

T1167



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**TESTİSİN GERM HÜCRELİ TÜMÖRLERİNDE
Fas, FasL ve p27 EKSPRESYONU:
HİSTOPATOLOJİK ALT TIPLERİNE GÖRE ve
ERİŞKİNDE NORMAL TESTİS DOKUSU ile
KARŞILAŞTIRILMASI**

(Uzmanlık Tezi)

T1167/1-1

Dr. Sevim ÖZTEKİN

Tez Danışmanı : Doç.Dr. M. Akif ÇİFTÇİOĞLU

'Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonunca 20.01.0103.01 Proje No ile Desteklenmiştir'

"Tezinden Kaynakça Gösterilerek Yararlanılabilir"

Antalya, 2001

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
Merkez Kütüphanesi

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sırasında bilgi ve becerilerinden faydalandığım saygıdeğer hocalarıma, tezimin hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Doç. Dr. M.Akif ÇİFTÇİOĞLU'na, immünohistokimyasal boyalarda büyük emek harcayan Uz. Biol.Nuran Keleş ve M.Ali ÖZGÜR'e, diğer laboratuvar çalışanlarına ve birlikte çalışmaktan zevk aldığım asistan arkadaşlarıma ve sabrından ve yardımlarından dolayı eşim Dr.Asil ÖZTEKİN'e teşekkür ederim.

*Dr. Sevim ÖZTEKİN
Antalya, 2001*

İÇİNDEKİLER

Sayfa No :

Giriş ve Amaç	1 - 4
Genel Bilgiler	5 - 32
Materyal ve Metod	33 - 36
Bulgular	37 - 50
Tartışma	51 - 64
Sonuçlar	65 - 68
Özet	69 - 70
Kaynaklar	71 - 85

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Testis tümörleri seyrek görülmekle birlikte, erkeklerdeki malign tümörlerin %1'ini oluşturur. Bunun yanında 15-35 yaş arası erkeklerde en sık görülen malign tümör, testis tümörüdür ve bu yaş grubundaki kansere bağlı ölümlerin %10'unu oluşturur (1-6) .

Testis tümörü insidansında nedeni bilinmemekle birlikte, artış görülmekte olup, coğrafik ve ırksal olarak belirgin farklılıklar vardır. ABD'de 1940'lı yıllarda testis tümörü insidansı 3.2/100.000 iken günümüzde 5-6/100.000 olarak bildirilmiştir. Danimarka ve İsveç'de testis tümörü insidansı 9/100.000 olarak bulunmuştur. Bunun yanında beyaz ırkta, siyahlara göre 5 kat daha fazla görülmektedir. Yeni Zelanda ve Asya'da ise daha düşük oranda izlenir (3-8) .

Karsinogenezis çok basamaklı bir süreç olup, fenotipik ve genetik düzeyde kompleks bir mekanizmaya sahiptir. Hücre proliferasyonu ve kanser gelişimini etkileyen başlıca 3 ana regülatör gen grubu mevcuttur. Bunlardan biri büyümeyi ve gelişmeyi artırıcı protoonkogenler, diğeri büyümeyi engelleyici tümör supressör genler (anti-onkogenler) , bir diğeri ise apoptozisi düzenleyici genlerdir. Genetik hasarlanma başlıca bu gen gruplarını hedef alır (3) .

Apoptozisin anlamı hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, programlı, aktif, RNA ve protein sentezine ve enerjiye gereksinim gösteren hücre ölümü olup; kısaca programlı hücre ölümü olarak açıklanmaktadır. Apoptozis fetal gelişimde ve erişkin dokularda birçok fizyolojik durumda önemli role sahiptir. Çoğunlukla fizyolojik hücre ölümü, nekroza direnerek apoptozis yoluyla gerçekleşir. Apoptotik hücre ölümü regülasyonundaki

defektler pek çok hastalığın gelişmesine yol açar. Bunlardan bazıları arasında, hücre proliferasyonuna bağlı kanser gelişimi veya hücre kaybına bağlı kalp yetmezliği veya nöron dejenerasyonu sayılabilir (3,9-10).

Apoptozis enerji gerektiren bir döngünün son noktası olup, birbiriyle örtüşen dört ayrı basamaktan oluşmaktadır. Birincisi apoptozisi başlatan sinyallerin belirlenmesi, ikincisi kontrol ve bağlanma, üçüncüsü infaz fazı, dördüncüsü ise ölü hücrelerin fagositozla ortadan kaldırılmasıdır.

Apoptotik uyarılar sinyaller üreterek plazma membranını geçip, hücre içi regülatör moleküller yoluyla hücrede hedeflerine ulaşır. Plazma membranından geçen transmembran sinyaller apoptozisin pozitif yada negatif belirleyicileridir. Bunlardan en önemlisi ligand bağlayıcı plazma membran reseptörlerinden olan TNFR (tümör nekrozis faktör reseptör) ailesidir. Bunlardan bazıları apoptozisi başlatırken, bazıları hücre proliferasyonunu başlatır, bazıları da her ikisini birden gerçekleştirir.

Apoptozisi başlatan reseptörlerin prototipi olan Fas (Apo-1 yada CD95) proteini anahtar role sahiptir. Fas L'ye (ligand) bağlanarak sitoplazmada ölüm emrini verir (3,9-12).

Fas proteini insanda, lenfositler, kalp, akciğer, böbrek, over, göz ve testis gibi çeşitli dokularda ekspresyon edilir. Hücrelerdeki Fas ekspresyonu düzeyi, normal durumlarda ve patolojik durumlarda hücre ölümünü etkiler. Normal hücre popülasyonlarında durağan durumda hücre proliferasyonu ve hücre ölümü birbirine yakın olup; dengededir. Kanserli dokularda ise hücre artışı, hücre ölümünden daha fazladır ya da bazen hücre ölümünün azalmasına bağlı göreceli olarak hücre artışı görülmektedir. Hücrelerin apoptozise gidememesi kanser gelişimine yolaçabilir. Fas ekspresyonu ve fonksiyonunda değişikliklerin kanser gelişimindeki rolü henüz tam olarak açıklanamamış olmakla birlikte araştırılmaya değer olarak görülebilir. Pek çok malign tümör Fas ekspresyonu gösterebilir. Normal hücrelerle

karşılaştırıldığında bazı malign tümörlerde anormal fenotipde ve fonksiyonel olarak anormal mutant Fas ekspresyonu mevcuttur (3,13-15).

Testis tümörlerinde bu konuda yapılmış oldukça az sayıda çalışma vardır. Bir çalışmada testisin germ hücreli tümörlerinde Fas ve Fas L ekspresyonu ve diğer bir çalışmada seminomatöz tümörlerde Fas ve Fas L ekspresyonu çalışılmış, sonuçları birbiriyle uyumlu bulunmamıştır (16-17).

Fizyolojik koşullarda hücre proliferasyonunu etkileyen çeşitli basamaklar mevcuttur. Bu basamaklar büyüme faktörlerinin hücre membranı üzerinde spesifik bir reseptöre bağlanması, bu reseptörlerin geçici ve sınırlı aktivasyonu, üretilen sinyallerin ikincil haberciler ile nükleusa iletilmesi, DNA transkripsiyonunu başlatan nükleer regülatör faktörlerin indüksiyonu ve aktivasyonu, hücrenin hücre siklusuna girmesi ve ilerlemesi ile en sonunda hücre bölünmesinin gerçekleşmesinden oluşur (3).

Neoplastik hastalıklarda hücre proliferasyonunun kontrolünde defekt olduğu ve bunun da aşırı hücre artışına neden olduğu görülmüştür. Kanser gelişimini daha iyi anlayabilmek için hücre bölünmesinin kontrol mekanizmalarını daha derinden incelemek gerekir. Hücre proliferasyonu ve hücre siklusunun ilerlemesi, bir grup protein kompleksi olan siklinler ve siklin bağımlı kinazlar tarafından kontrol edilir (3,18).

Siklinler başlıca beş ana gruptan oluşmaktadır ve A'dan E'ye kadar isimlendirilir. Siklin C D1-3 ve E, G1 fazı sırasında pik yapar ve hücrenin G1'den S fazına geçişini düzenler. Diğer taraftan Siklin A B1-2, S ve G2 fazında maksimuma ulaşır ve hücrenin mitozu girişini düzenler.

Siklinler ile eşleşen çok sayıda CDK (siklin bağımlı kinaz) molekülü saptanmış olup, siklin partnerleri ve hücre siklusunda yerleri ayırılmıştır. Siklin D1 CDK4'e bağlanır ve G1 fazının ilerlemesini

sağlar. Siklin E -CDK2 kompleksi S fazına girişi sağlar. Siklin A-CDK2 ünitesi S fazını düzenler. Siklin B-cdc2 (CDK1) mitozaya girişi kontrol eder.

Hücre siklusunu negatif olarak kontrol eden CKI(CDK inhibitörleri) tanımlanmıştır. Bu moleküller mevcut siklin-siklin bağımlı kinaz komplekslerine bağlanıp durağan kompleksler oluşturur ve inaktivasyona neden olur. Bu ailenin ilk ve en bilinen üyesi p21'dir. Siklin E-CDK2, Siklin A-CDK2 ve Siklin D1-, D2-, D3-,CDK4 komplekslerini inhibe eder. Diğer bir CKI , p16 olup, CDK4,CDK6 komplekslerine bağlanır (18-23) .

Bu ailenin yeni keşfedilen üyeleri p18 ve p27'dir. P18 Siklin D-CDK4 ve CDK6 komplekslerini inhibe eder. P27 G1 fazının negatif regülatörü olup, Siklin E-CDK2, Siklin A-CDK2 ve Siklin D-CDK4 kompleksleri ile bağlanarak bunların aktivitesini değiştirir.

P27 ekspresyonu normal dokularda görülmekle birlikte yapılan birçok çalışmada malign tümörlerde gittikçe azaldığı görülmüştür ve p27 ekspresyonu kaybının yüksek grade, metastaz yapma potansiyeli ve kötü prognozla beraber olduğunu belirten prostat, mesane, kolon, mide ve oral kaviteye ait çalışmalar bulunmaktadır (24-33) .

Bartkova ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada testisin germ hücreli tümörlerinde hücre siklusu regülatörlerinden p18, p21 ve p27 çalışılmıştır (34).

Bizim çalışmamızda testisin germ hücreli tümörlerinde Fas, FasL ve p27 ekspresyonu araştırılmış olup, normal testis dokusu ile germ hücreli tümörlerin histopatolojik alt tipleri arasındaki farklar incelenmiştir

2. GENEL BİLGİLER

2.1.a. TESTİS TÜMÖRLERİ

Testis tümörlerinin %90-95'den fazlasını germ hücreli tümörler oluşturur (2-6,35)

Etiyoloji :

Testis tümörlerinin etiyojisinde kriptorşizm ya da inmemiş testis, gonadal disgenezi ve androjen insensitivitesi gibi bozukluklar, travma, enfeksiyon, genetik faktörler ve endokrin bozukluklar ilişkili faktörler olarak bilinmektedir (2-6,35)

İnmemiş testis olgularında germ hücreli tümör oranı %5-50 arasındadır ve en fazla seminom geliştiği bildirilmiştir. Genel olarak spermatositik seminom hariç invaziv bir tümörün gelişiminden önce intratübüler germ hücreli neoplazi(IGCN-intratubuler germ cell neoplazi) ya da karsinoma in situ olarak tanımlanan lezyon görülmektedir. İnfertilite nedeniyle yapılan testis biyopsilerinde %0.5-1, kriptorşizmde %2-3 ve testis kanseri olgularında karşı taraf testiste %5-6 oranında IGCN izlenmekte olup, bu oranlar gonadal disgenezide daha yüksektir. Kriptorşizmde IGCN varlığında 5 yıl içinde invaziv tümör gelişme riski %50'den fazla bulunmuştur. Ailesinde özellikle babasında ve erkek kardeşinde testis tümörü olanlarda testiküler malignensi gelişme riski normal popülasyondan 6 kat daha fazladır (2-6,36-42) .

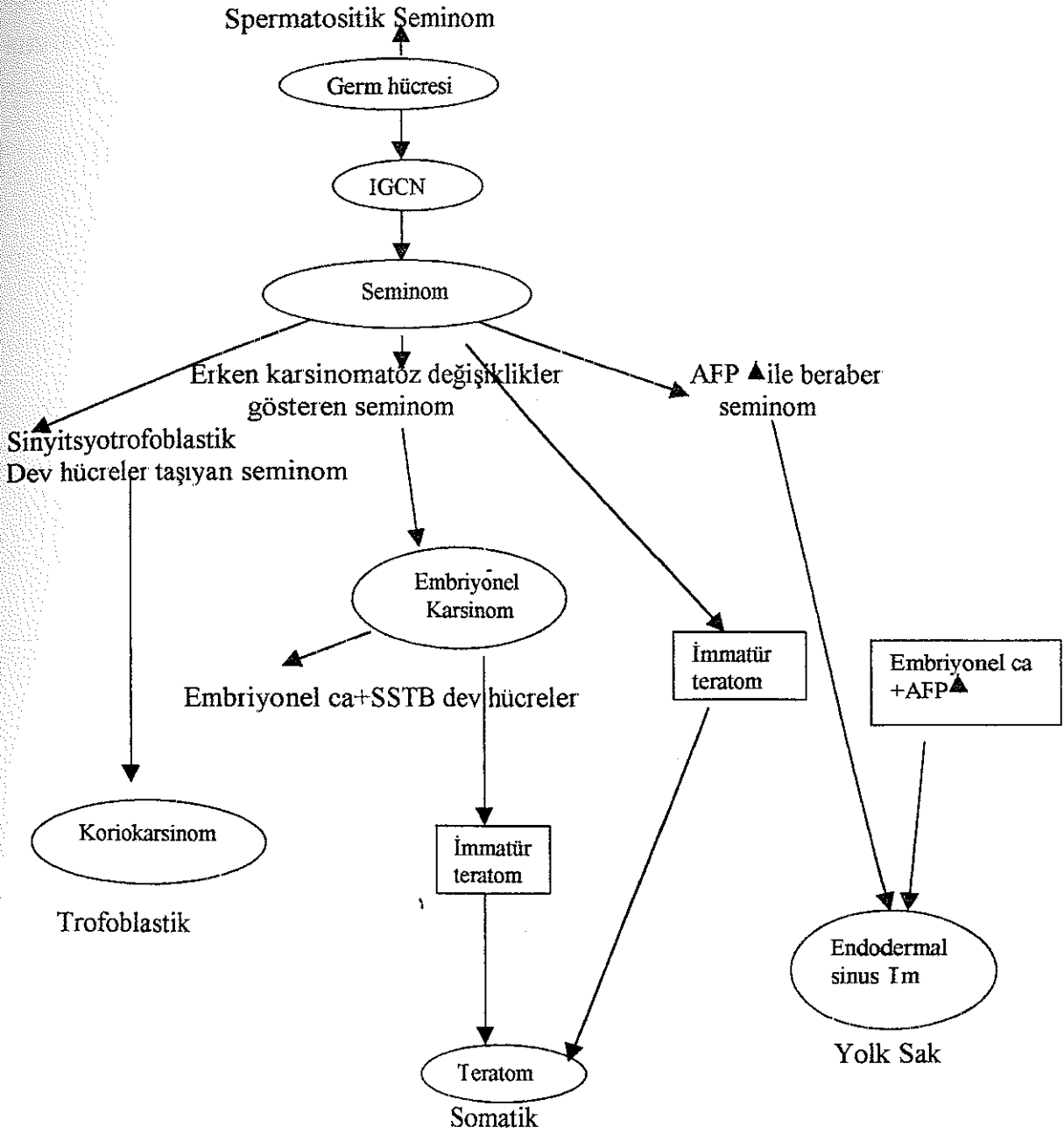
Bilateral testis tümörü prevelansı %2.8'dir. Karşı testiste IGCN prevelansı ortalama %4.9 olup, bunların çoğunun invazyon gösterdiği görülmüştür. IGCN nedeniyle radyoterapi uygulanan olgularda daha sonra

karşı taraf testis dokusunda malign germ hücreli tümör gelişen olgular bildirilmiştir (43, 44) .

Patogenez

Testisin germ hücreli tümörlerinin patogenezi hala tartışmalı bir konu olmakla birlikte, germ hücrelerinden çıktığı genel olarak kabul edilmektedir. Germ hücreli tümörlerin çevresinde çoğu kez IGCN'ye rastlanmakta olup, IGCN'yi oluşturan hücreler kesin olarak bilinmemekte, primordiyal germ hücreleri, embriyonel gonositler ya da erişkin spermatogoniumlar olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte IGCN'ye çocukluk çağı yolk sak tümörlerinde, çocukluk ve adölesan çağı benign teratomlarında ve spermatositik seminomda rastlanmamaktadır (2,6,35,45). Bunların dışında başta seminom olmak üzere IGCN'den her türlü germ hücreli tümör gelişebilir. Seminifer tübüllerin bazalinde, sertoli hücreleri arasında görülen normalden daha geniş, berrak sitoplazmalı atipik germ hücreleri IGCNU (sınıflandırılmayan) olarak adlandırılır. İmmunohistokimyasal olarak IGCN, normal epitelde izlenmeyen PLAP pozitifliği gösterir. Bunun yanında monoklonal 43-9F antikoru ve TRA-1-60 embriyonel markeri ile pozitif boyanır. RBM (Rna bağlayıcı motif) markerinde kayıp izlenir (46-49) .

Germ hücreli tümörler arasındaki ilişki aşağıda şematize edilmiştir (5,6,35,50)



SINIFLANDIRMA

Testis tümörlerinin WHO (Dünya Sağlık Örgütü)'ya göre sınıflandırılması (2,5,6) .

1. Germ hücreli tümörler (%90-95)

- ◆ Tek histolojik tip
- Seminom
- Spermatositik Seminom
- Embriyonel Karsinom
- Yolk Sak Tümörü
- Polyembriyoma
- Koriokarsinom
- Teratom

Matür

İmmatür

Malign transformasyon gösteren

- ◆ Birden fazla histolojik tip içeren
- Embriyonel karsinom ve teratom (teratokarsinom)
- Koriokarsinom ve diğer tipler
- Diğerleri

2. Seks Kord / Stromal Tümörler (%4)

- ◆ İyi differansiye tümörler
- Leydig hücreli tümör
- Sertoli hücreli tümör
- Granüloza hücreli tümör
- ◆ Mikst tümörler
- ◆ Differansiyasyonunu tamamlamamış tümörler

3. Mikst germ hücreli ve seks kord stromal elemanlardan oluşan tümör ve tümör benzeri lezyonlar (< %1)

- Gonadoblastoma
- Diğerleri

4. Miscellaneous Tümörler

Karsinoid

5. Lenfatik ve hemapoietik tümörler

6. Metastatik tümörler

Testis tümörlerinin büyük bir çoğunluğunu oluşturan germ hücreli tümörler için çeşitli sınıflamalar yapılmış olmakla birlikte bunlardan birbirine en yakını Mostofi ve Price'in yaptığı sınıflama ile WHO'nun yaptığıdır (2,6,35).

İngiliz testiküler tümör paneli

Seminoma
Klasik
Spermatositik
Malign Teratom
İndifferansiye
Malign Teratom
Intermediate
Teratoma
Differansiye
Malign Teratoma
Trofoblastik
Yolk Sak Tümörü

Mostofi ve Price

Seminom
Tipik
Spermatositik
Anaplastik
Embriyonel karsinom
Adult
Polyembriyoma
Embriyonel ca+Teratom
(teratokarsinom)
Teratom
Matür
İmmatür
Koriokarsinom
Embriyonel ca, infantil tip

WHO

Seminom
Spermatositik
Embriyonel Ca
Polyembriyoma
Embriyonel Ca+teratom
(teratokarsinom)
Teratom
Matür
İmmatür
Malign
transformasyon gösteren
Koriokarsinom
Yolk Sak Tümörü

EVRELENDİRME

Testis tümörleri için birden fazla evrelendirme sistemi vardır. Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü'ne göre testis tümörlerinin evrelendirilmesi şöyledir (2-3) .

EVRE I : Lokal yayılım

- A. Testise sınırlı
- B. Testis ekleri tutulmuş
- C. Skrotum duvarı tutulmuş

EVRE II : Retroperitoneal lenfatiklere yayılım

- A. Mikroskopik
- B. Gross yayılım, kapsül invazyonu yok
- C. Gross yayılım kapsül invazyonu ile birlikte
- D. Masif retroperitoneal yayılım

EVRE III : Diafram üzerinde metastaz

- A. Tek metastaz
- B. Multipl metastaz

TNM sistemine göre ise testis tümörlerinde şöyle evrelendirme yapılmıştır (5,35):

- Tx : Testisin durumu bilinmiyor
- To : Belirgin primer yok (skar dahil)
- Tis : İntratübüler tümör, invazyon yok
- T1 : Testis ve epididim ; vasküler invazyon veya tunika albuginea invazyonu yok

T2 : Testis ve epididim, vasküler invazyon ve tunika albuginea invazyonu, tunika vaginalis tutulmuş

T3: Spermatik kord tutulumu

T4: Skrotum tutulumu

Nx : Nodal durum bilinmiyor

No : Bölgesel lenf nodu tutulumu yok

N1 : 2cm'den küçük bir lenf nodu tutulumu ya da (+) lenf nodları < 5

N2 : 2-5 cm arası bir lenf nodu tutulumu yada multipl tutulum, (+) lenf nodları >5

N3 : Lenf nodu tutulumu 5cm'den fazla

Mx : Uzak metastaz kanıtı yok

M1a : Bölgesel olmayan nodal veya akciğer metastazı

M1b : Bölgesel olmayan nodal veya akciğer metastazından başka uzak metastaz

Sx : Markerleri bilinmiyor

So : Bütün markerleri normal

	LDH	HCG(MIU/ml)	AFP(ng/ml)
S1 :	< 1.5x N	<5,000	<1,000
S2 :	1.5-10xN	5,000-50,000	1,000-10,000
S3 :	>10xN	>50,000	>10,000

Testisin germ hücreli tümörleri klinik olarak; gerek prognoz, gerekse tedavilerindeki farklar açısından Seminomatöz ve NSGCT (Nonseminomatöz germ hücreli tümör) olarak iki ana gruba ayrılmaktadır.

NSGCT'ler denildiğinde embriyonel karsinom ve birden fazla histolojik tip içeren tümörler kastedilmektedir. Testis tümörlerinin yaklaşık %50'si, birden fazla histolojik tip içeren mikst tipde tümörlerden oluşmakta olup, en fazla teratom ve embriyonel karsinom birlikteliği yani teratokarsinom %24, teratom, embriyonel karsinom, yolk sak tümörü ve HCG pozitif sinsiyo trofoblastlardan oluşan mikst tümör %14, teratom, embriyonel karsinom ve seminom birlikteliği %6.4, seminom ve embriyonel karsinom birlikteliği %5 oranında izlenmektedir (2-6,35)

Klinik olarak testis tümörleri genellikle ağrısız şişlik şeklinde bulgu verir. %10-20 olguda ağrı görülebilir. Seminomatöz tümörlerin %70'i evre I olarak izlenirken, NSGCT'in %50 'den fazlası daha çok evre II ve III olma eğilimindedir. Buna bağlı olarak testis tümörleri eğer retroperitoneal metastaz yapmış ise yan ağrısı, akciğere metastaz yapmış ise öksürük ve hemoptizi gibi metastaza bağlı bulgular verebilir. Seyrek olarak HCG içeren tümörlerde jinekomasti görülebilir(2-6,35).

SEMİNOMLAR

Testis tümörlerinin %35-71'i seminomlardan oluşur. Pür seminomlar ise germ hücreli tümörlerin %50'sidir ve 4.-5. dekatta, ortalama 42 yaşında görülür. Genellikle seminom dışı germ hücreli tümörlerden 5 veya 10 yıl daha sonra ortaya çıkar. 10 yaş gibi erken bir dönemde seminom görülmüş olmakla birlikte bebeklerde izlenmemiştir (2-6, 35).

Seminomlar genellikle ağrısız şişlik ve kitle olarak bulgu verir. Retroperitoneal metastazlar nedeniyle lomber sırt ağrısı olguların ancak %1-3'ünde izlenir. Serum HCG yüksekliği %10 vakada bulunur ve sınıtyotroblastların varlığını yansıtır. Serum AFP yüksekliği örneklenmemiş bir nonseminomatöz komponentin varlığını gösterir yada seyrek olarak yolk sak tümörüne doğru moleküler düzeyde bir transformasyon olabilir (2,4-6,35,50,51).

Seminomların kesit yüzü homojen, gri, kirlili beyaz renkte, lobüle yada multinodüler olup, iyi sınırlı dışarı doğru taşma gösteren, yumuşak yada sert kıvamlı kitlelerdir. Kanama ve nekroz alanları pek beklenmez; eğer mevcut ise çok sayıda örnek alınarak seminom dışı komponentlerin varlığı ekarte edilmelidir (2-6,35). Mikroskopik incelemede tümör hücreleri büyük yuvarlak santral nükleuslu, nükleollerini belirgin, geniş berrak sitoplazmalı, sitoplazma sınırları belirgin hücrelerdir. Tümör dokusunda çoğunlukla üstüste binmeyen tabakalardan oluşan solid patern izlenir ve fibröz septalarla ayrılmıştır. Septalarda değişen miktarda lenfositik infiltrasyon, bazen de Langhans tipi dev hücrelerin yer aldığı granümatöz yangı izlenir. Solid paternin yanısıra, multinodüler patern, intertisyel patern ve seyrek olarak da tübüler patern izlenebilir. Seminom hücreleri sitoplazmalarında yoğun glikojen taşır ve PAS ile pozitif boyanır. İmmunohistokimyasal olarak PLAP ile %98 pozitif boyanır.

Seminomlarda, sitokeratin 8,18 ve seyrek olarak sitokeratin 4,17,19 pozitifliği izlenebilirse de genellikle tek tek tümör hücrelerinde görülür, yaygın değildir. Seminomların yaklaşık %10'unda fokal yada diffüz sitokeratin reaktivitesi görülebilirse de yine de nonseminomatöz tümörlerle ayırıcı tanıda kullanılabilir (52). Seminomların %10-20'sinde sinsityotrofoblastik dev hücreler görülür ve bunlar HCG ile pozitif boyanır. Bu tümörlerin prognozu kesin olarak bilinmemekle birlikte klasik seminomdan daha kötü olduğu söylenmektedir (5,6,35,53).

Seminomlarda DNA indeksi 1.66 olup, nonseminomatöz tümörlerden belirgin olarak yüksektir. Bunun yanında bir çalışmada nonseminomatöz tümörlerde DNA indeksi evre I tümörlerde 1.45, evre II tümörlerde 1.42 olarak bulunmuştur. Seminom dışı tümörlerde genellikle aneuploidi görülürken, seyrek olarak diploidi bulunabileceği söylenmiştir (5,54,55). Seminomlarda kromozom 12 anömalileri tesbit edilmiştir (56).

Ayırıcı tanıda embriyonel karsinom, yolk sak tümörü, spermatositik seminom, lenfoma ve leydig hücreli tümör düşünülmelidir. Embriyonel karsinomun hücresel özellikleri daha farklı olup, veziküle nükleuslu ve sitoplazmik sınırları belirgin olmayan hücrelerden oluşur. Bu hücreler üstüste biner ve yağlımlar gösterir. Seminomda ödeme bağlı mikrokistik alanlar görülebilir ve yolk sak tümörü ile karıştırılabilir. Seminomda bu alanlar daha düzensizdir ve boşluklar içinde dökülmüş seminom hücreleri izlenir. Sinsityotrofoblastik dev hücrelerin seminomlarda da görülebilmesi nedeniyle koriokarsinomla karışmasına neden olabilir. Ancak burada sitotrofoblastların olmaması ile ayırdedilebilir.

Lenfoma ise daha ileri yaşlarda ve genellikle bilateral olarak görülür ve seminomdaki intertisyel paterne benzer şekilde izlenir.

İmmunohistokimyasal olarak seminom, PLAP pozitifdir. Sitokeratin ile tek tek hücrelerde boyanma izlenir. HCG yalnızca sinsityotrofoblastik dev

hücrelerin varlığında pozitif boyanır. AFP ve LCA negatiftir. Bu boyanma özellikleri ayırıcı tanıya yardımcı olabilir. (2-6,35,57). CD30 genellikle embriyonel karsinomlarda pozitif boyanırken, seminomlarda da seyrek olarak pozitif olarak boyandığı gösterilmiş olup, moleküler düzeyde embriyonel karsinoma doğru bir dönüşüm olabileceği yönünde yorumlanmıştır (58).

Leydig hücreli tümörler de seyrek olarak seminom ile karışabilir, ancak tümör hücreleri içindeki madde birikimi glikojen değil, lipiddir ve hücreler arasında fibröz septalar ve yangı hücreleri izlenmez.

Seminomlar 3 ana alt gruba ayrılır. Bunlar; %90'ını oluşturan klasik seminom, spermatositik seminom ve anaplastik seminomdur.

Anaplastik seminom, klasik olarak her büyük büyütme alanında 3 veya daha fazla atipik mitoz içeren ve hücrel olarak daha fazla anaplazi gösteren tümörlerdir. Prognoz açısından önemi tartışmalıdır ve anlamlı olabilmesi için 6 veya 7 atipik mitoz çıkarılması gerektiği söylenmektedir (35).

Spermatositik seminom ilk kez 1946 yılında Masson tarafından tanımlanmıştır. Tüm testis tümörlerinin %4-7'sini oluşturur ve seminomdan en az 10 yıl daha ileri yaş grubunda görülür ve prognozu daha iyidir. Kesit yüzü daha kanamalı ve nekrotik olma eğiliminde olup, jelatinöz bir görünüme sahiptir. Mikroskopik incelemede 3 tip hücre izlenir. Bunlar, lenfosit benzeri küçük hücreler, intermediate hücreler ve büyük dev hücrelerdir. Spermatositik seminomda hücreler klasik seminomun aksine PAS ile boyanmaz. Fibröz septalarda lenfositik infiltrasyon ya çok azdır yada yoktur. PLAP pozitifliği olguların az bir kısmında izlenir. Beraberinde IGCN izlenmez. Bunlar da spermatositik seminomların kökeninin klasik seminomdan farklı olduğunu düşündürmektedir (2-6,35,59).

Albores-Saavedra ve arkadaşları tarafından spermatositik seminomun anaplastik varyantı tanımlanmıştır (60).

Spermatositik seminom testis dışında pek görülmez ve daha iyi prognoza sahiptir. Ancak Matoska ve arkadaşları tarafından metastatik spermatositik seminom olgusu bildirilmiştir. Seyrek olarak spermatositik seminomda sarkomatoid differansiyasyon izlenebilir ve prognozu oldukça kötüdür (61-62).

EMBRYONEL KARSİNOM

Pür embriyonel karsinom seyrek olarak görülür ve germ hücreli tümörlerin %2-3'ünü oluşturur. Genellikle mikst germ hücreli tümörlerin bir komponenti olup, NSGC tümörler arasında %87 oranında görülmektedir. Embriyonel karsinom sıklıkla 2.-3. dekatta, ortalama 31 yaşında görülür (2-6,35).

Makroskopik olarak düzensiz sınırlı, gri beyaz renkte, kanama ve nekroz alanları içeren, 2-3 cm çapında solid kitle izlenir. Mikroskopik incelemede primitif anaplastik epitelyal hücrelerden oluşan nodüler yapılar görülür. Bu nodüllerde 3 ana patern izlenir; solid, papiller, tübüler ya da glandüler patern. En sık glandüler paterne rastlanır. Embriyonel karsinom, düzensiz şekilli, pleomorfik, üstüste tabakalar oluşturan, veziküler çekirdekli, belirgin makronükleoller içeren ve hücre sınırları seçilemeyen geniş sitoplazmalı hücrelerden oluşur (2-6,35,63).

Embriyonel karsinomda serumda AFP ve HCG yüksekliği görülebileceği gibi daha çok başka bir komponentin daha varolabileceğini gösterir. Serum LDH düzeyi ileri evredeki olguların %60'ında yüksek bulunur (64).

Immunohistokimyasal olarak olguların %86-97'sinde PLAP, %95-100'ünde sitokeratin pozitifdir. EMA ise genellikle negatif olup, olguların ancak %2'sinde pozitif bulunmuştur. CD30 pozitifliği birçok olguda mevcut olup, büyük hücreli anaplastik lenfoma ile ayırıcı tanıda sorun oluşturabilir. Yolk sak tümörlerinden AFP pozitifliği ve hyalin globüllerin olmayışı ile ayırdedilebilir. Embriyonel karsinom metastazları, kötü differansiye somatik karsinomlar ile karışabilir. Eğer musin ile pozitif boyanıyorsa somatik karsinom lehine yorumlanmalıdır (5,65).

Sitogenetik çalışmalarda embriyonel karsinomda birçok olguda isokromozom 12p tesbit edilmiş olup, i(12p) kopyalarının sayısı ile tümörün ağırlığı arasında doğru orantı görülmüştür. Embriyonel karsinomda N-myc, c-myc, N-ras, K-ras gibi birçok protoonkogenin varlığı gösterilmiştir (5-6,66).

YOLK SAK TÜMÖRÜ

Çocukluk çağında genellikle pür olarak izlenen ve testis tümörlerinin büyük çoğunluğunu oluşturan yolk sak tümörü, erişkinlerde çoğunlukla mikst germ hücreli tümörlerin bir komponenti olarak izlenir. Seminom dışı germ hücreli tümörler arasında %40-50 oranında izlenir.

Makroskopik incelemede kapsül içermeyen, gri açık kahverengiden sarıya kadar değişen kistik ya da mikzoid görünümde nodüler tümör dokusu izlenir. Erişkinlerde kanama ve nekroz yaygın olarak bulunur. Çocukluk çağındaki tümörler daha homojen ve solid görünüme sahiptir. Mikroskopik incelemede birçok histopatolojik patern mevcut olup, çoğunlukla bu paternler içiçe girmiş olarak izlenir. Bu paternler başlıca; retiküler (mikrokistik yada balpeteği), endodermal sinüs (perivasküler), papiller, solid, glandüler/alveoler, miksomatöz, sarkomatoid, makrokistik, poliveziküler vitellin, hepatoid ve parietal paternlerdir. En sık mikrokistik patern izlenir. İntrasitoplazmik vakuoller nedeniyle lipoblast benzeri görünüm almış hücrelerin incelmış sitoplazmalarının birleşmesi ile oluşur. En karakteristik patern ise fibröz doku ile kuşatılmış santral yerleşimli bir damar yapısını çevreleyen malign epitel hücrelerinden oluşan endodermal sinüs paternidir ve bu yapıya Schiller-Duval cisimciği yada glomerüloid cisimcik adı verilir. Olgularda spesifik olmamakla birlikte karakteristik

olan bir başka histopatolojik özellik de çapları 1-50 μ arasında değişen ve PAS ile pozitif boyanan intrasitoplazmik hyalin globülleri ve bazal membran birikimidir.

Olguların %90-95'inde serumda AFP yüksekliği görülür. Dokuda AFP reaksiyonu bazen seminom ve embriyonel karsinomda seyrek olarak pozitif izlenebilirse de yolk sak tümörlerinde %55-100 pozitif olarak boyanır. Çocukluk yaş grubunda ise AFP pozitifliği daha az oranda izlenir. İmmunohistokimyasal olarak AFP yanında sitokeratin yaygın olarak pozitif, EMA negatif olup, PLAP ise diğer germ hücreli tümörlerden daha düşük oranda izlenir.

Ayırıcı tanıda solid patern seminomla karışabilir ve seminomdan yolk sak tümörüne doğru bir transformasyonu gösterdiği düşünülmektedir. Glandüler patern teratom ile karışabilir. Ancak yolk sak tümöründe bez yapılarında dallanmalar ve birbiriyle anastomozlar izlenir. Teratomdaki bez yapıları çevresinde izlenen düz kas hücreleri burada izlenmez. AFP pozitifliği de tanıya yardımcıdır. Embriyonel karsinom ve çocukluk çağı granuloza hücreli tümörden ayırımı da yapılmalıdır. Yolk sak tümöründe vimentin stromada zayıf pozitif izlenirken, granuloza hücreli tümörde kuvvetli pozitifdir (2-6,35,50-52).

KORIOKARSİNOM

Koriokarsinom mikst germ hücreli tümörler arasında dikkatli bir şekilde inceleme yapılırsa %16 gibi bir oranda izlenebilir, ancak tek başına oldukça seyrek ve testis tümörlerinin %0.3'ünü oluşturur. Pür koriokarsinom genellikle 2-3. dekatta görülür ve daha çok metastatik semptomlarla ortaya çıkar. Bazen testiste palpabl kitle tesbit edilemez.

Puberte öncesinde görülmez. Hemoptizi, sırt ağrısı, gastrointestinal kanama ve nörolojik bozukluklar , bazen de jinokomasti ile bulgu verebilir.

Makroskopik incelemede testis normal boyutlarda, bazen de atrofik olabilir. Kesit yüzünde kanamalı, ortası nekrotik ve çevresi gri doku içeren nodül izlenir. Mikroskopik incelemede, kanama ve nekroz alanları çevresinde berrak sitoplazmalı, orta derecede pleomorfik mononükleer sitotrofoblastlar ve geniş amfofilik sitoplazmalı, yer yer eritrosit içeren intrasitoplazmik lakünler taşıyan multinükleer sinsityotrofoblastlardan oluşan malign trofoblastik hücreler izlenir. Daha iyi differansiye olgularda sitotrofoblastlar normal plasentayı taklit eder şekilde sinsityotrofoblastlarca çevrelenir. Çoğunlukla yaygın hemoraji nekroz nedeni ile koriokarsinom odağını görmek için çok sayıda kesit yapmak gerekir. Koriokarsinom, fizyolojik trofoblastik dokuda da görülen damar invazyonu eğilimi gösterir ve klinik olarak tümörün daha ağırsiv olmasına yol açar

Koriokarsinom, immunohistokimyasal olarak HCG ile kuvvetli pozitif boyanır. Tümör dokusunda boyanan hücreler daha çok sinsityotrofoblastlardır. Sitotrofoblastlar ya zayıf olarak boyanır yada hiç boyanmaz. Bununla beraber olguların %50'si PLAP ile, %50'si EMA ile ve %25'i de CEA ile pozitif boyanır. Sitokeratin 7,8,18 ve 19 ile pozitif boyanma gözlenir. Bunların yanında sinsityotrofoblastlarda pregnansi-spesifik beta-1 glikoprotein ve Human Plasental Laktojen pozitifliği izlenebilir (2-6,35,52,64,67) .

Ayırıcı tanı, trofoblast içeren diğer germ hücreli tümörler ile yapılmalıdır. Fakat diğer tümörlerde trofoblastlar tek tek yada küçük gruplar halinde düzensiz olarak izlenir ve koriokarsinomda görülen bifazik patern bulunmaz. Trofoblastik hücreler içeren seminom ve dejenere kanamalı alanlar taşıyan embriyonel karsinomdan ayırımı yapılmalıdır (2-6,35) .

TERATOM

Teratom kompleks bir tümör olup farklı germ yapraklarından yada bir germ yaprağından oluşmuş farklı dokulardan oluşan bir tümördür. Çocukluk yaş grubunda %15 oranıyla testis tümörleri arasında 2. sırada yer alır. Çocuklarda genellikle tek başına görülürken erişkinlerde diğer mikst germ hücreli tümörlerin yarısından fazlasında bulunur ve tek başına NSGCT'lerinin %25'ini oluşturur. Tek başına seyrek olup, daha yavaş gelişir. Sıklıkla 2.-3. dekatta izlenir. Matür, immatür ve malign transformasyon gösteren teratom olarak alt gruplara ayrılır. Matür teratom erişkinlerde benignite anlamına gelmez (68). Seyrek olarak matür teratomun yine matür teratom olarak metastaz yaptığı gösterilmiştir (69).

Makroskopik olarak teratomlar multinodüler görünümde olup, kesit yüzü multikistik veya solid olabilir. Bazen kıkırdak ve mikzoid alanlar izlenebilir. İmmatür alanlar daha parlak ve beyin dokusuna benzer görünüme sahiptir. Mikroskopik incelemede matür teratom erişkin somatik dokularından oluşur. Sitolojik atipi görülebilir ve bu malignite potansiyelinin varlığını kanıtlar. Bir başka kanıt ise aneuploidi olmasıdır. Sitolojik atipi immatürite kriteri değildir. İmmatür teratom tanısı vermek için, embriyonel veya fetal yapılar görmek gerekir. En sık görülen immatür dokular, nöroepitelyum, nöroblastik-tip dokular, blastömatöz doku, özellikle epitel adaları çevresinde primitif çizgili kas ve düz kas prekürsörleridir. Sitolojik atipinin düşük ve yüksek dereceli olmak üzere sınıflandırılmasının prognoza etkisi tartışmalıdır.

Malign transformasyon gösteren teratomlarda ise epitelyal komponentden çıkan ve stromaya invazyon gösteren malign epitelyal tümör yada stromadan kaynaklanan sarkomatöz tümör izlenir (2-6,35,70).

İmmunohistokimyasal olarak teratom içerdiği dokulara göre boyanır. Nöral doku, nöral markırlar ile, epitelial alanlar sitokeratin ile, stromal dokular vimentin ile, kas dokusu desmin ile pozitif boyanır. Enterik yada respiratuvar bez yapıları AFP ile pozitif boyanır. Bunun yanında olguların %50'sinde CEA, alfa-antitripsin ve ferritin ile pozitif boyanma görülebilir. Seyrek olarak PLAP ile boyanan bez yapıları da görülebilir (5-6,35).

Ayrıcı tanı, pür matür teratomlarda epidermoid kist ve dermoid kist ile yapılmalıdır. Bazen metastatik lezyonlarda karsinomatöz odağın teratomatöz epitel veya embriyonel karsinomdan kaynaklandığını ayırtetmek zor olabilir. Işık mikroskopisinde teratomdan kaynaklanan karsinomlarda üstüste yığılmalar yoktur, hücre kontürleri daha düzenlidir, nükleol belirginliği yoktur ve müskarmin ile pozitif boyanır (71).

Monodermal bir teratom olarak kabul edilen karsinoid tümör seyrek olup, 2.-9. dekadlar arasında görülür. Genellikle sessiz olup, olguların ancak %10'unda karsinoid sendrom izlenir. Genellikle iyi prognoza sahip olup; orşiektomi tedavide tek başına yeterlidir.

Monodermal bir teratom olarak kabul edilen diğer bir tümör ise Primitif Nöroektodermal Tümördür (PNET). Bu tümör kordonlar, küçük tübüler yapılar, rozet yada rozet beheri yapılar oluşturmuş küçük hiperkromatik hücrelerden oluşur. Genellikle immatür teratomda primitif nöral hücrelerin aşırı proliferasyonu olarak kabul edilir. Metastaz yapanların prognozu kötüdür (5-6,35).

MİKST GERM HÜCRELİ TÜMÖRLER

Nonseminomatöz germ hücreli tümörlerin %60-90'ı birden fazla germ hücreli tümörden oluşur ve germ hücreli testis tümörlerinin %40-45'ini oluşturur. Çok çeşitli kombinasyonlar görülebilirse de; en fazla teratom ve embriyonel karsinom (teratokarsinom) , daha sonra teratom, embriyonel karsinom ve seminom birlikteliği ve daha az olarak da seminom ve embriyonel karsinom birlikteliği görülür.

Teratokarsinom genellikle 3 dekada görülür. Davranış olarak pür embriyonel karsinomdan daha az agressiftir. Teratom ve embriyonel karsinom oranlarına göre makroskopik ve mikroskopik görünüm değişebilir.

Poliembriyoma, mikst germ hücreli tümörlerin özel bir formu olup; santral yerleşimli embriyonik plati taklit eden embriyonel karsinom hücrelerinin, amnion kesesindeki benzer şekilde embriyonik yolk sakı taklit eden yolk sak hücreleri tarafından sarılması ile oluşan seyrek bir tümördür. Davranışı diğer NSGCTdeki gibidir.

Yayılım ve Metastaz

Testis tümörleri öncelikle periaortik ve iliak lenf nodlarına yayılır. Tümör ile aynı taraftaki retroperitoneal lenf nodlarına metastaz %80 iken, iki taraflı metastaz %13-20 arasında olup, tek başına karşı tarafta metastaz seyrekdir. İnguinal lenf nodlarına yayılım yalnızca skrotum tutulumu varsa görülür. Hematojen metastazlar ise en fazla akciğer, karaciğer, beyin ve kemiğe olur. Koriokarsinom öncelikle akciğere yayılırken, seminomlar en fazla kemiğe metastaz yaparlar. Germ hücreli tümörlerin metastaz yapma potansiyeli farklıdır. Embriyonel karsinomlar erken yayılım gösterirken

matür teratom ve spermatositik seminom daha az sıklıkla metastaz yapar. Koriokarsinom ise tanı konulduğunda büyük olasılıkla zaten metastaz yapmıştır.

Tedavi ve Prognoz

Bütün testis tümörlerinin başlangıçtaki tedavisi inguinal orşiektomi ve spermatik kordun yüksek bağlanmasıdır. Tedavi protokolü, tümörün seminomatöz ve nonseminomatöz germ hücreli olmasına göre ve tümörün evresine göre değişir. Evre I seminomatöz tümörlerde tedavi için orşiektominin yanında retroperitoneal bölgeye radyoterapi verilmesi yada hastanın izlenmesi tartışılmaktadır. Evre II tümörlerde radyoterapi veya kemoterapi tercih edilebilir. Evre III tümörlerde kemoterapi verilir (35,72-74).

NSGCT'in tedavisinde de tartışmalar vardır ve Evre I tümörlerin %30'unda yanlış evreleme yapıldığı söylenmektedir. Evre I NSGCT'in sadece orşiektomi ile tedavi edilebileceği söylenirken, vasküler invazyon ve embriyonel karsinom oranı fazla tümörlerde ve başka bir çalışmada PCNA indeksi yüksek bulunan olgularda okült metastazların olabileceği ve bu nedenle adjuvan kemoterapi eklenmesi gerektiği söylenmektedir. Yine de son yıllarda NSGCT de doğru evreleme ve hastalığın prognozu açısından RPLND yapılması gerektiği söylenmektedir. Bunun yanında bir çalışmada, retroperitoneal lenfadenektomi yapılan olgulardan lenf nodu negatif bulunanlarda relaps %10 iken pozitif bulunanlarda relaps oranı %50 olarak saptanmıştır (35,75-80).

Evre II NSGCT de orşiektomi ve retroperitoneal lenf nodu diseksiyonu (RPLND) ile tedavi edilebileceği, relapslarda ise platinium içeren kemoterapi verilmesi gerektiği söylenmektedir.

Orşiektomi sonrası hastaların semen kalitesinde belirgin azalma olur. Bu hastalarda eğer çocuk isteği varsa spermleri dondurulabilir (81).

Testis tümörlerinin pronozu tümör tipi ve klinik evreye bağlı olarak değişir. Seminomlarda Evre I ve II'de kür şansı % 95'den fazladır.

NSGCTde Evre I'de eğer koriokarsinom komponenti yoksa; ister radyoterapi isterse RPLND yapılmış olsun kür %95'den fazladır. Pulmoner metastazlar olsa bile eğer sınırlı ise, ekstansif radyoterapi ile kür %40 olarak izlenir. Kemoterapi ile Evre III tümörlerde bile tamamen iyileşme olabilir. Koriokarsinomda ise prognoz hala kötüdür (35). Kötü prognoza yol açan faktörler tümörün tipine bakılmaksızın, spermatik kord invazyonu, nontümöral testis dokusunda leydig hücre hiperplazisi, koriokarsinom, vasküler invazyon, teratom yada yolk sak komponentinin yokluğu, embriyonel karsinomun hacmi ve seminomlarda tümör dokusunda lenfositik infiltrasyonun kaybıdır. Evre I tümörlerde en önemli prognostik faktörler, vasküler invazyon ve embriyonel karsinom bileşenini miktarıdır (82-87).

2.2.a. APOPTOZİS VE KARSİNOGENEZİS İLİŞKİSİ

Tümör gelişiminin nedenlerini ve basamaklarını araştırmak, tümör gelişimini önlemek ve tedavide yararlanmak amacı ile moleküler düzeyde pek çok çalışma yapılmaktadır.

Karsinogenezis çok basamaklı bir durum olup, fenotipik ve genetik düzeyde kompleks bir mekanizmaya sahiptir. Hücre proliferasyonu ve kanser gelişimini etkileyen başlıca 3 ana regülatör gen grubu mevcuttur. Bunlardan biri büyümeyi ve gelişmeyi artırıcı protoonkogenler, diğeri büyümeyi engelleyici tümör supressör genler (anti-onkogenler) , bir diğeri ise apoptozisi düzenleyici genlerdir. Genetik hasarlanma başlıca bu gen gruplarını hedef alır (3).

Apoptozisin anlamı hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, programlı, aktif, RNA ve protein sentezine ve enerjiye gereksinim gösteren hücre ölümü olup; kısaca programlı hücre ölümü olarak açıklanmaktadır. Apoptozis fetal gelişimde ve erişkin dokularda birçok fizyolojik durumda önemli role sahiptir. Çoğunlukla fizyolojik hücre ölümü, nekroza direnerek apoptozis yoluyla gerçekleşir. Apoptotik hücre ölümü regülasyonundaki defektler pek çok hastalığın gelişmesine yol açar. Bunlardan bazıları arasında, hücre birikimine bağlı kanser gelişimi veya hücre kaybına bağlı kalp yetmezliği veya nöron dejenerasyonu sayılabilir (3,9-10).

Apoptozis hücre ölümüne yol açan farklı sinyaller ile ortaya çıkabilir. Bunlardan bazıları büyüme faktörü ya da hormonu eksikliği, diğeri pozitif ligand-reseptör bağlanması ve spesifik zararlı ajanlardır. Bunlardan Fas/Fas ligand sistemi, özel bir transmembran protein sistemi olup, apoptozisi düzenleyici moleküller arasında anahtar rolüne sahiptir (3).

Fas reseptörü, 48kDa ağırlığında sisteinden zengin, tip 1 membran proteini olup, tümör nekrozis faktör /nerve growth faktör reseptör ailesinin

bir üyesidir ve CD27, CD30, CD40, ve lenfotoksin- β reseptörü ile sınırlanma benzerliği gösterir. Fas ligand(FasL) ise tip 2 membran proteini olup tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), lenfotoksin - α (TNF- β), lenfotoksin- β , CD27L, CD30L, CD40L ve 4-1BBL gibi proteinleri içeren geniş bir ailenin üyesidir. (88) .

Fas proteini insanda lenfositler, kalp, akciğer, böbrek, prostat bezi, ve over gibi pek çok organda bulunur (13).

Fas ekspresse eden hücreler FasL ile bağlanınca apoptoza gider. FasL'ye bağlı aktive lenfositlerin apoptozise gitmesi sayesinde immun yanıtta azalma olur, tolerans gelişir, immun reaksiyon sonlanır ve bu da göz ve testis gibi organların ve fetüsün immun reaksiyonlardan korunmasını sağlar (14) .

Bununla birlikte Fas /FasL proteinlerinin apoptozis yanında tümör oluşumunda ve büyümesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Meme, tiroid, kolon, endometrium, pankreas, akciğer, esofagus, beyin, prostat ve mesane gibi pek çok organ tümörlerinde, melanoma, lenfoma ve yassı epitel hücreli karsinomlarda Fas/FasL ekspresyonu çalışılmıştır (89-91).

Testiste, seminomatöz ve germ hücreli tümörlerinde Fas/FasL ekspresyonunu araştıran sınırlı sayıda çalışma bildirilmiştir. Bu çalışmalardan Braendstrup ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen; frozen kesitlere uygulanmış ve seminomlarda Fas/FasL ekspresyonunun kaybolduğu bildirilmiştir. Sugihara ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen diğer çalışmada ise parafin blok kesitlere immunohistokimyasal olarak Fas/FasL uygulanmış ve normal testis dokusunda ve germ hücreli tümörlerde pozitif bulunmuştur. Ayrıca Western blot analizi yöntemiyle bu proteinlerin varlığı gösterilmiştir.

2.2.b. HÜCRE SIKLUSU VE TÜMÖROGENEZİS

Tümör gelişiminde önemli faktörlerden biri hücre proliferasyonudur. Hücrenin proliferasyonu eğer kontrol edilemez düzeye ulaşırsa, bu hücre sel artış sonucunda tümör kitlesi ortaya çıkabilir.

Fizyolojik koşullarda hücre proliferasyonunu etkileyen çeşitli basamaklar mevcuttur. Bu basamaklar büyüme faktörlerinin hücre membranı üzerinde spesifik bir reseptöre bağlanması, bu reseptörlerin geçici ve sınırlı aktivasyonu, üretilen sinyallerin ikincil haberciler ile nükleusa iletilmesi, DNA transkripsiyonunu başlatan nükleer regülatör faktörlerin indüksiyonu ve aktivasyonu, hücrenin hücre siklusuna girmesi ve ilerlemesi ile en sonunda hücre bölünmesinin gerçekleşmesinden oluşur (3).

Hücre proliferasyonu ve hücre siklusunun ilerlemesi, bir grup protein kompleksi olan siklinler ve siklin bağımlı kinazlar tarafından kontrol edilir (3,18).

Siklinler başlıca beş ana gruptan oluşmaktadır ve A'dan E'ye kadar isimlendirilir. Siklin C, D1-3 ve E; G1 fazı sırasında pik yapar ve hücrenin G1'den S fazına geçişini düzenler. Diğer taraftan Siklin A, B1-2 ; S ve G2 fazında maksimuma ulaşır ve hücrenin mitozaya girişini düzenler.

Siklinler ile eşleşen çok sayıda CDK (siklin bağımlı kinaz) molekülü tesbit edilmiş olup, siklin partnerleri ve hücre siklusunda yerleri ayırılmıştır. Siklin D1 CDK4'e bağlanır ve G1 fazının ilerlemesini sağlar. Siklin E -CDK2 kompleksi S fazına girişi sağlar. Siklin A-CDK2 ünitesi S fazını düzenler. Siklin B-cdc2 (CDK1) mitozaya girişi kontrol eder.

Hücre siklusunu negatif olarak kontrol eden CKI(CDK inhibitörleri) tanımlanmıştır. Bu moleküller mevcut siklin-siklin bağımlı kinaz komplekslerine bağlanıp durağan kompleksler oluşturur ve inaktivasyona

neden olur. Bu ailenin ilk ve en bilinen üyesi p21'dir. Siklin E-CDK2, Siklin A-CDK2 ve Siklin D1-, D2-, D3-, CDK4 komplekslerini inhibe eder. Diğer bir CKI, p16 olup, CDK4, CDK6 komplekslerine bağlanır (18-23).

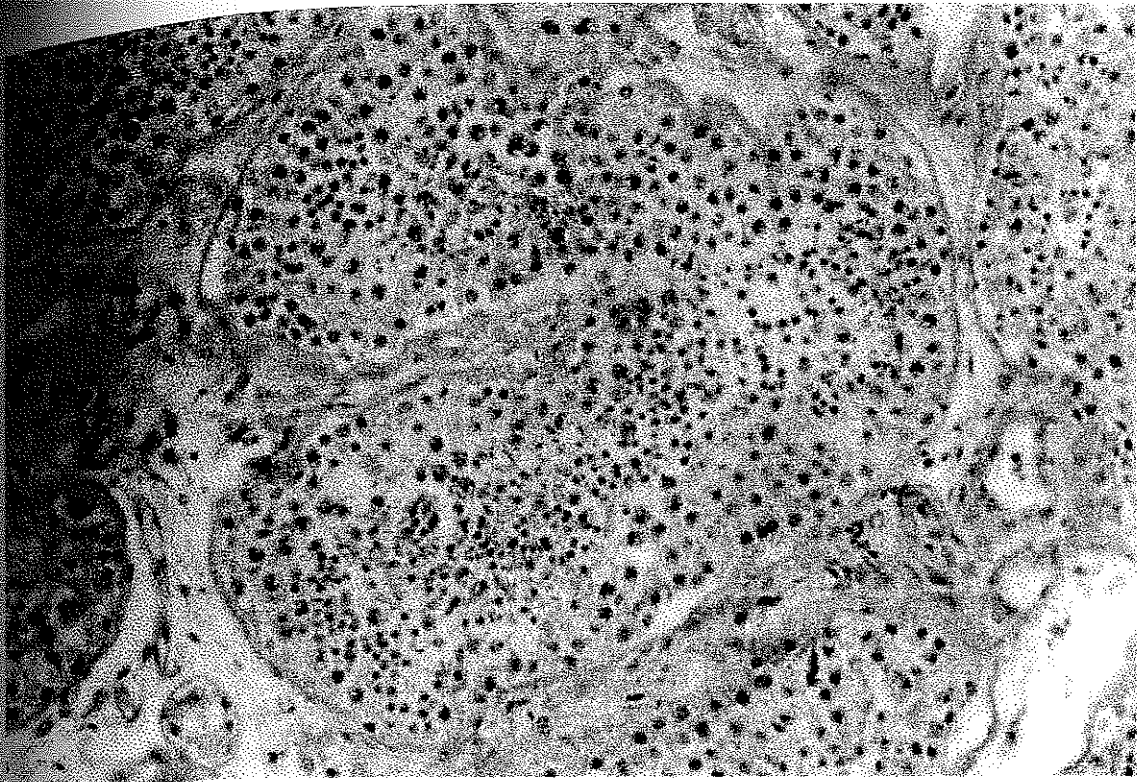
Bu ailenin yeni keşfedilen üyeleri p18 ve p27'dir. P18 Siklin D-CDK4 ve CDK6 komplekslerini inhibe eder. P27 G1 fazının negatif regülatörü olup, Siklin E-CDK2, Siklin A-CDK2 ve Siklin D-CDK4 kompleksleri ile bağlanarak bunların aktivitesini değiştirir.

P27, 27kDa ağırlığında bir protein olup, hücre siklusunda G1 fazında TGF- β tarafından etkilenmiş hücreleri, hücre-hücre kontaktını, cAMP'yi artıran faktörleri ve büyümeyi engelleyici bir ilaç olan rapamisini negatif yönde regüle eder (18-21).

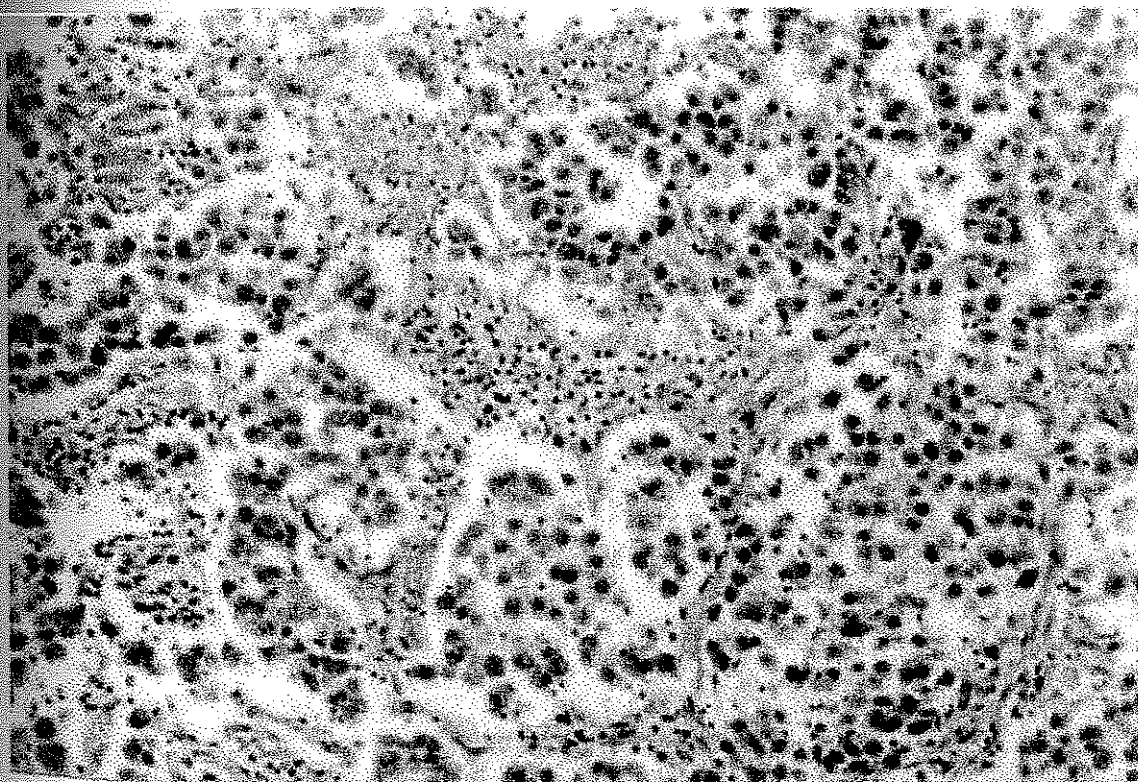
P27 ekspresyonu normal dokularda görülmekle birlikte yapılan birçok çalışmada malign tümörlerde gittikçe azaldığı görülmüştür ve p27 ekspresyonu kaybının yüksek grade, metastaz yapma potansiyeli ve kötü prognozla beraber olduğunu belirten prostat, mesane, kolon, mide ve oral kaviteye ait çalışmalar mevcuttur (24-33).

Bartkova ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada testisin germ hücreli tümörlerinde hücre siklusu regülatörlerinden p18, p21 ve p27 çalışılmıştır (34). P27 birçok tümör dokusunda gittikçe azalır, hatta kaybolmasına rağmen bu çalışmada normal germ hücrelerinde bulunmadığı, germ hücreli tümörlerde ise beklenmedik bir şekilde arttığı söylenmiştir (34).

Bu çalışmada testisin germ hücreli tümörlerinde Fas, FasL ve p27 ekspresyonu araştırılmış olup, erişkinde normal testis dokusu ile karşılaştırılarak, tümör gelişimindeki rolü ve histopatolojik alt tiplerine göre ekspresyonları arasındaki farklar incelenmiştir.



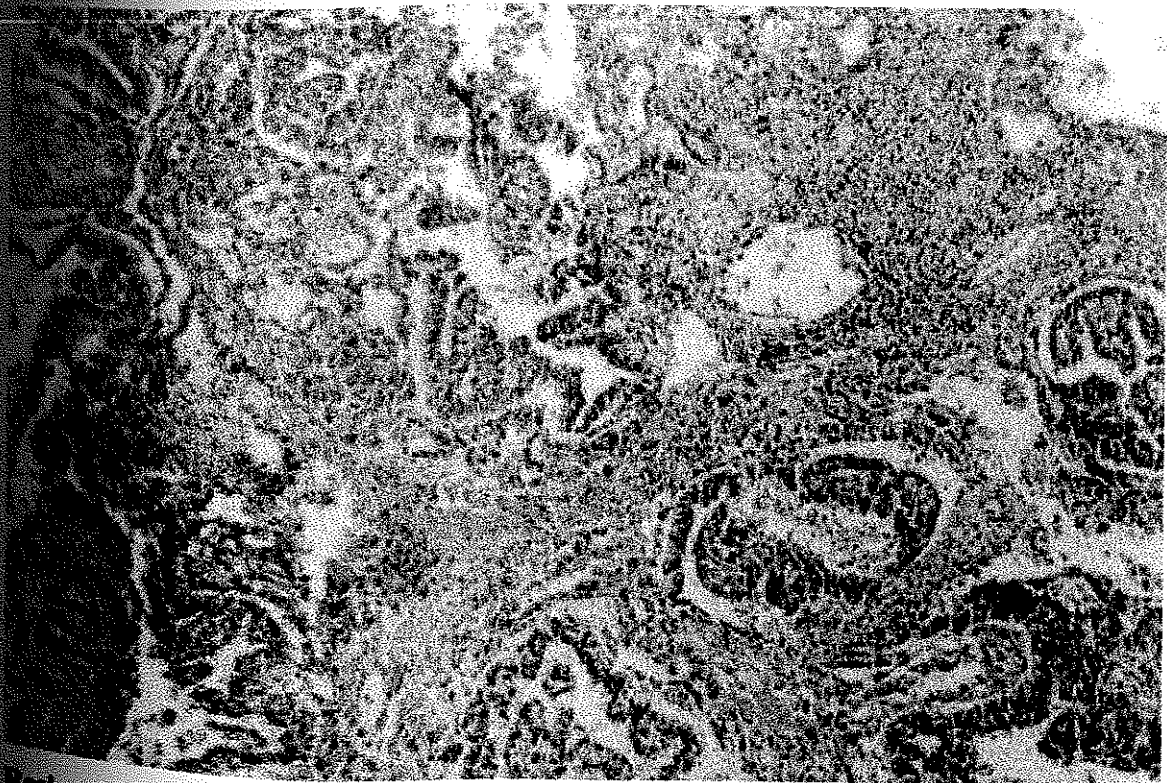
Resim 1. Normal testis dokusu (HE X 100).



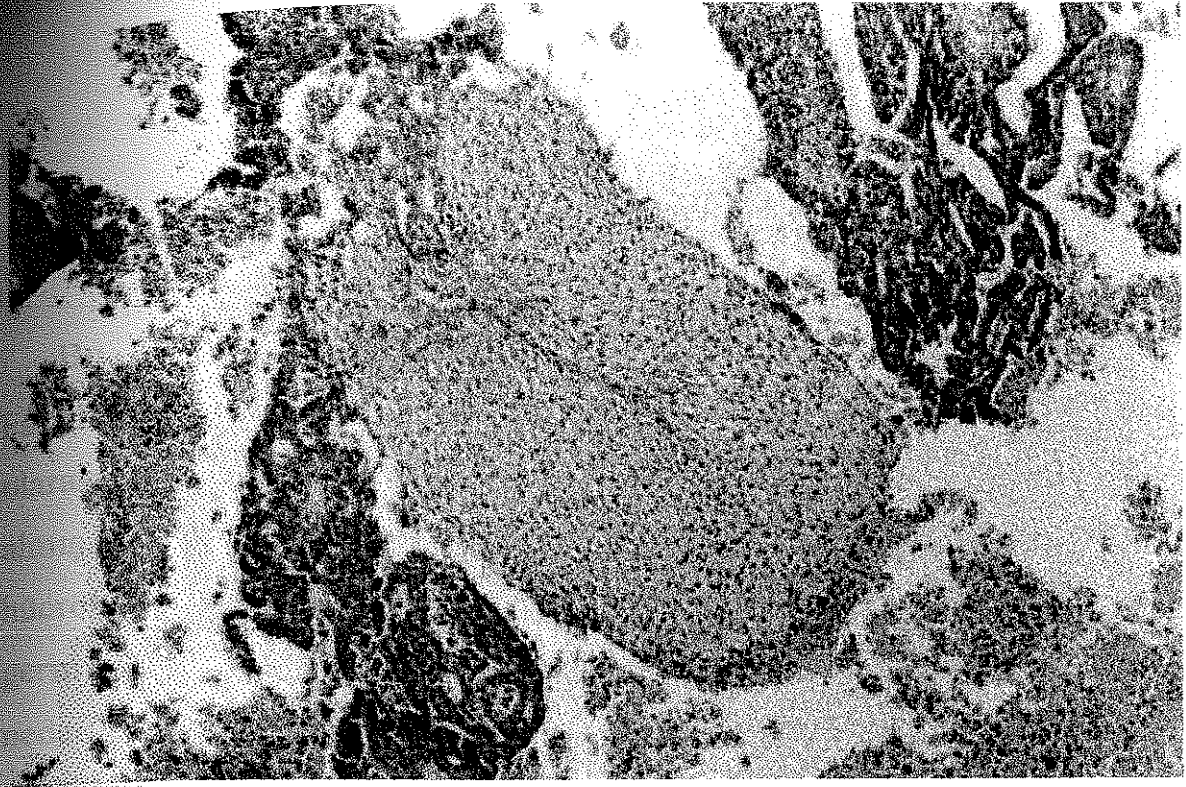
Resim 2. Seminom olgusu (HE X 100).



Resim 3. Embriyonel karsinom olgusu (HE X 100).



Resim 4. Nonseminomatöz mikst germ hücreli tümör olgusu (HE X 40).



Resim 5. Teratokarsinom olgusu (HE X 40).

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışmaya 1986-2000 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji ABD'na gelen formalin ile fikse edilip, parafine gömülü olarak arşivde saklanan ve bölümümüzde germ hücreli testis tümörü tanısı almış 32 olgu ve Erzurum Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde germ hücreli testis tümörü tanısı almış 8 olgu dahil edilmiş olup, toplam 40 adet germ hücreli testis tümörü olgusu alındı. Kontrol grubu olarak, nontümöral nedenlerle orşiektomi uygulanmış, 15-65 yaşları arasında 20 olgu alındı.

Olgulara ait arşiv kayıtlarında yer alan patoloji raporları incelenerek olguların yaşı, tümör çapı, tümörün lokalizasyonu (sağ veya sol testis), klinik bilgileri ve serumda tümör markırları saptandı. DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü)'ne göre olgularda tümör tipi saptandı ve klinik olarak AJC-TNM'ye göre evrelendirildi.

Olgulara ait doku örnekleri, HE boyalı kesitlerle incelenerek, her bir olgudan nekroz içermeyen ve tanıyı en çok temsil eden bir tümör bloğu ve kontrol grubundan birer blok seçildi.

Olgulara ait kesitlere immunohistokimyasal olarak "HRP (Horse radish peroksidase)- strepavitin complex" yöntemiyle Fas (APO-1,CD95) (C-20K: sc 715K Santa Cruz) ve FasL [(N-20)K: sc: 834K, Santa Cruz] ve LSAB+ yöntemiyle monoklonal p27^{Kipl} (M7203, Dako) immün boyaları uygulandı.

Fas ve FasL boyaları, içerisinde predilue primer antibody, "peroksidase blocking", "serum block", sekonder antibody, HRP-Strepavitin kompleksi ve DAB kromojeni bulunduran hazır set kullanıldı.

Immunohistokimyasal olarak boyanacak dokular, 4-5 μ kalınlığında kesilerek, "Dako chemMate TM 500 capillary Gap microscope slides (75 μ)" isimli hazır kromaliumlu lamalar üzerine alındı. 56°C'de etüvde yaklaşık 2 saat eritilip, ksilolde 2 kez 5'er dakika deparafinize edildi. Daha sonra azalan derecelerde alkollerden geçirilip, 1 dk. distile suya alınarak hidrate edildi. Lamalar üzerindeki suyun fazlası dokuya zarar vermeden kurutma kağıdı ile alındı ve doku örneklerinin çevresi dakopen ile çizilerek sınırlandırıldı. Daha sonra kesitlere antijenlerin yeniden kazanılması amacıyla "Antijen Retrieval" işlemi uygulandı. Bu işlem, 0.01M sitrat solusyonu(trisodyum sitrat) içinde pH: 6.0 da sıvı seviyesi lamaların üzerini kapatacak ve kesitler kurumayacak şekilde 95°C'de 5 dakika, p27 ile boyanacak preparatlar 90°C'de 10 dk. mikrodalga fırında kaynatılması ile gerçekleştirildi. Daha sonra oda ısısında 20 dk. soğumaya bırakıldı. 2 kez 2dk distile su ile yıkanarak fazla suyu kurulandı.

Fas ve FasL boyanacak preparatlar, kendi boya seti içinde yer alan "peroksidase blocking"den 3'er damla damlatılıp, 5 dk. bekletilip, 2 kez PBS ile 2'şer dk. yıkanıp kurulandı ve "serum block" 3'er damla damlatılarak 20 dk. bekletildi ve yıkanmadan kurulanıp, hemen predilue primer antikordan 3'er damla uygulanarak 2 saat oda sıcaklığında kapalı "humidifier chamber"de inkübe edildi. Daha sonra benzer şekilde yıkanıp, sekonder antikor ile 30 dk. inkübe edildi. Bu işlemden sonra yıkanan preparatlar "HRP-Strepavitin complex" uygulanarak 30 dk. bekletilip, yıkandı. Daha sonra DAB hazırlanıp, kesitlerin üzerini kapatacak miktarda damlatılarak kahverengi renk değişikliği gözlemlendi. Bu aşamada 5 dk tutulan preparatların soluk boyandığı görülerek, bekletme süresi 15 dk'ya çıkarıldı. Daha sonra preparatlar distile suyla 2 dk 2 kez yıkandı ve 10 saniye Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı. Çeşme suyunda yıkanan

preparatlar dereceleri gittikçe artan alkollerden geçirilerek 2 kez 1'er dk xylolde bekletilip, değerlendirilmek üzere balsam ile kapatıldı.

p27 boyası için hazırlanan preparatlar "antijen retrieval" işleminden sonra hidrojen peroksidad ile 5 dk bekletildikten sonra distile su ile 2 kez yıkandı ve 1:25 dilusyonlu p27 primer antikoru ile 1 saat oda ısısında kapalı nemli ortamda inkübe edildi. Daha sonra Fas ve FasL preparatları ile aynı aşamalardan geçirilip, değerlendirilmek üzere balsam ile kapatıldı. Her üç boya için pozitif kontrol olarak tonsil dokusu kullanıldı. Ayrıca germ hücreli tümörlerden sıklıkla seminomların stromasında yer alan lenfosit toplulukları internal pozitif kontrol olarak değerlendirildi.

Değerlendirme

Fas ve FasL boyalarında sitoplazmik ve membranöz boyanma pozitif kabul edildi. Tümörlerde boyanan alanların yüzdesi saptandı ve Mitsiades ve arkadaşlarının ve O'Connell ve arkadaşlarının da benzer şekilde uyguladığı gibi boyanan alanın yüzdesi semikantitatif olarak başlıca 5 ana gruba ayrıldı (90-91).

Boyanma yüzdesi	Boyanma skoru
%0	0
%<1-25	1
%26-50	2
%51-75	3
%76-100	4

Boyanma şiddetine göre ise ; hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak sınıflandırıldı.

F27 için nükleus boyanması pozitif kabul edildi. Kontrol grubundaki hücrelerde sitoplazma boyanmasının da olduğu görüldü. Ancak nükleus boyanması esas alındı. Tümörlerde ve kontrol grubunda 1000 hücre sayılarak pozitif hücre sayısı saptandı.

İstatistiksel olarak elde edilen sonuçları değerlendirirken, Student's t testi, Nonparametrik testlerden Mann Whitney U testi, Spearman ve Pearson korelasyon analizleri ve χ^2 testi uygulandı.

Fotoğraflar Nikon Alphapot YS2-H mikroskopta otomatik olarak 100 ASA Gold renkli film kullanılarak çekildi.

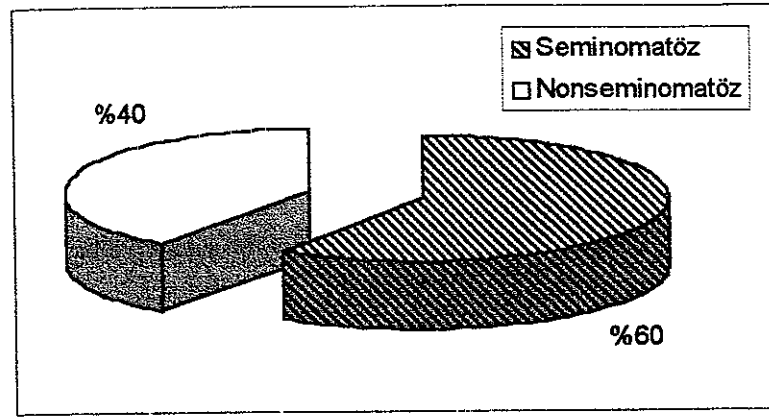
4. BULGULAR

Klinikopatolojik Bulgular :

Çalışmaya alınan germ hücreli testis tümörlerinin 24'ü (%60) seminomatöz ve 16'sı (%40) nonseminomatoz tümör (4 embriyonel karsinom, 6 teratokarsinom ve 4 tane embriyonel karsinom + seminom, 1 tane embriyonel karsinom + koriokarsinom ve 1 tane embriyonel karsinom + endodermal sinüs tümörü + teratom + seminom)'den oluşmaktaydı

Seminomatöz tümörlerden 2 olguda atrofik testis, 1 olguda bilateral inmemiş testis ve 1 olguda hidrosele mevcut olduğu görüldü.

Seminomatöz tümörlerden 2 olgunun tümör markerleri normal olarak belirtilirken, 1 olguda LDL $\uparrow\uparrow$ (3100) olarak saptandı. Nonseminomatöz tümörlerden 1 olgunun tümör markerleri normal sınırlar içinde izlenirken, 2 olguda (embriyonel karsinom + endodermal sinüs tümörü + teratom + seminom olan olguda β HCG:42.1 (N: 0-5), CEA>550 ng/dl, AFP >300ü/ml ve LDL: 517 (240-480), teratokarsinom olan diğer tümörde AFP:37.2 ve β HCG: 7.8) markerlerinin yüksek olduğu görüldü. Diğer tümör olgularının serumda tümör markerleri saptanamadı.



Grafik 1 : Seminomatöz ve nonseminomatöz tümörlerin dağılımı

Tablo 1 : Seminomatöz ve nonseminomatöz tümörlerde yaş ortalaması, ortalama çap ve nekroz varlığı

	Seminomatöz	Nonseminomatöz
Yaş	38,04	32,31
Çap (cm)	4,92	4,88
Nekroz (n)	13 (%54.17)	14 (%87.5)
Lokalizasyon (n)		
Sağ	11 (%45.83)	5 (%31.25)
Sol	13 (%54.17)	11 (%68.75)

Yaş :

Tüm testis tümörlerinde ortalama yaş 35,75(std sa : $\pm 10,99$) iken kontrol grubunda ortalama yaş 45,45(std sa : $\pm 7,55$) olarak bulundu.

Seminomatöz tümörlerde ortalama yaş 38,04(std sa : $\pm 3,03$) iken, nonseminomatöz tümörlerde ortalama yaş 32,31(std sa : $\pm 3,01$) olarak bulundu.

Çap :

Seminomatöz tümörlerin ortalama çapı 4,92 (std sa:±3,03) cm iken, nonseminomatöz tümörlerin çapı ortalama 4.88 (std sa : ±3,01) cm olarak bulundu.

Lokalizasyon :

Seminomatöz tümörlerin (n=24) 11'i (%45.83) sağ testiste, 13'ü (%54.17) sol testiste lokalize iken, nonseminomatöz tümörlerin (n=16) 5'i (%31.25) sağ, 11'i (%68.75) sol testiste lokalize olduğu görüldü.

Nekroz :

Seminomatöz tümörlerin 13 (%54.17) tanesinde nekroz izlenirken, nonseminomatöz tümörlerin 14 (%87.5) tanesinde nekroz görüldü.

Vasküler invazyon :

Seminomatöz tümörlerden 9 (%37.5) olguda, nonseminomatöz tümörlerden 10 (%62.5) olguda vasküler invazyon varlığı saptandı.

Lenfatik invazyon :

Seminomatöz tümörlerden 8(%33.3) olguda, nonseminomatöz tümörlerden 9(%56.25) olguda lenfatik invazyon olduğu saptandı.

Tablo 2 : Seminomatöz ve nonseminomatöz tümörlerde vasküler invazyon ve lenfatik invazyon

	Seminomatöz	Nonseminomatöz
Vasküler invazyon	9 (%37.5)	10 (%62.5)
Lenfatik invazyon	8 (%33.3)	9 (%56.25)

IGCN (intratübüler germ hücreli neoplazi) :

Seminomatöz tümörlerden 14(%58.3) olguda IGCN izlenirken, Nonseminomatöz tümörlerde 7(%43.75) olguda IGCN izlendi.

Tablo 3 : Seminomatöz ve nonseminomatöz tümörlerde IGCN

	Seminomatöz	Nonseminomatöz
IGCN	14 (%58.3)	7 (%43.75)

Tunika albuginea ve spermatik kord invazyonu :

Seminomatöz tümörlerden 6(%25) olguda tunika albuginea invazyonu, 4(%16.7) olguda spermatik kord invazyonu görüldü. Nonseminomatöz tümörlerden ise 5(%31.25) olguda tunika albuginea invazyonu, 3(%18.75) olguda spermatik kord invazyonu görüldü

Cerrahi sınır :

Seminomatöz ve nonseminomatöz tümörlerden her iki grupta 2'şer olguda (seminomatöz tümörlerde %8.33, nonseminomatöz tümörlerde %12.5), cerrahi sınırdaki tümör olduğu görüldü.

Tablo 4 : Seminomatöz ve nonseminomatöz tümörlerde tunika albuginea invazyonu, spermatik kord invazyonu ve cerrahi sınırdaki tümör pozitifliği

	Seminomatöz	Nonseminomatöz
Tunika albuginea invazyonu	6 (%25)	5 (%31.25)
Spermatik kord invazyonu	4 (%16.7)	3 (%18.75)
Cerrahi sınır pozitifliği	2 (%8.33)	2 (%12.5)

Evre :

AJC-TNM'ye göre; Seminomatöz tümörlerden 22 olgu (%91.7) Evre I, 1 olgu (%4.17) Evre II ve 1 olgu (%4.17) Evre III olarak izlendi. Nonseminomatöz tümörlerden 13 olgu (%81.25) Evre I, 3 olgu (%18.75) Evre II ve 1 olgu (%6.25) Evre III olarak izlendi.

Tablo 5 : Seminomatöz ve nonseminomatöz tümörlerin AJC 'ye göre evrelendirilmesi.

	Seminomatöz	Nonseminomatöz
Evre I	22 (%91.7)	13 (%81.25)
Evre II	1 (%4.17)	3 (%18.75)
Evre III	1 (%4.17)	1 (%6.25)

Tümör çapı ile nekroz ve spermatik kord invazyonu doğru orantılı bulundu ($p \leq 0.05$).

Tümör çapı ile vasküler invazyon, lenfatik invazyon, IGCN, tunika albuginea invazyonu pozitif doğru orantılı olarak görüldü ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p \leq 0.01$). Bunun yanında tümör çapı ile cerrahi sınırdaki tümör bulunması, tümörün evresi ve tipi arasında bir ilişki görülmedi ($p > 0.05$).

Tümörler histopatolojik olarak seminomatöz ve nonseminomatöz germ hücreli tümör olmak üzere başlıca 2 alttipe ayrıldığında tümörün lokalizasyonu, vasküler ve lenfatik invazyon, tunika albuginea invazyonu, spermatik kord invazyonu, tümörün IGCN ile birlikteliği, cerrahi sınır pozitifliği ve tümör evresi ile seminomatöz ve nonseminomatöz tümörlerde bir fark görülmedi ($p > 0.05$). Bunun yanında seminomatöz ve nonseminomatöz tümörler arasında nekrozun belirgin olarak farklı olduğu ve nonseminomatöz tümörlerde daha fazla görüldüğü bulundu ($p < 0.05$).

İmmünohistokimyasal Bulgular :

Fas boyası ile tümör grubunda ortalama %41.50 (std sa : ± 27.88) alanda pozitif boyanma izlenirken, kontrol grubunda %99 (std sa : $\pm 3,08$) pozitif boyanma görüldü.

FasL boyası ile tümör grubunda ortalama %57.50 (std sa : $\pm 28,17$) alanda pozitif boyanma, kontrol grubunda ise %100 (std sa : ± 0.00) alanda pozitif boyanma izlendi.

Tümör grubunda p27 ortalama % 13.55 (std sa : ± 23.48) hücrede pozitif, kontrol grubunda ise % 930 (std sa : $\pm 73,27$) hücrede pozitif boyandı.

Tablo 6 : Tümör grubu ve kontrol grubunda Fas, FasL ve p27 boyanma özellikleri .

	Tümör Grubu	Kontrol Grubu
Fas	%41.50	%99
FasL	%57.50	%100
p27	% 13.55	% 930

Tümör grubu ile normal testis dokusu karşılaştırıldığında, Fas, FasL ve p27 ekspresyonu arasındaki bu farklar istatistiksel olarak da anlamlı bulundu ($p \leq 0.001$) .

Fas boyası ile olgularda boyanma şiddetini incelendiğinde; kontrol grubunda (n=20) 2 (%10) olgu hafif derecede (+), 12 (%60) olgu orta derecede (++), ve 6 (%30) olgu şiddetli derecede (+++) olarak boyandı. Tümör grubunda (n=40) 1 (%2.5) olguda hiç boyanma izlenmedi (0), 21 (%52.5) olguda hafif derecede (+), 14 (%35) olguda orta derecede (++), ve 4 (%10) olguda şiddetli derecede (+++) pozitif boyanma izlendi.

FasL boyası ile boyanma şiddetine bakıldığında kontrol grubunda 2 (%10) olgu hafif derecede (+), 13 (%65) olgu orta derecede (++), ve 5 (%25) olgu şiddetli derecede (+++) pozitif olarak boyandı. Tümör grubunda ise; 1 (%2.5) olgu hiç boyanmadı (0), 19 (%47.5) olgu hafif derecede (+), 9 (%22.5) olgu orta derecede (++) ve 11 (27.5) olgu şiddetli derecede (+++) pozitif olarak boyandı. Fas ve FasL boyanma yüzdeleri ve boyanma şiddetlerinin birbirine paralel olarak değiştiği görüldü ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.001$).

Tablo 7 : Tümör grubu ve kontrol grubunda Fas ve FasL boyanma şiddeti.

	<u>Tümör Grubu</u>				<u>Kontrol Grubu</u>		
	<u>Boyanma Yok</u>	<u>Hafif</u>	<u>Orta</u>	<u>Şiddetli</u>	<u>Hafif</u>	<u>Orta</u>	<u>Şiddetli</u>
Fas	0 (%0)	21 (%52.5)	14 (%35)	4 (%10)	2 (%10)	12 (%60)	6 (%30)
FasL	1 (%2.5)	19 (%47.5)	9 (%22.5)	11 (%27.5)	2 (%10)	13 (%65)	5 (%25)

Fas ve FasL boyalarının boyanan alanların yüzdesine göre Fas ve FasL skoru oluşturuldu. Seminomatöz tümörlerde Fas skoru oluşturulduğunda 1 olgu (%4.17) skor 0, 9 olgu (%37.5) skor 1, 4 olgu (%16.67) skor 2, 4 olgu (%16.67) skor 3 ve 6 olgu (%25) skor 4 olarak değerlendirildi. Nonseminomatöz tümörlerde 6 olgu (%37.5) skor 1, 6 olgu (%37.5) skor 2, 2 olgu (%12.5) skor 3 ve 2 olgu (%12.5) skor 4 olarak değerlendirildi.

FasL skoru oluşturulduğunda; seminomatöz tümörlerde 1 olgu (%4.17) skor 0, 4 olgu (%16.67) skor 1, 2 olgu (%8.33) skor 2, 5 olgu (%20.83) skor 3 ve 12 olgu (%50) skor 4 olarak değerlendirildi. Nonseminomatöz tümörlerde 3 olgu (%18.75) skor 1, 4 olgu (%25) skor 2, 4 olgu (%25) skor 3 ve 5 olgu (%31.25) skor 4 olarak değerlendirildi.

Tablo 8 : Seminomatöz ve nonseminomatöz tümörlerde oluşturulan Fas skoru ve FasL skoru

	<u>Seminomatöz</u>		<u>Nonseminomatöz</u>	
	Fas skoru	FasL skoru	Fas skoru	FasL skoru
Skor 0	1 (%4.17)	1 (%4.17)	0 (%0)	0 (%0)
Skor 1	9 (%37.5)	4 (%16.67)	6 (%37.5)	3 (%18.75)
Skor 2	4 (%16.67)	2 (%8.33)	6 (%37.5)	4 (%25)
Skor 3	4 (%16.67)	5 (%20.83)	2 (%12.5)	4 (%25)
Skor 4	6 (%25.0)	12 (%50)	2 (%12.5)	5 (%31.25)

Fas skoru ile ; Fas boyanma şiddeti, FasL boyanma şiddeti, FasL skoru ve p27 ekspresyonunun birbiriyle doğru orantılı olduğu görüldü ve bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.01$) . Bunun yanında tümörün alttipi ve evresi ile Fas skoru arasında bir ilişki görülmedi ($p > 0.05$) . Tümör çapı, IGCN, vasküler invazyon, lenfatik invazyon, spermatik kord invazyonu, tunika albuginea invazyonu ve cerrahi sınır pozitifliği ile Fas skoru arasında bir ilişki izlenmedi ($p > 0.05$) .

FasL skoru ile ; Fas skoru, Fas boyanma şiddeti ve p27 ekspresyonunun birbiriyle doğru orantılı olduğu görüldü. İstatistiksel olarak bu sonuçlar anlamlı bulundu ($p < 0.01$) .

FasL skoru ile ; tümörün alttipi ve evresi arasında bir birliktelik izlenmedi ($p > 0.05$) .

Bunun yanısıra FasL skoru ile ; tümör çapı, IGCN, vasküler ve lenfatik invazyon, tunika albuginea invazyonu, spermatik kord invazyonu ve cerrahi sınır pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki görülmedi ($p > 0.05$) .

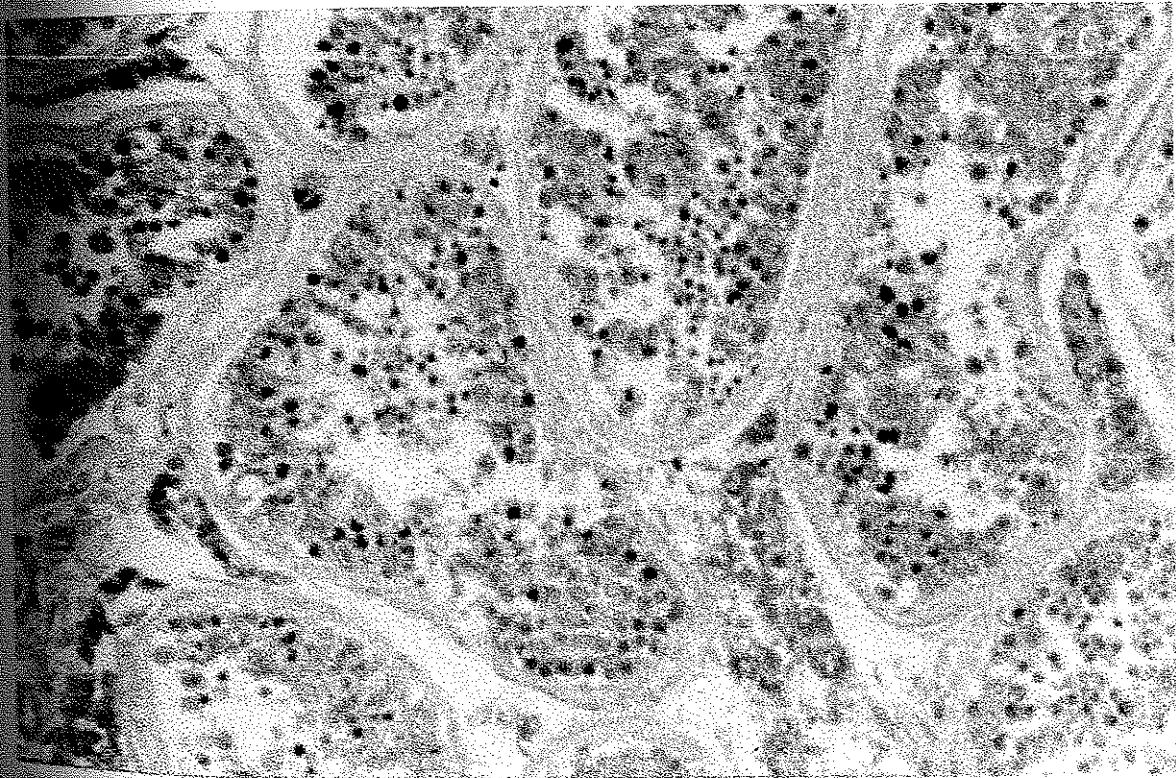
P27'nin tümör alttipleri arasındaki farkı incelendiğinde; seminomatöz tümörlerde %0 5.08 hücrede (std sa : ± 5.07) pozitif boyanma görülürken,

nonseminomatöz tümörlerde %0 26.25 hücrede (std sa : ± 33.27) pozitif boyanma görüldü. Bu fark istatistiksel olarak oldukça anlamlı bulundu ($p < 0.000$).

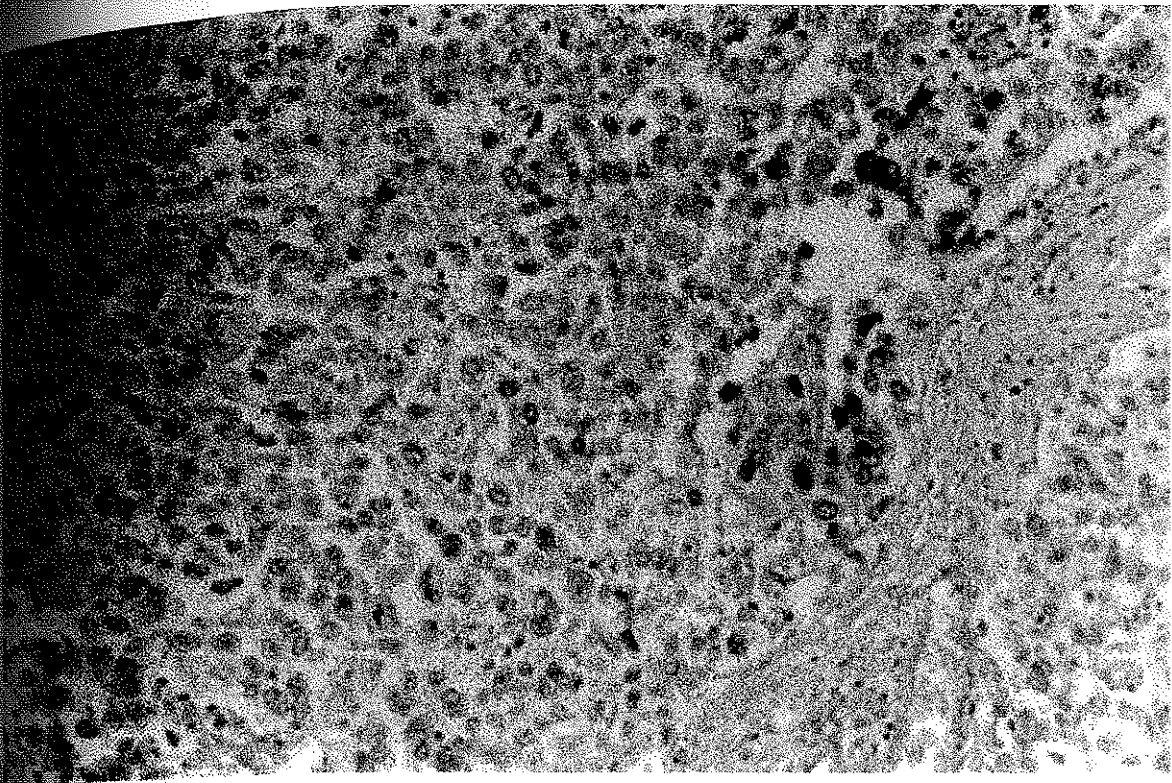
p27 ekspresyonu ile ; vasküler invazyon, IGCN, tunika albuginea invazyonu, spermatik kord invazyonu, cerrahi sınırdaki tümör pozitifliği ve tümörün evresi arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p > 0.05$). Bunun yanında p27 boyanma oranı ile lenfatik invazyonun doğru orantılı olduğu görüldü ve bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$).

Benzer şekilde p27 ile nekroz arasında doğru orantılı bir birliktelik saptandı ($p \leq 0.01$).

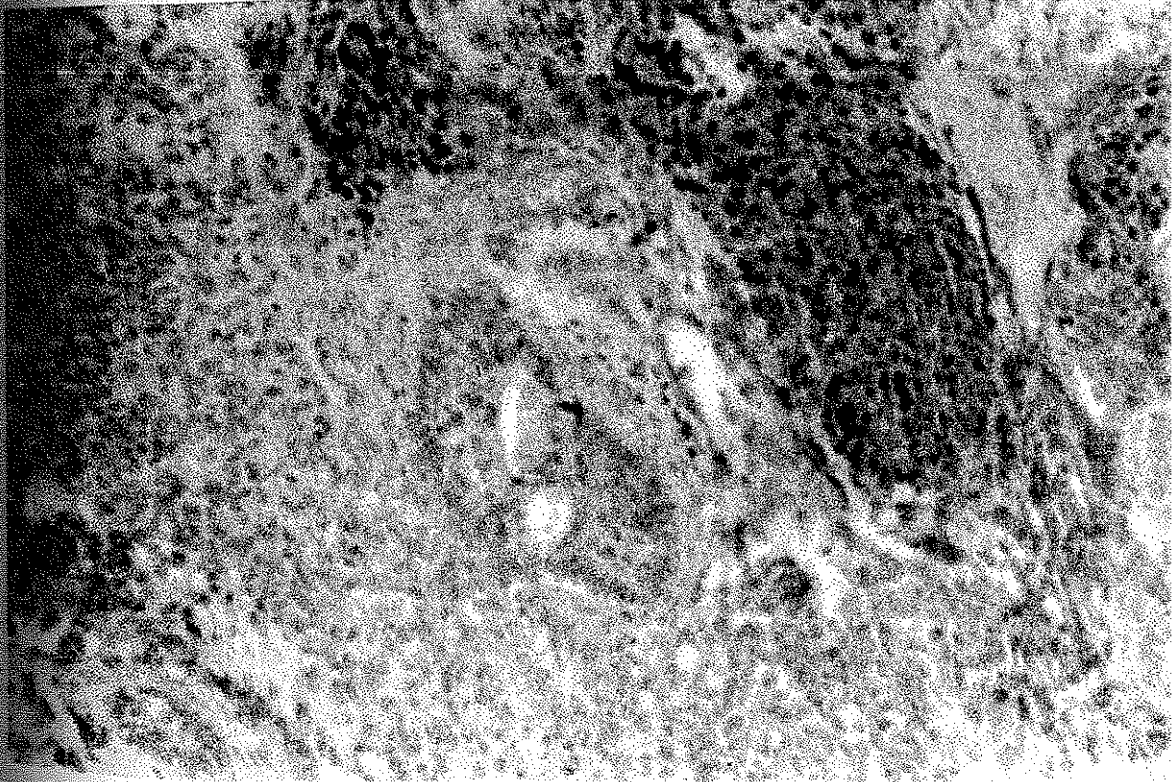
Yaş ile ; Fas skoru, FasL skoru ve p27 ekspresyonunun orantılı olduğu görüldü ($p < 0.05$).



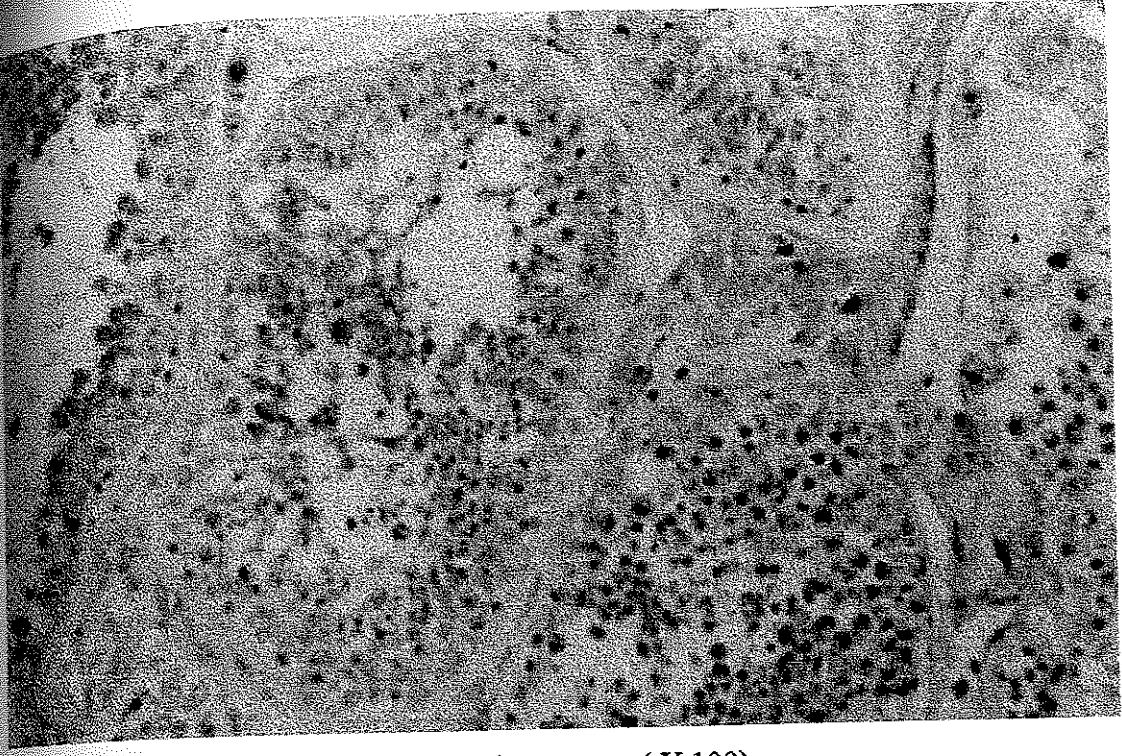
Resim 6. Normal testis dokusunda p27 ekspresyonu (X 100).



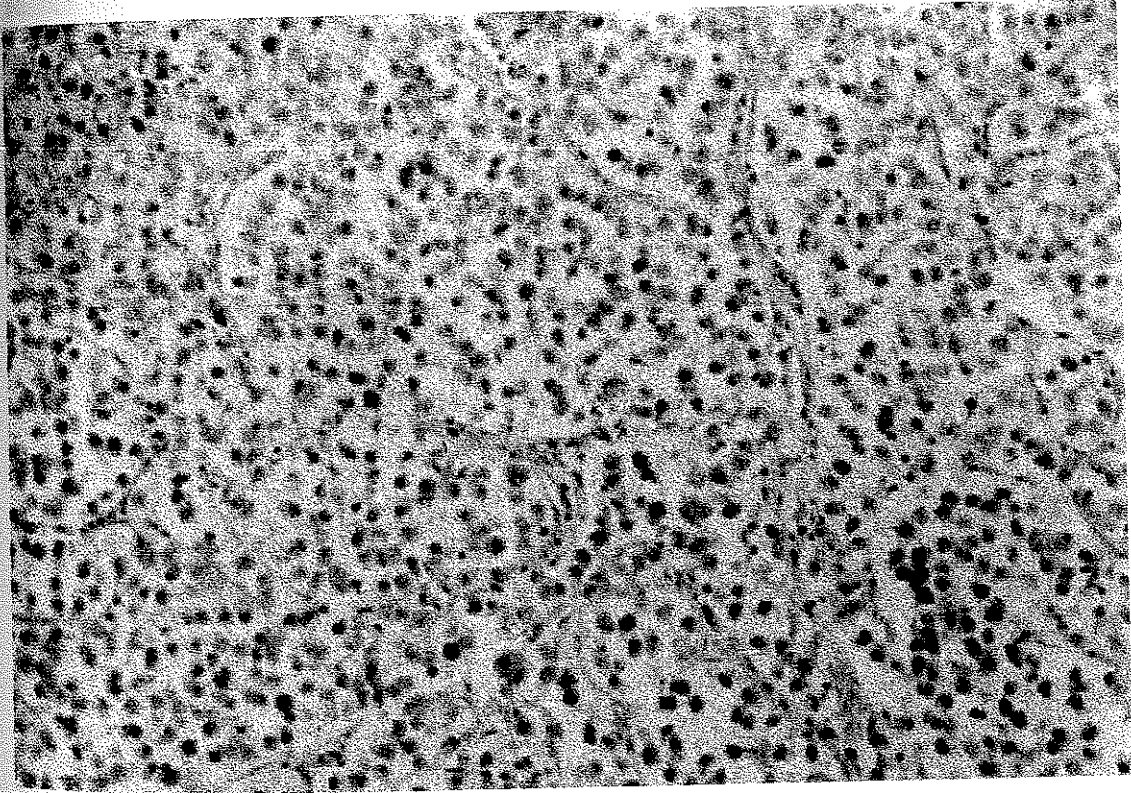
Resim 7. Seminom olgusunda p27 ekspresyonu (X 100).



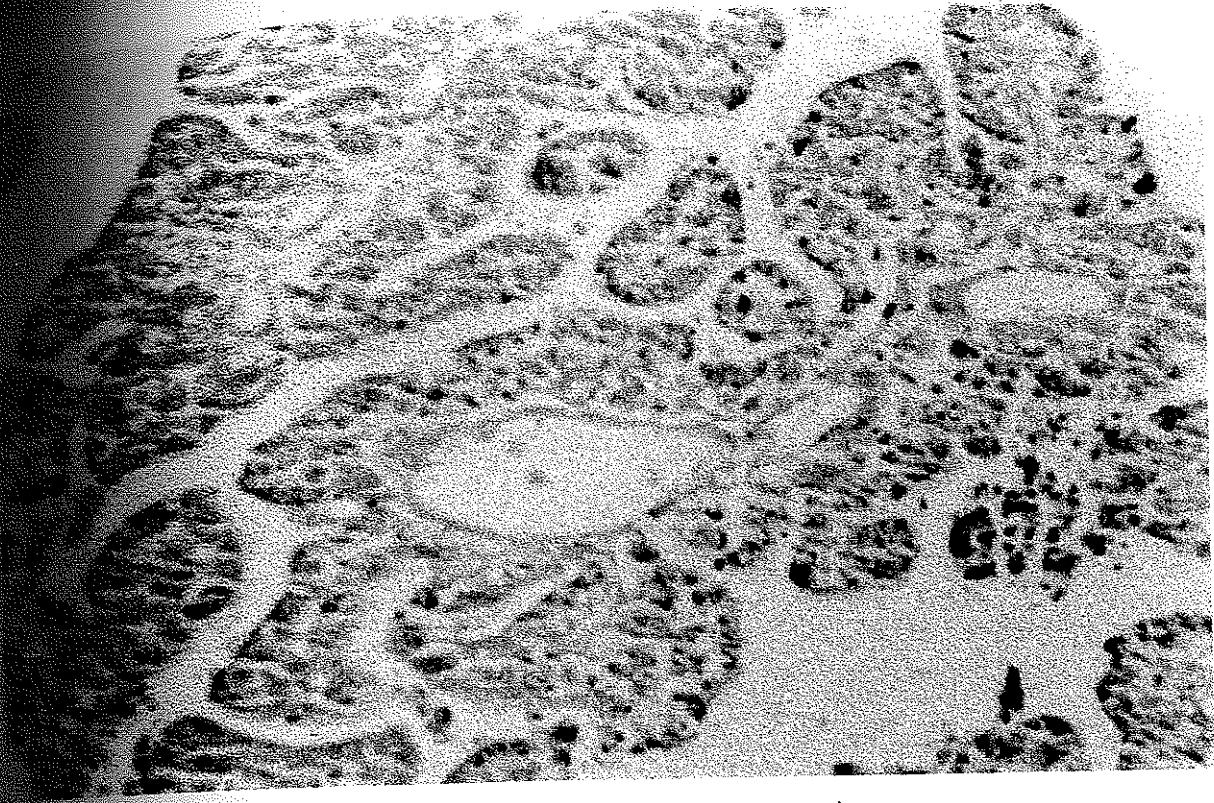
Resim 8. Nonseminomatöz mikst germ hücreli tümör olgusunda p27 ekspresyonu (X100)



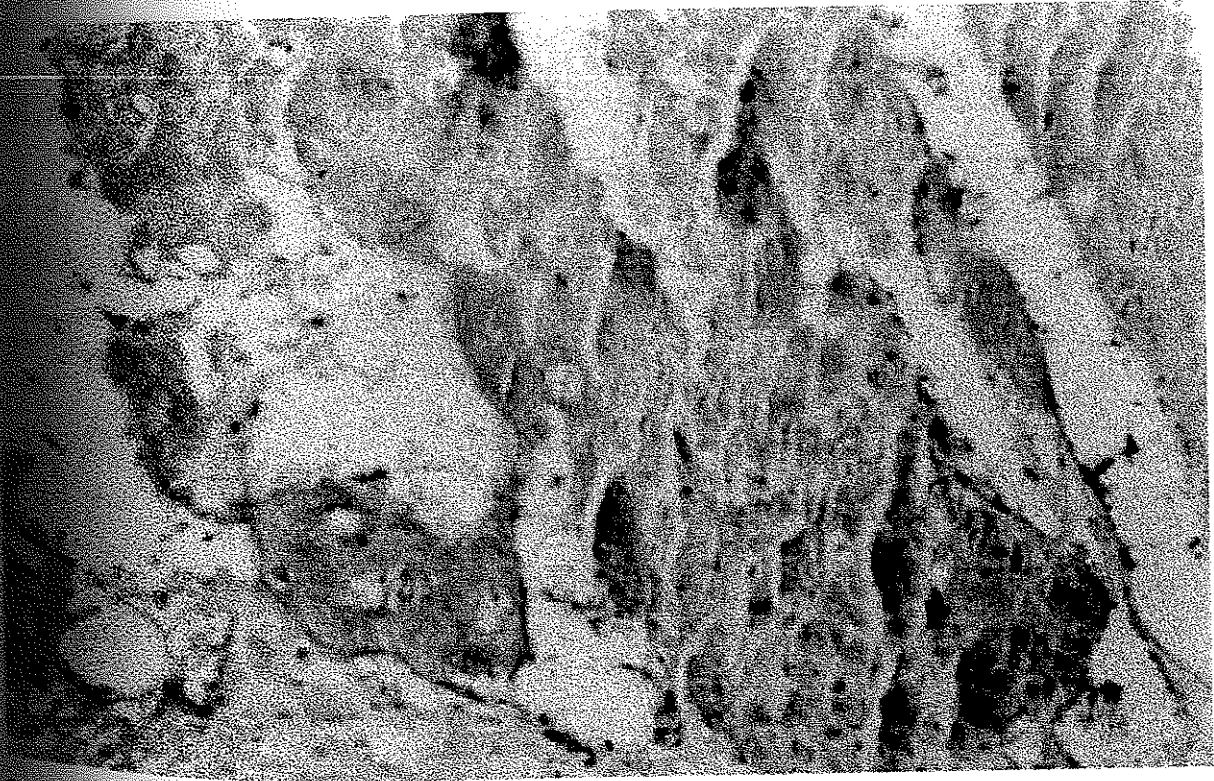
Resim 9. Normal testis dokusunda Fas boyanması (X 100).



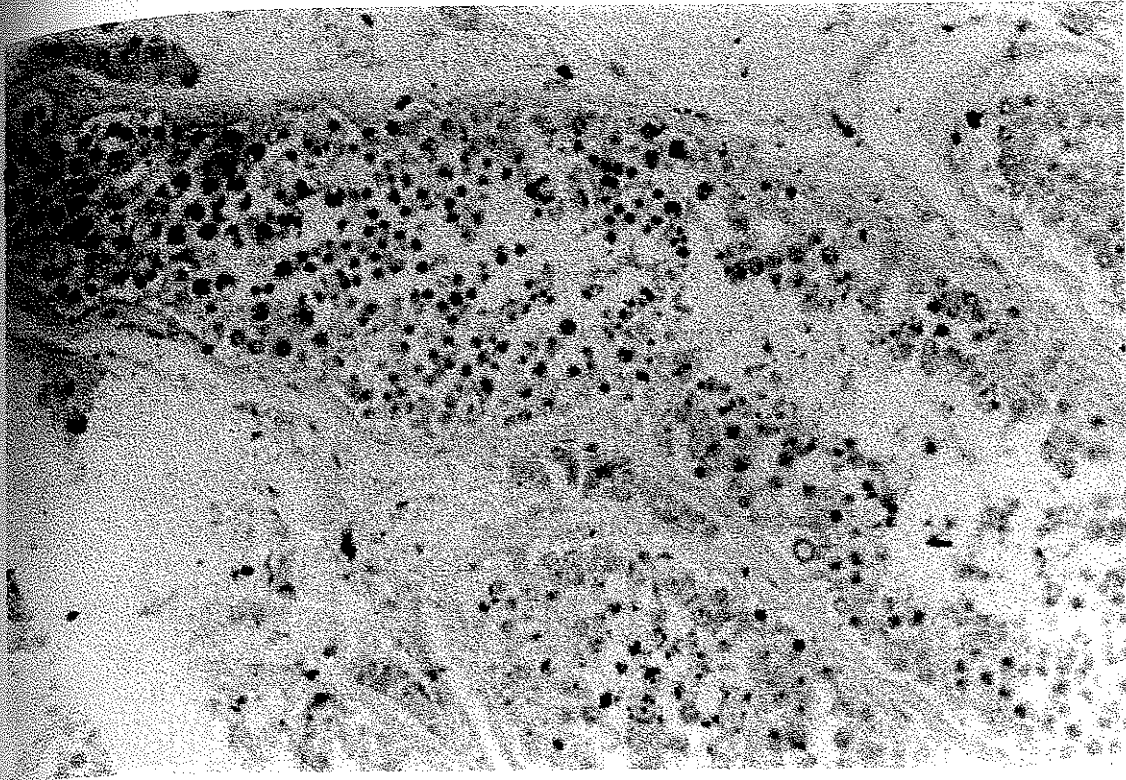
Resim 10. Seminom olgusunda Fas boyanması (X 100).



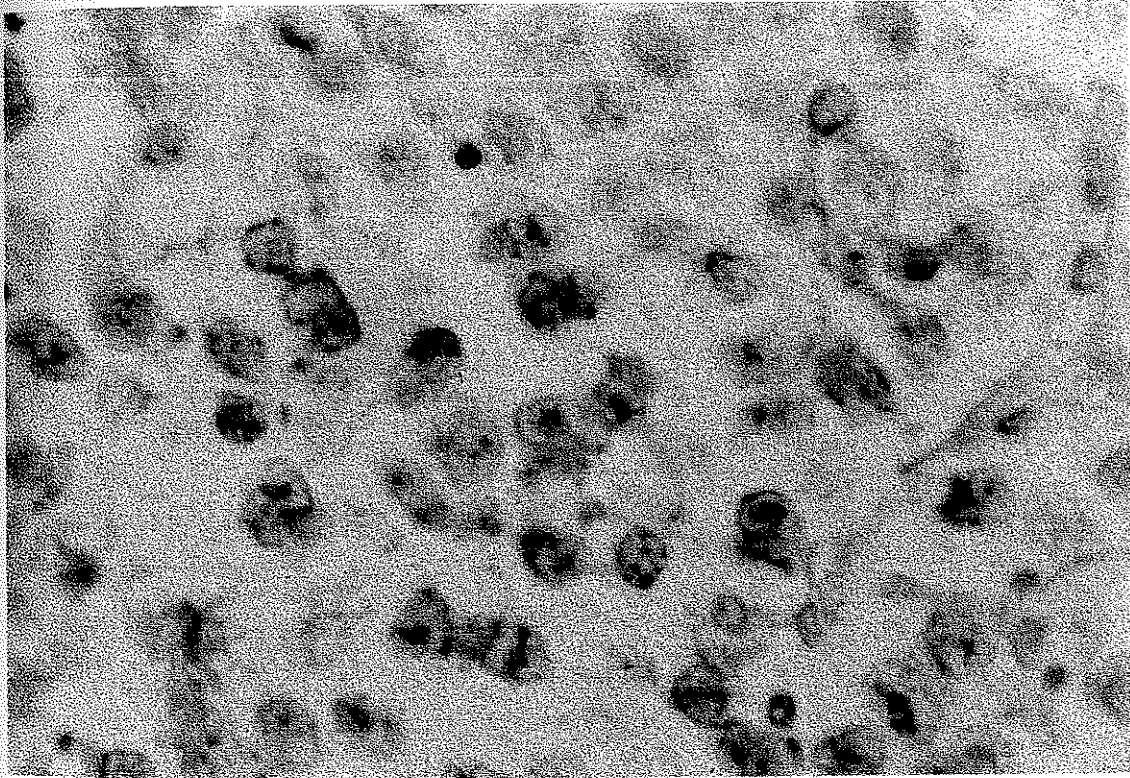
Resim 11. Embriyonel karsinomda Fas boyanması (X 100)



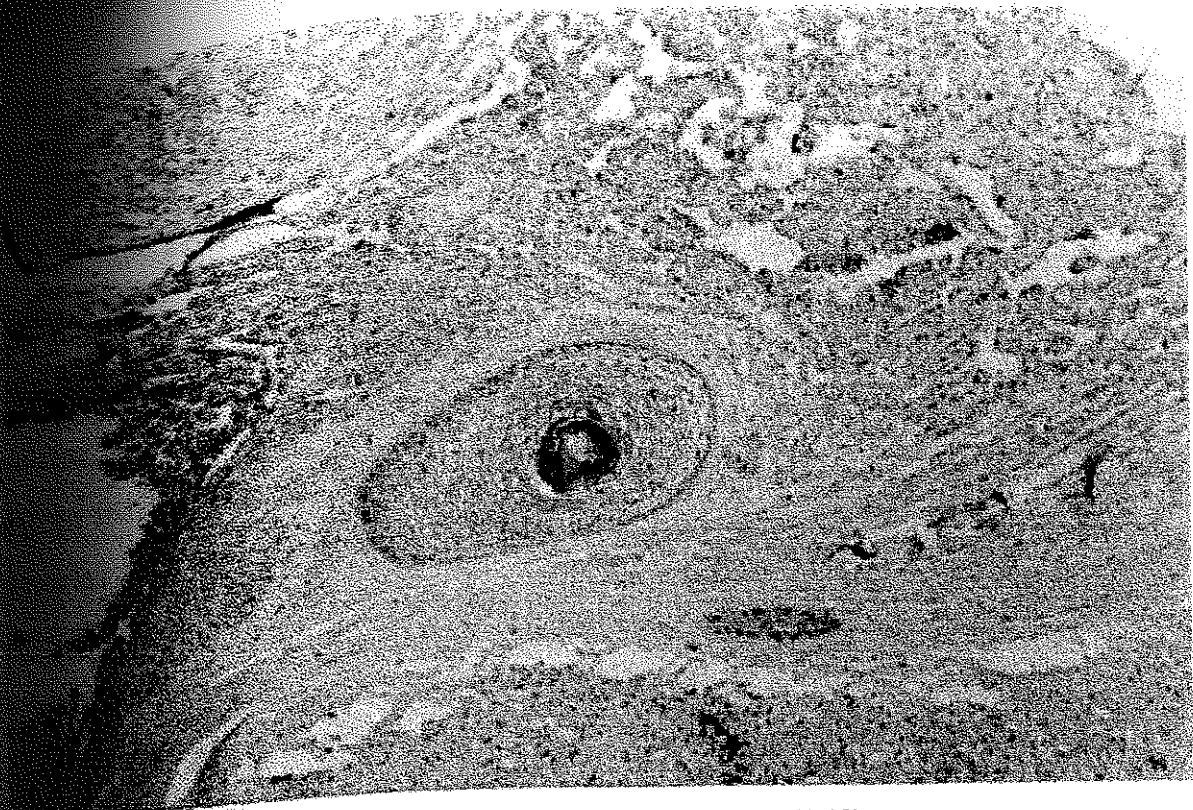
Resim 12. Embriyonel karsinom + teratom olgusunda, embriyonel karsinoma ait alanlarda Fas boyanması (X 400)



Resim 13. Normal testis dokusunda FasL boyanması (X 100).



Resim 14 Seminom olgusunda FasL boyanması (X 400).



Resim 15. Teratokarsinom olgusunda FasL boyanması (X 40).



Resim 16. Teratokarsinom tanısı verilen aynı olguya ait bir başka alanda FasL boyanması (X 40).

5. TARTIŞMA

Testis tümörleri erkeklerde tüm maligniteler arasında %1 oranında görülür. Bununla birlikte 15-35 yaş arasındaki erkeklerde en fazla görülen malign tümör testis tümörüdür. Büyük bir çoğunluğunu (%95) germ hücreli tümörler oluşturur (1-6,35). Son yıllarda testis tümörlerinin insidansında belirgin artış izlenmekte olup, coğrafik bölge ve ırklar arasında belirgin farklar mevcuttur. Testis tümörleri en fazla Danimarka ve İskandinav ülkelerinde görülürken (9-10/100.000), ABD'de daha düşük oranda (5-6/100.000) ve Uzakdoğu ve Asya ülkelerinde daha seyrek görülmektedir (1-2/100.000). Beyaz ırkta siyah ırka göre 5 kat daha fazla görülmektedir (1-8,35).

Karsinogenezis çok basamaklı bir durum olup, fenotipik ve genotipik düzeyde kompleks bir mekanizmaya sahiptir. Kanseri hücreleri differansiyasyon kaybı, invazyon yeteneği ve ilaçlara duyarlılığın kaybı gibi normal hücrelerden farklı özelliklere sahiptirler. Kanseri gelişimini sadece kontrolsüz hücre proliferasyonu olarak açıklamak yeterli değildir. Bunun yanında hücrenin gelişimsel döngüsünde de kontrol kaybı söz konusudur. Tümör oluşumunda çok sayıda genetik faktörün rol oynadığı düşünülmektedir. Hücrelerin hücre siklusu içinde ilerleyişi her basamakta çok sıkı bir şekilde kontrol edilmekte olup, ilerleme siklin-CDK (siklin bağımlı kinaz) protein kompleksleri tarafından sağlanmaktadır. Bu kompleksleri negatif olarak kontrol eden ve hücrenin denge içinde sessizce kalmasını sağlayan siklin bağımlı kinaz inhibitörleri mevcuttur. Bu inhibitörlerde görülen herhangi bir bozukluk genetik instabiliteye neden

olmakta ve bunun da hücrenin kanser hücresine dönüşmesine neden olabileceği söylenmektedir (3,92) .

Apoptozis hücre içinde "caspases" adı verilen "Cysteine Aspartyl-specific Proteases" protein kompleksi tarafından gerçekleştirilen programlı hücre ölümü olup, birçok fizyolojik ve patolojik durumda rol oynar (9-10) . Apoptozis sinyalinin iletilmesinde oldukça önemli bir role sahip olan Fas(CD95) transmembran proteini spesifik bağlayıcısı olan FasL ye bağlanarak apoptozise neden olur. Fas/FasL sistemi immun sistemin dengede tutulmasında önemli bir role sahiptir ve sitotoksik T-hücreleri ile oluşturulan immun yanıtta görev alır (11-14,93-94) . Bununla beraber insanda birçok doku ve hücrede fizyolojik ve patolojik durumlarda Fas ekspresyonu tanımlanmıştır (13) . Fas/FasL bağlanması sayesinde immun sistemde otoreaktif lenfositlerin yok edilerek bağışıklık sistemindeki dengenin korunduğu söylenmiştir. FasL ekspresyonunun ise T lenfositler, makrofajlar yanında göz, testis,beyin ve plasenta gibi daha sınırlı sayıda dokuda yer aldığı ve bu dokuları immun sistemdeki sitotoksik lenfositlerde ekspresse edilen Fas ile bağlanarak yıkılmaktan koruduğu söylenmektedir (14,91,93,94) . Testis bu açıdan diğer dokulardan daha farklı bir özelliğe sahiptir. Boekkeheide ve arkadaşları tarafından fareler üzerinde yapılan bir çalışmada testiste Fas sisteminin apoptozis üzerinde anahtar role sahip olduğu; sertoli ve germ hücreleri arasındaki ilişkinin dengesinde önemli olduğu ve toksik maddeye maruz bırakıldığında hasara yanıt olarak Fas ve Fas L ekspresyonunun arttığı söylenmektedir (11,95-97) . French ve arkadaşları tarafından embriyo ve erişkin fareler üzerinde yapılan bir çalışmada ise erişkin farelerde timus, akciğer, dalak, ince ve kalın barsak, seminal vezikül, prostat ve uterus gibi birçok organda Fas ve FasL koekspresyonu gösterilmiştir (88) . İnsanda, tümörlü dokularda Fas ve FasL ekspresyonu arasındaki farklar nedeniyle karaciğer hepatoselüler

... kansinmları, meme karsinomları, kütanöz T hücreli lenfoma, kolonun ... adenokarsinomları, kolon kanserlerinin karaciğer metastazları, ... melanom ve diğer melanositik deri lezyonları, malign melanom dışı ... kanserleri, prostat, testis ve tiroid karsinomlarında Fas ve FasL ekspresyonu araştırılmış ve farklı sonuçlar elde edilmiştir. Testis immün sistemin yıkıcı etkilerinden korunmuş bir organ olmakla birlikte testis tümörlerinde Fas ve FasL ekspresyonunu araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır (16-17).

Bu nedenle bizim çalışmamızda germ hücreli testis tümörlerinde Fas, FasL ve p27 ekspresyonu araştırıldı ve normal erişkin testis dokusu boyanma özellikleri ile tümör dokusu arasında ve tümör grubu içinde seminomatöz ve nonseminomatöz tümörlerin boyanma özellikleri arasındaki farklar araştırıldı. Daha önce normal testis dokusu ve germ hücreli testis tümörleri üzerine Sugihara ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada normal testis dokusu içinde yer alan leydig hücrelerinde, sertoli hücrelerinde ve germ hücrelerinde, bununla birlikte çalışmada yer alan tüm germ hücreli tümör olgularında Fas ve FasL ekspresyonunun varolduğu belirtilerek, Fas ve FasL sisteminin apoptozisden başka fonksiyonlarının da varolabileceği öne sürülmektedir (16). Danimarka'dan Braendstrup ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada ise seminomatöz tümörlerde Fas ve FasL çalışılmış ve normal seminifer tübüllerde, IGCN içeren tübüllerde ve tümör hücrelerinde boyanma özellikleri araştırılmıştır. Sonuç olarak, Braendstrup ve arkadaşları tarafından normal seminifer tübüllerde Fas ekspresyonu olmadığı, IGCN içeren tübüllerde tek tek boyanma olduğu, bunun yanında FasL ekspresyonunun normal seminifer tübüllerde bazalde ince bir tabaka halinde olduğu, IGCN içeren tübüllerde kesintiye uğradığı belirtilmiştir. İnvaziv tümörlerin hiç birisinde ise Fas ve FasL ekspresyonunun olmadığı söylenmektedir. Testisin normalde immün

sisitemin yıkıcı etkilerinden korunan bir organ olması nedeniyle böyle bir sonucun olabileceği öne sürülmektedir (17) .

Bizim çalışmamızda normal testis dokusu içeren kontrol grubunda (n=20) tüm olgularda Fas ve FasL boyası ile leydig hücrelerinde ve seminifer tübüllerde yer alan sertoli hücreleri ve germ hücrelerinde pozitif boyanma görüldü. Tümör grubunda (n=40) ise 1 olgu dışında 39 olguda boyanma izlenmekle birlikte normal testis dokusuna göre boyanma oranının oldukça azaldığı görüldü. Bunun yanında seminomatöz tümörler ile NSGCTler arasında belirgin bir fark izlenmedi. Bu çalışmada elde edilen bulgular daha çok Sugihara ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmanın sonuçları ile uyumlu görülmekle birlikte, tamamen kaybolmasa da tümör hücrelerinde Fas ve FasL ekspresyonunda görülen belirgin azalmanın Braenstrup ve arkadaşları tarafından bulunan sonuçlarla da kısmen uyumlu olduğu görüldü.

Fas ve FasL ekspresyonunun farklı dokularda farklı şekilde ortaya çıktığı görülmektedir.

Nagao ve arkadaşları tarafından hepatoselüler karsinomlar üzerinde yapılan bir çalışmada tümör dokusunda Fas ekspresyonunun azaldığı, nontümöral normal karaciğer dokusunda ise arttığı bildirilmiştir. FasL ekspresyonu nontümöral karaciğer dokusunda az oranda izlenirken tümörlerde arttığı bildirilmiştir (98) .

O'Connell ve arkadaşlarının meme karsinomları üzerinde yaptığı bir çalışmada meme karsinomlarında FasL ekspresyonunun arttığı ve tümör dokusunun Fas ekspresse eden sitotoksik tümör infiltre eden lenfositlere bağlanarak bu lenfositlerin apoptozise gitmesine neden olduğu, bu sayede tümör hücrelerinin immun sistemin yok edici etkisinden kurtulduğu söylenmektedir (89) . Kolonun primer adenokarsinomlarında ve karaciğer metastazlarında da FasL ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Karaciğer

metastazlarında aynı zamanda tümör çevresindeki hepatositlerde Fas ekspresyonunun arttığı belirtilmiş; bu durumun invazyonu kolaylaştırdığı söylenmiştir (91-99) .

Ouhtit ile Hill ve arkadaşlarının fareler üzerinde yaptıkları iki ayrı çalışmada ultraviole radyasyon ile meydana getirilen deri kanserlerinde FasL ekspresyonunun azaldığı ve Fas ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (100-101). Sprecher ve arkadaşlarının melanositik tümörler üzerinde yaptığı bir çalışmada ise melanositik lezyonlarda, malign melanomlarda Fas ekspresyonu azalırken, FasL ekspresyonunda melanositik nevüsler ile malign melanom arasında bir fark olmadığı ve FasL ekspresyonunun mevcut olduğu bildirilmiştir. Bir başka çalışmada ise melanositik tümörlerde tümörün malignitesi arttıkça ve Clark seviyesi arttıkça FasL ekspresyonunun arttığı söylenmiş ve FasL ekspresyonundaki artış ile tümörlerin immun sistemden korunabilir olması yanında metastaz yapma potansiyelinin arttığı öne sürülmüştür (15,102) . Kütanöz T hücreli lenfomalar üzerinde yapılan bir çalışmada ise Fas ekspresyonunun azaldığı ve buna karşın Fas L ekspresyonunun arttığı bildirilmiş olup, Fas ekspresyonu azaldıkça tümörün immun sisteme karşı daha güçlü hale geldiği ve prognozunun Fas kaybı ile beraber kötüleştiği söylenmektedir (103) .

Baş ve boyun kanserleri üzerinde yapılan bir çalışmada FasL ekspresyonu ile tümör hücrelerinin T lenfositlerde apoptozisi artırdığı bildirilmiş olup, Fas/FasL yolu ile tümörlerde immun sistemin baskılandığı ve tümörlerin yok edilmekten kurtuldukları ileri sürülmektedir (104) . Buna karşın Sasaki ve arkadaşları tarafından prostat kanseri üzerinde yapılan bir çalışmada BPH nedeniyle opere edilen olgularda ve prostat kanseri olan tüm olgularda, tümör grubunda oranı azalmakla birlikte olguların hepsinde Fas ekspresyonunun mevcut olduğu, FasL

ekspresyonunun ise prostat kanseri olan olguların hiç birisinde bulunmadığı belirtilmiştir. Fas ekspresyonunun azalmasının bu tümörlerin hormonal tedaviye yanıtını azaltabileceği ileri sürülmüştür (12).

Bizim bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlara göre testis dokusunun doğal immun korunmuşluğu nedeniyle normal testis dokusunda Fas ve FasL ekspresyonunun yer aldığı düşünülmektedir. Bunun yanında germ hücreli tümörlerde Fas ve FasL ekspresyonunda görülen belirgin azalma, apoptozis mekanizmasında bozukluğa yol açarak tümör gelişimine katkıda bulunmuş olabilir. Yine de germ hücrelerinin büyük bir çoğunluğunda Fas ve FasL ekspresyonunun varolması, germ hücreli tümörlerin koriokarsinom hariç pek çoğunda, evre III tümörlerde bile tedavi şansının yüksek olmasını açıklayabilir. Zira apoptozis oranının fazla olduğu tümörlerin tedaviye yanıtının daha iyi olduğu söylenmekte ve bu nedenle tümörlerde apoptozisi artıran kemoterapotik ajanların kullanılmasının kanser tedavisinde başarılı sonuçlar verebileceği söylenmektedir (92).

Hücre siklusunun regülasyonunda oldukça önemli olan siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinden p27, hücre proliferasyonunun kontrolünde anahtar role sahiptir ve son zamanlarda tümör baskılayıcı maddelerden biri olarak kabul edilmektedir (23). Kolon, mide, akciğer, oral kavite ve tükrük bezi tümörleri, testis tümörleri, prostat ve mesane karsinomları, vulva ve endometrium karsinomları, periferik sinir kılıfı tümörleri ve lenfoid doku gibi farklı dokulardan kaynaklanan tümöral yapılarda p27 ekspresyonu araştırılmış olup, farklı oranlarda olmakla birlikte birçoğunda normal dokunun kansere dönüşmesi ile p27 ekspresyonunun azaldığı görülmüştür (24-33,105-114). Teixeira ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada farelerde p27 geninin hasarlanması ile farelerin boyutlarının gittikçe arttığı, dalak, timus, testis, over ve hipofiz gibi organlarda orantısız büyüme görüldüğü bildirilmiştir (115).

Bizim çalışmamızda germ hücreli testis tümörlerinde ve normal testis dokusunda p27 ekspresyonu araştırılmış olup, seminomatöz ve nonseminomatöz tümörler karşılaştırıldı.

Barfkova ve arkadaşları tarafından in situ ve invasiv germ hücreli tümörler üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, kontrol grubu olan normal testis dokusunda (n=5) p27nin leydig ve sertoli hücrelerinde belirgin olarak pozitif boyandığı fakat germ hücrelerinde tesbit edilemediği söylenmektedir. Bunun yanında siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin bilinen fonksiyonları gereği ve diğer dokularda görüldüğü gibi normal dokunun p27 ekspresyonunun tümörlerde gittikçe azaldığı ve bazen kaybolduğu sonucunun tersine germ hücreli tümörlerde, özellikle differansiyasyon arttıkça p27 ekspresyonunun arttığı ve teratom alanlarında yoğunlaştığı bildirilmektedir. Bu sonuçların beklenmedik olduğu belirtilmekle birlikte, p27 ekspresyonunun siklin/siklin bağımlı kinaz komplekslerine bağlanma fonksiyonunun yanında, testis tümörlerinin gelişiminde ve differansiyasyonunda ikinci bir role sahip olabileceği öne sürülmektedir (34).

Bizim çalışmamızda ise kontrol grubu olan normal testis dokusundan oluşan olgularda (n=20), p27 ile oldukça yüksek oranda pozitif boyanma izlendi. Leydig ve sertoli hücrelerinin yanında germ hücrelerinde de belirgin olarak pozitif boyanma görüldü. Değerlendirmede esas alınan nükleus boyanmasının yanında normal testis dokusunda sitoplazmik boyanmanın da belirgin olduğu görüldü. Germ hücreli tümörlerde ise p27 ekspresyonunun belirgin olarak azaldığı izlendi. Bununla birlikte seminomatöz ve nonseminomatöz tümörler karşılaştırıldığında; p27 ekspresyonunun nonseminomatöz tümörlerde daha fazla olduğu dikkati çekti.

Thomas ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada p27 ekspresyonunun azalması ile kolorektal karsinomlarda metastaz yapma potansiyelinin arttığı söylenmektedir. P27 proteininin hücre siklusunun kontrolü dışında, hücre adezyonu üzerinde de role sahip olduğu öne sürülmektedir. P27 proteini azalması ile tümör hücreleri arasındaki bağlanmanın azaldığı ve bu nedenle tümör hücrelerinin dolaşıma geçip, metastaz yapma kapasitesi kazandığı söylenmektedir (28). Bir başka çalışmada inflamatuvar barsak hastalığı (IBH) ile ilişkili barsak karsinomları ve IBH ile ilişkisi olmayan barsak karsinomlarında p27 ekspresyonu araştırılmış, normal barsak mukozasında süperfisial tabakada yerleşmiş, differansiyasyonunu tamamlamış hücrelerde izlenirken, yangılı epitelde, displazi gösteren epitelde ve sporadik karsinomlarda bazal tabakada sınırlı olduğu, IBH ilişkili barsak tümörlerinde ise p27 ekspresyonunun sporadik kolon kanserlerinden daha az olduğu söylenmektedir (105).

Japonya'da Takano ve arkadaşları tarafından mide kanserleri üzerine yapılan bir çalışmada ise düşük oranda p27 ekspresyonu ile kötü prognozun birbiriyle orantılı olduğu bildirilmektedir (33). Oral kavite tümörlerinde p27 ekspresyonunu araştıran çalışmalarda da normal epitele göre tümör dokusunda p27 ekspresyonunun azaldığı ve bu azalma oranı ile prognozun ilişkili olduğu söylenmektedir (31-32).

Takata ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada tükrük bezinden köken alan adenoid kistik karsinom olgularında düşük düzeyde p27 ekspresyonu ile tümör metastazının ilişkili olduğu bildirilmektedir (108).

P27 üzerine yapılan bir başka çalışmada değişici epitel hücreli mesane karsinomlarında normal epitelde p27 ile hem nükleus hem de sitoplazmik boyanma izlenirken, tümör hücrelerinde p27 ekspresyonunda belirgin

azalma görüldüğü söylenmekte olup, tümörün differansiyasyon derecesi ve hastanın yaşam süresi ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. Ürotelial karsinomlarda p27 ekspresyonunu araştıran bir başka çalışmada ise p27 ekspresyonunun erken evre tümörlerde daha fazla oranda görüldüğü bildirilmektedir (29-30).

Benzer şekilde vulva karsinomlarında ve endometrium karsinomlarında gerçekleştirilen çalışmalarda normal epitelde belirgin p27 ekspresyonunun varolduğu izlenirken, tümörlerde belirgin şekilde azaldığı söylenmektedir (109,110).

Sanchez-Beato ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada lenfoid doku içinde p27 ekspresyonu araştırılmış olup, p27 ekspresyonunun daha çok durağan hücrelerde olduğu, büyüme faktörleri tarafından uyarılan hücrelerde ise azaldığı ve saldırgan lenfoma hücrelerinde ise kaybolduğu söylenmektedir. P 27 ekspresyonu ile yüksek proliferatif indeks arasında ters orantı bulunduğu ileri sürülmektedir (111). Periferik sinirlerden köken alan malign periferik sinir kılıfı tümörleri ve nörofibromlar üzerine yapılan bir çalışmada nörofibrom olgularının pek çoğunda p27 ekspresyonu olduğu halde, malign periferik sinir kılıfı tümörlerinde p27 ekspresyonunun azaldığı, hatta birçoğunda kaybolduğu yada sitoplazma içinde yer aldığı söylenmektedir (112).

Myeloid hücreler üzerinde yapılan bir çalışmada p27 ekspresyonunun hücrelerin differansiyasyonu arttıkça nükleustan sitoplazmaya doğru yer değiştirdiği söylenmektedir (113).

Prostat karsinomları üzerine yapılan çalışmalardan birinde normal prostat dokusunda asinuslar içindeki sekretuar hücrelerde %85 oranında boyanma izlenirken, prostatik intraepitelyal neoplazilerde ve invaziv karsinomlarda p27 ekspresyonunun azaldığı bildirilmektedir (26). De Marzo ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada da benzer şekilde

yüksek dereceli prostatik intraepitelyal neoplazilerde p27 oranının azaldığı bildirilmektedir (114) . Başka bir çalışmada ise p27 kaybı ile tümör differansiyasyon derecesinin (grade) birbiriyle ilişkili olduğu söylenmektedir (25) . Ayrıca prostat karsinomlarında p27 ekspresyonunun azalması ile birlikte hastalısız sağ kalım süresinin azaldığını bildiren ve prostatektomi, ardından radyoterapi tedavisi verilen prostat karsinomu olgularında p27 ekspresyon düzeyi ile hasta sağ kalım süresinin ilişkili olduğunu bildiren çalışmalar vardır (24,27) .

Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular ile Bartkova ve arkadaşlarının bulguları arasında farklılıklar görüldü. Onların çalışmasında normal testis dokusunda germ hücrelerinde p27 ekspresyonu bulunmadığı söylenirken, bizim çalışmamızda germ hücrelerinde p27 ekspresyonunun oldukça belirgin olarak ve yüksek oranda pozitif olduğu görüldü. Ayrıca germ hücreli tümörlerde p27 ekspresyonunun belirgin olarak azaldığı izlendi. Seminomatöz ve nonseminomatöz tümörler incelendiğinde p27 ekspresyonunun nonseminomatöz tümörlerde daha fazla olduğu görüldü. Bu sonuç kısmen Bartkova ve arkadaşlarının bulduğu germ hücreli tümörlerde teratoma doğru transformasyon miktarı arttıkça p27 ekspresyonunun da arttığı sonucu ve tümörün differansiyasyonu ile p27 ekspresyonunun birbiriyle ilişkili olduğu sonucu ile uyumlu bulundu. Bizim çalışmamızda izlenen nonseminomatöz tümörlerin birçoğunda teratom komponentinin bulunması nedeniyle böyle bir sonucun elde edildiği düşünüldü.

Testis tümörlerinin etiolojisinde; kriptorşizm, gonadal disgenezi, androjen insensitivitesi gibi bozukluklar, travma, enfeksiyon, genetik faktörler ve endokrin bozukluklar suçlanmaktadır. Kriptorşizmde testis tümörü görülme riskinin %5-50 arasında değiştiği ve daha çok da seminom geliştiği bildirilmektedir (2-6,35-41) .

Bu çalışma içindeki tümör olguları arasında, 1 olguda bilateral inmemiş olduğu görülmekte olup, seminomatöz tümör geliştiği görüldü.

Testis tümörlerinin patogenezi hala tartışmalı bir konu olmakla birlikte, seminomatöz seminom dışında bir çoğunun IGCN ile ilişkili olduğu ve özellikle seminomlarda daha fazla görülmekle birlikte diğer tümörlerin arasında da IGCN görülebileceği söylenmektedir. Schulze ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada seminifer tübüller içinde oluşan seminom hücrelerinin kalınlaşan bazal membranı geçip stromaya yayıldıkları gösterilmiştir (5-6,34,116).

Bizim çalışmamızda da 21 olguda (%52.5) oranında IGCN görüldü. Seminomatöz ve nonseminomatöz tümörler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmasa da seminomatöz tümörlerde (n=24) 14 (%58.3) olguda izlenirken; NSGCT de (n=16) 7 (%43.75) olguda beraberinde IGCN mevcut olduğu görüldü.

Seminomların germ hücreli testis tümörlerinin %50'sini oluşturduğu söylenmektedir (35). Bizim çalışmamız içindeki olguların %60'ı seminomlardan oluşmakta olduğu görüldü. Literatürle çok belirgin bir fark olmamakla birlikte, olgu sayısının kısıtlı olması nedeniyle böyle bir sonuç olabileceği düşünüldü.

Nonseminomatöz tümörler içinde embriyonel karsinom komponentinin bütün olgularda da mevcut olduğu görülürken, literatürde de bütün NSGCTler içinde %87 oranı gibi oldukça yüksek bir oranda bulunması ile uyumlu olduğu düşünüldü. Ancak pür embriyonel karsinomun literatürde tüm olguların ancak %2-3'ünü oluşturduğu belirtilirken; bu çalışmada 4(%10) olguda saf embriyonel karsinom tanısı verildi. Bu oranın literatürden fazla bulunması, örnekleme yapılırken gözden kaçan başka germ hücreli tümör komponentlerinin varolabileceğini düşündürdü.

Seminomatöz tümörlerin yaş ortalaması nonseminomatöz tümörlerden 5-10 yıl daha fazla olduğu bilinmektedir (2-6,35) . Bu çalışmadaki seminomatöz ve nonseminomatöz tümörlerin yaş ortalamaları arasında yaklaşık 6 yıl kadar fark olduğu; seminomatöz tümörlerin yaş ortalaması 38.04 iken nonseminomatöz tümörlerin 32.31 olduğu görülmüş olup, literatürle uyumlu bulundu. Bunun yanında seminomatöz tümörlerin yaş ortalaması beklenenden biraz daha erken yaşda ortaya çıktığı görüldü ve olguların sınırlı olmasına bağlandı.

Seminomatöz ve nonseminomatöz tümörler arasında tümör çapı, lokalizasyon, vasküler ve lenfatik invazyon , tunika albuginea invazyonu, spermatik kord invazyonu, IGCN ile birlikteliği, cerrahi sınır pozitifliği ve tümörün evresi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar görülmemekle birlikte, vasküler invazyon ve lenfatik invazyon, tunika albuginea invazyonu, spermatik kord invazyonu ve cerrahi sınır pozitifliği nonseminomatöz tümörlerde daha yüksek oranlarda izlendi. IGCN ise seminomlarda daha fazla izlendi. Nekroz, belirgin bir şekilde nonseminomatöz tümörlerde daha yüksek bulundu.

Tümör çapı ile; nekroz, vasküler ve lenfatik invazyon, tunika albuginea invazyonunun arttığı saptandı. Ancak tümör çapı ile cerrahi sınır pozitifliği, tümörün evresi ve alttipi arasında belirgin fark izlenmedi.

İmmunohistokimyasal olarak uygulanan Fas ve FasL boyaları, hem tümör grubunda hem de normal testis dokusunda heterojen olarak farklı şiddette boyandı. Oluşturulan Fas skor ve FasL skoru ile; boyanma şiddetleri ve p27 ekspresyonunun doğru orantılı olduğu bulundu ve p27 ekspresyonundaki artışın, hücrenin apoptozise gitmesini uyarıcı etki gösterebileceğini düşündürdü. Fas skoru ve FasL skoru ile; tümör çapı, nekroz, lenfatik ve vasküler invazyon, IGCN, tunika albuginea ve

spermatik kord invazyonu, cerrahi sınır pozitifliği ve tümörün evresi arasında bir ilişki bulunmadı.

P27 ekspresyonu kaybı ile; lenfatik invazyon ve nekroz arasında anlamlı bir ilişki olduğu görülmekle birlikte sebebi açıklanamadı. Ancak nonseminomatöz tümörlerde daha yüksek boyanması nedeniyle bu tümörlerde de beklendiği gibi nekroz ve lenfatik invazyonun daha fazla görülmesi nedeniyle ilişkili görülmüş olabileceği düşünüldü.

P27 boyanma oranı ile; vasküler invazyon, tunika albuginea invazyonu, spermatik kord invazyonu, cerrahi sınırdaki tümör pozitifliği ve tümörün evresi arasında anlamlı bir birliktelik görülmedi.

Tümörler arasında prognozla ilişkili olan faktörler arasında tümör dokusunda inflamatuvar hücre infiltrasyonu da yer alır. Seminomlarda stromada görülen lenfosit infiltrasyonu ile prognozun ilişkili olduğu bulunan çalışmalar mevcuttur. Wein ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada seminomlarda sitotoksik lenfositler, makrofajlar ve epiteloid hücrelerin tümör hücreleri üzerine sitotoksik etkisi olduğu söylenmektedir (117).

Evre I germ hücreli tümörlerde en önemli prognostik faktörlerden biri vasküler invazyondur (82-87). Nonseminomatöz tümörlerde Evre I olgularda vasküler invazyon ile rekürrens ilişkili olduğu ve vasküler invazyon izlenen tümörlerin rekürrens riskinin yüksek olduğu söylenmektedir (118-121).

Bizim çalışmamızda da istatistiksel olarak anlamlı görülme de nonseminomatöz tümörlerde vasküler ve lenfatik invazyon daha fazla görüldü ve nonseminomatöz tümörlerin davranışının seminomatöz tümörlerden daha agresif davranışlı olması nedeniyle uyumlu bulundu.

Çalışmamızda Fas, FasL ve p27 ekspresyonunun germ hücreli testis tümörlerinde belirgin olarak azaldığı görüldü. Bunun yanında seminomatöz

ve nonseminomatöz tümörlerde Fas ve Fas L ekspresyonu arasında belirgin bir fark izlenmedi. P27 ekspresyonu ise nonseminomatöz tümörlerde daha fazla oranda bulundu.

Testis tümörlerinin prognozunun önceden belirlenebilmesi ve tedaviye katkıda bulunabilmesi için moleküler düzeyde birçok çalışma yapılmaktadır. Bizim çalışmamızda uygulanan Fas, FasL ve p27 immun belirteçlerinin testis tümörü gelişiminde rol oynayabileceği düşünüldü. Ayrıca ileriki zamanlarda daha çok sayıda ve hasta yaşam süreleri ile birlikte yapılacak çalışmalara önyak olarak testis tümörlerinin tedavi ve prognozunun iyileştirilmesinde katkıda bulunabileceği düşünüldü.

6. SONUÇLAR

Çalışmaya 24'sü (%60) seminomatöz ve 16'sı (%40) nonseminomatöz olmak üzere 40 adet testis germ hücreli tümör olgusu ve 20 adet tümör dışı nedenlerle opere edilmiş testis dokusu dahil edildi. Nonseminomatöz tümörlerden 4 tanesi embriyonel karsinom, 6 tanesi teratokarsinom, 4 tanesi embriyonel karsinom+seminom, 1 tanesi embriyonel karsinom+koriokarsinom ve 1 tanesi embriyonel karsinom + endodermal sinüs tümörü + teratom + seminomdan oluşmaktaydı. Çalışmadaki germ hücreli testis tümörleri, seminomatöz ve nonseminomatöz histopatolojik alttiplere ayrıldı ve immunohistokimyasal olarak boyanan Fas, FasL ve p27 immun belirteçleri, klinikopatolojik parametrelerle (yaş, tümör çapı, lokalizasyon, nekroz, vasküler ve lenfatik invazyon, tunika albuginea invazyonu, spermatik kord invazyonu, cerrahi sınır pozitifliği ve tümör evresi) karşılaştırıldı ve bu belirteçlerin normal erişkin testis dokusunda ekspresyonu araştırılarak, bu belirteçlerin testis tümörü gelişimindeki önemi araştırıldı. Bu çalışma sonucunda aşağıdaki bulgular elde edildi.

- 1) Çalışmaya alınan olgularda, Fas boyası ile tümör grubunda (n=40) %41.50 alanda pozitif boyanma izlenirken, kontrol grubunda (n=20) %99 alanda pozitif boyanma görüldü. FasL boyası ile tümör grubunda %57.50 alanda pozitif boyanma görülürken, kontrol grubunda %100 boyanma görüldü. P27 ile ortalama %13.55 hücrede pozitif nükleer boyanma izlenirken, kontrol grubunda %930 hücrede pozitif nükleer boyanma izlendi. Tümör grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, Fas, FasL ve p27 ekspresyonu arasındaki bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p \leq 0.001$)

2) Fas boyası ile olgularda boyanma şiddeti incelendiğinde, kontrol grubunda (n=20) 2 olgu (%10) hafif derecede (+) , 12 olgu(%60) orta derecede (++) ve 6 olgu (%30) şiddetli derecede (+++) pozitif boyandı. Tümör grubunda (n=40) 1 olguda (%2.5) hiç boyanma izlenmedi (0) , 21 olgu (%52.5) hafif derecede (+) , 14 olgu (%35) orta derecede (++) ve 4 olgu (%10) şiddetli derecede (+++) pozitif olarak boyandı. FasL boyası ile boyanma şiddetine bakıldığında, kontrol grubunda 2 olgu (%10) hafif derecede (+) , 13 olgu (%65) orta derecede (++) ve 5 olgu (%25) şiddetli derecede (+++) pozitif olarak boyandı. Tümör grubunda ise ; 1 olgu hiç boyanmadı (0) , 19 olgu (%47.5) hafif derecede (+) , 9 olgu (%22.5) orta derecede (++) ve 11 olgu (%27.5) şiddetli derecede (+++) pozitif olarak boyandı. Tümör grubu ve kontrol grubunda Fas ve FasL boyanma şiddetleri ve boyanma yüzdelerinin birbirine paralel değiştiği görüldü ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.001$) .

3) Fas ve FasL boyanan alanların yüzdesine göre Fas ve FasL skoru oluşturuldu. Fas skoru ile tümörün histopatolojik alttipi ve evresi arasında bir ilişki bulunmadığı görüldü. Benzer şekilde FasL skoru ile tümörün alttipi ve evresi arasında da bir ilişki izlenmedi ($p>0.05$) .

4) Fas skoru ile ; Fas boyanma şiddeti, FasL boyanma şiddeti ve p27 ekspresyonunun doğru orantılı olduğu görüldü ve sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.01$). FasL skoru ile Fas skoru, Fas boyanma şiddeti ve p27 ekspresyonunun doğru orantılı olduğu görüldü ve bu istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.01$) .

5) Fas skoru ile ; tümör çapı, nekroz, IGCN, vasküler ve lenfatik invazyon, tunika albuginea invazyonu, spermatik kord invazyonu ve cerrahi sınır

pozitifliği gibi klinikopatolojik parametreler arasında bir ilişki izlenmedi ($p>0.05$).

- 6) FasL skoru ile ; tümör çapı, nekroz, IGCN, vasküler ve lenfatik invazyon, tunika albuginea invazyonu, spermatik kord invazyonu ve cerrahi sınır pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki görülmedi ($p>0.05$).
- 7) P27'nin tümör alttipleri arasındaki ekspresyon farkı incelendiğinde ; seminomatöz tümörlerde % 5.08 hücrede pozitif nükleer boyanma görülürken, nonseminomatöz tümörlerde %26.25 hücrede pozitif boyanma görüldü. Bu fark istatistiksel olarak oldukça anlamlı bulundu ($p=0.000$).
- 8) P27 ekspresyonu kaybı ile lenfatik invazyon arasında doğru orantılı bir ilişki saptandı ($p\leq 0.05$).
- 9) P27 ekspresyonu kaybı ile ; nekroz arasında doğru orantılı bir ilişki bulundu ($p\leq 0.01$).
- 10) P27 ekspresyonu kaybı ile vasküler invazyon, IGCN, tunika albuginea invazyonu, spermatik kord invazyonu, cerrahi sınır pozitifliği ve tümörün evresi arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p>0.05$).
- 11) Fas skoru, FasL skoru ve p27 ekspresyonunun yaş ile doğru orantılı olduğu görüldü ($p<0.05$).
- 12) alışmaya alınan tüm testis tümörlerinde yaş ortalaması 35,75 olarak bulundu. Seminomatöz tümörlerde yaş ortalaması 38,04 iken nonseminomatöz tümörlerde yaş ortalaması 32,31 olarak bulundu. Bu

fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Ancak nonseminomatöz germ hücreli testis tümörlerinin daha erken yaşta ortaya çıktığı görüldü.

- 13) Seminomatöz tümörlerin ortalama çapı 4.92 iken, nonseminomatöz tümörlerin ortalama çapı 4.87 olarak saptandı. Tümör çapı ile ; nekroz ve spermatik kord invazyonunun doğru orantılı olarak değiştiği görüldü ($p \leq 0.05$) . Ayrıca tümör çapı ile ; vasküler invazyon, lenfatik invazyon, IGCN, tunika albuginea invazyonunun doğru orantılı olduğu bulundu ve bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p \leq 0.01$) . Bunun yanında cerrahi sınırdaki tümör izlenmesi, tümörün histopatolojik alttipi ve evresi ile tümör çapı arasında bir ilişki görülmedi ($p > 0.05$) .
- 14) Seminomatöz tümörlerden 13(%54.17)olguda nekroz izlenirken, nonseminomatöz tümörlerde 14(%87.5)olguda nekroz görüldü ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$) .
- 15) Seminomatöz ve nonseminomatöz tümörlerde ; tümör çapı, tümörün lokalizasyonu (sağ ya da sol testis), vasküler ve lenfatik invazyon, tunika albuginea invazyonu, tümörün IGCN ile birlikteliği, cerrahi sınır pozitifliği ve tümörün evresi arasında anlamlı bir fark izlenmedi ($p > 0.05$) . Ancak vasküler ve lenfatik invazyon, spermatik kord invazyonu ve cerrahi sınır pozitifliği nonseminomatöz tümörlerde daha yüksek oranda bulunduğu görülürken ; IGCN ise seminomatöz tümörlerde daha yüksek oranda izlendi .

7. ÖZET

Testisin germ hücreli tümörleri seyrek görülmelerine karşın 15-35 yaşları arasındaki erkeklerde en sık rastlanan malign tümörler olması nedeniyle oldukça önemlidir.

İnsan vücudunda ortaya çıkan tümörlerin davranışının ve prognozunun önceden tahmin edilebilmesi ve efektif bir şekilde tedavisinin yapılabilmesi için, öncelikle kanser gelişim mekanizmalarının çözümlenmesi gerekmektedir. Günümüzde bu konuda çeşitli kanserler üzerinde moleküler düzeyde pekçok çalışma yapılmaktadır. Oldukça önemli ipuçları elde edilmiş olmakla birlikte henüz kesin bir açıklama yapılamamaktadır.

Tümörögenizde rol oynadığı söylenen mekanizmalar arasında apoptozis kontrol mekanizmalarında meydana gelen defektler ve hücre siklusunun kontrolünün kaybı nedeniyle hücrenin kontrolsüz proliferasyonu sayılabilir. Apoptozisi kontrol eden ve başlatan sinyallerin başında Fas transmembran proteini ve Fas reseptörüne özel olarak bağlanan FasL transmembran proteini gelir. Hücre siklusunu negatif olarak kontrol eden ve hücrenin kontrolsüz bir şekilde artışına engel olan faktörlerin en önemlilerinden biri ise p27 proteindir. Fas, FasL ve p27 immun belirteçleri ile farklı dokulardan kaynaklanan birçok tümör üzerinde çalışılmış, farklı sonuçlar elde edilmiştir. Ancak testis tümörleri üzerinde az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada testisin germ hücreli tümörlerinde Fas, FasL ve p27 ekspresyonunu araştırıldı. Normal testis dokusu ve histopatolojik alttıpleri arasındaki farklılıklar incelendi ve önemli klinikopatolojik parametrelerle karşılaştırıldı.

Germ hücreli testis tümörleri ile normal testis dokusu arasında Fas, FasL ve p27 ekspresyonunun oldukça farklı olduğu, normal testis dokusunda bu immun belirteçlerle oldukça yüksek oranda boyanma

izlenirken, tümörlerde bu belirteçlerin tamamen kaybolmamakla birlikte, belirgin olarak azaldığı izlendi. Germ hücreli tümörler; seminomatöz ve nonseminomatöz germ hücreli tümörler olarak histopatolojik alttiplere ayrıldığında Fas ve FasL ekspresyonunun iki grup arasında farklı olmadığı görüldü. Ancak p27 ekspresyonunun nonseminomatöz tümörlerde daha fazla olduğu saptandı.

Testis tümörlerinin gelişiminde bu belirteçlerin kaybı, apoptozis oluşum mekanizmasının bozulması ve hücre siklusunun kontrolsüz ilerlemesi nedeniyle, önemli bir role sahip olabilir. Testis tümörlerinin prognozunun önceden belirlenebilmesi ve tedaviye katkıda bulunabilmesi için moleküler düzeyde birçok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmanın da ileriki zamanlarda, daha çok sayıda hasta üzerinde ve hasta yaşam süreleri ile birlikte yapılacak çalışmalara ışık tutabileceği düşünülmektedir.

8. KAYNAKLAR

- 1) Hideaki Miyake, Isao Hara, Kazuki Yamanaka et al. "Expression Patterns of CD44 Adhesion Molecule in Testicular Germ Cell Tumors and Normal Testes" . American Journal of Pathology 1998 ; 152 : 1157-1160 .
- 2) Robert O. Peterson "Testicular Neoplasms" . In : Robert O. Peterson : Urological Pathology. 2nd Ed. L. B. Lippincott Company, Philadelphia 1992 ; 452-525 .
- 3) Cotran RS, Kumar V, Collins T "Cellular Pathology I : Cell Injury and Cell Death" and "Neoplasia" . In : Cotran RS, Kumar V, Collins T : Robins Pathologic Basis of Disease. 6th Ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania 1999 ; 1-31 and 260-327 .
- 4) F. K. Mostofi. "Testicular Tumours" . Cancer 1973 ; 32 : 1186-1201 .
- 5) Thomas M. Ulbright and Lawrence M, Roth. "Testicular and Paratesticular Tumors". In: Stephen S. Steinberg : Diagnostic Surgical Pathology. 3rd Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia 1999 ; 1973 – 2033 .
- 6) Thomas M. Ulbrigh "Neoplasms of Testis" . In : David G. Bostwick, John N. Eble : Urologic Surgical Pathology. Mosby Year Book, St. Louis, Missouri 1997; 567-645.
- 7) Klaus-Peter Diekman, Wieland Boeckmann, Wilhelm Brosig et al. "Bilateral Testicular Germ Cell Tumours" . Cancer 1986 ; 57 : 1254-1258 .
- 8) Helena Roelofs, Ruud J. H. L. M. Van Gorp, J. Wolter Oosterhuls et al. "Detection of Human Endogenous Retrovirus Type K-Specific Transcripts in Testicular Parenchyma and Testicular germ cell tumors

- of Adolescents and Adults” . American Journal of Pathology 1998 ; 153 : 1277-1282 .
- 9) Berthold Huppertz, Hans-Georg Frank, Peter Kaufman “The apoptosis cascade-morphological and histochemical methods for its visualization” . Anatomy Embryology 1999 ; 200 : 1-18 .
 - 10) John J. Reed. “Mechanisms of Apoptosis” . American Journal of Pathology 2000 ; 157 : 1415-1430 .
 - 11) Kim Boekelheide, Jeongwu Lee, Elizabeth B. Shipp et al. “Expression of Fas system-related genes in the testis during development and after toxicant exposure” . Toxicology Letters 1998 ; 102-103 : 503-508 .
 - 12) Y. Sasaki, H. Ahmed, T. Takeuchi et al. “Immunohistochemical study of Fas, Fas ligand and interleukin-1 β converting enzyme expression in human prostatic cancer” . British Journal of Urology 1998 ; 81 : 852-855 .
 - 13) George Pan, Selwyn M. Vickers, Alan Pickens et al. “Apoptosis and Tumorigenesis in Human Cholangiocarcinoma Cells” . American Journal of Pathology 1999 ; 155 : 193-203 .
 - 14) Jian -Jun Chen, Yongnian Sun, Gary J. Nabel. “Regulation of the proinflammatory Effects Fas Ligand (CD95L)” . Science 1998 ; 282 : 1714-1717 .
 - 15) A. Madea, Y. Aragane and T. Tezuka. “ Expression of CD95 ligand in melanocytic lesions as a diagnostic marker” . British Journal of Dermatology 1998 ; 139 : 198-206 .
 - 16) Ayaka Sugihara, Shigeru Saiki, Motomu Tsuji et al. “Expression of Fas and Fas ligand in the Testes and Testicular Germ Cell Tumors : Immunohistochemical Study” . Anticancer Research 1997 ; 17 : 3861-3866 .

- 17) Braendstrup O, Bols B, Jensen L. "Fas and Fas-Ligand expression in seminomatous testes". *APMIS* 1999 ; 107 (4) : 431-436 .
- 18) Carlos Cordon-Cardo. "Mutation of Cell Cycle Regulators" . *American Journal of Pathology* 1995 ; 147 : 545-560 .
- 19) Charles J. Sherr. "G1 Phase Progression : Cycling on Cue". *Cell* 1994 ; 79 : 551-555 .
- 20) Hideo Toyoshima and Tony Hunter. "p27, a Novel inhibitor of G1 Cyclin-CDK Protein Kinase Activity, is Related to p21" . *Cell* 1994 ; 78 : 67-74 .
- 21) Jun-ya Kato, Masaaki Matsuoka, Kornelia Polyak et al. "Cyclic AMP-Induced G1 Phase Arrest Mediated by an (p27^{kip1}) of Cyclin-Dependent Kinase 4 Activation". *Cell* 1994 ; 79 : 487-496 .
- 22) Tony Hunter and Jonathan Pines. "Cyclins and Cancer II : Cyclin D and CDK Inhibitors Come of Age" . *Cell* 1994 ; 79 : 573-582 .
- 23) Toshiyasu Hiramata and Phillip Koeffler. "Role of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors in the Development of Cancer" . *Blood* 1995 ; 86(3) : 841-854 .
- 24) Ronald M. Yang, John Naitoh, Michael Murphy et al. "Low p27 Expression Predicts Poor Disease-Free Survival in Patients with Prostate Cancer" . *The Journal of Urology* 1998 ; 159 : 941-945 .
- 25) Yanping Guo, Geoffrey N. Sklar, Andrew Borkowski et al. "Loss of Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p27^{Kip1} Protein in Human Prostate Cancer Corrolates with Tumor Grade" . *Clinical Cancer Research* 1997 ; 3 : 2269-2274 .
- 26) Angelo M. De Marzo, Alan K. Meeker, Jonathan I. Epstein et al. "Prostate Stem Cell Compartments, Expression of the Cell Cycle Inhibitor p27^{Kip1} in Normal, Hyperplastic, and Neoplastic Cells" . *American Journal of Pathology* 1998 ; 153 : 911-919 .

- 27) Liang Cheng, Ricardo V. Lloyd, Amy L. Weaver et al. "The Cell Cycle Inhibitors p21WAF1 and p27KIP1 Are Associated with Survival in Patients Treated by Salvage Prostatectomy after Radiation Therapy". *Clinical Cancer Research* 2000 ; 6: 1896-1899 .
- 28) George V. Thomas, Kinga Szigeti, Michael Murphy et al. "Down-Regulation of p27 Is Associated with Development of Colorectal Adenocarcinoma Metastases" . *American Journal of Pathology* 1998 ; 153 : 681-687 .
- 29) Joseph J. Del Pizzo, Andrew Borkowski, Stephen C. Jacobs et al. "Loss of Cell Cycle Regulators p27^{Kip1} and Cyclin E in Transitional Cell Carcinoma of the Bladder Correlates with Tumor Grade and Patient Survival" . *American Journal of Pathology* 1999 ; 155 : 1129-1136 .
- 30) Knut H. Franke, Mario Miklosi, Peter Goebell et al. "Cyclin-dependant Kinase Inhibitor P27^{Kip1} is Preferentially in Early Stages of Urothelial Carcinoma" . *Urology* 2000 ; 56 : 689-695 .
- 31) T. K. Venkatesan, Christiane Kuropkat, David D. Caldarelli et al. "Prognostic Significance of p27 Expression in Carcinoma of the Oral Cavity and Oropharynx" . *Laryngoscope* 1999 ; 109 : 1329-1333 .
- 32) Richard C. K. Jordan, Grace Bradley and Joyce Slingerland. "Reduced Levels of the Cell-Cycle Inhibitor p27^{Kip1} in Epithelial Dysplasia and Carcinoma of the Oral Cavity" . *American Journal of Pathology* 1998 ; 152 : 585-590 .
- 33) Yasuo Takano, Yo Kato, Paul J. van Diest et al. "Cyclin D2 Overexpression and Lack of p27 Correlate Positively and Cyclin E Inversely with a Poor Prognosis in Gastric Cancer Cases" . *American Journal of Pathology* 2000 ; 156 : 585-594 .

- 34) Jirina Bartkova, Minna Thullberg, Ewa Rajpert-De Meyts et al. "Cell Cycle Regulators in Testicular Cancer : Loss of p18INK4C Marks Progression from Carcinoma *in situ* to Invasive Germ Cell Tumours" . International Journal of Cancer 2000 ; 85 : 370-375 .
- 35) Rosai Juan "Testis" . In : Rosai Juan : Ackerman's Surgical Pathology. 8th Ed. Mosby Year Book , St. Louis 1996 ; 1257-1297 .
- 36) Mostafa A. Batata, Florence C. H. Chu, Basil S. Hilaris et al. "Testicular Cancer in Cryptorchids" . Cancer 1982 ; 49 : 1023-1030 .
- 37) Aleksander Giwerchman, Jacob Grindsted, Bjarne Hansen et al. "Testicular Cancer Risk in Boys with Maldescended Testis : A Cohort Study" . The Journal of Urology 1987 ; 138 : 1214-1216 .
- 38) Aleksander Giwerchman, Jorn Müller and Niels E. Skakkebaek. "Prevalance of Carcinoma *in situ* and Other Histopathological Abnormalities in Testes from 399 Men Who Died Suddenly and Unexpectedly" . The Journal of Urology 1991 ; 145 : 77-80 .
- 39) S.J. Harland, P.A. Cook, S. D. Fossa et al. "Intratubuler Gem Cell Neoplasia of the Contralateral Testis in Testicular Cancer : Defining A High Risk Group" . The Journal of Urology 1998 ; 160 : 1353-1357 .
- 40) Jorn Müller, Niels E. Skakkebaek, Ole H. Nielsen et al. "Cryptorchidism and Testicular Cancer" . Cancer 1984 ; 54 : 629-634 .
- 41) David J. Tollerud, William A. Blattner, Mary C. Fraser et al. "Familial Testicular Cancer and Urogenital Developmental Anomalies" . Cancer 1985 ; 55 : 1849-1854 .
- 42) Alan M. Ducatman, David E. Conwill and James Crawl. "Germ Cell Tumors of the Testicle among Aircraft Repairmen" . The Journal of Urology 1986 ; 136 : 834-836 .

- 43) Peter Albers, Alexander Göll, Erhard Bierhoff et al. "Clinical Course and Histopathologic Risk Factor Assessment in Patients with Bilateral Testicular Germ Cell Tumors" . *Urology* 1999 ; 54 : 714-718 .
- 44) Martin Dötsch, Andreas Brauers, Reinhard Büttner et al. "Malignant Germ Cell Tumor of the Contralateral Testis after Radiotherapy for Testicular Intraepithelial Neoplasia" . *The Journal of Urology* 2000 ; 164 : 452-453 .
- 45) Edith Hawkins, Stephen A. Heifetz, Roger Giller et al. "The Prepubertal Testis (Prenatal and Postnatal) : Its Relationship to Intratubular Germ Cell Neoplasia ." . *Human Pathology* 1997 ; 28 : 404-410 .
- 46) Osamu Koide, Shigetoshi Iwai, Kensuke Baba et al. "Identification of Testicular Atypical Germ Cells by an Immunohistochemical Technique for Placental Alkaline Phosphatase" . *Cancer* 1987 ; 60 : 1325-1330 .
- 47) Aleksander Giwerchman, Svend Lindenberg, Susan J. Kimber et al. "Monoclonal Antibody 43-9F as a Sensitive Immunohistochemical Marker of Carcinoma in Situ of Human Testis" . *Cancer* 1990 ; 65 : 1135-1142 .
- 48) Aleksander Giwerchman, Peter W. Andrew, Niels Jorgensen et al. "Immunohistochemical Expression of Embryonal Marker TRA-1-60 in Carcinoma In Situ and Germ Cell Tumors of the Testis" . *Cancer* 1993 ; 72 : 1308-1314 .
- 49) Beatriz Lifschitz-Mercer, David J. Elliott, Leonor Leider-Trejo et al. "Absence of RBM Expression As a Marker of Intratubular (In Situ) Germ Cell Neoplasia of the Testis" . *Human Pathology* 2000 ; 31 : 1116-1120 .
- 50) Joseph T. Czaja, Thomas M. Ulbright. "Evidence for the Transformation of Seminoma to Yolk Sac Tumor, with Histogenetic

- Considerations" . American Journal of Clinical Pathology 1992 ; 97 : 468-477 .
- 51) J. Carlos Manivel. "Transformation of Seminoma to Yolk Sac Tumor" . American Journal of Clinical Pathology 1992 ; 97 : 463-465 .
- 52) Gloria A. Niehans, J. Carlos Manivel, Gary T. Copland et al. "Immunohistochemistry of Germ Cell and Trophoblastic Neoplasms" . Cancer 1988; 62 : 1113-1123 .
- 53) Klaus Mann and Kenneth Siddle. "Evidence for Free Beta-Subunit Secretion in So-Called Human Chorionic Gonadotropin-Positive Seminoma" . Cancer 1988 ; 62 : 2378-2382 .
- 54) Judd W. Moul, John P. Foley, Charles L. Hitchcock et al. "Flow Cytometric and Quantitative Histological Parameters to Predict Occult Disease in Clinical Stage I Nonseminomatous Testicular Germ Cell Tumors" . The Journal of Urology 1993 ; 150 : 879-883 .
- 55) Peter Albers, Thomas M. Ulbright, Jutta Albers et al. "Tumor Proliferative Activity is Predictive of Pathological Stage in Clinical Stage A Nonseminomatous Testicular Germ Cell Tumors" . The Journal of Urology 1996 ; 155 : 579-586 .
- 56) Helene Roelofs, Marijke C. Mostert, Kirsten Pompe et al. "Restricted 12p Amplification and RAS Mutation in Human Germ Cell Tumors of the Adult Testis" . American Journal of Pathology 2000 ; 157 : 1155-1166 .
- 57) Toshikazu Uchida, Toshihiko Shimoda, Hisahiro Miyata et al. "Immunoperoxidase Study of Alkaline Phosphatase in Testicular Tumor" . Cancer 1981 ; 48 : 1455-1462 .
- 58) A. Hittmair, H. Rogatsch, A. Hobisch et al. "CD30 Expression in Seminoma" . Human Pathology 1996 ; 27 : 1166-1171 .

- 59) Inge Dekker, Thea Rozeboom, Jan Delemarre et al. "Placental-Like Alkaline Phosphatase and DNA Flow Cytometry in Spermatocytic Seminoma" . *Cancer* 1992; 69 : 993-996 .
- 60) Jorge Albores-Saavedra, Hank Huffman, Isabel Alvarado-Cabrero et al. "Anaplastic Variant of Spermatocytic Seminoma" . *Human Pathology* 1996 ; 27 : 650-655 .
- 61) Jozef Matoska, Dalibor Ondrus, Michal Hornak et al. "Metastatic Spermatocytic Seminoma" . *Cancer* 1988 ; 62 : 1197-1201 .
- 62) Craig Floyd, Alberto G. Ayala, Christopher J. Logothetis et al. "Spermatocytic Seminoma With Associated Sarcoma of the Testis" . *Cancer* 1988 ; 61 : 109-414 .
- 63) Peter N. Brawn. "The Characteristics of Embryonal Carcinoma Cells in Teratocarcinomas" . *Cancer* 1987 ; 59 : 2042-2046 .
- 64) George J. Bosy, Paul H. Lange, Lucien E. Nochomovitz et al. "Tumor Markers in Advanced Nonseminomatous Testicular Cancer" . *Cancer* 1981 ; 47 : 572-576 .
- 65) Ute Latza, Hans-Dieter Foss, Horst Dürkop et al. "CD30 Antigen in Embryonal Carcinoma and Embryogenesis and Release of the Soluble Molecule" . *American Journal of Pathology* 1995 ; 146 : 463-471 .
- 66) Taro Shuin, Hiroshi Misaki, Yoshinobu Kubota et al. "Differential Expression of Protooncogenes in Human Germ Cell Tumors of the Testis" . *Cancer* 1994 ; 73 : 1721-1727 .
- 67) Glenn D. Braunstein, Ronald Thompson, Gerald L. Princler et al. "Trophoblastic Proteins as Tumor Markers in Nonseminomatous Germ Cell Tumors" . *Cancer* 1986; 57 : 1841-1845 .
- 68) Ilan Leibovitch, Richard S. Foster, Thomas M. Ulbright et al. "Adult Primary Pure Teratoma of the Testis" . *Cancer* 1995 ; 75 : 2244-2250 .

- 69) Leo Kusuda, Raymond B. Leidich and Sakti Das. "Mature Teratoma of the Testis Metastazing As Mature Teratoma" . The Journal of Urology 1986 ; 135 : 1020-1021.
- 70) Tauseef Ahmed, George J. Bosl and Steven I. Hadju. "Teratoma With Malignant Transformation in Germ Cell Tumors in Men" . Cancer 1985 ; 56 : 860-863 .
- 71) Thomas M. Ulbright, Michael P. Goheen, Lawrence M. Roth et al. "The Differentiation of Teratomatous Origin From Embryonel Carcinoma" . Cancer 1986; 57 : 257-263 .
- 72) John P. Donohue. "Selecting Initial Therapy, Seminoma and Nonseminoma" . Cancer 1987 ; 60 : 490-495 .
- 73) Michael Hunter, Richard E. Perschel. "Testicular Seminoma" . Cancer 1989 ; 64 : 1608-1611 .
- 74) R. Joseph Babaian and Gunar K. Zagars. "Testicular Seminoma : The M. D. Anderson Experience. An Analysis of Pathological and Patient Characteristics and Treatment Recommendations" . The Journal of Urology 1988 ; 139 : 311-314 .
- 75) Willem A. H. Gelderman, Heimen Schraffordt Koops, Dirk TH. Sleijfer et al. "Orchidectomy Alone in Stage I Nonseminomatöz Testicular Germ Cell Tumors" . Cancer 1987 ; 59 : 578-580 .
- 76) Nicola Nicolai and Giorgio Pizzocaro. "A Surveillance Study of Clinical Stage I Nonseminomatous Germ Cell Tumors of the Testis : 10-Year Followup" . The Journal of Urology 1995 ; 154 : 1045-1049
- 77) Peter Albers, Greg A. Miller, Attilio Orazi et al. "Immunohistochemical Assesment of Tumor Proliferation and Volume of Embryonel Carcinoma Identify Patients with Clinical Stage A Nonseminomatous Testicular Germ Cell Tumor at Low Risk for Occult Metastasis" . Cancer 1995 ; 75 : 844-850 .

- 78) Eduardo B. Fernandez, Isabel A. Sesterhenn, William F. McCarthy et al. "Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression to Predict Occult Disease in Clinical Stage I Nonseminomatous Testicular Germ Cell Tumors" . The Journal of Urology 1994 ; 152 : 1133-1138 .
- 79) David G. McLeod, Raymond B. Weiss, Donald M. Stablein et al. "Staging Relationships and Outcome in Early Testicular Cancer : A Report from the Testicular Cancer Intergroup Study" . The Journal of Urology 1991 ; 145 : 1178-1183 .
- 80) Benoit P. Hermans, Christopher J. Sweeney, Richard S. Foster et al. "Risk of Systemic Metastases in Clinical Stage I Nonseminoma Germ Cell Testis Tumor Managed by Retroperitoneal Lymph Node Dissection" . The Journal of Urology 2000 ; 163 : 1721-1724 .
- 81) Peter Meidahl Petersen, Niels E. Skakkebaek, Mikael Rorth et al. "Semen Quality and Reproductive Hormones Before and After Orchiectomy in Men with Testicular Cancer" . The Journal of Urology 1999 ; 161 : 822-826 .
- 82) P. N. Rodriguez, G. R. Hafez and E. M. Meising "Nonseminomatous Germ Cell Tumor of the Testicle : Does Extensive Staging of the Primary Tumor Predict the Likelihood of Metastatic Disease?" . The Journal of Urology 1986 ; 136 : 604-608 .
- 83) L. S. Freedman, M. C. Parkinson, W. G. Jones et al "Histopathology in the Prediction of Relapse of Patients with Stage I Testicular Teratoma Treated by Orchidectomy Alone" . The Lancet 1987 ; 8 : 294-298 .
- 84) T. F. Sandeman, Chb Dmrt, Frer, Fracr et al. "Results of Adjuvant Chemotherapy for Low-Stage Nonseminomatous Germ Cell Tumors of the Testis With Vasculer Invasion" . Cancer 1988 ; 62 : 1471-1475

- 85) Dominik Böhlen, Markus Borner, Roland W. Sonntag et al. "Long-Term Results Following Adjuvant Chemotherapy in Patients With Clinical Stage I Testicular Nonseminomatous Malignant Germ Cell Tumors with High Risk Factors" . *The Journal of Urology* 1999 ; 161 : 1148-1152 .
- 86) Noubou Moriyama, James J. Daly, Michael A. Keating et al. "Vascular Invasion as a Prognosticator of Metastatic Disease in Nonseminomatous Germ Cell Tumors of the Testis" . *Cancer* 1985 ; 56 : 2492-2498 .
- 87) Werner T. de Riese, Peter Albers, Edwin B. Walker et al. "Predictive Parameters of Biologic Behavior of Early Stage Nonseminomatous Testicular Germ Cell Tumors" . *Cancer* 1994 ; 74 : 1335-1341 .
- 88) Lars E. French, Michael Hahne, Isabelle Viard et al. "Fas and Fas Ligand in Embryos and Adult Mice : Ligand Expression in Several Immune-privileged Tissues and Coexpression in Adult Tissues Characterized by Apoptotic Cell Turnover" . *The Journal of Cell Biology* 1996 ; 133 : 335-343 .
- 89) O'Connell J, Bennett MW, O'Sullivan GC et al. "Expression of Fas (CD95/APO-1) ligand by human breast cancers : significance for tumor immune privilege" . *Clin DIAGN Lab Immunol* 1999 ; 6 (4) : 457-463 .
- 90) Nicholas Mitsiades, Vassiliki Poulaki, George Mastorakos et al. "Fas Ligand Expression in Thyroid Carcinomas : A Potential Mechanism of Immune Evasion" . *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999 ; 84 : 2924-2932 .
- 91) O'Connell J, Bennett MW, O'Sullivan GC et al. "Fas Ligand Expression in Primary Colon Adenocarcinoma : Evidence that the Fas

- Counterattack is a Prevalent Mechanism of Immune Evasion in Human Colon Cancer” . Journal of Pathology 1998 ; 186 : 240-246 .
- 92) Leland H. Hartwell and Michael B. Kastan. “Cell Cycle Control and Cancer” . Science 1994 ; 266 : 1821-1828 .
- 93) Nicholas Mitsiades, Vassiliki Poulaki, Vassiliki Kotoula et al. “Fas Ligand is Present in Tumors of the Ewing’s Sarcoma Family and Is Cleaved into a Soluble Form by a Metalloproteinase” . American Journal of Pathology 1998 ; 153 : 1947-1956 .
- 94) Ahmet Zeytun, Mona Hassuneh, Mitzi Nagarkatti et al. “Fas-Fas Ligand –Based Interactions Between Tumor Cells and Tumor-Specific Cytotoxic T Lymphocytes : A Lethal Two-Way Street” . Blood 1997 ; 90 (5) : 1952-1959 .
- 95) Radmila Runic, Charles J. Lockwood, Linda LaChapelle et al. “Apoptosis and Fas Expression in Human Fetal Membrans” . The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1998 ; 83 : 660-666 .
- 96) Jeongwu Lee, John H. Richburg, Sarah C. Younkin et al. “The Fas System Is a Key Regulator of Germ Cell Apoptosis in the Testis” . Endocrinology 1997 ; 138 : 2081-2088 .
- 97) Jeongwu Lee, John H. Richburg, Elizabeth B. Shipp et al. “The Fas System, a Regulator of Testicular Germ Cell Apoptosis, Is Differentially Up-Regulated in Sertoli Cell *Versus* Germ Cell Injury of the Testis” . Endocrinology 1999 ; 140 : 852-858 .
- 98) Mitsuo Nagao, Yoshiyuki Nakajima, Mithiyoshi Hisanaga et al. “The Alteration of Fas Receptor and Ligand System in Hepatocellular Carcinomas : How Do Hepatoma Cells Escape From the Host Immune Surveillance In Vivo?” . Hepatology 1999 ; 30 : 413-421 .

- 99) Khong F. Yoong, Simon C. Afford, Satinder Randhawa et al. "Fas/Fas Ligand Interaction in Human Colorectal Hepatic Metastases" . American Journal of Pathology 1999 ; 154 : 693-703 .
- 100) Laurie L. Hill, Allal Ouhtit, Susan M. Loughlin et al. "Fas Ligand : A Sensor for DNA Damage Critical in Skin Cancer Etiology" . Science 1999 ; 285 : 898-900 .
- 101) Allal Ouhtit, Alexander Gorny, Konrad Muller et al. "Loss of Fas-Ligand Expression in Mouse Keratinocytes during UV Carcinogenesis" . American Journal of Pathology 2000 ; 157 : 1975-1981 .
- 102) Eli Sprecher, Reuven Bergman, Ahuvah Meilick et al. "Apoptosis, Fas and Fas-ligand expression in Melanocytic Tumors" . Journal of Cutaneous Pathology 1999 ; 26 : 72-77 .
- 103) O. Zoi-Toli, M. H. Vermeer, E. De-Vries et al. "Expression of Fas and Fas-ligand in primary Cutaneous T-cell Lymphoma (CTCL) : association between lack of Fas expression and aggressive types of CTCL" . British Journal of Dermatology 2000; 141 : 313-319 .
- 104) Brian R. Gastman, Yoshinari Atarashi, Torsten E. Reichert et al. "Fas Ligand Is Expressed on Human Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck, and It Promotes Apoptosis of T Lymphocytes" . Cancer Research 1999 ; 59 : 5356-5364 .
- 105) Shaun Walsh, Michael Murphy, Mark Silverman et al. "p27 Expression in Inflammatory Bowel Disease-Associated Neoplasia" . American Journal of Pathology 1999 ; 155 : 1511-1518 .
- 106) Yoh Dobashi, Mitsuhiko Shoji, Shi-Xu Jiang et al. "Active Cyclin A-CDK2 Complex, a Possible Critical Factor for Cell Proliferation in Human Primary Lung Carcinomas" . American Journal of Pathology 1998 ; 153 : 963-972 .

- 107) Hidetada Kawagana, Jun-Ichi Tamaru, Tomoaki Tanaka et al. "Role of p27^{Kip1} and Cyclin-Dependant Kinase 2 in the Proliferation of Non-Small Cell Lung Cancer" . American Journal of Pathology 1998 ; 153 : 505-513 .
- 108) Takashi Takata, Yasusei Kudo, Ming Zhao et al. "Reduced Expression of p27^{Kip1} Protein in Relation to Salivary Adenoid Cystic Carcinoma Metastases" . Cancer 1999 ; 86 : 928-935 .
- 109) Ana-Maria Bamberger et al. "Strongly reduced expression of the cell inhibitor p27 in endometrial neoplasia" . Vichows Arch 1999 ; 434(5): 423-428 .
- 110) Alessandra Zamparelli, Valeria Masciullo, Alessandro Bovicelli et al. "Expression of Cell-Cycle -Associated Proteins Prb2/p130 and p27^{Kip1} in Vulvar Squamous Cell Carcinomas" . Human Pathology 2001 ; 32 : 4-9 .
- 111) Margarita Sanchez-Beato, Ana Isabel Saez, Juan Carlos Martinez-Montero et al. "Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p27^{Kip1} in Lymphoid Tissue" . American Journal of Pathology 1997 ; 151 : 151-160 .
- 112) Helen P. Kourea, Carlos Cordon-Cardo, Maria Dudas et al. "Expression of p27^{Kip1} and Other Cell Cycle Regulators in Peripheral Nerve Sheath Tumors and Neurofibromas" . American Journal of Pathology 1999 ; 155 : 1885-1891 .
- 113) B. Yaroslavskiy, S. Watkins, A. D. Donnenberg et al. "Subcellular and Cell-Cycle Expression Profiles of CDK-Inhibitors in Normal Differentiating Myeloid Cells" . Blood 1999 ; 93(9) : 2907-2917 .
- 114) Angelo M. De Marzo, Valerie L. Marchi, Jonathan I. Epstein. "Proliferative Inflammatory Atrophy of the Prostate" . American Journal of Pathology 1999 ; 155: 1985-1992 .

- 115) L.T. Teixeira, H. Kiyokawa, X. D. Peng et al. "P27^{Kip1}-deficient mice exhibit accelerated growth hormone-releasing hormone (GHRH)-induced somatotrope Proliferation and adenoma formation". *Oncogene* 2000 ; 19 : 1875-1884 .
- 116) C. Schulze and A. F. Holstein. "On The Histology of Human Seminoma". *Cancer* 1977 ; 39 : 1090-1100 .
- 117) Yu-Quan Wei, Zhen- Biao Hang and Kai-Feng Liu. "In Situ Observation of Inflammatory Cell-Tumor Cell Interaction in Human Seminomas (Germinomas)". *Human Pathology* 1992 ; 23 : 421-428 .
- 118) Nasser Javadpour and John D. Young. "Prognostic Factors in Nonseminomatous Testicular Cancer". *The Journal of Urology* 1986 ; 135 : 497-499 .
- 119) Lawrence B. Marks, Joanne L. Rutgers, William U. Shipley et al. "Testicular Seminoma : Clinical Features that may Predict Par-Aortic Lymph Node Metastases". *The Journal of Urology* 1990 ; 143 : 524-527 .
- 120) W. Hoeltl, D. Kosak, J. Pont et al. "Testicular Cancer : Prognostic Implications of Vasculer Invasion". *The Journal of Urology* 1987 ; 137 : 683-685 .
- 121) Souchirou Fukuda, Tsutomu Shirahama, Yoshiharu Imazono et al. "Expression of Vasculer Endothelial Growth Factor in Patients with Testicular Gem Cell Tumors as an Indicator of Metastatic Disease". *Cancer* 1999 ; 85 : 1323-1330 .