

9390

T.C.  
İstanbul Üniversitesi  
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi  
Kadın Hastalıkları ve Doğum  
Anabilim Dalı

JİNEKOLOJİK TÜMÖRLERDE KARSİNO EMBRİYONİK  
ANTİGEN, HUMAN KORİONİK GONADOTROPİN VE  
ALFA FETOPROTEİN'İN DOKU KONSANTRASYONU İLE  
PLAZMA DÜZEYLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİ

(Uzmanlık Tezi)

T. C.  
Yükseköğretim Kurulu  
Dokümantasyon Merkezi

Dr.Fuat Demirkıran



İstanbul - 1990

## ÖNSÖZ

*Klinikte çalıştığım süre içinde Kadın Hastalıkları ve Doğum konusunda uzmanlaşmam için emeği geçen başta Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Necati Tolun olmak üzere önceki kürsü başkanları Prof.Dr.Şahap Karaaliler ve Prof.Dr.Turgay Atasü'ya ve kliniğimizin diğer öğretim üye ve yardımcılarına şükranlarımı sunarım.*

*Tezimin hazırlanmasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Prof.Dr.Turgay Atasü'ya, olguların çalışılmasında emeği geçen Dr.Nezih Hekim'e, Doç.Dr.Tülay İrez'e ve laboratuvar görevlilerine, istatistiksel hesaplarda deneyimlerinden yararlandığım Prof.Dr.Mustafa Şenocak'a ve tezimin her safhasında emeği geçen Doç.Dr.Kılıç Aydınli'ya teşekkür etmeyi bir borç bilirim.*

**Dr.Fuat Demirkıran**

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
MATERYAL VE METOD.....	22
BULGULAR.....	24
TARTIŞMA.....	43
SONUÇ.....	52
ÖZET.....	54
KAYNAKLAR.....	56

## GİRİŞ

Bütün kanserlerde mortalite tanının koyulma zamanı ve doğruluğu ile yakından ilgilidir.

Yüzyılın başından beri kanser araştırmaları tanı ve tarama yöntemleri üzerinde yoğunlaşmış ve bu konuda pek çok çalışma yapılmıştır. Genel olarak kanser araştırmalarındaki temel ilerlemeler kanserin spesifik immün cevabı oluşturma özelliğinin bulunmasına dayanır(1). Kanser hücrelerinin bakteri ve viruslarda olduğu gibi özel antijenlerinin olduğu gösterilmiştir(1). Tümör hücreleri sıklıkla bir antijen serisi taşırlar(2). Bu antijenler tümörle ilgili değişiklikleri yansıtırlar ve tümör gelişimi ile ilgili virus veya onkogenler tarafından kodlanmışlardır. Bir grup olarak bu antijenlere tümörle ilgili antijenler denir(2). Bu antijenlerden başka tümör hücrelerinde pek çok antijenik determinant mevcuttur.

Witebsky'nin 1930'da yaptığı bir çalışma kanser antijenleri fikrinin temelini oluşturur(3,4). İmmunolojinin gelişimine paralel olarak ilk spesifik tümör antijeni 1950'lerde gösterilmiştir(5). 1956'da yine Witebsky tarafından ilk olarak over kanser antijenleri tarif edilmiştir(6). Tümör antijenleri tümör belirteçleri olarak bilinir(7). Son zamanlarda tarif edilen pek çok tümör belirteçi klinik uygulamaya sokulmuştur(8,9,10,11). Buna rağmen önceleri tümör belirteçlerinin malign tümörlerin tanı, takip ve tedavisinde yardımcı olacağına dair oluşan ümit verici kanı sonradan azalmıştır(12). Çünkü herhangi bir belirtecin dolaşımdaki seviyesini tesbit etmek zordur ve yeterince duyarlı bir metod mevcut değildir(12).

Fakat somatik hücre melezlemesi kullanılarak yapılan monoklonal Ig üretiminden sonra tümör spesifik ve tümörle ilgili antijenlere ilgi yeniden artmıştır(13). Melezleme tekniğinin gelişimi ile kanser araştırmalarında poliklonal antikorlar yerine monoklonal antikorlar kullanılmaya başlanmış ve ilgili tekniklerin duyarlılığı kullanılır seviyeye getirilmiştir. Bütün bu gelişmelere paralel olarak tümör antijenleri ve antikorları tümör tanısında takibinde, yerinin tesbitinde ve tedavisinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır(14,15,16,17,18,19,20). İmmunohistokimyasal çalışmalar bu antijen ve antikorların önemli kullanım alanlarındandır. Özellikle yeni immunohistokimyasal tekniklerin gelişimi ile birlikte tümör dokusunun minimal antijenik determinantları bile tesbit edilebilmektedir(21). Bu yöntemle hem doku morfolojisi alanında gelişmeler sağlanmış ve hem de orijini bilinmeyen diferansiye olmuş tümörlerin tanısında ilerlemeler kaydedilmiştir(22,23,24).

Çalışmamızın amacı jinekolojik tümörlerde CEA, AFP ve HCG gibi belirteçlerin doku ve kan düzeylerini karşılaştırmak ve buradaki ilişkileri ortaya çıkarmaktır. Ayrıca ameliyat öncesi dönemde hasta serumunu çeşitli belirteçler için taramadan, operasyonda elde edilen dokuyu immunohistokimyasal olarak bir belirteçler grubu ile taramayı ve herhangi bir belirteç ile doku pozitifliği veren hastayı ameliyat sonrası dönemde yalnızca bu belirteç ile takip etmeyi amaçlıyoruz. Böylece maliyeti düşürmekle kalmayacak aynı zamanda işlemleri de kısaltmış olacağız.

Bundan başka jinekolojik tümörlerde bu 3 belirteçin ne oranda bulunduğunu araştırmak ve henüz ülkemiz jinekolojik patoloji laboratuvarlarında yeterince kullanılmayan immunohistokimyasal yöntemlerin avantaj ve dezavantajlarını tartışmak istiyoruz.

## GENEL BİLGİLER

Bir tümör belirteçi tümör dokusunda veya tümör hücreleri tarafından invazyona uğramış normal dokuda tümöre reaksiyon olarak üretilen ve kan dolaşımına verilen madde olarak tarif edilir(25,26). Tümör belirteçleri genel olarak tümörün taramasında, tanısında, tedavi sonrası takibinde, immünojenik olarak yerinin tespitinde ve immün tedavisinde kullanılırlar(27). İdeal bir tümör belirteçi bulmak zordur. Bununla beraber ideal bir tümör belirteçinde bulunması gereken özellikler şunlardır:

a) Tümör hücreleri tarafından sentez edilmeli ve vücut sıvılarında kolayca tespit edilebilmelidir.

b) Sağlıklı kişilerde ve selim hastalıklarda bulunmamalıdır.

c) Malignitelerin erken döneminde vücut sıvılarında tespit edilebilmelidir.

d) Belirteçin plazma seviyesi malignitenin tedavi sonuçlarına göre değişmelidir.

e) Vücut sıvılarında tespit edilen belirteç seviyesi tümörün kitlesi ile doğrudan ilgili olmalı ve tümörün klinik bulguları oluşmadan plazmada tespit edilebilmelidir.

Bu özelliklerin tamamını içeren bir tümör belirteçi şimdiye kadar

tarif edilmemiştir(25). Klinik uygulamaya girecek bir tümör belirteçi tarama, tanı, prognoz ve takibde kullanılabilmesi ve plazma değerleri klinik subgruplar arasında farklılıklar göstermelidir.

Örneğin kanser tanısında kullanılacak bir tümör belirteçinin plazma değerleri kanser olanlarda, olmayanlara nazaran anlamlı derecede farklı olmalıdır(28). Bir tümör belirteçi için test pozitif kanser populasyon oranı, test pozitif kanser olmayan populasyon oranından anlamlı derecede yüksek olmalıdır(28). Ayrıca bir belirteçin tümöre karşı olan sensitivite ve spesivitesi yüksek olmalıdır. Sensitivite test pozitif olanların hasta olanlara oranı, spesivite ise test negatif olanların hasta olmayanlara oranı şeklinde tarif edilir.

Enzimler, hormonlar ve proteinler gibi pek çok madde tümör belirteçi olabilir. Antijen putrifikasyonu, radioimmunoassay ve immunohistokimya teknolojisindeki yeni gelişmeler bir çok antijenik tümör belirteçinin tarif edilmesine neden olmuştur(29). Belirteçler çeşitli şekillerde sınıflandırılırlar. Örneğin 1981'de Mackay ve arkadaşları tümör belirteçlerini yapısal ve biokimyasal olmak üzere iki grupta incelemiştir(30). Belirteçler immunohistokimyasal çalışmalarda; epitelyal belirteçler, lenfoid ve hemopoetik belirteçler, germ hücre tümörü belirteçleri, melanom belirteçleri ve yumuşak doku belirteçleri olmak üzere 5 grup altında değerlendirilirler(2). Bates ve Longo tümör-belirteçlerini 6 gruba ayırmıştır(25). Bunlar onkofetal antijenler, ektojik hormonlar, plasental proteinler, enzimler, serum proteinleri ve diğerleridir. Onkofetal antijenler embriyonik ve neoplastik dokular tarafından üretilen proteinler olarak, plasental proteinler ise plasenta ve neoplastik dokular tarafından üretilen maddeler olarak tarif edilirler(29). Jinekolojik kanserlerde en çok araştırılan 3 tümör belirteçi karsino embriyonik antijen (CEA), alfa fetoprotein (AFP) ve human korionik gonadotropin (HCG) dir. CEA ve AFP onkofetal antijenler grubuna ve HCG ise plasental proteinler grubuna ait tümör belirteçleridir.

## KARSİNO EMBRİYONİK ANTİJEN (CEA):

Bir onkofetal antijendir. Tümörle ilgili antijenlerin tipik örneği olarak düşünülen CEA malign ve selim epitelyal neoplazımların pek çoğunda tespit edilmiş oldukça kompleks bir moleküldür. Fizyolojik olarak embriyo ve fetal barsakta bulunur. İlk olarak 1965'de Gold ve Freedman tarafından kolon adeno karsinomlu hastaların plazmasında gösterilmiştir(31). Bundan sonra jinekolojik tümörlerdeki rolünü ortaya çıkarmak için araştırmalar yapılmış ve pek çok vaka grubunda yüksek plazma seviyeleri tespit edilmiştir(32,33). Molekül ağırlığı 200.000 dalton olan bir glikoproteindir(31). Bununla beraber kromatografik çalışmalar kolon adeno kanseri ile jinekolojik kanserli hastalardan elde edilen CEA'lerin farklı molekül ağırlığında olduğunu fakat jel difüzyonunda aynı antijenik determinantları paylaştığını göstermiştir(33). Ayrıca aminoasit ve karbonhidrat yapısında zaman zaman değişiklikler olduğundan ölçümlerinde zorluklar çıkabilir(5). CEA hücre yüzey membranında bulunur ve çevre sıvılarla kolayca dağılır(34). CEA ve benzeri maddeler kolon mukozası, akciğer ve meme dokusu gibi pek çok nonneoplastik ve nonfetal dokuda da gösterilmiştir(34). CEA birbirleri ile çapraz reaksiyon veren substratlar grubundan oluşur ve ana metabolizma yeri karaciğerdir(34,35,36). Yarılanma ömrü kesin olarak bilinmemekle birlikte kolorektal adeno kanserli hastalarda tümörün total olarak çıkartılmasından sonra 4-12 hafta içinde serum seviyesi normale iner(34,37). Bazı araştırmacılar küratif cerrahiden 6 hafta sonra plazma seviyesinin normale indiğini bildirmişlerdir(25). Pek çok araştırmada CEA'nın normal plazma seviyesi 0-2.5 ng/ml olarak kabul edilmiştir(25,33).

Sigara içenlerin % 13'ünde, pankreas, karaciğer ve akciğer hastalıklarının % 20-50'sinde plazma CEA seviyesi yükselir(36,38,39). Fakat bu durumlarda nadiren 10 ng/ml sınırını aşar. Serviks kanserli hastaların % 42-50'sinde, endometrium kanserlilerin % 27'sinde ve over kanserlilerin % 35'inde CEA'nın plazma seviyesinin yükseldiği bildirilmiştir(25,40). Plazma düzeyindeki artış over kanserlerinde hücre tipi, serviks ve endometrium kanserlerinde ise hastalığın stage ile ilgilidir(32,33,41,42). Bast ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada plazma CEA seviyesi ile hastalığın prognozu arasında yakın bir ilişki olduğu bildirilmiştir(43). Bütün bunlara rağmen Stevensen'e göre CEA'nın jinekolojik kanserlerdeki duyarlılığı yetersizdir(44). Fakat duyarlılığı arttır-



mak için CEA tesbitinde monoklonal antikor kullananlar vardır(2,45). CEA doku kesitlerinde ilk olarak 1975'de Primus ve arkadaşları tarafından immun-peroksidaz tekniği kullanılarak gösterilmiştir(46). Sonraları Goldenberg bu antijeni over kanseri dahil pek çok jinekolojik tümörde göstermiştir(47). Swell ve arkadaşlarının 1986'da yaptıkları bir çalışmada ise normal serviks dokusunda, over yüzeyinde ve foliküllerinde immunohistokimyasal olarak CEA tesbit edilirken, endometriumda tesbit edilmemiştir(48).

CEA'nin sıklıkla tümör tanı ve takibinde kullanılmasına rağmen, 1980'de Van Nagell I<sup>131</sup> bağlı anti CEA antikorlarını kullanarak primer over kanseri ve metastazlarının yerlerini göstermiştir(49).

#### HUMAN KORİONİK GONADOTROPİN (HCG):

HCG birbirinden farklı alfa ve beta subunitlerinden oluşan bir glikoproteindir(50). Molekül ağırlığı 45.000 dalton ve yarılanma ömrü 12-36 saattir(25,51). Alfa subunitelerinin primer yapıları human korionik gonadotropin, folikül sitümulan hormon, luteinizan hormon ve tiroid sitümulan hormonda birbirine benzerdir(29). Bununla beraber bu 4 hormonun beta subunitlerinin terminal uçları farklıdır(25). Plasentada sinsisyotrofoblast hücreleri tarafından sekrete edilir ve plazma seviyesi gebelikte fizyolojik olarak artar. 1972'de Vaitaitis ve arkadaşları beta subunitlerinin fizyolojik özelliklerine dayanarak HCG için oldukça spesifik bir radyoimmunoassay yöntemi geliştirdiler(50). Bu yöntem özellikle trofoblastik tümörlerde olmak üzere bütün diğer tümörlerde HCG'yi belirteç olarak değerlendirmek için pek çok araştırmacı tarafından kullanılmaktadır. HCG trofoblastik ve nontrofoblastik tümörler tarafından üretilir(25). Tümör spesifik antijen olmamasına rağmen, bütün trofoblastik tümörlerde plazma seviyesi kantitatif olarak artar ve tümör kitlesi ile orantılıdır(52). Braunstein ve arkadaşları koriokarsinomda selüller HCG artışını in vivo ve invitro olarak göstermişlerdir(53). Tedavi sonrası HCG ölçümleri ile trofoblastik tümörlerin takibleri yapılabilir ve tedavi rejimleri düzenlenebilir(29). Ayrıca seri olarak ölçülen HCG gerek gestasyonel ve gerekse nongestasyonel trofoblastik neoplazmaların tedaviye verdikleri cevabı yansıtır(54). Trofoblastik tümörlerde spesivite ve sensitivitesi oldukça yüksektir ve bu tümörler için mükemmel bir belirteçtir(25). Gonadal primitif germ hücre

tümörlerinin pek çok tipi içinde önemli bir belirteç olarak bilinir(27). İnflamatuvar barsak hastalıklarında % 18, duodenal ülserde % 17 ve karaciğer sirozunda % 11 oranında plazma HCG seviyesinin yükseldiği bulunmuştur(25). Nontrofoblastik tümörlerde de HCG plazma seviyesi yükselebilir. Akciğer, meme ve gastrointestinal malignitlerin % 10-30'unda, melanomlu hastaların % 9'unda ve lenfoproliferatif hastalıkların % 14'ünde yüksek plazma HCG seviyeleri bildirilmiştir(55). Tormey ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada plazma HCG düzeylerinin metastatik meme tümörlerinde % 48, lokalize meme tümörlerinde ise % 37 oranında yükseldiği bulunmuştur(56). Bazı tümörlerin total HCG yerine onun subünitlerini ürettiği bilinir(57).

HCG nontrofoblastik jinekolojik tümörlerin pek çoğu tarafından da üretilir. Örneğin serviks kanserli hastaların % 35'inde, endometrium kanserlilerin % 16'sında ve over kanserlilerin % 38'inde yüksek plazma HCG seviyeleri tespit edilmiştir(58). Fakat genellikle nontrofoblastik jinekolojik tümörlerde spesivite ve sensitivitesi yetersiz olduğundan herhangi bir şekilde kullanılmaz.

İmmunohistokimyasal çalışmalar ile trofoblastik ve nontrofoblastik tümörlerde HCG üreten hücreler tespit edilebilir. Bu yöntem bazı durumlarda tanı amacı ile de kullanılmıştır(59). HCG'den tümör lokalizasyon tesbitinde de faydalanılmıştır. Bu amaçla radioimmün sintigramlar kullanılmış ve I<sup>131</sup> bağlı anti HCG antikoru ile trofoblastik tümörlerin ve metastazlarının lokalizasyonu tesbit edilmiştir(19).

#### ALFA FETOPROTEİN (AFP):

Bir glikoprotein olan AFP'nin molekül ağırlığı 70.000 dalton civarındadır ve elektroforezde alfa 1 globulin fraksiyonunda yer alır(60,61). İnsan fetusunda yolk kesesi, karaciğer ve gastrointestinal traktus tarafından sentez edilen AFP, erişkin albumin fonksiyonlarının pek çoğunu fetal hayatta yapar ve bu dönemin önemli proteindir(5). Yarılanma ömrü 3.5-6 gün olarak bilinir(25). İlk olarak Abelev tarafından 1936'da transplant hepatosellüler karsinomlu fare plazmalarında gösterilmiştir(62). Hemen sonra hepatosellüler karsinomlu ve ovarial-testiküler germ hücre tümörlü hasta plazmalarında bulun-

muş(61) ve bu gözlemler fetal karaciğer ve yolk kesesi hücre kültürlerinde AFP'nin üretimi ile belirginlik kazanmıştır(63).Gebelikte fizyolojik olarak artan AFP'nin normal erişkin seviyesi 1-25 ng/ml'dir ve 12 haftalık fetusta bu seviye 3 mgr/ml'ye kadar yükselir(61). Viral hepatit, karaciğer sirozu ve obstrüktif ikter vakalarında plazma AFP düzeyi yükselir(60,61,64,65). Pek çok neoplazmlı hasta plazmasında AFP seviyesinin yükseldiği tespit edilmiştir. Örneğin pankreas kanserli hastaların % 23'ünde, mide kanserlilerin % 18'inde, kolon kanserlilerin % 5'inde ve akciğer kanserlilerin % 7'sinde plazma AFP düzeyi yükselir(25). Waldman ve Mc Intire RIA kullanarak yaptıkları bir çalışmada hepatosellüler karsinomlu hastaların % 72'sinde ve testiküler teratokarsinom ile embriyonal hücre kanserli hastaların % 75'inde 40 ngr/ml'nin üzerinde plazma AFP sonuçları bildirmişlerdir(61). Metastatik karaciğer hastalıklarında da plazma AFP düzeyi yükselir(66). Jinekolojik neoplazmalarda plazma AFP düzeyleri değişik oranlarda artar(67). Endodermal sinüs tümörlü hastaların % 100'ünde plazma AFP seviyelerinin yükseldiği tespit edilmiştir(68,69,70). Aynı oran embriyonal karsinomlar için % 59 olarak bulunmuştur(2). Easterhay ve Talerman'ın yaptıkları çalışmalar teratokarsinom vakalarında plazma AFP seviyesinin yükseldiğini göstermiştir(71,72). Sertoli-Leyding hücre tümörü olan vakalarda anormal AFP artışı olduğunu bildirmiştir(73). Yeterince spesifik olmamasına rağmen AFP germ hücre belirteci olarak bilinir.(25) Talerman ve arkadaşlarına göre tedavi sonrası seri olarak ölçülen plazma AFP seviyeleri endodermal sinüs ve miks germ hücre tümörlerinde hastalığın durumunu gösterir(74). Tadavi öncesi plazma AFP seviyesi ise doğrudan neoplazmın stage ile ilgilidir(75). Bütün bunlara rağmen AFP ile birlikte bir kaç tümör belirteci üreten miks germ hücre tümörlerinde tedavi sonrası serum AFP seviyelerindeki normalleşme, yalnızca endodermal sinüs elementlerinin tedaviye cevabını gösterir(29).

Germ hücre tümörlerinin spesefik hücre tipi immunohistokimyasal çalışmalar ile gösterilmiştir(76). Bu çalışmalarda AFP hiyalen damlalarda, sitoplazmada ve tümör intersellüler aralıklarında görülmüştür(29). Diğer tümör belirteçlerinde olduğu gibi AFP de tümör lokalizasyon tespit çalışmalarında kullanılmıştır. I<sup>125</sup> bağlı anti AFP antikoru kullanarak total vücut sintigrafisi ile fare hepatomlarının yerleri belirlenmiştir(29). Kim ve arkadaşları aynı yöntemi endodermal sinüs tümörü dahil AFP üreten bir çok tümöre uygu-

lamış ve bunların vücuttaki yerlerini tespit etmişlerdir(77).

## İMMUNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA METODLARI

Bazı durumlarda rutin olarak kullanılan heamatoxylin-Eosin boyası ile bir histolojik preparata tanı koyulamayabilir. Bu durumda özel boyama yöntemleri gereklidir. Bu yöntemler de yetersiz kalabilir. Ayrıca klasik boyama yöntemlerinin hiç biri incelenen doku hücrelerinin ürettiği veya ihtiva ettiği maddeleri yeterince gösteremez. Tanıya yardımcı olan hücre maddelerinin özel yöntemler ile gösterilmesi bir histopatolojist için çok önemlidir. Bu özel yöntemler ilk olarak 1942'de Coons, Jones, Creech ve Berline'in tarif ettiği immunofloresan antikor metodu ile gelişmeye başlamıştır(78). Doku antijenini tespit eden bu ilk yöntem, tıbbın ve biolojinin ilerlemesine önemli katkılar sağlamıştır.

İmmunofloresan tekniği patolojide yaygın olarak kullanılan immunohistokimyasal bir metoddur. Fakat uygulama güçlükleri çoğu zaman tanısal amaçlar ile kullanım imkanını sınırlamaktadır. Bu teknikle taze dokulardaki antijen, floresan boya bağlı ilgili antikor ile birleştirilir ve floresan mikroskopta görünür hale getirilir. Floresan metodların uygulamasında karşılaşılan pek çok güçlük 1966'da Avrameas ve Uriel ve aynı yıl Nakane tarafından immunokimyasal belirleyici (Tracer) olarak enzimlerin kullanılmaya başlanması ile giderilmiştir(79). 1968'de Nakane bir doku kesitinde iki farklı antijeni lokalize etmeyi başarmıştır(80). 1969'da Mason ve arkadaşları ile Sternberger ve 1970'de yine Sternberger ve arkadaşları immunohistokimyasal teknikleri formalinle fikse-parafine gömülmüş dokulara uygulamaya başladılar(79,81,82). Bu yöntem uygulamada büyük faydalar sağlamıştır. Belirleyici molekül olarak asit fosfataz, alkaline fosfataz ve glikoz oksidaz gibi bir çok enzim kullanılabilir, fakat çalışmaların çoğunda horseradish peroksidaz enzimi kullanılır(83,84). Bu nedenle bu yöntem immunperoksidaz yöntemi denir ve en önemli avantajlarından bazıları; teknikte ışık mikroskopunun kullanılması, tekniğin uygulamasından sonra preparatın diğer yöntemler ile boyanabilir olması ve boyanmanın kalıcı olmasıdır. Başlangıçta immunperoksidaz yönteminde, immunofloresan metotta kullanılan direk ve indirek boyama teknikleri kullanıldı(79). 1969'da Mason ve Sternberger bağlanmamış (işaretlenmemiş) anti-

kor enzim metodunu tarif ederek yöntemin duyarlılığında önemli ilerlemeler sağladılar(79,81,85). Bu yöntemin en büyük özelliği belirleyici enzim ile primer antikör arasında bir köprüleme antikörünün kullanılmasıdır. Bütün bu yeniliklere rağmen karşılaşılan problemler hala tümü ile giderilmemişti. Örneğin yüksek afiniteli antiperoksidaz antikörlerini üretmek büyük bir sorun teşkil ediyordu. Bu problemler 1970'de Sternberger ve arkadaşları tarafından peroksidaz antiperoksidaz yönteminin bulunması ile giderilmiştir(86). Araştırmacılar bu yöntemde tarif ettikleri PAP (Peroksidaz antiperoksidaz) kompleksini bağlanmamış antikör enzim metoduna ilave ederek hem işlemi kısaltmışlar, hem de antijene daha fazla enzim belirleyici bağlanmasını sağlamışlardır. Sternberger ve arkadaşları PAP metodunun indirekt floresan ve peroksidaz metodlarına nazaran 100 ile 1000 kat daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir(86). Bu yeniliklerden sonra immunperoksidaz metodu histopatoloji laboratuvarlarına hızla girmeye başlamış ve karşılaşılan problemlere yeni çözümler önerilmiştir. 1971'de Avrameas ve Ternynck indirek metod da bütün IgG yerine Fab fragmentini kullanmaya başlamıştır(83). 1981'de Hsu ve arkadaşları Avidin-Biotin peroksidaz metodunu tarif etmiş ve halihazırda en duyarlı yöntemin bu olduğu bildirilmektedir(87,88).

### İMMUNPEROKSİDAZ METODLARI:

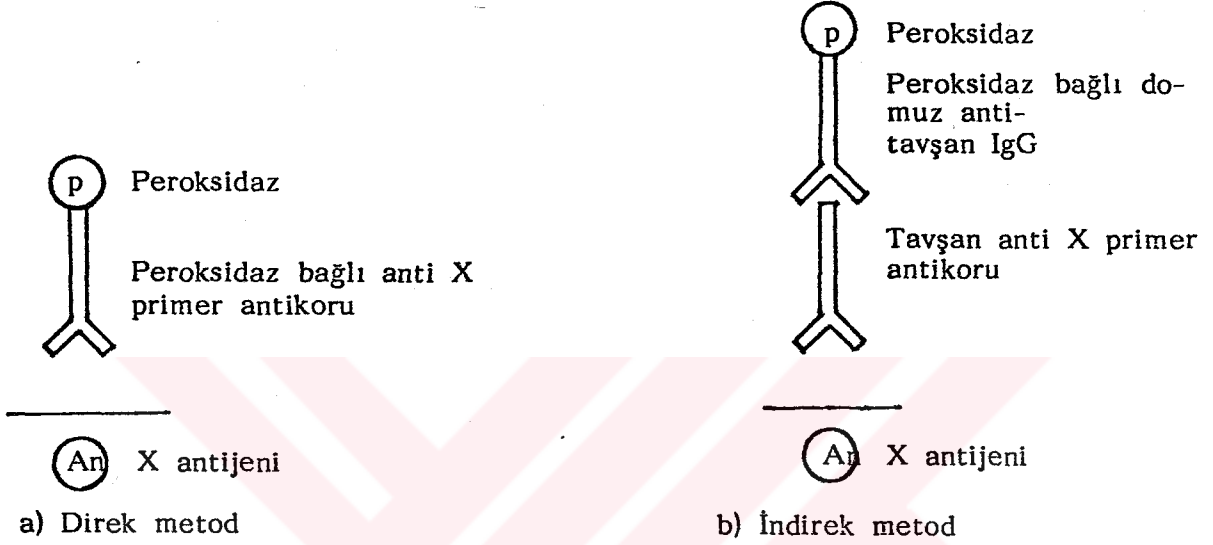
Bu metodların esası doku antijenlerine enzim bağlı antikörlerin bağlanması ve bu bağlanma yerlerinin bir boya yardımı ile görünür hale getirilmesidir.

Başlıca 8 başlık altında incelenirler:

**1-Direk metod:** Burada dokudaki antijene uygulanan primer antikör, horseradish peroksidaza kovalent bir bağla bağlıdır. Duyarlılığı az fakat uygulaması kolay bir yöntemdir (Şekil 1).

**2-İndirek metod:** Bu yöntemde doku kesitleri iki farklı antikör ile muamele edilir(89). Primer antikör serbest antikördür ve araştırılan antijene spesifiktir. İkinci antikör ise primer antikörün elde edildiği türün IgG'sine spesifik bir antikördür ve peroksidaz ile bağlıdır. Bu metod direk metoddan daha

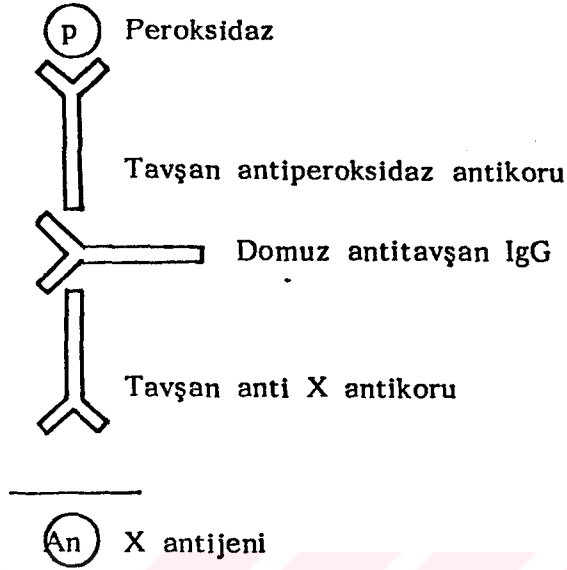
duyarlıdır ve daha az miktarda primer antiseruma gereksinim gösterir. ayrıca indirek immunfloresan metodunun analogudur(90). Şekil 1'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 1- Direk ve indirek immunoperoksidaz metodlar

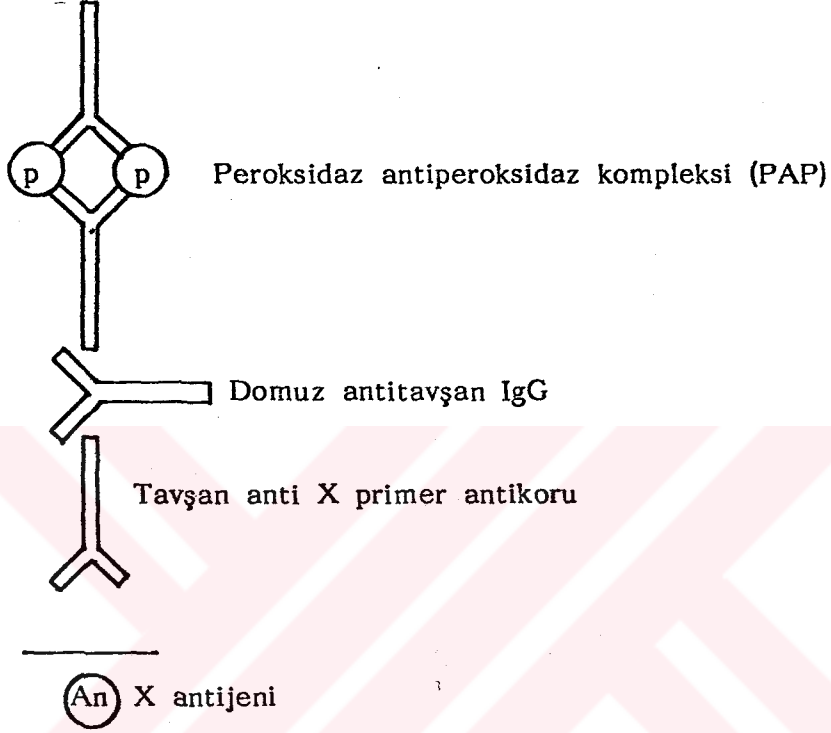
**3- İmmunoenzim köprü metodu:** Çok basamaklı bir metoddur. Primer ve sekonder antikor bir köprüleme antikoru ile birbirine bağlanır. Örneğin önce tavşandan elde edilen primer antikor doku kesitlerine uygulanır. Sonra domuz antitavşan IgG'sı işleme ilave edilir. Böylece bu bivalent molekülün 2 Fab birleşme yerinden biri primer antikorun Fc fragmanına bağlanır ve ikinci Fab yeri boşta kalır. Üçüncü basamak tavşandan elde edilen antiperoksidaz antikoru uygulamaya sokulur. Bu antikor antitavşan IgG molekülü olduğundan domuz anti tavşan IgG antikorununun serbest Fab yerine bağlanacaktır.

Son olarak doku kesitleri horseradish peroksidaz ihtiva eden bir solusyondan geçirilirler. Böylece enzim antiperoksidaz antikoru üzerindeki spesefik bağlanma yerlerine bağlanır. Bu bağı peroksidazlar histokimyasal bir yolla görünür hale getirilirler (Şekil 2).



Şekil 2- İmmünoenzim köprü metodu

4- Peroksidaz antiperoksidaz kompleksi kullanılan bağlanmamış antikor enzim metodu (PAP Metodu): İlk olarak Sternberger ve arkadaşları tarafından tarif edilmiştir(86). Burada ilk iki basamak immünoenzim köprü metodunun aynısıdır. Üçüncü basamakta olaya PAP (Peroksidaz antiperoksidaz) kompleksi ilave edilir ve kompleksteki tavşan IgG moleküllerinden birinin Fc fragmanı domuz antitavşan IgG'sinin serbest Fab kolu ile birleşir. Bundan sonra kompleksin peroksidaz komponenti histokimyasal bir yöntemle görünür hale getirilir. Bu metod Şekil 3'te şematik olarak gösterilmiştir. Burada kullanılan PAP kompleksi 2 tavşan antiperoksidaz antikorü ve 3 peroksidaz molekülünden oluşur(76,79). Pek çok çalışma PAP metodunun diğer yöntemlere nazaran daha duyarlı olduğunu belirtmiştir(90). Bu metodla ulaşılan duyarlılık seviyesi frozen kesitler kullanan immunfloresan tekniğini ikinci plana atmıştır(90). Bir antijenin bir çok antijenik determinanti vardır ve bunların büyük bir çoğunluğu dokunun fiksasyon ve parafine gömme işlemleri sırasında tahrip olur. PAP metodu geriye kalan birkaç antijenik determinanti gösterecek kadar duyarlıdır ve en çok kullanılan immunperoksidaz metodlarından biridir(90).



Şekil 3- Peroksidaz antiperoksidaz kompleksi kullanılan bağlanmamış antikor enzim metodu

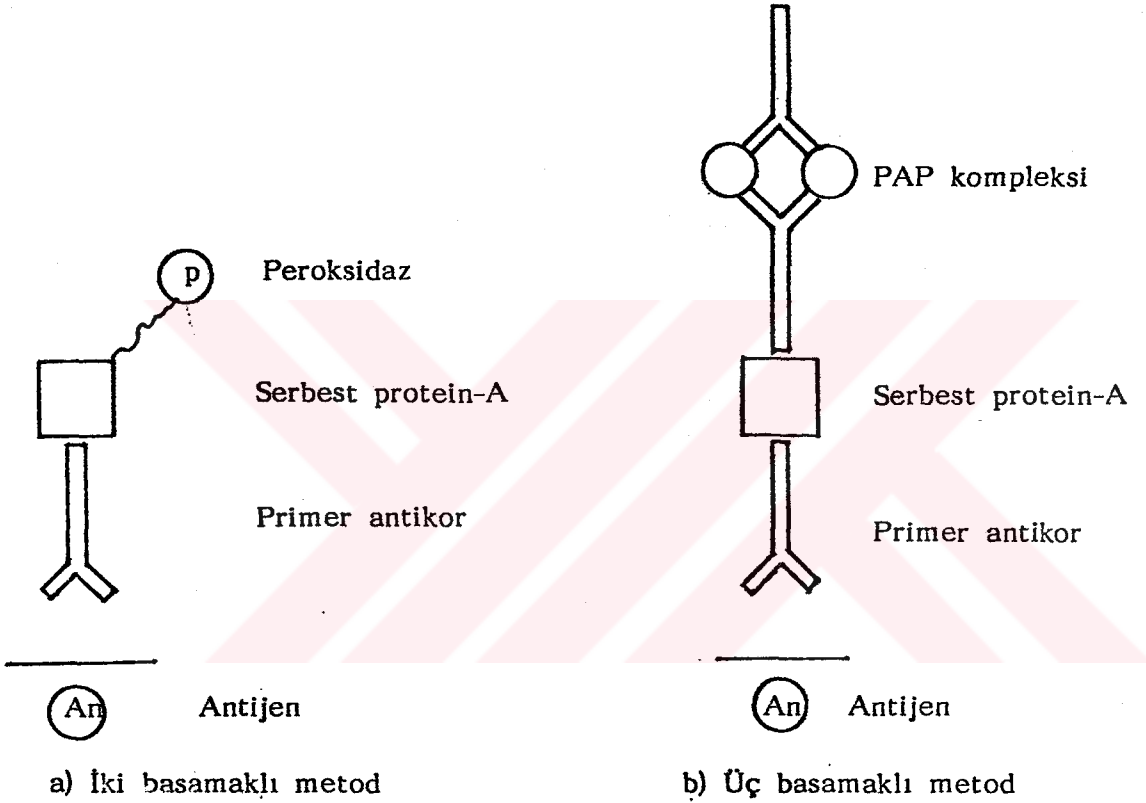
5- Protein-A'nın kullanıldığı immunoenzimatik metodlar: Staphylococcus aureus hücre duvarından elde edilen Protein-A immunperoksidaz tekniğinde kullanılabilir(21). Protein-A memelilerin pek çoğundan elde edilen IgG'nin Fc fragmanına spesifik olarak bağlanır(21). Ayrıca bu proteinin diğer bir özelliği fluorecein, peroksidaz veya alkalın fosfataz gibi bir çok yapıya özelliğini bozmadan bağlanabilmesidir(21). Protein-A'nın kullanıldığı iki immunperoksidaz metodu vardır:

a) İki basamaklı metod: Burada primer antikor peroksidaz bağlı Protein-A'ya bağlanır (şekil 4).

b) Üç basamak metodu: Bu metotta Protein-A primer antikor ile



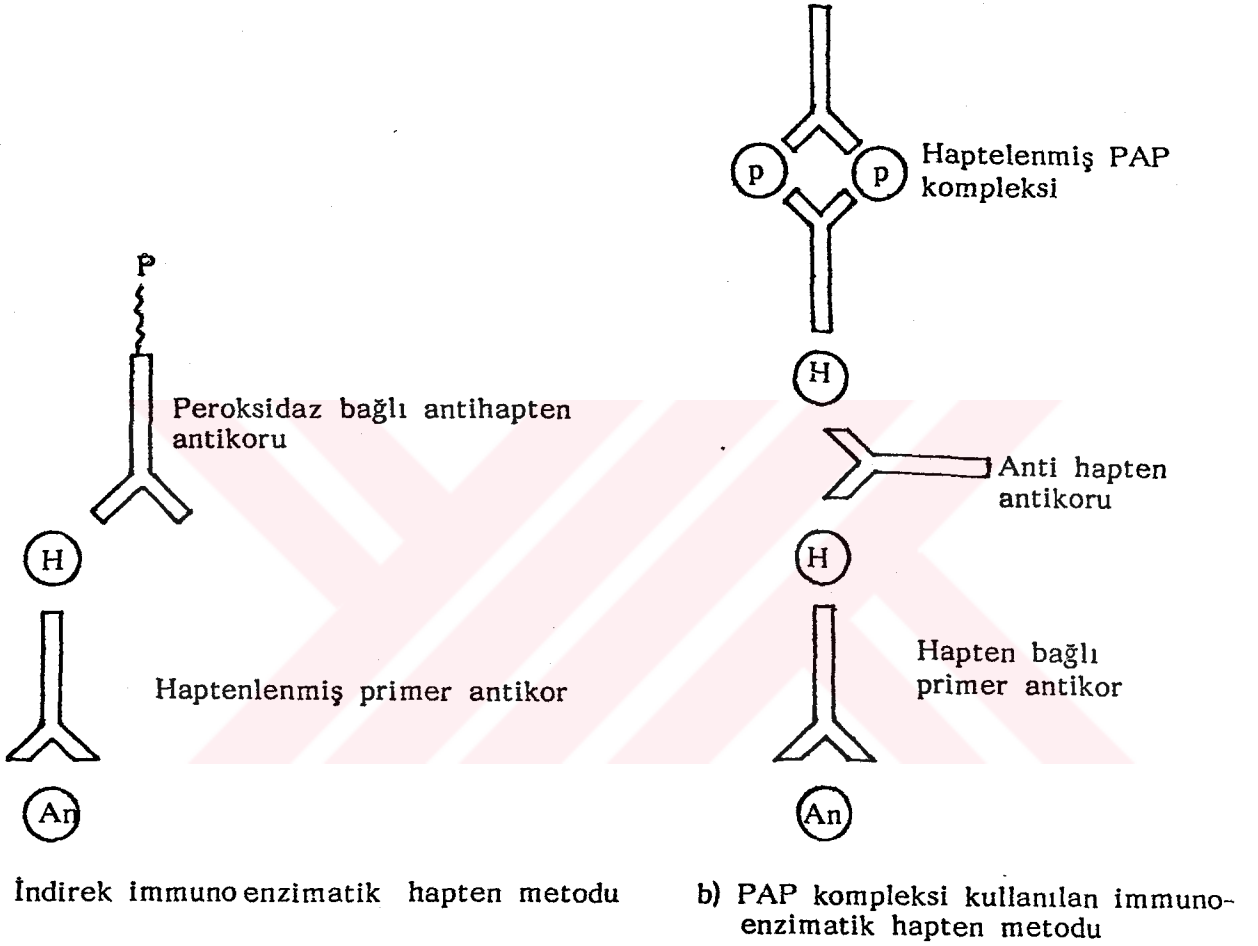
PAP kompleksi arasında köprü görevi görür(91). Metodun başlıca avantajları kolay uygulanabilir olması ve zemin boyamasının az olmasıdır. Protein-A metodlarının elektron mikroskopu çalışmalarında kullanılmasını önerenler vardır(92,93). Şekil 4'de 3 basamaklı metod şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 4- Protein-A'nın kullanıldığı immünoenzimatik metodlar

**6- Hapten kullanılan immünoenzimatik metodlar:** Bu metod immünoenzimatik çalışmalara 1981'de Jaseni ve arkadaşları tarafından katılmıştır(94). İki uygulama şekli vardır: Birincisinde hapten bağlı primer antikor peroksidaz bağlı antihapten antikoruna bağlanır ve bu yöntemde indirek immünoenzimatik hapten metodu denir (Şekil 5)(95). İndirek immünperoksidaz metodunun benzeridir. İkincisinde ise antihapten antikorunu hapten bağlı primer antikor ile haptenlenmiş PAP kompleksi arasında köprü görevi görür (Şekil 5). Bu da peroksidaz antiperoksidaz metodunun benzeridir(21). Hapten kullanılan immünoenzimatik metodlar klasik immunofloresan ve immünoenzim

metodlarından daha fazla duyarlıdır ve çok küçük doku antijenlerini bile tayin edebilirler(21).

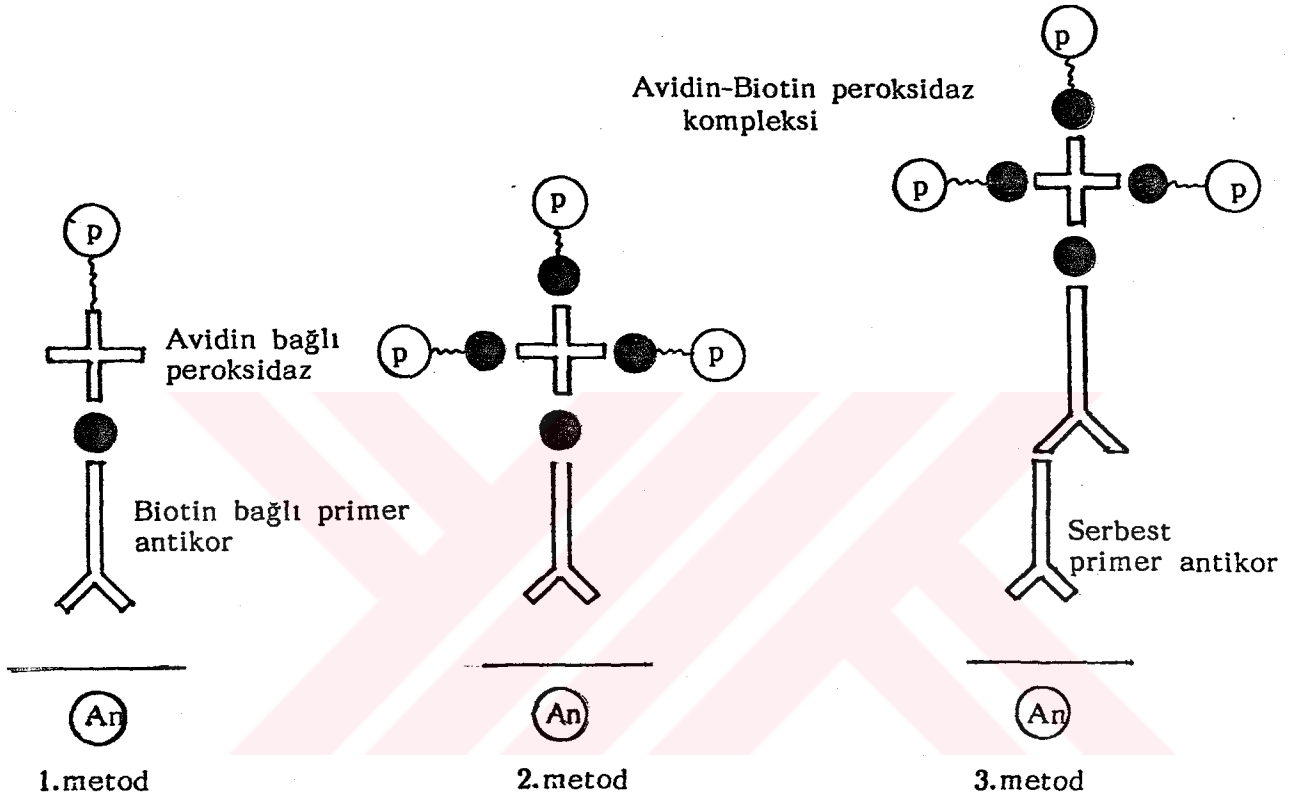


Şekil 5- Haptten kullanılan immunoenzimatik metodlar

#### 7- Avidin-Biotin kompleksi kullanılan immunoenzimatik metodlar:

Son yıllarda giderek artan sıklıkta kullanılan en duyarlı immunoenzimatik metodtur(87,88). Bu yöntemin temeli avidin in biotin'e olan yüksek afinitesine dayanır. Avidin bir glikoprotein, biotin ise vitamindir. Üç şekilde uygulanır, birincisinde biotin bağlı primer antikor peroksidaz bağlı avidine bağlanır. İkincisinde biotin bağlı primer antikor avidin-biotin peroksidaz kompleksine bağlanır. Üçüncüsü Warnke ve Levy'nin kullandığı bir metoddur(96). Burada serbest primer antikor biotin bağlı antiprimer antikoruna, o da avidin biotin

kompleksine bağlanır. Anlatılan tekniklerin 3'ü de Şekil 6'da şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 6- Biotin-Avidin kompleksi kullanılan immünoenzimatik metodlar

Avidin-Biotin-Peroksidaz kompleksi metodunda primer antikor diğer metodlardan daha yüksek dillüsyonda kullanılır(21). Bu metodun istenmeyen önemli iki özelliği vardır. Bunlardan birincisi biotin pek çok memeli dokuda bulunan bir vitamin ve koenzimdir, böylece endojen biotin reaksiyonu oluşturulabilir. Bu durum yanlış pozitiflik oranlarını artırır. Bunu önlemek için endojen biotin aktivitesi bloke edilmelidir(97,98). İkinci istenmeyen özellik ise avidin ve biotinün farklı hazırlanışlarının doğal afinitelerinde farklılıklar oluşturmasıdır.

8- Double immünoenzimatik metod: Bu metolla bir kesitteki iki farklı antijen aynı anda gösterilebilir(21). Uygulama sırasında doku kesitinde

farklı renkler oluşturmak için ya farklı substratchromogen sistemlere sahip horseradish peroksidaz ya da horseradish peroksidaz, alkalın fosfataz ve glikoz oksidaz gibi farklı enzimler kullanılır(21).

Yukarıda anlatılan bütün metodlarda sıklıkla horseradish peroksidaz olmak üzere enzimler belirleyici molekül olarak kullanılırlar. Fakat radioaktif izotoplar, ferritin ve ağır metallerde aynı amaç için kullanılabilir(21).

İmmunohistokimyasal çalışmalarda yöntem seçimi önemli bir konudur. Araştırmanın amacı ile birlikte dokunun ve kullanılacak antiserumun tipine göre belirlenir. Örneğin morfolojik detayların korunması çok önemli değilse ve taze doku mevcutsa immunfloresan metodu en uygun methoddur. Bu yöntemde doku antijenleri en iyi şekilde korunur(99). Fakat bu tekniğin pek çok olumsuz tarafı da vardır. Bunların başlıcaları yöntemde taze doku kullanılması, özel aletler ve karanlık odaya ihtiyaç duyulması, preparattan fotoğraf çekmenin zor olması, elektron mikroskobuna uygulanamaması, incelenen doku morfolojisini kısmen bozması ve ekipler arasında sıkı bir işbirliğinin gerekli olmasıdır(90,100,101).

Çalışmaların pek çoğunda morfolojik detayların korunması önemlidir ve yalnızca parafine gömülü doku kesitleri çalışma materyali olarak mevcuttur. Bu çalışmalara morfolojik detayları en iyi şekilde gösteren ve parafine gömülü doku kesitlerini kullanarak yapılan immunperoksidaz teknikler uygulanmalıdır(101). Bu teknikler ile yıllarca evvel otopsi ve cerrahi girişimler sonucu elde edilmiş ve fikse edilerek parafinde saklanmış dokuların antijenik yapıları ortaya çıkarılabilir ve boyalı preparatlar yıllarca saklanabilir(90) Histopatolojide tanı esas olarak retrospektiftir ve doku örnekleri formalinde fikse ve parafinde gömülü olarak bulunurlar. Bu sebepten immunperoksidaz metodunun alternatifi yoktur(21). İmmuno peroksidaz yöntemleri içinde en sık kullanılanlar ve en duyarlı olanlar sırayla indirek metod, PAP metodu ve avidin-biotin kompleks metodudur.(21,86). Bununla beraber bir çok çalışma indirek metodun bazı antijen grupları için en az diğer metodlar kadar duyarlı olduğunu göstermiştir(102,103). PAP ve avidin biotin kompleks metodunda primer antikor yüksek dilüsyonda kullanılır(21, 79). Bu durum primer antikorun pahalı olduğu durumlarda yöntem seçimini etkileyebilir.

İmmunperoksidaz çalışmalarında dokunun fiksasyon şekli immunoreaktivitenin korunmasında önemli derecede etkindir ve farklı fiksatif solüsyonların antijenik determinantlar üzerine olan etkisi farklıdır(104). İmmunperoksidaz çalışmaları için ideal bir fiksatif morfolojiyi korumalı, antijenin immunoreaktivitesini bozmamalı, difüzyon ve yer değiştirmesini önlemeli ve antijen antikor reaksiyonunu etkilememelidir. Yakın zamanlarda en sık kullanılan fiksatif solüsyonu % 10'luk formalin solüsyonudur. Bu solüsyon kullanılıyorsa tamponlanmalıdır ve dokunun fiksatif içinde kalma süresi morfolojiyi korumak için gereken süre kadar olmalıdır. Uzun fiksasyon süresi bir çok antijenin immunoreaktivitesini azaltır(104). Asidik reaksiyonda bekletilmiş ve tamponlanmamış formaldehit ile fiksasyon antijenik determinantları tahrip edebilir(79). Genel olarak asit ve ağır metaller gibi protein çöktüren ajanlar içeren fiksatifler, formaline nazaran immunoreaktiviteyi daha iyi korur(104). Ancak bu ajanlar ile primer fiksasyon immünserumun doku kesitlerine nonspesifik bağlanmasını arttırır. Bu sebepten Caron ve Banks dokuların 48 saat süresince nötral tamponlanmış formalin ile primer fiksasyonunu ve sonra % 10'luk formalin içindeki % 5'lik asetik asit ile sekonder fiksasyonunu önerirler(79,104). Bununla beraber immunohistokimyasal çalışmalarda doku fiksasyonu için en uygun fiksatiflerin düşük pH'lı Bouin ve civa klorür içeren B5 fiksatiflerinin olduğunu savunanlar vardır(76). Örneğin klasik fiksatif olan formalin AFP'nin polipeptit zincirlerini bozabilir ve antijenik yapısını değiştirebilir. Bu problem Bouin fiksatifi kullanılarak giderilebilir(76). Her şeye rağmen bütün antijenler için ideal bir fiksatif yoktur(105).

Fikse edilmiş dokularda saklama (gömme) işlemleri immunoreaktiviteyi etkileyen diğer bir faktördür. Erime noktası  $56^{\circ}\text{C}$  olan parafin mumu bu işlem için oldukça uygundur(79). Parafin yerine resin kullananlar da vardır. İmmunperoksidaz teknikler parafin doku bloklarından başka cryostat kesitlere, smearlere, imprintlere, hücre suspansiyonlarına ve doku kültür preparatlarına uygulanabilir(79).

Endojen peroksidazlar, fiksasyon süresince maskelenmiş antijenik bölgeler ve zemin (background) boyanması immünperoksidaz çalışmalarında en sık karşılaşılan problemlerdir.

Pseudoperoksidaz reaksiyon veren enzimler ve peroksidazlar lökosit, eritrosit ve östrojen hedef doku hücreleri gibi pek çok normal ve neoplastik hücrede mevcuttur. Bunlar değerlendirmede sorunlar yaratırlar. Endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için pek çok yöntem vardır. Bu amaç için doku kesitleri hidrojen peroksit ihtiva eden absolu metanol içinde ön enkübasyona tabi tutulurlar(106). Heyderman ve Nevile incelenen antijenin karbonhidrat olmadığı durumlarda hidrojen peroksit ve sodyum borhidrid'i önerirler(79).

Maskelenmiş antijenlerin immunoreaktivitesi proteolitik enzimler ile yeniden ortaya çıkarılabilir(107). Marphan ve arkadaşları bu amaç için pH 7.8 ve 37°C'de % 1'lik  $Ca^{++}$  clorid içindeki % 0.1'lik trypsin ile yapılan işlemin iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir(107). Tripsinizasyon pek çok araştırmacı tarafından kullanılmaktadır(79).

Zemin (background) boyanması spesifik ve nonspesifik olmak üzere ikiye ayrılır. Spesifik zemin boyanması sıklıkla sorun oluşturmaz. Bu tip boyanma primer antiserumun iyi hazırlandığı durumlarda görülmez. Uniform zemin rengi olarak tarif edilen nonspesifik zemin boyanmasının asıl sebebi doku kesitlerindeki bazı bölgelerde spesifik immuneserumun nonimmünolojik bağlanmasıdır(108). Bu tip boyanma PAP metodunda daha az oluşur. Nonimmünolojik bağlanma yerleri bloke edilerek nonspesifik zemin boyanması önlenbilir(90). Bu bağlanma yerleri doku kesitleri primer spesifik Ig ile reaksiyon vermeyen bir Ig ile enkübe edilerek bloke edilir(90). Blokan Ig kaynağı olarak sekonder antikorun elde edildiği türün tam serumu kullanılır. Bazı araştırmacılara göre doku kesitlerinin enzimatik ön işlemi nonspesifik zemin boyanmasını azaltır(109). Nonspesifik zemin boyanmasını azaltan diğer önemli bir faktör endojen peroksidaz aktivitesinin ortadan kaldırılmasıdır(106). Bütün bu faktörlerden başka genel olarak primer antikorun yüksek dilüsyonda kullanılması zemin boyanmasını büyük çapta önler(76).

Bir immunperoksidaz tekniği uygulanırken optimal boyama elde edebilmek için primer antiserum (antikor)'un uygun dilüsyonda kullanılması gerekir. Uygun olmayan dilüsyon oranı özellikle antijenden zengin dokularda yanlış negatif sonuçlar verir. Bu boyanma inhibisyonuna steric inhibisyon

denir. Ancak herhangi bir serumun uygun dilüsyon oranını bulmak oldukça güçtür. Çünkü bir örnek için uygun olan dilüsyon başka bir örnek için uygun olmayabilir. Böylece test edilmemiş bir serum bilinen bir dokuya uygulandığında, veya test edilmiş bir serum bilinmeyen bir dokuya uygulandığında negatif sonuçları ortadan kaldırmak için pek çok dilüsyon serisi kullanılmalıdır. Teorik olarak çok basamaklı metodlarda her bir basamağın antikor dilüsyonu ayrı ayrı tespit edilmelidir. Pratik uygulamada ise yalnızca primer antikorun dilüsyon veya konsantrasyon oranı değişiktir. Örneğin PAP metodunda köprüleme molekülü için 1/20 ve PAP kompleksi için 1/60 dilüsyonları sabit dilüsyon oranlarıdır. Yalnızca primer antikorun dilüsyon oranı uygulamadan uygulamaya değiştirilir. Optimal antikor dilüsyonu elde etmek için Beutner, Denk ve Shu'nun geliştirdiği bir titrasyon sistemi kullanılabilir(79).

Tekniklerin uygulaması sırasında antiserumun buharlaşmasını önlemek için bütün enkübasyonlar nemli ortamda yapılmalı ve kesitler basamaklar arasında TRIS/HCL tamponlanmış tuz ile yıkanmalıdır. Bazı araştırmacılar yıkama solusyonuna BRIJ 96 gibi deterjanların ilavesini önerirler(103).

İmmuno peraksidaz çalışmalarında antijen pozitif bölgeleri değerlendirmek için enzim bağlanma yerlerinin histokimyasal bir metodla görünür hale getirilmesi gerekir. Bu amaç için en sık kullanılan metod Graham ve Karnovsky'nin tarif ettiği metottur(110). Burada boyama işlemi için diaminobenzidin (DAB) kullanılır ve boyanma yerleri ışık mikroskopunda incelenir. DAB boyaması yerine Phnylenediamine pyrocatechol boyası kullananlar da vardır. Fakat bu boya ile daha koyu bir boyanma oluşur. Bunlardan başka peroksidazları görünür hale getirmek için pek çok metod vardır(111,112).

Immunohistokimyasal metodların spesivitesini ortaya çıkarmak için yapılması gereken bir çok kontrol yöntemi vardır.

Bunlar sırasıyla:

a) Antijen taşıdığı veya taşımadığı bilinen kontrol dokularını kullanmak.

- b) Primer antiserumu spesefik bir antijenle önceden bloke etmek
- c) Aynı türden elde edilmiş normal serumla primer antiserumun yerini değiştirmek, şeklinde uygulanırlar.





## MATERYAL ve METOD

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı ameliyat servisine çeşitli tanılar ile 1987-1988 yılları arasında yatırılan ve ameliyat edilen 41 olgu çalışma kapsamına alındı. Bu olguların ameliyat piyeslerinden hazırlanmış parafin doku blok kesitleri, hematoxylin eosin boyası ile boyanarak histopatolojik tanı koyuldu ve malign tümörlerin diferansiasyon derecesi tespit edildi. Buna göre olguların dağılımı: 22'si malign jinekolojik tümör 14'ü selim jinekolojik tümör ve 5'i de nontümöral hastalık şeklinde idi. Selim tümörlerden ve nontümöral hastalıklardan oluşan olgular kontrol grubu olarak alındı. Bu 41 olgudan elde edilen formalinle fikse ve parafine gömülmüş aynı doku blok kesitlerine immunohistokimyasal boyama uygulandı. Dokular CEA, AFP ve HCG olmak üzere üç tümör belirteci için tarandı. Boyama yöntemi olarak seçilen bağlanmamış antikor peroksidaz-antiperoksidaz tekniği, her bir vakanın 2 veya 3 doku bloğuna uygulandı. Bu amaç için DPC Immustain HCG, AFP ve CEA universal kiti seçildi. Parafin doku bloklarından 3-5 mikron kalınlığında doku kesitleri yapıldı ve dokuyu lama yapıştırmak için % 1'lik jelatin kullanıldı. Her bir örnek için en az 2 lam hazırlandı ve bunlardan biri negatif kontrol lamı olarak kabul edildi. Bütün işlemler yaklaşık 22°C olarak kabul edilen oda ısısında yapıldı. Hazırlanan doku kesitlerini parafinden temizlemek ve rehidrate etmek için önce xylene sonra etil alkolden geçirdik. Dokudaki endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için ise kesitler, 30 dakika süresince methanol içindeki % 0.3'lük hidrojen peroksid ile muamele edildi. Bundan sonra sırasıyla:

1- Kesitler 30 dakika süresince 0.05 M Tris tampon (0.2 M trisamino-methane: (CH<sub>2</sub>OH<sub>2</sub> CNH<sub>2</sub>) içindeki % 3'lük normal tavşan serumundan olu-

şan nonspesifik blokan ajan ile muamele edildi.

2- Fazla serum kurutma kağıdı ile alındıktan sonra, kesitler +40 C'de 24 saat süresince Tris tampon ile tamponlanmış % 1'lik normal tavşan serumu içindeki % 0.1'lik primer anti serum ile muamele edildi. Bu sırada negatif kontrol kesitlerine de kontrol reageni uygulandı.

3- Kesitler 3 kez ikişer dakikalık süreler ile Tris tamponda çalkalandı. Bundan sonra 30 dakika süresince Tris tampon içindeki % 20'lik koyun antitavşan IgG ile muamele edildi.

4. Yukardaki Tris tampon ile yıkama işlemi tekrarlandı ve kesitlere tavşanda hazırlanmış peroksidaz-antiperoksidaz (PAP) kompleksi uygulandı.

5. Kesitler üç kez ikişer dakikalık süreler ile Tris tamponda çalkalandı ve pH 7.2'de 0.05 M tris tampon içindeki % 0.05'lik diaminobenzidine tetrahydrochloride ve % 0.01'lik hidrojen peroksid ile muamele edildi.

Bu işlemlerden geçirilen kesitler hematoxylen ile 30-60 saniye süresince boyandı. Hazırlanan preparatlar lamel ile kapatıldıktan sonra adi ışık mikroskobunda incelendi. Pozitif değerlendirme için tararan alanların en az 1/4'ünde kırmızı-kahverengi boyanan antijen pozitif bölgeler arandı. Sonuçlar pozitif ve negatif olarak değerlendirildi.

Her bir olgunun kan örnekleri ameliyat gününde; ameliyattan 1 hafta ve 4 hafta sonra olmak üzere 3 kez alındı. Kubital venden alınan kanların serumları ayrıldı ve - 200 C'de test gününe kadar muhafaza edildi. Plazma CEA, AFP ve HCG konsantrasyonları sırasıyla pharmacia CEA, RIA 100, Amerlex-m AFP ve beta HCG kitleri kullanılarak tespit edildi. Normal değerler CEA için 0-2.5 ngr/ml, AFP için 0-20 ngr/ml ve HCG için 0-10 mIU/ml olarak alındı. Kullanılan bütün tümör doku ve hasta kan örnekleri ayrı ayrı kodlandı. Böylece immunperoksidaz boyamayı yapan ve plazma belirteç düzeyini tespit eden araştırmacılar olguların tanısını ve durumunu bilmeksizin çalıştılar.

Çalışmamızın istatistiksel hesapları ki kare ve Fisher testleri kullanılarak yapıldı.

## BULGULAR

Olguları malign jinekolojik tümör ve kontrol grubu olmak üzere iki başlık altında inceledik. Malign jinekolojik tümör grubunda 22 olgu, kontrol grubunda ise 19 olgu çalışma kapsamına alındı. Malign jinekolojik tümörlerin dağılımı; 6 endometrial kanser, 4 serviks kanseri, 6 over kist adenokanseri, 1 krukenberg tümörü, 1 over clear-cell kanseri, 1 anaplastik over kanseri, 1 sarkoma uteri, 1 granüloza hücre tümörü ve 1 koriokarsinom şeklindedir (Tablo 1). Bu gruptaki 6 over kist adenokanseri, 1 over clear-cell kanseri, 1 anaplastik over kanseri ve 1 krukenberg tümörü olgusunu epitelyal over kanserleri başlığı altında topladık. Krukenberg tümörü primer over kanseri olmamakla birlikte, epitelyal tümör olması nedeni ile bu grupta incelenmiştir.

Kontrol grubu 9 myoma uteri, 5 selim over kisti, 3 normal doku (periton, tuba, omentum) ve 2 infeksiyon olgusundan oluşmaktadır (Tablo 2). Olguların yaş ortalaması malign tümörlü hastalarda 46.8 (26-60) ve kontrol grubunda ise 45.2 (30-59) olarak bulundu.

Tablo 3'de jinekolojik malign tümör dokularının, immunohistokimyasal boyama ile tespit edilen belirteç profilleri görülmektedir. CEA en sık epitelyal over tümörlerinde bulundu ( $p > 0.05$ ). Bunu sıklık sırasına göre % 50 ve % 33'lük oranlar ile serviks kanseri ve endometrial kanser takib ediyordu ( $p > 0.05$ ). Epitelyal over kanserlerinin kendi aralarındaki belirteç dağılımı Tablo 4'de görülmektedir. Burada dikkati çeken özellik 6 over kist adenokanser olgusunun 4'ünde CEA'nın bulunmasıdır. CEA gibi AFP ve HCG'de sırasıyla % 34 ve % 45 oranları ile en sık epitelyal over tümörlerinde tespit edildi

TABLO 1

Malign Tümörlerin CEA, AFP ve HCG İçerikleri ve Bu Belirteçlerin Plazma Seviyeleri

(X)	CEA (ngr/ml)			AFP (ngr/ml)			HCG (mIU/ml)					
	D	PRE	IPO	2PO	D	PRE	IPO	2PO	D	PRE	IPO	2PO
Over kist adenokanser	+	0.5	0.1	0	-	7.5	8.5	8.8	+	56	11	7
	+	10.5	8.2	0	-	7	7	8	-	1	1	1
	-	0.1	0	0	-	6.5	6	5	-	1	1	1
	-	1.3	3.2	0	+	8.5	9	8	-	1	1	1
	+	1.7	1	1	-	1	1	1	+	1	1	1
	+	6	7	8.3	+	2	2.5	3	+	19	11	7
Krukenberg tümörü	+	5	1.5	2.5	-	4	3.2	4.8	+	1.3	1	3
Over clear-cell kanseri	-	0.2	1	1	+	170	36	8.5	-	2	3.4	5
Anaplastik over kanseri	+	0.4	0	2.2	-	12	6.5	9	-	3	3	2
Granüloza hücre tümörü	+	1.1	1	1	-	2	2	2.2	-	1	1	1

TABLO 1  
(devam)

(X)	CEA (ngr/ml)			AFP (ngr/ml)			HCG (mIU/ml)					
	D	PRE	IPO	2PO	D	PRE	IPO	2PO	D	PRE	IPO	2PO
Endometrial kanser												
-	1.5	1.5	1.5	2	-	8	4.8		-	3.5	4	
+	3	2	2	2	-	3.3	3	2	-	1.1	1	1
-	1.5	1.5	1	1	-	1.5	4	3	-	2	2.1	1
-	0.9	1	2	2	-	3.1	2	2.1	-	1	1	1
+	3.5	2.5	2	2	-	3	3	4	-	1	1	1
-	1.3	0	2	2	-	3	5.2	5	-	8.1	3	4
Serviks kanseri												
-	2.8	1.8	1.7	1.7	-	8.5	15	9	-	2	3	3.7
+	6.5	4	3	3	+	3	3	3.2	+	19	17	9.5
-	0	0	0	0	-	1.2	3	4	-	1	2.3	2
+	9	6.3	6	6	-	2	3.4	4	-	1	1	1
Sarkoma Uteri												
-	1	1.6	1	1	-	6.5	6	8.1	-	1	2	3.2
Koriokarsinom												
-	1	0	0	0	-	7.5	10.5	7	+	20000	1800	60

(X) D: Dokuda belirteç varlığı  
 PRE: Ameliyat öncesi plazma belirteç seviyesi  
 IPO: Ameliyattan 1 hafta sonra plazma belirteç seviyesi  
 2PO: Ameliyattan 4 hafta sonra plazma belirteç seviyesi

TABLO 2  
Kontrol Grubu Dokularının CEA, AFP ve HCG İçerikleri ve Bu Belirteçlerin Plazma Seviyeleri

(X)	CEA (ngr/ml)			AFP (ngr/ml)			HCG (mIU/ml)					
	D	PRE	IPO	2PO	D	PRE	IPO	2PO	D	PRE	IPO	2PO
Myoma uteri												
-	0.3	1.3	1.3	0.2	-	8.5	8.8	10	-	1	4.2	2
-	0	0.8	0.1	0.1	-	8	7	8.5	-	2	6	1.7
-	1.1	0.2	0.5	0.5	-	9.2	7.5	10	-	2	2.1	3.1
-	2.1	0	0.1	0.1	-	9.3	7.5	7.6	-	1	1	1
-	1.8	1.4	1.6	1.6	-	7.5	5	5	-	3.1	1.9	4
-	0.2	2	1.9	1.9	+	7.5	5	4.1	-	1.2	2.4	2
+	0.2	1.7	1.3	1.3	-	7.5	5	5.5	+	1	2	1
+	0.1	2.4	0.8	0.8	+	13	11	12	-	2	2	2
-	1	1.3	2.2	2.2	+	8.5	8	10	-	1	1	1
Selim over kisti												
+	1.3	1.3	0	0	-	11	9	12.5	-	2.2	2.4	2.6
-	0.7	0.7	0.7	0.7	-	1	0.9	1	-	1	1	1
+	4.2	2.8	2.6	2.6	+	10.9	8.5	12.5	+	11	4	6
-	0.4	0	2	2	+	9.2	9.2	11.5	-	5	4.2	3
+	0.1	0.5	1.9	1.9	-	2	1	1	-	3.1	3	3.2

TABLO 2  
(devam)

(X)	CEA (ngr/ml)			AFP (ngr/ml)			HCG (mIU/ml)					
	D	PRE	IPO	2PO	D	PRE	IPO	2PO	D	PRE	IPO	2PO
Dokuda malignite yok												
+	2.8	1	2.7	2.7	-	3	2	1	+	1.4	9.7	1.2
-	1.2	0.8	2	2	-	1	5	4.2	-	3.1	1	2
-	0.1	0	0	0	-	9	2	9.3	-	2	3.7	2.1
İnfeksiyon												
-	0	3	2	2	-	2	3.1	2	-	2	2.1	2.2
+	0.1	0.1	0.5	0.5	-	2.2	2	2	-	1	1	1

(X) D: Dokuda belirteç varlığı

PRE: Ameliyat öncesi plazma belirteç seviyesi

IPO: Ameliyattan 1 hafta sonra plazma belirteç seviyesi

2PO: Ameliyattan 4 hafta sonra plazma belirteç seviyesi

TABLO 3

Jinekolojik Malign Tümörlerde İmmunohistokimyasal Olarak  
CEA, AFP ve HCG Tespit Edilme Oranları  
(p>0.05)

	CEA		AFP		HCG	
	n	%	n	%	n	%
Endometrial kanser	6	33	6	0	6	0
Serviks kanseri	4	50	4	1	4	25
Sarkoma Uteri	1	0	1	0	1	-
Koriokarsinom	1	0	1	0	1	1
Epitelyal over kanseri	9	67	9	3	9	45
Granüloza hücre tümörü	1	1	1	0	1	0
TOPLAM	22	50	22	4	22	6
		$\chi^2:0.86$		$\chi^2:3.07$		$\chi^2:6.68$



TABLO 4

Epitelyal Over Kanserlerinde İmmunohistokimyasal Olarak  
CEA, AFP ve HCG Tespit Edilme Oranları

	CEA		AFP		HCG	
	n	+	n	+	n	+
Over kist adenokanser	6	4	6	2	6	3
		66		33		50
Krukenberk tümörü	1	1	1	0	1	1
		-		-		-
Over Clear-Cell kanseri	1	0	1	1	1	0
		-		-		-
anaplastik over kanseri	1	1	1	0	1	0
		-		-		-

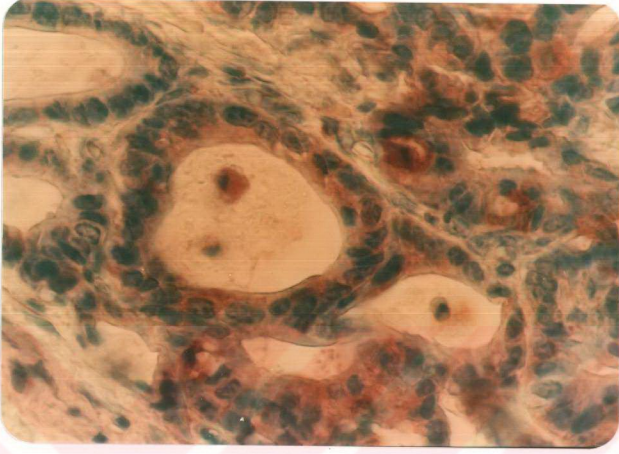
( $p > 0.05$ ) (Tablo 3). Beklendiği şekilde bir sarkoma uteri olgusunda çalışılan belirteçlerin hiçbiri gösterilemedi. Ayrıca endometrial kanser, koriokarsinom ve granüloza hücre tümörü olgularının hiçbirinde AFP ve HCG tespit edilmedi. Serviks kanseri olgularının % 25'inde immunohistokimyasal olarak AFP ve HCG bulundu ( $p > 0.05$ ).

Nonmalign olgulardan oluşan kontrol grubunda ise doku belirteç dağılımı Tablo 5'de görülmektedir. Burada immunohistokimyasal boyama ile over kistlerinin % 60'ında CEA, % 40'ında AFP ve % 20'sinde HCG'nin bulunduğu tespit edildi ( $p > 0.05$ ). Aynı oranlar myoma uteri için sırasıyla % 22, % 33 ve % 11 şeklindedir ( $p > 0.05$ ). Bundan başka 3 normal doku ve 2 infeksiyon olgusunun birinde CEA tespit edildi. Burada adı geçen infeksiyon olgularından biri tüberküloz peritonit diğeri ise tubo-overyal apsedir. Sonuç olarak immunohistokimyasal boyama ile malign jinekolojik olguların % 50'sinde, kontrol grubu olgularının ise % 37'sinde CEA pozitifliği tespit edildi ( $p > 0.05$ ). Bunun yanında AFP malign olguların % 18'inde, kontrol grubu olgularının % 26'sında, HCG ise malign olguların % 27'sinde kontrol grubu olgularının ise % 16'sında tespit edildi ( $p > 0.05$ ) (Tablo 3-5). İmmunohistokimyasal boyama ile dokudaki belirteç pozitifliği Resim 1-4'de görülmektedir. CEA'nın genellikle hücre membranlarında ve apikal tarafda yoğunlaştığı görüldü. Aynı şekilde gland lümenlerinde de tespit edildi. AFP ve HCG'nin ise tümör hücre sitoplazmasında yoğunlaştığı görüldü.

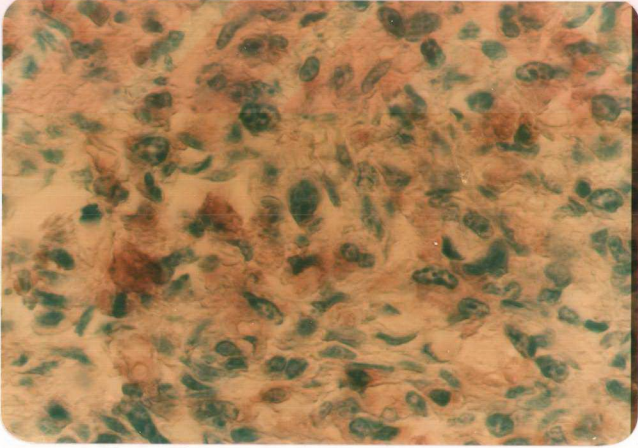
Malign tümörlü 22 olgunun 8'inde (% 36) ameliyat öncesi CEA seviyesi 2.5 ngr/ml'nin üzerinde bulundu ( $p > 0.05$ ) (Şekil 7, Tablo 6). Aynı oranın kontrol grubunda % 10 olduğu görüldü ( $p > 0.05$ ) (Şekil 7, Tablo 6). Şekil 8-9 ve Tablo 6'da incelenen toplam 41 olgunun ameliyat öncesi plazma AFP ve HCG seviyeleri görülmektedir. 22 malign tümörlü hastanın 1 (% 4) inde AFP ve 4 (% 18) ünde HCG normalden yüksek bulundu (Tablo 6). 19 selim jinekolojik olgunun hiçbirinde AFP yükselmesi tespit edilemezken 1 (% 5) olguda HCG normal seviyenin üzerinde bulundu (Tablo 6). Tablo 1 ve 2'de 41 olgunun plazma belirteç seviyeleri kantitatif olarak görülmektedir. Her bir malign tümör türü ameliyat öncesi serum seviyeleri yönünden incelendiğinde endometrial kanserli hastaların % 33'ünde, serviks kanserli hastaların % 75'inde ve epitelyal over kanserli hastaların % 33'ünde plazma CEA seviyesinin 2.5

TABLO 5  
Nonmalign Oluşumlarda İmmunohistokimyasal Olarak  
CEA, AFP ve HCG Tespit Edilme Oranları  
( $p>0.05$ )

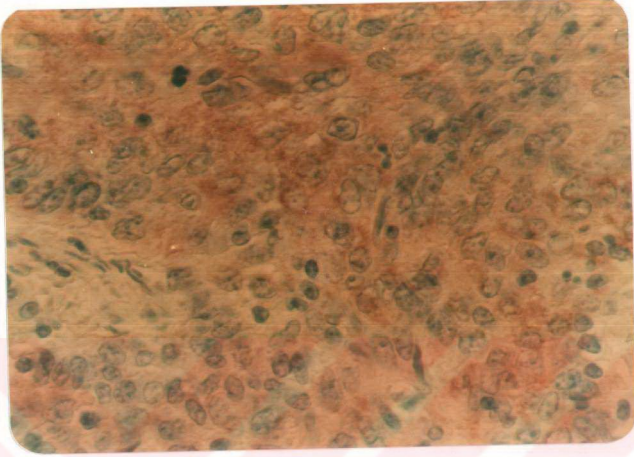
	CEA		AFP		HCG	
	n	%	n	%	n	%
Over kisti	5	60	5	40	5	20
Myoma uteri	9	22	9	33	9	11
Malignite görülmeyen doku	3	33	3	-	3	33
İnfeksiyon	2	50	2	-	2	-
TOPLAM	19	37	19	26	19	16
		$\chi^2:1.03$		$\chi^2:0.19$		$\chi^2:0.26$



Resim 1- Bir over kist adenokanser dokusunda kahverengi kırmızı odaklar halinde görülen CEA pozitifliği



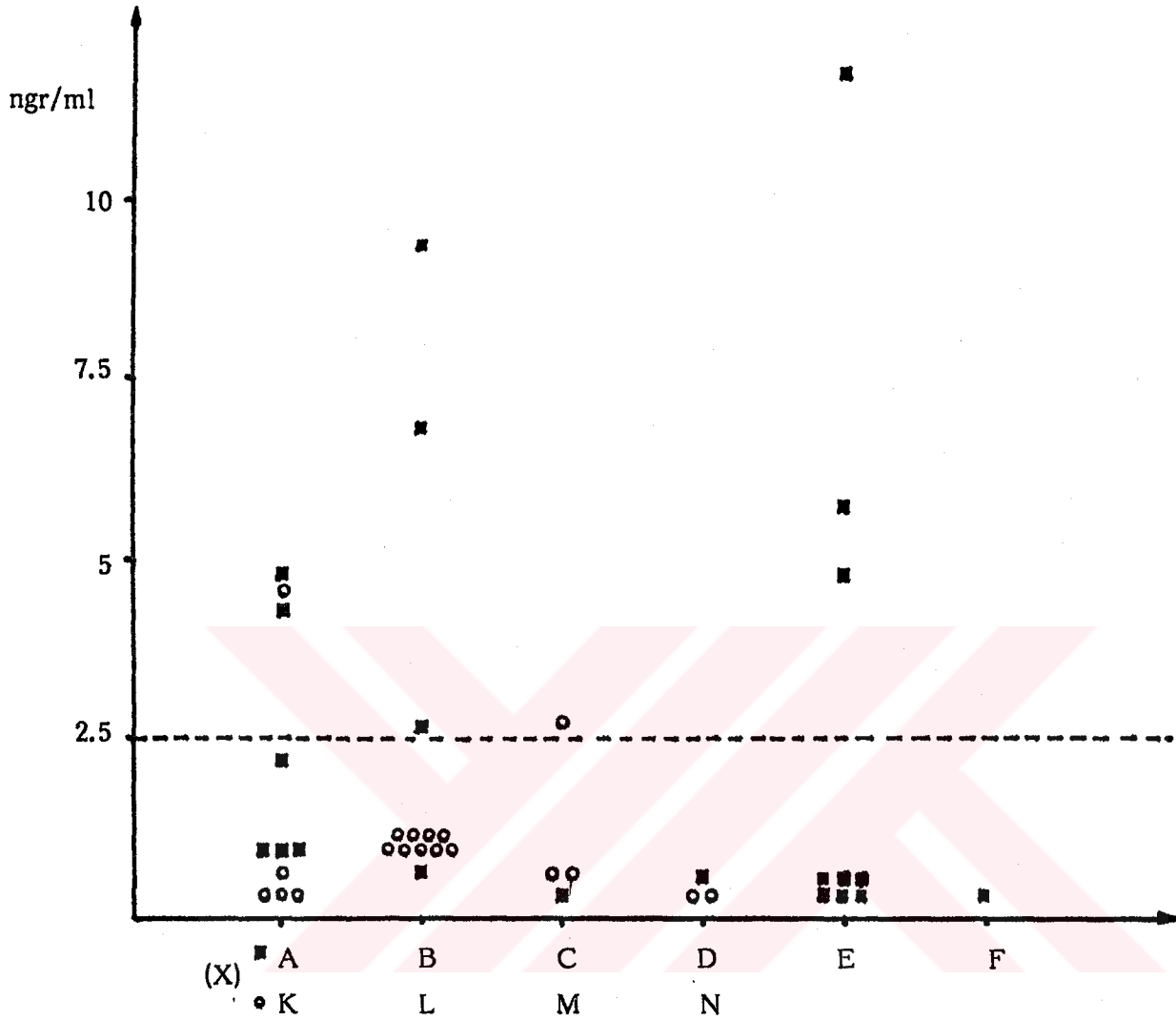
Resim 2- Bir Krukenberg tümörü dokusunda daha çok hücre sitoplazmalarında görülen kahverengi kırmızı HCG antijen pozitif bölgeleri



Resim 3- Bir serviks kanseri dokusunda kahverengi kırmızı odaklar halinde görülen AFP pozitifliği



Resim 4- Bir endometrial kanser dokusunda kahverengi kırmızı odaklar halinde görülen CEA pozitifliği



Şekil 7- Malign ve kontrol grubu olgularında ameliyat öncesi plazma CEA dağılımları

(X) A: Endometrial kanser

B: Serviks kanseri

C: Sarkoma uteri

D: Koriokarsinom

E: Epitelyal over kanseri

F: Granüloza hücreli tümör

K: Over kisti

L: Myoma Uteri

M: Malignite görülmeyen doku

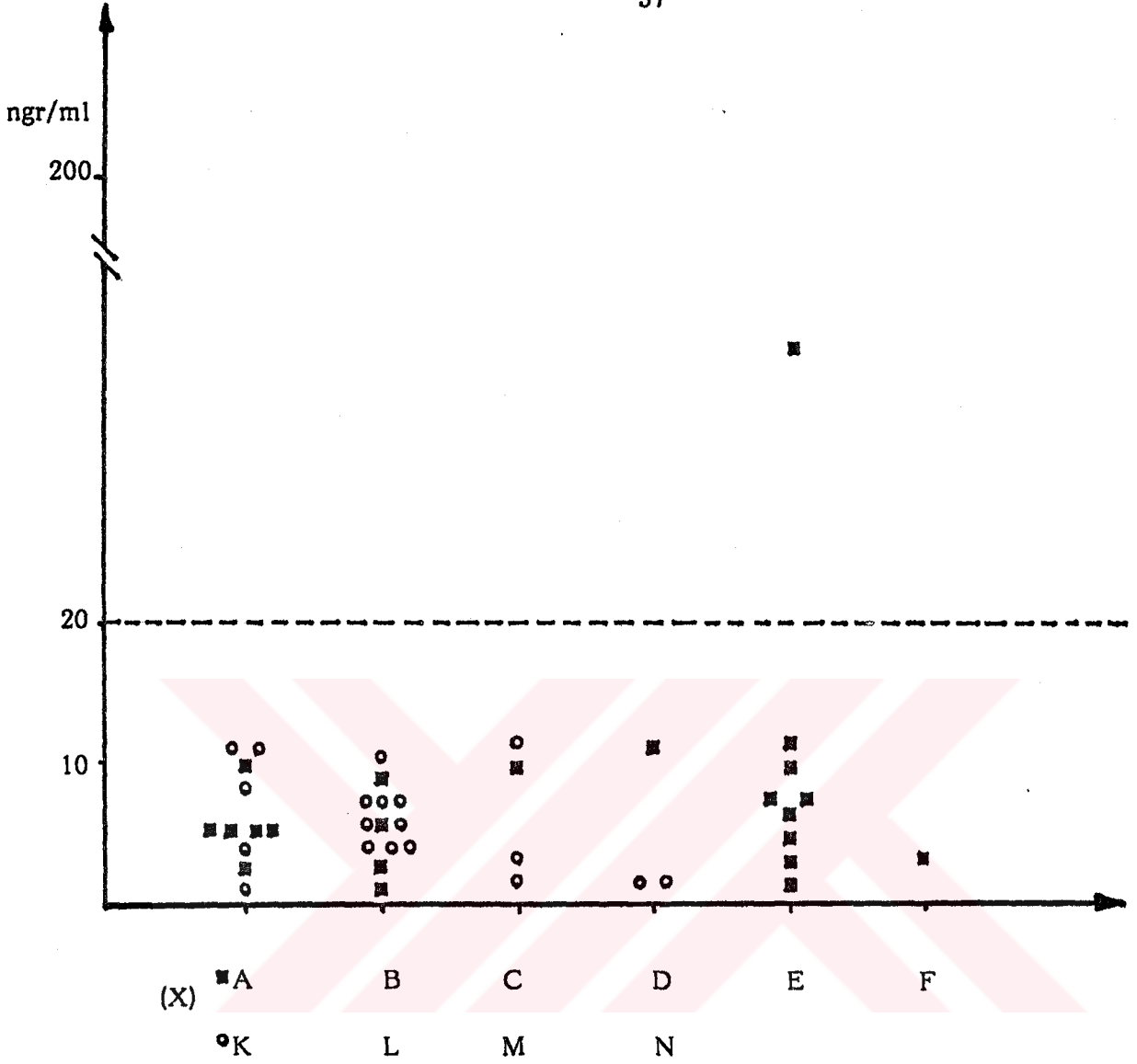
N: İnfeksiyon

TABLO 6

Jinekolojik Malign Tümör ve Kontrol Vakalarında Ameliyat Öncesi Plazma CEA, AFP ve HCG Dağılımları  
( $p > 0.05$ )( $p:0.79$ )

	CEA		AFP		HCG	
	n	% > 2.5 ng/ml	n	% > 20 ng/ml	n	% > 10 mÜ/ml
Kontrol	19	2	10	-	1	5
Endometrial kanser	6	2	33	-	-	-
Serviks kanseri	4	3	75	-	1	25
Epitelyal over kanseri	9	3	33	11	2	22
Total malign neoplazm(X)	22	8	36	4	4	18
						$\chi^2:0.72$
						P:0.79

(X) Birer koriokarsinom, sarkoma uteri ve granüloza hücre tümörü ilave edildi

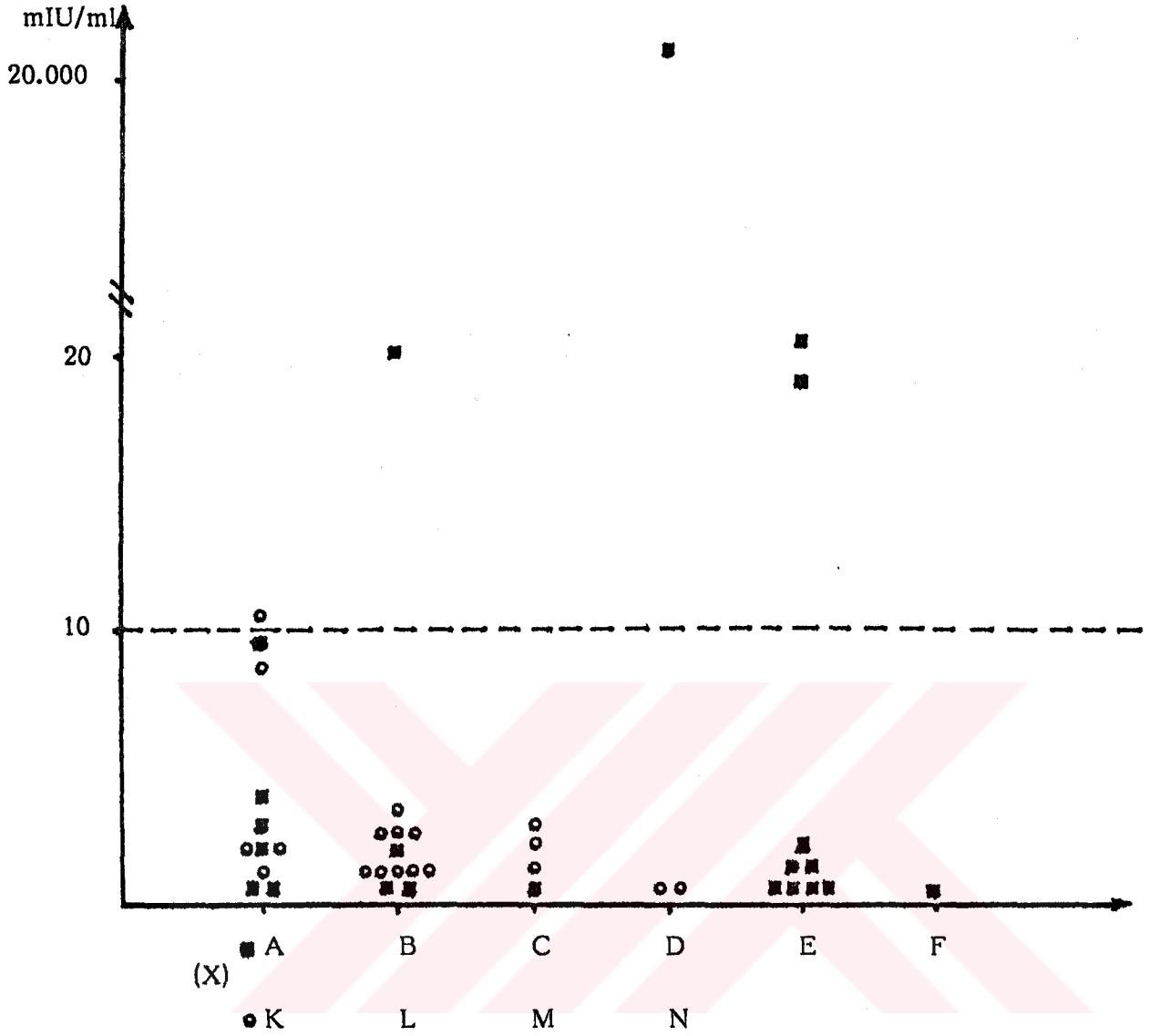


Şekil 8- Malign ve kontrol grubu olgularının ameliyat öncesi plazma AFP dağılımları

(X): A: Endometrial kanser  
 B: Serviks kanseri  
 C: Sarkoma uteri  
 D: Koriokarsinom  
 E: Epitelyal Over kanseri  
 F: Grantüloza hücreli tümör

K: Over kisti  
 L: Myoma Uteri  
 M: Malignite görülmeyen doku  
 N: İnfeksiyon





Şekil 9- Malign ve kontrol grubu olgularında ameliyat öncesi Plazma HCG dağılımları

- (X): A: Endometrial kanser  
 B: Serviks kanseri  
 C: Sarkoma uteri  
 D: Koriokarsinom  
 E: Epitelyal Over kanseri  
 F: Granuloza hücreli tümör
- K: Over kisti  
 L: Myoma Uteri  
 M: Malignite görülmeyen doku  
 N: İnfeksiyon

ngr/ml'nin üzerinde olduğu bulundu ( $p > 0.05$ ) (Tablo 6). Endometrial ve servikal kanserli olguların hiçbirinde ameliyat öncesi AFP yükselmesi tespit edilmedi. Epitelyal over kanserlerinin ancak % 11'inde plazma AFP seviyesi 20 ngr/ml'nin üzerinde bulundu (Tablo 6). Endometrial kanserde ameliyat öncesi dönemde plazma HCG yükselmesi görülmedi. Bunun yanında serviks kanserli olguların % 25'inde ve epitelyal over kanseri olan olguların % 22'sinde plazma HCG seviyesinin 10 mIU/ml'nin üzerinde olduğu tesbit edildi ( $p:0.79$ ) (Tablo 6).

Tablo 7 malign ve nonmalign tümöral oluşumların doku CEA, AFP ve HCG içerikleri ile plazma değerleri arasındaki uygunluk oranlarını göstermektedir. Yirmi iki malign tümör olgusunun 11'inde doku CEA pozitifliği tespit edildi ve bu 11 olgunun % 63'ünde ameliyat öncesi plazma değeri normalden fazla bulundu (Tablo 7). Aynı grupta immunohistokimyasal olarak AFP pozitifliği tespit edilen 4 olgunun % 25'inde plazma değeri normalden fazla bulunurken, dokuda HCG pozitifliği tespit edilen 6 olgunun % 67'sinde plazma değerinin normalden fazla olduğu tesbit edildi (Tablo 7). Kontrol grubunda doku CEA pozitifliği tespit edilen olguların % 28'inde, HCG pozitifliği tespit edilenlerin ise % 33'ünde plazma belirteç seviyesi normalden fazla bulundu (Tablo 7). Malign tümörlerde belirteçlerin doku ve plazma düzeylerindeki uygunluk CEA'da % 77, AFP'de % 86 ve HCG'de % 91 olarak bulundu. Aynı uygunluk oranlarının kontrol grubunda CEA için % 74, AFP için % 74 ve HCG için % 89 olduğu görüldü (Tablo 7). Bir olgu dışında, dokuda immunohistokimyasal olarak belirteç pozitifliği tespit edilmeyen gerek malign ve gerekse nonmalign olguların hiçbirinde plazma belirteç seviyesi normalden fazla bulunmadı.

Ameliyat öncesi ve sonrası plazma CEA ve HCG seviyeleri şekil 10,11'de görülmektedir. Sitoredüktif cerrahi uygulanan bir over kanseri olgusunda plazma CEA seviyesi ameliyattan sonra artmıştır. Diğer olgularda plazma belirteç seviyesi ameliyat sonrası dönemde belirgin olarak azalmıştır.

TABLO 7

Malign ve Nonmalign Tümöral Oluşumlarda Doku CEA, AFP ve HCG İçerikleri İle  
Plazma Değerleri Arasındaki Uyumluluk Oranları

	n	+/+	+/-	-/+	-/-	Ortak İlişki (X)
Malign Tümörler						
CEA	22	7	4	1	10	17 (% 77)
AFP	22	1	3	-	18	19 (% 86)
HCG	22	4	2	-	16	20 (% 91)
Non malign oluşumlar						
CEA	19	2	5	-	12	14 (% 74)
AFP	19	0	5	-	14	14 (% 74)
HCG	19	1	2	-	16	17 (% 89)

(X) +/- Dokuda var kanda yüksek

-/+ Dokuda yok kanda var

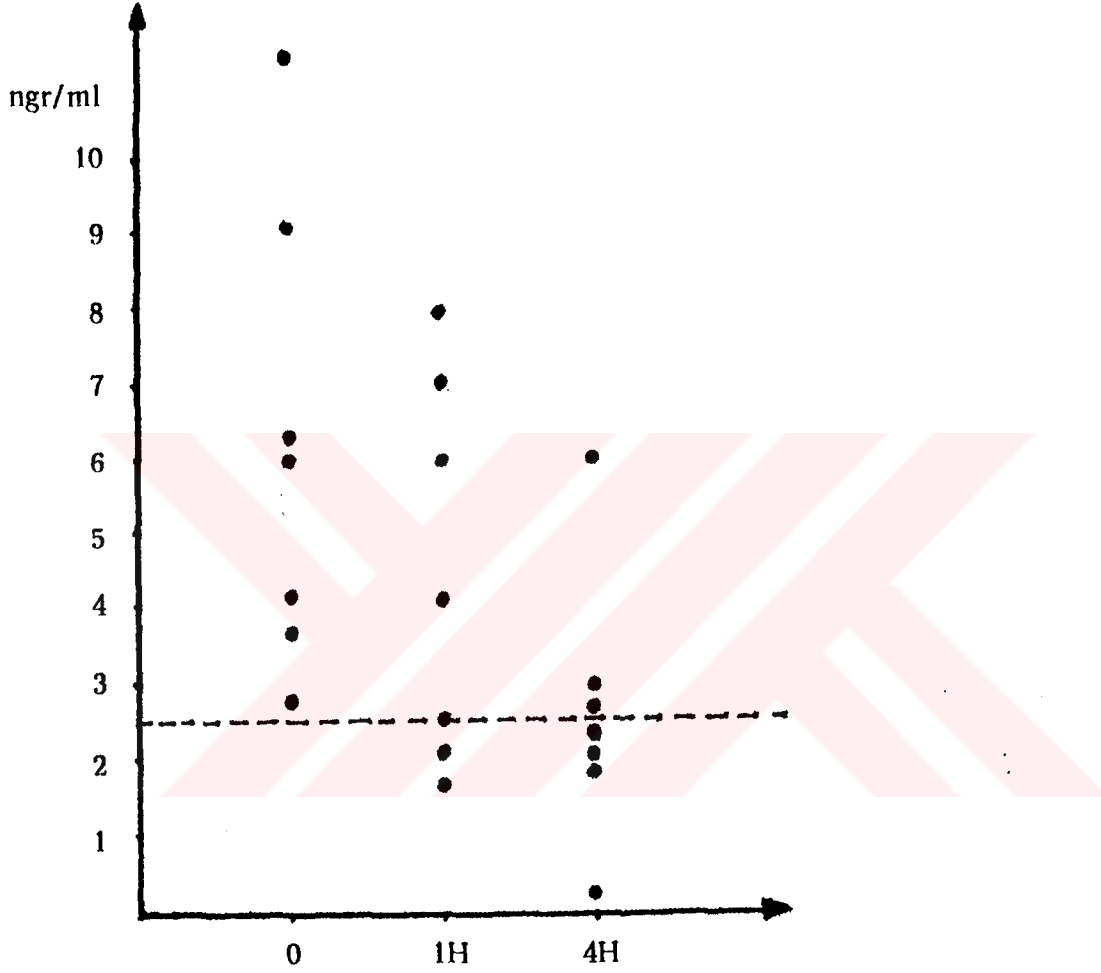
+/- Dokuda var kanda yok

-/- Dokuda yok kanda yok

Not: CEA için  $\chi^2:10.75$  (p<0.001)

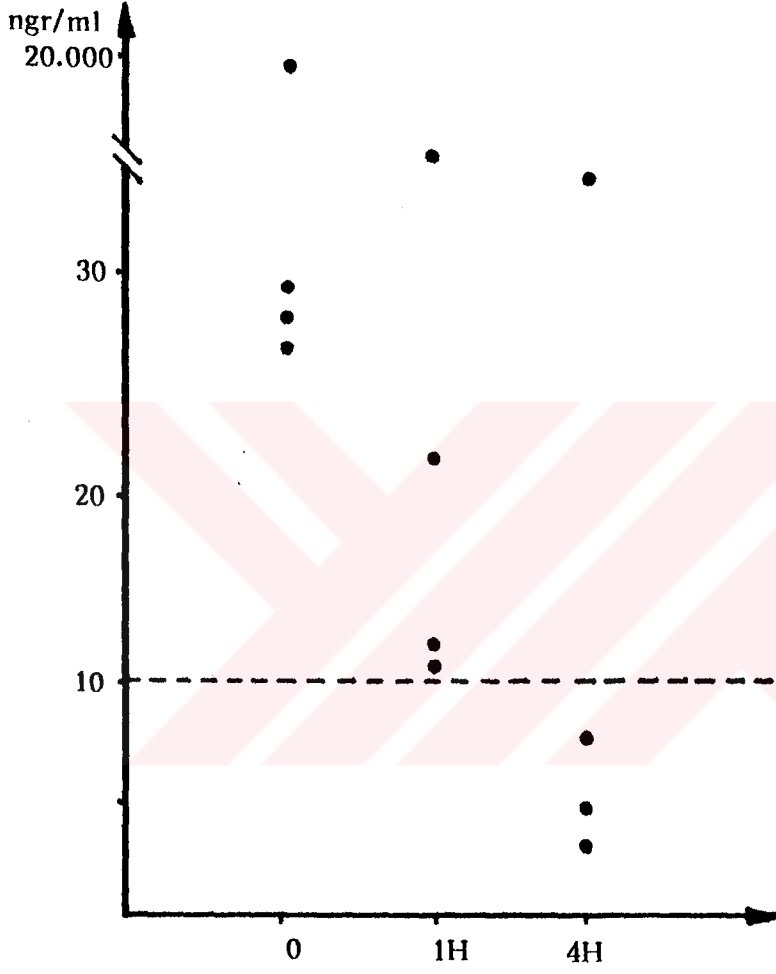
AFP için  $\chi^2:15.29$  (p<0.001)

HCG için  $\chi^2:26.56$  (p<0.001)



Şekil 10- Malign olgularda yüksek plazma CEA seviyelerinin ameliyattan sonra 1 ve 4. hafta değerleri

Not: Dokuda CEA pozitifliği bulunmayan fakat ameliyat öncesi plazma seviyesi 2.8 ngr/ml olan olgu alınmamıştır.



Şekil 11- Malign olgularda yüksek plazma HCG seviyelerinin ameliyattan sonra 1 ve 4. hafta değerleri

## TARTIŞMA

Geçen 20 yıl süresince bilim ve teknikteki ilerlemeler tümör belirteci olarak tanımlanan pek çok antijenin bulunmasına neden olmuştur. Buna rağmen hala tümör belirteçlerinin klinik önemi konusunda açıklanamamış sorular vardır. Bugünkü bilgilerimize göre, mevcut belirteçlerin bir kaçı hariç hiçbiri jinekolojik kanserlerin immun tanısında kullanılacak kadar duyarlı değildir. Buna rağmen bazı tümör belirteçleri tümörün tedaviye cevabını değerlendirmek için kullanırlar. Örneğin over karsinomlarında kanser antijeni 125 (CA-125) den, trofoblastik tümörlerde HCG'den, endodermal sinüs tümörlerinde AFP'den ve prostat kanserinde asit fozfatazdan yaygın olarak faydalanılmaktadır(52,100,113,114).

Plazma antijen konsantrasyonu tümör dokusunun antijen konsantrasyonu ile hastalığın yaygınlığına bağlıdır(29). Ne yazık ki pek çok klinik uygulamada tümör belirteçlerinin ameliyat sonrası seri plazma ölçümleri tümörün belirteç içeriğine bakılmaksızın yapılmıştır. Bunun sonucu olarak, plazma belirteç seviyesi yükselmeksizin tedavi sonrası tümör nüksünün meydana geldiği durumlarda ilgili belirteçin klinik olarak yetersiz olduğu sonucuna varılmıştır. Genel olarak bir belirteçin seri plazma ölçümlerinin hastalığın durumunu doğru olarak gösterebilmesi için tümörde belirli bir konsantrasyonda bulunması gerekir(29). Sıklıkla jinekolojik tümörlerin herhangi bir sınıfı için hangi belirteçin takib ve tanıda faydalı olabileceğini önceden tahmin etmek zordur. Örneğin bir malign over tümörü CEA, HCG, AFP ve SONA (seröz over neoplazm amilazı) gibi bir çok antijeni birlikte taşıyabilir. Bu nedenle herhangi bir tümörün antijenik profilini ortaya çıkarabilen doku antijen taramasına gereksi-

nim vardır. Böyle bir doku taraması sonucunda, seri plazma ölçümleri ile tümörün tedaviye cevabını değerlendirmek için, uygun olan belirteç seçilebilecektir. Günümüzde en güvenilir doku antijen tarama metodu immunohistokimyasal boyamadır(2,79). Bu teknikte enzim bağlı antikorlar hazırlanır ve immunolojik aktif bölgeler histokimyasal bir reaksiyon ile görünür hale getirilir(89,115). Bu amaç için pek çok çalışmada immunperoksidaz teknikler kullanılır(21). İmmunfloresan tekniğinin aksine immunperoksidaz tekniklerinde boyanma kalıcıdır ve preparatlar klasik histolojik boyalar ile tekrar boyanabilirler. Böylece boyanan antijen pozitif bölgeler tümör dokusunun morfolojik yapısı içinde belirgin olarak görünür. Bu metodla jinekolojik tümörlerde bir çok belirteç tespit edilmiştir(2). Jinekolojik onkolojide, CEA, AFP ve HCG'nin tümör belirteçi olarak önemini araştıran pek çok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda bu belirteçler farklı açılardan incelenmiş ve kliniğe uygulanabilirlik dereceleri araştırılmıştır.

Malign ve selim tümöral oluşumlar olarak ikiye ayırdığımız çalışma grubumuzda bu belirteçleri dokuda ve kanda inceledik. Bir çok tümör antijeninin immunohistokimyasal olarak jinekolojik tümör dokularında tesbiti tümör belirteçlerinin klinikteki kullanım alanlarını genişletmiştir. 1977 de Van Nagell ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada endometrial kanser dokularında immunohistokimyasal olarak % 9 oranında CEA'nın olduğu tespit edilmiştir(116). Van Nagell bir başka çalışmada servikal tümör olgularının % 63'ünde, Hiroshi ise % 80'inde immunohistokimyasal olarak CAE pozitifliği bildirilmiştir(12,117). Goldenberg ve arkadaşları over kanserleri dahil pek çok jinekolojik tümörde CEA tespit etmiştir(47). Casper ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise immunohistokimyasal olarak epitelyal over kanserlerinin % 50'sinde CEA, % 7'sinde AFP ve % 7'sinde HCG olduğu bulunmuştur(118). Bu çalışmanın sonuçlarına göre incelenen 3 tümör belirteçi içinde, epitelyal over tümörlerinin en fazla ürettiği belirteç CEA'dır. Nihayet 1987'de Etienne'nin yayınladığı bir yazıda malign over tümörlerinde CEA bulunma oranının % 37 olduğu bildirilmiştir(119). Genel olarak epitelyal over tümörlerinin % 50'sinde immunohistokimyasal olarak CEA boyanması görülür(73).

CEA bir epitelyal tümör antijenidir. Özellikle hücre membranlarında ve lümene bakan apikal yüzde bulunur(2). Bazı durumlarda sitoplazmada

da görülebilir. Immunohistokimyasal olarak tümör dokusunda CEA tespit edebilmek için en az 3 mikro/gr'lık bir doku konsantrasyonu gerekir(120). Epitelial over tümörlerinde CEA üretiminin düşük düzeyde olmasının nedenlerinden biri germinal inklüzyon kistlerinde CEA'nın olmaması diğeri ise normal mülleryan sistemden oluşan epitelde CEA'nın az olmasıdır(119). Diğer onkofetal belirteçler gibi CEA'nın malign tümörler tarafından üretimi, neoplastik transformasyon süresince embriyonal gen fonksiyonlarının baskıdan kurtulması sonucu, meydana gelir(5).

Çalışma grubumuzda immunohistokimyasal olarak malign tümör dokularının % 50'sinde, selim tümörlerden oluşan kontrol grubu dokularının ise % 37'sinde CEA tespit edildi. Fakat aradaki fark istatistiksel olarak anlamsızdı ( $p > 0.05$ ). Ayrıca CEA'in malign ve selim jinekolojik tümörlerin çeşitli histolojik tiplerindeki dağılımı istatistiksel açıdan anlamsız bulundu ( $p > 0.05$ ). Örneğin % 50 ve % 67'lik oranlar ile en fazla CEA içeren tümörlerin sırasıyla serviks kanseri ile epitelial over kanseri olduğu görüldü. Selim grupta over kistlerinin % 60'ında, myoma uteri olgularının ise % 22'sinde immunohistokimyasal boyama ile CEA tespit edildi. İki myoma uteri olgusunda CEA'nın tesbit edilmesi açıklanması gereken bir durumdur. Ayrıca sarkoma uteri olgumuzda CEA dahil çalıştığımız hiçbir belirteçin bulunmaması beklenen sonuç olarak değerlendirildi. Çünkü myom ve sarkom yumuşak doku tümörlerindedir. Bu grup tümörlerin en önemli iki belirteçi vimentin ve desmindir(2). Gerek vimentin ve gerekse desmin intermediat proteinler grubu üyelerindedir(121). Ayrıca yumuşak doku tümörlerinde immunohistokimyasal boyama ile vimentin ve desminden başka myoglobin, faktör 8, S-100 proteini, alfa 1 antitripsin ve alfa 1 antichymotripsin gibi belirteçlerde tespit edilmiştir(2). Genel olarak leiomyom ve leiomyosarkom dokularında vimentin olsun olmasın desmin vardır(121). Bununla beraber Disaia ve arkadaşlarının 1975'de yaptıkları bir çalışmada 3 sarkoma uteri olgusunun birinde CEA tespit edilmiştir(122). İmmunohistokimyasal olarak myoma uteri olgularında CEA pozitifliğinin bulunması yanlış pozitiflik olarak yorumlanabilir. Bir diğer açıklamada; bu myom dokularında yumuşak doku hücrelerinden başka epitel doku hücreleri vardır, şeklinde olabilir. Bu durum yorumu açıktır.

Literatürde immunohistokimyasal olarak AFP, over tümörleri dışın-



da nadiren araştırılmıştır. Clear-Cell karsinomu dışındaki epitelyal over tümörlerinin hemen tamamında immunohistokimyasal boyama ile AFP'nin tespit edildiği bildirilmiştir(73). Germ hücre belirteci olarak bilinen AFP endodermal sinüs tümörlerinde, embriyonal karsinom yolk kesesi diferansiasyon odaklarında ve poliembriyom yolk kesesi elemanlarında immunohistokimyasal olarak gösterilmiştir(123,124). Kurman ve Noris 15 endodermal sinüs tümör vakasının tamamında AFP tespit etmiştir(125). Çalışma serimizde selim tümörlerden oluşan grupta AFP immunohistokimyasal olarak % 26 oranında bulunurken, malign tümörlerden oluşan grupta % 18 oranında bulundu. Aradaki fark istatistiksel açıdan anlamsız olarak değerlendirildi ( $p > 0.05$ ) Malign grupta clear-cell karsinomlu bir olgu dışında yüksek plazma AFP seviyesi tespit edilemezken değişik 4 malign neoplazm olgusunda dokuda AFP tespit edildi(Tablo 3). Bir clear-cell karsinom olgusunda doku pozitifliği ile birlikte yüksek plazma seviyesi ve bu tümörlerde endodermal sinüs hücresi odaklarının varlığını düşündürmektedir. Genital kanalın clear-cell karsinomu ya müller epitelinde ya da over yüzeyini döşeyen embriyonik olarak benzer sölömik epiteliden kaynaklanır. Pek çok sınıflaması vardır.

Teilum clear-cell karsinomlarının bazılarının aslında endodermal sinüs tümörü olduğu fikrini savunmuştur(7). Bu durum clear-cell karsinomlu olgumuzun tümör dokusunda endodermal sinüs tümörü elemanları bulunduğu fikrini desteklemektedir. Çalışma serimizin malign gurubunda epitelyal over kanserlerinin % 34'ünde, serviks kanserlerini ise % 25'inde immunohistokimyasal olarak AFP tespit edildi ve aradaki farkın anlamsız olduğu bulundu ( $p > 0.05$ ). Selim tümörlerin çeşitli histolojik tipleri içinde farklı oranlarda bulunması da keza istatistiksel olarak anlamsızdı. Myoma uteri ve selim over kisti gibi dokularda AFP'nin tesbiti, pek çok malign ve nonmalign hücre tarafından bu belirtecin az da olsa üretildiğini göstermektedir.

Trofoblastik tümörler hariç, jinekolojik tümörlerde HCG'nin varlığını araştıran çalışmalardan farklı sonuçlar alınmıştır(73). Mohabeer ve arkadaşları selim, borderline ve invaziv tümörler arasında önemli bir fark olmaksızın, epitelyal over tümörlerinin % 40'ında immunohistokimyasal boyama ile HCG tespit etmişlerdir(73). Bir başka çalışmada over karsinomlarında HCG boyanma sıklığının yalnızca % 10 olduğu ve selim tümörlerde boyanmanın olmadığı

bildirilmiştir(73). Jinekolojik tümörlerde plazma HCG düzeyini araştıran pek çok çalışma vardır(29). Bunun yanında gestasyonel trofoblastik hastalık ve over tümörleri dışındaki jinekolojik tümörlerde HCG'yi immunohistokimyasal olarak araştıran çalışma sayısı yok denecek kadar azdır. Çalışmamızda bütün jinekolojik tümörleri immunohistokimyasal olarak HCG için taradık. Malign jinekolojik tümörlerin % 27'sinde immunohistokimyasal boyama ile HCG tespit ettik. Bu oran selim jinekolojik tümörlerde % 16 olarak bulundu. En yüksek HCG pozitiflik oranı % 45 ile epitelyal over kanserlerinde tespit edildi. Beklendiği gibi bir koriokarsinom olgusunda hücrelerin büyük bir çoğunluğunun HCG ürettiği görülürken, sarkoma uteri ve granüloza hücreli tümör olgusunda HCG üreten hücre görülmedi. Çalışmamızın sonuçlarına göre malign jinekolojik tümörler selim olanlardan daha fazla oranda HCG üretirler fakat aradaki fark istatistiksel olarak anlamsızdır ( $p > 0.05$ ). Aynı anlamsızlık derecesi gerek malign ve gerekse selim grupta çeşitli histolojik tümör tipleri arasında da mevcuttu. Literatür verilerine göre germ hücre tümörleri hariç tutulursa HCG anlamlı olarak yalnızca selim ve malign trofoblastik tümör hücreleri tarafından üretilir(51). HCG'nin trofoblastik tümörlerdeki sensitivite ve spesivitesi oldukça yüksektir. Bunun yanında germ hücre tümörlerindeki duyarlılığının % 17-50 ve spesivitesinin % 97-98 olduğu bildirilmiştir(126,127).

Plazma belirteç seviyesini tespit etmenin başlıca 2 nedeni vardır. Bunlar tümörün tarama ve ve tanısı ile ameliyat sonrası dönemde takibi şeklinde sıralanabilir. CEA, AFP ve HCG'nin bazı malign tümörlerde hasta plazma seviyelerinin tümör gelişimine veya gerilemesine paralel seyir gösterdiği ve bu nedenle tedavi sonrası takibde kullanıldıkları bilinir(12,25,29). Örneğin özellikle gestasyonel ve nongestasyonel trofoblastik tümörlerde plazma HCG seviyeleri ayrıca, tedavinin şeklini ve süresini net olarak belirler(52).

Jinekolojik malignitelerde bu üç belirteçin serum seviyelerini araştıran çalışmaların sonuçları birbirine yakındır. Sağlıklı insanların % 11'inde, selim jinekolojik hastalıkların ise % 18'inde plazma CEA seviyesinin 2.5 ngr/ml'nin üzerinde olduğu bildirilmiştir(29). Van Nagell ve arkadaşlarının 1978'de yaptıkları bir çalışmada plazma CEA yükselme oranlarının endometrial kanserli hastalarda % 30, over kanserli hastalarda % 50 ve servikal kanserli hastalarda % 60 olarak tespit edilmiştir(33). Disaia endometrial kanserli has-

uların % 57'sinde, Kjorstad ise % 34'ünde plazma CEA seviyesinin yükseldiğini belirtmiştir(122,128). Donaldson ve arkadaşlarının yaptığı 317 selim ve 253 malign jinekolojik olguyu içeren bir çalışmada CEA, AFP ve HCG'nin herbirinin plazma konsantrasyonlarının invaziv jinekolojik kanserlerde kontrol grubuna nazaran anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur(67). Keza bu çalışmada serviks kanserlerinde AFP (>20 ngr/ml), HCG (>5mIU/ml) ve CEA (>2.5 ngr/ml)'nin plazma yükselme oranları sırasıyla % 53, % 24 ve % 69 olarak belirtilirken endometrial ve over kanserlerinde aynı belirteçlerin yükselme oranları yine sırasıyla % 50, % 21 % 55 ve % 57, % 17, % 65 olarak belirtilmiştir(67). Bast'ın epitelyal over kanserlerini içeren bir çalışmasında bu kanser türünü taşıyan hastaların % 37'sinde, Van Nagell'in aynı konudaki çalışmasında ise % 40'ında plazma CEA düzeyinin 2.5 ngr/ml'den fazla olduğu bulunmuştur(43,73). Over kanserleri ile yapılan diğer çalışma grubunda hastaların ortalama % 50'sinde plazma CEA düzeyinin artmış olduğu gösterilmiştir(32,129).

Yirmi iki malign ve 19 selim jinekolojik olgudan oluşan araştırma grubumuzda Tablo 6'da görüldüğü gibi plazma CEA seviyesi hemen hemen bütün tümör türlerinde değişik oranlarda yükselirken AFP plazma seviyesi yalnızca clear-cell karsinomlu bir hastada yükselmiştir. Plazma CEA seviyesi serviks kanserli hastaların % 75'inde yükseldi. Fakat bu yükselme oranı istatistiksel olarak anlamsızdı ( $P > 0.05$ ). Endometrial kanserli hastalar hariç tutulursa, plazma HCG seviyesindeki yükselme oranları diğer tümör türlerinde literatür verilerine uygunluk göstermektedir. Sonuç olarak ameliyat öncesi dönemde çalışma grubumuzun kontrol olgularında plazma CEA (>2.5 ngr/ml), AFP (>20 ngr/ml) ve HCG (>10mIU/ml) seviyelerinin sırasıyla % 10, % 0 ve % 5 oranında yükseldiği görüldü. Aynı oranların malign tümörlü olgularda CEA için % 36, AFP için % 4 ve HCG için % 18 olduğu tespit edildi. CEA, AFP ve HCG'nin ameliyat öncesi plazma konsantrasyonlarının malign jinekolojik tümörlerde kontrol grubuna nazaran anlamsız derecede yüksek olduğu sonucuna varıldı ( $P > 0.05$ ). Bu anlamsızlık olgu sayısının azlığına bağlı olabilir.

Olgularımızda ameliyattan 4 hafta sonra, yüksek plazma belirteç seviyeleri tedrici olarak normale inmiştir. Sitoredüktif cerrahi uygulanan bir over kanseri olgusunda plazma belirteç seviyesinin ameliyattan sonra yüksel-

mesi çıkarılamayan kanser dokularının bol miktarda belirteç ürettiğini göstermektedir. Olgu sayısı az olduğundan ameliyat sonrası seri plazma ölçümleri yeterince değerlendirilmemiştir.

Genel olarak tümörün belirteç konsantrasyonu ile plazma belirteç düzeyi arasında düzenli bir ilişkinin olmadığı bilinir(33, 130). Çünkü bir belirteğin plazma seviyesi, tümör doku hücrelerinin belirteç sentez hızına, belirteğin metabolizma hızına, tümör kitlesinin büyüklüğüne ve tümörün vaskülaritesine bağlı olarak değişir(117,130). Literatürde belirteç doku kan seviyesini karşılaştıran az sayıda çalışma mevcuttur.

Van Nagell ve arkadaşları immunohistokimyasal olarak CEA ihtiva eden 49 serviks kanseri olgusunun yalnızca % 38'inde plazma CEA seviyesinin normalden fazla olduğunu bulmuştur(117). Hiroshi'nin serviks kanseri üzerine yaptığı başka bir çalışmada doku kan ilişki oranının % 20-50 olduğu bildirilmiştir(12). Breittenecker ve arkadaşlarının 1989'da yaptığı ve plazma doku belirteç düzeyini kıyaslayan bir çalışmada, immunohistokimyasal olarak CEA tespit edilen over kanserli hastaların % 26'sında ve over kisti taşıyan hastaların % 16'sında plazma CEA düzeyinin normalden fazla olduğu bulunmuştur(51). Aynı çalışmada doku kan uygunluk oranları CEA için over karsinomlarında % 79, selim over kistlerinde ise % 100 olarak bulunmuştur(131).

Araştırma grubumuzda çalıştığımız her üç belirteç için doku kan ilişkisi farklı bulundu.

Bir serviks kanseri olgusu dışında, tümör dokusunda belirteç tespit edilmeyen olguların hiçbirinde plazma belirteç seviyesi normalden fazla bulunmadı. Bu olguda plazma CEA seviyesi 2.8 ngr/ml değeri ile minimal düzeyde yükselmişti. Bu minimal artış sigara dahil pek çok tümör dışı faktöre bağlı olabilir. Toplam 41 olgunun % 76'sında doku CEA içeriği ile plazma CEA düzeyi arasında uygunluk görülmüştür. Aynı oranlar AFP için % 80 ve HCG için % 90'dır. Tablo 7'de de görüldüğü gibi her üç belirteğin de doku kan uygunluk oranları oldukça yüksektir. Bu sonuçların istatistiksel değerlendirmesinde; genel olarak bütün olgular göz önüne alındığında, CEA'nın kanda yüksek seviyede bulunması durumunda immunohistokimyasal olarak dokuda bulunma ola-

sılığının, dokuda tespit edildiği durumda kanda yüksek seviyede bulunma olasılığına nazaran istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu (P: 0.04039). Aynı ilişki AFP ve HCG'de bulunamadı (P: 0.20, P: 0.1259). Buna göre CEA'nın doku pozitifliği kandaki belirteç düzeyini göstermesi açısından AFP ve HCG'den daha yetersizdir. Ayrıca CEA, AFP ve HCG'nin dokuda ve kanda uyum gösterme oranlarının uyum gösterememe oranlarına nazaran yüksek olduğu bulundu ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi (P<0.001). Aynı şekilde ameliyatda elde edilen tümör dokusunda immunohistokimyasal olarak bulunmayan bir belirteçin hasta plazmasında yüksek seviyede bulunma olasılığı çok düşüktür. Böylece tümör dokusunda immunohistokimyasal boyama ile tespit edilmeyen bir belirteçi plazmada aramanın faydası yoktur. Sonuç olarak hasta plazmasını tümör belirteçleri için taramadan dokuda immunohistokimyasal olarak belirteç taraması yapılmalıdır. Böylece bir çok belirteçin plazma seviyesine gereksiz yere bakılmayacaktır.

Genel olarak immunohistokimyasal yöntemler ile dokuda belirteç aramanın iki önemli nedeni vardır. Bunların birincisi ameliyat sonrası dönemde seri plazma ölçümleri için uygun olan belirteçi seçmektir. Immunohistokimyasal çalışmalarda asıl amaç, tümör dokusunun hangi belirteçi içerdiğinden çok hangi belirteçi ne oranda içerdiği olmalıdır. Dolayısı ile belirteç üreten hücrelerin oranını tespit etmek oldukça önemlidir. Burada dikkat edilmesi gereken özellik, bir tümör dokusunun antijen-belirteç içeriğinin farklı tümör bölgelerinde değişkenlikler göstermesidir(131). Bazen antijen pozitif bölgeler yanında antijen negatif bölgeler bulunabilir(101,131). Bu nedenle çok sayıda doku kesitinin immunohistokimyasal olarak boyanması gerekir. Pek çok çalışma bir belirteçin postoperatuvar dönemde hastalığın durumunu doğru olarak yansıtabilmesi için tümör hücrelerinin büyük bir çoğunluğu tarafından üretilmesi gerektiğini göstermiştir(35,44,117,118). Bu nedenler ile tümör dokusunu immunohistokimyasal olarak bir belirteçler grubu ile taramak postoperatuvar takibde kullanılacak belirteçi seçme açısından önemlidir(67,76).

İmunohistokimyasal yöntemler ile dokuda belirteç aramanın ikinci önemli nedeni orijini bilinmeyen kötü diferansiye tümörlerin tanınmasıdır(2,76). Bu tümörlerin doğru tanısı tedavinin başarısı açısından önemlidir(2,22). 1985'de Gatter ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada daha önce kla-

sik histolojik boyalar ile kanser tanısı koyulmuş 43 olgunun % 67'sinin immunohistokimyasal boyama ile aslında lenfoma olduğu ve lenfoma olduğu düşünülen olguların % 16'sının kanser olduğu gösterilmiştir(22). Böylece her histopatoloji laboratuvarında orijini bilinmeyen kötü diferansiye tümörler için rutin olarak immunohistokimyasal boyama yapılmalıdır.

Bütün bu olumlu taraflarına rağmen, immunohistokimyasal tekniklerin uygulanması sırasında oluşan yanlış pozitiflik ve negatiflikler sonuçları önemli oranda etkiler. Doku içindeki herhangi bir antijenin immunohistokimyasal olarak gösterilmesi kullanılan görüntüleme metodunun özelliği, doku fiksasyon metodları, primer antikorun spesivitesi ve doku saklama (gömme) metodları gibi pek çok değişken komplekse bağlıdır. Klasik antiserumlar farklı afiniteye sahip antikorlar taşırlar. Bu ilgisiz antikorlar absorbe edilmelidirler(2). Örneğin standart CEA antiserumu nonspesifik çapraz reaksiyon antijenine, kolon kanser antijen 3'e, normal glikoprotein antijenine ve kan grubu antijenik determinantlarına karşı afinitesi olan antikorlar ihtiva ederler. Bütün bu nonspesifik antikorlar absorbe edilmedikleri sürece boyama işlemi sırasında istenmeyen reaksiyonlar ortaya çıkar. Monoklonal antikorların kullanılması bütün bu problemlerin çözümlenmesinde ana faktördür. İmmunohistokimyasal çalışmaların sonuçlarını etkileyen diğer önemli bir faktörde doku fiksasyon ve saklama metodlarının şeklidir. Her antijen türü için uygun fiksasyon ve saklama metodları tarif edilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan immunperoksidaz tekniği ülkemiz şartlarında pahalı fakat basit bir tekniktir. İstenirse pek çok antijene uygulanabilir. Jinekolojik onkolojide immunohistokimyasal tekniklerin kullanılması yenidir. Bu metodun en önemli özelliği dokuların bilinen morfolojik çatası içinde hücrelerin biokimyasal özelliklerini ortaya çıkarmasıdır(2). Böylece jinekolojik patoloji hücresel morfoloji ve fonksiyon üzerinde çalışabilecektir.

## SONUÇ

Çalışmamıza başlarken asıl amacımız tümör belirteç içeriği ile plazma belirteç seviyeleri arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmaktı. Aynı şekilde CEA, AFP ve HCG gibi tümör belirteçlerinin tümörlerdeki bulunma oranlarını araştırdık. Ayrıca ülkemizde yeterince kullanılmayan immunohistokimyasal yöntemlerin avantaj ve dezavantajlarını karşılaştırdık ve uygulama şekillerini inceledik.

1- Çalışmamızın immunohistokimyasal boyama sonuçlarına göre CEA, AFP ve HCG'nin jinekolojik malign tümörlerin çeşitli histolojik tiplerinde farklı oranlarda bulunması istatistiksel olarak anlamsızdır ( $P > 0.05$ ).

2- Aynı anlamsızlık derecesi nonmalign grubu oluşturan olgularda da görüldü ( $P > 0.05$ ).

3- İmmunohistokimyasal olarak malign jinekolojik tümörlerin % 50'sinde CEA, % 18'inde AFP ve % 27'sinde HCG pozitifliği tespit edilirken aynı oranlar nonmalign olgularda sırasıyla % 37, % 26 ve % 16 olarak bulundu.. Fakat aradaki fark anlamsız olarak değerlendirildi ( $P > 0.05$ ).

4- Ameliyat öncesi her üç tümör belirteçinin plazmadaki yükselme oranları malign tümörlerde nonmalign olanlara nazaran daha yüksek bulundu. Buna rağmen aradaki fark istatistiksel olarak anlamsızdı ( $P > 0.05$ ). Serviks kanseri olgularının % 75'inde plazma CEA seviyesinin normalden fazla bulunması dikkat çekicidir. Serviks kanserlerinde görülen bu yüksek CEA oranının

diğer jinekolojik malign tümör tiplerine nazaran istatistiksel açıdan anlamsız olduğu bulundu ( $P > 0.05$ ). Fakat bu anlamsızlık derecesi olgu sayısının azlığına bağlı olabilir ve yeterli değerlendirme yapabilmek için olgu sayısının artırılması gerekir.

5- Tümör belirteçlerinin doku kan seviyeleri arasındaki uygunluk oranları araştırmamızın diğer bir bölümünü oluşturmaktadır. CEA'nın immunohistokimyasal boyama ile tespit edilen doku pozitifliğinin, belirteçin kandaki seviyesini göstermesi açısından AFP ve HCG'den daha yetersiz olduğu sonucuna varıldı. Ayrıca her üç belirteçin de dokuda ve kanda birlikte bulunma veya bulunmama oranının oldukça yüksek olduğu tespit edildi ( $P < 0.001$ ).

Olgu sayısındaki azlık çalışmamızın sonuçlarını yeterince değerlendirmemizi önlemiştir. Pahalıya mal olmakla birlikte immunohistokimyasal çalışmalarda verileri istatistiksel olarak yorumlamak için fazla sayıda olguya gereksinim vardır.

İmmunohistokimyasal yöntemler ülkemiz jinekolojik patoloji laboratuvarlarında henüz yeterince kullanılmamaktadır. Fakat bu yöntemlerin onkolojide pek çok uygulama alanı vardır. Özellikle orijini bilinmeyen diferansiye olmamış tümörlerin tanısında ve tümör takibinde kullanılacak belirteçi seçme amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadırlar.



## Ö Z E T

Jinekolojik tümörlerde karsino embriyonik antijen alfa fetoprotein ve human korionik gonadotropin'in doku konsantrasyonları ile ameliyat öncesi ve sonrası dönemde plazma seviyelerini araştırdık ve doku kan değerleri arasındaki ilgiyi değerlendirdik. Bu çalışmada kliniğimiz ameliyat servisine müracaat eden toplam 41 olgunun ameliyat piyeslerinden hazırlanmış doku blok kesitleri immunohistokimyasal olarak bağlanmamış antikör peroksidaz antiperoksidaz tekniği ile CEA, AFP ve HCG için tarandı. Bu olgulardan ameliyat öncesi ile ameliyattan 1 ve 4 hafta sonraki dönemde alınan kan örneklerinde aynı tümör belirteçlerinin plazma seviyeleri tespit edildi. Kırk bir olgunun 22'sinde malign jinekolojik tümör ve 19'unda nonmalign jinekolojik tümör mevcuttu.

İmmunohistokimyasal boyama sonuçlarına göre malign grubu oluşturan 22 olgunun tümör dokularında % 50 oranında CEA, % 18 oranında AFP ve % 27 oranında HCG tespit edildi. Aynı oranlar selim tümörlerden oluşan kontrol grubunda sırasıyla % 37, % 26 ve % 16 olarak bulundu. Aradaki farkın ki kare analizine göre anlamsız olduğu tespit edildi ( $P > 0.05$ ).

Ameliyat öncesi dönemde çalışma grubumuzun kontrol olgularında plazma CEA ( $> 2.5\text{ng/ml}$ ), AFP ( $> 20\text{ng/ml}$ ) ve HCG ( $> 10\text{mİÜ/ml}$ ) seviyelerinin sırasıyla % 10, % 0 ve % 5 oranında yükseldiği görüldü. Aynı oranların malign tümörlü olgularda CEA için % 36, AFP için % 4 ve HCG için % 18 olduğu tespit edildi. CEA, AFP ve HCG nin plazma seviyelerinin malign jinekolojik tümörlerde kontrol grubuna nazaran anlamsız derecede yüksek olduğu

sonucuna varıldı ( $P > 0.05$ ).

Toplam 41 olgunun % 76'sında doku CEA konsantrasyonu ile plazma CEA seviyesi arasında uygunluk görülmüştür.

Aynı oranların AFP için % 80 ve HCG için % 90 olduğu bulundu. Olgu sayısı az olduğundan ameliyat sonrası plazma belirteç seviyelerinin dağılımı değerlendirmeye alınmadı.

Tümör dokusunun belirteç konsantrasyonu ile plazma belirteç seviyeleri arasındaki uygunluk gözönüne alındığında: Hasta plazmasını bir belirteçler grubu ile taramadan evvel tümör dokusunun immunohistokimyasal olarak çeşitli belirteçler için taranmasının daha pratik olduğu görülür. Ayrıca jinekolojik patoloji laboratuvarında tümör tanısı ve seri plazma ölçümleri için uygun olan belirteçi seçme amacı ile immunohistokimyasal boyamanın rutin olarak yapılmasının gerekliliğine inanıyoruz.

**KAYNAKLAR**

- 1- Barber,H.R.K., Dorsett,B.: Ovarian cancer: Immunologic diagnosis and therapy. *Contr Gynec Obstet.*, 14:176, 1985.
- 2- DeLellis,R.A., Dayal,Y.: The role of immunohistochemistry in the diagnosis of poorly differentiated malignant neoplasms. *Seminars in Oncology* 14:173, 1987.
- 3- Barlow,J.J., Bhattacharya,M.: Tumour-associated antigens for cystadenocarcinoma of the ovary. *Clinics in Obstet Gynaecol.*, 10:187, 1983.
- 4- Witebsky,E.: Zur serologischen spezifitat des carcniomgewebes. *Klinische wochenschrift*, 2:58, 1930
- 5- Rubin,S.C., Lewis,J.L.: Tumor antigens in ovarian malignancy. *Clinical Obstet and Gynecol.*, 29:693, 1986.
- 6- Witebsky,E., Rose,N.R., Schulman,S.: Studies of normal and malignant tissue antigens. *Cancer Research*, 16:831, 1956.
- 7- Barber,H.R.K.: Cancer Immunology. In Buchsbaum,H.J., Sciarra,J.J. (eds.): *Gynecology and Obstetrics*, Harper ve Row Philadelphia 60, 1987.

- 8- Bhattacharya,M., Barlow,J.J. Immunologic studies of human serous cystadenocarcinoma of the ovary. Demonstration of tumor-associated antigens. *Cancer* 31:588, 1973.
- 9- Knauf,S., Urbach,G.I. Purification of human ovarian tumor associated antigen and demonstration of circulating tumor antigen in patients with advanced ovarian malignancy. *Am J Obstet Gynecol* 127:705, 1977.
- 10- Etienne,J.N., Dirk,E.P., Marlene,W.E., Patricia,G.H., et al.: Immunohistochemical localization of placental alkaline phosphatase, carcinoembryonic antigen, and cancer antigen 125 in normal and neoplastic human lung. *Cancer Res* 46:866, 1986.
- 11- Burton,R.M., Hope,N.J., Lubbers,L.M.: A thermostable antigen associated with ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 125:472, 1976.
- 12- Hiroshi,K.: Studies on the special tumor marker of cervical cancer of the uterus. *Seminars in Surgical Oncology*, 3:55, 1987.
- 13- Diamond,B.A., Yelton,D.E., Sharrf,M.D.: Monoclonal antibodies. *N Engl J Med* 304:1344, 1981.
- 14- Pressman,D., Koringold,L.: The in vivo localization of anti-Wagner osteogenic sarcoma antibodies. *Cancer*, 6:619, 1953.
- 15- Goldenberg,D.M., DeLand,F., Kim,E., et al: Use of radiolabeled antibodies to carcinoembryonic antigen for the detection and localization of diverse cancers by external photoscanning. *N Engl J Med* 298:1384, 1978
- 16- Epenetos,A.A., Britton,K.E., Matter,S., Shepherd,J., et al.: Targeting of iodine 123- labelled tumour-associated monoclonal to ovarian, breast and gastrointestinal tumours. *Lancet* ii:999, 1982.

- 17- Epenetos,A.A., Snook,D., Johnson,P.M., Taylor-Papadimitrio,J.: Limitation of radiolabelled tumour associated monoclonal antibodies. *Cancer Res* 46:3183, 1986.
- 18- Mach,J.P., Carrel,S., Forni,M., Ritschard,J., Donath,A., Alberto,P.: Tumour localization of radiolabelled antibodies against carcinoembryonic antigen in patients with carcinoma. *N Engl Med.*, 303:5, 1980.
- 19- Goldenberg,D.M., DeLand,F.H., Kim,E., Van Nagell,J.R., Javadpour,N.: Clinical radioimmunodetection of cancer using radioactive antibodies to human chorionic gonadotropin. *Science* 208:1284, 1980.
- 20- Bale,W.F., Contreras,M.A., Grady,E.D.: Factors influencing localization of labeled antibodies in tumors. *Cancer Res*, 40:2965, 1980.
- 21- Falini,B., Taylor,C.R.: New developments in immunoperoxidase techniques and their application. *Arch Pathol Lab Med* 107:105, 1983.
- 22- Gatter,K.C., Alcock,C., Heyret,A., Mason,D.Y.: Clinical importance of analysing malignant tumours of uncertain origin with immunohistochemical techniques. *Lancet* 8:1032, 1985.
- 23- Gatter,K.C., Abdulaziz,Z., Beverley,P., et al: Use of monoclonal antibodies for the histopathological diagnosis of human malignancy. *J Clin Pathol* 35:1253, 1982.
- 24- Debus,E., Moll,R., Franke,W.W., Weber,K., Osborn,M.: Immunohistochemical distinction of human carcinomas by cytokeratin typing with monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 114:121, 1984.
- 25- Bates,S.E., Longo,D.: Use of serum tumor markers in cancer diagnosis and management. *Seminars in Oncology* 14:102, 1987.
- 26- Van Nagell,J.R.: Tumor markers in ovarian cancer. *Clinics in Obstet Gynaecol*, 10:197, 1983.

- 27- Cantarow,W.D., Stolbach,L.L., Bhattachary,M., Chatterje,S.K., Barlow,J.J.: The value of tumor markers in cancer of the ovary. *J Radiation Oncology. Biol Phys* 7:1095, 1981.
- 28- Makuch,R.W., Muenz,L.R.: Evaluating the adequacy of tumor markers to discriminate among distinct population. *Seminars in Oncology* 14:89, 1987.
- 29- Van Nagell,J.R., Donaldson,E.S., Hanson,M.B., Gay,E.C., et al.: Biochemical markers in the plasma and tumors of patients with gynecologic malignancies. *Cancer* 48:495, 1981.
- 30- Mackay,E.V., Khoo,S.K., Daunter,B.: Tumor markers. *Gynecologic Oncology*, 1(21):270, 1981.
- 31- Gold,P., Freedman,S.O.: Demonstration of tumor specific antigens in human colonic carcinomata by immunologic tolerance and absorption teshniques. *J Exp Med* 121:439, 1965.
- 32- Barrelet,V., and Mach,J.: Variations of the cacinoembryonic antigen level in the plasma of patients with gynecologic cancers during therapy. *Am J Obstet Gynecol* 121:164, 1975.
- 33- Van Nagell,J.R., Donaldson,E.S., Wood,E.G., Goldenberg,D.M.: The clinical significance of carcinoembrynic antigen in the plasma and tumors of patients with gynecologic malignancies. *Cancer* 42:1527, 1978.
- 34- Gold,P., Shuster,J., Freedman,S.O.: Carcinoembryonic antigen (CEA) in clinical medicine. Historical perspectives, pitfalls, and projections. *Cancer* 42:1399, 1978.
- 35- Laurence,D.J.R., Neville,A.M.: Fetal antigens and their role in the diagnosis and clinical management of human neoplasms: A review, *Br J Cancer* 26: 335, 1972.

- 36- Fleisher,M., Nisselbaum,J.S., Loftin,L., et al: Roche RIA and Abbot EIA carcinoembryonic antigen assays compared. *Clin Chem* 30: 200, 1984.
- 37- Beatty,J.D., Romero,C., Brown,P.W., et al.: Clinical value of carcinoembryonic antigen: Diagnosis, prognosis, and follow-up of patients with cancer. *Arch Surg* 114:563, 1979.
- 38- Stevens,D.P., Mackay,I.R.: Increased carcinoembryonic antigen in heavy cigarette smokers. *Lancet* 2: 1238, 1973.
- 39- Doos,W.G., Wolff,W.I., Shinya,H., et al.: CEA levels in patients with colorectal polyps. *Cancer* 36:1996, 1975.
- 40- Van Nagell,J.R., Donaldson,E.S., Gay,E.C., Rayburn,P., et al.: Carcinoembryonic antigen in carcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 42:428, 1978.
- 41- Reynoso,G., Ming Chu,T., Holyoke,D., Cohen,E., et al.: Carcinoembryonic antigen in patients with different cancers. *JAMA* 220:361, 1972.
- 42- Van Nagell,J.R., Meeker,W.R., Parker,J.C., Kashmiri,R., and McCollum,V.: Carcinoembryonic antigen in intraepithelial neoplasia of the uterine cervix. *Am J Obstet Gynecol.*, 123:105, 1976.
- 43- Bast,R.C., Klug,T.L., Schaetzel,E., Lavin,P., et al.: Monitoring human ovarian carcinoma with a combination of CA 125, CA 19-9 and Carcinoembryonic antigen. *Am J Obstet Gynecol* 149:553, 1984.
- 44- Stevens,D.P., Mackay,I.R., Cullen,K.J.: Carcinoembryonic antigen in an unselected elderly population: A fouryear follow-up. *Br J Cancer* 32:147, 1975.
- 45- Jothy,S., Brazinsky,S.A., Chin-A-lay,M., et al.: Characterization of monoclonal antibodies to Carcinoembryonic antigen with increased tumor specificity. *Lab Invest* 54:108, 1986.

- 46- Primus,F.J., Wang,R.H., Sharkey,R.M., and Goldenberg,D.M.: Detection of Carcinoembryonic antigen in tissue sections by immunoperoxidase. *J Immunol, Methods* 8:267, 1975.
- 47- Goldenberg,D.M., Sharkey,R.M., and Primus,F.J.: Carcinoembryonic antigen in histopathology: Immunoperoxidase staining of conventional tissue section. *J Natl Cancer Inst* 57:11, 1976.
- 48- Sewell,H.F., Jaffary,B., Thompson,W.D.: Reaction of monoclonal anti Leu M1-A myelomonocytic marker (CD 15)-with normal and neoplastic epithelia. *J Pathol* 151:279, 1987.
- 49- Van Nagell,J.R., Kim,E., Casper,S., Primus,F., et al.: Radioimmunodetection of primary and metastatic ovarian cancer using radiolabeled antibodies to Carcinoembryonic antigen. *Cancer Research* 40:502, 1980.
- 50- Vaitukaitis,J.L., Braunstein,G.D., Ross,G.T.: A radioimmunoassay which specifically measures human chorionic gonadotropin in the presence of human luteinizing hormone. *Am J Obstet Gynecol* 113:751, 1972.
- 51- Bast,R.C., Hunter,V., Knapp,R.C.: Pros and Cons of Gynecologic tumor markers. *Cancer* 60:1984, 1987.
- 52- Disaisa,P.J., Creasman,W.T.: *Clinical Gynecologic Oncology* The C.V Mosby Company, Toronto 560, 1989.
- 53- Braunstein G.D., Grodin,J.M., Vaitukaitis,J.L., Ross,G.T.: Secretary rate of human chrionic gonodotropin by normal trophoblast. *Am J Obstet Gynecol* 15:447, 1973.
- 54- Jones,W.B., Lewis,J.L., Lehr,M.: Monitor of chemotherapy in gestational trophoblastic neoplasm by radioimmunoassay of the subunit of human chorionic gonadotropin. *Am J Obstet Gynecol*, 121:669, 1975.



- 55- Gailani,S., Chu,T.M., Nussbaum,A., et al.: Human chorionic gonadotropins (HCG) in non-trophoblastic neoplasms. Assessment of abnormalities of HCG and CEA in bronchogenic and digestive neoplasms. *Cancer* 38: 1684, 1976.
- 56- Tormey,D.C., Waalkes,T.P., Simon,R.M.: Biological markers in breast carcinoma II. Clinical correlations with human chorionic gonadotrophin. *Cancer* 39: 2391-2396, 1977.
- 57- Vaitukaitus,J.L., Ebersole,E.R.: Evidence for altered synthesis of human chorionic gonadotropin in gestational trophoblastic tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 42:1048, 1976.
- 58- Goldstein,D.P., Kosasa,T.S., Skarim,A.T.: The clinical application of a specific radioimmunoassay for human chorionic gonadotropin in trophoblastic and nontrophoblastic tumors. *Surgery Gynecol Obstet* 138:747, 1974.
- 59- Yorde,D.E., Husa,R.O., Garancis,J.C., Pattillo,R.A.: Immunocytochemical localization of human choriogonadotropin in human malignant trophoblast: model for human choriogonadotropin secretion. *Lab Invest*, 40:391, 1979.
- 60- Abelev,G.I.: Alfa fetoprotein in ontogenesis and its association with malignant tumors. *Adv Cancer Res* 14:295, 1971.
- 61- Waldmann,T.A., McIntire,K.R.: The use of a radioimmunoassay for alpha-fetoprotein in the diagnosis of malignancy. *Cancer* 34:1510, 1974.
- 62- Abelev,G.I.: Study of the antigenic structure of tumors. *Acta Intern Cancer* 19:80, 1963
- 63- Gitlin,D., Perricelli,A., Gritlin,G.M.: Synthesis of  $\alpha$ -feto- protein by liver, yolk sac, and gastrointestinal tract of the human conceptus. *Cancer Res*; 32:979, 1972.

- 64- Jalanko,H., Kuusela,P., Roberts, P., et al.: Comparison of a new tumor marker. CA 19-0, with  $\alpha$ -fetoprotein and carcino- embryonic antigen in patients with upper gastrointestinal diseases. *J Clin Pathol* 37:218, 1984.
- 65- Bloomer,J.R., Waldmann,T.A., McIntire,K.R., et al.:  $\alpha$ -Fetoprotein in non-neoplastic hepatic disorders. *JAMA* 233:38, 1975.
- 66- Trichopoulos,D., Sizaret,P., Tabor,E., et al: Alphafetoprotein levels of liver cancer patients and controls in a European population. *Cancer* 46:736, 1980.
- 67- Donaldson,E.S., Van Nagel,J.R., Pursell,S., Gay,E.C., et al.: Multiple biochemical markers in patients with gynecologic malignancies. *Cancer* 45:948, 1980.
- 68- Tsuchida,Y., Satio,S., Ishida,M., et al.: Yolk sac tumor (endodermal sinus tumor) and  $\alpha$ -fetoprotein. A report of three cases. *Cancer*, 32:917, 1973.
- 69- Wilkinson,E.J., Friedrich,E.G., Hosty,T.A.:  $\alpha$ -fetoprotein and endodermal sinus tumor of the ovary. *Am J Obstet Gynecol* 116:711, 1973.
- 70- Norgaard-Pedersen,B., Albrechtsen,R., Telium,G.: Serum  $\alpha$  fetoprotein as a marker for endodermal sinus tumour (Yolk sac tumour) or a vitelline component of teratocarcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 83:573, 1975.
- 71- Esterhay,R.J., Shapiro,H.M., Sutherland,J.C., McIntire,K.R., Wiernik,P.H.: Serum  $\alpha$ -Fetoprotein concentration and tumor growth dissociation in patient with ovarian teratocarcinoma. *Cancer* 31:835, 1973.
- 72- Talerman,A., Haije,W.G.:  $\alpha$ -Fetoprotein concentration and tumor growth dissociation in a patient with ovarian teratocarcinoma. *Cancer* 34:1722, 1974.

- 73- Scully,R.E.: Immunohistochemistry of ovarian tumors. In Ruso J.(eds): Immunocytochemistry in the tumor diagnosis, Matrinus Nijhoff Pub Detroit 293, 1984.
- 74- Talerman,A., Haije,W.G., Berggerman,L.: Serum  $\alpha$ -Fetoprotein in diagnosis and management of endodermal sinus tumor and mixed germ cell tumors of the ovary. *Cancer* 41:272, 1978.
- 75- Thompson,D.K., Haddow,J.E.: Serial monitoring of serum  $\alpha$ -fetoprotein and chorionic gonadotropin in males with germ cell tumors. *Cancer* 43:1820, 1979.
- 76- Kurman,R.J.: Contributions of immunocytochemistry to gynaecological pathology. *Clinics in Obstet Gynaecol.*, 11:5, 1984.
- 77- Kim,E.E., DeLand,F.H., Nelson,M.O., et al.: Radioimmuno-detection of cancer with radiolabeled antibodies to -fetoprotein. *Cancer Res*, 40:3008, 1980.
- 78- Coons,A.H., Creech,H.J., Jones,R.N., Berliner,E.: The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of a fluorescent antibody. *Journal of Immunology*, 45, 159, 1942.
- 79- Robinson,G.: Immunohistochemistry. In Bancroft,J.D., Stevensen,A. (eds): Theory and practice of histological techniques, Churchill Livingstone William Clowes Limited London, 1982.
- 80- Nakane,P.K.: Simultaneous localization of multiple tissue antigens using the peroxidase-labeled antibody method: A study on pituitary glands of the rat. *J Histochem Cytochem*, 16:557, 1968.
- 81- Mason,T.E., Pfifer,R.F., Spicer,S.S., Swallow,R.A., Dreskin,R.B.: An immunoglobulin enzyme bridge method for localising tissue antigens. *Histochemi Cytochem* 17:563, 1969.

- 82- Sternberger,L.A.: Some new developments in immunocytochemistry. *Mikroskopie*, 25:346, 1969.
- 83- Avrameas,S., Ternyck,T.: Peroxidase labelled antibody and and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. *Immunochemistry*, 8:1175, 1971.
- 84- Kreuning,J., Bosman,F.T., Kuiper,G., Wal,A.M., Lindeman,J.: Gastric and duadenal mucosa in healthy individuals. *Clin Pathol*, 31:69, 1978.
- 85- Engvall,E., Perimann,P.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Xuantitative assay of immunoglobulin G.*Immonochemistry* 8:871, 1971.
- 86- Sternberger,L.A., Hardy,P.H., Cuculis,J.J., Meyer,H.G.: The unlabelled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-anti-peroxidase) and its use in identification of spirochaetes. *J.Histochem Cytochem*, 18:315, 1970.
- 87- Hsu,S.M., Raine,L., Fanger,H.: Use of avidinbiotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*, 29:577, 1981.
- 88- Hsu,S.M., Raine,L., Fanger,H.: A comparative study of the PAP method and avidin-biotin complet method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Pathol* 75:734, 1981.
- 89- Nakane,P.K., Pierce,G.B.: Enzyme labeled antibodies: Preparation and application for localization of antigens. *J Histochem Cytochem* 14:929, 1966.
- 90- DeLellis,R.A., Sternberger,L.A., Mann,R.B., Banks,P.M. Nakane,P.K.: Immunoperoxidase technics in diagnostic pathology. *Am J Clin Pathol* 71:483, 1979.

- 91- Celio,M.R., Lutz,H., Binz,H. et al: Protein A in immunoperoxidase techniques.J Histochem Cytochem, 27:691, 1979.
- 92- Dubosis,Dalcq,M, MrFarland,H., McFarlin,D.: Protein A-peroxidase: A valuable tool for the localization of antigens. J Histochem Cytochem, 25:1201, 1977.
- 93- Hedman,K.: Intracellular localization of fibronectin using immunoperoxidase cytochemistry in light and electron microscopy. J Histochem Cytochem, 28:1233, 1980.
- 94- Jasani,B., Thomas,D.W., Williams,E.D.: Use of monoclonal antihapten antibodies for immunolocalization of tissue antigens. J Clin Pathol, 34:1000, 1981.
- 95- Ponder,B.A., Wilkinson,M.M.: Inhibition of endogenous tissue alkaline phosphatase with the use of alkaline phosphatase conjugates in immunohistochemistry. J.Histochem Cytochem, 29:981, 1981.
- 96- Warnke,R., Levy,R.: Detection of T and B cell antigens with hybridoma monoclonal antibodies: A biotin-avidin-horseradish peroxidase method. J Histochem Cytochem, 28:771, 1980.
- 97- Naritoku,W.Y., Taylor,C.R.: A comparative study of the use of monoclonal antibodies using three different immunohistochemical methods. An-evaluation of monoclonal and polyclonal antibodies against human prostatic acid phosphatase. J Histochem Cytochem, 30:253-260, 1982.
- 98- Wood,G.S., Warnk,R.: Suppression of endogenous avidin-binding activity in tissues and its relevance to biotin-avidin detection systems. J Histochem Cytochem 29:1196, 1981.
- 99- Nagle,R.B., McDaniel,K.M., Clark,V.A., Panye,C.M.: The use of antikera-tin antibodies in the diagnosis of human neoplasms. Am J Clin Pathol 79:458, 1983.

- 100- Nadji,M., Tabei,S.Z., Castro,A., Chu,T.M., et al.: Prostatic orijin of tumors: An immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol* 73:735, 1980.
- 101- Neunteufel,W., Breiteneker,G.: Tissue expression of CA 125 in benign and malignant lesions of ovary and fallopian tube: A comparison with CA 19-9 and CEA. *Gynecologic Oncology* 32:297, 1989.
- 102- Dorling,J.: Relative sensitivities of the indirect conjugate method and the antibody bridge method using PAP. *J Clin Pathol*, 32: 411, 1979.
- 103- Heyderman,E.: Immunoperoxidase technique in histopathology: applications methods, and controls. *J Clin Pathol* 32, 971, 1979.
- 104- Banks,P.M.: Diagnostic applications of an immunoperoxidase method in hametopathology. *J Histochem Cytochem*, 27:1192, 1979.
- 105- Taylor,C.R., Kledzik,G.: Immunohistologic techniques in surgical pathology-A spectrum of new special stains, *Hum Pathol* 12:590, 1981.
- 106- Streefkerk,J.G.: Inhibition of erythrocyte pseudoperoxidase activity by treatment with hydrogen peroxide following methanol. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 20:829, 1972.
- 107- Marphan,B.L., Frater,W., Mitchell,B.S.: The use of protcolytic enzymes to improve immunoglobulin staining by the P.A.P. technique. *Histochemical Journal* 11:345, 1979.
- 108- Krachenbuhl,J.P., Jamieson,J.D.: Localisation of intracelluler antigens by immunoelectron microscopy. *International Review of Experimental Pathology*, 12:1, 1974.
- 109- Huang,S.N., Minassian,H., More,J.D.: Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Labaratory Investigation*, 35:383, 1976.

- 110- Graham,R.C. Karnovsky,M.J.: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney. Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J Histochem Cytochem*, 14:291, 1966.
- 111- Taylor,C.R., Burns,J.: The demonstration of plasma cells and other immunoglobulin-containing cells in formalin fixed, paraffin embedded tissues using peroxidase labelled antibody. *J Clin Pathol*, 27:14, 1974.
- 112- Taylor,C.R., Kurman,R.J., Warner,N.E.: The potential value of immunohistochemical techniques in the classification of ovarian and testicular tumours. *Human Pathology*, 9:417, 1978.
- 113- Atack,D.B., Nisker,J.A., Allen,H.H., Tustanof,E.R., Levin,L.: CA 125 surveillance and second-look laparotomy in ovarian carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 154:287, 1986.
- 114- Mann,W.J., Chusmas,J., Rosenwaks,Z., Merrill,J.A., et al.: Elevated serum  $\alpha$ -Fetoprotein associated with sertoli-Leydig cell tumors of the ovary. *Obstet Gynecol* 67:141, 1986.
- 115- Nakane,P.K., Pierce,G.B.P Enzyme labeled antibody for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. *J Cell Biol*, 33:307 1967.
- 116- Van Nagell,J.R., Donaldson,E.S., Wood,E.G., Sharkey,R.M., Goldenberg,D.M.: The Prognostic significance of carcinoembryonic antigen in the plasma and tumors of patient with endometrial adenocarcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 128:308, 1977.
- 117- Van Nagell,J.R., Donaldson,E.S., Gay,E.C., Hudson,S., et al.: Carcinoembryonic antigen in carcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 44: 944, 1978.

- 118- Casper,S., Van Nagell,J.R., Powell,D.F., Dubilier,L.D., et al.: Immunohistochemical localization of tumor markers in epithelial ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 149:154, 1984.
- 119- Nouwen,E.J., Hendrix,P.G., Dauwe,S., Eerdeken,M.W., De Broe,M.E. Etiennes,N.: Tumor markers in the Human ovary and its neoplasms. *Am J Pathol.*: 126:230, 1987.
- 120- Van Nagell,J.R., Donaldson,E.S., Gay,E.C., Sharkey,R.M., et al: Carcinoembryonic antigen in ovarian epithelial cyctadenocarcinomas. *Cancer* 41:2335, 1978.
- 121- Denk,H., Krepler,R., Artlieb,V., et al.: Proteins of intermediate filaments: An immunohistochemical and biochemical approach to the classification of soft tissue tumors. *Am J Pathol* 110:193, 1983.
- 122- Disaia,P.J., Haverback,B.J., Dyce,B.J., Marrow,C.P.: Carcinoembryonic antigen in patients with gynecologic malignancies. *Am J Obstet Gynecol* 121:159, 1975.
- 123- Kurman,R.J., Noris,H.J.: Endodermal sinus tumor of the ovary. *Cancer*, 38:2404, 1976.
- 124- Takeda,A., Ishizuka,T., Goto,T., Ohta,M., et al.: Polyembryoma of ovary producing  $\alpha$ -fetoprotein and HCG: Immunoperoxidase and electron microscopic study. *cancer* 49:1878, 1982.
- 125- Kurman,R.J., Noris,H.J.: Embryonal carcinoma of the ovary: A clinicopathologic entity distinct from endodermal sinus tumor resembling embryonal carcinoma of the adult testis. *Cancer*, 38:2420, 1976.
- 126- Samaan,N., Smith,S.P., Rutledge,F.N., et al.: The significance of the measurment of human placental lactogen, human chorionic gnodotropin, and carcinoembryonic antigen in patient with ovarian carcinoma. *Am J Obstet Gynecol*, 126:186, 1976.



- 127- Stone,M., Bagshaw,K.D., Kardana,A., et al.:  $\beta$ -Human chorionic gonadotropin and carcino embryonic antigen in the management of ovarian carcinoma. Br J Obstet Gyneacol 84:375, 1977.
- 128- Kjorstad,K.E., Orjaseter,H.: Studies on carcinoembryonic antigen levels in patiens with adenocarcinoma of the uterus. Cancer 40:2953, 1977.
- 129- Lo Gerfo,R., Krupey,J., and Hansen,H.J.: Demonstration of an antigen common to several varieties of neoplasia: assay using zirconyl phosphate gel. N Engl J Med. 285:138, 1971.
- 130- Khood,S.K., Whitaker,S., Jones,I., Mackay,E.: Predictive value of serial carcinoembrynic antigen levels in long-term follow- up of ovarian cancer. Cancer, 43:2471, 1979.
- 131- Breitenecker,G., Neunteufel,W., Bieglmayer,C., Kölbl,H.,and Schieder,K.: Comparison between tissue and serum content of CA 125, CA 19-9 and carcinoembryonic antigen ovarian tumors. International Journal of Gynecological pathology 8:97, 1989.

Yükseköğretim Kurulu  
Dokümantasyon Merkezi