kalım üzerinde etkilerinin olması beklenebilir. Bu amaçla elde edilen veriler değerlendirildiğinde p53 ekspresyonu negatif olan olgularda median sağ kalım 68 ay, pozitif olan olgularda 75 ay olarak bulunmuştur,(tablo 19, grf.4). Bu fark istatistiksel olarak anlam taşımamaktadır ($p>0.05$). Benzer bulgular bcl-2 ekspresyonu için elde edilmiştir (tablo 19, grf.5).

Hem p53 hem de bcl-2'nin birlikte negatif olduğu olgularda median sağkalım 66.7 ay iken ikisinin birlikte pozitif olduğu durumda median sağkalım 72.2 aydır. Bu sonuç khi-kare testiyle değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

Sonuç olarak bu çalışmada, p53 ve bcl-2 gen ekspresyonlarının median sağ kalım ile bir ilişkisinin olmadığı saptanmıştır (tablo 19).

Apoptotik İndeks

Düşük apoptotik indeksli (Aİ) grupta median sağ kalım 71 ay, yüksek Aİ'li grupta 72 ay olarak bulunmuş, istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır, (tablo 19. grf. 6).

Evre: Diğer malignitelerde olduğu gibi tümörün evresi önemli bir prognostik faktördür. Evredeki artış kötü prognoz gösteren bir parametre olmasına karşın bizim çalışmamızda elde edilen sonuç şöyledir:

Evre I ve II'den oluşan olgularda median sağ kalım süresi 84, 6 ay, evre III ve IV'den oluşan olgularda 63.9 ay olarak bulunmuştur. Tümörün evresinin artması median sağ kalımı azaltmaktadır. Ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$), (tablo 19, grf. 7).

Mitoz sayısı

Yaptığımız bu çalışmada düşük mitoz sayılı grupta median sağ kalım süresi 79.51 ay, yüksek mitoz sayılı grupta 58.77 ay olarak bulunmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$) (tablo 19, grf.8).

Histolojik grade: histolojik grade'in artması tümörün agresifliğini gösterdiğinden kötü prognozu gösteren bir parametre olarak kabul edilir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar şöyledir:

Histolojik grade'i I olan olgularda ortalama yaşam süresi 82 ay, grade'i II ve III olan olgularda ise 68.47 aydır. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). Grade II ve III olan olgularda median sağ kalım daha düşüktür (tablo 19, grf. 9).

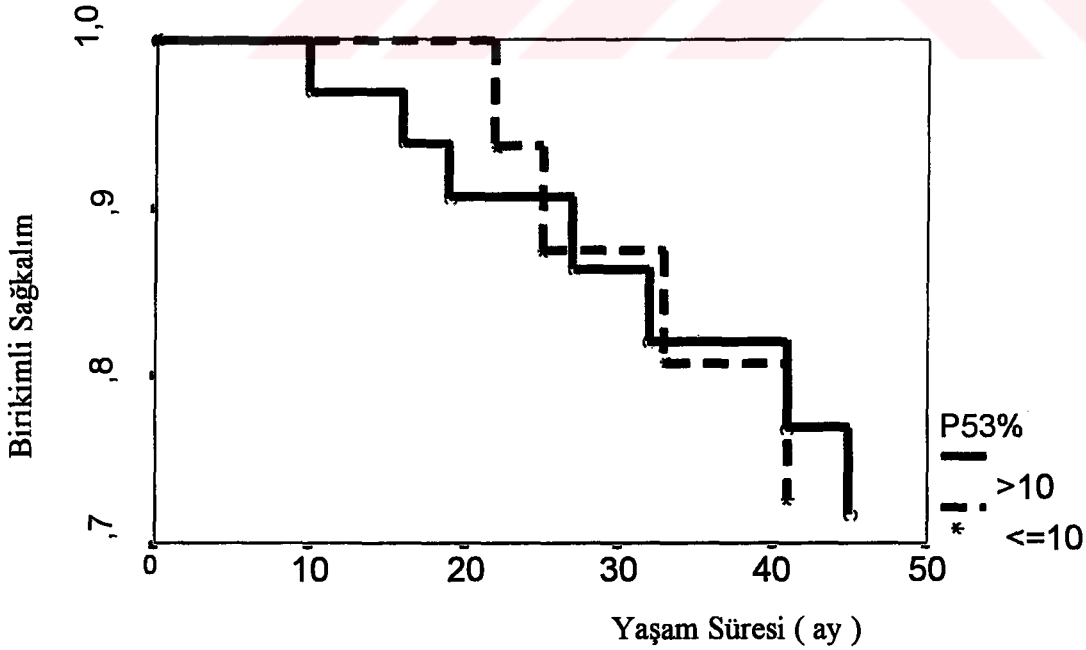
Histolojik Tümör Tipi :

Çalışmamızda seröz papiller tip EOK'li olgularda median sağkalım 76.35 ay, müsinöz ve endometrioid tümör histolojik subtipine sahip olgularda 67.33 ay olarak bulunmuş, gruplar arasında istatistiksel fark saptanmamıştır ($p>0.05$) (tablo 19, grf. 10).

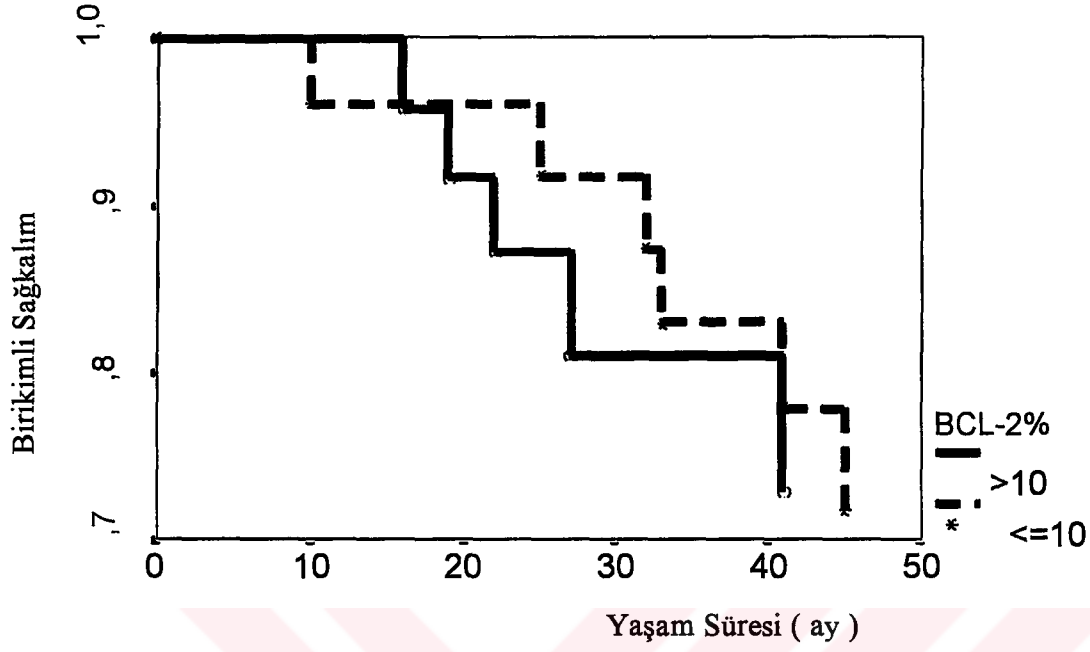
Tablo 19: EOK'li olgularda prognostik faktörlerin surviv açısından univariant analiz sonuçları

Faktör		Olgu Sayısı	Median Yaşam Süresi (ay)	24 aylık surviv olasılığı (%)	36 aylık surviv olasılığı (ay)	48 aylık surviv olasılığı (ay)	P
p53	Negatif	17	68	88	81	73	>0,05
	Pozitif	33	75	90	82	72	
Bcl-2	Negatif	26	68	92	83	72	>0,05
	Pozitif	24	75	87	81	73	
Ai	Düşük	28	71	89	77	66	>0,05
	Yüksek	22	72	95	89	81	
MS	Düşük	31	79,5	97	88	77	>0,05
	Yüksek	19	58,7	84	72	64	
Evre	I + II	14	84,6	100	92	85	>0,05
	III + IV	36	63,9	88	77	66	
Histolojik grade	1	15	82	100	100	100	<0,05
	2 + 3	35	68,4	85	75	61	
Histolojik tip	Seröz	34	76,3	97	82	73	>0,05
	Müsinöz+ Endometrioid	16	67,3	87	80	70	

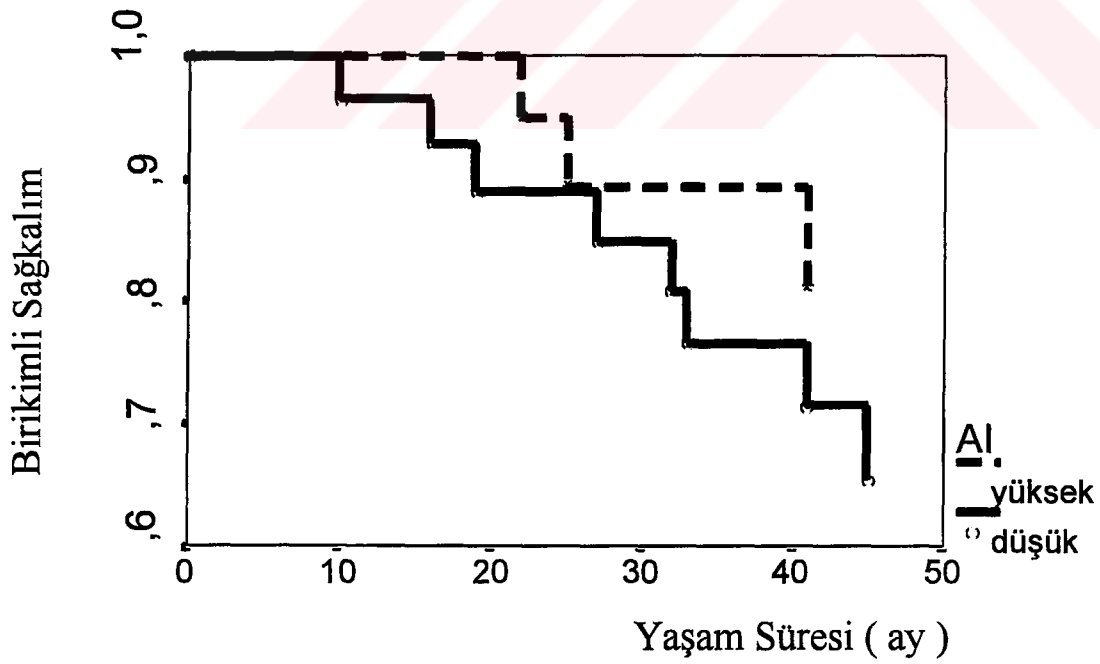
Grafik 4. P53 % İçin Sağkalım.



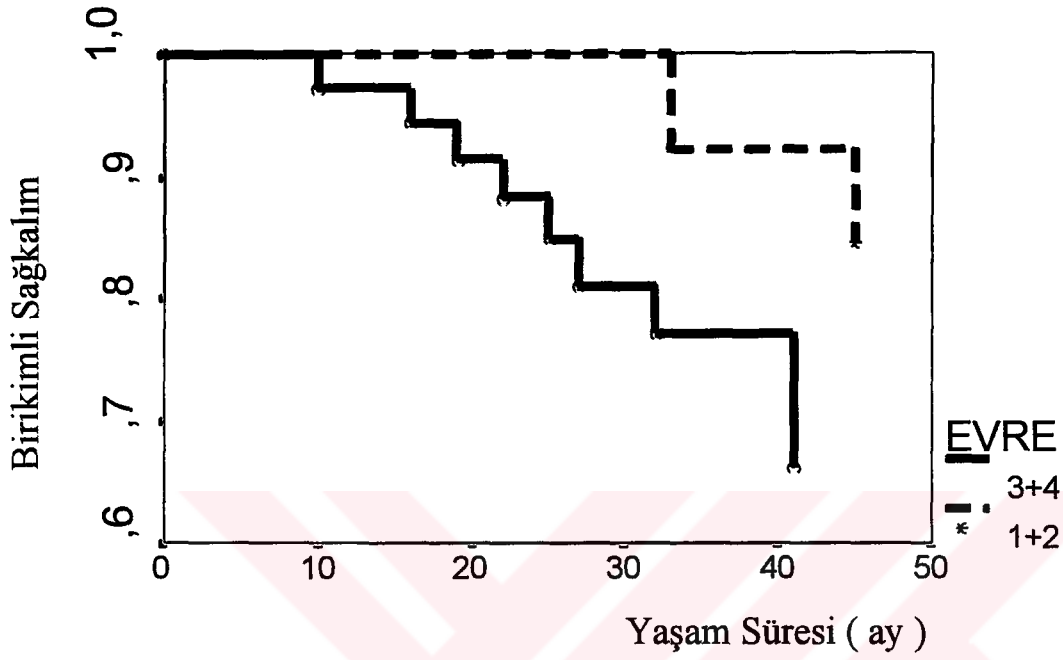
Grafik 5. BCL-2 için sağkalım.



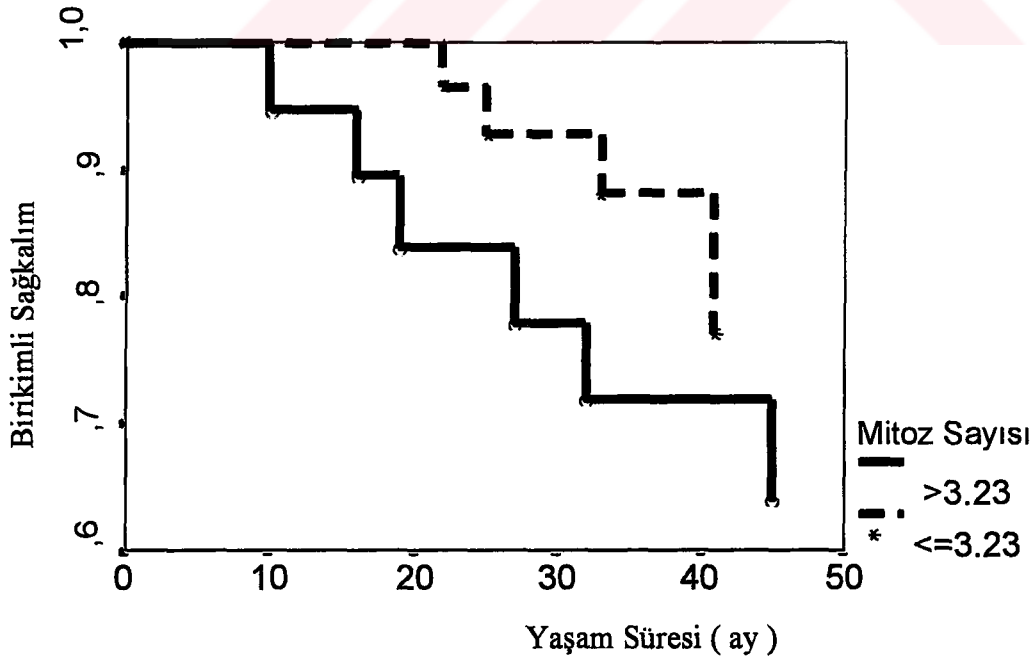
Grafik 6. Al için Sağkalım



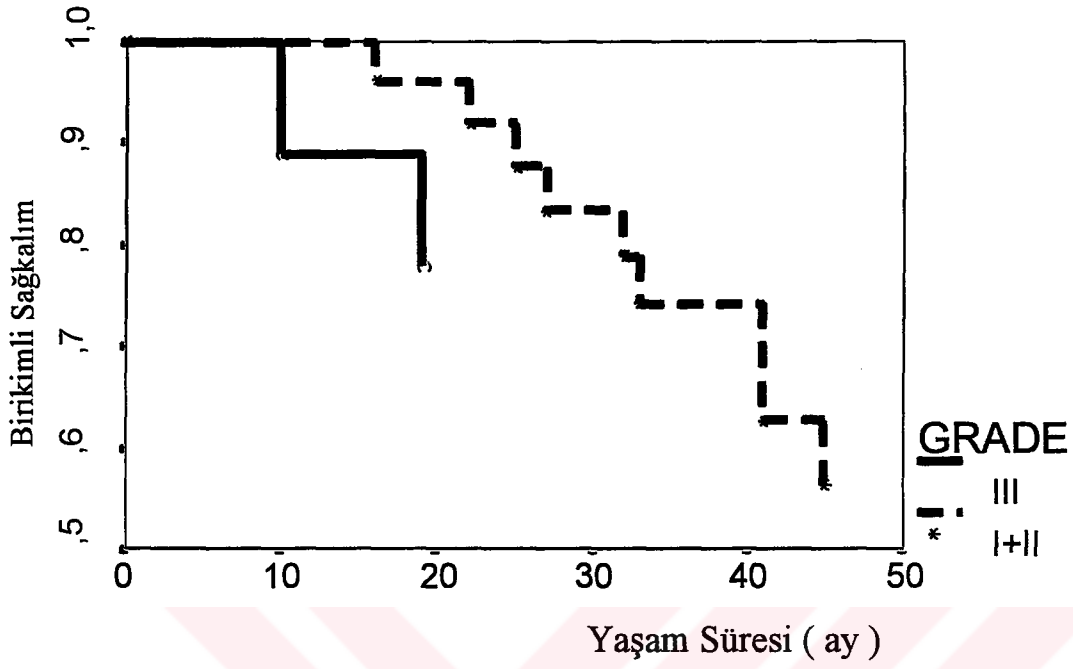
Grafik 7. Evre İçin Sağkalım



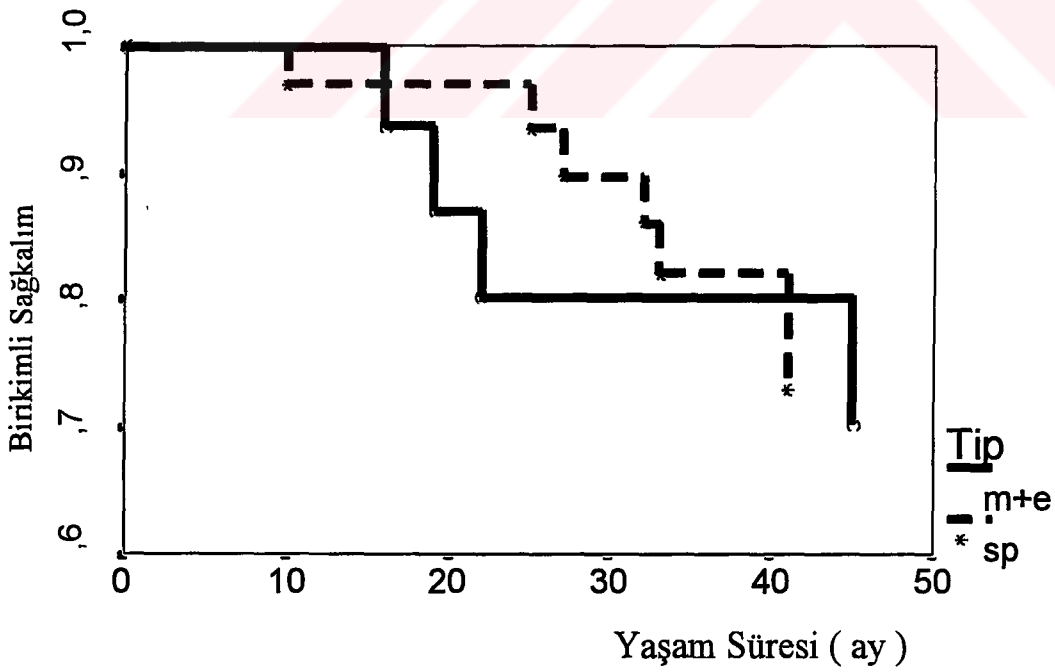
Grafik 8 . Mitoz Sayısı İçin Sağkalım.



Grafik 9. Grade İçin Sağkalım.



Grafik 10. Tümör Tipine Göre sağkalım.



4.6. Prognostik faktörlerin epitelyal over kanserli olguların ölüm riski üzerindeki etkileri multivariant analiz için Cox's Regresyon Analizi ile değerlendirildi (tablo 20). Bu değerlendirmeye prognostik faktörler olarak p53 ve bcl-2 gen ürünlerinin ekspresyonu, apoptotik indeks, mitoz sayısı, cerrahi evre, histolojik grade, tümör histolojik tipi ve yaş alındı. Elde edilen sonuçlar şöyledir:

p53 protein ekspresyonu pozitif olan olgularda epitelyal over kanserine bağlı ölüm riski negatif olan gruba göre 1.04 kat daha yüksektir. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$).

bcl-2 protein ekspresyonu pozitif olan olgularda ölüm riski negatif olanlara göre 1.10 kat daha yüksektir, fakat istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$).

Apoptotik hücre sayısının bir artması ölüm riskinde % 4.37'lik bir azalma yaratmaktadır, fakat istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$).

Mitoz sayısındaki bir artış ölüm riskinde % 15'lik bir artış yaratmaktadır. Bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Evre III ve IV'te ex olma riski evre I ve II'ye göre 2.8 kat daha yüksektir. Fakat istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmaz ($p>0.05$).

Grade II ve III'te ex olma riski grade I'e göre 5.88 kat daha yüksektir ($p=0.09$).

Çalışmada yer alan olgulardan müsinöz ve endometrioid tümör histolojik subtipine sahip olgularda ölüm riski serözpapiller tip olgulara göre 1.26 kat daha yüksektir. İstatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$).

Çalışmamızdaki olgulardan 55 yaş üzerinde olanların ölüm riski 55 yaş altındakilere göre 2.25 kat yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak bu sonuç anlamlı değildir ($p>0.05$).

Sonuç olarak yukarıdakilerden sadece mitoz sayısı bağımsız prognostik faktör olarak saptanmıştır.

Tablo 20: EOK'li olgularda klinikopatolojik özelliklerin Cox's Regresyon Analizi

Değişken	Grup	Rölatif Risk	Regresyon Katsayısı (SH) ^a	%95 CI ^b	p değeri
Evre	III,IV / I,II	2,819	1,036 (0,789)	0,60-13,22	>0,05
Grade	2,3 / 1	5,883	1,772 (1,051)	0,75-46,15	=0,09
Histolojik Tip	M+E / S	1,264	0,234 (0,627)	0,37-4,32	>0,05
Yaş	>55 / ≤55	2,250	0,811 (0,6132)	0,68-7,48	>0,05
AI		0,956	-0,044 (0,126)	0,74-1,23	>0,05
MS		1,157	0,146 (0,058)	1,03-1,30	<0,05
p53	poz. / neg.	1,043	0,042 (0,627)	0,31-35,31	>0,05
bcl-2	poz. / neg.	1,100	0,095 (0,608)	0,33-3,62	>0,05

^a) SH (standard hata)

^b) CI (güven aralığı)

5. TARTIŞMA

Apoptozis hücrenin kendi kendisini yok ettiği itrensek bir mekanizma, başka bir deyişle programlı hücre ölümü olarak açıklanabilir. Bir dokunun büyümesi sadece hücre çoğalmasına değil aynı zamanda fizyolojik olarak gerçekleşen apoptozis olarak adlandırılan programlanmış hücre ölümüne de bağlıdır. Bu nedenle apoptozisi inhibe eden faktörlerin neoplastik büyümelere sebep olabileceği düşünülmektedir.

Kanser, DNA'daki değişikliklerin yol açtığı anormal hücre akümüasyonu olarak tanımlanır. Hücre ölümü ile hücre bölünme oranlarının karşılaştırılması hızlı kanser gelişimini açıklar. Bazı tümör hücreleri normal hücrelerden daha yavaş bölünürler. Ancak hücrelerin hayatta kalma sürelerinin uzaması kanser gelişiminin devamına neden olur. Birçok karsinogen DNA hasarına neden olur. Bu aşamada hücre bu tür zedelenmeye birkaç değişik yolla cevap verir. Hücre bölünmesi DNA hasarının tamirinden sonraya ertelenir, şayet tamir mümkün değilse hasarlı hücre apoptozise gidebilir ya da hücre aralıksız olarak hücre büyüme siklusu ile bölünmeye devam eder. Bu anlamda apoptozis genetik lezyonlu hücrelerin ortadan kaldırılmasıyla malign transformasyonu önler.

Büyüme ve karsinogeneziste etkili olan bazı onkogen ve supresör genler apoptozisin regulasyonunda rol oynamaktadırlar. Bu genlerden en önemlileri bcl-2 ve p53'tür. Anormal p53 ve bcl-2 ekspresyonu sonucunda ortaya çıkan ve bozulmuş apoptozis indüksiyonu şüphesiz birçok tümörün oluşum ve ilerlemesine katılmaktadır.

Normal hücreler DNA hasarına maruz kaldıklarında iki şekilde cevap verirler: Hücre siklusu arresti veya apoptozis; p53 bunların her ikisinde de yer

alır. Bu sonuçlardan hangisinin görüleceği hücre tipi ve etki eden ajana bağlıdır. Mekanizmaları farklı olan bu iki yol arasında çeşitli durumlarda ilişki olabilir.

P53 geninin DNA sentezi onarımı ve programlı hücre ölümünün kontrolünde rol oynadığı bilinmektedir. Bu genin inaktive olması ya da fonksiyonunu kaybetmesi karsinogenezisin ilk basamağını oluşturan önemli bir süreçtir (43-48). Akciğer, kolon ve meme kanserleri, glioma, kronik myeloid lösemi, sarkoma, mezotelyoma gibi birçok tümör grubunda p53 mutasyonları tespit edilmiştir (56). Benzer şekilde kadın genital sisteminin birçok malignitesinde de p53 geninde değişiklikler olduğu bildirilmiştir (57).

"Wild-tip" olarak da bilinen normal p53 proteini (wt-p53) hücre çoğalması üzerinde negatif regülatör etkiye sahiptir. Bu protein tüm normal hücrelerde düşük seviyelerde mevcuttur. Fizyolojik koşullarda wt-p53 proteininin yarı ömrü 20-30 dakikadır. Bu nedenle normal hücrelerde wt-p53 immunoreaktivitesi izlenmez. Buna karşın p53 geninde meydana gelen değişiklikler sonucunda, normal p53 proteini bu fonksiyonunu kaybeder. Sonuçta oluşan mutant p53 proteini hücre çoğalmasını inhibe etme ve apoptosisi indükleme özelliğine sahip değildir. Normal p53 proteini çok kısa bir yarı ömre sahiptir. Aslında histolojik kesitlerde görülmez. Aksine apoptozisin indüklenmesinde etkisiz olan mutant p53, karsinomların hemen hemen yarısında kolayca saptanabilir.

Bcl-2 geni, selüler ve viral onkogenlerle işbirliği yaparak hücresel immortalizasyon ve/veya transformasyona yol açabilmektedir. Bu kooperatif etki Vaux ve arkadaşları tarafından lenfoid sistemde bcl-2 ve cmyc arasında gösterilmiştir (52). Çeşitli çalışmaların sonucunda bcl-2 ekspresyonunun hücre yaşamını uzattığı ve böylece hücreleri kromozomal anormallikler, viral

enfeksiyonlar gibi risklerle daha fazla maruz bırakarak malign transformasyon veya tümör progresyonuna yol açtığı görüşü belirmiştir.

Son yıllardaki çalışmalar bcl-2 ve bax genlerinin p53 tarafından regüle edildiğini göstermektedir. Bcl-2 gen ailesinden olan bax (bcl-2 associated gene X), bcl-2 ile heterodimerler oluşturarak apoptozisi artırır. P53 bağımlı apoptozis bcl-2 ekspresyonunun veya fonksiyonunun baskılanması yoluyla gerçekleşir. P53, bax upregulasyonuna veya bcl-2 downregulasyonuna yol açarak hücre ölümünü indükler (31,53-55).

Bu çalışmada 50 epitelyal over kanserli olguda, apoptotik prosesin bir göstergesi olan apoptotik indeksin (AI) ve tümör supresör gen p53 ve onkogen bcl-2 ekspresyonlarının birbirleriyle ve sürviv ve çeşitli klinikopatolojik faktörlerle olan ilişkilerini araştırdık. Çalışmamızdaki olgulara ait preparatları incelerken apoptotik hücrelerin az sayıda olduğu dikkatimizi çekmiştir. Bu, literatürdeki apoptotik indeks (AI) ile ilgili verilere ve de ayrıca apoptozisin hızlı gerçekleşen bir proses olduğu yönündeki bilgiler uygunluk göstermektedir (58, 59).

Yamasaki ve arkadaşları p53 protein ekspresyonu ile AI arasında bir ilişki bulamazlarken, bcl-2 ekspresyonu ve AI arasında negatif yönde bir ilişki saptamışlardır (20). Baretton ve arkadaşları da kolorektal adenokanserler ile ilgili çalışmalarında benzer sonuçlar bildirmişlerdir (60). Diebold ve arkadaşları ise 148 epitelyal over kanserli (EOK) olgudan oluşan çalışmalarında AI ile p53 ve bcl-2 arasında herhangi bir korelasyon bulamamışlardır (44). Biz de çalışmamızda bu araştırmaya benzer şekilde DNA fragmentasyonunun immunohistokimyasal olarak saptanmasıyla elde edilen AI ile p53 ve bcl-2 ekspresyonu arasında herhangi bir ilişki bulamadık. Bu sonuç bize apoptozis

meydana gelen apoptozisde oynadıkları rolün değişik olabileceğini ve apoptotik prosesin daha kompleks bir hal aldığını düşündürmektedir. Yine immunohistokimyasal yöntemlerle saptanan p53 pozitifliğinin çoğunlukla mutant p53 genini işaret ettiği hatırlanacak olursa çünkü mutant formun wild tip-p53'e göre yarılanma ömrü uzamaktadır, Aİ ile p53 ekspresyonu arasında bir ilişkinin saptanamaması açıklanabilir (25, 61).

Leoncini ve arkadaşları 1993 yılında (62), Kiberu ve arkadaşları 1996 yılında (63) ve Yamasaki ve arkadaşları 1997 yılında (20) yaptıkları çalışmalarında Aİ ile mitotik statüs arasında pozitif yönde korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Fakat Wheeler, 1995 ve Chyle, 1996 çalışmalarında aksi yönde sonuçlar bulmuşlardır (64,65). Bizim çalışmamızda da görülmüştür ki istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte mitoz sayısı arttıkça apoptotik hücre sayısı azalmaktadır. Yani neoplastik dokuda meydana gelen değişiklik dengeyi proliferasyon lehine bozmaktadır. Bu düşüncemizi doğrulamak amacıyla p53 ve bcl-2 protein ekspresyonları ile mitoz sayısı arasındaki ilişkiyi araştırdığımızda görülmüştür ki mitoz sayısı yüksek olan olgularda p53 pozitifliği, istatistiksel olarak anlamlı oranda daha fazla saptanmıştır ($p<0.01$). Benzer şekilde mitoz sayısı ile bcl-2 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlılık sınırına yakın ($p=0.06$) olacak şekilde negatif yönlü bir ilişki bulunmuştur. Mutant p53 proteininin apoptozisdeki indükleyici rolünün kaybolduğu ve artan bcl-2 ekspresyonunun apoptozisi engelleyip hücre yaşamını uzattığı bilgileri hatırlanacak olursa neoplastik gelişimde dengenin proliferasyon lehine bozulduğu bir kez daha gösterilmiştir.

Çalışmamızda, Yamasaki ve arkadaşlarının (20) çalışmalarına paralel yönde apoptotik indeksin median yaşam süresi üzerindeki etkisi istatistiksel olarak anlamsız bulunurken, ayrıca Cox's regresyon analizi ile değerlendirildiğinde Al'in prognoz açısından önemli olmadığı görülmüştür.

Bu çalışmada ayrıca Al, diğer prognostik faktörler olan cerrahi evre, histolojik grade, tümör histolojik tipi ve yaş ile olan ilişkisi yönünden de araştırılmış fakat istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki olmadığı başka bir ifadeyle, EOK'li olgulardaki farklı evre, grade ve histolojik tiplerde apoptoz yoğunluğunda bir farklılık olmadığı saptanmıştır.

Tümör hücrelerinin mitotik statüsü gözönüne alındığında daha agresif malig tümörlerde daha yüksek mitoz sayısı beklenir. Bizim çalışmamızda da bu yönde sonuç elde edilmiştir. Yüksek grade'li EOK'de istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha yüksek mitoz sayısı bulunmuştur ($p<0.001$). ayrıca yine çalışmamızda mitoz sayısı bağımsız bir prognostik faktör olarak bulunmuştur. Yamasaki ve arkadaşlarının 1997'de yayınladıkları sonuçlar da benzer yöndedir (20).

Çalışmamızda apoptozisde regülatör rol oynadıkları bilinen p53 ve bcl-2 proteinlerinin diğer prognostik faktörlerle olan ilişkilerini ve prognozdaki önemlerini de araştırdık.

Diebold ve arkadaşları 1996 yılında yayınladıkları 148 EOK'li olgudan oluşan çalışmalarında p53 ve bcl-2 protein ekspresyonunun prognostik önemi olduğunu saptamışlardır (44). P53 pozitif olgularda survival kötü yönde etkilenirken, bcl-2 pozitif olgularda daha iyi prognoz bildirmişlerdir. Hem nükleer p53 akümüasyonu olan hem de bcl-2 eksprese eden olgular ise tümör

progresyonu ve prognozu açısından bu iki grubun sonuçlarının arasında yer almıştır. Herod ve arkadaşları da yaptıkları araştırmada hem p53 hem de bcl-2'yi bağımsız prognostik faktörler olarak bulmuşlardır. Yüksek düzeyde p53 eksprese eden tümörlerde surviv düşük iken, bcl-2 ekspresyonunun sağ kalımı olumlu yönde etkilediğini göstermişlerdir (35). Mark ve arkadaşlarının 1997 yılında, 215 EOK'li olguyla yaptıkları çalışmada bcl-2 pozitif olanlarda tüm yaşam süresinin daha uzun ve prognoz daha iyi olduğunu saptamışlardır (37). Henriksen ve arkadaşları da benzer sonuçlara ulaşmışlardır (66).

Hartmann ve arkadaşlarının 1994 yılında yaptıkları 284 EOK'li olgudan oluşan çalışmalarında ise univariant analizle p53 ekspresyonu azalmış sağkalımla ilişkili bulunurken, multivariant analizle değerlendirildiğinde p53 bağımsız bir prognostik faktör olarak bulunmamıştır (67). Yamasaki ve arkadaşlarının 1997'deki 71 EOK'li olguyu içeren çalışmalarında da bu apoptozis regülâtör genlerin ekspresyonlarının prognozda bir önemi olmadığı belirtilmiştir (20). Bizim çalışmamızdaki istatistiksel sonuçlar da bu yöndedir. Yani gerek p53 ve gerekse bcl-2 ekspresyonlarının median sağkalım üzerindeki etkileri istatistiksel olarak anlamsız bulunurken ($p>0.05$). Cox's regresyon analizi ile değerlendirildiklerinde her ikisinin de prognoz açısından önemsiz oldukları görülmüştür.

Hartmann ve arkadaşları 1994 yılında yaptıkları 284 gibi oldukça büyük sayıda EOK'li olgudan oluşan çalışmalarında p53 ekspresyonu ile evre, histolojik grade, histolojik tip ve yaş arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır (67). Erken ve ileri evre hastalıklarda p53 ekspresyonu açısından farklılık bulamamışlardır. Yüksek gradeli vakalarda p53 pozitifliğini istatistiksel olarak

anlamli olacak oranda daha fazla bulmuşlardır. Seröz ve seröz olmayan histolojik subtipler arasında p53 ekspresyonu açısından fark saptamamışlardır. Benzer şekilde yaş grupları arasında da istatistiksel fark bulunmamıştır. Bizim çalışmamızda her ne kadar grade ile p53 ekspresyonu arasında bir ilişki saptanmamışsa da diğer bulgular bu çalışmayla paralellik göstermektedir. EOK'li olgularda farklı evre, histolojik subtip ve yaş grupları arasında p53 ekspresyonu açısından fark bulunmamıştır.

Wilander ve arkadaşları 1995 yılında yayınladıkları çalışmalarında bcl-2 protein ekspresyonunu daha az agresif, daha düşük gradeli EOK'li vakalarda anlamlı şekilde daha yüksek bulmuşlardır (66). Benzer sonucu Diebold ve arkadaşları da belirtmişlerdir (44). Diebold ve ark. çalışmalarında bcl-2 ekspresyonuyla tümör evresi arasında bir ilişki bulamamışlardır. Histolojik tümör tipi yönünden değerlendirdiklerinde ise bcl-2 ekspresyonunun endometrioid epitelyal over kanserlerinde daha fazla görüldüğünü saptamışlardır. Müsinöz kanserlerde ise hem bcl-2 hem de p53 proteini gösterilememiştir. Seröz ve andiferansiye karsinomlarda ise her iki protein de yüksek düzeylerde saptanmıştır. Marx ve arkadaşlarının 215 EOK'li olguyla 1997'de yaptıkları çalışmada ise değişik histolojik subtipler ve farklı evreler için bcl-2 ekspresyonu açısından fark saptanmamış, bcl-2 ekspresyonunun daha düşük gradeli tümörler ile ilişkili olduğu bulunmuştur (37). Yaptığımız bu çalışmada ise biz bcl-2 ekspresyonu ile bu parametreler arasında herhangi bir ilişki saptayamadık ($p>0.05$).

Malign tümörlerde evre, histolojik tip ve grade'in prognozda önemli olduğu klasik bir bilgidir. Bu nedenle biz de çalışmamızda EOK'li olgularda

cerrahi evre, histolojik subtip ve histolojik grade'in sağkalım ve prognoz üzerindeki etkilerini araştırdık. Genel literatüre uygun şekilde çalışmamızdaki olgularda % 68 oranında seröz, % 32 oranında da nonseröz (musinöz ve endometrioid) histolojik tümör tipleri tespit edilmiştir (68). Petterson ve arkadaşlarının 1995'te yayınladıkları çalışmalarında EOK'li kadınların uzun süre asemptomatik olmalarından dolayı tanı esnasında üçte ikisinin ileri evrede oldukları belirtilmiştir (68). Literatürdeki bilgi de bu yöndedir. Bizim çalışmamızda da olguların % 28'inin evre I ve II'de ve % 78'nin evre III ve IV'de oldukları görülmüştür.

Çalışmamızda yer alan olgular için 24 aylık sağ kalım olasılığı % 92, 36 ay için % 82 ve 48 ay için % 72 olarak bulunmuş, median sağkalım 75.4 ay olarak saptanmıştır. Villa ve ark.'da benzer sonuçlar bildirmişlerdir (69).

Hoskins ve arkadaşlarının 1993'te (68) ve Makar ve arkadaşlarının 1995'te (70) yayınladıkları çalışmalarında prognozla ilgili en önemli faktörün evre olduğu belirtilmiştir.

Gerek Vergote ve ark. (71), gerekse Makar ve ark (70) yaptıkları çalışmalarda histopatolojik prognostik faktörler olarak histopatolojik tip ve grade'i göstermişlerdir. Ayrıca clear-cell (berrak hücreli) karsinomun tüm evreler için en kötü prognoza sahip olduğunu belirtirlerken müsinöz karsinomun ileri evreler için daha kötü prognozu gösterdiğini ve en iyi prognozun endometrioid tip tümörde görüldüğünü belirtmişlerdir.

Çalışmamızda clear-cell karsinomlu olgu olmadığı için bu yönde bir görüş bildiremiyoruz. Fakat tümör histolojik subtipinin median sağkalım ile istatistiki olarak anlamlı bir ilişkisini biz çalışmamızda saptayamadık. Tümörün evresinin

artmasıyla median sağ kalımın azaldığının görülmesine rağmen istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Yaptığımız çalışmada grade I olgularda ortalama yaşam süresini (OYS) 82 ay, grade II ve III olgularda 68.4 ay olarak bulduk. Yüksek histolojik grade düşük OYS ile koreledir ve bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Ayrıca grade II ve III olgularda EOK'den ölüm riski grade I olgulara göre 5.88 kat daha yüksek bulunmuştur ($p=0.09$) Histolojik grade bağımsız bir prognostik faktör olarak bulunamasa da "p" değeri istatistiki anlamlılık sınırına yakın, 0.09 olarak bulunmuş; tümörün cerrahi evresi ve histolojik tipi ise bağımsız prognostik faktörler olarak bulunmamışlardır. Genel literatüre ters olan bu sonuçların vaka sayılarının azlığından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR

Çeşitli prognostik faktörlerin analizi sonucunda tümördeki mitoz sayısının en önemli prognostik faktör olduğu saptanmıştır. Dolayısıyla adjuvan kemoterapiden fayda görebilecek hastaların saptanmasında tümördeki mitoz sayısının belirlenmesinin önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

Biz çalışmamızda başta apoptotik indeks, p53 ve bcl-2 proteinleri olmak üzere epitelyal over kanseri ile ilgili olan, literatürde önemli sayılan bazı faktörlerin prognozdeki değerlerini ve birbirleriyle olan ilişkilerini araştırdık. Apoptotik indeksin bir prognostik faktör olmadığını ve mitoz sayısı dışında diğer prognostik faktörler ile bir ilişkisinin olmadığını saptadık. Apoptotik indeks ile bağımsız prognostik faktör olarak bulunan mitoz sayısı arasında ise istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte negatif yönde bir ilişki saptanmıştır.

Benzer şekilde çalışmamızda p53 ve bcl-2 ekspresyonlarının epitelyal over kanserli hastalarda prognostik önemi olmadığını ve mitoz sayısı dışındaki diğer prognostik faktörlerle istatistiksel olarak anlamlı ilişkilerinin olmadığını gösterdik. Mitoz sayısı ile p53 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde pozitif yönde bir ilişki saptanırken, bcl-2 ekspresyonuyla mitoz sayısı arasında istatistiki anlamlılık sınırına yakın ($p=0.06$) bir ilişki bulduk.

Bulduğumuz bu sonuçları destekleyen veya aksi yönde görüş bildiren yayınların olması bu konuda daha fazla sayıda olguyu içeren çok sayıda çalışmanın yapılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

7. ÖZET

Bu çalışmada, epitelial over kanserlerindeki önemi konusunda henüz çok fazla bilginin olmadığı apoptotik prosesin bir göstergesi olan apoptotik indeksin (AI) ve tümör supresör gen p53 ve onkogen bcl-2 ekspresyonlarının sürviv ve çeşitli klinikopatolojik faktörlerle olan ilişkileri araştırılmıştır. Bu amaçla 1990-1997 yılları arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilimdalı'nda opere edilip cerrahi evrelendirme yapılmış olan 50 epitelyal over kanserli (EOK) olgu çalışmaya dahil edilmiştir.

Programlı hücre ölümü olan apoptozis anormal hücre çoğalmasını dengeleyen fizyolojik bir olaydır. Bu olayın histopatolojik göstergesi olan apoptotik indeks ile apoptozis regülatör genleri olarak kabul edilen tümör supresör gen p53 ve onkogen bcl-2 ekspresyonları arasındaki ilişki araştırıldığında istatistiksel anlamlılık ifade eden bir ilişki saptanmamıştır. Bu sonuç bizi apoptozis regülatör faktörleri olarak bilinen p53 ve bcl-2'nin neoplastik dokularda meydana gelen apoptozisde oynadıkları rolün değişik olabileceği ve apoptotik prosesin daha kompleks bir hal aldığı düşüncesine götürmektedir. Çalışmamızdaki EOK'li olgulardaki farklı evre, grade ve histolojik tiplerde apoptozis yoğunluğunda bir farklılık olmadığı saptanmıştır. AI'nin median yaşam süresi üzerindeki etkisi istatistiksel olarak anlamsız bulunurken, prognoz açısından da önemli olmadığı görülmüştür.

Çalışmamızda gerek p-53 ve gerekse bcl-2 gen ekspresyonlarının medyan sağ kalım üzerindeki etkileri istatistiksel olarak anlamsız bulunurken, her ikisinin de prognoz açısından önemsiz oldukları ve mitoz sayısı dışındaki

diğer prognostik ve klinikopatolojik faktörlerle istatistiksel olarak anlamlı ilişkilerinin olmadığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda tek bağımsız prognostik faktör olarak bulunan mitoz sayısı ile p53 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönde bir ilişki saptanırken, bcl-2 ekspresyonuyla mitoz sayısı arasında istatistiki anlamlılık sınırına yakın ($p=0,06$) bir ilişki bulunmuştur. Ayrıca çalışmamızda, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte mitoz sayısı arttıkça apoptotik hücre sayısının azaldığı görülmüştür. Bütün bu bulgular bizi neoplastik dokuda meydana gelen değişikliğin dengeyi proliferasyon lehine bozduğu sonucuna götürmektedir.

Olgu sayısının artırılması ile istatistiksel analizlerin daha da doğrulanabileceği gerçeğinin yanısıra, yapılacak prospektif çalışmalarla da bu markırların prognostik önemlerinin daha rasyonel olarak ortaya konulabileceği görüşündeyiz.

8. KAYNAKLAR

1. Platz CE, Benda JA. Female genital tract cancer. Cancer 1995; 75 (suppl):270-294
2. Chen CA, Chen YH, Ko TM, Wu CC, Lee CN Infrequent mutation in tumor suppresser gene p53 in gestational trophoblastic neoplasia. Carcinogenesis 1994; 15:2221-2222
3. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. Cancer Research 1994 ;54 :4855-4878
4. Henry C. Pitot The molecular biology of carcinogenesis. Cancer 1993;72: 962-70
5. Berek S.J., Hacker N.F., Practical gynecologic oncology, Williams and Wilkins copyright, second edition, sayfa 327-77
6. Young RC, Walton LA, Elenberg SS, et al: Adjuvant therapy in stage I and stage II epithelial ovarian cancer : results of two prospective randomized trials. N Engl. J. Med 1990; 332 : 1021
7. Baak JP, Chan KK, Stolk JG, et al: Prognostic factors in borderline and invaziv ovarian tumors of the common epithelial type. Pathol Res Pract 182: 775, 1987
8. Friendlander ML, Hedley DW, Swanson C, et al: Prediction of long term survivals by flow cytometric analysis of cellular DNA content in patients with advanced ovarian cancer. Int. J. Gynaecol Pathol 1: 55, 1983
9. Khoo SK, Hurst T, Kearsley J, et al : Prognostic significans of tumor ploidy in patients with advanced ovarian carcinoma. Gynecol Oncol 39: 284, 1990

10. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al: Studies of the Her-2/neu protooncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244: 707, 1989
11. Berchuck A, Kamel A, Whitaker R, et al: Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 50 : 4087, 1990
12. Leary JA, Edwards BG, Houghton CRS : Amplification of HER-2/neu oncogene in human ovarian cancer. *Int. J Gynecol oncol* 2: 291, 1993
13. Omura GA, Brady MF, Homesley HD, et al : long term follow up and prognostic factor analysis in advanced ovarian carcinoma : the Gynecologic Oncology Group Experience. *J Clin Oncol* 9: 1138, 1991
14. Cummings MC, Winterford CM, Walker NI, Apoptosis. *The American journal of Surgical Pathology*, 21(1): 88-101, 1997
15. Wyllie AH. Apoptosis. *British Journal of Cancer*, 67:208,1993
16. Schwartzman RA, Cidlowski JA. "Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death." *Endocrine Reviews*, Vol.14(2): 133-51, 1993
17. Carson AD, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *The Lancet*, Vol 341: 1251-4 May 15, 1993
18. Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C. Phagocyte recognition of cell undergoing apoptosis. *Immunology today*, Vol. 14(3), 131-6, 1993
19. Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programmed cell death and the control of cell survival: Lessons from the nervous system. *Science*, Vol.262-29, 695-700, October 1993

20. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 267 (1995) 1456-62
21. Oive C, Evans CA, Whetton AD. Induction of apoptosis- new targets for cancer chemotherapy. Seminars in Cancer Biology, Vol 3, 1992: pp417-27
22. Dowd Drand Miesfeld RL. Evidence that glucocorticoid and cyclic AMP induced apoptotic pathways in lymphocytes share distal events. Mol. Cell Biol. 12(1992) 3600-3608.
23. Adrew H Wayle. Apoptosis: an overview. British Medical Bulletin 1997; 53(No.3): 451-465
24. Rajotte D et al. Role of protein kinase C and the Na⁺/H⁺ antiporter in suppression of apoptosis by granulocyte macrophage colony stimulating factor and interleukin-3. J. Biol. Chem. 267(1992) 9980-9987.
25. Kane DJ et al. Bcl-2 inhibition of neuronal death: Decreased generation of reactive oxygen species. Science 262 (1993) 1274-7
26. Hockenbery dD et al. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway apoptosis. Cell 75 (1993) 241-51
27. John Savill et al. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. British Medical Bulletin 1997; 53(no3): 491-508
28. Damjanov I, Linder J. Anderson's Pathology, 10th edition Vol 1 ,372-3
29. Scott K Lyons, Alan R Clarke. Apoptosis and carcinogenesis. British Medical Bulletin 1997; 52 (no3) 554-69
30. Alarcon RM, Ruprow BA, Graeber GI, Knox SJ, Giaccia AJ. Modulation of c-myc activity and apoptosis in vivo. Cancer Research, 56: 4315-9, October 1, 1996

31. Rubin Brown et al. The bcl-2 family of proteins. British Medical Bulletin 1997; 53 (no3): 466-77
32. Jiang MC, Yang-Yen HF, Lin JK. Differential regulation of p53, c-myc, bcl-2 and bax protein expression during apoptosis induced by widely divergent stimuli in human hepatoblastoma cells. Human cell, 9(3) : 223-8, 1996
33. Pzola P, Monica G, Sabina C, et al. Association between cisplatin resistance and mutation of p53 gene and reduced Bax expression in ovarian carcinoma cell systems. Cancer Research 56, 556-62, February 1, 1996
34. Cristhopher O C Bellamy. P53 and apoptosis. British Medical Bulletin 1996 ; 53(no3): 522-38
35. Margaret C. Cumings, M.B., B.S., Clay M. Winterford, and Neal I. Walker, MD. Apoptosis. The American Journal of Surgical Pathology 21 (1): 88-101. 1997
36. John F R, Kerr ,et al. Apoptosis: significance in cancer therapy. Cancer 1994; 73:2013-26.
37. Poul G Ekert and David L Vaux. Apoptosis and the immune system. British Medical Bulletin. 1997;53 (no3): 591-603
38. Marcus E Peter, Adreas Ehret, et al. AIOS and the death receptors. British medical Bulletin 1997;52(no3):604-616
39. Abraham Amsterdam and Salvaraj N. Control of differentiation, transformation, apoptosis in granulosa cells by oncogenes, oncoviruses, and tumor suppressor genes. Endocrin Reviews, 1997 Vol. 18, no.4, 435-61

40. Gwyn T. Williams and Cristopher A. Smith . Molecular regulation of apoptosis: Genetic controls on cell death. Cell, Vol. 74,777-79, September 10, 1993
41. Williams T G. Programmed cell death : Apoptosis and oncogenesis. Cell, Vol. 65, 1097-8, June 28, 1991
42. Adriana H F, Richard N K, Zvi F . Ceramide signalling in apoptosis. British Medical Bulletin 1997;53(no3): 539-53
43. Ylirmi S, MD , and Paavo P, MD. Extent of apoptosis in p53 and bcl-2 expression in germ cell tumors. Human Pathology, 27 : 1221-26. 1996
44. Joachim D, MD, Gustavo B, MD, et al. Bcl-2 Expression, p53 accumulation , and apoptosis in ovarian carcinomas. Am J Clin Pathol 1996; 105:341-9
45. J. Jonathan , O Herod, Aristides G E, et al. The prognostic significance of bcl-2 and p53 expression in ovarian carcinoma. Cancer Research 56, 2178-84 May 1 1996
46. Tsujimoto Y, Finger L R, Yunis J, et al.: Cloning of the chromosome brake point of neoplastic B cells with thet (14,18) chromosome translocation. Science 226: 1097-9, 1989
47. Pezzella F, Tse AGD, et al: Expression of the bcl-2 oncogene protein is not spesific for the 14;18 chromosomal translocation. AM J Pathol 137:225-32, 1990
48. Stanley J. Korsmeyer. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: Regulators of cell death. Blood, Vol 80, no.4 (august 15), 1992: pp879-86
49. Lu Q, Abel P, Foster C S, et al: Bcl-2 : role in epithelial differentiation and oncogenesis. Human Pathology , 27:102-10, 1996

50. Qi-Long Lu, Poulson R et al: Bcl-2 expression in adult and embryonic non-haematopoietic tissues. *Journal of Pathology*. Vol. 169:431-37, 1993
51. Hockenbery D, Zutter M, et al: Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc. Natl Acad Sci USA* Vol.88, pp6961-5, August 1991
52. Vaux DL, Cory S, Adams J MB: Bcl-2 gene promotes haematopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335:440-2, 1988
53. Fumio Yamasaki M D, Osamu Tokunaga MD, et al : Apoptotic index in ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology* 66, 439-48, 1997
54. Marx D, Binder C, Meden H, et al.: Differential expression of apoptosis associated genes Bax and bcl-2 in ovarian cancer. *Anticancer Research* 17:2233-40, 1997
55. Reid P B, Fernando E, Artin M and Douglas R G. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature*. Vol 359, 8 October 1992, 552-4.
56. Niwo K, Itoh M, Murase: Alteration of p53 gene in ovarian carcinoma: clinicopathological correlation and prognostic significance. *Br J Cancer* (1994), 70; 1191-1197
57. Silvano B, Giusupp V, Umberto R, Paola B. p53 accumulation in ovarian carcinomas and its prognostic implications. *Human Pathology*. 24, No. 11, Nov. 1993, 1175-1179
58. Miyashita T, Reed JC: Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80:293-299, 1995

59. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV: Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73: 2013-2036, 1994
60. Baretton GB, Diebold J, Christoforis G, Dopfer K: Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas. *Cancer* 77:255-264, 1996
61. Bodner SM, Minna JD, Jensen SM, et al: Expression of mutant p53 protein immunoreactivity in lung cancer correlates with the class of p53 mutation. *Oncogene* 7:743-749, 1992
62. Leoncini L, Del vecchio MT, Kraft R, Cottier H: Correlations between apoptotic and proliferative indices in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol* 142: 755-763, 1993
63. Kiberu SW, Pringle JH, Murphy P, Lauder I: Correlation between apoptosis, proliferation and bcl-2 expression in malignant non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Pathol Mol Pathol* 49: 268-272, 1996
64. *Radiat. Oncol Biol Phys* 32: 1487-1493, 1995
65. Chyle V, Pollack A, Terry NH, Meyn RE: Apoptosis and downstaging after preoperative radiotherapy for muscle-invasive bladder cancer. *Int J Radiat. Oncol Biol Phys* 35:281-287, 1996
66. Henriksen R, Wilander E, Oberg K, Expression and prognostic significance of Bcl-2 in ovarian tumors, *Brit J Cancer* 72: 1324-1329, 1995
67. Lynn C, Hartmann, Karl Podraz, Patrick C.Roche: Prognostic significance of p53 immunostaining in epithelial ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* Vol 12, No 1(Jan) 1994: pp64-65
68. *Lancet* 1997; 349: 113-17: Epithelial ovarian carcinoma

69. A Villa, F Parazzini, G Bolis. Survival and prognostic factors of early ovarian cancer. British J of Cancer (1998) 77 (1), 123-124
70. Makor A, Claes G, Kristensen G. The prognostic significance of residual disease, FIGO substage, tumor histology, and grade in patients with FIGO stage III ovarian cancer. Gynecologic Oncology 56, 775-180 (1995)
71. Vergote IB, Kaern J, Abeler VM, Trope CG. Analysis of prognostic factors is stage I epithelial ovarian carcinoma. Am J Obstet Gynecol 1993, 169: 40-52

