

Germ hücreli tümörlere eşlik eden intratübüler germ hücre neoplazisi

Intratubular germ cell neoplasia accompanying germ cell tumors

Bilir G, Çakır E, Benzer E, Pak I, Kebat T, Ardiç F

Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümü

Özet

Intratübüler germ hücre neoplazisi, invaziv germ hücreli tümörlerle birlikteliğinden dolayı, testiküler germ hücreli malignansilerin preinvaziv dönemi olarak kabul edilir. Bu çalışmada, 158 testiküler germ hücreli tümörde, intratübüler germ hücreli neoplazi sıklığı, p53 ve plasental alkalen fosfataz immunohistokimyasal boyamaları, periodik-asid Schiff - diastaz ve arjirofilik nükleoler organize bölge histokimyasal boyamaları ile değerlendirildi. 158 testiküler germ hücreli tümörün 69' unda, invaziv neoplastik odakların periferinde rezidüel seminifer tübüller bulundu. 65 olguda histomorfolojik olarak intratübüler germ hücre neoplazisi görüldü. 65 olgunun 63' ünde (%96.9) , neoplastik intratübüler germ hücreleri plasental alkalen fosfataz ve periodik-asid Schiff (PAS) - diastaz ile glikojen lehine boyanma gösterdi. 48 (%73.8) olguda, atipik germ hücrelerinde p53 ile boyanma görüldü. PLAP ve PAS-diastaz boyama yöntemleri arasında istatistiksel olarak %100 anlamlı uyum saptandı (p<0.01). Intratübüler germ hücreli neoplazi saptanan olgularda ortalama arjirofilik nükleoler organize bölge değeri 5.83 olarak hesaplandı. Çoğu invaziv germ hücreli tümörde intratübüler germ hücreli neoplazinin bulunduğu ve periodik-asid Schiff -diastaz ve plasental alkalen fosfataz boyamalarının intratübüler germ hücreli neoplazinin tesbitinde faydalı olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: testis, intratübüler germ hücre neoplazisi, immünhistokimya, histokimya

Summary

Intratubular germ cell neoplasia is considered a preinvasive stage of testicular germ cell malignancy because of its association with invasive germ cell tumors. In this study, the frequency of intratubular germ cell neoplasia in testicular germ cell tumors and immunohistochemical stains for p53, placental alkaline phosphatase and histochemical stains for periodic-acid Schiff (PAS)- diastase and argyrophilic nucleolar organizer regions were evaluated. 69 of 158 testicular germ cell tumors, residual seminiferous tubules were found at the periphery of the invasive neoplastic foci. Intratubular germ cell neoplasia was detected histomorphologically in 65 cases. Neoplastic intratubular germ cells were reactive with placental alkaline phosphatase and positive for glicogene with periodic-acid Schiff - diastase stain in 63 (%96.9) of these cases. In 48 cases (%69), atypical germ cells were rective with p53. Argyrophilic nucleolar organizer regions count for the 63 cases which have intratubular germ cell neoplasia was 5.83. It is concluded that intratubular germ cell neoplasia is present in most invasive germ cell tumors and the periodic-acid Schiff - diastase and placental alkaline phosphatase stains are useful in detecting intratubular germ cell neoplasia.

Key Words: testis, germ cell tumor, intratubular germ cell neoplasia

Giriş

İnvaziv testiküler germ hücreli tümörlerin prekürsörü olarak kabul edilen intratübüler germ hücre neoplazisi, ilk kez Skakkebaek tarafından tanımlanmıştır (1,2,3).

Günümüzde, bu antite için yaygın olarak kullanılan terim "intratübüler germ hücre neoplazisi, anklasifiye tip (ITGCNU)" tir . ITGCNU' nin testiküler germ hücreli tümörlerin prekürsörü olduğunu destekleyen bulgular bulunmaktadır (4). Bunlar; ITGCNU saptanan hastaların %50' sinde, eğer orşiektomi uygulanmazsa 5 yıl içinde invaziv karsinom gelişimi; sıklıkla testiküler tümör riski yüksek olan popülasyonda bulunması ve daima spermatositik seminom ve prepubertal testis tümörleri

Yazışma adresi: Ebru ÇAKIR, Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma

Hastanesi Patoloji Bölümü, ANKARA

Makalenin geliş tarihi : 14.07.2006 ; kabul tarihi : 12.02.2007

dışındaki testiküler germ hücreli tümörlere komşu seminifer tübüllerde bulunmasıdır. Erişkinlerde spermatositik seminom dışındaki seminomatöz ve nonseminomatöz invaziv testiküler germ hücreli tümöre komşu testiste % 85-100 oranında ITGCNU bulunmaktadır (5). Ancak, çocukluk çağında görülen testiküler tümörlerde ITGCNU saptanamamıştır (6,7). ITGCNU, çocukluk çağında, adrojen insensitivite sendromu (testiküler feminizasyon), gonadal disgenезiler ve kriptoorşidizm gibi çeşitli gelişimsel bozukluklarda bildirilmiştir (8,9).

Bu çalışmada, çocukluk ve erişkin döneminde görülen çeşitli germ hücreli tümörlerde, komşu testisteki seminifer tübüllerde ITGCNU varlığını morfolojik, histokimyasal ve immunohistokimyasal yöntemlerle araştırdık ve bunları literatürdeki bulgularla birlikte yeniden değerlendirdik.

Materyal ve Metod

Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümü'nde Ocak 1990- Mart 2003 tarihleri arasında tanı almış 66 seminomatöz ve 92 nonseminomatöz testis tümörü olgusuna ait, formalin fikse parafine gömülü dokulardan elde edilen hematoksilen eosin boyalı kesitler yeniden değerlendirildi. Bu olguların 69' unda değerlendirme için yeterli miktarda rezidüel testis dokusu mevcuttu. Bu 69 olgu çalışma grubumuzu oluşturdu. Hematoksilen eosin boyalı kesitlerde, rezidüel seminifer tübüllerde ITGCNU' nin tipik morfolojik görünümü araştırıldı. Morfolojik kriterler belirgin olmakla birlikte, rutin kullanım olan formalin fikse, parafine gömülü kesitlerde, atipik germ hücrelerinin tanımlanması oldukça zor olduğundan, çalışma grubumuzu oluşturan olgularda, ITGCNU için oldukça duyarlı olduğu bildirilen plasental alkalin fosfat (PLAP), p53 ve periodik-asid Schiff (PAS)- diastaz boyama yöntemlerini uyguladık. İmmunohistokimyasal çalışmada, streptavidin biotin peroksidaz yöntemi ile PLAP (predilüe; Neomarkers) ve p53 (1:1000; Neomarkers) antikorları uygulandı. ITGCNU alanlarındaki atipik germ hücrelerinde, PLAP boyanmasında membranöz boyanma, p53 boyanmasında ise nükleer boyanma esas alınarak değerlendirme yapıldı. Ayrıca, PAS- diastaz boyamasına ek olarak, histokimyasal yöntem ile gümüşle işaretlenmiş 'nucleolar organiser regions' (AgNORs) boyanmasında, primer spermatositler, ITGCNU alanlarındaki atipik germ hücreleri ve testiküler tümörlerdeki boyanma paterni incelendi ve gümüşle boyanan benek sayıları hesaplandı. Gümüşle afinitesi olan NOR proteinleri, AgNOR yöntemi ile işaretlenerek, ışık mikroskopunda koyu benekler halinde izlendi. AgNOR yönteminin en büyük problemi, beneklerin sayılmasında kesin olarak standart bir yöntemin olmayışıdır. Önerilen iki türlü sayma yöntemi vardır (10,11). Birincisinde ayrı duran tüm benekler ayrı, ama grup oluşturanlar tek sayılmaktadır. İkincisinde ise, intra ve ekstra nükleoler ayrı görülebilen tüm benekler sayılmaktadır. Bizim çalışmamızdaki olgularda, ayrı duran

tüm benekleri ayrı, grup oluşturan benekler tek olarak sayıldı.

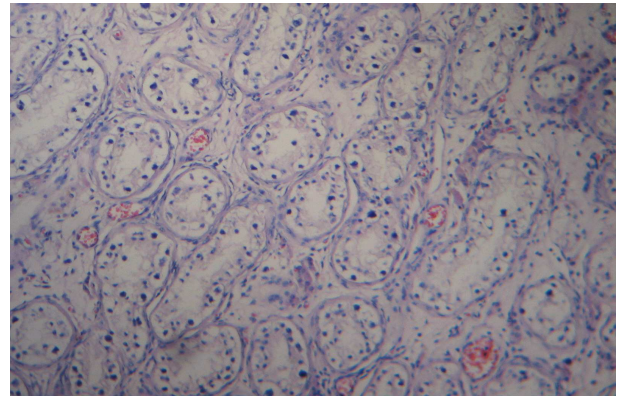
Verilerin analizi SPSS 11.5 paket programında yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler gözlem sayısı ve (%) şeklinde gösterildi. PLAP, PAS ve P53 arasında tanısal benzerliğin olup olmadığı McNemar testiyle araştırıldı. PLAP'a göre PAS ve P53'ün performansını değerlendirmek için sensitivite, spesifisite, pozitif ve negatif tahmini değerler hesaplandı. Yöntem arasındaki tanısal uyumun düzeyini belirlemek için kapa katsayısı incelendi. $p < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Ocak 1990- Mart 2003 tarihleri arasında tanı alan ve yeniden değerlendirilen 66 seminomatöz ve 92 nonseminomatöz testis tümörü olgusundan, yeterli rezidüel testis dokusu içeren 69' u çalışma grubumuzu oluşturdu. Bu olguların 37' si seminom, 17' si mikst germ hücreli tümör, 11' i embriyonel karsinom, 1' i yolk sac tümör, 2' si koriokarsinom ve 1' i de rabdomyosarkomatöz komponent içeren teratom tanısı almıştı.

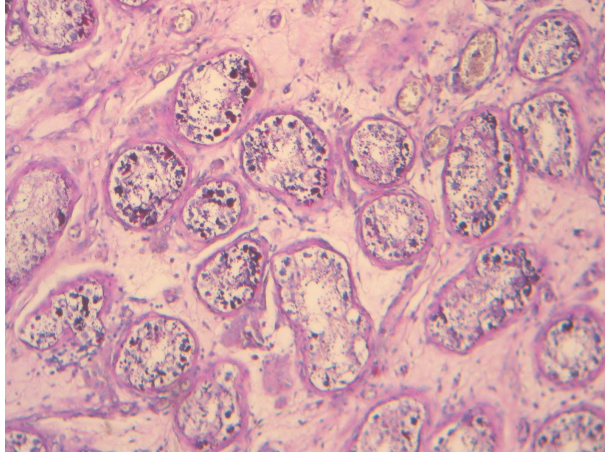
Olguların yaş ortalaması 29.34 olup en genci 3, en yaşlısı 56 yaşında idi. En genç hasta yolk sac tümör, en yaşlı hasta klasik seminom tanısına sahipti.

Çalışma grubumuzu oluşturan 69 olgunun 65' inde, invaziv tümör komşuluğundaki seminifer tübüllerde, bazal membran boyunca tek sıralı dizilim gösteren, berrak sitoplazmalı, iri atipik germ hücreleri izlendi. Bu hücrelerde nükleus yuvarlak, hiperkromatik ve spermatogonialardan daha iri olup, belirgin nükleoller mevcuttu. Nükleer membran kalın ve irregülerdi. Mitoz izlendi fakat sıklıkla belirgin değildi. Bu hücreler, seminifer tübüller içindeki sertoli hücrelerine eşlik etmekteydi. ITGCNU içeren seminifer tübüllerin duvarlarında belirgin kalınlaşma görüldü (Resim 1).

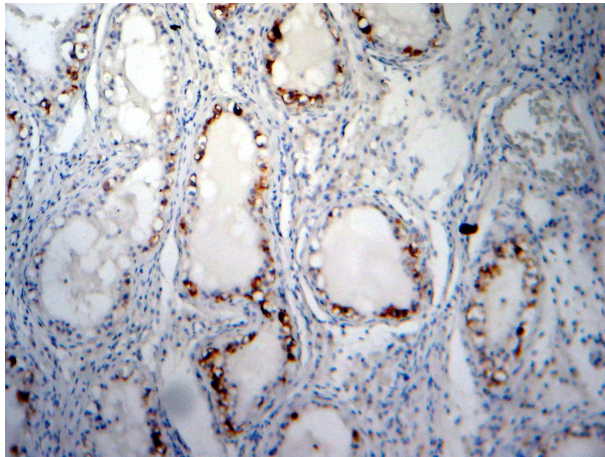


Resim 1. Seminifer tübüller içindeki atipik germ hücrelerinin morfolojik görünümü (H-E, x100)

Histomorfolojik olarak ITGCNU içeren 65 olgunun 63'ünde (%96.9) seminifer tübüller içindeki atipik germ hücrelerinde PAS ile boyanan, diastaz ile kaybolan glikojen lehine intrasitoplazmik boyanma (Resim 2) ve PLAP ile membranöz boyanma görüldü (Resim 3). ITGCNU içeren 63 olgudan 48'inde (%73.8) atipik germ hücrelerinde p53 ile boyanma görülürken, geri kalan olgularda PAS-diastaz ile glikojenin ve PLAP ile de membranöz boyanma paterninin izlenmesine rağmen, p53 ile nükleer boyanma görülmedi.

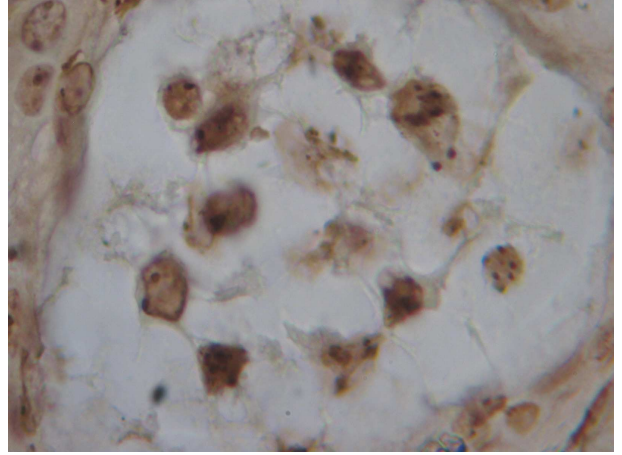


Resim 2. İntratübüler atipik germ hücrelerinde abondan intrasitoplazmik glikojen (PAS-diastaz, x100)



Resim 3. İntratübüler atipik germ hücrelerinde PLAP boyanması (PLAP, x100)

İstatiksel olarak PLAP' a göre PAS boyasının performansı değerlendirildiğinde, sensitivite %100, spesivite %100, pozitif tahmini değer %100, negatif tahmini değer %100 olarak hesaplandı . İki boyama yöntemi arasında boyanmanın görülmesi yönünden istatiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0.01$). Ayrıca iki boyama yöntemi arasında tanı koyma yönünden %100 anlamlı uyum saptanmıştı ($p<0.01$).



Resim 4. İntratübüler atipik germ hücrelerinde AgNORs (AgNors, x1000)

P53 'ün PLAP ve PAS' a göre performansı değerlendirildiğinde ise sensitivite %76.2, spesivite %100, yanlış negatiflik %23.8, yanlış pozitiflik %0, pozitif tahmini değer %100, negatif tahmini değer ise %11.8 olarak hesaplandı. P53' ün pozitif boyanma yaygınlığı %73.8 iken PLAP ve PAS' in pozitif boyanma yaygınlıkları %96.9 olup aradaki bu fark istatiksel olarak anlamlıydı ($p<0.01$). Yöntemler arasında pozitif boyanma yönünden anlamlı bir uyum tesbit edilmesine karşın kapp katsayısı çok zayıf bulundu ($kappa= \%16.5$).

ITGCNU saptanan olgularda ortalama AgNORs değeri 5.83 olarak hesaplandı (Resim 4). En yüksek AgNORs değeri 8.4, en düşük AgNORs değeri 4.36 olarak bulundu. En yüksek AgNORs değerine sahip ITGCNU olgusu seminom tanısı, en düşük AgNORs değerine sahip ITGCNU olgusu ise mikst germ hücreli tümör tanısı almıştı. Kontrol olarak seçilen tümör olgularının ortalama AgNORs değeri 9.16, primer spermatositlerde ortalama AgNORs değeri 2.2 olarak bulundu.

Tartışma

İntratübüler germ hücre neoplazisi, ilk olarak Skakkebaek tarafından tanımlanmıştır ve invaziv testiküler germ hücreli tümörlerin prekürsörü olarak kabul edilmektedir (1,2,3,12). Erişkinlerde spermatositik seminom dışındaki seminomatöz ve nonseminomatöz invaziv testiküler germ hücreli tümöre komşu testiste % 85- 100 oranında ITGCNU bulunmakla birlikte çocukluk çağında görülen testiküler tümörlerde ITGCNU saptanamamıştır (5,6,13).

Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak, olguların %91'inde invaziv testiküler germ hücreli tümöre komşu testiste ITGCNU izledik. Bu bulgu ITGCNU' nin testiküler germ hücreli tümörlerin prekürsörü olduğu görüşünü desteklemektedir. Abondan intrasitoplazmik glikojen varlığı ITGCNU hücrelerinde yararlı bir

belirleyicidir (5,14). Sertoli hücreleri ve normal germ hücreleri çok az miktarlarda glikojen içerir.

Testiküler örneklerde immünohistokimyasal olarak PLAP ile membranöz boyanmanın ve PAS ile glikojenin gösterilmesi ile atipik germ hücreleri kolaylıkla saptanabilir (10). PLAP,ITGCNU için oldukça duyarlı bir belirleyicidir (10,12). Normal erişkin germ hücrelerinde eksprese edilmez, bununla birlikte, ITGCNU tanısı için tamamen spesifik değildir. Çünkü, nadiren yaşamın ilk yılındaki normal immatür germ hücrelerinde de eksprese edilir. PLAP fetal germ hücrelerinde de boyandığı için fetustaki ITGCNU tanısı için yararlı bir marker değildir (10,14).

Soosay ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, erişkin ve çocukluk dönemindeki testiküler germ hücreli tümörlere komşu testiste ITGCNU alanlarına PLAP uygulanmış ve yalnızca erişkinlerdeki tümörlere komşu atipik hücrelerde boyanma görülmüştür (13). Bir çalışmada, infantil germ hücreli tümörlere komşu germ hücrelerinin proliferatif olduğu fakat neoplastik olmadığı, morfolojinin ve biyolojik davranışın adölesan ve erişkin dönemden farklı olduğu ileri sürülmüştür (15). Başka çalışmalarda da, infantil testiküler germ hücreli tümörlerin ITGCNU ile ilişkili olmadığı bulunmuş, farklı orjinden geliştiği düşünülmüştür (6,16,13). Ancak, Stamp ve arkadaşlarının yayınladığı bir olguda, immatür teratomlu çocukta atipik germ hücreleri izlenmiş ve bu hücrelerin PLAP ile boyandığı, PAS-diastaz ile glikojen içerdiği gösterilmiştir (7).

Çalışmamızda 63 (%96.9) olguda, PAS-diastaz ile intrasitoplazmik glikojen lehine boyanma izledik. Bu olguların tümünde PLAP ile membranöz boyanma da izlendi ve iki boyama yöntemi arasında tanı koyma yönünden %100 uyum saptandı ($p<0.01$). Prepubertal ve pubertal yaştaki olgularda ise ITGCNU' nun tipik morfolojisi ve PLAP boyanması görülmedi.

Bazı çalışmalarda, p53' ün testiküler tümörler ve eşlik eden ITGCNU alanlarında önemli miktarda eksprese edildiği gösterilmiştir (17,18). Çalışmamızda, PLAP ve PAS diastaz ile glikojen lehine boyanma gösteren 63 ITGCNU olgusunun 43' ünde (%73.8) atipik germ hücrelerinde p53 ile nükleer boyanma izledik. Bu oran literatürdeki diğer çalışmalara oranla daha düşüktür ve istatistiksel olarak p53' ün PLAP ve PAS' a göre perfor-

mansı düşük bulunmuştur. Bu nedenle, bizim çalışmamızda ITGCNU tanısında p53'ün değeri, PLAP ve PAS diastaz boyalarına göre oldukça sınırlıdır.

“ Nucleolar Organiser Regions” (NORs) , insanlarda 13, 14, 15, 21 ve 22' nci akrosentrik kromozomlarda lokalize, ribozomal genler içeren DNA sarmallarıdır (19). Hücre siklusu boyunca NOR' ların boyut ve şekillerinde meydana gelen değişiklikler, nükleol şekil ve hacmine yansımaktadır (19,20). Genellikle oldukça malign neoplazilerde AgNORs çok sayıdadır ve benign lezyonlara göre daha küçük ve irregülerdir (21). Çeşitli çalışmalarda testiküler tümörler ve eşlik eden ITGCNU olgularında yüksek AgNORs değerleri bulunmuştur (22,23). Loftus ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, spermatogonialarda nükleus başına 2.8-5.0, primer spermatositlerde 1.0-2.9, tümörlerde 7.0-20.0, ITGCNU'de 7.9-15.0 ortalama AgNORs değerleri bulunmuştur. Boyanma paterni ise tümörlerde ve ITGCNU alanlarında multipl, küçük ve irregülerdir (23).

Çalışmamızda ITGCNU saptanan olgularda ortalama AgNORs değeri 5.83 olarak hesaplandı. Kontrol olarak seçilen tümör olgularının ortalama AgNORs değeri 9.16 iken primer spermatositlerde ortalama 2.2 olarak bulundu. AgNORs boyanma paterni ise tümörlere benzer şekilde multipl, küçük ve irregüler olarak izlendi. Literatürle uyumlu olarak bu bulgular, AgNORs boyanma paterni ve sayısının ITGCNU' nin saptanmasında oldukça yararlı olduğu görüşünü desteklemektedir.

Sonuç olarak, PAS-diastaz ile atipik germ hücrelerinde intrasitoplazmik glikojenin saptanması ve PLAP ile membranöz boyanma paterninin gösterilmesi ITGCNU'nin rutin tanısında oldukça duyarlı yöntemlerdir. Hematoksilin eosin ile kolaylıkla izlenemeyen atipik germ hücrelerinin saptanmasında bu yöntemler faydalıdır. Bizim çalışmamızda, ITGCNU' yi saptamada P53' ün yararı oldukça sınırlı olmakla birlikte literatürde bu belirleyicinin de faydalı olduğu bildirilmektedir. AgNORs benign ve malign hücreler arasında farklı boyanma paterni ve sayısı göstermekle birlikte zaman alıcı ve sıkıcı bir yöntemdir. Rutin kullanımı zordur ve sayma tekniğinde problemler bulunmaktadır.

Kaynaklar

1. Giwecman A, Muller RJ, Skakkebaek NE. Carcinoma in situ of the undescended testis. *Semin Urol* 1988; 6: 110-119.
2. Montironi R. Intratubuler germ cell neoplasia of the testis: testicular intraepithelial neoplasia. *Eur Urol* 2002 Jun; 41(6): 651-4.
3. Skakkebaek NE. Possible carcinoma in situ of the testis. *Lancet* 1972; 2: 516-517.
4. Ulbright TM, Amin MB, Young RH. Tumors of the testis, adnexa, spermatic cord and scrotum. In: *Atlas of tumor pathology. Third series. Fascicle 25. Washington (DC): AFIP. 1999; p. 41-58.*
5. Coffin CM, Ewing S, Dehner LP . Frequency of intratubular germ cell neoplasia with invasive testicular germ cell tumors. *Arch Pathol Lab Med* 1985; 109 (6): 555-559.
6. Manivel JC, Simonton S, Wold LE, et al. Absence of intratubular germ cell neoplasia in testicular yolk sac tumors in children. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112: 641-645.

7. Stamp IM, Barlebo H, Rix M, et al. Intratubular germ cell neoplasia in an infantile testis with immature teratoma. *Histopathology* 1993; 22: 69-72.
8. Cassio A, Cacciari E, D'Errico A, et al . Incidence of intratubular germ cell neoplasia in androgen insensitivity syndrome. *Acta Endocrinol* 1990; 123: 416-422.
9. Müller J, Skakkebaek NE, Nielsen OH, et al. Cryptorchidism and testis cancer: atypical infantile germ cells followed by carcinoma in situ and invasive carcinoma in adulthood. *Cancer* 1984; 54: 629- 634.
10. Hustin J, Collette J, Franchimont P. Immunohistochemical demonstration of placental alkaline phosphatase in various states of testicular development and in germ cell tumors. *Int J Androl* 1987; 10: 29-35.
11. Izquierdo M, Van Der Valk P, Van Ark-Otte J. Differential expression of the c-kit proto-oncogene in germ cell tumors. *J Pathol* 1995; 177: 253-258.
12. Jones TD, Ulbright TM, Eble JN, et al. OCT4 A sensitive and specific biomarker for intratubular germ cell neoplasia of the testis. *Clinical Cancer Research* 2004; 10: 8544-47.
13. Soosay GN, Bobrow L, Happerfield L, et al. Morphology and immunohistochemistry of carcinoma in situ adjacent to testicular germ cell tumors in adults and children: implications for histogenesis. *Histopathology* 1991; 19: 537-544.
14. Koide O, Iwai S, Baba K, et al. Identification of testicular atypical germ cells by an immunohistochemical technique for placental alkaline phosphatase. *Cancer* 1987; 60: 1325-1330.
15. Hawkins E, Heifetz SA, Giller R, et al. The prepubertal testis (prenatal and postnatal): Its relationship to intratubular germ cell neoplasia: A combined pediatric oncology group and children's cancer study group. *Hum Pathol* 1997; 28: 404-410.
16. Hartwick W, Ro J, Ordonez N. Testicular germ cell tumors under age 5 : Does intratubular germ cell neoplasia exist?. *Lab Invest* 1990; 62: 43A.
17. Guillou L, Estreicher A, Chaubert P, et al . Germ cell tumors of the testis overexpress wild-type p53. *Am J Pathol* 1996; 149: 1221-1228.
18. Moore BE, Banner BF, Gokden M, et al. p53 a good diagnostic marker for intratubular germ cell neoplasia, unclassified. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2001 sep; 9(3): 203-6.
19. Crocker J . Nucleolar organizer regions in Underwood JCE (ed): *Current topics in pathology*, Heidelberg: Springer Verlag, 1990, pp: 91-149.
20. Derenzini M, Ploton D. Interphase nucleolar organizer regions in Crocker J. (ed) : *Molecular Biology in Histopathology*. John Wiley and Sons 1994; pp:121-149.
21. Derenzini M, Betts CM, Ceccarelli M. et al. Ultrastructurel organization of nucleoli in benign naevi and malignant melanomas. *Virchows Arch B [Cell. Pathol.]* 1986;5: 343-352.
22. Delahunt B, Mostofi FK, Sesterhenn IA, et al . Nuclear organizer regions in seminoma and intratubular malignant germ cells. *Mod Pathol* 1990; 3: 141-145.
23. Loftus BM, Gilmartin LG, O'Brien MJ, et ali. Intratubular germ cell neoplasia of the testis: identification by placental alkaline phosphatase immunostaining and argyrophilic nuclear organizer region quantification. *Hum Pathol* 1990; 21: 941-948.

**Bu çalışma 29-31 Mayıs 2003 tarihinde Konya'da yapılan XVI. Ulusal Patoloji Kongresi'nde poster bildirisi olarak sunulmuştur.*