

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**TESTİS TÜMÖRÜ TANISI KONMUŞ OLGULARDA GENETİK
MARKERLARIN FLORESAN IN SİTU HİBRİDİZASYON (FISH)
YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇİĞDEM TOPRAK

DANIŞMAN

YRD.DOÇ. DR. BEYHAN DURAK ARAS

MART 2010

KABUL VE ONAY SAYFASI

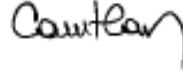
Çiğdem TOPRAK' ın Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "*Testis Tümörü Tanısı Konmuş Olgularda Genetik Markerların Floresan In Situ Hibridizasyon Yöntemi ile Belirlenmesi*" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

26.03.2010

Üye: Prof.Dr. Sevilhan ARTAN



Üye: Doç.Dr. Cavit CAN



Üye: Doç.Dr. M.Hamza MÜSLÜMANOĞLU



Üye: Yrd.Doç.Dr. Muhsin ÖZDEMİR



Üye: Yrd.Doç.Dr. Beyhan DURAK ARAS (Danışman)



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 01.04/2010. tarih ve 825/3820. sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof.Dr.Ferruh YÜCEL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Giriş: Testis tümörü ürogenital sistemden kaynaklanan bir kanser türüdür. Testis tümörlerinin %95'i germ hücrelerinden gelişir ve hemen hepsi maligndir. Geriye kalan %5'in çoğu Leydig'in interstisyel hücreleri ya da sertoli hücrelerinden kaynaklanır. Testis kanserleri erkek neoplazilerinin yaklaşık %1'ini ve ürolojik tümörlerin %5'ini oluşturmaktadır. En çok 15-34 yaşları arasında görülürler.

Amaç: Çalışmamızın amacı, testis tümör tipleri tespit edilen 30 olguya ait deparafizine örnekler kullanılarak FISH yöntemi ile hastalıkla ilişkilendirilmiş ve literatürde daha önce tanımlanan P53, AR, 12p, STK-11 ve P16 gen bölgelerini incelemektir. Ayrıca literatürde yayınlanan diğer çalışmalarla karşılaştırarak , saptanan anomalilerin hastalığın takibinde tarama yöntemleri ile birlikte kullanılabilirliğini incelemektir.

Gereç-Yöntem: Çalışmamızda ESOGÜ Tıp Fakültesi Üroloji Ana Bilimdalı'na başvuran ve testis tümörü nedeniyle orşiektomi yapılan 30 olgu değerlendirilmiştir. FISH analizi ile AR gen bölgesi, STK-11, P16, Cyclin D2 ve P53 genetik markerları açısından değerlendirilmiştir.

Bulgular: Olgularımızın %36 sında Androjen Reseptör Geni için (Xq11.12) amplifikasyon, %6 sında Serin/Treonin Kinaz geni için (19p13.3) delesyon, %40 ında P16 tümör supresör geni için (9p21) delesyon, %56 sında CyclinD2 onkogeni için (12p13) izokromozom ve amplifikasyon, %23 ünde P53 gen delesyonu saptanmıştır.

Sonuç ve tartışma: Çalışmamızda anomalili olguların %75 inin non-seminomatöz germ hücreli tümör olması genetik markerların hastalığın takibinde önemli olduğunu göstermiştir. Çalışmamız Türk populasyonunda bu konuda yapılmış ilk ve tek çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Testis tümörü, FISH, genetik marker

SUMMARY

Background: Testis cancer is a type of cancer originated from uro-genital system. 95% of testis tumors are originated from germ cells and nearly all of them are malignant. Most of the remaining 5% are originated from Leydig's interstitial cells or Sertoli cells. Testis neoplasies constitute 1% of male neoplasies and 5% of urological tumors. It is seen mostly between 15-34 years of age.

Aim: Aim of our study is to investigate amplification of Xq11.12 harbouring androgen receptor gene, deletion of 19p13.3 harbouring Serine/Treonine Kinase gene, deletion of 9p.21 harbouring tumor suppressor gene P16 and isochromosome and amplification of 12p.13 harbouring oncogene Cyclin D2 and 17p13 harbouring tumor suppressor gene P53 using FISH method.

Methods: In our study, biopsy samples of 30 testis cancer patients investigated with FISH analysis. With FISH analysis genetic markers such as AR gene region, STK-11, P16, Cyclin D2 and P53 evaluated.

Findings: In FISH analysis amplification of 12p and Xq11.12, isochromosome 12p, deletion of 19p13.3 and deletion of P53, P16 investigated. %36 of our patients amplification of Xq11.12 harbouring androgen receptor gene, %6 deletion of 19p13.3 harbouring Serine-treonin kinase gene, %40 deletion of 9p21 harbouring P16, %56 amplification of 12p13 harbouring oncogen Cyclin D2 and isochromosome, %23 17p13 harbouring tumor suppressor gene P53 are detected.

Results and Conclusions: In our study, according to % 75 patients with anomalies non-seminomatous germ cell tumour showed that, genetic markers is very important to observe patients during disease progression.

Keywords: Testis tumor, FISH, genetic marker

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	v
SUMMARY.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Kanserin Tanımı.....	3
2.2.Kanser Oluşumunda Sorumlu Genler ve Fonksiyonları.....	4
2.2.1.Tümör Süpresör Genler.....	4
2.2.2.DNA Tamir Genleri.....	5
2.2.3.Onkogenler.....	5
2.3.Testis Histolojisi.....	7
2.3.1.Seminifer Tübüller.....	8
2.3.2.Sertoli Hücreleri.....	9
2.3.3.İnterstisyel Doku.....	10
2.3.4.Kan-Testis Bariyeri.....	10
2.3.5.Testis İçi Genital Kanallar.....	11
2.3.6.Genital Boşaltım Kanalları.....	11
2.3.7.Yardımcı Genital Bezler.....	11
2.4.Testis Tümörleri.....	12

2.4.1.İnsidans ve Mortalite.....	12
2.4.2.Yaş.....	12
2.4.3.Irk.....	13
2.4.4.Sosyo-Ekonomik Düzey ve Beslenme.....	13
2.4.5.Lateralite ve Bilateralite.....	13
2.4.6.Histolojik Sınıflandırma.....	14
2.4.7.Germ Hücreli Tümör Gelişmesi.....	15
2.5.Testis Tümörlerinin Patolojisi.....	16
2.6.Testis Tümörü ve Genetik.....	17
2.6.1.Tümör Süpresör Gen P53 ve Testis Tümörleri.....	17
2.6.2.Serin/Treonin Kinaz 11 ve Testis Tümörleri.....	19
2.6.3.Cyclin-Bağımlı Kinaz İnhibitör 2A ve Testis Tümörleri.....	19
2.6.4.Androjen-reseptör geni (AR-gen) ve Testis Tümörleri.....	21
2.6.5.P16 Tümör Süpresör Geni ve Testis Tümörleri.....	22
2.7.Floresan In Situ Hibridizasyon.....	22
2.7.1. FISH Tekniğinde Kullanılan Problar ve Özellikleri.....	23
2.7.2. FISH Tekniğinin Temel Mekanizması.....	24
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	26
3.1. Gereç.....	26
3.1.1. Kullanılan Gereçler.....	26
3.1.2. Cam Malzeme.....	27
3.1.3. Kimyasal Maddeler.....	27
3.1.4.Kullanılan Problar.....	27
3.2 Yöntemler.....	28

3.2.1. Materyal Seçimi.....	28
3.2.2.FISH yönteminin uygulanması	29
3.2.2.1. Preparatların ön yıkaması ve denatürasyonu.....	31
3.2.2.2. Prob denatürasyonu.....	31
3.2.2.3. Hibridizasyon.....	31
3.2.2.4. Hibridizasyon sonrası yıkamalar.....	32
3.2.2.5. Preparatların Mikroskopta İncelenmesi.....	32
3.2.2.6. Değerlendirme.....	33
4.BULGULAR.....	34
4.1.Yöntem ve Değerlendirmeye İlişkin Bulgular.....	37
4.2.Klinik Evreleri Bilinen ve Tiplendirilmesi Yapılan Olguların FISH	
Analiz Bulguları.....	37
4.2.1.P53 Gen Bölgesine Ait Anomaliler.....	41
4.2.2.Androjen Reseptör Gen Bölgesine Ait Anomaliler.....	41
4.2.3.İzokromozom 12p Anomalileri.....	41
4.2.4.STK-11 Gen Bölgesine Ait Anomaliler.....	42
4.2.5.P16 Gen Bölgesine Ait Anomaliler.....	42
5.TARTIŞMA	
5.1. FISH Yöntemi İle Saptanan Anomalilerle Literatür Bilgilerinin	
Karşılaştırılması	47
5.1.1. P53 Gen Bölgesi Anomalilerinin Karşılaştırılması.....	47
5.1.2. Androjen Reseptör Gen Bölgesi Anomalilerinin Karşılaştırılması..	48
5.1.3. İzokromozom 12p Anomalilerinin Karşılaştırılması.....	50
5.1.4. STK-11 Gen Bölgesi Anomalilerinin Karşılaştırılması.....	53
5.1.5.P16 Gen Bölgesi Anomalilerinin Karşılaştırılması.....	55

6.SONUÇ ve ÖNERİLER.....57

7.KAYNAKLAR.....59

ÖZGEÇMİŞ

TABLULAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 2.1. Germ hücreli testis tümörlerinin sınıflaması.....	16
Tablo 3.2. Preparatların Ön Yıkama Solüsyonları.....	29
Tablo 3.3. Preparatların Denatürasyon Solüsyonu.....	29
Tablo 3.4. Hibridizasyon Sonrası Solüsyonlar.....	30
Tablo 3.5. Görüntüleme Sistemleri Solüsyonu.....	30
Tablo 4.1. Olguların yaş, klinik evre ve tümör tipine ait bilgiler.....	35
Tablo 4.2. Tüm Parametrelerin Görülme Sıklığı.....	38
Tablo 4.3. Değerlendirilen Parametrelerin Toplam Görülme Oranı.....	43
Tablo 5.1. P53 gen bölgesi delesyonu sonuçlarının literatür verileri ile karşılaştırılması.....	48
Tablo 5.2. X kromozom artışı sonuçlarının literatür verileri ile karşılaştırılması.....	50
Tablo 5.3. 12p anomalileri sonuçlarının literatür verileri ile karşılaştırılması.....	53
Tablo 5.4. Kromozom 19 anomalileri sonuçlarının literatür verileri ile karşılaştırılması.....	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Testis Histolojisi.....	8
Şekil 2.2. Testisin germ hücreli tümörlerinde tümörogenetik model.....	15
Şekil 4.1. P53 delesyonu görülen 27 numaralı olgunun FISH görüntüsü.....	44
Şekil 4.2. AR gen amplifikasyonu görülen 25 numaralı olgunun FISH görüntüsü.....	44
Şekil 4.3. İzokromozom 12p görülen 03 numaralı olgunun FISH görüntüsü.....	45
Şekil 4.4. 19p13 bölgesine ait normal ve 19q13 bölgesine ait artışları görülen 02 numaralı olgunun FISH görüntüsü.....	45
Şekil 4.5. P16 delesyonu görülen 26 numaralı olgunun FISH görüntüsü.....	46

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AR-gen	Androjen Reseptör Geni
ASE	Androjen Sorumlu Elementler
ATP	Adenozin Trifosfat
β HCG	β-İnsan Koryonik Gonadotropin,
CDI	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörleri
CDK	Siklin Bağımlı Kinaz
CGH	Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon
CIS	Karsinoma İn Situ
°C	Santigrat
DNA	Deoksiriboz Nükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
GDP	Guanozin Difosfat
GHT	Germ Hücreli Tümör
GTP	Guanozin Trifosfat
ISH	In Situ Hibridizasyon
IHK	İmmunohistokimyasal
FISH	Floresan In Situ Hibridizasyon

FSH	Folikül Stimüle Edici Hormon
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LHT	Leydig Hücre Tümör
M	Mol
m	Metre
mm	Milimetre
µl	Mikrolitre
NISH	Non-İzotopik In Situ Hibridizasyon
NaOH	Sodyum Hidroksit
NSE	Nöron Spesifik Enolaz
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyon
PLAP	Plasental Alkalen Fosfataz
RNA	Ribonükleik Asit
SLHT	Sertoli-Leydig Hücre Tümör
STK	Serin-Treonin Kinaz
TNMS	Tümör Nodül Metastaz Serum

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser önemi giderek artan bir sağlık ve yaşam sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Ölüm nedeni olarak, kalp ve damar hastalıklarının hemen ardından gelmektedir (22).

Kanserin sebebi henüz kesin olarak bilinmemektedir. Kanser için risk faktörleri yaşam şekillerine, yaşa, cinsiyete ve aile öykülerine bağlı olarak değişir. Bir başka risk grubu ise çevresel faktörlerdir (22).

2003 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından yayınlanan raporda, kanserli hasta sayısının hızla arttığı ve 2020 yılında, bu oranın %50 artarak bu sayının on beş milyon kişiye çıkacağı bildirilmiştir (24).

Testis tümörü erkeklerde görülen kanserlerin %1'ini oluşturur. Genel olarak nadir olarak görülen testis tümörleri 15-35 yaş arası erkekler arasında en sık görülen solid tümör olma özelliğini taşır. Bu tümörlerde tedavi başarı şansının yüksek olması nedeniyle ölüm olasılığı oldukça düşüktür (10,26,32).

Testis tümörlerinin sebepleri bilinmemektedir. Gelişmiş ülkelerde yüksek kalorili diyet ve fiziksel aktivite azlığına bağlı olarak daha sık görülmekte ve gerçek insidansı her geçen gün artmaktadır. Kriptorşidizmde tümör gelişme riski oldukça fazla olup sağ tarafta sola oranla daha sık görülmektedir. İnmemiş testis daha sonra cerrahi yöntemlerle indirilse bile bu risk devam eder (41).

Tüm malignitelerde olduğu gibi erken tanı testis tümörünün etkin tedavisi için de önemlidir. Testis tümörünün tanısı genital muayene, serum tümör belirteçleri (alfa-fetaprotein, β -insan korionik gonadotropin, laktat dehidrogenaz) düzeyinin ölçülmesi ve skrotal ultrasonografinin ardından konulabilir. En sık (olguların %75-90'ında) rastlanan

belirti, tek bir testisin, genellikle ağrısız bir biçimde büyümesidir. Olguların %10'unda kitle ağırlı, %10'unda ise tümör kendini metastatik semptomlarla gösterir (20).

Hastalığın kalıtsal olduğuna ilişkin kesin kanıtlar yoksa da, testis tümörlerine bazı ailelerde daha sık rastlandığı bilinmektedir.

Kanser bugün genetik orjinli bir hastalık grubu olarak bilinmektedir. Kanser oluşumu yani karsinogenezis farklı türlerde genlerin etkili olduğu çok aşamalı bir süreçtir. Kanserde etkili olduğu düşünülen genler; onkogenler, tümör süpresör genler ve DNA tamir genleri olarak 3 ana grup altında toplanır (14).

Gen ve genom mutasyonları kanser gelişiminde etkili olan genleri içerdiğinde (kromozom ve/veya gen delesyonları, amplifikasyonları, yapısal değişimler vb.) gen ürününün az ya da çok sentezlenmesi veya farklı ürünün sentezlenmesine neden olmaktadır. Sonuçta bu değişimler de sellüler fonksiyonlarda bozulmalara yol açmaktadır (14).

Testis tümörü oluşumunda çoklu genetik hasar sonucu malign germ hücrelerinin meydana geldiği ve kontrol edilemeyen şekilde bölünerek çoğaldığı düşünülmektedir.

Yaptığımız çalışmada;

Testis tümörü tanısı konmuş olgulara ait demografik ve histopatolojik bulgular ile birlikte literatürde kanser oluşumunda etkili olduğu saptanmış olan onkogen, tümör süpresör gen ve androjen reseptör genindeki amplifikasyon ve delesyon frekansını değerlendirerek testis tümör oluşumunun genetik etyolojisini aydınlatılabilmek amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Kanser, hücrelerin yaşam sikluslarını düzenleyen mekanizmaların bozulması sonucunda hücrenin aşırı, kontrolsüz ve agresif şekilde çoğalmasıyla ilerleyen, çağımızın en önemli sağlık problemlerinden birisidir (14). Kanser, Sağlık Bakanlığı'na "bildirimi zorunlu" bir hastalıktır. Buna rağmen ülkemizde gerçek kanser insidansı bilinmemektedir. DSÖ'nün 2003 yılına ait kanser raporunda, dünya çapında kanser oranının hızla arttığı ve 2020 yılında, bu oranın %50 artarak on beş milyon kişiyi etkileyebileceği bildirilmiştir (24,48).

Testis tümörleri erkek neoplazilerininin %1 ini ve ürolojik tümörlerin ise %5 ini oluşturmaktadır (29).

2.1. Kanser Tanımı

Kanser; hücrenin normal davranışlarını düzenleyen mekanizmaların bozulması sonucunda hücrenin aşırı, kontrolsüz ve agresif bir biçimde çoğalmasıyla seyreden bir hastalıktır. Kanser, çağımızın en önemli sağlık problemlerinden birisidir (14). Ülkemizde kesin istatistikler bulunmamakla birlikte her yıl 150 bin kişinin kansere yakalandığı tahmin edilmektedir (11).

Kanser tek bir hastalık olmayıp tümör oluşumuna neden olan kontrolsüz hücre çoğalmasıyla karakterize olan neoplazinin kesin formlarını tanımlamak için kullanılır.

Malign bir neoplazi, kontrolsüz hücre proliferasyonu, komşu hücreleri istila edebilme veya daha uzak bölgelere metastaz yapabilme gibi çeşitli özelliklere sahiptir. Bu özellikler aşamalı bir şekilde kazanılır ve bu süreç "*tümör progresyonu*" olarak isimlendirilir. Anormal hücre birikimi olan neoplazi, hücre proliferasyonu ile hücre ölümü arasındaki dengenin bozulması sonucu meydana gelmektedir. Her hücre hücre siklusuna girer ve mitozu uğrayarak yavru hücrelerini oluşturur. Normal koşullarda her hücrenin belirli bir yaşam süresi vardır. Hücre gelişimi, farklılaşması,

yaşlanması ve ölümü belirli bir program dahilinde gerçekleşir ve her aşama farklı gen ürünleri ile gerçekleştirilir ve kontrol edilir. Bir dokuda çoğalan hücre miktarı ile ölen hücre miktarı arasında sabit bir oran vardır.

Ancak hücrenin normalin dışında çoğalması, buna karşılık ölmesi gereken hücrelerin sonsuz yaşayabilme yeteneği kazanması dengenin bozulmasına ve dolayısıyla da hücre birikimine neden olur. Tüm bu mekanizmalar, gen ürünleri olan proteinler tarafından düzenlendiğinden, bir gendeki başkalaşım ya da epigenetik olay o genin kodladığı protein ya da polipeptidin üretilmemesi, yanlış üretilmesi ya da normalden az üretilmesi ile sonuçlanır. Bunun sonucunda da ilgili proteinlerin rol aldığı mekanizmalarda normalden sapmalar ortaya çıkar (14,29,31).

Kanser hücreninin büyüme ve çoğalma süreci, meydana gelen genetik değişiklikler (onkogenler, tümör süpresör genler), konakçı faktörleri (enzim polimorfizmi) ve tümör konakçı etkileşimi (anjioenez, invazyon, metastaz) ile yakından ilişkilidir (12,38).

2.2. Kanser Oluşumunda Sorumlu Genler ve Fonksiyonları

Hücrelerin poliferasyonunu, farklılaşmasını ve sağ kalımını denetleyen genlerde gerçekleşen değişimler kanserin oluşumuna neden olur (14).

2.2.1. Tümör Süpresör Genler

Tümör süpresör genler, hücre çoğalmasının kontrolünde onkogen mekanizmasının tam tersi bir yolu simgeler, normal koşullarda hücre çoğalmasını ve tümör gelişimini baskırlar. Oluşan birçok tümörde bu genlerin hasar görmesi veya inaktive olması sonucu hücre çoğalmasını negatif yönde düzenleyen etki ortadan kalkar ve tümör hücrelerinde anormal çoğalma başlar (1).

Tümör süpresör genlerinin kontrolsüz hücre proliferasyonunu kontrol etme ve inhibe etme yeteneği vardır. Bu yetenek ancak ilgili genin her iki allelinde de başkalaşım olması durumunda kaybolur ve tümör baskılayıcı gen kontrol etme fonksiyonunu kaybeder (14).

2.2.2. DNA Tamir Genleri

DNA çok çeşitli kimyasal reaksiyonlardan geçer. DNA hücre genomunun kalıcı kopyası olduğu için yapısındaki değişiklikler, diğer hücre komponentleri olan RNA ya da proteinlere göre çok daha önemli sonuçlara neden olur. Başkalaşım, DNA replikasyonu sırasında yanlış bazların DNA ya katılması nedeniyle oluşur. Ayrıca DNA da spontan veya kimyasal ajanlara, radyasyona maruz kalma durumunda da çeşitli kimyasal değişiklikler ortaya çıkar. Hücre genomunun bütünlüğünün korunabilmesi için hücreler harap olan DNA yı tamir etmek için mekanizmalar geliştirmek durumundadırlar. Bu DNA tamir mekanizmaları iki ana gruba ayrılır:

1. DNA hasarından sorumlu kimyasal reaksiyonun direkt olarak önlenmesi
2. Hasarlı olan bazların DNA'dan çıkarılması (14,31)

Bu gruba dahil olan genlerde oluşacak başkalaşım, fonksiyonel ürün sentezlenmesini engelleyecek ve DNA tamir edilmeyecek ve genom dengesi bozulacaktır (47).

2.2.3. Onkogenler

Onkogenler ilk kez yüksek derecede onkojenik virüslerin izolasyonu sonucu elde edilmiştir. Retroviral onkogenlerin oluşmasına öncülük eden hücresel genlere '*protoonkogen*' adı verilmiştir. Onkogenler yine tümör virüsleri ile yapılan çalışmalar da, hücreleri transforme edebildikleri gösterilerek, kanserin moleküler temelleri hakkında ilk bulguların oluşturulmasını sağlamışlardır. Protoonkogenler, genellikle hücrenin normal çoğalmasını denetleyen sinyal yollarında görev yapan genlerdir (14).

Protoonkogenler sinyal iletimini, hücresel farklılaşmayı ve hücre proliferasyonunu kontrol ederler. Sinyal iletimi karmaşık ve çok aşamalı bir şekilde hücre membranından başlayıp, sitoplazmaya ve nükleusa kadar gider. Normal hücre farklılaşması ve proliferasyonu için pozitif ve negatif feed back mekanizmalarıyla protoonkogen tiplerinin çeşitliliği önemlidir.

Protoonkogenler, protein ürünleri, temel biyolojik olayları düzenleyen ve evrim boyunca yüksek oranda korunmuş genlerdir. Protoonkogenler sinyal iletiminde 3 temel noktada görev yapar:

1. ATP'nin fosfat grubunun transferi ile proteinlerin serin, treonin ve tirozin aminoasitlerinin fosforilasyonunu sağlar. Böylece protein konfigürasyonunda değişiklik yaparak proteinin kinaz özelliğini aktive eder ve sinyal iletimini sağlayan proteinler için bağlanma bölgeleri oluştururlar.

2. RAS ailesi protoonkogenleri GDP/GTP döngüsünde aracı olarak görev yaparlar.

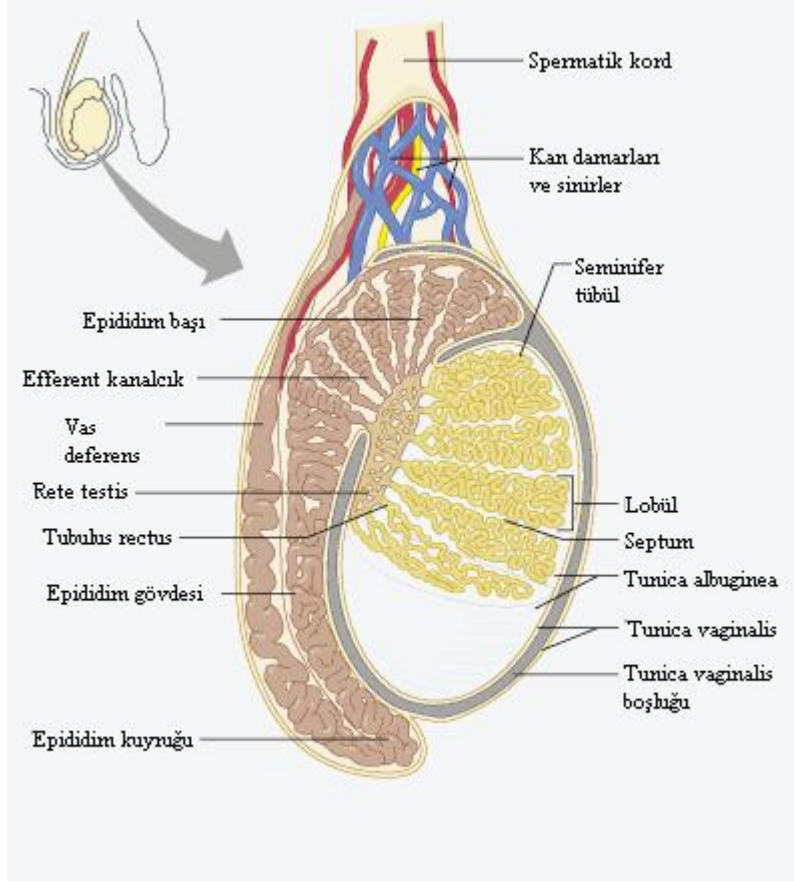
3. Nükleus içindeki proteinlerdir ve gen ekspresyonu, DNA replikasyonu ayrıca hücre döngüsünün kontrolünde görev yaparlar (33).

Onkogenler ise protoonkogenlerin anormal ya da mutant eksprese olan şekilleridir. Böylece, onkogenler artan hücre proliferasyonuna ve tümör gelişimine sebep olurlar.

2.3. Testis Histolojisi

Erkek üreme sistemi, **testisler**, genital kanallar, yardımcı bezler ve penisten oluşmuştur.

Testisler, karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak gelişirler. Her bir testis *tunica vaginalis* denen seröz bir kese taşır; bu kese peritondan gelişir. Testisin başlıca görevi; hormon ve spermatozonları üretmektir. Testis, *tunica albuginea* denilen kalın bir kollajenöz bağ dokusu kapsülü ile çevrilidir. Bu fascia örtü posteriorda testis dokusu içine bir miktar sokularak mediastinum testisi oluşturur. Burada bezin içine giren fibröz septumlar bu yapıyı testiküler lobüller denilen yaklaşık 250 adet piramidal bölmeye ayırırlar. Bu septumlar arasında çoğunlukla iletişim vardır. Her lobülde gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 seminifer tübül yer alır. Bu bağ dokusunda bol miktarda kan ve lenf damarları, sinirler ve interstisyel (Leydig) hücreler bulunur. Seminifer tübüller erkek üreme hücreleri olan spermatozonları üretirler. İnterstisyel hücreler testiküler androjenleri salgırlar (29,32,42).



Şekil 2.1. Testis Histolojisi

copyright 2001 benjamin cummings, an imprint of addison wesley longman, inc' den alınmıştır.

2.3.1. Seminifer Tübüller

Her bir seminifer tübül yaklaşık olarak 150-250 μm çapında ve 30-70 cm uzunluktadır, çok katlı bir epitel ile döşelidir. Bir testisteki tübüllerin toplam uzunluğu 250 m civarındadır.

Seminifer tübüller bir fibröz bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık bir germinal ya da seminifer epitelden oluşur.

Epitel iki tip hücreden meydana gelmektedir: Sertoli ya da destek hücreleri ile spermatogenik seriyi oluşturan hücreler. Spermatogenik seri hücreleri, bazal lamina ve

tübül lümeni arasını dolduracak 4-8 tabaka halinde düzenlenmişlerdir. Bu hücreler birkaç bölünme sonra farklılaşır ve spermatozonları oluştururlar. Bunlar erkek germ hücrelerinin sürekli farklılaşma sürecindeki çeşitli evrelerinde bulunabilirler (29,32,42).

2.3.2. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri spermatogenez serisindeki hücreleri kısmi olarak saran uzamış piramidal hücrelerdir. Bu hücrelerin tabanları bazal laminaya tutunur, apikal uçları ise sıklıkla seminifer tübülün lümenine uzanır. Sertoli hücreleri birbirlerine spermatogonyumlar seviyesinde sıkı bağlantılarla bağlanmışlardır. Bu spermatogonyumlar, içine kanda bulunan materyallerin serbestçe girebildiği bazal kompartmanda yerleşirler. Spermatogenez sırasında spermatogonyum serisi, bu bağlantılardan bir yolunu bulup geçerek adluminal kompartmana çıkarlar. Burada spermatogenezin daha ileri safhaları kandan gelen ürünlerden bir kan-testis bariyeri ile korunurlar. Bu bariyer Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar ile oluşturulur (23,29).

Sertoli hücrelerinin dört önemli fonksiyonu vardır:

-Gelişmekte olan spermatozonların desteklenmesi, korunması ve beslenmesinin düzenlenmesi

Spermatositler, spermatidler ve spermatozonlar kan testis bariyeri ile kan desteğinden izole edildiği için, bu spermatogenez hücreleri besin maddelerinin ve metabolitlerin alıp verilmesinde Sertoli hücrelerinin aracılığına muhtaçtırlar.

-Fagositoz

Spermiyogenez sırasında fazla spermatid sitoplazması artık cisimcikler şeklinde dökülür. Bu sitoplazmik parçacıklar fagosite edilir ve Sertoli hücre lizozomları tarafından yıkılırlar.

-Sekresyon

Sertoli hücreleri devamlı olarak seminifer tübüllere genital kanallar yönünde akan ve sperm transportu için kullanılan bir sıvı salgırlarlar. Androjen-bağlayıcı protein sekresyonu Sertoli hücreleri tarafından FSH ve testosteron kontrolü altında gerçekleştirilir. Bu protein, seminifer tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaşmasını sağlar. Ayrıca bu hücreler, anterior hipofiz bezinden FSH sentez ve salınmasını önleyen inhibin adı verilen bir peptid salgırlarlar (23,29).

-Anti-Müllerian Hormon Üretimi

Müllerian-inhibe edici hormon olarak da isimlendirilen bu hormon embriyonik gelişme sırasında erkek fetusta Müller kanallarının gerilemesini sağlayan bir glikoproteindir. Testosteron ise Wolf kanallarından köken alan yapıların gelişmesini sağlar (16,23).

2.3.3. İnterstisyel Doku

Testisin seminifer tübülleri arasındaki boşluklar bağ dokusu birikintileri, sinirler, kan ve lenfatik damarlarla doldurulmuştur. Bağ dokusu çeşitli tipte hücreler içerir; bunlar arasında fibroblastlar, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlar bulunur. Steroid salgılayan hücre özelliklerini gösteren bu hücreler, testisin interstisyel ya da Leydig hücreleridir. Bu hücreler, sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan testosteronu üretirler. İnterstisyel hücrelerin hem aktiviteleri ve hem de miktarları hormonal uyarımlara bağlıdır. Hormonların bulunması embriyonik farklılaşmada erkek genital organların gelişmesi için gereklidir (16,23).

2.3.4. Kan-Testis Bariyeri

Kan ile seminifer tübüllerin iç bölgesi arasında bir bariyerin bulunması testiküler sıvı içine çok az maddenin geçmesini açıklar. Erkek germ hücrelerinin kandan gelen zararlı ajanlara karşı korunmasında önemli olan bu bariyer, Sertoli hücrelerinin arasındaki tıkaçıcı bağlantılar ile oluşturulur (42).

2.3.5. Testis İçi Genital Kanallar

Testis içi genital kaynaklar tubuli rekti, rete testis ve duktuli efferentestir. Seminifer tübüllerin her iki ucu rete testise tubuli rekti olarak bilinen yapılarla bağlanır. Tubuli rekti rete testisin içine boşalır. Rete testis tunica albugineanın kalınlaşması ile oluşmuş mediastinum içinde bulunur. Rete testisten 10-20 adet duktuli efferentes çıkar. Duktuli efferentes giderek birleşip epididimisin duktus epididimisini oluşturur (29,32,42).

2.3.6. Genital Boşaltım Kanalları

Testiste üretilen spermatozoonları penil yollara doğru taşıyan duktus epididimis, duktus deferens ve uretradır.

Duktus epididimis yaklaşık 4-6 m uzunluğunda, tek ve oldukça kıvrıntılı bir tüptür. Bu kanal, çevresini saran bağ dokusu ve kan damarları ile birlikte epididimisin kuyruk ve gövdesini oluşturur.

Epididimisten duktus deferens denilen kalın müsküler duvarlı düz bir tüp devam ederek prostatik uretraya açılır. Prostata girmeden önce duktus deferens genişler ve ampulla denilen bölümü oluşturur. Ampullanın son kısmında seminal veziküller duktusa katılırlar. Bundan sonra duktus deferens prostata girer ve prostatik uretraya açılır (32,36).

2.3.7. Yardımcı Genital Bezler

Seminal veziküller, prostat bezi ve bulboüretal bezlerdir.

Seminal veziküller; uzunlukları 15 cm olan iki adet bulunan tüplerdir. Erkek üreme sistemi ile ilişkili bu bezler tarafından üretilen karbonhidratlar seminal sıvıya salgılanırlar ve sperm motilitesi için enerji kaynağı oluştururlar.

Prostat; 30-50 adet dallanmış tübüloalveolar bezin oluşturduğu bir topluluktur; bu bezlerin kanalları prostatik uretraya boşalır. Prostat prostatik sıvıyı üretir ve bu sıvı ejakülasyon sırasında itme gücü için gereklidir.

Bulboüretal bezler (Cowper bezleri); çapları 3-5 mm olan ve üretranın membranöz kısmının proksimalinde yerleşerek buraya açılan bezlerdir (32,42).

2.4. TESTİS TÜMÖRLERİ

2.4.1. İnsidans ve Mortalite

Erkeklerde tüm kanserlerin %1'ini oluşturan testis tümörleri, erişkin erkeklerde (15-40 yaş arası) en sık görülen solid organ kanseridir. Testis tümörlerinin diğer kanserlerde olduğu gibi yaşla birlikte insidansı artmamaktadır. İnsidans, etnik, sosyo-ekonomik koşullar ve coğrafya ile ilişkili değişkenlik göstermekte olup yılda 100 bin erkek nüfus için 3-6.9 yeni olgudur. Özellikle gelişmiş batı ülkelerinde son 30-40 yıldır testis tümörleri insidansı artmıştır. ABD 'de her yıl yaklaşık 100.000 erkekte 2-3 yeni olgu bildirilmektedir. Tüm primer tümörlerden %90-95'i germ hücreli tümörlerdir. Geri kalan bölümü germ hücresi içermeyen tümörleridir (Leydig hücreli, Sertoli hücreli, gonadoblastoma) (42).

1970'li yılların ortalarında tedavide sisplatin içeren kemoterapi protokollerinin kullanılmaya başlanmasıyla Amerika ve Avrupa'da mortalite belirgin olarak azalmıştır. Testis tümörleri erkek kanseri ölümlerinin %0.1'ini oluşturur. ABD'de 2005 yılında 8000 yeni testis kanseri olgusundan 400'den azının ölmesi beklenmektedir (32,42).

2.4.2. Yaş

Testis tümörü erkeklerde 45 yaş altındaki tümörlerin %17'sinden sorumlu olup, testis tümörlerinin %90'ından fazlası da bu yaş grubunda görülmektedir (30). Seminom 10 yaşından önce ve 60 yaşından sonra nadir görülmekle birlikte en çok tespit edilen histolojik tiptir. Seminomun %4-7'sini oluşturan spermatositik seminom genellikle 50 yaş üzerindeki, ortalama 65 yaştaki erkeklerde görülmektedir. Teratom ve

koryokarsinom insidansı 20-29 yaşları arasında en yüksek iken, yolk sac tümör daha çok çocuklarda görülmektedir (15,37).

2.4.3. Irk

Testis tümörü insidansı, ırklar ve etnik gruplar arasında belirgin farklılıklar göstermektedir. Beyaz ırkla aynı histoloji ve yaş dağılımı göstermesine rağmen, siyah ırkta testis tümörü gelişme riski daha düşüktür. Siyah ırktaki kadınlarda gebelik boyunca beyazlara göre daha yüksek konsantrasyonda testosteron bulunması durumunun bu fenomenle ilişkili olabileceği ifade edilmektedir (32).

2.4.4. Sosyo-Ekonomik Düzey ve Beslenme

Ganmaa ve arkadaşları testis tümör insidans ve mortalite oranları farklı toplam 42 ülkede beslenme alışkanlıklarını incelediklerinde, testis tümör insidansı ile peynir tüketiminin çok yakın ilişki gösterdiğini, bunu hayvansal yağlar ve süt tüketiminin izlediğini bulmuşlardır. *Davies ve arkadaşları* İngiltere Doğu Anglia'da süt ve süt ürünlerini testis tümörü için risk faktörü olarak inceledikleri vaka-kontrol çalışmalarında, testis tümörlü hastaların adölesan döneminde kontrollere göre önemli derecede daha fazla süt ve ürünlerini tükettiklerini tespit etmişlerdir (13).

2.4.5. Lateralite ve Bilateralite

Testis tümörü, inmemiş testis ile uyumlu olarak sağ tarafta sola göre biraz daha fazla görülmektedir. Testis tümörlerinin yaklaşık olarak %2-3'ü bilateral olup, bu tümörlerin yaklaşık %50 sinde tek ya da çift taraflı inmemiş testis öyküsü bulunmaktadır (32).

2.4.6. Histolojik Sınıflandırma

Germ hücreli tümörler

Öncül lezyonlar (intratübüler germ hücreli neplazi)

Seminom (sinsisyotrofoblastik hücreli olgular dahil)

Spermatositik seminom (sarkomatoz içerik varsa belirtilir)

Embriyonal karsinom

Yolk sac tümörü

Koryokarsinom

Teratom (matür, immatür, malign içerikli)

Birden fazla histolojik tipi olan tümörler (her tip % olarak belirtilir)

Seks kord/gonadal stromal tümörler

Leydig hücreli tümör

Malign Leydig hücreli tümör

Sertoli hücreli tümör

-Lipidden zengin tip

-Sklerozan

-Kalsifiye büyük hücreli

Malign Sertoli hücreli tümör

Granuloza hücreli tümör

-Erişkin tip

-Juvenil tip

Tekoma/fibroma grubu tümörler

Diğer seks kord/gonadal stromal tümörler

-Tam diferansiye olmamış

-Karışık

Germ hücreli ve seks kord/gonadal stromal yapıları beraber içeren tümörler

(gonadoblastoma)

Çeşitli özgül olmayan stromal tümörler

Ovaryan epitelyal tümörler

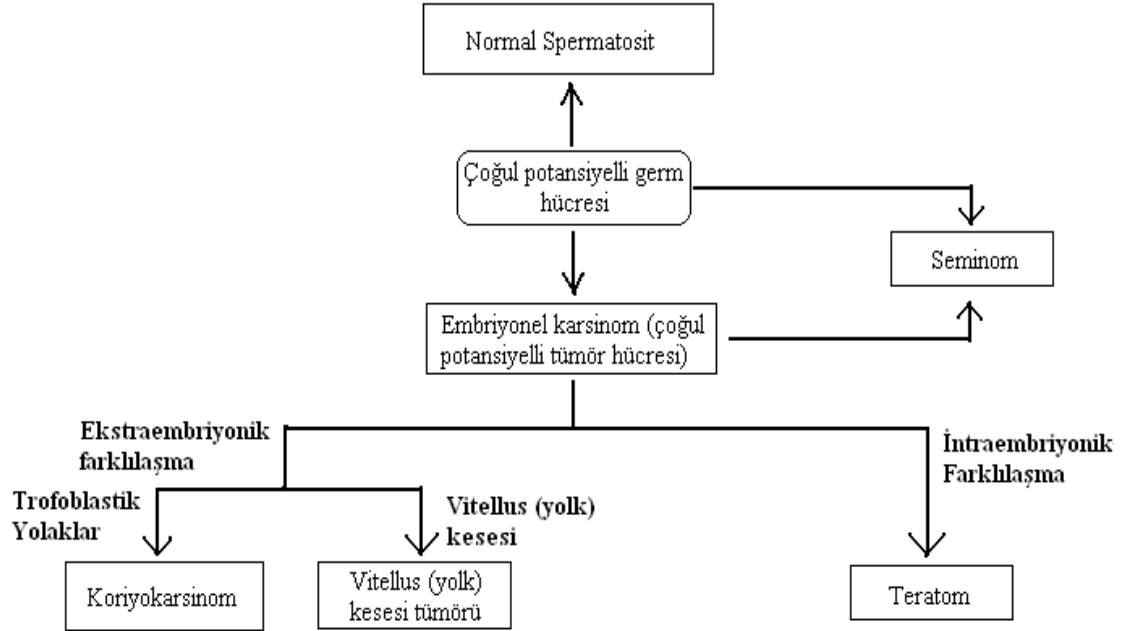
Toplayıcı duktuslar ve rete testis tümörleri

Özgül olmayan stroma tümörleri (benign veya malign) (42).

Germ hücreli tümörlerin sadece %40'ı tek bir hücre tipinden oluşurken, kalan %60 embriyonal karsinom, seminom, teratom, yolk sac tümör ve koryokarsinom elemanlarından iki ya da daha fazlasının kombinasyonu şeklindedir ve mikst germ hücreli tümörler olarak adlandırılır. Kombinasyonda en sık yer alan hücresel ögeler embriyonal karsinom (%50) ve seminomdur (%30-60) (42).

2.4.7. Germ Hücreli Tümör Gelişmesi

Embriyonal gelişim sırasında çoğul potansiyelli germ hücreleri normal gelişme yollarını izlerse spermatozitleri oluştururlar. Ancak bu çoğul potansiyelli germ hücreleri normal dışı gelişim yollarını izlerse seminom ve embriyonal karsinomlar (çoğul potansiyelli tümör hücreleri) gelişir. Bu embriyonal hücreler intraembriyonik yollarını izleyerek farklılaşmalarını sürdürürlerse teratom oluşacaktır. Embriyonal hücreler ekstraembriyonik yollarını izleyerek farklılaşmaya devam ederse koryokarsinom veya vitellus (yolk sac) kesesi tümörleri oluşacaktır (36).



Şekil 2.2. Testisin germ hücreli tümörlerinde tümörögenetik model (39).

2.5. Testis Tümörlerinin Patolojisi

ABD de en yaygın olarak kullanılan DSÖ sınıflamasıdır. Tablo 2.1 de belirtildiği gibi testisin germ hücreli tümörleri, tek bir histolojik örnek (olguların %40' ı) veya birden fazla histolojik örnek (olguların %60' ı) içermeleri göz önüne alınarak, iki ana gruba ayrılmıştır. Bu sınıflama testisin germ hücreli tümörlerinin ilkel hücrelerden geliştiği düşüncesine dayanmaktadır.

BİR HİSTOLOJİK TİP İÇEREN TÜMÖRLER
Seminim
Embriyonal karsinom
Yolk kesesi tümörü
Teratomlar
Matür
İmmatür
Somatik elemanların malign değişimi ile birlikte olanlar
ÇEŞİTLİ DİĞER NADİR ŞEKİLLER
BİRDEN FAZLA HİSTOLOJİK TİP İÇEREN TÜMÖRLER
Embriyonal karsinom ve teratom
Koryokarsinom ve diğer tipler
Diğer bileşenler

Tablo 2.1. Germ hücreli testis tümörlerinin sınıflaması (29)

2.6. Testis Tümörü ve Genetik

Çeşitli nedenlerden dolayı kromozomlardaki tekrarlanan kazanım ve kayıplar, hem tümör supressör genlerin inaktivasyonuna hem de proto-onkogenlerin aktivasyonuna yol açarak tümör gelişiminde rol oynayabilmektedirler.

2.6.1. Tümör Süpresör Gen P53 ve Testis Tümörleri

P53'ün esas fonksiyonu hücre DNA'sı radyasyon ve ilaçlar gibi faktörler nedeniyle hasarlandığı zaman, hücre siklusunu ve proliferasyonunu durdurup, hücrenin hasarlanmış DNA'sını tamir etmesi için ona zaman kazandırmasıdır. Bu yüzden gen koruyucusu olarak da tanımlanır. Tümör süpresör gen olan P53; kromozom 17 nin kısa kolu üzerinde (17p13) bulunan bir gendir. Bu genden sentezlenen proteinin normal formu hücre siklusunu ekspolipeptid yani tetramer yapıda ve 53kDa molekül ağırlığı (393 aminoasit) olan P53 proteini DNA'da transkripsiyon faktörlerinin faaliyeti için ilgili genin promotor bölgesine bağlanmaktadır. Bu bölge hücre bölünmesinin G1/S fazları arasındaki geçiş dönemini kontrol eder. P53 geninde ve dolayısıyla proteininde oluşacak bir mutasyon sonucunda G1 hazırlık dönemi tamamlanmadan S fazına geçiş olmaktadır. Diğer bir ifadeyle, kromozom yapılıması tamamlanmadan replikasyon başlatılır. Özet olarak P53 geninin görevi; hücre DNA'sı hasarlandığı zaman (radyasyon, ilaç vs.) hücre siklusunu ve proliferasyonunu durdurup, hücrenin hasarlanmış DNA'sını tamir etmesi için ona zaman kazandırmaktır. Fakat hasar tamir edilemeyecek kadar büyükse P53 geni hücreyi apoptozise götürür (32).

P53, kanser hastalarında mutasyonu en sık görülen proteindir ve kanserlerin %50-55'inde mutanttır. Normalde P53, bir siklin bağımlı kinaz inhibitörü (CKI) olan P21'in sentezini artırarak proliferasyonunu bloke eder. P21, siklin-siklin bağımlı kinaz (CDK) kompleksine bağlanarak inaktive eder. Böylece, bu kompleks pRb'yi fosforile edemeyeceğinden ve E2F ailesi de pRb'den ayrılamayacağından dolayı siklus ilerietici işlevini yerine getiremez ve sonuçta hücre siklusu G1 durur. Hücre siklusunun durması hücreye zaman kazandırır ve hücre hasarlanmış DNA'sını tamir eder. Hasar tamir edilemeyecek kadar büyükse bu kez P53 hücreyi apoptozise götürür. P53'ün apoptozisi

indüklemesi Bax'ın ekspresyonunu artırarak Bcl-2/Bax oranını değiştirmesi yoluyla gerçekleşir.

Testiküler tümörlerde P53'n rolü yoğun bir şekilde araştırılmıştır. Bu çalışmalarla testiküler tümörlerin çoğunda wild tip P53 aşırı miktarda eksprese edilmesine rağmen, tümöral hücrelerin P53'e bağlı apoptozise karşı gelebilmesi dikkat çekici bir sonuçtur . *Lutzker ve arkadaşları* teratomda relatif olarak yüksek wild tip protein seviyesine karşın, bazal p53 aktivitesinin çok düşük olduğunu tespit ederek non-fonksiyonel p53 proteini nedeniyle apoptozisin gerçekleşmediğini vurgulamışlardır. Etoposid gibi sitotoksik ajanlar endojen hücresel p53' aktive ederek indirekt olarak DNA hasarı meydana getirmektedirler (19,32).

Germ hücre tümörlerinin moleküler biolojisine bakıldığında; iki major teori dikkat çekmiştir. Bunlardan ilk teoriyi savunanlar *Chaganti ve Houldsworth* olmuştur. Transformasyon için hedef hücrenin rekombinasyon kontrol noktası olarak belirlenen zigoten-pakiten spermatozoid olduğunu kabul etmişlerdir. Bu aşamada replike olmuş DNA ve yeniden düzenlenmiş P53 vardır. Yeniden düzenlenmiş P53 fazın uzamasına ve rekombinasyona imkan vermektedir (36).

Eğer zlmemişse; DNA zincir kırılması meydana gelir ve artmış wild-tip P53 apoptotik tetiğini çekmektedir. Bu modelde, crossing over ile ilişkili artmış kromatid değişimi olayları 12p kopya sayısı yükselmesine neden olabilir. Muhtemelen Siklin D2'nin onkogenik etkisinin eşliğinde , aşırı derecede farklılaşmış , genomik açıdan stabil olmayan şimdi neoplastik olan hücre P53'n apoptotik etkilerinden kaçabiliyor ve tekrardan hücre döngüsüne girebilmektedir (36).

İkinci ve daha geri şekilde kabul edilen hipotez *Skakkebaek ve arkadaşları* tarafından ortaya atılmıştır. Bu model fetal gonositlerin (primordial germ hücreleri) oğunlukla in utero çevresel şartlara bağlı anormal hücre bölünmesine gidebileceğini ve IGHN'ye sebep olabileceğini önermektedirler. Poliploidizasyon i(12p) oluşumunu çabuklaştırır. Bu hücreler postnatal ve pubertal gonadotropin stimülasyonuna açık hale gelir ve invaziv tümör geliştirebilir (36).

2.6.2. Serin/treonin kinaz 11 ve Testis Tümörleri

Kromozom 19p13.3 bölgesinde bulunur. Serin /treonin kinaz ailesinin bir üyesini kodlayan bu gen, hücre polaritesini düzenler ve tümör süpresör gen vazifesi görür. Bu gendeki mutasyonlar gastrointestinal kanalda poliplerin büyümesi , cilt ve ağızda pigmentli makül ve diğer neoplazmlarla karakterize otozomal dominant kalıtılan Peutz-Jeghers Sendromu ile ilişkilendirilmiştir. Genin alternatif splicing varyantları gözlenmiş ancak tam olarak tanımlanamamıştır.

Testiküler tümörlerde yapılan bazı çalışmalarda yumurtalık sex kord- stromal tümörlerinde 19p13.3 bölgesinde heterozigosite kaybı olduğunu göstermişlerdir. Bu genin dağınık sex kord-stromal tümörleri patogenezi ile ilgili olmadığı görülmüştür. Heterozigosite kaybı bu kromozomal bölgedeki diğer gen değişimlerini göstermektedir. Bu bulgular CGH yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmayla tezatlık oluşturmuş ve 19 ve 19p artışı ispat edilmiştir (43).

2.6.3. Cyclin-Bağımlı Kinaz İnhibitör 2A ve Testis Tümörleri

Hücre siklusu, çoğalmak üzere uyarılmış bir hücrede gerçekleşen ve bir dizi geçici biyokimyasal aktivitelerin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü bir süreç olup, hücre proliferasyonu hücre siklusu içinde yer alan bazı kontrol noktaları tarafından düzenli olarak kontrol edilmektedir. Hücre siklusu, siklusa özgü birtakım proteinler olan siklinler, siklin bağımlı kinaz (CDK) ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) tarafından özgün olarak kontrol edilir. CDK'lar normalde inaktif olup sikline bağlandıklarında aktifleşirler. Bunun sonucunda aktif siklin-CDK kompleksleri meydana gelir. Siklinler bu komplekslerin regülatör subünitelerini oluştururken, CDK'lar ise katalitik subünitelerini meydana getirir. Siklinler (A, B1, D ve E) siklusun çeşitli fazlarında periyodik olarak bir taraftan sentez edilirlerken diğer taraftan da yıkılırlar. Siklinlerin yapım ve yıkımları, ilişkide buldukları CDK'ların (CDK2, CDK4, CDK 5, CDK 6, CDK7 ve CDK25) aktivitelerinin düzenlenmesini sağlar. CDK'ların aktiviteleri siklinler dışında özgün fosforilasyon/defosforilasyona yol açan

başka yollarla da düzenlenir. CDI'ler ise ya siklinlere, ya CDK'ların kendisine ya da siklin-CDK komplekslerine bağlanarak CDK'ların aktivitelerini inhibe eder.

D tip siklinler (D1, D2, D3) başlama siklinleri olup büyüme faktörleri veya mitojenlere yanıt olarak eksprese edilir. Mitojenler ortamdaki uzaklaştırıldığında ise hızla yıkılırlar.

Siklin D2 geni testiküler gelişim ile birlikte germ hücreli tümörlerin patogeneğinde de önemli yer tutmaktadır. Siklin D2'nin hücre proliferasyonunda önemli rollerinden dolayı, ekspresyonları sıkı kontrol altındadır. Siklin D2 , CDK4 veya CDK6 ile birleşerek aktif enzim kompleksi oluşturur ve siklusun G1-S kontrol noktasının aşılmasını sağlar. Siklin D2'nin hücre proliferasyonundaki önemli rollerinden dolayı, siklus boyunca ekspresyonları sıkı kontrol altındadır. Siklin D2 geni 12. kromozomun kısa kolu üzerinde bulunur. Bu gen germ hücreli testis tümörlerinde sıklıkla amplifiye olup mRNA düzeyi de yükselmiştir. Siklin D2 ekspresyonunun artması siklus kontrolünün muhtemel deregulasyonuna neden olmaktadır. Siklin A1 ekspresyonunun agresif tümörlerde artması tümör gelişiminde rolü olabileceğini düşündürmektedir. CDI, aktif siklin CDK kompleksini negatif regüle etmekte olup, aktivitelerinin azalması çeşitli kanserlerle yakından ilişkilidir. CDI oldukça geniş bir grup oluşturmakla birlikte özellikle 4 grup (P15 INK, P16 INK, P18 INK ve P19 INK) testiküler sistem için önemli bir yer tutmaktadır. P19 INK4D spermatozoidlerde oldukça yüksek oranda eksprese edilirken, fetal germ hücrelerinde, CIS'da invazif germ hücreli tümörde eksprese edilmemektedir. P18 INK4C CIS'da eksprese edilirken, seminom ve embriyonal karsinomda eksprese edilmemektedir (5,30,32,46,50).

2.6.4. Androjen Reseptör Geni (AR-gen) ve Testis Tümörleri

Androjen hücre içine girince önce androjen reseptöre bağlanır. AR'leri glukokortikoidler, mineralokortikoidler, tiroid hormonu, retinol, östrojen ve progesteron gibi steroid hormon reseptörleri ailesine aittir. Bu bölgeler DNA'daki spesifik bölgelerine bağlanırlar ve mRNA sentezi böylece başlamış olur.

Androjen reseptörü bir yandan kendine spesifik geni aktive ederken, diğer yandan AR yapan geni de aktive eder. Androjen seviyesi artar fakat AR seviyesi azalmaz, sabit kalır.

Androjen reseptörünü kodlayan genler X kromozomu üzerinde bulunmaktadır. Parasentromerik bölgede uzun kol üzerinde q11-q13 aralığında bulunur. Erkeklerde tek X kromozomu bulunduğu için bu genden tek bir allel üzerinde lokalize sadece bir tek kopya mevcuttur.

AR'ünü kodlayan gen üzerinde 8 adet ekson bulunmaktadır. Ekson kısımları genin AR proteinlerinin sentez edildiği kısımlardır. Burada mRNA transkripsiyonu gerçekleştirilir, mRNA'lar sayesinde de aminoasitler birleştirilerek protein sentezi için translasyon gerçekleşir.

AR'ün DNA'ya bağlanan kısmı 72aa' den meydana gelmiştir ve tüm reseptörün %10'unu oluşturur. AR'ünün bağlandığı DNA kısmı androjenlere özel protein sentezlettikleri için androjen sorumlu elementler (ASE) adını alırlar ve genin uyarılması için emir alırlar. Eğer bu bölgede bir mutasyon meydana gelirse reseptör androjene duyarlı genleri aktive edemez ve neticede kalıtsal sendromların ortaya çıkmasına neden olurlar.

Testiküler germ hücre tümörlerinde, X kopya sayısı değişmesi sık rastlanan aberasyondur. Yapılan çalışmalarda ispatlanmıştır (21,43,44,45).

2.6.5. P16 Tumor Süpresör Geni ve Testis Tümörleri

En az üç farklı protein kodlayan alternatif kesilmiş varyantları tanımlanmıştır. Bunların ikisi yapısal olarak ilişkili izoformlardır ve CDK4 kinaz inhibitörü rolü oynar. Bu ARF ürünü, P53'ün degradasyonundan sorumlu bir protein olan MDM1 ile etkileşip onu ayırmak suretiyle tümör süpresör P53 proteininin stabilizasyonunda görev alır. Yapısal ve fonksiyonel değişikliklerin yanında bu gen tarafından CDK inhibitör izoformları ve ARF gen ürünü CDK4 ve P53'ün hücre siklusunda G1 sürecindeki düzenleyici rolleri nedeniyle, hücre döngüsünün G1 kontrolünde ortak bir fonksiyonalitye sahiptir. Bu gen tümörlerin çoğunda mutasyona ya da delesyona uğrar ve önemli bir tümör süpresör gen olarak bilinir.

Testiküler tümörlerde,yapılan çalışmalarda CGH yöntemi ile ispatlanmış fakat P53 ve P16 tümör süpresör genleri arasındaki ilişki bu tümörlerde tam olarak açığa çıkarılamamıştır.

2.7. Floresan In Situ Hibridizasyon

Moleküler sitogenetik, işaretli DNA problemleri kullanılarak interfaz veya metafazdaki kromatin ve kromozomların mikroskopik analizi olarak tanımlanabilir. Bu yaklaşım, mitotik hücrelerin standart mikroskopik preparatlarında, denatüre edilmiş kromozomal DNA ile tek dallı DNA dizilerinin (prob) uygun koşullarda birleşebildiğinin gözlenmesi ile ortaya çıkmıştır (2,3,4).

İn Situ Hibridizasyon (ISH) tekniği spesifik DNA ve RNA sekanslarının doku kesitlerindeki her hücrede, kromozom preparasyonlarında veya interfaz nükleuslarında morfolojik olarak gösterilmesini ve nükleik asitlerin doğal hücre ortamında incelenmesini sağlayan, doku/hücre arkitektinin bozulmadığı bir tekniktir (4).

Non-İzotopik İn Situ Hibridizasyon (NISH), radyoaktif olmayan bir molekül ile kimyasal olarak modifiye edilen DNA problemlerinin immunolojik veya afinite reaksiyonları ile floresan veya enzimatik olarak görüntülendiği bir ISH tekniğidir (3).

FISH ise probun haptenlerle ya da florokromlarla işaretlenip florokrom maddelerle görüntülenmesinden oluşan, floresan veren sinyaller ile değerlendirilmenin yapıldığı bir ISH tekniğidir (3).

İlk kez 1969 yılında Gall ve Pardeu tarafından gerçekleştirilen sitolojik preparatlarda RNA'nın DNA ile hibridizasyonu, işaretlenmiş DNA sekanslarının sitolojik preparatlarda lokalize olduklarını göstermişlerdir. Büyümekte olan hücrelere tritium verilmiş ve işaretli nükleik asitler nükleer emülsiyon aracılığı ile belirlenmiştir (6).

İlk önceleri ISH radyoaktif madde kullanılarak uygulamaya konulmuştur. Radyoaktif maddelerin pahalı olması, yarı ömürleri, özellikle toksik etkisi ve uzaklaştırılması gibi zorluklardan dolayı bu yöntemin ilk dönemlerde kullanım alanı azalmıştır. 1970 lerde gelişen moleküler klonlama teknikleri, 1975 te biotin-avidin sisteminin bulunması, hapten molekülleri ile işaretlenmiş olan problemlerin florokrom enzim veya koloidal altın gibi aracı moleküllerle belirgin hale getirilmesini sağlamıştır. Tekniğin rezolüsyonu ve güvenilirliğini etkilemiştir. Biotinin yanı sıra digoxigenin ve florescein ile işaretleme, farklı florokrom moleküllerin birlikte kullanılması ikili ve üçlü işaretleme için olanak vermiştir. 1986 da non-radyoaktif işaretli problemler kullanılarak FISH yöntemi ortaya çıkmıştır (3).

2.7.1. FISH Tekniğinde Kullanılan Problemler ve Özellikleri

FISH tekniğinin uygulamasında en önemli ve ilk basamak prob seçimidir. Kullanılacak probun incelenecek materyale, değerlendirilecek anomali tipine ve bölgesine uygun olması gerekir .

Prob; örneklerde aranan genetik materyale (DNA veya RNA) komplementer, radyoaktif veya nonradyoaktif madde ile işaretli DNA veya RNA segmentidir. Probu

hangi yöntemle işaretlendiği, uzunluğu, RNA veya DNA kaynaklı olması, tek veya çift sarmallı olması spesifik olmayan sinyalleri arttırabilir (2).

FISH tekniğinde sitogenetik alanda kullanılan başlıca problemler şunlardır;

- Tekrarlayan dizi problemleri (satellit problemleri)
- Lokusa özgü problemler
- Tüm kromozomu boyayan problemler
- Banda özgü problemler
- Telomer bölgesine özgü problemler

2.7.2. FISH Tekniğinin Temel Mekanizması

FISH prosedürü 6 aşamada gerçekleştirilir;

1. Preparatların Hazırlanması
2. Preparatların Ön Yıkaması
3. Prob ve Hedef DNA Denatürasyonu
4. Prob ve Hedef DNA Hibridizasyonu
5. Hibridizasyon sonrası Yıkamalar
6. Görüntüleme ve İnceleme

Moleküler hibridizasyona dayalı bütün yöntemlerin (Southern blotting, Northern blotting, PCR, ISH) ana mekanizması iki komplementer daldan çift sarmal yapının oluşmasıdır. DNA-DNA hibridizasyonunda prob ve hedef DNA ların denatürasyonunu takiben oluşan DNA fragment karışımı, tek dal halindeki fragmentlerin tekrar birleşmesini sağlayacak koşullarda gerçekleştirilir (3).

Bu koşullarda etkili olan dört parametre vardır;

1. Isı
2. pH
3. Monovalent katyon konsantrasyonu
4. Organik solvent varlığı

Hibridizasyonda üç temel aşama önemlidir;

- 1-Hedef dizilerin hibridizasyon sırasında geçirgenliklerini korumaları,
- 2-Probla hedefin yüksek etkinlikle birbirlerine bağlanması,
- 3-Hibridizasyonun spesifik aktivitesi yüksek bir reporter ile en az zemin sinyali olacak biçimde en parlak şekilde görüntülenmesidir (3).

Bir hibridizasyon reaksiyonunda tolere edilebilen yanlış eşleşme derecesi 'stringency' olarak ifade edilir. Yüksek stringency koşullarında, sadece hedef sekansla tam homolog olan probler stabil hibridler oluştururlar. Düşük stringency koşullarında ise prob sadece % 70–90 homoloji gösteren sekanslara bağlanabilir. Bu spesifik olmayan sinyaller, hibridizasyon sonrası yıkamalarda yüksek stringency koşullarının (yüksek ısı + düşük tuz konsantrasyonu) sağlanmasıyla ortamdaki uzaklaştırılır.

FISH sonrası problemlerden elde edilen sinyaller epifloresan mikroskopta incelenirler. Kullanılan florokromların gözlenebilmesi için doğru prob setleri ve uygun filtrelerin seçilmesi gerekmektedir. Birden fazla hedef dizinin görüntülenmesi gerektiğinde doğru filtreler ile yeşil, kırmızı ve mavi florokromlar gözlenebilmektedir (3,4).

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Gereçler

Buzdolabı (Arçelik 415)

Cam kalemi

Deep-Freeze (Heraeus)

Elektronik Terazi (Seuter, Ainworth-AA-250, Setra-M2000L)

Ependorf tüpü (1,5 ml lik)

Enjektör

Etüv (Friocell MMM Med Center)

Floresan Mikroskop (Olympus BX-61)

Image Analyser (Applied Imaging)

Kronometre

Mikropipet (Eppendorf)

Mikrosantrifüj (Eppendorf Centrifuge 5415)

Sensys Kamera (Sensys)

Su Banyosu (Nüve)

Vortex (Janke and Kunkel, UF-2)

pH Metre (Jenco)

Pipet uçları

Termometre

3.1.2. Cam Malzeme

Beher (500 ml, 1000 ml)
Erlenmayer (500 ml, 1000 ml)
Lamel
Mezür
Yatay ve dikey Şale

3.1.3. Kimyasal Maddeler

Absolü Alkol (Merck)
Antifade (Vector)
DAPI (Sigma)
Distile Su
HCl (Merck)
Immersion yağı (Merck)
Ksilol (Merck)
 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Carlo Erba)
NaCl (Merck)
NaOH (Merck)
Pepsin (Sigma)
Parafilm
Rubber Cement (Marabu Fixo gum)
Sitrik asit (Sigma)
Tween 20 (Sigma)

3.1.4. Kullanılan problemler

LSI 19q13/19p13 Dual Color Prob (Vysis 32-231004)
LSI P53 Spectrum Orange Prob (17p13.1) (Vysis 32-190008)

LSI P16 (9p21) Spectrum Orange/Cep9 Spectrum Green Probe Set(9p21,9p11-q11) (Vysis 32-190078)

TelVysion 12p Spectrum Green (Vysis 33-252012)

LSI Androgen Receptor Gene (Xq12) Spectrum Orange Probe (Xq11.2-Xq12) (Vysis 32-190040)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Materyal Seçimi

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Üroloji Anabilim dalında testis tümörü tanısı almış ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Patoloji Anabilim dalında histopatolojik olarak incelenen 30 olgu çalışmaya alınmıştır. Her hastaya ait doku örneklerinden kanser dokusu içeren 4 mikronluk kesitler pozitif şarjlı lamlara tespit edilerek deparafinize olarak her olguya ilişkin farklı 5 prob için 5 farklı kesite FISH analizi yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.2.2. FISH yönteminin uygulanması

Tablo 3.2. Preparatların Ön Yıkama Solüsyonları

<u>20XSSC Solüsyonu</u>	
NaCl (3 M)	175,3 gr
Tri Sodyum Sitrat (0,3 M)	88,24 gr
Distile su	1000 ml

<u>0,1XSSC Solüsyonu</u>	
20XSSC	3 ml
Distile su	597 ml

Tüm solüsyonlar HCl ile pH 7.0 a ayarlanır.

Tablo 3.3. Preparatların Denatürasyon Solüsyonu

<u>0,07 M NaOH</u>	
1M NaOH	14 ml
Distile su	200 ml

Tablo 3.4. Hibridizasyon Sonrası Solüsyonlar

<u>1XSSC Solüsyonu</u>	
20XSSC	10 ml
Distile su	190 ml

<u>2XSSC Solüsyonu</u>	
20XSSC	20 ml
Distile su	180 ml

<u>2XSSC/Tween-20 Solüsyonu</u>	
20XSSC	20 ml
Tween 20	100 µl
Distile su	180 ml

Tüm solüsyonlar HCl ile pH 7.0 a ayarlanır.	
---	--

Tablo 3.5. Görüntüleme Sistemleri Solüsyonu

<u>DAPI/Antifade Solüsyonu</u>	
2XSSC	20 ml
DAPI	100 µl
Distile su	80 ml

3.2.2.1. Preparatların ön yıkaması ve denatürasyonu

- Preparatlar 1'er dakika olmak üzere sırasıyla % 100-%70-%50-%30 luk alkol serisinden ve 0.1XSSC solüsyonundan geçirilerek dehidre edilmiştir.
- Dehidratasyon sonrası preparatlar 70 °C deki 2XSSC solüsyonunda 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- İçerisinde preparatların bulunduğu 2XSSC solüsyonu içeren şale soğuk su içerisine konulmuş ve solüsyon ısısının 37°C'ye gelmesi sağlanmıştır.
- Sıcaklığı 37 °C'ye düşen 2XSSC içerisindeki preparatlar oda sıcaklığında bulunan 0.07 M lık NaOH solüsyonuna alınmış ve denatüre edilmiştir.
- Denatürasyonu takiben oda sıcaklığında bulunan 0,1XSSC ve ardından +4 °C'de olan 0,1XSSC ve 2XSSC solüsyonlarında 1'er dakika bekletilerek dehidratasyon ile ön yıkama tamamlanmıştır. Dehidratasyon, preparatların sırasıyla %30-%50-%70-%100'lük alkollerde 1'er dakika tutularak gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.2. Prob denatürasyonu

- Problar 5 dakika 74 °C de bekletilerek denatüre edilmiştir.

3.2.2.3. Hibridizasyon

- Çalışmada kullanılan problar santrifüj edilerek tüm probun dibe çökmesi sağlanmıştır.
- Denatüre edilen preparatlarda belirlenen alanlara prob (5 µl) eklenmiş ve üzerlerine 24mm lik lamel kapatılmıştır.
- Lamel çevresi su girmemesi için rubber sement ile yalıtılmıştır.

- Preparatlar 37 °C de bir gece nemli ortamda hibridizasyona bırakılmıştır.

3.2.2.4. Hibridizasyon sonrası yıkamalar

Bu yıkamalarda spesifik olarak bağlanmayan prob DNA sının ortamdaki uzaklaştırılması ve olgu DNA sına tam komplementer olan (% 80–100) dizilerin hedef bölgede sabit hale getirilmesi amaçlanmaktadır. Aşamaları:

-Hibridizasyonu tamamlanan preparatlar etüvden çıkartılarak lamellerin çevresindeki yalıtım maddesi dikkatlice temizlenmiştir.

- Preparatlar, oda ısısındaki 2XSSC solüsyonunda hafifçe karıştırılarak lameller preparatlardan uzaklaştırılmıştır.

- Preparatlar 1XSSC solüsyonu ile 74 °C de 5 dakika yıkanmıştır.

- Sonrasında 2XSSC/Tween–20 solüsyonunda 5 dakika yıkanmıştır.

- Hibridizasyon sonrası yıkaması yapılan preparatlar 4XSSC/DAPI solüsyonunda 2 dakika bekletilmiştir.

- Preparatların üzerine 15 µl antifade eklenerek lamel ile kapatılmıştır.

- İnceleme aşamasına kadar -20 °C’ de saklanmıştır.

3.2.2.5. Preparatların mikroskopta incelenmesi

Preparatlar Olympus BX-61 Floresan mikroskobunda uygun filtreler kullanılarak incelenmiştir. Floresan mikroskoba bağlı bilgisayar sistemi (Applied Imaging) ile sinyaller değerlendirilerek Sensys kamera aracılığıyla FISH sinyalleri içeren nükleuslar analiz edilmiş ve fotoğraflanmıştır.

3.2.2.6. Değerlendirme

Testis tümörü tanısı almış her örneğe yapılan FISH analizinde her prob için 45-170 hücre değerlendirilmiştir. Her hücre için hedef gene ve bu genin lokalize olduğu kromozom sentromerine ait sinyaller sayılmıştır. Değerlendirme ; kullanılan tüm hedef gen ve sentromer bölge problemlerinin cut off değerlerine göre yapılmıştır. Hücrelerin %2 sinde > 2 kopya bulunması durumunda amplifikasyon (+), % 7 sinde <1 kopya bulunması durumunda delesyon (-) ve 12p artışı hücrelerde 12p/12 sentromerik oranının 1.63 > olması durumunda pozitif olarak değerlendirilmiştir (25).

4. BULGULAR

Çalışmamız 1995-2006 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Üroloji Anabilim Dalı'nda testis tümörü tanısı almış ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı'nda histopatoloji ile tanısı konmuş ve evrelendirilmesi yapılmış 30 testis tümörü örneği, seçilen beş farklı kromozom bölgesi için FISH analizi ile değerlendirilmiştir.

İncelemeye alınan testis tümörü örneklerine sahip 30 olgunun yaş ortalaması 29.5 (18-53) olarak tespit edilmiştir. Olgularımızın 10 unda seminom, 20 sinde ise non-seminomatöz germ hücreli tümör belirlenmiştir.

Olgularımızın yaş, klinik evre ve testis tümörü tipine ait bilgiler Tablo 4.1 de verilmiştir.

Tablo 4.1. Olguların yaş,klinik evre ve tümör tipine ait bilgiler

Hasta No	Yaş	Klinik Evre	Testis Tümör Tipi
01	38	T2N0M0S1	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
02	28	T2N0M0S1	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
03	26	T2N0M0S1	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
04	28	T2N0M0S1	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
05	29	T1N2bM0S1	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
06	29	T1N0M0S1	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
07	50	T2N0M0S0	Seminim
08	47	T1N0M0S0	Seminim
09	27	T1N0M0S0	Seminim
10	18	T1N2bM0S1	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
11	32	T2N0M0S1	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
12	33	T1N0M0S1	Seminim
13	40	T2N0M0S1	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
14	53	T1N0M0S1	Seminim
15	20	T1N0M0S0	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
16	21	T2NxM0	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
17	20	T2N0M0S1	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
18	33	T1N0M0S0	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
19	27	T1N0M0S1	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
20	25	T1N0M0S1	Seminim
21	26	T2NxMx	Seminim
22	26	T1N0M0S0	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
23	30	T1N0M0S1	Seminim
24	28	T2N0M0	Seminim

Tablo 4.1. Olguların yaş,klinik evre ve tümör tipine ait bilgiler

Hasta No	Yaş	Klinik Evre	Testis Tümör Tipi
25	34	T2N0M0S0	Seminom
26	24	T1N2M1bS0	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
27	19	T2N0M0S0	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
28	27	T2N0M0S1	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
29	26	T1N0M0S0	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
30	21	T2N0M0S0	Non-seminomatöz germ hücreli tümör

4.1. Yöntem ve Değerlendirmeye İlişkin Bulgular

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı'nda her hastaya ait doku örneklerinden kanser dokusu içeren 4 mikronluk kesitler pozitif şarjlı lamlara tespit edilmiş ve deparafinizasyon işlemine tabi tutulmuş ve FISH analizi uygulamasına hazır halde laboratuvarımıza ulaştırılmıştır. Doku örnekleri floresan işaretli problarla hibridize edilmiştir. Hibridizasyon sonrası P53, Androjen Reseptör Gen, Siklin D2, STK-11 ve P16 gen bölgelerine özgü hazırlanan problardan alınan sinyaller analiz edilmiştir. Analiz edilen 30 olgunun tümünden sonuç alınmıştır. Çalışmamızın başarı oranı %100 olarak saptanmıştır.

Çalışmamızda her olguda beş farklı FISH probuna ilişkin değerlendirmede prob başına 45-170 hücre analiz edilmiştir. Analiz edilen hücre sayısı, doku ve görüntü kalitesine bağlı olarak değişiklik göstermiştir.

4.2. Klinik Evreleri Bilinen ve Tiplendirilmesi Yapılan Olguların FISH Analiz Bulguları

Çalışmamızda 30 olgu 5 parametre açısından FISH analizi ile değerlendirilmeye alınmış ve 6 olguda herhangi bir anomaliye rastlanmamıştır. Olguların 24 ünde ise FISH analizi ile tespit edilen en az bir anomaliye rastlanmıştır. Tablo 4.2. de P53, AR, İzo12p, 19p13 ve 9p21 gen bölgesi anomalileri görülme sıklığı verilmiştir.

Tablo 4.2. Tüm Parametrelerin Görülme Sıklığı

SAYI	P53del	Xq11.12amp	İzo12p	19p13del	9p21del	Klinik Evre	Testis Tümör Tipi
01	Poz	Poz	Neg	Neg	Poz	T2N0M0S1	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
02	Neg	Neg	Neg	Neg	Poz	T2N0M0S1	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
03	Neg	Poz	Poz	Neg	Neg	T2N0M0S1	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
04	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	T2N0M0S1	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
05	Neg	Poz	Poz	Neg	Poz	T1N2bM0S1	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
06	Poz	Neg	Neg	Neg	Poz	T1N0M0S1	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
07	Poz	Neg	Neg	Neg	Poz	T2N0M0S0	Seminom
08	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	T1N0M0S0	Seminom
09	Neg	Neg	Poz	Neg	Poz	T1N0M0S0	Seminom
10	Neg	Neg	Poz	Neg	Neg	T1N2bM0S1	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
11	Neg	Neg	Poz	Poz	Poz	T2N0M0S1	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
12	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	T1N0M0S1	Seminom
Tablo 4.2. Tüm Parametrelerin Görülme Sıklığı							
SAYI	P53del	Xq11.12amp	İzo12p	19p13del	9p21del	Klinik Evre	Testis Tümör Tipi
14	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	T1N0M0S1	Seminom
15	Neg	Neg	Poz	Neg	Poz	T1N0M0S0	Non-seminomatöz germ hücreli tümör

16	Neg	Poz	Poz	Neg	Neg	T2NxM0	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
17	Neg	Neg	Poz	Neg	Neg	T2N0M0S1	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
18	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	T1N0M0S0	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
19	Poz	Poz	Poz	Neg	Neg	T1N0M0S1	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
20	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	T1N0M0S1	Seminom
21	Neg	Poz	Poz	Neg	Poz	T2NxMx	Seminom
22	Neg	Poz	Neg	Neg	Neg	T1N0M0S0	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
23	Neg	Neg	Poz	Poz	Neg	T1N0M0S1	Seminom
24	Neg	Poz	Poz	Neg	Neg	T2N0M0	Seminom

Tablo.4.2 Tüm Parametrelerin Görülme Sıklığı

SAYI	P53del	Xq11.12amp	İzo12p	19p13del	9p21del	Klinik Evre	Testis Tümör Tipi
25	Neg	Poz	Neg	Neg	Neg	T2N0M0S0	Seminom
26	Neg	Neg	Neg	Poz	Poz	T1N2M1bS0	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
27	Poz	Neg	Poz	Neg	Poz	T2N0M0S0	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
28	Neg	Poz	Neg	Neg	Neg	T2N0M0S1	Non-seminomatöz germ hücreli tümör
	Poz	Neg	Poz	Neg	Neg	T1N0M0S0	Non-seminomatöz

29							germ hücreli tümör
30	Poz	Neg	Poz	Neg	Poz	T2N0M0S0	Non-seminomatöz germ hücreli tümör

4.2.1. P53 Gen Bölgesine Ait Anomaliler

P53 delesyonları çalışma grubumuzda diğer gen bölge anomalilerine göre daha az oranda tespit edilmiştir. Olguların %23.3 ünde (7/30) P53 gen bölgesi delesyonları gözlenmiştir. P53 delesyonu olgularda izole anomali olarak görülmeyip olguların %16.6 sında (5/30) aynı zamanda P16 gen bölgesi delesyonu birlikteliğiyle saptanmıştır. P53 ve P16 gen bölge delesyonlarının beraber saptandığı olguların tümör tiplerinde de benzerlik saptanmış olup bu olguların 4 üne non-seminomatöz, 1 ine ise seminom tanısı konmuştur.

4.2.2. Androjen Reseptör Gen Bölgesine Ait Anomaliler

Androjen Reseptör gen bölgesine (Xq11.12) ait amplifikasyon olgularımızın %36.6 sında (11/30) saptanmıştır. Çalışmamızda Xq11.12 amplifikasyonları izole anomali olarak 2 olguda karşımıza çıkmaktadır. Olgu grubumuzun %23.3 ünde androjen reseptör amplifikasyonuna, izokromozom 12p ve 12p amplifikasyonu anomalilerinin eşlik ettiği tespit edilmiştir. İki olguda ise androjen reseptör amplifikasyonu, izokromozom 12p ve P16 gen bölgesi delesyonu birlikteliği saptanmıştır. Amplifikasyon saptanan olguların 8 inin non-seminomatöz germ hücreli tümör, 3 ünün ise seminom özellikte olduğu bildirilmiştir.

4.2.3. İzokromozom 12p Anomalileri

İzokromozom 12p aberasyonu çalışmamızda en sık görülen anomali olarak tespit edilmiştir. Olguların %56.7 sinde (17/30) izokromozom 12p tespit edilmiştir. Olguların %23.3 ünde (7/30) 12p, Androjen Reseptör Gen bölgesi amplifikasyonu ile birlikte saptanmıştır. Bu olgulardan 5 inin tümör tipi non-seminomatöz, 2 sinin tümör tipi seminom olarak bildirilmiştir.

Olgularımızın %23.3 ünde (7/30) 12p aberasyonuna P16 gen bölgesi delesyonu eşlik etmiştir. Bu olgularımızın 2 si seminom, 5 i ise non-seminomatöz olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda olgularımızın %6.6 sında (2/30) izokromozom 12p aberasyonu, P16 gen bölgesi delesyonu ve androjen reseptör gen bölgesi amplifikasyonu ile beraber gözlenmiştir. Bu olgularımızın 1 i seminom diğeri ise non-seminomatöz özellikte olup klinin evrelerine bakıldığında ise $T_1N_2bM_0S_1$ ve $T_2N_xM_x$ olarak saptanmıştır.

Olguların %13.3 ünde (4/30) 12p aberasyonu ve P53 delesyonu birlikteliği saptanmış olup bu 4 olgunun hepsi non-seminomatöz özelliktedir. İki olguda izokromozom 12p aberasyonu, STK 11 gen bölgesi delesyonu beraber saptanmıştır. Bu olguların 1i seminom diğeri ise non-seminomatöz özellikte olup, klinik evreleri $T_2N_0M_0S_1$ ve $T_1N_0M_0S_1$ olarak bildirilmiştir.

4.2.4. STK-11 Gen Bölgesine Ait Anomaliler

Çalışma grubumuzda STK-11 gen bölgesine ait delesyon en az görülen anomali olarak tespit edilmiştir. Olgularımızın %10 unda (3/30) görülen bu anomali izole anomali olarak değil, 2 olguda izo12p tek olguda ise P16 gen bölgesi delesyonu birlikteliği ile saptanmıştır. Bu olguların 2 si non-seminomatöz , diğeri ise seminomatöz özelliktedir.

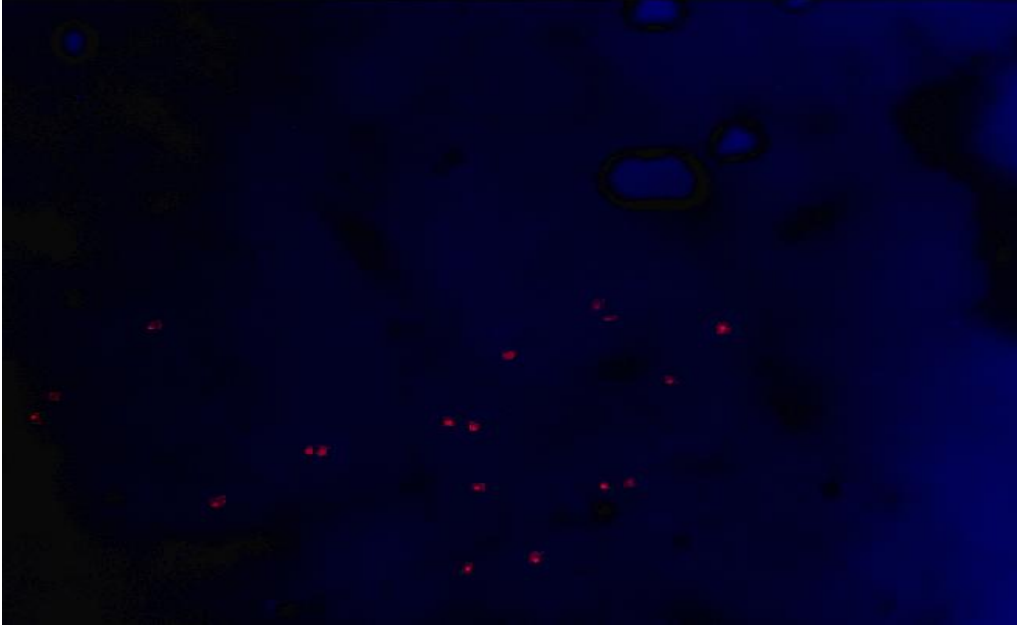
4.2.5. P16 Gen Bölgesine Ait Anomaliler

Çalışmamızda P16 gen bölgesi delesyonu olgularımızın %40 ında (12/30) rastlanmıştır. Olgularımızın %16.6 sında (5/30) P16 gen bölgesi delesyonlarına P53 gen bölgesi delesyonları da eşlik etmiştir. Bu olguların 4 ü non-seminomatöz olarak belirtilmiş , tek olgu ise seminom olarak bildirilmiştir.

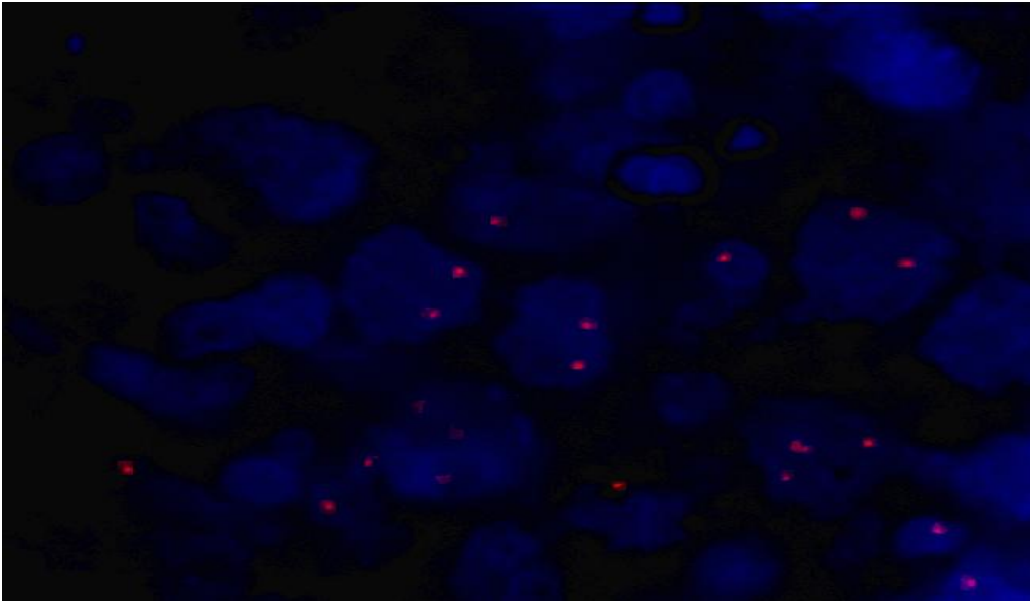
Olgularımızın %23.3 ünde (7/30) P16 gen bölgesi delesyonları, izokromozom 12p aberasyonları ile beraber gözlenmiştir. Bu anomalileri gösteren olguların 5 inde non-seminomatöz tümör tipi, 2 sinde ise seminomatöz tümör tipi saptanmıştır.

Tablo 4.3. Değerlendirilen Parametrelerin Toplam Görülme Oranı

Değerlendirilen Parametreler	Yüzde/Oran
P53 DELESYONU	%23.3 (7/30)
X AMPLİFİKASYONU	%36.6 (11/30)
İZOKROMOZOM 12P	%56.7 (17/30)
STK-11 DELESYONU	%10 (3/30)
P16 DELESYONU	%40 (12/30)

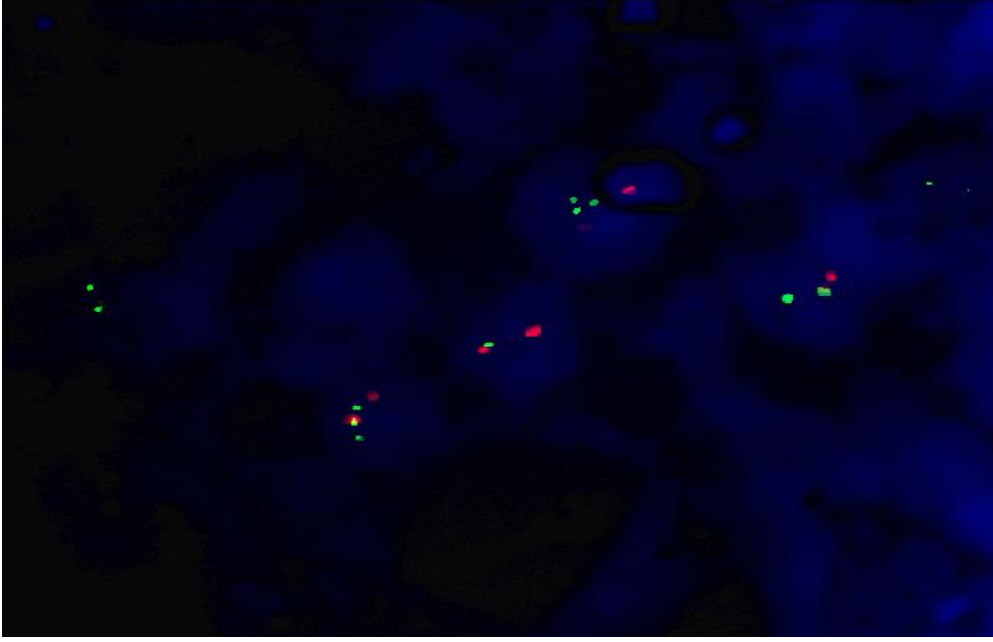


Şekil 4.1. P53 delesyonu görülen 27 numaralı olgunun FISH görüntüsü

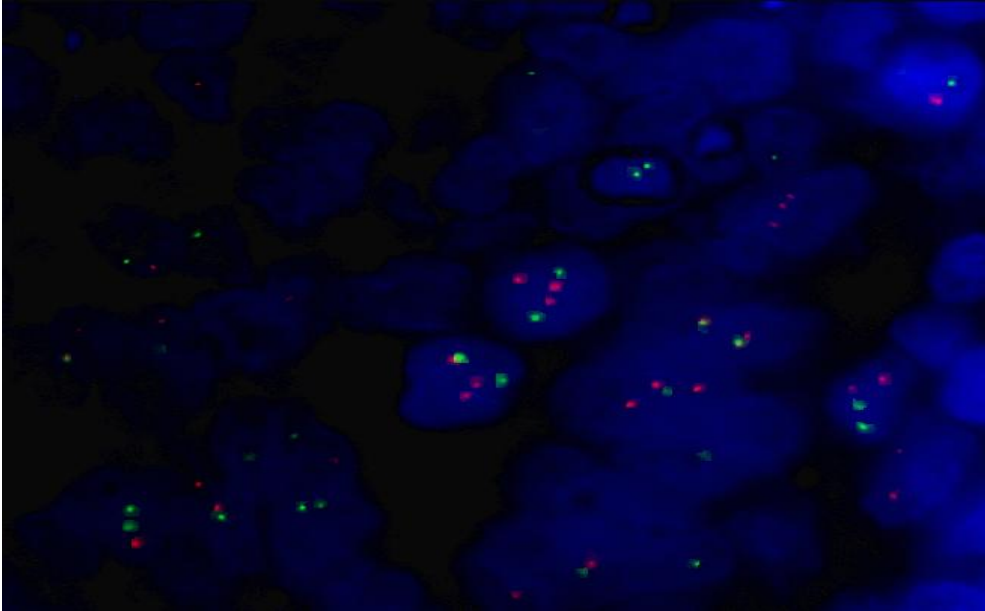


Şekil 4.2. AR gen amplifikasyonu görülen 25 numaralı olgunun FISH görüntüsü

* P53 kırmızı sinyal, AR kırmızı sinyal

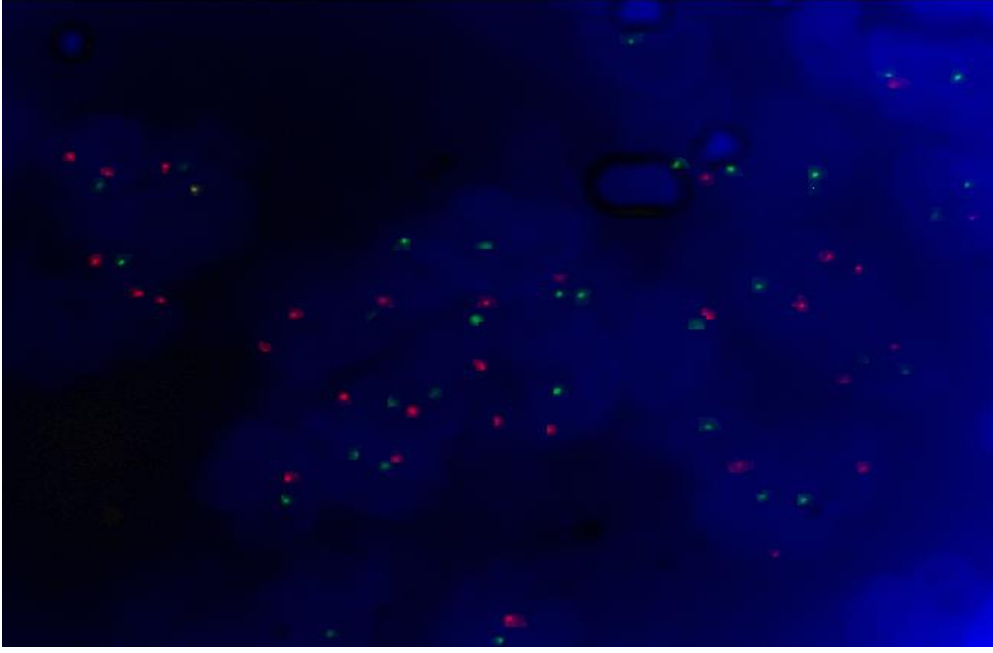


Şekil 4.3. İzokromozom 12p görülen 03 numaralı olgunun FISH görüntüsü



Şekil 4.4. 19p13 bölgesine ait normal ve 19q13 bölgesine ait artışları görülen 02 numaralı olgunun FISH görüntüsü

*Tel 12p yeşil, Cep 12 kırmızı, 19p13 yeşil, 19q34 kırmızı sinyal



Şekil 4.5. P16 delesyonu görülen 26 numaralı olgunun FISH görüntüsü

* P16 kırmızı, Cep 9 yeşil sinyal

5.TARTIŞMA

Çalışmamızda tümör tipi tespit edilen (Dünya Sağlık Örgütü Sınıflaması) 30 olguya ait deparafinize doku örneklerinde FISH analizi ile *P53*, *AR*, *Cyclin-D2*, *STK-11* ve *P16* gen bölgelerine bakılmıştır ve bulgularımız literatür ile karşılaştırılarak tartışılmıştır.

5.1. FISH Yöntemi İle Saptanan Anomalilerle Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması

5.1.1. P53 Gen Bölgesi Anomalilerinin Karşılaştırılması

Bir tümör süpressör gen olan P53 genomda mutasyon oluşmasını önleyerek genom stabilitesini korur. Mutant formları meme, mide, akciğer, karaciğer, kolon, uterus, beyin, mesane, over ve testis kanserleri gibi birçok malignitelere neden olur (31).

Literatürde testis tümöründe P53 gen bölgesi aberasyonlarını FISH analizi ile değerlendiren çalışmaya rastlanmadığından verilerimiz farklı yöntemlerle bu gen bölgesi aberasyonlarını değerlendiren araştırmacıların çalışmaları ile karşılaştırılmıştır.

Süllü ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yapılan çalışmada p53 ekspresyonunu belirlemek için immunohistokimyasal çalışma yapılmıştır. (Tablo 5.1.) Seminomlarda %86 oranında (24/28) ve seminom dışı germ hücreli tümörlerde %75 (12/16) oranında p53 ekspresyonu saptanmıştır. Son yıllarda bir tümör baskılayıcı gen olan P53 geninin, birçok tümörün gelişiminde ve seyirinde rol oynadığını göstermişlerdir (40).

Vladuşi ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan çalışmada testiküler germ hücre tümörleri iki ana gruba ayrılarak çalışılmıştır.(seminom/non-seminom) (Tablo 5.1.) PCR ve RFLP metodu ile *CDH1*, *APC*, *P53* ve *nm23-H1* tümör süpressör genlerini iki grupta değerlendirmeyi hedeflemişlerdir. Çalışma sonucunda araştırmacılar P53 ün

exon 4 teki allelik kaybının yalnızca nonseminomada, P53 intron 6 heterozigosite kaybının ise seminoma ve nonseminomada olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar; allelik kayıpların iki histolojik grupta farklılık gösterdiğini vurgulamışlardır (49).

Çalışmamızda olguların %23.3 ünde (7/30) P53 gen bölgesine ait delesyon saptanmıştır. Bulgularımız Tablo 5.1. de görüldüğü gibi literatür sınırları içindedir. P53 delesyonu non-seminomatöz germ hücreli testis tümörlerinde (6/30) seminomatözlara kıyasla (1/30) daha sık oranda saptanmıştır. Non-seminomatöz germ hücreli tümörler kötü prognoza sahip ve seminomdan daha agresif seyreden testis tümörleri olup P53 delesyonunun daha sık rastlanması beklenen bir sonuçtur.

Tablo 5.1. P53 gen bölgesi delesyonu sonuçlarının literatür verileri ile karşılaştırılması

<i>Araştırmacının ismi</i>	<i>Olgu Sayısı (n)</i>	<i>Yıl</i>	<i>Yöntem</i>	<i>P53 Bulguları Seminom</i>	<i>NonSeminom</i>
<i>Süllü ve ark.</i>	44	2006	IHK	%14	%25
<i>Vladusi ve ark.</i>	38	2010	PCR RFLP	%2.6	%18.4
<i>Bizim Çalışmamız</i>	30	2009	FISH	%3.3	%20

5.1.2. Androjen Reseptör Gen Bölgesi Anomalilerinin Karşılaştırılması

Araştırma grubumuzu oluşturan 30 testis tümörü tanısı almış doku örneği Androjen Reseptör gen bölgesi aberasyonu açısından incelenmiş ve AR gen bölgesi aberasyonları testiküler germ hücre tümörlerinde sık rastlanan anomali olarak gözlenmiştir.

Verdorfer ve arkadaşları tarafından 2007 yılında yapılan çalışmada; testis leydig hücre tümörü olan geniş bir hasta grubunun materyallerine moleküler sitogenetik analiz

yapılmıştır(Tablo 5.2.). Çalışmada cinsiyet kromozomlarının; özellikle X kromozomunun testiküler germ hücre tümörleri oluşumunda çok önemli rol oynadığını kanıtlamışlardır. Çalışılan leydig hücre tümörlü 25 olgunun %56 sında X kromozom kopya sayısı artışı gözlenmiştir. Biyolojik ve klinik açısından X kromozom kopya sayısı artışının; testiküler germ hücre tümörü oluşumunda **ARAF-1 ve EKL1 onkogen** mekanizmasının önemli olduğunu savunmuşlardır (44).

Aynı araştırmacının yapmış olduğu bir başka çalışmada; 2 testiküler ve 1 yumurtalık Sertoli-Leydig hücre tümörleri ile çalışılmış ve testis Sertoli-Leydig hücre tümörlerinin birisinde kromozom X artışını izole anomali olarak belirlemişlerdir (Tablo 5.2.) (45).

Verdorfer ve arkadaşları tarafından 2007 yılında parafin içine koyulmuş 11 hastaya ait testis SHT nden DNA izole edilmiş, FISH ve CGH yöntemi ile DNA da değişen kopya sayısı incelenmiştir (Tablo 5.2.). Testiküler germ hücre tümörlerinde, X kromozomunda kopya sayısının değişmesini sık rastlanan aberasyon olarak değerlendirmişlerdir. Kromozom X artışı, 11 vakanın 5 inde bulunmuş (%45) ve bu CGH çalışmasında en sık görülen aberasyon olarak tanımlanmıştır. Tümör dokularının analizlerinin çoğunda, üçlü mozaizm bulunmuştur (XY/ XXY/ XXYY) (43).

Verdorfer ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada 8 tümör örneği (7 si SS ve 1 i lenf nodu metastazı bulunan SS) ile çalışılmıştır (Tablo 5.2.). Analiz edilen tüm olgularda X kopya sayısı artışı tespit edilmiştir. Cinsiyet kromozomları dağılımına bakıldığında genellikle triploid (XXY), haploid (X0,Y0), oktaploid (XXXXYYYY) kromozom kuruluğu gözlenmiştir (46).

Çalışmamızda olguların %36.6 (11/30) sında Androjen Reseptör gen bölgesi aberasyonu saptanmıştır. Çalışmamız sonuçları diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında anomali oranı düşük bulunmuştur. Bunun nedeni olarak; diğer çalışmalarda çok çeşitli histolojik tip tümör kullanılmasına rağmen, çalışmamızda yalnızca iki histolojik tip kullanılması, olgu sayılarının farklılığı, kullanılan yöntem (IHK,CGH) farklılığı olarak düşünülmektedir.

Literatürlerde saptanmış olan Serin /Threonin kinaz ailesinden RAF altbirimine mensup olan **ARAF-1** geni hücre büyümesi ve diferansiasyonunda etkilidir. Testis tümörü oluşumunda X kromozom kopya sayısı artışı ARAF-1 geninin onkogen aktivasyonu kazanmasına neden olmaktadır. Yine literatürlerde saptanmış olan **ELK1** geni Ets onkogen ailesi üyesi olup, bu genin kodladığı protein ras-raf-MAPK sinyal yolağında etkilidir.

Tablo 5.2. X kromozom artışı sonuçlarının literatür verileri ile karşılaştırılması

<i>Araştırcının ismi</i>	<i>Olgu Sayısı (n)</i>	<i>Yıl</i>	<i>Yöntem</i>	<i>X Kromozom Artışı Bulguları</i>
<i>Verdorfer ve ark.</i>	25	2007	IHK CGH	%56
<i>Verdorfer ve ark.</i>	3	2007	FISH CGH	%66.6
<i>Verdorfer ve ark.</i>	11	2007	FISH CGH	%45
<i>Verdorfer ve ark.</i>	8	2004	FISH CGH	%100
<i>Bizim Çalışmamız</i>	30	2009	FISH	%36.6

5.1.3. İzokromozom 12p Anomalilerinin Karşılaştırılması

Hücresel proto-onkogenler, hücre büyümesini düzenlemede temel rol oynamaktadır. Proto-onkogenlerin anormal aktivite göstermeleri ya da aşırı eksprese olarak onkogene dönüşmesi, insan tümörlerinin progresyonuna ve gelişimine neden olmaktadır (31).

Jean ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada; bir erkeğin sadece testislerindeki kıkırdağı içeren saf monodermal tümör bulunmuştur. Araştırma bulguları bu kıkırdaklı tümörde i(12p) pozitif bulunmuş (%4 hücrede) ve ayrıca 12p artışı 1.63 (12p/12 sentromerik oran) oranında saptanmıştır. Gözlenen izokromozom 12p ve 12p artışı, tümörün germ hücreli olması lehine bir kanıt olarak bildirilmiştir (25).

Cheng ve arkadaşları (2006) testiküler teratomlu 17 hasta ile çalışmışlardır. Teratomların %76 sında i(12p) ve %29 unda 12p artışı saptamışlardır. Çalışılan tüm teratomların %88 inde 12p anomalisi olduğu gösterilmiştir (Tablo 5.3.) (8).

Poulos ve arkadaşlarının 2006 yılında yapmış oldukları çalışmada; toplam 14 germ hücre tümörü ile çalışılmıştır (Tablo 5.3.). Çalışma sonuçları i (12p) ve 12p amplifikasyonu formlarının postpubertal testiküler teratomlarda var olduğunu, prepubertal testiküler teratomlarda ise bu genetik bulguların hiçbirine rastlanmadığını bildirmişlerdir (35).

Cossu-Rocca ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmada ; 21 disgerminoma ve 2 gonadoblastoma ile çalışılmıştır (Tablo 5.3.). Kromozom 12p anomalileri; disgerminoma hastalarının %81 inde gözlemlenmiştir. Hastaların %57 sinde yalnızca izokromozom 12p ve %5 inde yalnızca 12p amplifikasyonu ve % 19 unda ise her iki aberasyon birlikte saptanmıştır. Gonadoblastomlar ise izokromozom 12p ve 12p artışı açısından negatif bulunmuştur. Bu da 12p anomalilerinin disgerminomalarda ortak olduğunu göstermiştir. Araştırmacılar kromozom 12p anomalilerini belirlemek için kullanılan FISH analizlerini teşhis amacıyla da kullanılmasının son derece faydalı olacağını savunmuşlardır (9).

Kernek ve arkadaşları tarafından yapılmış olan araştırmada 10 metastatik malignant somatik tip tümör çalışılmıştır (Tablo 5.3.). Çalışma bulguları; 12p anomalilerinin; erken evre germ hücre tümörleri evrimi sırasında meydana geldiğini ve 12p amplifikasyonunun invaziv tümör gelişiminin kanıtı olduğunu göstermiştir (28).

Reuter ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada 12p13 bölgesinde lokalize olan **Cyclin D2** geninin yaklaşık %70 tümör örneğinde overekspres olduğu saptanmıştır. Testiküler kanserlerin büyük çoğunluğu postpubertal erkeklerde gözlenir ve bir ya da daha fazla izokromozom 12 ve 12p amplifikasyonu ile karakterizedir. Kromozom 12 amplifikasyonu invaziv GHT leri tanımlanmasında kritik öneme sahiptir. 12p11.2-12.1 amplifikasyon bölgesi **SOX5**, **JAW1** ve **K-RAS** genlerini içermektedir. (36).

Pienkowska-Grela ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada testiküler germ hücre tümörlerinde seminom ve non-seminom gruplarda kromozom 12p artışı konvensiyonel sitogenetik ve FISH yöntemleriyle incelenmiştir (Tablo 5.3.). Postpubertal seminom ve seminom olmayan gruplarda izokromozom 12p ve 12p artışı saptanmıştır (34).

Çalışmamızda değişik histolojik tipe sahip olan testis tümörlerinin tümünü 12p anomalileri açısından değerlendirmeyi tasarladık. Yaptığımız çalışmada; 10 olgunun tek histolojik tipe (seminom), 20 olgunun ise karma hücreli testis tümörü tipine (non-seminomatöz) sahip olduğu belirlenmiştir.

Çalışma sonuçlarımız literatür sınırları içinde yer almıştır. Olguların %56.7 (17/30) sinde izokromozom 12p anomalisi saptanmıştır. Erken evre testis tümörlerinde izokromozom 12p izole anomali olarak bulunurken, olgunun klinik evresi arttıkça 12p amplifikasyonu daha sık rastlanan anomali olarak kendini göstermiştir.

Çalışmamız sonuçları da; erken germ hücre tümörleri evrimi sırasında 12p anomalilerinin ortaya çıktığını destekler niteliktedir.

Tablo 5.3. 12p anomalileri sonuçlarının literatür verileri ile karşılaştırılması

<i>Araştırcının ismi</i>	<i>Olgu Sayısı (n)</i>	<i>Yıl</i>	<i>Yöntem</i>	<i>12p Anomalileri Bulguları</i>
<i>Cheng ve ark.</i>	17	2006	FISH	%88
<i>Poulos ve ark.</i>	14	2006	FISH	%83
<i>Cossu-Rocca ve ark.</i>	23	2006	FISH	%81
<i>Kernek ve ark.</i>	10	2004	FISH	%54.5
<i>Pienkowska-Grela ve ark.</i>	15	2001	Sitogenetik FISH	%86.6
<i>Bizim Çalışmamız</i>	30	2009	FISH	%56.7

5.1.4. STK-11 Gen Bölgesi Anomalilerinin Karşılaştırılması

Serin/Treonin kinaz ailesine mensup olan STK-11 geni tümör süpresör bir genidir. Bu gendeki mutasyonlar otozomal dominant kalıtılan Peutz-Jeghers Sendromu ile de ilişkilendirilmiştir.

Kato ve arkadaşları (2004) yumurtalık seks stromal tümörlerinde 19p13.3 gen bölgesinde heterozigosite kaybı olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar; bu genin sporadik seks kord-stromal tümörleri patogenezi ile ilişkili olmadığını, bu kromozomal bölgedeki diğer gen değişimleri açısından önemli olduğunu savunmuşlardır (27).

Verdorfer ve arkadaşları (2006) seks kord-stromal tümörleriyle yapılan moleküler sitogenetik çalışmada, Sertoli hücre tümörlü 11 hasta değerlendirmişlerdir. Hasta tümör materyallerinde kromozom 19 ya da 19p artışı (3/11) göstermişlerdir (43).

Verdorfer ve arkadaşları 2007 yılında yapmış oldukları bir başka çalışmada kromozom 19 ya da 19p artışı en sık rastlanan ikinci anomali olarak gözlemişlerdir (Tablo 5.4.). Kromozom 19 artışı osteosarkom ve megakaryoblastik lösemilerde de gözlenmiş bir anomali olurken, bu anomalinin testis tümörü oluşumdaki rolü tam olarak açıklanamamıştır (44).

Yine aynı araştırmacı tarafından (2006) yapılan çalışmada; Sertoli-Leydig hücre tümörüyle çalışılmıştır (Tablo 5.4.). Araştırmada testis ve ovaryan SLHT incelenmiştir. Ovaryan SLHT nde kromozom 19 artışı saptamışlardır (45).

Diamonds ve arkadaşları, 2002 yılında insan doku kallikrein ile ilgili bir çalışma yapmışlar ve kallikreinlerin yeni kanser biomarkerları olabileceğini öne sürmüşlerdir. İnsan kallikrein gen lokusu keşfedildikten sonra, 15 kallikrein geni içerdiği bulunmuştur. Kallikreinler; bir çok dokuda fazla miktarda eksprese olur. Bu dokular steroid hormon üreten ve prostat, meme, ovaryum, *testis dokusu* gibi hormon bağımlı dokulardır. İnsan kallikrein geni 19q13.4 bölgesinde lokalizedir.

Çalışmamızda STK-11 gen bölgesi delesyonları olgularımızın %6.6 (2/30) sında gözlenmiştir.

Bunun yanında olgu grubumuzun %20 (6/30) sinde 19q13 bölgesi overekspresyonu da saptanmıştır. Araştırmamızda da 19q13 gen bölgesi

overekspresyonu gözlenmesi, *Diamonds ve arkadaşları* tarafından ortaya koyulan yeni biomarkerlar olabileceği düşüncesini destekler niteliktedir.

Anomali oranımız diğer çalışmalardan düşük olmakla birlikte bu konudaki az sayıda yapılmış çalışma ile karşılaştırılabilmektedir. Sonuçlarımızın değerlendirilebilmesi için geniş olgu serilerinde yapılacak FISH çalışmalarına ihtiyaç vardır.

Tablo 5.4. Kromozom 19 anomalileri sonuçlarının literatür verileri ile karşılaştırılması

<i>Araştıracının ismi</i>	<i>Olgu Sayısı (n)</i>	<i>Yıl</i>	<i>Yöntem</i>	<i>Kromozom 19 Anomalileri Bulguları</i>
<i>Verdorfer ve ark.</i>	25	2007	IHK CGH	%28
<i>Verdorfer ve ark.</i>	11	2007	FISH CGH	%27
<i>Bizim Çalışmamız</i>	30	2009	FISH	%20

5.1.5. P16 Gen Bölgesi Anomalilerinin Karşılaştırılması

Tümör süpressör gen olan P16 insan kanserlerinde (meme, over, baş-boyun kanserleri) sıklıkla mutasyona uğramıştır.

Literatürde testis tümöründe P16 gen bölgesi aberasyonlarını FISH analizi ile değerlendiren çalışmaya rastlanmadığından verilerimiz farklı yöntemlerle bu gen bölgesi aberasyonlarını değerlendiren araştırmacıların çalışmaları ile karşılaştırılmıştır.

Heidenreich ve arkadaşları (1998) primer testiküler germ hücre tümörlerinde P16 (Ink4)/CDKN2 ve P15 (INK4B)/MTS2 genleri ile moleküler analiz yapmışlardır. Southern blot kullanılarak 9p21 LOH lokus bölgeleri belirlenmiştir. PCR yöntemi kullanılarak mutasyon taraması yapmışlardır. Sonuç olarak 2 ekzon için yüksek sıklıkta mutasyon tanımlamışlardır (IFNA ve D9S161). Bundan dolayı araştırmacılar P16 geninin TGHT pathogenezinde önemli bir adım olduğunu savunmuşlardır (17).

Chaubert ve arkadaşları tarafından (1997) yapılan çalışmada TGHT oluşumunda sorumlu olan moleküler mekanizma aydınlatılmak amaçlanmıştır. P16INK4 (MTS1) ve CDK4 gen bölgesi değişimleri seminom ve non-seminom gruplarda çalışılmıştır. Araştırmacılar P16INK4 inaktivasyonunun GHT oluşumunda rol oynadığını bildirmişlerdir (7).

Henegariu ve arkadaşları tarafından 2004 yılında yapılan araştırmada spermatositik tümör ile çalışılmıştır. Vakalarda 9p artışı sık rastlanan anomali olarak gözlenmiştir. Kromozom 9 artışı spermatositik seminomlarla uyumlu bir anomali olarak gözlenmiş ve bu tümör tipi gelişimde önemli bir bulgu olarak bildirilmiştir (18).

Verdorfer ve arkadaşları tarafından 2007 yılında yapılan çalışmada, 2 testiküler ve 1 yumurtalık SLHT ile çalışılmıştır. Çalışmada üç vakadan birinde 9p artışı saptanmıştır (45).

Bizim çalışmamızda olguların %40 (12/30) ında 9p21 gen bölgesi delesyonu gözlenmiştir. Bu gen Siklin-bağımlı kinaz 4 inhibitörüdür ve bu kompleks G1 fazı

boyunca hücrel proliferasyonu kontrol eder fakat bu gen bölgesinin kemoterapotik ajanlara hassasiyetindeki rolü tam olarak açığa çıkarılmamıştır.

Yapılan çalışmalarda P16 gen bölgesi anomalileri için oran bildirilmemektedir. Araştırmacılar 9p artışı bildirmektedirler, karşılaştırıldığında çalışmamızda da olguların %10 (3/30) unda 9p artışı gözlenmiş bu nedenle bulgularımız uyumlu olarak kabul edilmiştir. Mevcut çalışma sayısı az olup, bu konuda büyük olgu serilerinde yapılacak çalışmalarda elde edilecek sonuçların karşılaştırılması gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Araştırma grubunu oluşturan tümör tipi ve klinik evre açısından sınıflandırılan 30 testis tümörü tanısı almış doku örneğine FISH analizi yapılmıştır. Seminom ve seminom dışı germ hücreli tümörler sıklıkları belirlenen gen aberasyonları açısından değerlendirilmiş ve testis tümörü oluşum patogenezi genetik açısından açıklanmaya çalışılmıştır.

- 1- FISH analizi ile tüm parametreler için anomali oranı % 31.3 olarak belirlenmiştir.
- 2- Anomali görülen olgularımızın %75 inde non-seminomatöz germ hücreli testis tümörü (18/24), %25 inde ise seminomatöz germ hücreli testis tümörü görülmüştür.

- 3- Olgularımızda izokromozom 12p en sık gözlenen anomali olarak tespit edilmiştir.
- 4- Çalışmamızda P16 gen bölgesi delesyonu ikinci en sık görülen anomali olarak tespit edilmiştir.
- 5- Androjen Reseptör gen bölgesi amplifikasyonları çalışmamızda üçüncü sık rastlanan aberasyon olarak gözlenmiştir.
- 6- P53 delesyonları çalışma grubumuzda diğer gen bölge anomalilerine göre daha az oranda tespit edilmiştir.
- 7- Çalışma grubumuzda STK-11 gen bölgesine ait delesyon en az görülen anomali olarak tespit edilmiştir.
- 8- Çalışmamız Türk popülasyonunda deparafinize testis tümör örneklerinden P53, AR, 12p, STK-11 ve P16 gen bölgesi aberasyonlarının FISH yöntemi ile incelendiği ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

Gelecekte hastaların takibi ve bulgularımızın histopatolojik değerlendirme ile karşılaştırılmasının yararlı olacağını düşünmekteyiz. Dolayısıyla çalışmamız ve ileride daha geniş olgu serilerinde yapılacak olan çalışmalar, yeni takip ve tedavi protokollerinin geliştirilmesine ve bu protokollerin klinikte kullanımlarına büyük ölçüde yardımcı olacaktır.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D., 2002, The molecular biology of the cell, Third Edition, Garland Publishing Inc., New York&London.
2. Artan, S., 1996, FISH tekniğinde kullanılan problemler ve özellikleri, Teorik ve Pratik Floresan İn Situ Hibridizasyon, Ed. Başaran, N.; Etam, Eskişehir, 14-25s.
3. Artan, S., 1996, FISH tekniğinde hibridizasyon koşulları, Teorik ve Pratik Floresan İn Situ Hibridizasyon, Ed. Başaran, N. ; Etam, Eskişehir, 34-39s.
4. Artan, S., 1996, Rutin FISH uygulamaları, Teorik ve Pratik Floresan İn Situ Hibridizasyon, Ed. Başaran, N. ; Etam, Eskişehir, 34-39s.
5. Bartkova, J., Thullberg, M., Rajpert-De Meyts, E., et al, 2000, Cell cycle regulators in testicular cancer: loss of P16INK4C marks progression from carcinoma in situ to invasive germ cell tumors. Int J Cancer 85 (3):370-375p.
6. Başaran, N., 1999, Tıbbi Genetik. 7. Baskı, Güneş ve Nobel Tıp Kitabevi, Bursa
7. Chaubert, P., Guillou, L., Kurt, A.M., Bertholet, M.M., Metthez, G., Leisinger, H.J., Bosman, F., and Shaw, P., 1997, Frequent p16INK4 (MTS1) gene inactivation in testicular germ cell tumors, Am J Pathol. 151(3): 859–865 p.
8. Cheng, L., Zhang, S., MacLennan, G.T., et al, 2006, Interphase fluorescence in situ

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- hybridization analysis of chromosome 12p abnormalities is useful for distinguishing epidermoid cysts of the testis from pure mature teratoma. Clin Cancer Res 12: 5668-5672 p.
9. Cossu –Rocca, P., Zhang, S., Roth, L. M., Eble, J., Zheng, W., Abdul Karim, F. W., Michael, H., Emerson, E. R., Jones, T. D., Hattab, E. M., Cheng, L., 2006, Chromosome 12p abnormalities in dysgerminoma of the ovary:a FISH analysis, Modern Pathology 19, 611-615 p.
 10. Çal, Ç., Akbay, K., Altıntaş, R., 2008, Türkiye Klinikleri J Urology-Special Topics, 1(3): 14-19 s.
 11. Fırat, D., Çelik, İ., 1998, Cancer Statics in Turkey and in the World 1993-1995, Turkish Association For the Cancer Research and Control, Ankara.
 12. Fong, K.W., Sekido, Y., Minna, J.D., 1999, Molecular pathogenesis of lung cancer, J Thorac Cardiovasc Surg, 118, 1136-1152 s.
 13. Ganmaa, D., Li, XM., Wang, J., et al, 2002, Incidence and mortality of testicular and prostatic cancers in relation to world dietary practices. Int J Cancer 98(2): 262-267 s.
 14. Geoffey, M., Coope, Robert, E., Hausman, 2006, Hücre Moleküler yaklaşım, 3. baskı, Tıp Kitapevi, İzmir, 592-640 s.
 15. Gori, S., Porrozzi, S., Roila, F., et al, 2005, Germ cell tumours of the testis,Crit Rev Oncol Hematol. 53(2):141-164 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

16. Guyton, A. C., Hall J. E., 1996, The textbook of Medical Physiology Guyton & Hall Dokuzuncu Edisyon, (Çev:Çağlayan, B.), Nobel Kitapevleri, İstanbul, 432-567 s.
17. Heidenreich, A., Gaddipati, JP., Moul, JW., Srivasta, S., 1998, Molecular analysis P16 P16(Ink4)/CDKN2 and P15(INK4B)/MTS2 genes in primary human testicular germ cell tumors , J Urol. 159 (5): 1725-30 p.
18. Henegariu, O., Heerema, N. A., Thurston, V., Jung, S., Pera, M., Vance, G. H., 2004, Characterization of gains, losses, and regional amplification in testicular germ cell tumor cell lines by comparative genomic hybridization, Cancer Genetics and Cytogenetics 148 14-20 p.
19. Houldsworth, J., Reuter, V., Bosl, GJ., et al, 1997, Aberrant expression of cyclin D2 is an early event in human male germ cell tumorigenesis. Cell Growth Differ. 8 (3):293.
20. [http:// uroloji.uludag.edu.tr/ DERSLER/ testistumorleri. ppt.](http://uroloji.uludag.edu.tr/DERSLER/testistumorleri.ppt)
21. <http://www.androloji.org.tr>
22. <http://www.kanser.org>
23. http://www.mc.metu.edu.tr/pdf/ODTU_SRM_brosur_testis.pdf
24. <http://www.turkcancer.org>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

25. Jean, R.D., Eble, J., Zhang, S., Cheng, L., 2007, Pure cartilaginous teratoma of the testis: an immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization (FISH) study, J.Clin. Pathol. published online 29 Jun 2007; doi: 10.1136/jcp. 048702.
26. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., Thun, MJ., 2008, Cancer static, CA Cancer J Clin. 58: 71-96 s.
27. Kato, N., Romero, M., Catusus,L., Prat, J., 2004, The STK11/LKB1 Peutz-Jegher gene is not involved in the pathogenesis of sporadic sex cord-stromal tumors, although loss of heterozygosity at 19p13.3 indicates other gene alteration in these tumors Hum Pathol 35;1101-1104 p.
28. Kernek, K. M., Brunelli, M., Ulbright, T. M., Eble, J.,Martignoni, G., Zhang, S., Michael, H., Cummings, O., Cheng, L., 2004, Fluorescence in situ hybridization analysis of chromosome 12p paraffin- embedded tissue is useful for establishing germ cell origin of metastatic tumors, Modern Pathology 17,1309-1313 p.
29. Kumar, V. , Cotran, R.S., Robbins, S.L., 2003, Robbins Temel Patoloji, (Çev:Çevikbaş U.), Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul , 172-195
30. Muller-Tidow, C., Diederichs, S., Schrader, MG., et al, 2003, Cyclin A1 is highly expressed in aggressive testicular germ cell tumors. Cancer Lett.;190 (1):89-95 p.
31. Nussbaum, R.L., Mcinnes, R.R., Willard, H.F., Thompson&Thompson Tıbbi Genetik, 2005, Güneş Kitabevi, 312-313 s.
32. Özen, H., Türkeri, L., Akdoğan, B., 2007, Üroonkoloji Kitabı, Üroonkoloji Derneği, Cilt II, 1065-1189 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

33. Peter, T., Sîan, E., 2005, Emery's Elements of Medical Genetics, Twelfth Edition, 234-254 s.
34. Pienkowska-Grela, B., Grygalewicz, B., Bregula, U., 2002, Overrepresentation of the short arm of chromosome 12 in seminoma and nonseminoma groups of testicular germ cell tumors. Cnaer Genetics and Cytogenetics 134 102-108 p.
35. Poulos, C., Cheng L., Zhang S., Gersell, D. J., Ulbright T. M., 2006, Analysis of ovarian teratomas for isochromosome 12p: evidence supporting a dual histogenetic pathway for teratomatous elements, Modern Pathology 19, 766-771 p.
36. Reuter, E. V., 2005, Origins and molecular biology of testicular germ cell tumors, Modern Pathology 18, 51-60 p.
37. Richie, JP., Steele, GS., 2002, Neoplasms of the testis. In: Retik AB., Vaughen EDJ., Wein AJ.; eds. Campbell's Urology.8. ed. WB Saunders: Philadelphia; 2876-2919 s
38. Roth, J.A., 1994, Molecular events in lung cancer, Lung Cancer ,10, 3s-15s.
39. Snell, R., S., Klinik Anatomi Beşinci Baskı, Nobel Kitabevi, İstanbul, 412-435
40. Süllü, Y. , Kandemir, B., Yıldız, L., Karagöz, F., Barış, S., Aydın, O, 2006, Germ hücreli testis tümörlerinde p53 ve bcl-2 ekspresyonu, Cilt 22, Sayı 3, 181-186 s.
41. Türk Patoloji Dergisi, 2008; Cilt 24, Sayı 2, 100-106 s.
42. Türkiye Klinikleri Üroloji Dergisi Cilt/ Vol:1 Sayı/ No:3 Yıl: 2008

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

43. Verdorfer, I., Höllrigl, A., Strasser, U., Susani, M., Hartmann, A., Rogatsch, H., Mikuz, G., 2007, Molecular-cytogenetic characterisation of sex cord-stromal tumours: CGH analysis in sertoli cell tumours of the testis, Virchows Arch 450: 425_431 DOI10. 1007/ s00428-007-0385-8.
44. Verdorfer, I., Horst, D., Höllrigl, A., Susani, M., Hartmann, A., Rogatsch, H., Mikuz, G., 2007, Leydig cell tumors of the testis :a molecular-cytogenetic study. based on a large series of patients, Oncol Rep, 17(3):585-9.
45. Verdorfer, I., Horst, D., Höllrigl, A., Susani, M., Hartmann, A., Rogatsch, H., Mikuz, G., 2007, Sertoli-Leydig cell tumours of the ovary and testis :a CGH and, FISH study Virchows Arch 450:267-271 s.
46. Verdorfer, I., Rogatsch, H., Tzankov, A., Steiner, H., Mikuz, G., 2004, Molecular cytogenetic analysis of human spermatocytic seminomas, Journal Pathology, J. Pathol 204: 277_281, Published online Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com)DOI:10.1002/path.1634
47. Vert, V., Kenneth, W. K., 2004, Cancer genes and the pathways they control, Nature Medicine, 10, 789-799p.
48. WHO “ World Cancer Report” (DSÖ), 2003, Genova (<http://www.who.int/cancer/en/>)
49. Vladušić, T., Hrašćan, R., Vrhovac, I., Krušlin, B., Gamulin, M., Grgić, M., Pećina- Šlaus, N. Ve Čolić, J.F., 2010, Loss of heterozygosity of selected tumor suppressor genes in human testicular germ cell tumors .

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- 50.** Zindy, F., van Deursen, J., Grosveld, G., et al, 2000, INK4d-deficient mice are fertile despite testicular atrophy. *Mol Cell Biol.* 20 (1):372-378 p.

ÇİĞDEM TOPRAK

Kişisel Bilgiler :

Doğum Tarihi : 11.10. 1982
Doğum Yeri : Ankara
Uyruğu : T.C.
Medeni Hali : Bekar

Eğitim Durumu :

Yıl	Üniversite	Ortalama
Yüksek Lisans	Osmangazi Üniversitesi	
2006-	Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik A.D	3.63/4
Üniversite	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	
2001-2006	Fen Fakültesi, Biyoloji bölümü	60.56/100
Lise	Ankara Kocatepe Mimar Kemal Lisesi	4.00/5
09.1996- 02.2000		

Yabancı Diller :

İngilizce
(İyi Seviyede)

Katıldığı Ulusal- Uluslararası Bilimsel Toplantılar

1. VIII. Ulusal Tıbbi genetik kongresi, 2008, Çanakkale
2. Ulusal Ege Sempozyumu, 2006, Afyon
3. Onkolojide Arayışlar Sempozyumu, 2008, İzmir