

# Germ hücreli testis tümörlerinde p53 ve bcl-2 ekspresyonu

## p53 and bcl-2 expression in testicular germ cell tumors

Yurdanur SÜLLÜ, Bedri KANDEMİR, Levent YILDIZ, Filiz KARAGÖZ, Sancar BARIŞ, Oğuz AYDIN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, SAMSUN

### ÖZET

Testisin germ hücreli tümörlerinde p53 ve bcl-2 ekspresyonu ile tümörlerin morfolojik ve biyolojik özellikleri arasındaki ilişkiyi incelemek amacı ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 1986-2002 yılları arasında germ hücreli testis tümörü tanısı almış 49 adet orşiektomi spesimenine ait kesitler retrospektif olarak incelendi ve sınıflandı. p53 ve bcl-2 ekspresyonunu saptamak amacıyla immünohistokimyasal çalışma yapıldı. Boyanma şiddeti semikantitatif olarak (+) ile (++++) arasında derecelendirildi. Yirmi sekiz seminom olgusunun 24'ünde (%86), 16 seminom dışı germ hücreli tümör olgusunun ise 12'sinde (%75) p53 ekspresyonu saptandı. Bcl-2 ekspresyonu 28 seminom olgusunun 2'sinde (%7), 16 seminom dışı germ hücreli tümör olgusunun 7'sinde (%44) gözlemlendi.

Seminomlarda %86 ve seminom dışı germ hücreli tümörlerde %75 oranında saptanan p53 ekspresyonu ile %44 oranında gözlenen bcl-2 pozitivitesinin bu tümörlerin gelişimi ve prognozundaki rolünü açıklayabilmek için geniş serilerde, uzun takip süreleri ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar sözcükler:** Testis, germ hücreli tümör, p53, bcl-2

### ABSTRACT

To investigate the association between p53 and bcl-2 expressions and morphological and biological features of testicular germ cell tumours, tissue slides from 49 orchietomy specimens diagnosed as testicular germ cell tumors between 1986-2002 in the Department of Pathology, Ondokuz Mayıs University Faculty of Medicine were retrospectively analysed and classified. The p53 and bcl-2 expression were demonstrated immunohistochemically and the intensity of staining was graded semiquantitatively from (+) to (++++). The p53 expression was seen in 24 of 28 (86%) seminoma cases and 12 of 16 (75%) nonseminomatous germ cell tumours. Bcl-2 expression was seen in 2 of 28 (7%) seminoma and 7 of the 16 (44%) nonseminomatous germ cell tumour cases.

To explain the role of p53 expression detected in 86% of seminomas and 75% of nonseminomatous germ cell tumours and bcl-2 positivity observed in 44% of nonseminomatous germ cell tumors in the development and prognosis of these testicular tumours, large scale studies with long term follow-up periods are needed.

**Key words:** Testis, germ cell tumour, p53, bcl-2

### GİRİŞ

Testisin germ hücreli tümörleri genç erkeklerin hastalığıdır. Seminomlar yaşamın dördüncü on yılında nonseminomatöz tümörler ise üçüncü on yılında en yüksek sıklıktadır. Testisin germ hücreli tümörleri (TGHT) tüm malign tümörler arasında küçük bir orana sahip olmasına karşın, 15-34 yaş arası erkeklerde en sık malign

tümör olup, bu yaş grubu erkeklerde tümöre bağlı ölümlerin başta gelen nedenlerindedir (1).

Son yıllarda bir tümör baskılayıcı gen olan p53 geni ve apoptozisi kontrol eden bcl-2 geninin, birçok tümörün gelişiminde ve seyirinde rol oynadığı gösterilmiştir (2-6). TGHT'lerinde p53 ve bcl-2 ekspresyonu hakkında az sayıda çalışma vardır (7-16). Bu nedenle çalışmamızda TGHT'lerinde p53 ve bcl-2 ekspresyonu ile tümör tipi ve klinik evre arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlandı.

**Yazışma adresi:** Yrd. Doç. Dr. Yurdanur Süllü, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, 55139, Samsun

## GEREÇ ve YÖNTEM

Anabilim Dalı arşivimiz 1986-2002 yılları arası taranarak germ hücreli testis tümörü tanısı alan 49 orşiektomi spesimenine ait kesitler çalışmaya alındı. Çalışmaya alınan preparatların hematoksilin-eozin kesitleri yeniden gözden geçirildi. Tümörler 2004 WHO sınıflamasına göre sınıflandırıldı (17). Üroloji Kliniği ve Radyasyon Onkolojisi Kliniklerinden elde edilen kayıtlarla klinik evreleme yapıldı (18).

Kırk dokuz orşiektomi spesimeninden 28'i seminom (26'sı klasik, 2'si anaplastik seminom) 16'sı seminom dışı germ hücreli tümör (SDGHT), 5'i mikst seminom-seminom dışı germ hücreli tümör (MSSDGHT) olarak sınıflandırıldı. Tamponlanmış %10'luk nötral formaldehit solüsyonunda 24 saat fikse edilmiş dokulardan elde edilmiş olan parafin bloklardan uygun olanlar, 4 mikron kalınlığında kesilerek bcl-2 ve p53 antikolarıyla streptavidin biotin peroksidaz yöntemi ile immünhistokimyasal çalışma yapıldı. Bcl-2 primer antikoru olarak monoklonal mouse anti-human bcl-2 proteini (bcl-2/100/D5, Nova Castra, U.K.), p53 primer antikoru olarak "wild" ve mutant protein ile reaksiyon veren monoklonal mouse anti p53 proteini (DO-7, Novo Castra, U.K.) kullanıldı. Deparafinize ve rehidrate edilen kesitlerin endojen peroksidaz aktivitesi %10'luk hidrogen peroksit solüsyonunda 10 dakika inkübe edilerek giderildi. Kesitler 90°C'deki sitrat buffer içerisinde 4 dakika mikrodalga fırında kaynatılıp 20 dakika kadar soğuması beklendi. Protein bloke edici ajan uygulamasından sonra bcl-2 ve p53 primer antikoruyla 60 dakika oda ısısında inkübe edildi. Ardından biotinli-anti immünglobulin ve streptavidin peroksidaz konjugatı ile 10'ar dakika inkübe edildi. Renklendirici ajan olarak 3.3'diamino-benzidin (DAB) içeren kit (Biogenex, SanRamon) kullanıldı. Son olarak kesitler Mayer hemotoksilen ile 60 saniye boyanıp dehidrate edilerek kapatıldı. Kesitler DAB uygulamasına kadar tüm aşamalarda ph 7.6 fosfat tamponu ile DAB, uygulamasından sonra ise distile

su ile yıkandı.

Bcl-2 için tonsilla palatina kesitlerinde lenfoid follikülün mantle zonundaki lenfositlerin reaksiyonu eksternal pozitif kontrol ve ayrıca doku içindeki lenfositlerdeki reaksiyon ise internal pozitif kontrol olarak kullanıldı. p53 için ise kuvvetli p53 immün reaksiyonu olduğu bilinen infiltratif duktal karsinomlu bir olgudan elde edilen kesitlerdeki tümör hücrelerinin immünreaksiyonu eksternal pozitif kontrol olarak kullanıldı. Olgular bcl-2 için membranöz ve/veya sitoplazmik boyanma, p53 için ise nükleer boyanma dikkate alınarak değerlendirildi. Bcl-2 ve p53 immünhistokimyasal reaksiyonunun değerlendirilmesi %0-5 arası boyanma negatif, malign hücrelerin %5-25'i pozitif reaksiyon veriyorsa (+), %26-50'si pozitif reaksiyon veriyorsa (++) , %51-75'i pozitif reaksiyon veriyorsa(+++) , %76-100'ü pozitif reaksiyon veriyorsa (++++) olarak derecelendirilerek yapıldı (3,5).

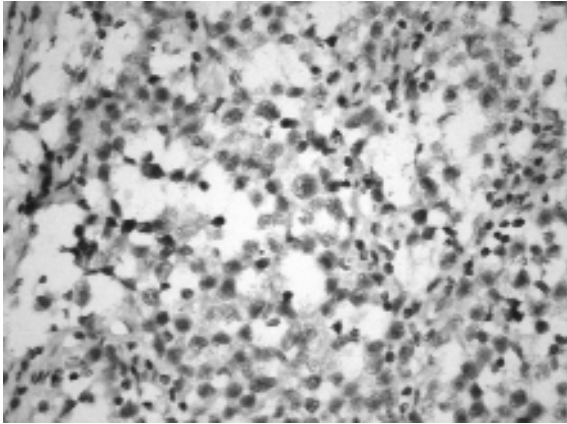
Bulguların değerlendirilmesinde Fisher'in kesin  $\chi^2$  testi kullanıldı. Anlamlılık sınırı olarak  $p < 0.05$  alındı.

## BULGULAR

Çalışmaya alınan 28 seminomlu hastanın yaş ortalaması  $35 \pm 12$  (19-63), 16 SDGHT olgusunun yaş ortalaması  $29 \pm 9$  (17-53), 5 MSSDGHT olgusunun yaş ortalaması  $28 \pm 9$  (17-40) idi.

### p53 ekspresyonu

Seminomlu 28 olgunun 24'ü (%86) p53 ile boyanırken 4'ü (%14) boyanmadı. P53 ile boyanan olguların 16'sı (%67) (+), 6'sı (%25) (++) , 1'i (%4) (+++) 1'i de (%4) (++++) idi (Resim 1). İki anaplastik seminom olgusu (+) olgular arasındaydı. Hastaların 18'inin evreleme kayıtları, 14'ünün postoperatif takipleri elde edildi. Bu hastaların ortalama takip süresi  $47 \pm 41$  ay (12-156 ay) idi. Evreleme kayıtları elde edilen 18 hastanın 13'ü evre I, 5'i evre II idi. Evre I'deki 13 olgunun 10'u (%77) p53 ile (+), 1'i (%7,7) (+++), 2'si ise negatifti. Evre II'deki 5 hastanın 2'si (%40) p53 ile (+), 3'ü (%60) (++) pozitif.



Resim 1. Seminom olgusunda p53 immünreaktivitesi (B-SA, DAB x400).

Tümör evresi ile p53 pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki yoktu ( $p>0.05$ ) (Tablo 1). SDGHT'lü 16 olgunun 12'si (%75) p53 ile boyanırken, 4'ü (%25) boyanmadı. Beş MSSDGHT olgusunun 4'ünde seminom komponenti (+), 1'inde (-) idi. On altı SDGHT ve 5 MSSDGHT olmak üzere 21 tümör olgusunda 32

Tablo 1. Seminom (klasik ve anaplastik) olgularının p53 pozitifitesi ile tümör evresi arasındaki ilişki görülmektedir.

p53 boyanması	Hasta sayısı (n=28)	Tümör evresi*			
		I	II	III	Bilinmeyen (n=10)
-	4	2	-	-	2
+	16	10	2	-	4
++	6	-	3	-	3
+++	1	1	-	-	-
++++	1	-	-	-	1

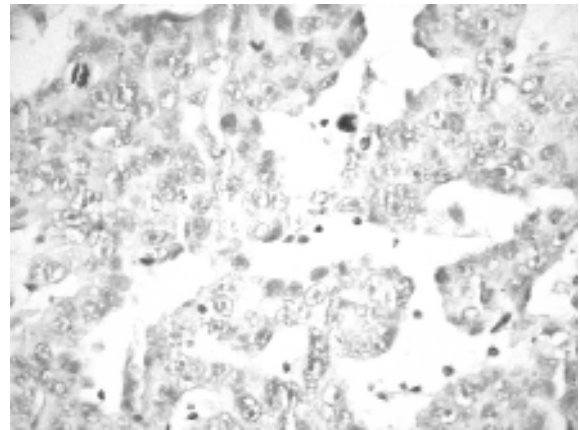
\*:  $p=0.063$ ,  $\chi^2=4.8$

Tablo 2. 16 SDGHT\* ve 5 MSSDGHT\*\* olgusunda görülen 33 tümör komponentinde p53 pozitifitesi görülmektedir.

Tümör komponenti (n=33)	p53 boyanması n (%)				
	-	+	++	+++	++++
Endodermal sinüs tümörü	1 (25)		1 (25)	1 (25)	1 (25)
Somatik tip malignitesi olan teratom	1 (33)	2 (67)			
Teratom	2 (17)	5 (42)	4 (33)	1 (8)	
Embriyonal karsinom	1 (8)	3 (25)	4 (33)	4 (33)	
Koryokarsinom	2 (100)				

\*Seminom dışı germ hücreli tümör, \*\*Mikst seminom, seminom dışı germ hücreli tümör

adet non-seminomatöz komponent vardı. Bu tümör komponentlerinin p53 boyanmaları ve boyanma dereceleri Tablo 2'de gösterilmiştir. Endodermal sinüs tümörü komponenti 4 olgunun 3'ünde (%75), somatik tipte maligniteye sahip teratom komponenti 3 olgunun 2'sinde (%67), teratom komponenti 12 olgunun 10'unda (%83.3), embriyonal karsinom komponenti 12 olgunun 11'inde (%92) p53 boyanması gösterirken, koryokarsinom komponenti 2 olgunun 2'sinde de (%0) boyanmadı. Embriyonal karsinom olgularında belirgin olarak daha koyu nükleer boyanma gözlemlendi (Resim 2). Somatik tipte malignite içeren teratom komponentlerinin her üçünde de malign komponent adenokarsinomdu.



Resim 2. Embriyonal karsinomda p53 immünreaktivitesi (B-SA, DAB x400).

### Bcl-2 ekspresyonu

Seminomlu 28 olgudan sadece 2'sinde (%7) bcl-2 boyanması görülürken, 26 (%93) olguda boyanma yoktu. Bcl-2 ile boyanan 2 olgunun 1'i (+++), diğeri ise (+) idi.

SDGHT'lü 16 olgunun 7'sinde (%44) bcl-2 boyanması gözlemlendi. p53 boyanmasının negatif olduğu 4 olgudan sadece teratomlu 1 olguda bcl-2 boyanması pozitif.

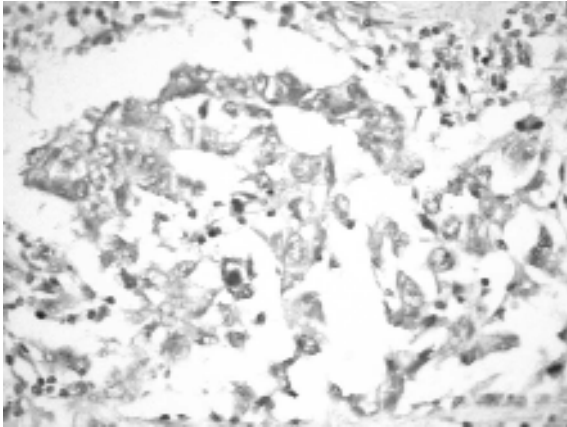
MSSDGHT'lü 5 olgudan sadece 1'inde seminom komponenti (+), diğelerinde negatif. SDGHT ve MSSDGHT olgularında yer alan 32 adet tümör komponentinin bcl-2 boyanmaları

Tablo 3'te gösterilmiştir. Endodermal sinüs tümöründe %75 (Resim 3), somatik malignitenin eşlik ettiği teratomda %33, teratomda %58 oranında bcl-2 boyanması gözlemlendi. Embriyonal karsinom ve koryokarsinom komponentlerinin hiçbirisinde bcl-2 boyanması görülmedi.

**Tablo 3. 16 SDGHT\* ve 5 MSSDGHT\*\* olgusunda görülen 33 tümör komponentinin bcl-2 pozitivitesi görülmektedir.**

Tümör komponenti (n=33)	Bcl-2 boyanması n (%)				
	-	+	++	+++	++++
Endodermal sinüs tümörü	1 (25)		1 (25)	2 (50)	
Somatik tip malignitesi olan teratom	2 (67)			1 (33)	
Teratom	5 (42)	2 (17)	4 (33)	1 (8)	
Embriyonal karsinom	12 (100)				
Koryokarsinom	2 (100)				

\*Seminom dışı germ hücreli tümör, \*\*Mikst seminom, seminom dışı germ hücreli tümör



**Resim 3. Endodermal sinüs tümörü olgusunda bcl-2 immün-reaktivitesi (B-SA, DABx400).**

## TARTIŞMA

Neoplaziler, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu veya onkogenlerin aktivasyonuna neden olan ve adım adım oluşan birçok genetik değişikliğin sonucu gelişir. Tümör baskılayıcı genlerin insanlarda birçok tümör gelişiminde önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir. Retinoblastom geni ve p53 geni bilinen en önemli

iki tümör baskılayıcı genidir (19,20). p53 geninde oluşan değişikliklerin neden olduğu p53 proteinin immünohistokimyasal olarak saptanması ile, tümörün evresi, seyri ve prognozu hakkında bilgi edinilebilir. Yeni sitogenetik araştırmalar kromozom 1 ve 12'de rastlantısal olmayan spesifik anormallikleri göstermiş olmasına rağmen, germ hücreli tümörlerin patogenezinde genetik lezyonların rolü tam olarak bilinmemektedir (18). Ulbright ve ark.'ları (21) SDGHT'lerde p53 protein ekspresyonu ile tümör agresivliğini gösteren bir belirleyici olan PCNA ekspresyonu arasında pozitif ilişki bulunduğunu bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda seminomlu olgularımızın %86'sı p53 ile boyanma gösterdi. p53 ile boyanan olgularımızın %67'si (+), %25'i (++) ve %4'ü (+++) ve %4'ü (++++) boyanmıştır. Lewis ve ark.'ları (14) 41 seminomlu olgunun 37'sinde (%90) p53 pozitifliği bulmuşlardır. Olguların %81'inde (+), %19'unda (++) olmak üzere klinik evre I seminomların %100'ünde p53 pozitifliği bildirmişlerdir. Klinik evre II olgularının ise %75'i p53 ile boyanmış olup; bu olguların %78'inde (+), %29'unda (++) boyanma saptamışlardır. Klinik evre III olan 2 olgunun ise 1'inde, (+) boyanma saptamışlardır. Bizim klinik evrelemesi elde edilebilen 18 olgumuzdan, klinik evre I'de olan 13 olgumuzun %77'si (+), %8'i (+++) p53 boyanması gösterirken, %15'i boyanma göstermemiştir. Çalışmamızda evre I seminomlarda p53 pozitifliği %85 olarak bulundu. Klinik evre II olgularımız ise; %40'ı (+), %60'ı (++) olmak üzere %100 oranında p53 boyanması göstermişlerdir. Lewis ve ark.'larının çalışmasında olduğu gibi çalışmamızda da seminom olgularının büyük kısmı p53 ile (+) ve (++) gibi zayıf ve orta derecede pozitive göstermiştir. Aynı çalışmada seminomlarda ileri evrede p53 ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir. Biz evre II'de, evre I'e göre daha yüksek oranda ve şiddette p53 ekspresyonunu gözlememize rağmen bu istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Bartkova ve ark.'ları, (7) 47 seminom ol-



gusunun %23'ünde p53 boyanması olmadığını, %43'ünde zayıf, %34'ünde orta derecede olmak üzere olguların toplam %77'sinde p53 boyanması olduğunu gözlemişlerdir. Aynı çalışmada preinvaziv germ hücreli tümörlerde %59 oranında p53 pozitifliği bildirerek, germ hücreli testis tümörlerinin patogeneğinde p53 geninin rol oynadığını ileri sürmüşlerdir. Soini ve Paakko (16) 15 saf seminom olgusunun %73'ünde p53 ekspresyonu olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada seminom olgularının bu yüksek p53 ekspresyonuna karşın, apopitozis oranı da yüksek olarak bulunmuştur. Bu durum germ hücreli tümörlerde p53 mutasyonu olmadığı, eksprese edilen proteinin doğal yapıda p53 proteini ("wild" tip p53 proteini) olduğu düşüncesi ile açıklanmıştır.

p53 ekspresyonunun genellikle radyoterapi ve kemoterapiye dirençle birlikte olması TGHT'lerinin de radyoterapi ve kemoterapiye duyarlı olmaları nedeniyle, TGHT'lerinde p53 protein ekspresyonunun p53 geninde oluşan bir mutasyona bağlı olup olmadığı bir çok çalışmada araştırılmıştır (8,13,15,22,23,24). Testisin germ hücreli tümörlerinde p53 mutasyonu olduğunu bildiren çalışmalara karşın, bu tümörlerde eksprese olan proteinin "wild" tip p53 proteini olduğunu bildiren çalışmalar da vardır (13,22,23).

SDGHT olgularımızın %75'inde p53 boyanması saptanmıştır. Birden fazla tümör komponenti içeren tüm germ hücreli tümör olgularımızda boyanma şiddeti her bir komponent için değişmektedir. Bizim çalışmamızda embriyonal karsinom komponentlerinin %92'sinde boyanma gözlenmiştir. Lewis ve ark.'ları (14) evre I seminom dışı germ hücreli tümörlerin %33, evre II tümörlerin %61, evre III tümörlerin ise %67'sinde p53 boyanması olduğunu bildirmişlerdir. Embriyonal karsinomlarda evre arttıkça, p53 ekspresyonunda artış olduğunu ve tümördeki embriyonal karsinom oranı, vasküler invazyon ve p53 ekspresyonu varlığının gizli nodal hastalık için risk faktörü olduğunu bildirmişlerdir (14). Embriyonal karsinom komponenti,

SDGHTT'lerde en kuvvetli p53 boyanması gösteren komponenttir (14). Bartkova ve ark.'ları (7) teratom ve mikst tümörlerin teratom komponentlerinde p53 ile ya boyanma olmadığını veya oldukça zayıf bir boyanma olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca endodermal sinüs tümörleri ve koryokarsinomlarda oldukça değişken yoğunlukta boyanma gözlemişlerdir. Bartkova ve ark.'ları (7) embriyonal karsinomların %94'ünde, embriyonal karsinom ve teratomlu mikst olguların %92'sinde, seminom ve embriyonal karsinomların %80'inde boyanma olduğunu gözlemişlerdir. SDGHTT'lerinden endodermal sinüs tümörü diğer çalışmalara uyumlu olarak çalışmamızda da yoğun p53 boyanması gösteren tümör komponenti idi. Somatik malignite içeren teratom komponenti çalışmamızda zayıf p53 boyanması göstermiştir. İki koryokarsinom olgumuzda saptadığımız p53 negatifliği bu tümörlerin patogeneğinde ve seyirinde p53 dışındaki moleküler mekanizmaların rol oynayabileceğini akla getirmekle birlikte olgu sayımız yorumlama için yeterli değildir.

Serimizde seminomlu olgularımızın %7'si bcl-2 ile boyanırken, %93'ü boyanmadı. SDGHTT olgularımızın ise %44'ünde bcl-2 boyanması gözlendi. Bcl-2 pozitifitesi teratom, somatik malignite içeren teratom ve endodermal sinüs tümörü olgularımızda görülürken, embriyonal karsinom ve koryokarsinom olgularımızda boyanma olmamıştır. Soini ve Paakko (16) embriyonal karsinomlu ve seminomlu olguların bcl-2 ile boyanmadığını bildirmişlerdir. Mikst germ hücreli tümörlerde bcl-2 boyanmasının az sayıda stromal hücrelerde ve immatür teratomlu olguların epiteliyal hücrelerinde görüldüğü bildirilmiştir. Bizim bulgularımız Soini ve Paakko'nun (16) bulguları ile uyumlu idi. Eid ve ark.'ları (10) çalışmalarında seminomlarda %42.3, SDGHT'lerde ise %68 oranında olmak üzere TGHT'lerinde %58 oranında bcl-2 pozitifliği saptamışlar ve bcl-2 ekspresyonunun ileri evrede belirgin olarak arttığını bildirmişlerdir. Bcl-2 pozitifliği saptadığımız olguların klinik evresine ait bilgimiz olmadığından, bcl-2 poziti-

tifliği ile evre arasındaki ilişki değerlendirilememiştir.

Bu çalışmada TGHT'lerinde p53 ve bcl-2 ekspresyonu araştırılmış, sadece seminomlu yerterli sayıda olgunun klinik evresine ait kayıt elde edilebildiğinden, seminomlarda klinik evre ile p53 ekspresyonu arasındaki ilişki incelenmemiştir. Yine hastalarımızın takiplerine ait yerterli kayıtların olmayışı nedeni ile p53 ve bcl-2 ekspresyonu ile sağ kalım süreleri arasındaki ilişki değerlendirilememiştir.

Seminomlarda %86 ve SDGHT'lerde %75 oranında saptanan p53 ekspresyonu ile SDGHT'lerde %44 oranında gözlenen bcl-2 pozitivitesinin bu tümörlerin gelişimi ve prognozundaki rolünü açıklayabilmek için geniş serilerde, uzun takip süreleri ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

1. Bray F, Richardi L, Ecbom A, et al. Trends in testicular cancer incidence and mortality in 22 European countries: continuing increases in incidence and decline in mortality. *Int J Cancer* 2006;118:3099-3111.
2. Barbareschi M, Caffo O, Veronese S, Leek RD, Fina P, Fox S, et al. Bcl-2 and p53 expression in node-negative breast carcinoma: A study with long-term follow-up. *Hum Pathol* 1996;27:1149-1155.
3. Bauer JJ, Sesterhenn IA, Mostofi FK, Mcleod DG, Srivastana S, Moul JW. Elevated levels of apoptosis regulator proteins p53 and bcl-2 are independent prognostic biomarkers in surgically treated clinically localized prostate cancer. *J Urol* 1996;156:1511-1516.
4. Bhatia KG, Gutierrez MI, Huppi K, Siwarski D, Magrath IT. The pattern of p53 mutations in Burkitt's lymphoma differs from that of solid tumors. *Cancer Res* 1992;52:4273-4276.
5. Friedrich MG, Riethdorf S, Erbersdobler A, Tiemer C, Schwaibold H, Sölter JK, et al. Relevance of p53 gene alterations for tumor recurrence in patients with superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 2001;39:159-166.
6. Han H, Landreneau RJ, Santucci TS, Tung MY, Macheary RS, Shackney SE, et al. Prognostic value of immunohistochemical expressions of p53, HER-2/neu, and bcl-2 in Stage I non-small-cell lung cancer. *Human Pathology* 2002;33:105-110.
7. Bartkova J, Bartek J, Lukas J, Vojtesek B, Staskova Z, Rejthar A, et al. p53 protein alterations in human testicular cancer including preinvasive intratubular germ-line neoplasia. *Int J Cancer* 1991;49:196-202.
8. Burger H, Nooter K, Boersma AWM, Kortland CJ, van den Berg Pand Stoter G. Expression of p53, p21/WAF/CIP, bcl-2, bax, bcl-x and bak in radiation-induced apoptosis in testicular germ cell tumor lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998;41:415-424.
9. Deriese WTW, Orazi A, Foster RS, Donohue JP, Messer JE. The clinical relevance of p53 expression in early stage nonseminomatous germ cell tumor. *J Urol* 1993;149:311 A, abstract 392.
10. Eid H, Gulyas M, Geczi L, Bodrogi I, Institoris E, Bak M. Expression of bcl-2 in testicular carcinoma: correlation with tumor progression and MDR1/Pgp. *Cancer* 1998;83:331-336.
11. Fleischhacker M, Strohmeyer T, Imai Y, Slamon DJ, Koeffler HP. Mutations of the p53 gene are not detectable in human testicular tumors. *Mod Pathol* 1994;7:435-439.
12. Korman HJ, Schultz DS, Linden MD, Miles BJ, Peabody JO. Proliferating cell nuclear antigen and mutant p53 staining in testicular nonseminomatous germ cell tumors. A pilot study. *J Urol Pathol* 1994;2:327-336.
13. Kuczyk MA, Serth J, Bokemeyer C, Jonassen J, Machters S, Werner M, Jonas U. Alterations of the p53 tumor suppressor gene in carcinoma in situ of the testis. *Cancer* 1996;78:1958-1966.
14. Lewis DJ, Sesterhenn IA, McCarty WF, Moul JW. Immunohistochemical expression of p53 tumor suppressor gene protein in adult germ cell testis tumors: Clinical correlation in stage I disease. *J Urol* 1994;152:418-423.
15. Peng HQ, Hogg D, Malkin D, Bailey D, Gallie BI, Bulbul M, et al. Mutations of the p53 gene do not occur in testis cancer. *Cancer Res* 1993;53:3574-3578.
16. Soini Y, Paakkö P. Extent of apoptosis in relation to p53 and bcl-2 expression in germ cell tumors. *Hum Pathol* 1996;27:1221-1228.
17. Berney DM. A practical approach to the reporting of germ cell tumours of the testis. *Curr Diagn Pathol* 2005;11:151-161.
18. Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology Vol I, 9th ed., Mosby, Philadelphia, 2004. p.2817-2818.
19. Cote RJ, Taylor CR. Immunohistochemistry and related marking techniques. In: Anderson's Pathology 10th ed. Damjanov I, Linder J (eds) Mosby, USA, 1996. p.136-175.
20. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. The male genital tract. Ch: 21 Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th ed. Elsevier Saunders, China. 2005. p.1034-1058.
21. Ulbright TM, Roth LM. Testicular and paratesticular tumors. In: Sternberg SS, ed. Diagnostic Surgical Pathology (2) 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 1999. p.1973-2033.
22. Wei YD, Jiafu Z, Xi QS, Yongjiang M, Xiulong Z, Daizong L, et al. P53 gene mutations in Chinese human testicular seminoma. *J Urol* 1993;150:884-886.
23. Giwercman A, Bruun E, Frimodt MC, Skakkebaek NE. Prevalence of carcinoma in situ and other histopathologic abnormalities in testes of men with a history of cryptorchidism. *J Urol* 1989;142:998-1002.
24. Chresta CM, Masters JRW, Hickman JA. Hypersensitivity of human testicular tumors to etoposide-induced apoptosis is associated with functional p53 and a high bax:bcl-2 ratio. *Cancer Res* 1996;56:1834-1841.