



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
ΤΟΜΕΑΣ: ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΟΡΧΕΩΝ  
ΑΠΟ ΓΕΝΝΗΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ  
ΕΠΙΒΙΩΣΗ

ΠΑΣΤΕΛΛΗ ΝΙΚΟΛΕΤΑ  
ΙΑΤΡΟΣ ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2010



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»



Ημερομηνία αίτησης:

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Νίκη Αγνάντη**

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Άννα Μπατιστάτου**

Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Νίκος Σοφικίτης**

Καθηγητής Ουρολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Νίκη Αγνάντη**

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Άννα Μπατιστάτου**

Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Νίκος Σοφικίτης**

Καθηγητής Ουρολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Άννα Γούσια**

Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Θεόδωρος Βουγιουκλάκης**

Καθηγητής Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Δημήτριος Γιαννάκης**

Αναπληρωτής Καθηγητής Ουρολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Κωνσταντίνος Χαραλαμπόπουλος**

Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος διδακτορικής διατριβής:

Ημερομηνία κατάθεσης διδακτορικής διατριβής:



Στους γονείς μου  
Γιώργο και Μαρούλα ,  
που μου έδειξαν το δρόμο

Στο σύζυγό μου Βασίλη





## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η συχνότητα των νεοπλασμάτων των όρχεων από γεννητικά κύτταρα έχει διπλασιαστεί τα τελευταία τριάντα χρόνια και αν και η διάγνωση στην πλειονότητα των ασθενών γίνεται σε πρώιμο και θεραπεύσιμο στάδιο, η συνεχής αύξηση της συχνότητας αυτών των όγκων αποτελεί ανησυχητικό φαινόμενο.

Κατά συνέπεια, οι κύριος σκοπός της διδακτορικής διατριβής είναι η διερεύνηση της διαγνωστικής αξίας του OCT 3/4 στα νεοπλάσματα των όρχεων από γεννητικά κύτταρα στον Ελληνικό πληθυσμό και παράλληλα η μελέτη των υπολοίπων ανοσοϊστοχημικών δεικτών που χρησιμοποιούνται για αυτά τα νεοπλάσματα.

Η διδακτορική διατριβή περιλαμβάνει δύο μέρη, το γενικό και το ειδικό. Στο γενικό μέρος περιγράφονται στοιχεία εμβρυολογίας, ανατομίας και ιστολογικής δομής των όρχεων, τα επιδημιολογικά δεδομένα, η αιτιολογία, η ταξινόμηση, η κλινική εικόνα, αναλυτικά οι διάφοροι τύποι νεοπλασμάτων των όρχεων από γεννητικά κύτταρα, η ογκογένεση, οι ανοσοϊστοχημικοί δείκτες και τέλος το OCT 3/4.

Το ειδικό μέρος περιλαμβάνει το πρωτόκολλο της μελέτης που εστιάζεται στον ανοσοϊστοχημικό έλεγχο των χειρουργικών παρασκευασμάτων ορχεκτομής για την έκφραση των δεικτών PLAP, c-kit, CD 30 και OCT 3/4 στο νεοπλασματικό ιστό αλλά και στον παρακείμενο φυσιολογικό. Μετά τη λεπτομερή καταγραφή των αποτελεσμάτων της μελέτης με τις αντίστοιχες ιστολογικές εικόνες, ακολουθεί συζήτηση, στην οποία αναλύονται τα ευρήματα, συσχετίζονται με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας και καταγράφονται τα συμπεράσματα. Ακολουθεί η περίληψη στην ελληνική και αγγλική γλώσσα και στο τέλος παρατίθεται η βιβλιογραφία.

Το ερευνητικό μέρος της μελέτης εκπονήθηκε στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Α.Ν.Θ. «Θεαγένειο» και ένα μέρος της ανοσοϊστοχημικής μελέτης πραγματοποιήθηκε στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Γενικού Νοσοκομείου Γ. Παπανικολάου Θεσσαλονίκης. Οι ασθενείς προέρχονταν από την Ουρολογική Κλινική του Α.Ν.Θ. «Θεαγένειο».

Θεωρώ καθήκον μου να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου σε όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση αυτής της διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια της Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Νίκη Αγνάντη, επιβλέπουσα της διδακτορικής διατριβής μου, για την εμπιστοσύνη που επέδειξε στο πρόσωπο μου με την ανάθεση της διδακτορικής διατριβής, για την επιστημονική καθοδήγηση, το ενδιαφέρον και τη διάθεση που επέδειξε κατά τη διάρκεια της μελέτης.

Σημαντική ήταν η συμβολή του Καθηγητή κ. Νικολάου Σοφικίτη και της κ. Άννας Μπατιστάτου, ως μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, στη διεξαγωγή και ολοκλήρωση της μελέτης, τους οποίους ευχαριστώ θερμά για την συμπαράστασή τους.

Στη Διευθύντρια του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του Α.Ν.Θ. «Θεαγένειο» κ. Φρειδερίκη Πατακιούτα, χάρη στην παρότρυνση και τη συμπαράστασή της οποίας κατέστη δυνατή η διεξαγωγή της μελέτης, εκφράζω τις θερμές ευχαριστίες μου.

Ευχαριστώ τους συναδέλφους μου ιατρούς παθολογοανατόμους του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του Γενικού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης Γ. Παπανικολάου για την κατανόηση, τη συμπαράσταση και τη βοήθειά τους.

Σημαντική και καταλυτική ήταν η συμβολή, στην περάτωση του εργαστηριακού μέρους, των τεχνολόγων Ιατρικών Εργαστηρίων κ. Γεωργίας Ζουπούδη από το Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Α.Ν.Θ. «Θεαγένειο και του κ. Γιάννη Μωραΐτη από το Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Γενικού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης Γ. Παπανικολάου, στους οποίους και εκφράζω ιδιαίτερες ευχαριστίες.

Θεωρώ επίσης υποχρέωσή μου να ευχαριστήσω τα ακόλουθα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για την τιμή που μου έκαναν να αποδεχθούν την πρόσκληση: την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Άννα Γούσια, τον Καθηγητή κ. Θεόδωρο Βουγιουκλάκη και τους Αναπληρωτές Καθηγητές κ. Δημήτριο Γιαννάκη και κ. Κωνσταντίνο Χαραλαμπόπουλο.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Εισαγωγή	13
<b>A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>15</b>
1. Στοιχεία εμβρυολογίας	16
2. Ανατομία-Ιστολογική δομή	16
3. Γενικά χαρακτηριστικά των νεοπλασμάτων των όρχεων από γεννητικά κύτταρα	18
3.1. Επιδημιολογικά δεδομένα	18
3.2. Αιτιολογία	19
3.3. Ταξινόμηση	20
3.4. Κλινική εικόνα	20
4. Παθολογική Ανατομική των νεοπλασμάτων των όρχεων από γεννητικά κύτταρα	21
4.1. Ορχική ενδοσωληναριακή νεοπλασία από γεννητικά κύτταρα	21
4.2. Όγκοι ενός ιστολογικού τύπου (αμιγείς όγκοι)	22
4.2.1. Κλασικό σεμίνωμα	22
4.2.2. Σπερματοκυτταρικό σεμίνωμα	23
4.2.3. Εμβρυικό καρκίνωμα	24
4.2.4. Όγκος του λεκιθικού ασκού	25
4.2.5. Χοριοκαρκίνωμα	26
4.2.6. Τεράτωμα	27
4.3. Μικτοί όγκοι	28
4.4. Υποστραφείς όγκοι	28
5. Ογκογένεση	29
5.1. Γενικά	29
5.2. Ογκογένεση και IGCNU	31
5.3. Ογκογένεση και TGCTs	32
5.4. Ο ρόλος του p53	32
5.5. Εξέλιξη της IGCNU σε TGCT	33
6. Κλινική διάγνωση και θεραπευτική αγωγή	35
7. TGCTs και ταχεία βιοψία	37
8. Ανοσοϊστοχημεία και νεοπλάσματα των όρχεων από γεννητικά κύτταρα	37
8.1. PLAP	37
8.2. c-kit	38
8.3. CD 30	40
8.4. OCT 3/4	40
8.4.1. OCT 3/4 και IGCNU	44
<b>B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>47</b>
1. Σκοποί της μελέτης	48
2. Ασθενείς και Μέθοδοι	49
2.1. Ασθενείς	49
2.2. Ιστολογική εξέταση	50
2.3. Ανοσοϊστοχημικός έλεγχος	51
2.4. Εκτίμηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων	52

2.5. Κλινικά δεδομένα ασθενών-Μετεγχειρητική παρακολούθηση	52
3. Αποτελέσματα	54
3.1. Ανοσοϊστοχημική έκφραση OCT 3/4	60
3.2. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών PLAP, c-kit και CD 30	66
3.2.1. PLAP	66
3.2.2. c-kit (CD117)	67
3.2.3. CD 30 (ki-1)	67
4. Συζήτηση-Συμπεράσματα	68
5. Περίληψη	75
6. Summary	77
7. Βιβλιογραφία	81

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα νεοπλάσματα των όρχεων από γεννητικά κύτταρα εμφανίζουν ποικιλία στην ιστολογία και την κλινική συμπεριφορά τους, η οποία εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Ορισμένοι τύποι νεοπλασμάτων των όρχεων από γεννητικά κύτταρα όπως είναι το σεμίνωμα και το εμβρυικό καρκίνωμα παρουσιάζουν πολυδυναμικότητα η οποία διαφάνεται από την ικανότητα τους να διαφοροποιούνται σε σωματικά ή/και εξωεμβρυικά στοιχεία. Το εμβρυικό καρκίνωμα είναι ένα ενδογενές πολυδύναμο νεόπλασμα, αλλά και το σεμίνωμα καθώς και η ορχική ενδοσωληναριακή νεο-πλασία/καρκίνωμα *in situ*, εμφανίζουν τον φαινότυπο των άωρων γεννητικών κυττάρων. Οι άλλοι τύποι νεοπλασμάτων των όρχεων από γεννητικά κύτταρα αποτελούνται από διαφοροποιημένα κυτταρικά στοιχεία. Το OCT 3/4 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων POU, γνωστός και ως OTF3 και POU5F1, που εμπλέκεται στη ρύθμιση της πολυδυναμικότητας κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης και ανιχνεύεται στα αρχέγονα εμβρυικά κύτταρα και γεννητικά κύτταρα

Το OCT 3/4 θεωρείται ένας σημαντικός παράγοντας ο οποίος κατευθύνει τη διαφοροποίηση προς συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές και διατηρεί την πολυδυναμικότητα των εμβρυικών αρχέγονων κυττάρων<sup>135,136</sup>. Συνεπώς, αφού το OCT 3/4 εκφράζεται φυσιολογικά στα ανθρώπινα αρχέγονα κύτταρα και στα γεννητικά κύτταρα, αναμένεται να εκφράζεται και στα νεοπλάσματα από γεννητικά κύτταρα. Με βάση τις πρόσφατες ερευνητικές μελέτες, το OCT 3/4 αναδεικνύεται θετικό στην ορχική ενδοσωληναριακή νεοπλασία από γεννητικά κύτταρα, στα σεμινώματα, στα εμβρυικά καρκινώματα που εντοπίζονται στους όρχεις αλλά και εξωορχικά, στο δυσγεμίνωμα και το γοναδοβλάστωμα. Οι υπόλοιποι τύποι νεοπλασμάτων των όρχεων από γεννητικά κύτταρα δηλ. το τεράτωμα, ο όγκος του λεκιθικού ασκού, το χοριοκαρκίνωμα και το σπερματοκυτταρικό σεμίνωμα, είναι αρνητικοί για το OCT 3/4. Επιπρόσθετα, από όλους τους ερευνητές σχολιάζεται η υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα του δείκτη αυτού. Το OCT 3/4 φαίνεται να αντιπροσωπεύει ένα καινούριο ανοσοϊστοχημικό δείκτη για τους TGCTs, που θα αποτελέσει προσθήκη στην αυξανόμενη λίστα των μεταγραφικών παραγόντων.

Οι σκοποί της παρούσας μελέτης ήταν η μελέτη των διαφόρων ανοσοϊστοχημικών δεικτών οι οποίοι χρησιμοποιούνται στην παθολογοανατομική διάγνωση των νεοπλασμάτων των όρχεων από γεννητικά κύτταρα, η εκτίμηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του OCT 3/4 σε νεοπλάσματα των όρχεων από γεννητικά κύτταρα, η συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του OCT 3/4 με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των νεοπλασμάτων αυτών και η εκτίμηση της διαγνωστικής αξίας του OCT 3/4.



## **A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1.Στοιχεία εμβρυολογίας

Η εμβρυολογική καταβολή του όρχι εμφανίζεται αρχικά ως πάχυνση του εσωτερικού τοιχώματος του μεσονέφρου κατά την πέμπτη βδομάδα εμβρυικής ζωής, η οποία πάχυνση προβάλλει μέσα στο σπλαχνικό κοίλωμα. Αρχικά, διαπλάσσεται η αδιαφοροποίητη γονάδα που δεν εμφανίζει ιδιαίτερους μορφολογικούς χαρακτήρες στα δύο φύλα. Κατά την έβδομη εβδομάδα εμβρυικής ζωής τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται και σχηματίζουν δοκίδες, στις οποίες ενσωματώνονται τα αρχέγονα βλαστικά γεννητικά κύτταρα που έχουν μεταναστεύσει από το ενδόδερμα του λεκιθικού ασκού, διαμέσου του εντερικού ενδοδέρματος και του μεσοδέρματος του μεσεντερίου. Μετά τη μετανάστευση αυτή, αρχίζει η διαφοροποίηση του φύλου και η μελλοντική ανάπτυξη θηλυκής ή αρσενικής γονάδας, η οποία έχει προκαθορισθεί κατά τη γονιμοποίηση. Οι δοκίδες επιμηκύνονται, αποκτούν αυλό και αποτελούν τα σπερματικά σωληνάκια, με επιθήλιο τα σπερματογόνια. Τα κύτταρα Sertoli προέρχονται από τα κύτταρα των δοκίδων της επιφανείας της εμβρυικής καταβολής, ενώ τα κύτταρα Leydig (ή διάμεσα κύτταρα) από τα κύτταρα του μεσεγγύματος που απέμεινε ανάμεσα στις δοκίδες. Από το μεσέγγυμα προέρχεται επίσης, ο διάμεσος συνδετικός ιστός μεταξύ των σπερματικών σωληναρίων, ο λευκός ή ινώδης χιτώνας, καθώς και τα ινώδη διαφραγμάτια του όρχι τα οποία χωρίζουν ατελώς το παρέγγυμα του οργάνου σε λόβια.

Καθώς εξελίσσεται η ορχική μορφογένεση, αυξάνεται το μέγεθος των όρχεων και μετακινούνται διακοιλιακά από το οπίσθιο κοιλιακό τοίχωμα στη βουβωνική χώρα και ακολούθως στο όσχεο. Το στάδιο αυτό της διόδου του βουβωνικού πόρου μέχρι το όσχεο ξεκινάει τον έβδομο μήνα εμβρυικής ζωής και διαρκεί μέχρι τη γέννηση.

Η κατάσταση της παραμονής των όρχεων έξω από το όσχεο καλείται κρυφορχία και οι όρχεις ανευρίσκονται σε κάποιο σημείο της διακοιλιακής ή διαβουβωνικής τους οδού. Η κρυφορχία αποτελεί, όπως θα αναφερθεί αργότερα, έναν αιτιολογικό παράγοντα των νεοπλασμάτων των όρχεων.

## 2.Ανατομία-Ιστολογική δομή

Οι όρχεις βρίσκονται στο όσχεο, το οποίο επιτελεί προστατευτικό και θερμορρυθμιστικό ρόλο. Ο κάθε όρχις συγκρατείται στο όσχεο από τον σπερματικό τόνο ο οποίος αποτελείται από τον σπερματικό πόρο, από αγγεία και νεύρα. Συνήθως ο αριστερός όρχις βρίσκεται λίγο πιο χαμηλά από τον δεξιό.

Ο όρχις έχει μέγεθος καρυδιού, με μεγαλύτερη διάσταση 4-5 εκ και σχήμα ωοειδές, αποπλατυσμένο από τα πλάγια. Κάθε όρχις εμφανίζει δύο χείλη, πρόσθιο και οπίσθιο, δύο πόλους, άνω και κάτω, και δύο επιφάνειες, έσω και έξω. Κατά μήκος του οπισθίου χείλους κατέρχεται το σώμα και η ουρά της επιδιδυμίδας. Στον άνω πόλο ανευρίσκεται η κεφαλή της επιδιδυμίδας.

Ο όρχις περιβάλλεται από παντού από τον ινώδη ή λευκό χιτώνα. Στο άνω τριτημόριο του οπισθίου χείλους σχηματίζει πάχυνση που καλείται μεσαύλιο του όρχεως, από την οποία ξεκινούν ινώδη πέταλα ή διαφραγμάτια που χωρίζουν το ορχικό παρέγγυμα σε λόβια, 200-300 σε αριθμό, που το καθένα περιέχει συνήθως τρία σπερματικά σωληνάκια. Τα τελευταία αρχίζουν τυφλά κάτω από τον ινώδη χιτώνα, ακολουθούν σπειροειδή πορεία και



συγκλίνουν προς το μεσαύλιο του όρχεως όπου αναστομώνονται, σχηματίζουν το δίκτυο του Haller (rete testis) και μεταπίπτουν στα σωληνάρια των λοβίων της κεφαλής της επιδιδυμίδας.

Τα σπερματικά σωληνάρια παράγουν και αποχετεύουν τα σπερματοζωάρια.

Ανάμεσα στα σπερματικά σωληνάρια βρίσκεται η διάμεση ουσία που αποτελείται από τα κύτταρα Leydig και από στηρικτικό συνδετικό ιστό. Τα κύτταρα Leydig παράγουν την ορμόνη τεστοστερόνη, υπεύθυνη για την ανάπτυξη των δευτερογενών χαρακτήρων του άντρα και τη γενετήσια λειτουργία.

Οι όρχεις περιβάλλονται από τους εξής χιτώνες, από μέσα προς τα έξω: α) τον ίδιο ελυτροειδή χιτώνα, ο οποίος είναι ορογόνος χιτώνας, προέρχεται από το περιτόναιο χωρίς ωστόσο να επικοινωνεί με την περιτοναϊκή κοιλότητα. Αποτελείται από δύο πέταλα, το περισπλάχνιο που περιβάλλει τον όρχι και την επιδιδυμίδα και το περίτονο, β) τον κοινό ελυτροειδή χιτώνα, ο οποίος προέρχεται από την εγκάρσια περιτονία, γ) τον έξω κρεμαστήρα μυ, ο οποίος είναι γραμμωτός μυς που καταφύεται πάνω στον κοινό ελυτροειδή χιτώνα, δ) την κρεμαστήρια περιτονία, ε) τον δαρτό, ο οποίος είναι λεπτό ινομυώδες πέταλο με λείες μυϊκές ίνες, και στ) το όσχεο.

Η αναγνώριση των χιτώνων και της διήθησης τους από νεόπλασμα έχει ιδιαίτερη σημασία γιατί καθορίζει την κλινική σταδιοποίηση κατά TNM. Έτσι νεόπλασμα που περιορίζεται στον όρχι και την επιδιδυμίδα και που μπορεί να διηθεί τον ινώδη ή λευκό χιτώνα του όρχεως χωρίς όμως επέκταση στον ίδιο ελυτροειδή χιτώνα, κατατάσσεται στο στάδιο T1. Η διήθηση και του ιδίου ελυτροειδή χιτώνα κατατάσσει το νεόπλασμα στο στάδιο T2.

Ο σπερματικός πόρος αποτελεί τη συνέχεια της ουράς της επιδιδυμίδας, περνά μέσα από τον βουβωνικό πόρο και φθάνει μέχρι τον προστάτη αδένα. Αποτελεί την οδό αποχέτευσης του σπέρματος.

Τα σπερματικά σωληνάρια περιβάλλονται από βασική μεμβράνη πάνω στην οποία είναι τοποθετημένα τα κύτταρα του βλαστικού επιθηλίου (germ cells) και τα κύτταρα Sertoli. Το βλαστικό επιθήλιο αποτελείται, από έξω προς τα μέσα, από τα σπερματογόνια, τα σπερματοκύτταρα και τις σπερματίδες. Τα σπερματοζωάρια είναι ελεύθερα στον αυλό των σωληναρίων. Η διαδικασία της σπερματογένεσης προχωράει από έξω προς τα μέσα με ωρίμανση των διαφόρων μορφών του επιθηλίου. Ένας πλήρης κύκλος σπερματογένεσης διαρκεί 16 ημέρες.

Η καλή γνώση της μορφολογίας των κυττάρων του βλαστικού επιθηλίου είναι σημαντική γιατί σύμφωνα με τους Gonrad και συν<sup>1</sup>, η γένεση ανθρώπινων κυττάρων από τις ορχικές βιοψίες μπορεί να αποτελεί απλή και προσιτή μέθοδο πρόσβασης. σε μεμονωμένη κυτταρική θεραπεία χωρίς ηθικά ή ανοσολογικά προβλήματα που σχετίζονται με τα ανθρώπινα βλαστικά κύτταρα.

Τα κύτταρα Sertoli έχουν ρόλο στηρικτικό και προστατευτικό για τα διάφορα κύτταρα του βλαστικού επιθηλίου. Εδράζονται στη βασική μεμβράνη και εκτείνονται μέχρι τον αυλό του σπερματικού σωληναρίου.

### 3. Γενικά χαρακτηριστικά των νεοπλασμάτων των όρχεων από γεννητικά κύτταρα

Η πλειονότητα (95%) των πρωτοπαθών ορχικών νεοπλασμάτων αφορούν σε αυτά που προέρχονται από το βλαστικό επιθήλιο των σπερματικών σωληναρίων ή αλλιώς στα νεοπλάσματα των όρχεων από γεννητικά κύτταρα (Testicular germ cell tumors-TGCTs)

#### 3.1. Επιδημιολογικά δεδομένα

Τα νεοπλάσματα των όρχεων από γεννητικά κύτταρα αποτελούν το 1-2% των κακοήθων νεοπλασμάτων στους άντρες και αφορούν κυρίως ηλικίες μετά την εφηβεία μέχρι τα τριάντα χρόνια ζωής. Η συχνότητα της νόσου ποικίλλει ευρέως μεταξύ των πληθυσμών. Η υψηλότερη συχνότητα, που είναι γύρω στους 8-10 ασθενείς ανά 100000 κατοίκους παρατηρείται στη Δανία, στη Γερμανία, στη Νορβηγία, στην Ουγγαρία και στην Ελβετία. Ο μόνος μη ευρωπαϊκός πληθυσμός με παρόμοια επίπεδα είναι το Μαορί της Νέας Ζηλανδίας. Σε χώρες της Αφρικής και της Ασίας αναφέρονται 2 περιστατικά ανά 100000 πληθυσμό. Στην Αμερική το 2008 έχουν καταγραφεί 8,090 νέες περιπτώσεις και 380 θάνατοι.

Γενικά, η συχνότητα των TGCTs έχει αυξηθεί στις περισσότερες χώρες τις τελευταίες δεκαετίες<sup>2</sup>.

Στη Δανία, τη Νορβηγία και τη Σουηδία, η γενικά αυξημένη συχνότητα TGCTs εμφάνισε σημαντική μείωση σε άντρες που γεννήθηκαν κατά τη διάρκεια του Β Παγκοσμίου Πολέμου<sup>3,4</sup>. Οι λόγοι για αυτό το παράδοξο φαινόμενο είναι άγνωστοι αλλά διευκρινίζει πολλά χαρακτηριστικά αυτών των νεοπλασμάτων. Αρχικά, ότι ο κίνδυνος εμφάνισης ορχικού καρκίνου σε πληθυσμό με υψηλή συχνότητα δεν είναι σταθερός αλλά κυμαίνεται ανάλογα με την έκθεση σε προδιαθεσικούς-αιτιολογικούς παράγοντες. Ακολούθως, ο κίνδυνος αυτός κυμαίνεται επίσης ανάλογα με τις μεταβολές στις συνθήκες και τις συνήθειες της καθημερινής ζωής, οι οποίες και επηρεάζονται από την προσφορά και την κατανάλωση στις χώρες αυτές κατά τη διάρκεια του Β Παγκοσμίου Πολέμου. Τέλος η σχετικά χαμηλή συχνότητα TGCTs κατά τη διάρκεια του Πολέμου και η στατιστική μελέτη των γεννήσεων, δείχνουν ότι η ανάπτυξη του ορχικού καρκίνου καθορίζεται από την παιδική ηλικία.

Η συχνότητα TGCTs σχετίζεται με αυτή της ορχικής ενδοσωληναριακής νεοπλασίας-in situ καρκινώματος(IGCNU) από γεννητικά κύτταρα και η σχέση τους είναι άμεση και πολύ ειδική. Ο επιπολασμός του in situ καρκινώματος στον ανδρικό πληθυσμό αντιπροσωπεύει σχεδόν απόλυτα τον κίνδυνο εμφάνισης ορχικού καρκίνου. Εστίες IGCNU ανευρίσκονται σχεδόν πάντοτε στο ορχικό παρέγχυμα κοντά στον διηθητικό όγκο. Επίσης εστίες IGCNU δεν έχει παρατηρηθεί να εξαφανίζονται. Από αυτές τις παρατηρήσεις φαίνεται ότι το πρώτο βήμα στην εξέλιξη των TGCTs είναι η ανώμαλη διαφοροποίηση και εξαλλαγή των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων που οδηγεί σε ενδοσωληναριακή νεοπλασία και στην σχεδόν βέβαιη εξέλιξη σε διηθητικό καρκίνωμα. Ηλικίες μικρότερες από τις ηλικίες που συχνότερα εμφανίζουν TGCTs μπορεί να αποτελούν ηλικίες παρουσίας IGCNU ενώ μεγαλύτερες έχουν ξεπεράσει τον κίνδυνο γιατί όλες εξελίχθηκαν σε διηθητικό καρκίνο.

### 3.2. Αιτιολογία

Ως κύριοι αιτιολογικοί παράγοντες θεωρούνται:

- i) κρυφορχία. Σχετίζεται με 3-5 φορές υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης TGCTs, σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό. Η υποκείμενη ατροφία του επιθηλίου των σπερματικών σωληναρίων θεωρείται το εκλυτικό αίτιο.
- ii) καθυστέρηση ενδομήτριας ανάπτυξης. Μελέτες έχουν δείξει ότι έμβρυα μικρά για την ηλικία κύησης εμφανίζουν σε μεγαλύτερη συχνότητα TGCTs
- iii) υπογονιμότητα/στεριότητα. Άντρες με προβλήματα γονιμότητας εμφανίζουν, σύμφωνα με μελέτες, συχνότερα TGCTs.

Πρόσφατα γίνεται λόγος από διάφορους ερευνητές<sup>5,6,7</sup> για το σύνδρομο ορχικής δυσγενεσίας (testicular dysgenesis syndrome-TDS). Ανωμαλίες στο γεννητικό σύστημα των νεογνών(κρυφορχία, υποσπαδία) και των ενηλίκων(ολογοσπερμία, νεοπλάσματα των όρχεων) κατατάσσονται σε αυτό το σύνδρομο, με κοινή προέλευση την εμβρυική ζωή και γίνονται υποθέσεις ότι πιθανά να οφείλεται στη μειωμένη παραγωγή και κατ'επέκταση δράση των ανδρογόνων κατά τη διάρκεια της ορχικής εμβρυογένεσης αλλά και στην έκθεση στη ν-διβουτυλική φθαλάση (n dibutyl pthalate). Επιπρόσθετα κάποιοι ερευνητές αναφέρουν επιδημιολογική συσχέτιση των TGCTs με τη χρήση μαριχουάνας<sup>8</sup> αν και είναι απαραίτητη η επιβεβαίωση της υπόθεσης αυτής με τη χρήση μοριακής ανάλυσης υποδοχέων των κανναβιδοειδών για τη διευκρίνιση των βιολογικών μηχανισμών.

Σε μία μελέτη στη Δανία που περιλάμβανε 399 άντρες που πέθαναν ξαφνικά για διάφορους λόγους, μετά από νεκροτομική εξέταση η συχνότητα IGCNU υπολογίσθηκε στο 1%<sup>9</sup>. Στους στείρους άντρες η συχνότητα IGCNU είναι επίσης 1%<sup>10</sup> και η στεριότητα-υπογονιμότητα αποτελεί παράγοντα κινδύνου για ορχικό καρκίνο<sup>11</sup>, κυρίως σε ασθενείς με ατροφικούς όρχεις και ιδιαίτερα χαμηλό αριθμό σπερματοζωαρίων(<3X10<sup>6</sup>/ml). Σε ενήλικες άντρες με ιστορικό κρυφορχίας, το ποσοστό IGCNU προσεγγίζει το 2-4%<sup>12</sup> και αντιστοιχεί στη γνωστή συχνότητα TGCTs στην ομάδα αυτών των ανδρών. Παιδιά με ερμαφροδιτισμό εμφανίζουν IGCNU σε ποσοστό περίπου 25%<sup>13</sup>. Ασθενείς με TGCTs εμφανίζουν υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης IGCNU αλλά και διηθητικού νεοπλάσματος στον ετερόπλευρο όρχι με συχνότητα που φθάνει το 5%<sup>14,15</sup>.

Πολλές άλλες καταστάσεις έχουν ταυτοποιηθεί ως παράγοντες κινδύνου για TGCT, όπως είναι η αυξημένη έκθεση στις ορμόνες της κύησης, η πρώτη εγκυμοσύνη και το χαμηλό βάρος γέννησης. Είναι ενδιαφέρον που οι περισσότεροι από αυτούς τους παράγοντες σχετίζονται με τις επιδράσεις του περιβάλλοντος ή του τρόπου ζωής κατά την πρώιμη ανάπτυξη<sup>16,17,18</sup>.

### 3.3. Ταξινόμηση

Σήμερα έχει γίνει αποδεκτή από τους περισσότερους συγγραφείς η πρόσφατη ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO 2004)<sup>19</sup>, η οποία είναι η εξής:

- Ενδοσωληναριακή νεοπλασία από γεννητικά κύτταρα, αταξινόμητου τύπου
- Σεμίνωμα
  - Σεμίνωμα με συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα
- Σπερματοκυτταρικό σεμίνωμα
  - Σπερματοκυτταρικό σεμίνωμα με σάρκωμα
- Εμβρυικό καρκίνωμα
- Όγκος λεκιθικού ασκού
- Τροφοβλαστικοί όγκοι
  - Χοριοκαρκίνωμα
  - Άλλα τροφοβλαστικά νεοπλάσματα
- Τεράτωμα
  - Δερμοειδής κύστη
  - Μονοδερματικό τεράτωμα
  - Τεράτωμα με σωματικού τύπου κακοήθεια
- Μεικτοί όγκοι
  - Μικτό εμβρυικό καρκίνωμα και τεράτωμα
  - Μικτό τεράτωμα και σεμίνωμα
  - Χοριοκαρκίνωμα και τεράτωμα/εμβρυικό καρκίνωμα
  - Άλλα

### 3.4. Κλινική εικόνα

Οι ασθενείς συνήθως προσέρχονται με ψηλαφητή ανώδυνη ετερόπλευρη διόγκωση. Συχνά αναφέρουν ήπιο πόνο στο όσχεο ή την κάτω κοιλιακή χώρα. Περίπου το 10% των ασθενών εμφανίζουν ως πρώτο κλινικό σημείο, συμπτώματα λόγω μετάστασης όπως κοιλιακό άλγος, γαστρεντερικές διαταραχές, βήχα ή δύσπνοια καθώς και γυναικομαστία. Σε μία πρόσφατη μελέτη<sup>20</sup>, οι Angulo και συν, αναφέρουν ως κλινικό σύμπτωμα ψηλαφητή κοιλιακή μάζα σε ποσοστό 47%, οσφυαλγία στο 35% και υποτροπιάζον ορχικό άλγος στο 29% των ασθενών.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι δείκτες στον ορό αυτών των ασθενών, τόσο για τη διάγνωση όσο και για τη παρακολούθηση της πορείας της νόσου<sup>21,22</sup>. Οι δείκτες που χρησιμοποιούμε σήμερα είναι η β-χοριακή γοναδοτροπίνη (βhCG), η άλφα εμβρυική σφαιρίνη (AFP), η πλακουντιακή αλκαλική φωσφατάση (PLAP) και η γαλακτική δεϋδρογονάση (LDH). Η παρακολούθηση της διακύμανσης των τιμών των δεικτών και μάλιστα του συνδυασμού τους, μπορεί να μας δώσει σημαντικές πληροφορίες για την παρακολούθηση της εξέλιξης των όγκων αυτών<sup>23,24</sup>.

Τα συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα του φυσιολογικού πλακούντα συνθέτουν και εκκρίνουν βhCG και συνεπώς αυτή βρίσκεται κατά κύριο λόγο αυξημένη στον ορό των ασθενών με μη σεμινωματοειδείς όγκους, όπως το χοριοκαρκίνωμα ή σε μικτούς όγκους αλλά

και στα σεμίνωμα με συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα. Η αύξηση τόσο της βhCG όσο και της AFP σε ασθενείς με ορχικό νεόπλασμα σταδίου I, μετά από ορχεκτομή, είναι ενδεικτικά στοιχεία υποτροπής. Η ευαισθησία αυτή φθάνει στο 70% εάν οι δείκτες αυτοί συνδυασθούν με απεικονιστικές μεθόδους. Από πολυπαραγοντικές αναλύσεις βρέθηκε ότι η βhCG έχει ανεξάρτητη προγνωστική αξία σε ασθενείς με καρκίνο των όρχεων. Ιδιαίτερα υψηλές τιμές βhCG προ θεραπείας σχετίζονται με μικρότερα ποσοστά πλήρους ύφεσης και κατά πρόεκταση μειωμένη επιβίωση και ίαση και γενικότερα κακή πρόγνωση<sup>25,26</sup>. Σε μία πρόσφατη μελέτη οι συγγραφείς έχουν αποδείξει ότι η β-HCG παίζει ρόλο στη νεοαγγείωση των νεοπλασμάτων των όρχεων από γεννητικά κύτταρα, αφού εμπλέκεται στη δράση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα(VEGF)<sup>27</sup>. Η AFP αποτελεί σημαντικό δείκτη για τη διάγνωση του εμβρυικού καρκινώματος και μάλιστα σε περιπτώσεις όπου ο όγκος εντοπίζεται σε περιοχές εκτός των όρχεων.

Η γαλακτική δεϋδρογονάση(LDH) χαρακτηρίστηκε σαν δείκτης για τα νεοπλάσματα των όρχεων το 1967 αλλά η αξία της επιβεβαιώθηκε στη συνέχεια και σε άλλες πιο πρόσφατες μελέτες<sup>28,29,30</sup>. Η ανίχνευση της αύξησης του ισοενζύμου LDH-1 παρατηρείται κυρίως σε ασθενείς με σεμίνωμα, ενδέχεται σε κάποιες περιπτώσεις να αποτελεί το μοναδικό παθολογικό ορολογικό δείκτη και χρησιμοποιείται ιδιαίτερα για την παρακολούθηση των ασθενών.

#### **4. Παθολογική Ανατομική των νεοπλασμάτων των όρχεων από γεννητικά κύτταρα.**

##### **4.1. Ορχική ενδοσωληναριακή νεοπλασία από γεννητικά κύτταρα, αταξινόμητου τύπου(intratubular germ cell neoplasia, unclassified type-IGCNU)**

Είναι πρόδρομη αλλοίωση, γνωστή και ως καρκίνωμα in situ ή ενδοσωληναριακή νεοπλασία, οι οποίοι αποτελούν μάλλον αδόκιμους όρους καθώς το σπερματικό επιθήλιο και ο όρχις εμβρυογενετικά προέρχονται από το μέσο βλαστικό δέρμα. Ορίζεται ως η παρουσία κακοήθων γεννητικών κυττάρων μέσα στα ορχικά σωληνάκια και η εξέλιξη της οδηγεί στην ανάπτυξη σεμινώματος ή μη σεμινωμάτωσης νεοπλάσματος στους όρχεις. Τα κύτταρα της IGCNU ομοιάζουν με τα κύτταρα του σεμινώματος, είναι διογκωμένα και εμφανίζουν άφθονο φυσαλιδώδες κυτταρόπλασμα πλούσιο σε γλυκογόνο, θετικό στη χρώση PAS και μεγάλους ανώμαλους πυρήνες με εμφανές πυρήνιο. Συχνά παρατηρούνται μιτώσεις. Τα νεοπλασματικά κύτταρα είναι συνήθως βασικά τοποθετημένα ανάμεσα στα κύτταρα Sertoli. Συνυπάρχει αναστολή της φυσιολογικής σπερματογένεσης αλλά ενίοτε μπορεί να διαπιστωθεί παζετοειδής διασπορά σε γειτονικά σπερματικά σωληνάκια που διατηρούν τη σπερματογένεση. Το σωληνάριο προσβάλλεται τμηματικά ή διάχυτα. Παρουσία νεοπλασματικών κυττάρων στο διάμεσο χώρο ή στα λεμφαγγεία αποτελεί μικροδιάθρηξη και τα διηθητικά αυτά κύτταρα συχνά συνοδεύονται από χρόνια φλεγμονώδη λεμφοκυτταρική αντίδραση

Καλείται αταξινόμητου τύπου(unclassified type) γιατί δεν εμφανίζει ειδικούς χαρακτήρες διαφοροποίησης.

Παρατηρείται στο 2-4% των ασθενών με κρυψορχία<sup>31</sup>, στο 0,5-1% των ασθενών με σοβαρή ολογοσπερμία<sup>32,33</sup>, αλλά και στο 82-88% των ασθενών με TGCTS, σε θέσεις παρακείμενες του όγκου. Παράλληλα, σε σημαντικό ποσοστό 6% εντοπίζεται στον ετερόπλευρο όρχι σε ασθενείς με ιστορικό TGCT<sup>34,35,36</sup>.

Ασθενείς με εστίες IGCNU εμφανίζουν 25-30 φορές υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης TGCT<sup>37</sup>. Αρκετά συχνά η IGCNU ανευρίσκεται ως τυχαίο εύρημα σε βιοψίες όρχεων για διερεύνηση στειρότητας. Παράλληλα, σε περιπτώσεις 'burnt out' όγκων, παρατηρούνται παρακείμενα σε περιοχές ίνωσης, εστίες IGCNU σε ποσοστό 45 % περίπου<sup>38</sup>.

Η αναγνώριση αυτών των εστιών ιδιαίτερα σε απουσία όγκου θέτει δίλλημα θεραπευτικής αντιμετώπισης. Μία προσέγγιση αφορά ορχεκτομή και βιοψία του ετερόπλευρου όρχεως, ενώ εναλλακτικά και πιο συντηρητικά, επιλέγεται η στενή κλινική παρακολούθηση.

Ανοσοϊστοχημικά, τα δυσπλαστικά κύτταρα είναι θετικά, σε ποσοστό 83-99%, στο PLAP καθώς επίσης και στο CD117(c-kit).

Συχνά η ορχική μικρολιθίαση υπερηχογραφικά σχετίζεται με IGCNU<sup>39,33,40</sup>.

Τελευταίες μελέτες αναφέρουν έντονη ανοσοϊστοχημική έκφραση των κυττάρων της IGCNU στην Aurora B/Ipi 1, που είναι μία κινάση που εμπλέκεται στη ρύθμιση του διαχωρισμού των γονιδίων κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Πιθανά ο αποκλεισμός της δράσης της Aurora B με φαρμακευτικούς αναστολείς να καταφέρει να μειώσει σημαντικά την εξέλιξη της νεοπλασματικής εξαλλαγής και να αποτελεί εν δυνάμει θεραπευτική αντιμετώπιση<sup>41,42,43,44</sup>. Ανοσοφαινοτυπικά η IGCNU εμφανίζει ομοιότητες με τα εμβρυικά γεννητικά κύτταρα (ή αρχέγονα βλαστικά κύτταρα ή γονοκύτταρα) και εκφράζει μεταγραφικούς παράγοντες που σχετίζονται με την πολυδυναμικότητα όπως NANOG, OCT 3/4 αλλά και με πρωτεΐνες που ανευρίσκονται σε διάφορους ιστούς ειδικών αρχέγονων κυττάρων όπως TFAP2C(AP-2gamma) ή c-kit. Υπάρχουν υποθέσεις από επιδημιολογικά δεδομένα, ότι διαταραχές του μικροπεριβάλλοντος στις γονάδες που βρίσκονται κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης, μπορεί να οδηγήσουν σε νεοπλασίες ή/και σε μία ομάδα άλλων προβλημάτων στην ενήλικη ζωή, όπως ανωμαλίες του γεννητικού συστήματος, μειωμένη σπερματογένεση ή σημεία υπογοναδισμού<sup>37,45,46</sup>.

## **4.2. Όγκοι ενός ιστολογικού τύπου(αμιγείς όγκοι).**

### **4.2.1. Κλασικό σεμίνωμα.**

Είναι το πιο συχνό νεόπλασμα των όρχεων και σε αμιγή μορφή αποτελεί το 30-40% των νεοπλασμάτων από γεννητικά κύτταρα. Επίσης συχνά αποτελεί συστατικό των μικτών όγκων σε συνδυασμό με οποιοδήποτε άλλο ιστολογικό τύπο.

Μικροσκοπικά, αποτελείται από ομοιόμορφα κύτταρα, τυπικά με διαυγές κυτταρόπλασμα πλούσιο σε γλυκογόνο, σαφή κυτταρική μεμβράνη και ευμεγέθεις πυρήνες με ένα ή περισσότερα πυρήνια. Τα νεοπλασματικά κύτταρα διατάσσονται σε ταινίες ή μικρές νησίδες που διαχωρίζονται από λεπτά ινώδη διαφραγμάτια. Χαρακτηριστικά, παρατηρείται λεμφοκυτταρική διήθηση που σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να είναι έντονη με σχηματισμό λεμφοζιδίων με βλαστικά κέντρα. Ορισμένες φορές συνυπάρχουν διηθήσεις από πλασματοκύτταρα και ηωσινόφιλα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα καθώς και

κοκκιωματώδης αντίδραση με παρουσία γιγαντοκυττάρων τύπου Langhans ή ξένου σώματος.

Διακρίνονται οι εξής ποικιλίες:

(i) Σεμίνωμα με ηθμοειδές, ψευδοαδενικό ή σωληνώδες πρότυπο ανάπτυξης, όπου τα νεοπλασματικά κύτταρα διατάσσονται σε νησίδες με κυψελιδώδη διαμόρφωση. Σε μερικές περιπτώσεις τίθεται θέμα διαφορικής διάγνωσης από όγκο από κύτταρα Sertoli και χρειάζεται ανοσοϊστοχημική διερεύνηση για την τελική διάγνωση.

(ii) Σεμίνωμα με αυξημένο αριθμό μιτώσεων το οποίο καλείται και άτυπο ή αναπλαστικό σεμίνωμα που εμφανίζει υψηλή μιτωτική δραστηριότητα και λιγότερο συχνά λεμφοκυτταρική διήθηση. Αποτελεί ξεχωριστή οντότητα γιατί εμφανίζει πιθανότατα χειρότερη πρόγνωση, μεθίσταται συχνότερα και αντιστοιχεί σε προχωρημένο κλινικό στάδιο. Ο αριθμός των μιτώσεων συχνά υπερβαίνει τις 30/10 ΜΟΠ.

(iii) Σεμίνωμα με συγκυτιοτροβλαστικά στοιχεία. Σε ποσοστό γύρω στο 30%<sup>27</sup>, τα κλασικά σεμινώματα συνδυάζονται με συγκυτιοτροφοβλαστικά γιγαντοκύτταρα, ανοσοϊστοχημικά θετικά στη β-HCG. Κατά συνέπεια, οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα της ορμόνης αυτής στον ορό τους<sup>47</sup>. Η διαφορική διάγνωση πρέπει να γίνει από το χοριοκαρκίνωμα

Ορισμένοι συγγραφείς<sup>48</sup>, αναφέρουν ότι σε μεγάλο ποσοστό τα εν λόγω κύτταρα εμφανίζουν έντονη έκφραση στον EGFR.

Γενικότερα, τα σεμινώματα ανοσοϊστοχημικά είναι θετικά στο PLAP σε ποσοστό 80-100% (μεμβρανική ή περιπυρηνική dot like χρώση), στο c-kit σε ποσοστό που πλησιάζει το 100%<sup>49,50,51</sup>, ενώ σπάνια αναγνωρίζονται κύτταρα θετικά στις κερατίνες CAM5.2 και AE1/AE3 καθώς και στο CD30(Ki 1).

Διαφοροδιαγνωστικά προβλήματα τίθενται κυρίως με το εμβρυικό καρκίνωμα. Εκτός από τα αναφερόμενα τυπικά μορφολογικά ευρήματα του σεμινώματος (διακριτές κυτταρικές μεμβράνες, λεμφοκυτταρική-κοκκιωματώδης αντίδραση), υποβοηθητική είναι η ανοσοϊστοχημεία (PLAP+ και CD117+στο σεμίνωμα, CD30+ και πανκερατίνη + στο εμβρυικό καρκίνωμα).

Κακοί προγνωστικοί παράγοντες αποτελούν το μεγάλο μέγεθος του όγκου, η παρουσία νεκρώσεων, η αγγειακή νεοπλασματική διήθηση καθώς και η επέκταση στον ινώδη χιτώνα και στο rete testis.

Στους ασθενείς κλινικού σταδίου Ι (όγκος περιορισμένος στον όρχι) έρευνες έχουν καταδείξει το μέγεθος του όγκου, και τη διήθηση του rete testis ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί δείκτες για υποτροπή νόσου.

#### **4.2.2. Σπερματοκυτταρικό σεμίνωμα.**

Είναι σχετικά σπάνιο νεόπλασμα και η συχνότητα του κυμαίνεται από 1,2-4,5 %, δεν σχετίζεται με ιστορικό κρυψορχίας και προσβάλλει μεγαλύτερες ηλικίες με μέση ηλικία εμφάνισης τα 52 χρόνια ζωής. Είναι το μοναδικό ορχικό νεόπλασμα χωρίς ομόλογο όγκο στην ωοθήκη ή σε άλλες εξωγοναδικές θέσεις. Απαντά μόνο ενδοορχικά και πάντα σε αμιγή μορφή, συχνά είναι μετάρχονα αμφοτερόπλευρο, ενώ σχεδόν ποτέ δεν μεθίσταται και είναι γενικά καλής πρόγνωσης. Επιπρόσθετα, οι ορολογικοί δείκτες των ασθενών είναι αρνητικοί.

Μακροσκοπικά, το μέγεθος του κυμαίνεται από 2-20 εκ., με μέση τιμή τα 7 εκ. είναι περιγράπτα, ομοιογενή νεοπλάσματα, συμπαγή, λευκόφαιης χροιάς και μαλακής ή ζελατινώδους σύστασης.

Μικροσκοπικά, τα νεοπλασματικά κύτταρα δεν έχουν συνοχή και εμφανίζουν ελάχιστο ινώδες ή συχνότερα οιδηματώδες στρώμα, προσδίδοντας την εντύπωση ψευδοαδενικών σχηματισμών. Σπάνια παρατηρείται η χαρακτηριστική για το κλασικό σεμίνωμα λεμφοκυτταρική ή κοκκιωματώδης αντίδραση. Τα εν λόγω κύτταρα είναι τριών βασικών τύπων. Ο τύπος που συνήθως επικρατεί είναι κύτταρα υποστρόγγυλου σχήματος, ποικίλου μεγέθους, με ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα. Οι πυρήνες είναι ωοειδείς με δαντελωτή χρωματίνη με νηματοειδή-σπιδραματοειδή εμφάνιση, όμοια με αυτή που παρατηρείται στα σπερματοκύτταρα. Τα κύτταρα του δεύτερου τύπου είναι μικρά με πυκνοχρωματικό πυρήνα και ελάχιστο ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα ενώ του τελευταίου τύπου είναι μονοπύρρηνα ή πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα διαμέτρου περίπου 100μm με άφθονο ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα και υποστρόγγυλους ή ωοειδείς πυρήνες. Οι μιτώσεις δύναται να είναι συχνές, ενίοτε άτυπες.

Μπορεί να παρατηρηθεί νεοπλασματική αγγειακή διήθηση αλλά και επέκταση στους χιτώνες του όρχεως ή ακόμα και στην επιδιδυμίδα. Στην περιφέρεια του όγκου συνήθως παρατηρείται ενδοσωληναριακή διήθηση αλλά εστίες IGCNU δεν ανευρίσκονται.

Ανοσοϊστοχημικά, οι περισσότεροι δείκτες που είναι θετικοί στα άλλα νεοπλάσματα των όρχεων από γεννητικά κύτταρα είναι αρνητικοί στο σπερματοκυτταρικό σεμίνωμα. Μπορεί να παρατηρηθούν μεμονωμένα κύτταρα θετικά στο PLAP.

Διακρίνεται ο υποτύπος του σπερματοκυτταρικού σεμινώματος που σχετίζεται με σάρκωμα. Σε αυτές τις πολύ σπάνιες περιπτώσεις το σπερματοκυτταρικό σεμίνωμα συνυπάρχει με στοιχεία αδιαφοροποίητου ή λιγότερο συχνά διαφοροποιημένου σαρκώματος με ποικίλη μορφολογία όπως ραβδομυοσάρκωμα, ατρακτοκυτταρικό σάρκωμα ή χονδροσάρκωμα. Η διαφορική διάγνωση θα πρέπει να γίνει από ένα νεόπλασμα των όρχεων από γεννητικά κύτταρα που έχει υποστεί σαρκωματώδη εξαλλαγή και θα πρέπει να αναζητηθούν τυχόν υπολειμματικές εστίες τερατώματος. Επίσης θα πρέπει για την τελική διάγνωση να αποκλεισθεί η περίπτωση ενός πρωτοπαθούς ορχικού σαρκώματος, ενός μεταστατικού σαρκώματος ή ενός σαρκωματοειδούς καρκινώματος. Η πρόγνωση του υποτύπου αυτού του σπερματοκυτταρικού σεμινώματος είναι κακή καθώς συχνά μεθίσταται.

#### **4.2.3. Εμβρυικό καρκίνωμα.**

Απαντά ως αμιγής μορφή, με συχνότητα 2-10% ή ως συστατικό των μικτών όγκων σε ποσοστό πάνω από το 80% των περιπτώσεων. Αφορά έφηβους και νεαρούς άντρες, με μέση ηλικία εμφάνισης τα 30 έτη. Συχνά το πρώτο σύμπτωμα είναι απότοκο των μεταστάσεων ή οφείλεται σε παρανεοπλασματικά φαινόμενα όπως γυναικομαστία.

Μακροσκοπικά, εμφανίζει μέση διάμετρο 4 εκ., χωρίς σαφή όρια, λευκόφαιη χροιά, εστίες αιμορραγίας ή νέκρωσης και συχνά επεκτείνεται στους χιτώνες και την επιδιδυμίδα.

Μορφολογικά, παρατηρείται συμπαγές ή συγκυτιακό ή θηλώδες πρότυπο ανάπτυξης με λίγο χαλαρό, οιδηματώδες ή ινώδες υαλοειδοποιημένο υπόστρωμα ή άλλες φορές κυτταροβριθές με ή χωρίς λεμφοκυτταρική διήθηση. Τα νεοπλασματικά κύτταρα είναι



αδιαφοροποίητα, επιθηλιόμορφα, ευμεγέθη, πολυγωνικά με ασαφή όρια και με μεγάλους φυσαλιδώδεις πυρήνες, διαφανείς ή υπερχρωματικούς. Η πυρηνική μεμβράνη αναγνωρίζεται σαφώς και παράλληλα παρατηρούνται ένα ή περισσότερα ανώμαλα πυρήνια. Οι μιτώσεις είναι άφθονες συχνά άτυπες. Το κυτταρόπλασμα των εν λόγω κυττάρων είναι άφθονο διαυγές ή κοκκιώδες.

Μεμονωμένα συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα δεν είναι ασυνήθη και η παρουσία τους θα πρέπει να επισημαίνεται όπως επίσης και η αγγειακή, λεμφαγγειακή ή εξωορχική επέκταση. Επίσης συχνή είναι παρουσία εστιών IGCNU.

Ανοσοϊστοχημικά τα κύτταρα του εμβρυικού καρκινώματος είναι θετικά στο PLAP, στο CD30, στις κερατίνες, εστιακά θετικά στο PLAP, ενώ είναι αρνητικά στο EMA και στο CEA.

Το πιο σημαντικό στοιχείο για την πρόγνωση είναι το κλινικό στάδιο της νόσου. Γενικά είναι υψηλής κακοήθειας νεόπλασμα που συχνά συνοδεύεται από μεταστάσεις κατά τη διάγνωση. Αρχικά επεκτείνεται στους οπισθοπεριτοναϊκούς λεμφαδένες και ακολούθως στο μεσοθωράκιο.

#### **4.2.4. Όγκος του λεκιθικού ασκού.**

Ορίζεται ως το νεόπλασμα από βλαστικά κύτταρα το οποίο θυμίζει ανθρώπινο λεκιθικό ασκό. Είναι γνωστό και ως όγκος του ενδοδερμικού πόρου ή ορχιοβλάστωμα.

Στους όρχεις ο όγκος του λεκιθικού ασκού εμφανίζεται σε δύο μορφές, ως αμιγής όπως κλασικά περιγράφηκε από τον Teilum σε βρέφη και παιδιά ηλικίας μικρότερης των 2 ετών και ως συστατικό των μικτών όγκων από γεννητικά κύτταρα στους ενήλικες. Στα παιδιά είναι το πιο συχνό ορχικό νεόπλασμα.

Μακροσκοπικά ο όγκος στα παιδιά έχει διάμετρο 2-6 εκ, τείνει να αντικαταστήσει το ορχικό παρέγχυμα και είναι συμπαγές με σαφή όρια, λευκοκίτρινη χροιά και κατά θέσεις κυστικές περιοχές. Στους ενήλικες είναι λευκόφαιος, μαλακός με συχνές νεκρώσεις.

Η μορφολογική του εικόνα είναι ίδια ανεξάρτητα από την ηλικία του ασθενούς αλλά με ποικιλία ιστολογικής εμφάνισης, όπως μικροκυστικό ή δικτυωτό πρότυπο ανάπτυξης, μακροκυστικό, συμπαγές, αδενικό-κυψελιδώδες, ενδοδερμικού πόρου, θηλώδες, μυξωματώδες, ηπατοειδές και εντερικό. Οι μορφές αυτές συνήθως συνδυάζονται, ενώ μία ή δύο συνήθως επικρατούν. Στην περίπτωση με μορφολογία ενδοδερμικού πόρου παρατηρούνται οι χαρακτηριστικοί σχηματισμοί που ονομάζονται σωμάτια Schiller-Duval. Αυτοί οι σχηματισμοί αποτελούνται από ένα μονήρες αγγείο το οποίο περιβάλλεται από κυλινδρικά αρχέγονα κύτταρα και ευρίσκεται σε μία κοιλότητα επενδυμένη από αποπλατυσμένα κύτταρα. Είναι χαρακτηριστικά του νεοπλάσματος όχι όμως παθολογικά καθώς ίδια μορφώματα ανευρίσκονται σπάνια σε εμβρυικά καρκινώματα και άλλους όγκους.

Τα νεοπλασματικά κύτταρα έχουν ομοιόμορφους στρογγυλούς, φυσαλιδώδεις ή υπερχρωματικούς πυρήνες. Είναι χαμηλά ή υψηλά κυβοειδή, αποπλατυσμένα ή ατρακτόμορφα. Μπορεί να παρατηρηθεί εκσεσημασμένη κυτταροβρίθεια και πολυμορφία κυρίως στους όγκους των ενηλίκων. Παράλληλα, δυνατή είναι η παρουσία συγκυτιοτροφοβλαστικών κυττάρων.

Το κυτταρόπλασμα είναι άφθονο και διαυγές και περιέχει γλυκογόνο ή ενίοτε λιπίδια. Στο κυτταρόπλασμα πολλών νεοπλασματικών κυττάρων αλλά και εξωκυττάρια παρατηρούνται άφθονα υαλοειδή, ηωσινόφιλα σωματίδια, θετικά στη χρώση PAS ή ορισμένα στην AFP.

Ανοσοϊστοχημικά τα νεοπλασματικά κύτταρα είναι θετικά στην AFP αλλά η ένταση της χρώσης συνήθως είναι ήπια και η αρνητικότητα δεν αποκλείει τη διάγνωση. Επίσης, είναι θετικά στις κερατίνες χαμηλού μοριακού βάρους και εστιακά στην α1-αντιθρυψίνη, στη φερριτίνη και την αλβουμίνη.

Υπάρχει σημαντική διαφορά στη βιολογική συμπεριφορά των όγκων του λεκιθικού ασκού σε παιδιά μικρότερα των 2 ετών και στους ενήλικες. Η πρόγνωση σε βρέφη και παιδιά είναι εξαιρετική σε αντίθεση με αυτή των ενηλίκων. Τα επίπεδα της AFP στον ορό επηρεάζουν την πρόγνωση.

#### 4.2.5. Χοριοκαρκίνωμα

Είναι το κακοήθες νεόπλασμα που αποτελείται από συγκυτιοτροφοβλαστικά, κυτταροτροφοβλαστικά και ενδιάμεσα τροφοβλαστικά κύτταρα. Στην αμιγή του μορφή αποτελεί λιγότερο από το 1% των ορχικών νεοπλασμάτων από γεννητικά κύτταρα ενώ συμμετέχει σαν συστατικό στους μικτούς όγκους σε ποσοστό 8%. Αφορά κυρίως νεαρούς άντρες με μέση ηλικία τα 25-30 έτη.

Οι ασθενείς τυπικά εμφανίζουν ορολογικά πολύ υψηλά επίπεδα hCG(συχνά παρατηρούνται τιμές μεγαλύτερες από 100,000 mIU/ml), η οποία hCG σε διασταυρούμενη αντίδραση με την ωχρινότροπο ορμόνη προκαλεί υπερπλασία των κυττάρων Leydig και επακόλουθο γυναικομαστία. Επίσης ορισμένοι ασθενείς εμφανίζουν υπερθυρεοειδισμό λόγω διασταυρούμενης αντίδρασης με την θυρεοειδοτρόπο ορμόνη. Έτσι οι ασθενείς συχνά έχουν σαν πρώτη εκδήλωση τα ανωτέρω παρανεοπλασματικά φαινόμενα ή και πιο συχνά συμπτώματα που οφείλονται σε εκτεταμένες αιματογενείς μεταστάσεις όπως αιμόπτυση, δύσπνοια, συγχυτική κατάσταση, αιματέμεση, μέλαινες κενώσεις, υπόταση και αναιμία.

Μακροσκοπικά, είναι όγκος μικρού μεγέθους που δεν προκαλεί διόγκωση του όρχεως, με αιμορραγικές περιοχές. Σε μερικές περιπτώσεις η πρωτοπαθής εστία μπορεί να εμφανίσει πλήρη αυτόματη υποστροφή καταλείποντας μόνο ουλωτική εστία λευκόφιας χροιάς.

Όπως αναφέρθηκε, ιστοπαθολογικά το νεόπλασμα αποτελείται από συγκυτιο-, κυτταρο-, και ενδιάμεσα τροφοβλαστικά κύτταρα τα οποία αναμιγνύονται μεταξύ τους (διφασική ή τριφασική εικόνα). Το μεγαλύτερο μέρος του όγκου αποτελείται από κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα. Έτσι, παρατηρείται κεντρικά κυτταροτροφοβλάστη που αποτελείται από ομάδες ομοιόμορφων εξαγωνικών κυττάρων μικρού ή μέσου μεγέθους με ασθενώς ηωσινόφιλο ή διαυγές κυτταρόπλασμα και κεντρικά τοποθετημένους, μικρούς, ομαλούς, υπερχρωματικούς ή φυσαλιδώδεις πυρήνες με ή χωρίς εμφανή πυρήνια. Τα κύτταρα αυτά περιβάλλονται από στεφάνη συγκυτιοτροφοβλαστικών κυττάρων, τα οποία είναι μεγάλου μεγέθους, με άφθονο φυσαλιδώδες ηωσινόφιλο έως αμφίφιλο κυτταρόπλασμα και συνήθως πολλαπλούς ευμεγέθεις, ανώμαλους υπερχρωματικούς πυρήνες. Η διάταξη αυτή προσομοιάζει το ιστολογικό πρότυπο αρχιτεκτονικής που παρατηρείται στις χοριακές λάχνες του άωρου πλακούντα. Σε σπάνιες περιπτώσεις επικρατούν τα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα και το νεόπλασμα περιγράφεται ως

μονοφασικό. Το υπόστρωμα είναι έντονα αιμορραγικό και νεκρωτικό και σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρούνται νεοπλασματικά έμβολα σε αιμοφόρα αγγεία.

Ανοσοϊστοχημικά, όλα τα τροφοβλαστικά κύτταρα είναι θετικά στις κυτοκερατίνες ενώ περίπου το ήμισυ των περιπτώσεων εμφανίζει εστιακή θετικότητα στην πλακουντιακή αλκαλική φωσφατάση (PLAP). Τα συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα είναι θετικά στην hCG, στην α- υποομάδα της ινχιμπίνης και στο EMA.

Το χοριοκαρκίνωμα είναι υψηλής κακοήθειας νεόπλασμα και κακής πρόγνωσης. Χορηγεί πρώιμες μεταστάσεις μέσω της λεμφικής και της αιματικής οδού και έτσι οι ασθενείς κατά τη διάγνωση είναι σε προχωρημένο κλινικό στάδιο νόσου.

#### 4.2.6. Τεράτωμα

Είναι το νεόπλασμα που τυπικά αποτελείται από διάφορους τύπους ιστών που προέρχονται από διαφορετικά βλαστικά δέρματα (ενδόδερμα, μεσόδερμα, εξώδερμα). Για να τεθεί η διάγνωση τερατώματος δεν απαιτείται παρουσία ιστών και από τα τρία βλαστικά δέρματα. Νεοπλάσματα παρόμοιας ιστολογικής εικόνας είναι συχνά στην ωοθήκη, με σημαντικές όμως διαφορές στη βιολογική συμπεριφορά των ορχικών και ωοθηκικών τερατωμάτων.

Αφορούν σε δύο ηλικιακές ομάδες, στα παιδιά πριν την εφηβεία και στους ενήλικες που αποτελούν το 2,7-7% των ορχικών νεοπλασμάτων από γεννητικά κύτταρα και συμμετέχουν σε ποσοστό 47-50% ως συστατικό στους μεικτούς όγκους. Η πλειονότητα των τερατωμάτων εμφανίζονται σε παιδιά μικρότερα των 4 ετών. Μερικές φορές αναπτύσσονται ενδοκοιλιακά επί κρυφορχίας.

Μακροσκοπικά, είναι εν μέρει συμπαγή και εν μέρει κυστικά νεοπλάσματα. Το μέγεθος τους ποικίλλει όπως και η σύσταση, ανάλογα με τα συστατικά που τα αποτελούν.

Μορφολογικά, το ώριμο τεράτωμα αποτελείται αποκλειστικά από καλά διαφοροποιημένους ώριμους ιστούς. Πλακώδες επιθήλιο με ή χωρίς κερατινοποίηση, σιελογόνοι αδένες, νευρικός ιστός αποτελούν αντιπροσωπευτικούς ιστούς εξωδέρματος, γαστρεντερικός, ηπατικός, παγκρεατικός και αναπνευστικός ιστός, ενδοδέρματος και χόνδρος, μύες και οστό, ιστούς από το μεσόδερμα. Οι μιτώσεις είναι σπάνιες. Επίσης συνυπάρχουν συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα.

Άωρο καλείται το τεράτωμα που αποτελείται από ατελώς διαφοροποιημένους άωρους ή εμβρυικούς ιστούς. Εστίες αρχέγονου νευροεπιθηλίου, εμβρυικοί βλεννώδεις αδένες, στοιχεία άωρου χόνδρου και άωρα μεσεγχυματικά στοιχεία είναι συχνά συστατικά του νεοπλάσματος αυτού. Οι μιτώσεις μπορεί να είναι συχνές. Στα παιδιά είναι καλόηθες ενώ στους ενήλικες παρατηρούνται λεμφικές και αιματογενείς μεταστάσεις.

Το τεράτωμα μπορεί να παράγει AFP σε περιοχές με γαστρεντερική ή ηπατική διαφοροποίηση η οποία αποδεικνύεται και ανοσοϊστοχημικά. Επίσης τα κύτταρα του τερατώματος είναι θετικά στην α1- αντιθυψίνη, στο CEA και στη φερριτίνη, ενώ οι αδενικοί σχηματισμοί μπορεί να εκφράζουν PLAP.

Στα παιδιά πριν την εφηβεία το τεράτωμα θεωρείται καλόηθες νεόπλασμα ενώ στους ενήλικες εμφανίζει κακοήθη συμπεριφορά, συχνά μεθίσταται και πολλές φορές η

μεταστατική εστία εμφανίζει διαφοροποιημένη ιστολογική εικόνα σε σχέση με την πρωτοπαθή εστία.

Η δερμοειδής κύστη είναι ένας πολύ σπάνιος τύπος καλοήθους ώριμου κυστικού τερατώματος ανάλογο με αυτό που παρατηρείται στην ωοθήκη. Αποτελείται από μία ή περισσότερες κύστες με ινώδες τοίχωμα που επαλείφονται από πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο και εμφανίζουν περιεχόμενο με τρίχες ή πετάλια κερατίνης. Στο περιβάλλον ινώδες τοίχωμα μπορεί να παρατηρηθούν ιδρωτοποιοί ή σμηγματογόνοι αδένες, οστό, χόνδρος και άλλοι ιστοί με καλοήγη κυτταρολογικά χαρακτηριστικά. Στην καλούμενη επιδερμική κύστη απουσιάζουν τα εξαρτήματα του δέρματος ή άλλοι ιστοί.

Το τεράτωμα με σωματικού τύπου κακοήθεια είναι το τεράτωμα με εστίες κακοήθειας σωματικού τύπου. Τα κακοήγη στοιχεία μπορεί να είναι μεσεγχυματικά, όπως αδιαφοροποίητο σάρκωμα, ραβδομυοσάρκωμα και χονδροσάρκωμα ή επιθηλιακά όπως αδenoκαρκίνωμα ή καρκίνωμα από πλακώδες επιθήλιο. Μπορεί επίσης να παρατηρηθεί νευροεπιθηλίωμα, νευροβλάστωμα, νεφροβλάστωμα.

### 4.3. Μικτοί όγκοι

Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει όγκους από γεννητικά κύτταρα οι οποίοι αποτελούνται από δύο ή περισσότερους τύπους και αποτελούν το 32-54% του συνόλου των TGCTs. Οποιοσδήποτε συνδυασμός μπορεί να παρατηρηθεί και στην τελική ιστολογική έκθεση θα πρέπει να αναφέρονται όλοι οι τύποι και το ποσοστό που καταλαμβάνει το κάθε συστατικό στο σύνολο της μάζας του όγκου. Πιο συχνά παρατηρείται η συνύπαρξη εμβρυικού καρκινώματος, με όγκο του λεκιθικού ασκού και τεράτωμα με τροφοβλαστικά στοιχεία.

Ανεξάρτητοι κακοί προγνωστικοί παράγοντες για τους μικτούς όγκους αποτελεί η διήθηση αιμοφόρων αγγείων και λεμφαγγείων, η παρουσία σε μεγάλο ποσοστό εμβρυικού καρκινώματος και η απουσία στοιχείου όγκου του λεκιθικού ασκού.

### 4.4. Υποστραφείς όγκοι

Ασθενείς στους οποίους δεν έχει προηγηθεί ακτινο- ή χημειοθεραπείας πριν την ορχεκτομή ορισμένες φορές παρουσιάζονται με ορχική μάζα, η οποία κατά την ιστολογική εκτίμηση, αποτελείται από πυκνό κολλαγονοποιημένο συνδετικό ιστό χωρίς εμφανή νεοπλασματικά κύτταρα. Πολλές φορές οι ασθενείς προσέρχονται με συμπτώματα λόγω μεταστάσεων στο οπισθοπεριτόναιο ή σε άλλες θέσεις και με τη βοήθεια του υπερηχογραφήματος ανακαλύπτεται μικρή ορχική μάζα. Αυτές οι εξεργασίες ονομάζονται υποστραφή ορχικά νεοπλάσματα ή *burned out germ cell tumours* ή ορχικές ουλές. Μπορεί να είναι οζώδεις ή αστεροειδείς. Ιστολογικά παρατηρείται ινώδης ιστός σχετικά ακυτταρικός, συνήθως πυκνός αλλά μερικές φορές χαλαρός με στοιχεία αιμοσιδηρίνης και λίγα συνυπάρχοντα πλασματοκύτταρα. Συχνά ανευρίσκονται χαρακτηριστικά σωματίδια αιματοξυλίνης στην ουλή ή στον αυλό των σπερματικών σωληναρίων. Επιπλέον στην περιφέρεια δύναται να ανευρεθούν βιώσιμα νεοπλασματικά στοιχεία καθώς και εστίες IGCTU αλλά συνήθως το παρακείμενο ορχικό παρέγχυμα είναι ατροφικό, με λεμφοπλασματοκυτταρική διήθηση και απομείναντα υαλοειδοποιημένα ορχικά σωληνάκια 'σαν φαντάσματα' (*hyalinized ghost tubules*). Ενδέχεται να συνυπάρχει υπερπλασία των κυττάρων Leydig<sup>38,52</sup>.

## 5. Ογκογένεση

### 5.1. Γενικά

Όλα τα νεοπλάσματα των όρχεων από γεννητικά κύτταρα (TGCTs) αναπτύσσονται σε προϋπάρχουσα ενδοσωληναριακή νεοπλασία (IGCNU) ή αλλιώς καρκίνωμα *in situ*. Εξαιρέση αποτελούν το σπερματοκυτταρικό καρκίνωμα στους ηλικιωμένους άντρες<sup>53</sup> και τα νεοπλάσματα στα νεογνά και τα μικρά παιδιά δηλαδή ο όγκος του λεκιθικού ασκού και το ώριμο τεράτωμα<sup>54</sup>.

Τα δύο αδιαμφισβήτητα γεγονότα που αποδεικνύουν ότι η IGCNU αποτελεί πρόδρομη κατάσταση για την εξέλιξη σε TGCT είναι η σχεδόν πάντοτε παρουσία εστιών IGCNU σε θέσεις στο ορχικό παρέγχυμα παρακείμενες του διηθητικού νεοπλάσματος καθώς και η αναπόφευκτη ανάπτυξη TGCT σε ασθενείς με προηγηθείσα διάγνωση IGCNU σε ορχική βιοψία.

Πολλοί ερευνητές εστίασαν τις μελέτες τους στο θέμα ποιοι είναι οι μηχανισμοί εξαλλαγής του γεννητικού κυττάρου, ποίοι είναι οι αιτιολογικοί παράγοντες που προκαλούν αυτό το γεγονός και πώς μπορεί ένα μόνο πρόδρομο κύτταρο να εμφανίζει τόσο μεγάλη ποικιλία στην εξέλιξη του και να διαφοροποιείται ως ώριμο γεννητικό κύτταρο προς σεμίνωμα και ως αρχέγονο πολυδύναμο κύτταρο προς εμβρυικό καρκίνωμα, τεράτωμα, ή χοριοκαρκίνωμα.

Το σπερματικό σωληνάριο με IGCNU συχνά είναι μειωμένης διαμέτρου, εμφανίζει μία στιβάδα κυττάρων και συνήθως αυξημένου πάχους βασική μεμβράνη. Τα εν λόγω κύτταρα είναι μεγαλύτερου μεγέθους από τα φυσιολογικά σπερματογόνια, με ευμεγέθεις πυρήνες και συχνά με πολλαπλά ευδιάκριτα πυρήνια<sup>55</sup>. Συνήθως τα κύτταρα καταλαμβάνουν ολόκληρη την περιφέρεια του σπερματικού σωληναρίου μαζί με τα προϋπάρχοντα κύτταρα Sertoli αλλά κάποιες φορές περιορίζονται σε εστίες και σε ανάμειξη με φυσιολογικά γεννητικά κύτταρα, όπως με σπερματογόνια, σπερματοκύτταρα και σπερματίδες. Συχνά συνυπάρχει διάμεση λεμφοκυτταρική διήθηση αν και κάποιοι ερευνητές ισχυρίζονται πως η παρουσία της εγείρει την υπόνοια μικροδιήθησης. Το ορχικό παρέγχυμα με IGCNU είναι πολλές φορές ατροφικό και μπορεί να εμφανίζει στοιχεία δυσγενεσίας με ατελώς διαφοροποιημένα σωληνάρια και μικρολίθους (εστιακές μικροεπασβεστώσεις).

Έχουν γίνει πολλές έρευνες για τη διευκρίνιση των βιολογικών χαρακτηριστικών των κυττάρων IGCNU αλλά προέκυψαν σημαντικές δυσκολίες πρόσβασης και έτσι απουσίας κυτταρικών σειρών. Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος δείκτης στην κλινική πράξη για τα κύτταρα IGCNU είναι η πλακουντιακή αλκαλική φωσφατάση (PLAP)<sup>56</sup>, με άγνωστη όμως βιολογική λειτουργία που εκφράζεται επίσης και στα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα και στα άωρα ανθρώπινα γονοκύτταρα<sup>57</sup>.

Το πρωτοογκογονίδιο c-kit (CD117) εκφράζεται θετικά στα κύτταρα IGCNU και έχει γνωστή βιολογική λειτουργία. Τα πρωτοογκογονίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και στη διαφοροποίηση των κυττάρων και κωδικοποιούν πληροφορίες για τη σύνθεση πρωτεϊνών, οι οποίες αποτελούν τμήματα του μηχανισμού επαγωγής μηνυμάτων των κυττάρων. Ο μηχανισμός αυτός ρυθμίζει την απάντηση του κυττάρου στα εξωτερικά ερεθίσματα. Τα πρωτοογκογονίδια αποτελούν τόπους διαταραχών του DNA(μεταλλάξεις) οι οποίες τα

μετατρέπουν σε ογκογονίδια, μεταβάλλοντας τη δομή ή το ρυθμό έκφρασής τους. Κατά το μηχανισμό επαγωγής μηνυμάτων ένα μόριο, ευρισκόμενο στο εξωκυττάριο περιβάλλον, όπως π.χ. ένας αυξητικός παράγοντας, συνδέεται με τον υποδοχέα του και το νέο σύμπλοκο με τη σειρά του ενεργοποιεί μια πρωτεΐνη που εντοπίζεται στην εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης και αντιστοιχεί σε διαμεμβρανικό μεταβιβαστή μηνυμάτων. Αυτοί οι μεταβιβαστές μπορεί να είναι ενδοκυτταροπλασματικά τμήματα των υποδοχέων ή ένα ενεργοποιημένο μόριο αμέσως μετά από τη μεμβράνη. Τέτοιος διαμεμβρανικός μεταβιβαστής μηνυμάτων είναι η τυροσινική κινάση. Το c-kit κωδικοποιεί έναν P145 διαμεμβρανικό υποδοχέα τυροσίνης κινάσης. Στους TGCTs το c-kit πιθανά εμπλέκεται στη μετανάστευση και τη διαφοροποίηση των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων. Επιπλέον εκφράζεται έντονα θετικά στα πρώιμα εμβρυικά κύτταρα και γονοκύτταρα των νεογνών αλλά είναι αρνητικό στα φυσιολογικά σπερματογόνια των ενηλίκων<sup>58</sup>. Η παρατεταμένη δράση του c-kit, ο οποίος είναι ένας δυναμικά αντιαποπτωτικός παράγοντας στα αδιαφοροποίητα γεννητικά κύτταρα, θα μπορούσε να αποτελεί ένα από τους μηχανισμούς που οδηγεί σε μετάλλαξη, γιατί με αυτόν τον τρόπο καταφέρνει να παρατείνει την επιβίωση των κυττάρων<sup>58,59</sup>.

Άλλοι δείκτες για την IGCNU αποτελούν το M2A, το 43F και το TRA-1-60 που είναι αντισώματα τα οποία στρέφονται κατά γλυκολιπιδίων και γλυκοπρωτεϊνών που εντοπίζονται στην επιφάνεια των κυττάρων IGCNU αλλά η δομή και η ακριβής λειτουργία αυτών των πρωτεϊνών παραμένει άγνωστη<sup>60,61,62</sup>.

Ορισμένοι ανοσοϊστοχημικοί δείκτες εκφράζονται ταυτόχρονα και στα κύτταρα IGCNU και στα διθητικά νεοπλάσματα των όρχεων και συνήθως αυτό συμβαίνει με τα σεμινώματα παρά με τους μη σεμινωματώδεις όγκους. Παράλληλα, λόγω της ετερογένειας των κυττάρων IGCNU, ορισμένες φορές οι δείκτες εκφράζονται σε ένα αριθμό των κυττάρων αυτών και όχι σε όλα, ειδικά σε περιπτώσεις που η IGCNU συνδυάζεται με μεικτό όγκο<sup>63</sup>.

Επιπρόσθετα, πρόσφατα έχει μελετηθεί η μεθυλίωση και η έκφραση γονιδίων ειδικών για τα νεοπλάσματα των όρχεων, τα λεγόμενα CTA (Cancer Testis Antigen) που κωδικοποιούν πρωτεΐνες συμμετέχουσες στα μόρια τάξης I του Μείζονος Συμπλέγματος Ισοσυμβατότητας που εκφράζονται σε διάφορους καρκίνους. Στα νεοπλασματικά κύτταρα τα γονίδια CTA ενεργοποιούνται ανώμαλα με απομεθυλίωση ενώ στους σωματικούς ιστούς τα γονίδια CTA με μεθυλίωση καταστέλλονται. Τα περισσότερα μελετημένα γονίδια είναι το MAGE -A1, το MAGE-A3 και το MAGE-A4 τα οποία είναι θετικά στα φυσιολογικά γεννητικά κύτταρα, στα σπερματογόνια, σε ένα υποπληθυσμό κυττάρων της IGCNU και με ένα διαφοροποιημένο τρόπο στους TGCTs<sup>64</sup>. Τα 5' άκρα των γονιδίων MAGE -A1 και MAGE-A3 στο χρωμόσωμα X είναι μη μεθυλιωμένα στους σεμινωματώδεις όγκους, ανεξάρτητα από την έκφραση των γονιδίων αυτών, ενώ είναι μεθυλιωμένα στους μη σεμινωματώδεις όγκους όταν η έκφραση των δύο γονιδίων απουσιάζει.

Ελάχιστα γνωρίζουμε για τις γενετικές ανωμαλίες στο γονιδίωμα των κυττάρων της IGCNU και των TGCTs, αν και τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί σχετική πρόοδος. Οι TGCTs στους ενήλικες σε ποσοστό 80% εμφανίζουν ένα κυτταρογενετικό χαρακτηριστικό, το ισοχρωμόσωμα του βραχέος άκρου του χρωμοσώματος 12, το i(12p). Ισοχρωμόσωμα είναι το χρωμόσωμα με βραχίονες οι οποίοι είναι μορφολογικά ταυτόσημοι και περιέχουν τον ίδιο γενετικό τύπο. Με εξαίρεση το ώριμο τεράτωμα στον προεφηβικό όρχι, οι TGCTs είναι

σχεδόν υπερδιπλοειδικοί και έχουν τουλάχιστον ένα X και ένα Y χρωμόσωμα. Αυτό υποδηλώνει ότι η κακοήθης εξαλλαγή έχει γίνει πριν την ανάφαση της μείωσης.

Το γενικό πρότυπο ογκογένεσης των TGCTs συνίσταται σε αυξημένο αριθμό αντιγράφων του χρωμοσώματος 12p, αυξημένη έκφραση της κυκλίνης D2 στο προδιηθητικό στάδιο, ανάπτυξη τριπλοειδίας-τετραπλοειδίας και υπερέκφραση του φυσικού στελέχους του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53. Το ανωτέρω πρότυπο ογκογένεσης προσομοιάζει με εκείνο του σπερματοκυττάρου στο στάδιο της ζυγοταινίας-παχυταινίας κατά την πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης. Το σπερματοκύτταρο του εν λόγω σταδίου της μείωσης φαίνεται να είναι ο στόχος της κακοήθους εξαλλαγής. Στο στάδιο αυτό εκφράζεται προσωρινά το φυσικό στέλεχος του γονιδίου p53. Η ανώμαλη ανταλλαγή χρωματίνης μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένο αριθμό αντιγράφων 12p και υπερέκφραση της κυκλίνης D2 οπότε προχωρεί ο κυτταρικός κύκλος και έτσι το υπό εξαλλαγή κύτταρο ξεφεύγει από την απόπτωση που υπό άλλες συνθήκες θα το οδηγούσε το φυσικό στέλεχος p53.

Στους TGCTs παρατηρούνται είτε ανωμαλίες υπερρύθμισης γονιδίων που σχετίζονται με δύο υποδοχείς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, το KIT και το FGF4, ή ανωμαλίες στο μονοπάτι INK4-κυκλίνη D-γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (RB)-E2F. Οι γονιδιακές ανωμαλίες προκαλούν φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Rb(pRb), αποδέσμευση της πρωτεΐνης pRb από το E2F1, μετάβαση του κυττάρου στο σημείο ελέγχου G1R1 και κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ορισμένοι αυξητικοί παράγοντες διευκολύνουν την κυτταρική μετάβαση μέσω της φάσης G1 και μέσω του σημείου περιορισμού που συνδέεται με τη φωσφορυλίωση της pRb. Ο συνδυασμός γονιδιακών ανωμαλιών σε επίπεδο υποδοχέα ενός αυξητικού παράγοντα και στο μονοπάτι του γονιδίου του ρετινοβλαστώματος είναι σημαντικός για την κακοήθη εξαλλαγή των γεννητικών κυττάρων και την ανάπτυξη τους ενώ σπάνια παρατηρείται σε άλλα κακοήθη νεοπλάσματα.

## 5.2. Ογκογένεση και IGCNU

Τα κύτταρα IGCNU είναι ανευπλοειδικά υπερτετραπλοειδικά έως υποτετραπλοειδικά<sup>59,60</sup>. Κυτταρογενετικές μελέτες κατά τη διάρκεια της μεσόφασης έχουν δείξει ανωμαλίες στη σύσταση των χρωματοσωμάτων των κυττάρων της IGCNU, συχνά με αριθμητικές διαφορές στα χρωμοσώματα 1,12 και 15, σε περιοχές παρακείμενες του διηθητικού νεοπλάσματος<sup>65,66</sup>. Το ισοχρωμόσωμα i(12p), που αποτελεί συχνή και χρωμοσωμική ανωμαλία στους TGCTs έχει παρατηρηθεί επίσης και σε μία υποομάδα κυττάρων της IGCNU<sup>67,68</sup>. Εντούτοις σύγχρονες μελέτες με συγκριτικό γονιδιακό υβριδισμό δεν έχουν αποδείξει σχετική ενίσχυση του 12p χρωμοσώματος στα κύτταρα IGCNU<sup>69,70</sup>.

Μελέτες σε κάποια γονίδια που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και στην επιδιόρθωση του DNA έχουν συμβάλει στη διαλεύκανση της βιολογίας των κυττάρων της IGCNU και των TGCTs. Οι κυκλίνες τύπου D εμπλέκονται στη ρύθμιση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος στον κυτταρικό κύκλο. Μειωμένη έκφραση του ογκοκατασταλτικού mRNA του ρετινοβλαστώματος έχει αναφερθεί στους TGCTs με απουσία της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος στα κύτταρα IGCNU αλλά και σημαντική μείωση της έκφρασης σε πιο διαφοροποιημένους όγκους όπως είναι τα ώριμα τερατώματα<sup>71</sup>. Έρευνες για την έκφραση των τεσσάρων γονιδίων INK4, τα οποία είναι αναστολείς των κινάσεων της κυκλίνης, έχουν

δείξει ότι ένα από αυτά τα γονίδια, το p19<sup>INK4d</sup> το οποίο εμπλέκεται στη μετάβαση από τη μίτωση στη μείωση κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου της ωρίμανσης των γεννητικών κυττάρων, δεν ανιχνεύεται στα κύτταρα της IGCNU και στα γονοκύτταρα<sup>72</sup>.

### 5.3. Ογκογένεση και TGCTs

Ο μορφολογικός διαχωρισμός των TGCTs σε σεμινωματώδεις και μη σεμινωματώδεις πιθανά να έχει και γονιδιακό υπόβαθρο. Μετά από μελέτη 1.176 γονιδίων σε ανάλυση μακροσυστοιχιών, στους νη σεμινωματώδεις όγκους ανευρέθησαν κατεσταλμένα γονίδια σε ποσοστό 75% ενώ στα σεμινώματα παρατηρήθηκαν γονίδια υπερέκφρασης κυρίως σε ποσοστό 64% επί του συνόλου των εξετασθέντων γονιδίων.

Στα σεμινώματα βρέθηκαν ενεργοποιημένα ορισμένα ογκογονίδια, γονίδια που ρυθμίζουν τη σύνθεση και επιδιόρθωση του DNA και γονίδια που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Σε αντίθεση, τα γονίδια μεταγραφικής δραστηριότητας και εκείνα της απόπτωσης ήταν κατεσταλμένα. Στους μη σεμινωματώδεις όγκους, βρέθηκαν κατεσταλμένες πολλές λειτουργίες ογκογονιδίων, ρυθμιστικών γονιδίων της απόπτωσης, της μεταγραφής, της σύνθεσης και της επιδιόρθωσης του DNA ενώ θετικά ρυθμισμένα ήταν τα γονίδια ελέγχου του κυτταρικού κύκλου.

### 5.4. Ο ρόλος του p53

Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου σχετίζεται στενά με μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για την επιδιόρθωση του DNA. Η πρωτεΐνη p53 είναι μία πυρηνική πρωτεΐνη που φωσφορυλιώνεται στη φάση S του κυτταρικού κύκλου και έχει μικρή ημιπερίοδο ζωής, γεγονός που την κάνει αθέατη σε φυσιολογικούς ιστούς με συνήθεις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις. Η πρωτεΐνη αυτή από μόνη της ή σε συνεργασία με άλλες πρωτεΐνες υπεισέρχεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και είναι παρούσα στους περισσότερους εμβρυικούς και ενήλικες ιστούς. Η πρωτεΐνη p53 κωδικοποιείται από το γονίδιο p που εδράζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 17(p13), «φρενάρει» τη μεταγραφή του DNA και ενεργοποιεί τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, γνωστό ως απόπτωση. Η πρωτεΐνη p53 και το γονίδιο p53 έχουν φυσικούς(wild) και μεταλλαγμένους (mutant) τύπους. Βασικό ερέθισμα για κωδικοποίηση της φυσικής πρωτεΐνης p53 αποτελεί βλάβη του DNA. Η συσσώρευση φυσικής πρωτεΐνης p53 έχει ως αποτέλεσμα διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 με αποτέλεσμα να παρέχεται χρόνος στο DNA να αυτοεπισκευασθεί πριν εισέλθει στη φάση S. Αν η επιδιόρθωση δεν είναι επιτυχής τότε διεγείρεται η διαδικασία της απόπτωσης και απαλλάσσεται ο οργανισμός από ένα μεταλλαγμένο κύτταρο. Απώλεια της λειτουργίας αυτής της πρωτεΐνης p53, επιτρέπει τη σταθεροποίηση των καρκινογόνων μεταλλάξεων στο γενετικό υλικό των κυττάρων και επομένως την ανάπτυξη όγκου. Η πρωτεΐνη p53 υπερεκφράζεται στα κύτταρα IGCNU και στα ορχικά νεοπλάσματα<sup>73</sup>. Όμως πολλές μελέτες δεν έχουν πείσει για την παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο p53 και αυτό πιθανά να σημαίνει ότι η συγκέντρωση του φυσικού τύπου πρωτεΐνης p53 πιθανά να εξυπηρετεί βιολογικούς σκοπούς που έχουν σχέση με την ανάπτυξη των πρώιμων γεννητικών κυττάρων<sup>74,75</sup>. Η υπερέκφραση των κυττάρων της IGCNU στην πρωτεΐνη p53 ενισχύει επίσης την άποψη ότι τα κύτταρα αυτά προέρχονται από τα εμβρυικά γεννητικά κύτταρα.

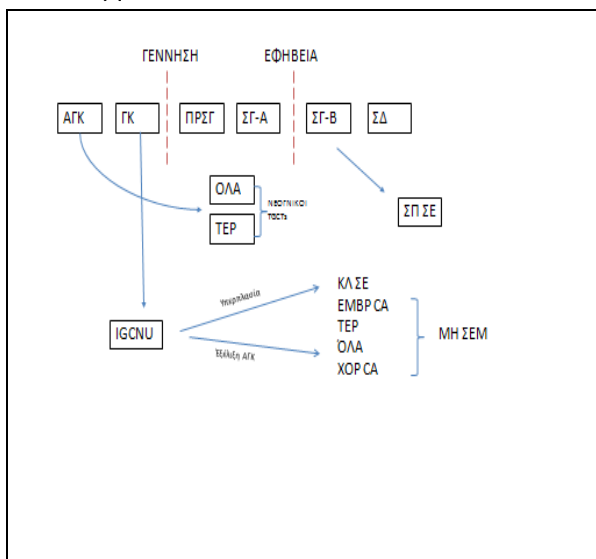


### 5.5. Εξέλιξη της IGCNU σε TGCT

Η ακριβής φύση των γενετικών αλλοιώσεων και των μοριακών μηχανισμών παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστη, με μόνο βέβαιο το γεγονός της έναρξης της κακοήθους εξαλλαγής του πρόδρομο γεννητικού κυττάρου σε κύτταρο IGCNU. Η έναρξη της κακοήθους εξαλλαγής διαδραματίζεται κατά τη διάρκεια της πρώιμης ανάπτυξης των γεννητικών κυττάρων και το κύτταρο στόχος είναι πιθανά είτε το αρχέγονο γεννητικό κύτταρο ή το γονοκύτταρο. Οι φαινοτυπικές ομοιότητες μεταξύ των κυττάρων IGCNU και γονοκυττάρων ισχυροποιούν την ένδειξη ιστογενετικής συσχέτισης των δύο κυττάρων. Τα κύτταρα IGCNU αλλά και αυτά των TGCTs είναι υπερτριπλοειδικά και πιστεύεται ότι ο τετραπλοειδισμός ενός πρόδρομου δυσπλαστικού γεννητικού κυττάρου είναι ένα πρώιμο γεγονός που οδηγεί σε γενετική αστάθεια<sup>76</sup>. Μία άλλη υπόθεση είναι ότι το άωρο γεννητικό κύτταρο στόχος είναι διπλοειδικό και ο ενδοδιπλασιασμός του σχετίζεται με αυξημένη προδιάθεση σε μιτωτικά λάθη και απώλεια αριθμού χρωμοσωμάτων κατά την εξέλιξη.

Η ιστογένεση της IGCNU και συνεπώς και των TGCTs συνοψίζονται στο Σχήμα 1:

Σχήμα 1: Ιστογένεση των νεοπλασμάτων από γεννητικά κύτταρα σε σχέση με την ορχική ανάπτυξη.



ΑΓΚ: αρχέγονο γεννητικό κύτταρο, ΓΚ: γονοκύτταρο, ΠΡΣΓ: προσπερματογόνιο, ΣΓ-A: σπερματογόνιο Α, ΣΓ-B: σπερματογόνιο Β, ΣΔ: σπερματίδη, ΟΛΑ: όγκος λειθητικού ασκού, ΤΕΡ: τεράτωμα, ΚΛ ΣΕ: κλασικό σεμίνωμα, ΣΠ ΣΕ: σπερματοκυτταρικό σεμίνωμα, ΕΜΒΡ CA: εμβρυικό καρκίνωμα, ΧΟΡ CA: χοριοκαρκίνωμα, ΜΗ ΣΕΜ: μη σεμινωματώδη νεοπλασμάτα

Παράλληλα υπάρχει ισχυρή επιδημιολογική ένδειξη ότι η IGCNU ξεκινάει πιθανά από την πρώιμη ζωή. Όπως έχει ήδη αναφερθεί παρατηρείται υψηλή συχνότητα ορχικού καρκίνου σε διάφορες ανωμαλίες της ανάπτυξης, όπως είναι η κρυψορχία αλλά και η βουβωνοκλήη. Αυτή η συσχέτιση δεν είναι τυχαία και έχει προταθεί αυτές οι ανωμαλίες μαζί με την IGCNU και τους TGCTs, να αποτελούν στοιχεία του καλούμενου συνδρόμου ορχικής δυσγενεσίας (testicular dysgenesis syndrome-TDS). Ιστολογικά αυτό το σύνδρομο χαρακτηρίζεται

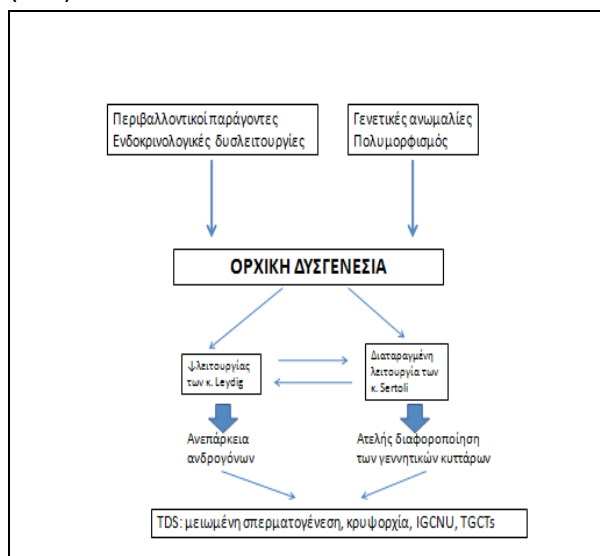
επιπλέον από αδιαφοροποίητα σωληνάρια ή μικρολιθίαση. Αυτές οι αλλοιώσεις παρατηρούνται και σε βιοψίες ασθενών για κρυφορχία ή υπογονιμότητα. Με όλα αυτά τα δεδομένα γίνεται για άλλη μια φορά κατανοητό ότι όλα τα συστατικά του συνδρόμου ορχικής δυσγενεσίας εμφανίζουν κοινή αιτιολογία που περιλαμβάνει περιβαλλοντικούς παράγοντες που επιδρούν κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης σε άτομα με γενετική προδιάθεση. Ο πιθανός αιτιολογικός ρόλος του τρόπου ζωής και των περιβαλλοντικών παραγόντων στην ογκογένεση του ορχικού καρκίνου αντικατοπτρίζεται από τη δραματική αύξηση της επίπτωσης της νόσου τις τελευταίες δεκαετίες. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η επίπτωση του ορχικού καρκίνου σχετίζεται με την ηλικία γέννησης παρά με τον χρόνο διάγνωσης<sup>77</sup>. Ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση, που προαναφέρθηκε και σε κάποιο άλλο σημείο, της μείωσης της συχνότητας των νεοπλασμάτων των όρχεων κατά τη διάρκεια του Β Παγκοσμίου Πολέμου σε χώρες της Σκανδιναβίας<sup>78</sup>. Η παρατήρηση αυτή ενισχύει το ρόλο του περιβάλλοντος στην ογκογένεση των TGCTs.

Οποιαδήποτε διαταραχή στον εμβρυικό προγραμματισμό της ανάπτυξης των γονάδων σε γενετικά προδιαθετιμένα άτομα πιθανά να μπορεί να αποτελεί εκλυτικό αίτιο. Τέτοιου είδους διαταραχή είναι η ενδομητρική ή περιγεννητική αστάθεια που καθυστερεί τη διαφοροποίηση των γεννητικών κυττάρων και έτσι τα καθιστά επιδεκτικά σε μεταλλάξεις.

Κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας ή της εφηβείας, η κακοήθης εξαλλαγή, μπορεί, λόγω ενδοκρινικής διέγερσης κατά την περίοδο αυτή, να αρχίσει να εξελίσσεται<sup>79,80</sup>. Αυτό εξηγεί και την ιδιαίτερα σπάνια εμφάνιση νεοπλασματος των όρχεων σε άτομα με υπογοναδικό υπογοναδισμό παρά το γεγονός ότι οι όρχεις τους συνήθως είναι υποπλαστικοί.

Τα φυσικά και συνθετικά οιστρογόνα και τα αντιανδρογόνα αποτελούν δύο ομάδες ορμονών γνωστές για την ανεπιθύμητη δράση τους στην ανάπτυξη των όρχεων, σε μελέτες που έγιναν σε πειραματόζωα. Αυτό εξηγεί και τη διαφορά στη συχνότητα μεταξύ των TGCTs σε μαύρους και λευκούς ανθρώπους, αφού οι μαύροι εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα τεστοστερόνης στην αρχή της εγκυμοσύνης. Επίσης, έχει παρατηρηθεί συχνότερη εμφάνιση TGCTs στα πρωτότοκα αγόρια και αυτό πιθανά να οφείλεται στα σχετικά χαμηλά επίπεδα γεννητικών ορμονών κατά τη διάρκεια της πρώτης εγκυμοσύνης αλλά και στη μεταφορά από τη μητέρα στο παιδί, χημικών, τα οποία βρίσκονταν αποθηκευμένα στο λίπος της εγκυμοσύνης, κατά τη διάρκεια της κύησης και της γαλουχίας. Παράλληλα τα παιδιά μικρά για την ηλικία κύησης εμφανίζουν πιο συχνά TGCTs πιθανά λόγω των αυξημένων επιπέδων κυκλοφορούντων οιστρογόνων στους πρόωρους τοκετούς. Τα ανωτέρω παρουσιάζονται και σχηματικά στον Σχήμα 2.

Σχήμα 2: Σχηματική απεικόνιση της παθογένεσης του ορχικού συνδρόμου δυσγενεσίας (TDS).



## 6. Κλινική διάγνωση και θεραπευτική αγωγή

### 6.1. IGCNU

Προς το παρόν δεν υπάρχουν απεικονιστικές τεχνικές ή ορολογικές μέθοδοι για την ασφαλή διάγνωση της IGCNU. Ο μόνος τρόπος για ασφαλή διάγνωση είναι η λήψη χειρουργικής βιοψίας υλικού. Αντιπροσωπευτικό θεωρείται το δείγμα με διάμετρο το λιγότερο 3mm και αποτελείται από 30-40 σπερματικά σωληνάκια τουλάχιστον<sup>81</sup>.

Η αντιμετώπιση της IGCNU έχει σκοπό την αποφυγή ανάπτυξης διηθητικού νεοπλασματος και μπορεί να είναι ορχεκτομή, χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία ή παρακολούθηση, ανάλογα με την ηλικία του ασθενούς και αν η νόσος είναι ετερόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη. Σε περίπτωση ετερόπλευρης εντόπισης συστήνεται ορχεκτομή<sup>82</sup>. Σε σπάνιες περιπτώσεις η ορχική IGCNU μπορεί να συνδυάζεται με εξωγοναδικό όγκο από γεννητικά κύτταρα για αυτό χρειάζεται πλήρης διερεύνηση του ασθενούς.

Σε περιπτώσεις αμφοτερόπλευρης IGCNU εφαρμόζεται χαμηλή δόση ακτινοθεραπείας με καλά αποτελέσματα.

Σε όλους τους ασθενείς συστήνεται η χορήγηση σπέρματος σε τράπεζα σπέρματος πριν από κάθε θεραπεία.

## 6.2. TGCTs

Συγκριτικά με την πλειονότητα των συμπαγών όγκων στους ενήλικες, οι TGCTs, ανταποκρίνονται καλά στη χημειοθεραπεία με κυτταροτοξικά φάρμακα. Ακόμα και σε μεταστατική νόσο, ποσοστό 80% των ασθενών μπορούν να θεραπευθούν με πολυπαραγοντική θεραπεία με βάση τη σισπλατίνη, και ακολούθως αφαίρεση των υπολειμματικών εστιών. Οι τελευταίες συνήθως αποτελούνται από νεκρωμένα κυτταρικά στοιχεία, από ελάχιστα βιώσιμα νεοπλασματικά κύτταρα ή από υπολειμματικό όγκο με στοιχεία τερατώματος<sup>83</sup>. Περίπου το 10% των ασθενών με TGCTs δεν ανταποκρίνεται στη θεραπεία με σισπλατίνη ή υποτροπιάζει. Δεν είναι σαφές γιατί οι TGCTs εμφανίζουν διαφοροποιημένη συμπεριφορά στη χημειοθεραπεία. Η μεγάλη ανταπόκριση πιθανά να οφείλεται στα χαρακτηριστικά του αρχέγονου γεννητικού κυττάρου από το οποίο προέρχονται. Το κύτταρο αυτό υφίσταται απόπτωση αμέσως μετά την έκθεση σε εξωγενείς στρες. Οι TGCTs ανοσοϊστοχημικά εμφανίζουν υψηλά επίπεδα φυσικού (wild) τύπου πρωτεΐνης p53 αλλά, σε αντίθεση με άλλους συμπαγείς όγκους, οι μεταλλάξεις στο p53 είναι σχεδόν ανύπαρκτες. Όλες αυτές οι διαπιστώσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τα υψηλά επίπεδα φυσικού p53 είναι υπεύθυνα για την υψηλή χημειοευαισθησία. Άλλοι παράγοντες που μπορεί να συμβάλουν, πιθανά να αποτελούν η χαμηλή ικανότητα επιδιόρθωσης του DNA<sup>84</sup> ή η έλλειψη αντιαποπτωτικών μελών της οικογένειας Bcl2

Η θεραπεία των TGCTs καθορίζεται από το κλινικό στάδιο και την ιστολογική διάγνωση. Στο σεμίνωμα σταδίου I (νόσος που εμφανώς περιορίζεται στον όρχι), η πιο αποδεκτή αντιμετώπιση μετά την ορχεκτομή είναι η συμπληρωματική ακτινοθεραπεία στους παρα-αορτικούς και πυελικούς λεμφαδένες, με τάση τα τελευταία χρόνια η ακτινοθεραπεία να περιορίζεται μόνο στους παρα-αορτικούς λεμφαδένες<sup>85</sup>. Η πολιτική της απλής παρακολούθησης (surveillance), έχει δοκιμαστεί σε αρκετά κέντρα, χωρίς όμως να καθιερωθεί λόγω αυξημένης συχνότητας υποτροπών μετά από μερικά χρόνια και απουσίας ενός ευαίσθητου ορολογικού δείκτη. Η ταυτοποίηση μορφολογικών χαρακτηριστικών ως παραγόντων κινδύνου, μπορεί να οδηγήσει σε πιο ευρεία αποδοχή της απλής παρακολούθησης ως θεραπευτικής προσέγγιση. Η χορήγηση μίας δόσης καρβοπλατίνης εφαρμόζεται σε πειραματικό στάδιο σε ορισμένα κέντρα με σχετικά καλά αποτελέσματα.

Οι ασθενείς με σπερματοκυτταρικό καρκίνωμα δεν χρήζουν άλλης συμπληρωματικής θεραπείας μετά την ορχεκτομή, με εξαίρεση τις σπάνιες περιπτώσεις που το σπερματοκυτταρικό σεμίνωμα σχετίζεται με σάρκωμα<sup>86</sup>.

Στο στάδιο I των μη σεμινωματοδών νεοπλασμάτων, παρατηρούνται σε σημαντικό ποσοστό πνευμονικές μεταστάσεις. Όταν οι περιπτώσεις αυτές θεωρούνται, με βάση μορφολογικά κριτήρια, υψηλού κινδύνου, συνηθίζεται να χορηγούνται 2 κύκλοι συμπληρωματικής συνδυασμένης χημειοθεραπείας, ενώ σε μερικές εφαρμόζεται προφυλακτικός οπισθοπεριτοναϊκός καθαρισμός.

Σε ασθενείς με πιο προχωρημένο στάδιο νόσου, η θεραπεία και για τις δύο ομάδες TGCTs είναι η χημειοθεραπεία, με εξαίρεση τους ασθενείς με μεταστατικό σεμίνωμα που εντοπίζεται στους κοιλιακούς λεμφαδένες με διάμετρο μικρότερη των 50mm. Γενικά, η ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία είναι λίγο καλύτερη στα σεμινώματα σε σχέση με τα μη

σεμινωματώδη νεοπλάσματα. Για το λόγο αυτό πολλοί ογκολόγοι χορηγούν 2 χημειοθεραπευτικά φάρμακα (σισπλατίνη και ετοποσίδη, χωρίς μπλεομυκίνη), αντί τρία, σε ασθενείς με μεταστατικό σεμίνωμα εάν οι μεταστάσεις περιορίζονται στους κοιλιακούς λεμφαδένες και δεν αφορούν τους πνεύμονες.

## 7. TGCT και ταχεία βιοψία

Η κλινική διάγνωση συνήθως είναι επαρκής για να στηρίξει την επιλογή ορχεκτομής στην πλειονότητα των περιπτώσεων. Εντούτοις, η διεγχειρητική επιβεβαίωση της νεοπλασματικής φύσης της μάζας στην περίπτωση που υφίσταται μόνο ένας όρχις είναι σημαντική, ειδικά αν τα κλινικά ευρήματα δεν είναι απολύτως σαφή. Η ετερογένεια των νεοπλασμάτων των όρχεων κάνουν δύσκολο τον προσδιορισμό του τύπου του όγκου σε τομές ψυκτικού μικροτόμου. Μία περίπτωση όπου μπορεί μία καλοήθης κατάσταση να δυσερμηνευτεί με TGCT, αποτελεί, η παρουσία πλακώδους μεταπλασίας στην επιδιδυμίδα που οδηγεί λανθασμένα στη διάγνωση τερατώματος. Επίσης, κατάσταση που προκαλεί προβληματισμό, αποτελεί η εκσεσημασμένη κοκκιωματώδης αντίδραση στο σεμίνωμα που ' επισκιάζει ' τα νεοπλασματικά κύτταρα. Σε ασθενείς με σύγχρονες αμφοτερόπλευρες ορχικές μάζες που κλινικά θεωρούνται TGCTs, η διεγχειρητική επιβεβαίωση της διάγνωσης είναι απαραίτητη. Ο παθολογοανατόμος για την τελική διάγνωση σε αυτές τις περιπτώσεις θα πρέπει να έχει υπόψη του ασυνήθεις καταστάσεις αμφοτερόπλευρων ορχικών αλλοιώσεων, όπως, λέμφωμα, αμαρτώματα από κύτταρα Sertoli-Leydig στο σύνδρομο απευαισθητοποίησης (insensitivity) στα ανδρογόνα, θηλώδη κυσταδενώματα της επιδιδυμίδας που σχετίζονται με το σύνδρομο von Hippel-Lindau, ορχίτιδα. Αυτά τα ερωτήματα πριν ή κατά τη διάρκεια της επέμβασης, μπορούν να έχουν ως αποτέλεσμα να αποφευχθεί η ορχεκτομή που δεν χρειάζεται<sup>87</sup>.

## 8. Ανοσοϊστοχημεία και νεοπλάσματα των όρχεων από γεννητικά κύτταρα.

### 8.1. PLAP

Η πλακουντιακή αλκαλική φωσφατάση αποτελεί το ένα από τα έξι διαφορετικά ισοένζυμα της αλκαλικής φωσφατάσης τα οποία είναι οργανοειδικά. Το ενδιαφέρον για το PLAP ξεκίνησε από την παρατήρηση της άφθονης έκτοπης παραγωγής της σε ασθενή με καρίνωμα του πνεύμονα από πλακώδες επιθήλιο<sup>88</sup>. Αυτή η πρωτεΐνη ονομάστηκε ισοένζυμο Regan και αργότερα άλλη μια παρόμοια πρωτεΐνη τύπου PLAP απομονώθηκε από ασθενή με καρκίνωμα και ονομάστηκε ισοένζυμο Nabaο. Οι δύο αυτές πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται ως νεοπλασματικοί δείκτες ευρέως φάσματος και ανευρίσκονται στον ορό ασθενών με ποικίλους όγκους όπως σε νεοπλάσματα από γεννητικά κύτταρα, καρκινώματα του πνεύμονα, του στομάχου, του παγκρέατος, του μαστού και της ωοθήκης.

Στην κλινική πράξη, οι μετρήσεις των επιπέδων του PLAP συμβάλλουν στην παρακολούθηση των ασθενών και στην ανίχνευση τυχόν υποτροπής.

Δυστυχώς, όπως συμβαίνει και με άλλους καρκινικούς δείκτες, όπως π.χ. το καρκινοεμβρυικό αντιγόνο (CEA ) και την α-εμβρυική σφαιρίνη (AFP), έτσι και το PLAP δεν είναι ειδικό για κάποιο συγκεκριμένο νεόπλασμα. Οι καπνιστές και οι ασθενείς με διάφορες καλοήθειες παθήσεις όπως φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, ηπατική κίρρωση, σύνδρομο οξείας αναπνευστικής ανεπάρκειας και πνευμονίας, εμφανίζουν υψηλά επίπεδα PLAP στον ορό τους, πολλές φορές ίδια με αυτά των ασθενών με νεοπλασία. Επίσης, σε μία μελέτη ασθενών με ιστορικό TGCT, το 1/3 εμφανίζει αυξημένα επίπεδα PLAP στον ορό χωρίς ωστόσο κλινικές και απεικονιστικές ενδείξεις υποτροπής. Σημειώνεται όμως ότι όλοι οι ασθενείς της μελέτης ήταν καπνιστές.

Το PLAP ανοσοϊστοχημικά είναι θετικό και σε ποικιλία φυσιολογικών ιστών, όπως ο πλακούντας, τα βρογχοκυψελιδικά κύτταρα τύπου I, οι αδένες του ενδοτραχήλου της μήτρας, το επιθήλιο των σαλπίνγων, ορισμένα δικτυωτά κύτταρα του θύμου αδένος, σπάνια μεμονωμένα γεννητικά κύτταρα των όρχεων, στις κύστες από εγκλεισμό του βλαστικού επιθηλίου στις ωοθήκες και σπάνια σε επιθηλιακά κύτταρα στο παχύ έντερο.

Η ανθρώπινη αλκαλική φωσφατάση έχει τουλάχιστον τρία δομικά γονίδια, το ένα που κωδικοποιεί για το PLAP, το άλλο για την εντερική αλκαλική φωσφατάση (intestinal alkaline phosphatase-IAP) και ένα ή περισσότερα για μη ειδικές αλκαλικές φωσφατάσες (unspecific alkaline phosphatases-UAP)<sup>89</sup>. Η φυσική δομή αυτών των ενζύμων, τα ανοσοϊστοχημικά δεδομένα και η χημική παρεμπόδιση, δείχνουν ότι τα ισόενζυμα αυτά είναι τρία διαφορετικά πεπτίδια. Εντούτοις, το IAP και το PLAP εμφανίζουν διασταυρούμενη αντίδραση και η απομόνωση του cDNA του PLAP και του IAP δείχνουν ότι εμφανίζουν στενή γενετική συσχέτιση και δεν μπορούν σαφώς να διαχωριστούν τα παράγωγα πολυκλωνικά τους αντισώματα<sup>90,91,92,93</sup>.

Ως καρκινικός δείκτης το PLAP χρησιμοποιείται κυρίως στα γυναικολογικά και ουρολογικά περιστατικά, καθώς αυξημένα επίπεδα εμφανίζονται στα νεοπλάσματα των ωοθηκών(30-40%)<sup>94</sup> και στους TGCTs(80-90%)<sup>95</sup>.

Ανοσοϊστοχημικά, το PLAP εκφράζεται σε ποσοστό 83-99% στην IGCNU και χρησιμοποιείται ευρέως για τη διάγνωση, σε ποσοστό 85-100% στο κλασικό σεμίνωμα με μεμβρανική ή περιπυρηνική dot-like χρώση<sup>96,97</sup> ακόμα και στις περιοχές με νέκρωση. Στο σπερματοκυτταρικό σεμίνωμα το PLAP ανιχνεύεται μόνο σε μεμονωμένα νεοπλασματικά κύτταρα<sup>98,99,100</sup>. Στο εμβρυικό καρκίνωμα το PLAP είναι εστιακά θετικό ως μεμβρανική ή κυτταροπλασματική χρώση<sup>101</sup>. Η έκφραση του PLAP στον όγκο του λεκιθικού ασκού κυμαίνεται από 1-85% σε 4 μελέτες<sup>101,102,103,104</sup>. Επίσης το χοριοκαρκίνωμα είναι κατά τύπους θετικό σε ποσοστό 54%<sup>124</sup>, ενώ στο τεράτωμα παρατηρείται έκφραση στους αδενικούς σχηματισμούς<sup>98,101,121,105,106</sup>.

## 8.2.c-kit

Το c-kit είναι ένα πρωτοογκογονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα για τον αυξητικό παράγοντα των αρχέγονων κυττάρων. Τα πρωτοογκογονίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και στη διαφοροποίηση των κυττάρων και κωδικοποιούν πληροφορίες για τη σύνθεση πρωτεϊνών, οι οποίες αποτελούν τμήματα του μηχανισμού επαγωγής μηνυμάτων των κυττάρων. Ο μηχανισμός αυτός ρυθμίζει την απάντηση του κυττάρου στα εξωτερικά

ερεθίσματα. Τα πρωτοογκογονίδια αποτελούν τόπους διαταραχών του DNA(μεταλλάξεις), οι οποίες τα μετατρέπουν σε ογκογονίδια μεταβάλλοντας τη δομή ή τον ρυθμό έκφρασης του.

Κατά το μηχανισμό επαγωγής μηνυμάτων ένα μόριο ευρισκόμενο στο εξωκυττάριο περιβάλλον, όπως π.χ. ένας αυξητικός παράγοντας, συνδέεται με τον υποδοχέα του και το νέο σύμπλοκο με τη σειρά του ενεργοποιεί μια πρωτεΐνη που εντοπίζεται στην εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης και αντιστοιχεί στον διαμεμβρανικό μεταβιβαστή μηνυμάτων. Αυτοί οι μεταβιβαστές μπορεί να είναι ενδοκυτταροπλασματικά τμήματα των υποδοχέων ή ένα ενεργοποιημένο μόριο αμέσως μέσα από τη μεμβράνη. Τέτοιος διαμεμβρανικός μεταβιβαστής μηνυμάτων είναι η τυροσινική κινάση, η οποία προσθέτει ή αφαιρεί φωσφορικές ρίζες από υπολειμματικά τμήματα τυροσίνης ή σερίνης-θρεονίνης. Η κατηγορία αυτή των ογκογονιδίων αναφέρεται ως οικογένεια *src*, γιατί όλες οι πρωτεΐνες της εμφανίζουν διαφόρου βαθμού αλληλουχία με το καταλυτικό τμήμα της τυροσινικής-κινάσης του ογκογονιδίου *src*. Στην ίδια ομάδα ανήκει και το *cerbB2* που κωδικοποιεί τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGFR).

Το *c-kit* κωδικοποιεί τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη CD117,145kDa, με λειτουργία ενδογενούς τυροσινικής κινάσης, που δρα ως υποδοχέας για τον αυξητικό παράγοντα του αρχέγονου κυττάρου (stem cell factor-SCF). Σημειακή μετάλλαξη στο *c-kit* ενεργοποιεί σταθερά την τυροσινική κινάση του υποδοχέα, ανεξάρτητα από την πρόσδεση του συνδέτη.

Το γονίδιο *C-kit* είναι μέλος της οικογένειας των υποδοχέων της τυροσινικής κινάσης, υποκατηγορίας II, που περιλαμβάνει υποδοχείς για τον αυξητικό παράγοντα των αιμοπεταλίων (platelet-derived growth factor-PDGF), του διεγερτικού παράγοντα αποικισμού των μακροφάγων (macrophage colony stimulating factor) και του διεγερτικού παράγοντα αποικισμού των μονοκυττάρων (monocyte colony stimulating factor). Εκφράζεται σε ποικιλία κυττάρων όπως είναι τα μονοκύτταρα, τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, τα μελανοκύτταρα, τα γεννητικά κύτταρα και τα κύτταρα των στρωματικών όγκων του γαστρεντερικού συστήματος (GIST). Φυσιολογικά εκφράζεται στα κύτταρα Leydig, στα σπερματογόνια και τις ωοειδείς σπερματίδες και αυτό αποδεικνύει την παρουσία τοπικού ενεργού ρυθμιστικού συστήματος στην ανθρώπινη σπερματογένεση που είναι άμεσα εξαρτημένο από τη δράση του *c-kit* ως μεταβιβαστή μηνύματος. Συμπερασματικά, το *c-kit* είναι ζωτικής σημασίας για τη ρύθμιση της ανάπτυξης και της επιβίωσης των γεννητικών κυττάρων.

Υπερέκφραση του *c-kit* σχετίζεται με κακοήγη εξαλλαγή των κυττάρων. Το γονίδιο *KIT* και τα γονίδια του μονοπατιού του ρετινοβλαστώματος συνεργάζονται για να ωθήσουν τα ενδοσωληναριακά νεοπλασματικά γεννητικά κύτταρα να πολλαπλασιασθούν. Τα κύτταρα Sertoli εκκρίνουν το συνδέτη του *KIT* ο οποίος στέλνει σήμα μέσω του υποδοχέα *KIT* στην κυκλίνη D2. Έχουν περιγραφεί τρεις γενικοί μηχανισμοί υπερέκφρασης του *c-kit* στα νεοπλασματικά κύτταρα: αυτοκρινής ή/και παρακρινής διέγερση του υποδοχέα, διασταυρούμενη αντίδραση με άλλες κινάσες ή/και απώλεια της λειτουργίας της ρυθμιστικής φωσφατάσης και απόκτηση ενεργών μεταλλάξεων<sup>102,107</sup>.

Πολλοί ερευνητές έχουν αποδείξει ότι το *c-kit* εκφράζεται έντονα θετικά στα σεμινώματα των όρχεων (σε ποσοστό 80-100%) , καθώς και στα κύτταρα της IGCNU.

Ο δείκτης αυτός παρουσιάζει ιδιαίτερο κλινικό ενδιαφέρον λόγω της ύπαρξης στοχοθεραπείας με το φάρμακο *Glivec* (αναστολέας του υποδοχέα τυροσινικής κινάσης).

### 8.3.CD30

Το αντίσωμα CD30(ki 1) αρχικά προήλθε από μία προσπάθεια να απομονωθεί ειδικός δείκτης για τη νόσο Hodgkin<sup>108</sup>. Σχηματίστηκε έναντι μίας κυτταρικής σειράς, της L428, προερχόμενης από κύτταρα Hodgkin-Reed Sternberg και αρχικά θεωρήθηκε ότι αντιπροσωπεύει το CD30 αντιγόνο, το οποίο αφορά αποκλειστικά τα κύτταρα Hodgkin-Reed Sternberg. Στη συνέχεια το αντιγόνο βρέθηκε ότι εκφράζεται σε ενεργοποιημένα T- και B-λεμφοκύτταρα<sup>109</sup>. Επίσης βρέθηκε θετικό σε ένα μεγάλο ποσοστό περιφερικών T-λεμφοκυττάρων από μεσαία και μεγάλα κύτταρα, στην αγγειοανοσοβλαστική λεμφαδενοπάθεια, στη λεμφωματοειδή βλατίδωση, στο αναπλαστικό μεγαλοκυτταρικό λέμφωμα(ALCL) και σε νεοπλάσματα των μαλακών μορίων. Παράλληλα εκφράζεται σε ένα εύρος φυσιολογικών ιστών όπως στο μεσοθήλιο, στα κύτταρα του φθαρού και στα ενεργοποιημένα μακροφάγα<sup>110</sup>.

Σήμερα πλέον είναι γνωστό ότι το CD30 είναι μία πρωτεΐνη 120kDa, μέλος της μεγάλης ομάδας των NGFR/TNFR πρωτεϊνών(οικογένεια του υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης όγκου-tumor necrosis factor receptor superfamily)<sup>111</sup>, ορισμένες από τις οποίες λειτουργούν ως υποδοχείς κυτοκινών. Στην ίδια ομάδα ανήκουν το CD40, FAS/APO-1(CD95), CD27(αντιγόνο ενεργοποίησης των T-λεμφοκυττάρων). Δεδομένα από in vitro μελέτες δείχνουν ότι το CD30 μεταφέρει μηνύματα για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και την κυτταροτοξικότητα των λεμφοειδών κυττάρων<sup>112</sup>

Εντούτοις, η πιο γνωστή και ευρέως αναγνωρισμένη εξωλεμφοειδής έκφραση του αντιγόνου είναι στο εμβρυικό καρκίνωμα. Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει έντονη έκφραση του CD30 στο εμβρυικό καρκίνωμα στα επίπεδα και της πρωτεΐνης<sup>113-114</sup> και του mRNA<sup>115,116</sup>. Το CD 30 δεν εκφράζεται στο σεμίνωμα<sup>117</sup> και στον όγκο του λεκιθικού ασκού, καθώς και στους μικτούς όγκους χωρίς στοιχείο εμβρυικού καρκινώματος<sup>116</sup>.

Η αναγνώριση του εμβρυικού καρκινώματος, ως αμιγές νεόπλασμα ή ως στοιχείο σε ένα μικτό όγκο είναι αποδεδειγμένα ιδιαίτερα σημαντική γιατί καθορίζει την πρόγνωση. Το CD 30 συμβάλλει σαφώς σε περιπτώσεις που τίθεται θέμα διαχωρισμού των ετερογόνων στοιχείων ενός μη σεμινωματώδους νεοπλάσματος<sup>104</sup>.

Πολλές φορές εστίες μεταστατικού εμβρυικού καρκινώματος μετά από χημειοθεραπεία χάνουν την έκφραση στο CD30<sup>110,118</sup>.

### 8.4.OCT 3/4

Κατά τη διάρκεια της ανθρώπινης ανάπτυξης, οι μεταγραφικοί παράγοντες λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες οι οποίοι ενεργοποιούν ή καταστέλλουν ειδικά γονίδια τα οποία με τη σειρά τους ρυθμίζουν τον κυτταρικό φαινότυπο. Το OCT3/4 γνωστό και ως OCT3, OCT4, OTF3 και POU5F1 ανήκει στην οικογένεια Pit-Oct-Unc μεταγραφικών παραγόντων, εκφράζεται στα ανθρώπινα εμβρυικά και βλαστικά κύτταρα και εμπλέκεται ως κύριος ρυθμιστής στην έναρξη, τη διατήρηση και τη διαφοροποίηση των αρχέγονων αδιαφοροποίητων κυττάρων καθώς και των γεννητικών κυττάρων κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης<sup>119,120</sup>. Η λειτουργία εκτελείται μέσω ρύθμισης κυττάρων στόχων. Το OCT4 (POUF1) γονίδιο εντοπίζεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 6p21.3 και καταστέλλεται



κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης του ενδοδέρματος και του μεσοδέρματος. Μετά την ένατη ημέρα ζωής η έκφραση του OCT3/4 είναι πρακτικά μη ανιχνεύσιμη στα σωματικά κύτταρα. Στους ενήλικες, η έκφραση του mRNA του OCT3/4 ανευρίσκεται στα αρχέγονα βλαστικά κύτταρα των γονάδων και στα ώριμα ωάρια αλλά απουσιάζει από τα κύτταρα του εγκεφάλου, της καρδιάς, του ήπατος, του σπλήνα, των γραμμωτών μυών, του πνεύμονα, των νεφρών και του παγκρέατος<sup>121,122,123,124</sup>. Αν και η ενεργοποίηση της έκφρασης του OCT3/4 και η μετάφραση δεν είναι κοινά γεγονότα στην κακοήθη εξαλλαγή, εντούτοις, η πρωτεΐνη ανευρίσκεται φυσιολογικά στα ανθρώπινα εμβρυικά κύτταρα και στους αδιαφοροποίητους όγκους που προκύπτουν από αυτούς.<sup>125,126</sup>

Η δράση του και η προσωρινή έκφραση αυτού του μεταγραφικού παράγοντα στην εμβρυογένεση, είναι περίπλοκη. Κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης, η έκφραση του OCT 3/4 εντοπίζεται μόνο στα γεννητικά κύτταρα στα αρχικά στάδια της διαφοροποίησης, σταδιακά καταστέλλεται όσο τα κύτταρα διαφοροποιούνται σε φυσιολογικά σπερματογόνια κατά τη διάρκεια του δεύτερου και τρίτου τριμήνου της κύησης και παραμένουν μόνο λίγα διάσπαρτα κύτταρα θετικά στο OCT 3/4, κατά τις πρώτες μέρες της ζωής<sup>120,127,128,129,130</sup>. Τα γεννητικά κύτταρα από ασθενείς με δυσγενετικές γονάδες (46XX/46XY), εξακολουθούν να εκφράζουν OCT 3/4 και μετά από τη γέννηση λόγω της καθυστερημένης διαφοροποίησης τους<sup>131</sup>. Στην πραγματικότητα, καθυστέρηση στην ωρίμανση των γεννητικών κυττάρων, που αναγνωρίζεται μεταξύ άλλων και με την ανοσοέκφραση στο OCT 3/4, έχει παρατηρηθεί και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις. Αυτές κυρίως σχετίζονται με ανωμαλίες των γονάδων, τις καλούμενες διαταραχές της ανάπτυξης του φύλου (disorders of sexual development-DSD)<sup>132</sup>. Συγκεκριμένα ασθενείς με δυσγενεσία των γονάδων και υποθηλεοποίηση (hyponirilization, απευαισθητοποίηση στα ανδρογόνα), παρουσιάζουν καθυστέρηση στην ωρίμανση των γεννητικών κυττάρων<sup>133</sup>. Η σωστή διάγνωση των κακοήθων αυτών κυττάρων είναι πολύ σημαντική σε αυτές τις περιπτώσεις γιατί αυτοί οι ασθενείς παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης TGCT<sup>134</sup>. Με βάση τις παρατηρήσεις της έκφρασης του OCT 3/4, βρέθηκε ότι τα εμβρυικά γεννητικά κύτταρα των ασθενών με τρισωμία 21 εμφανίζουν καθυστέρηση στην ωρίμανση και το γεγονός αυτό συμβαδίζει με τον γνωστό κίνδυνο αυτών των ασθενών για ανάπτυξη TGCT.

Το OCT 3/4 θεωρείται ένας σημαντικός παράγοντας ο οποίος κατευθύνει τη διαφοροποίηση προς συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές και διατηρεί την πολυδυναμικότητα των εμβρυικών αρχέγονων κυττάρων<sup>135,136</sup>. Συνεπώς, αφού το OCT 3/4 εκφράζεται φυσιολογικά στα ανθρώπινα αρχέγονα κύτταρα και στα γεννητικά κύτταρα, αναμένεται να εκφράζεται και στα νεοπλάσματα από γεννητικά κύτταρα.

Οι υπάρχοντες ποικίλοι τύποι ορχικών νεοπλασμάτων από γεννητικά κύτταρα εμφανίζουν διαφορετικούς βαθμούς διαφοροποίησης. Το OCT 3/4 έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζει την έκφραση ενός 1.5-kb εναλλακτικού PDGF- $\alpha$  υποδοχέα σε *in vitro* μελέτες που αφορούσαν σε ειδικούς τύπους ορχικών νεοπλασμάτων από γεννητικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων σεμινωμάτων και εμβρυικών καρκινωμάτων<sup>126,137</sup>. Τα σεμινώματα παρουσιάζουν το γονότυπο των πρώιμων γεννητικών κυττάρων και έτσι χαρακτηρίζονται από πολυδυναμικότητα. Τα εμβρυικά καρκινώματα είναι επίσης ενδογενώς πολυδύναμοι όγκοι. Έτσι οι δύο αυτοί τύποι νεοπλασμάτων από γεννητικά κύτταρα αναμένεται να εκφράζουν OCT 3/4. Άλλοι τύποι νεοπλασμάτων από γεννητικά κύτταρα, όπως ο όγκος του λεκιθικού

ασκού και το χοριοκαρκίνωμα (εξωεμβρυική διαφοροποίηση), καθώς και το ώριμο και το άωρο τεράτωμα (σωματική διαφοροποίηση), οι οποίοι είναι πιο διαφοροποιημένα νεοπλάσματα δεν αναμένεται να εκφράζουν αυτόν τον μεταγραφικό παράγοντα.

Έχουν πολλές και πολύ πρόσφατες μελέτες για τη διερεύνηση της έκφρασης του OCT 3/4 στους TGCTs σε ποικίλο αριθμό περιστατικών, οι οποίες συνοψίζονται στον Πίνακα 1. Σε όλες τις μελέτες, φαίνεται να επιβεβαιώνονται οι ανωτέρω υποθέσεις. Το OCT 3/4 αναδεικνύεται θετικό στην IGCNU, στα σεμινώματα, στα εμβρυικά καρκινώματα που εντοπίζονται στους όρχεις αλλά και εξωορχικά, στο δυσγερμίνωμα και το γοναδοβλάστωμα. Οι υπόλοιποι τύποι TGCTs δηλ. το τεράτωμα, ο όγκος του λεκιθικού ασκού, το χοριοκαρκίνωμα και το σπερματοκυτταρικό σεμίνωμα, είναι αρνητικοί για το OCT 3/4. Επιπρόσθετα, από όλους τους ερευνητές σχολιάζεται η υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα του δείκτη αυτού. Το OCT 3/4 φαίνεται να αντιπροσωπεύει ένα καινούριο ανοσοϊστοχημικό δείκτη για τους TGCTs, που θα αποτελέσει προσθήκη στην αυξανόμενη λίστα των μεταγραφικών παραγόντων. Η λίστα αυτή ήδη περιλαμβάνει πολύ χρήσιμους καθιερωμένους μεταγραφικοί παράγοντες, όπως είναι το TTF1 (thyroid transcription factor-1), το CDX2, η μυογενίνη και το myoD1, οι οποίοι θεωρούνται ειδικοί για συγκεκριμένα κύτταρα και νεοπλάσματα<sup>138</sup>. Ομοίως με τους υπόλοιπους μεταγραφικούς παράγοντες, η έκφραση του OCT 3/4 χαρακτηρίζεται από χρώση που εντοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου. Η ανοσοαντιδραστικότητα είναι γενικά διάχυτη, αφορά στο μεγαλύτερο ποσοστό των νεοπλασματικών κυττάρων και είναι έντονη. Αυτά τα χαρακτηριστικά κάνουν το OCT 3/4 ένα σχετικά απλό δείκτη που μπορεί εύκολα να εκτιμηθεί από τους παθολογοανατόμους.

**Πίνακας 1. Δημοσιεύσεις ευρημάτων της χρήσης του OCT 3/4 σε νεοπλάσματα από γεννητικά κύτταρα.**

Αναφορά	Μέθοδος	Σγ	A	EN	ΓΒ	ΣΕ	ΓΕ	ΔΓ	ΣΣ	EK	ΟΛΑ	ΩΤ	ΑΤ	ΧΚ	ΜΕΚ	ΜΣΕ
Looijenga et al <sup>125</sup>	AIX	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-					
Gidekel et al <sup>139</sup>	AIX	+	+		+					+						
Sperger et al <sup>140</sup>	Microarray					+				+	-					
Rajpert-Meyts et al <sup>131</sup>	AIX	-	+	+	+				-	+						
Jones et al <sup>141</sup>	AIX					+			-	+	-	-	-	-		
Almstrup et al <sup>142</sup>	Microarray		+			+				+						
Cheng et al <sup>143</sup>	AIX				+			+			-	-	-			
Cheng <sup>144</sup>	AIX														+	+
Jones et al <sup>145</sup>	AIX		+													
Jeroen de Jong et al <sup>146</sup>			+			+			-	+	-	-	-	-		

AIX= ανοσοϊστοχημεία, ΣγΑ= σπερματογόνια Α, EN=ενδοσωληναριακή νεοπλασία(IGCNU), ΓΒ= γοναδοβλάστωμα, ΣΕ= σεμίνωμα, ΓΕ= γερμίνωμα, ΔΓ= δυσγερμίνωμα, ΣΣ= σπερματοκυτταρικό σεμίνωμα, EK= εμβρυικό καρκίνωμα, ΟΛΑ= όγκος του λεκιθικού ασκού, ΩΤ= ώριμο τεράτωμα, ΑΤ= άωρο τεράτωμα, ΧΚ= χοριοκαρκίνωμα, ΜΕΚ= μεταστατικό εμβρυικό καρκίνωμα, ΜΣΕ= μεταστατικό σεμίνωμα.

Ο Cheng το 2004 σε μελέτη 62 περιστατικών αφαίρεσης οπισθοπεριτοναϊκών λεμφαδένων με μεταστατικό νεόπλασμα έδειξε ότι όλες οι περιπτώσεις σεμινώματος και εμβρυικού καρκινώματος εμφάνιζαν θετική έκφραση στο OCT 3/4. Αντιθέτως, κανένα μεταστατικό νεόπλασμα που δεν προέρχονταν από γεννητικά κύτταρα και κανένα λέμφωμα δεν ήταν θετικό στο OCT 3/4. Η έκφραση του ήταν παρόμοια με τα νεοπλάσματα από γεννητικά κύτταρα που προέρχονταν από τους όρχεις. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι το OCT 3/4 είναι ένας χρήσιμος δείκτης για να καθορισθεί η προέλευση από γεννητικά κύτταρα ενός μεταστατικού όγκου.

Επίσης, τα δεδομένα που καθιερώνει ο Cheng φαίνεται να έχουν εφαρμογή και στα μεταστατικά καρκινώματα με άγνωστη πρωτοπαθή εστία, που δεν είναι καθόλου ασυνήθη στην καθημερινά κλινική πράξη και αποτελούν το 3-5 % όλων των κακοήθων νεοπλασμάτων<sup>147,148</sup>. Εκτιμάται ότι ένα ποσοστό αυτών οφείλεται σε κλινικά λανθάνοντα (occult) πρωτοπαθή νεοπλάσματα από γεννητικά κύτταρα<sup>149,150</sup> και αν αυτό καθορισθεί, έχει σημαντική θεραπευτική αξία, αφού αυτά τα νεοπλάσματα ανταποκρίνονται στη χημειοθεραπεία με σισπλατίνη σε ποσοστό που ξεπερνάει το 80%<sup>151,152</sup>. Αν και τις περισσότερες φορές τα ιστολογικά χαρακτηριστικά ενός μεταστατικού νεοπλάσματος που προέρχεται από ένα λανθάνον πρωτοπαθές νεόπλασμα από γεννητικά κύτταρα είναι διακριτά, κάποιες άλλες φορές η μορφολογία προσομοιάζει με άλλα χαμηλής διαφοροποίησης κακοήθη νεοπλάσματα με διαφορετική προέλευση. Η ανοσοϊστοχημική διερεύνηση είναι απαραίτητη για την ταυτοποίηση αυτών των κακοηθειών.

Η ιστολογική διάγνωση των ορχικών νεοπλασμάτων συνήθως βασίζεται στην μορφολογία των κυττάρων. Η αναγνώριση όλων των στοιχείων ενός μικτού όγκου πολλές φορές είναι προβληματική αλλά προγνωστικά και θεραπευτικά σημαντική. Διαγνωστικές δυσκολίες μπορεί να προκύψουν για διάφορους λόγους, και ένας δείκτης ειδικός και με μεγάλη ευαισθησία, θα μπορούσε να αποτελεί μία ανεκτίμητη προσθήκη στην ήδη υπάρχουσα ομάδα των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων για τα νεοπλάσματα των όρχεων από γεννητικά κύτταρα. Οι καθιερωμένοι ανοϊστοχημικοί δείκτες, όπως είναι το PLAP, το CD117 και το CD30 είναι χρήσιμοι αλλά η διαγνωστική τους αξία υπόκειται σε περιορισμούς γιατί ενώ είναι ευαίσθητοι δεν είναι ειδικοί. Πολλά νεοπλάσματα που δεν προέρχονται από γεννητικά κύτταρα, όχι σπάνια εμφανίζουν θετική έκφραση στο PLAP<sup>153,154</sup>. Παράλληλα, το CD117 είναι θετικό σε μία ποικιλία επιθηλιακών νεοπλασμάτων, στους γνωστούς GIST και στο κακοήθες μελάνωμα<sup>155,156</sup>. Τέλος, το CD30 ανευρίσκεται θετικό σε αιματολογικά νοσήματα όπως στο αναπλαστικό λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα και στη νόσο Hodgkin, αλλά και σε ορισμένα καρκινώματα και στο μεσοθηλίωμα<sup>157,158</sup>.

#### 8.4.1.OCT 3/4 και IGCNU

Ασθενείς με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης TGCT, όπως είναι αυτοί με υπογονιμότητα (<20 εκατομύρια ανά mL ή/και ορχικό όγκο  $\leq 12$  mL), ετερόπλευρο όγκο, αμφοτερόπλευρη μικρολιθίαση, υποηχοϊκές περιοχές σε ορχικό υπέρηχο ή κρυψορχία (ακόμα και μετά από την ορχεοπηξία), υποβάλλονται σε ορχική βιοψία για τον καθορισμό της κατάστασης της σπερματογένεσης<sup>159,160</sup> και την ανεύρεση πιθανών εστιών IGCNU. Σε αρκετές περιπτώσεις τα αποτελέσματα είναι ψευδώς αρνητικά λόγω της ετερογενούς ανάπτυξης της IGCNU<sup>161,162</sup> αλλά και δυσκολίας της διάκρισης τους στις χρώσεις αιματοξυλίνης-ηωσίνης. Για την ανίχνευση των κυττάρων IGCNU χρησιμοποιήθηκαν στο παρελθόν οι δείκτες CD117(c-kit)<sup>163</sup> και PLAP<sup>164</sup>. Πολλές πρόσφατες μελέτες<sup>165,166,167,168,169</sup> επισημαίνουν τη σημασία του OCT 3/4 στη διάγνωση των εστιών IGCNU, τόσο σε παρακείμενες θέσεις διηθητικού νεοπλασματος όσο και σε ορχικές βιοψίες αφού σε όλες τις μελέτες αποδεικνύεται 100% ανοσοαντιδραστικότητα των κυττάρων με έντονη χρώση. Το PLAP συγκριτικά ήταν θετικό στο 93-98% των περιπτώσεων, με συνοδό όμως θετικότητα ολιγάριθμων μη νεοπλασματικών γεννητικών αλλά και των συγκυτιοτροφοβλαστικών κυττάρων.

Στη μελέτη του Cheng και συν<sup>143</sup>, μελετήθηκαν 157 ορχικές βιοψίες από ασθενείς που δεν είχαν υποψία ορχικού όγκου, η πλειοψηφία των οποίων γινόταν για λόγους υπογονιμότητας ή κρυψορχίας. Στους 6 ασθενείς βρέθηκαν κύτταρα θετικά στο OCT 3/4 μόνο στη μία περίπτωση ήταν διακριτή η μορφολογία IGCNU σε τομές αιματοξυλίνης-ηωσίνης που εξετάστηκαν σε κοινό μικροσκόπιο. Οι συγγραφείς συμπεραίνουν ότι η ανοσοϊστοχημεία με τη χρήση OCT 3/4 μπορεί να βοηθήσει στην αναγνώριση των πρώιμων μορφών διηθητικής νεοπλασίας από γεννητικά κύτταρα σε ασθενείς με παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη TGCT.

Δύο πρωτοποριακές μελέτες, των Høie-Hansen και συν<sup>170</sup> το 2007, και των Casteren και συν<sup>171</sup> το 2008, υποστηρίζουν ότι με τη βοήθεια του OCT 3/4 και με ανοσοκυτταροχημικές μεθόδους, είναι δυνατή η ανάδειξη των κυττάρων IGCNU σε σπέρμα. Οι παρατηρήσεις τους καταδεικνύουν ότι υφίσταται πιθανά ένα χρονικό παράθυρο κατά το οποίο τα κύτταρα IGCNU 'αποφολιδώνονται' και έτσι υπάρχει πιθανότητα έγκαιρης ανίχνευσης τους στο σπέρμα αντρών με αυξημένο κίνδυνο TGCT. Η εντόπιση των κυττάρων IGCNU στο σπέρμα, χωρίς τη χρήση ανοσοκυτταροχημείας, είναι δύσκολη για τους εξής λόγους: 1) στα πρώιμα στάδια τα νεοπλασματικά κύτταρα δεν αποφολιδώνονται εύκολα γιατί έχουν στενή σύνδεση με τα κύτταρα Sertoli. Μπορεί πιθανά να υπάρχει ένα χρονικό παράθυρο μεταξύ του πρώιμου σταδίου και του σταδίου όπου τα νεοπλασματικά κύτταρα γεμίζουν και αποφράζουν τα σπερματικά σωληνάκια 2) τα κύτταρα αυτά μπορεί περνώντας διαμέσου του ανδρικού γεννητικού σωλήνα να εμφανίσουν αλλοιώσεις στη μορφολογία και έτσι να μην αναγνωριστούν ως νεοπλασματικά 3) στο σπέρμα απουσιάζουν οι παρακείμενοι ιστοικοί σχηματισμοί ανάμεσα στους οποίους τα κύτταρα IGCNU είναι ευδιάκριτα. Έτσι η διάγνωση IGCNU σε σπέρμα εξαρτάται ολοκληρωτικά από ανοσοκυτταροχημικές μεθόδους.

Στον Πίνακα 2 φαίνονται συνοπτικά η έκφραση των διαφόρων ανοσοϊστοχημικών δεικτών για τον κάθε τύπο TGCT καθώς και στην IGCNU.

**Πίνακας 2. Ανοσοϊστοχημεία στα νεοπλάσματα των όρχεων από γεννητικά κύτταρα**

	AE1/AE 3	Cam5.2	PLAP	OCT3/4	AFP	hcG	Ckit	CD30	Vim
Σεμίνωμα	Π	Π	+	+	-	-	+	-	Π
Σπ. Σεμίνωμα	-	Π	-	-	-	-	Π	-	-
Εμβρυικό Ca	+	+	-	+	Π	-	-	+	-
Όγκ.λεκιθικού ασκού	+	+	+	-	Π	-	-	-	-
Χοριοκαρκίνωμα	+	+	+	-	-	+	-	-	Π
IGCNU	-	-	+	+	-	-	+	-	+

Π: η έκφραση του δείκτη ποικίλλει (μεταξύ 20-80% των περιπτώσεων)



## **Β.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1. ΣΚΟΠΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Οι σκοποί της παρούσας μελέτης ήταν

1. Η μελέτη των διαφόρων ανοσοϊστοχημικών δεικτών οι οποίοι χρησιμοποιούνται στην παθολογοανατομική διάγνωση των νεοπλασμάτων των όρχεων από γεννητικά κύτταρα
2. Η εκτίμηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του OCT 3/4 σε νεοπλάσματα των όρχεων από γεννητικά κύτταρα
3. Η συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του OCT 3/4 με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των νεοπλασμάτων αυτών
4. Η εκτίμηση της διαγνωστικής αξίας του OCT 3/4



## 2. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. Ασθενείς

Μελετήθηκαν 68 άρρενες ασθενείς (μέσης ηλικίας 30,3 έτη, εύρος 18-62 έτη) με νεόπλασμα του όρχεως από γεννητικά κύτταρα οι οποίοι χειρουργήθηκαν στην Ουρολογική Κλινική του Αντικαρκινικού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης «Θεαγένειο» από το 1998-2005, χωρίς να έχει προηγηθεί οποιαδήποτε θεραπεία (Πίνακας 1).

**Πίνακας 1.** Δημογραφικά δεδομένα ασθενών με TGCT

A/α	Ασθενής	Ηλικία	Τύπος TGCT
1	ΜΧ	24	Σεμίνωμα
2	ΠΑ	40	Σεμίνωμα
3	ΜΓ	19	Εμβρυικό Ca
4	ΛΜ	45	Σεμίνωμα
5	ΛΚ	19	Μικτό
6	ΜΑ	32	Μικτό
7	ΘΜ	29	Σεμίνωμα
8	ΤΧ	32	Μικτό
9	ΝΜ	25	Μικτό
10	ΤΔ	24	Τεράτωμα
11	ΚΠ	38	Σεμίνωμα
12	ΤΕ	43	Σεμίνωμα
13	ΚΘ	27	Εμβρυικό Ca
14	ΠΣ	50	Σεμίνωμα
15	ΧΔ	33	Μικτό
16	ΚΑ	34	Σεμίνωμα
17	ΤΧ	33	Σεμίνωμα
18	ΚΚ	33	Μικτό
19	ΣΑ	43	Σεμίνωμα
20	ΜΔ	32	Μικτό
21	ΖΕ	38	Σεμίνωμα
22	ΜΜ	35	Σεμίνωμα
23	ΦΛ	18	Εμβρυικό Ca
24	ΚΣΜ	32	Εμβρυικό Ca
25	ΜΓ	33	Σεμίνωμα
26	ΤΑ	29	Μικτό
27	ΠΓ	26	Σεμίνωμα
28	ΝΠ	40	Σεμίνωμα
29	ΚΑ	27	Μικτό
30	ΠΑ	21	Εμβρυικό Ca
31	ΠΙ	62	Μικτό
32	ΚΛ	20	Μικτό
33	ΑΑ	26	Σεμίνωμα
34	ΣΚ	19	Μικτό
35	ΙΕ	28	Σεμίνωμα

36	ΣΑ	36	Σεμίνωμα
37	ΤΓ	35	Σεμίνωμα
38	ΚΑ	29	Μικτό
39	ΝΔ	35	Όγκος λεκ. ασκού
40	ΧΤ	23	Μικτό
41	ΑΚ	30	Σεμίνωμα
42	ΑΙ	37	Μικτό
43	ΝΚ	19	Μικτό
44	ΑΖ	26	Εμβρυικό Ca
45	ΓΞ	25	Σεμίνωμα
46	ΚΦ	28	Σεμίνωμα
47	ΛΚ	31	Σεμίνωμα
48	ΟΕ	23	Μικτό
49	ΦΓ	27	Σεμίνωμα
50	ΑΣ	28	Σεμίνωμα
51	ΕΔ	20	Εμβρυικό Ca
52	ΦΙ	39	Σεμίνωμα
53	ΓΜ	24	Τεράτωμα
54	ΔΜ	18	Μικτό
55	ΛΣ	19	Μικτό
56	ΑΧ	32	Σεμίνωμα
57	ΛΠ	28	Μικτό
58	ΚΓ	20	Εμβρυικό Ca
59	ΤΟ	26	Σεμίνωμα
60	ΓΠ	33	Μικτό
61	ΚΝ	39	Σεμίνωμα
62	ΜΓ	21	Τεράτωμα
63	ΚΧ	35	Σεμίνωμα
64	ΜΙ	40	Σεμίνωμα
65	ΑΣ	34	Μικτό
66	ΚΝ	41	Σεμίνωμα
67	ΤΝ	23	Τεράτωμα
68	ΧΔ	30	Σεμίνωμα

## 2.2 Ιστολογική εξέταση

Όλα τα χειρουργικά παρασκευάσματα στέλλονταν νωπά στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του ιδίου Νοσοκομείου και μετά τη μονιμοποίηση τους σε διάλυμα φορμόλης 10%, λαμβάνονταν τομές οι οποίες επεξεργάζονταν και ακολουθούσε εγκλεισμός τους σε παραφίνη.

Στη μακροσκοπική περιγραφή αναφέρονταν οι ακριβείς διαστάσεις, η χροιά, η σύσταση του όγκου αλλά και η παρουσία νέκρωσης ή αιμορραγίας.

Ο συμβατικός έλεγχος σε τομές αιματοξυλίνης-ηωσίνης (H&E) περιελάμβανε τον ιστολογικό τύπο του νεοπλάσματος, την τυχόν επέκταση του στο rete testis, στους χιτώνες του όρχεως ή την επιδιδυμίδα, την συνύπαρξη εστιών IGCNU, την ύπαρξη νεοπλασματικής διήθησης λεμφαγγείων ή αιμοφόρων αγγείων, την παρουσία νεκρώσεων καθώς επίσης και την κατάσταση των χειρουργικών ορίων εκτομής. Στις περιπτώσεις των μικτών όγκων

αναφέρονταν τα διάφορα συστατικά και το ποσοστό που καταλάμβαναν στο σύνολο της μάζας του όγκου.

### 2.3. Ανοσοϊστοχημικός έλεγχος

Από το κάθε περιστατικό επιλέγεται ο αντιπροσωπευτικότερος κύβος παραφίνης για να μελετηθεί με ανοσοϊστοχημική μέθοδο. Στους μικτούς όγκους γίνεται προσπάθεια επιλογής κύβου που να περιλαμβάνει όλα τα συστατικά τους και αν αυτό δεν είναι εφικτό τότε επιλέγονται δύο κύβοι παραφίνης.

Η ανοσοϊστοχημική μέθοδος βασίζεται στην υψηλή συγγένεια της βιοτίνης προς την αβιδίνη για τη δέσμευση της υπεροξειδάσης στο πρωταρχικό αντίσωμα. Χαρακτηριστικό γνώρισμα της μεθόδου είναι η σύνδεση αντισωμάτων με το ένζυμο υπεροξειδάση. Η αβιδίνη είναι μία γλυκοπρωτεΐνη, προέρχεται από το λευκό του αυγού και έχει μεγάλη τάση σύνδεσης (4 συνδετικές θέσεις ανά μόριο). Η βιοτίνη είναι βιταμίνη με χαμηλό μοριακό βάρος και βρίσκεται στη λέκιθο του αυγού.

Ο ανοσοϊστοχημικός έλεγχος στο νεοπλασματικό ιστό με το πολυκλωνικό αντίσωμα OCT 3/4 πραγματοποιούνταν ως εξής:

Οι ιστολογικές τομές από κύβους παραφίνης, πάχους 4μm σε θετικά φορτισμένες αντικειμενοφόρες πλάκες, τοποθετούνταν σε κλίβανο, σε θερμοκρασία 58° -60° C για 2 ώρες τουλάχιστον ή για όλη τη νύχτα. Μετά την αποπαραφίνωση των τομών με ξυλόλη και την ενυδάτωση με αιθανόλη, ακολουθούσε η έκπλυσή τους με απεσταγμένο νερό και η προετοιμασία σε φούρνο μικροκυμάτων σε 700 Watt για 30 λεπτά. Ακολουθούσε η έκπλυση με απεσταγμένο νερό και η τοποθέτησή τους σε συσκευή αυτόματου συστήματος ανοσοϊστοχημείας (Bondvision System 1CH/ISH Staining Module), στην οποία για την εξουδετέρωση της ενδογενούς υπεροξειδάσης χρησιμοποιούνταν διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου για 8 λεπτά. Στη συνέχεια η διαδικασία περιλάμβανε έκπλυση με ειδικό διάλυμα (Phosphate-Buffered saline, PBS), επώαση των τομών με 100 μl ειδικού πολυκλωνικού αντισώματος OCT 3/4 (Spring), σε αραίωση 1:40, επί 32 λεπτά σε θερμοκρασία 37° C. Ακολούθησε έκπλυση και επώαση με ενισχυτικό διάλυμα (Avidin+Biotinylated horseradish peroxidase complex) επί 8 λεπτά για ενίσχυση της έντασης της χρώσης. Ακολούθησε επώαση με διάλυμα γλουταραλδευδης, έκπλυση και επώαση με δευτερογενές αντίσωμα (37°C επί 8 λεπτά), ακολουθούμενη, μετά από έκπλυση, από επώαση με χρωμογόνο 3,3 διαμινοβενζιδίνη (Diaminobenzidine, DAB), έκπλυση με ARKWASH Buffer και χρώση με αιματοξυλίνη Harris για 4 min σε 37° C, έκπλυση με ARKWASH Buffer και διαφοροποίηση με αντιδραστήριο, έκπλυση με νερό βρύσης, αφυδάτωση και επικάλυψη των τομών.

#### 2.4. Εκτίμηση των ανοιστοχημικών χρώσεων

Η ανοσοϊστοχημική μελέτη των ορχικών νεοπλασμάτων είχε δύο σκέλη. Πρωταρχικά, εξετάστηκαν εκ νέου οι καθιερωμένοι ανοσοϊστοχημικοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ως ρουτίνα για τη διάγνωση (PLAP, CD117, CD30) και ακολούθως έγινε συσχέτιση τους με τα κλινικά δεδομένα των ασθενών.

Σε δεύτερο χρόνο, προσδιορίστηκε σε όλα τα περιστατικά ο δείκτης OCT 3/4. Το OCT 3/4 είναι, όπως αναφέρθηκε, πυρηνικός μεταγραφικός δείκτης και έτσι μόνο η πυρηνική χρώση θεωρείται θετική χρώση. Όλες οι τομές εξετάστηκαν και βαθμολογήθηκαν σε κοινό μικροσκόπιο. Η εκτίμηση της χρώσης έγινε με το ακόλουθο σύστημα βαθμολόγησης: ένταση χρώσης 0 (αρνητική), +1 (ήπια), +2 (μέτρια), +3 (έντονη). Η έκταση της χρώσης, ανάλογα με το ποσοστό των κυττάρων με θετική χρώση στον πυρήνα σε σχέση με τη συνολική έκταση του νεοπλασματικού ιστού βαθμολογήθηκε με 0 (0%), 1 (1-25%), 2 (26-50%), 3 (51-75%) και 4 (76-100%). Το άθροισμα των βαθμολογιών της έντασης και της έκτασης της χρώσης χρησιμοποιήθηκε ως τελικός βαθμός (κλίμακα 0-7) για το OCT 3/4. Η σχετικά απλή και αναπαραγώγιμη αυτή μέθοδος που επιτρέπει βέλτιστη συμφωνία μεταξύ ανεξάρτητων εκτιμητών, έχει χρησιμοποιηθεί και σε άλλες μελέτες και για άλλους δείκτες<sup>141,142</sup>. Για την στατιστική ανάλυση, οι όγκοι με τελικό βαθμό χρώσης  $\geq 3$  θεωρήθηκαν θετικοί.

#### 2.5. Κλινικά δεδομένα ασθενών-Μετεγχειρητική παρακολούθηση

Μετά την ιστολογική ταυτοποίηση του όγκου ακολουθούσε σταδιοποίηση των όγκων, η οποία καθορίζεται από την εντόπιση του νεοπλάσματος, την ύπαρξη λεμφαδενικών ή απομακρυσμένων μεταστάσεων και έγινε με βάση το ακόλουθο σύστημα TNM<sup>143,144</sup>.

##### Πίνακας 2. Σταδιοποίηση των νεοπλασμάτων των όρχεων κατά WHO

Στάδιο I: Νεόπλασμα εντοπισμένο στον όρχι χωρίς απόδειξη μεταστάσεων

Στάδιο II: Με λεμφαδενικές μεταστάσεις

IIA: Διάμετρος μεταστάσεων  $\leq 2$  εκ.

IIB: Διάμετρος μεταστάσεων 2-5 εκ.

IIIC: Διάμετρος μεταστάσεων  $> 5$  εκ.

Στάδιο III: Με απομακρυσμένες μεταστάσεις

Στους ασθενείς με σεμίνωμα σταδίου I,IIA και IIB εφαρμοζόταν μετά την εγχείρηση ακτινοθεραπεία(adjunctant radiotherapy) στους παραορτικούς λεμφαδένες αμφοτερόπλευρα και στους σύστοιχους πυελικούς, λαγόνιους και βουβωνικούς, με στόχο την εξάλειψη των μικρομεταστάσεων. Σε περίπτωση υποτροπής ακολουθούσε χημειοθεραπεία. Οι ασθενείς με σεμίνωμα σταδίου IIC και III υποβάλλονταν εξαρχής σε χημειοθεραπεία με βάση τη σισπλατίνη (ΒΕΡ-σισπλατίνη, μπλεομυκίνη, ετοποσίδη).

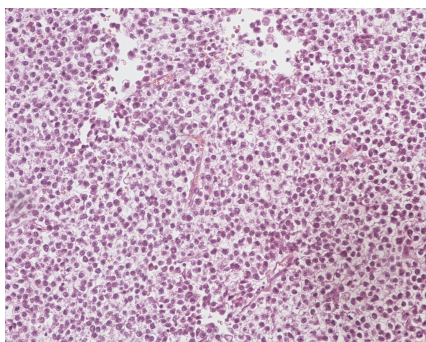
Στους ασθενείς με μη σεμινωμάτωδη νεοπλάσματα σταδίου I, εάν οι δείκτες ήταν φυσιολογικοί ακολουθούσε μόνο παρακολούθηση ή, αν ειδικά οι ορολογικοί δείκτες (LDH, PLAP, AFP, β-hCG) ήταν ανεβασμένοι, δύο κύκλοι προφυλακτικής χημειοθεραπείας. Σε πιο προχωρημένα στάδια, οι ασθενείς υποβάλλονταν σε 4-6 κύκλους χημειοθεραπείας. Αν στη συνέχεια παρέμενε υπολειμματική νόσος ακολουθούσε χειρουργική αφαίρεση και συμπληρωματική χημειοθεραπεία.

Όλοι οι ασθενείς μετά το τέλος της χημειοθεραπείας, όπως και αυτοί που δεν υποβλήθηκαν σε χημειοθεραπεία μετεγχειρητικά, ήταν σε τακτική παρακολούθηση στην Ογκολογική Κλινική, με κλινική εξέταση, αιματολογικές και βιοχημικές εξετάσεις για προσδιορισμό των δεικτών LDH, PLAP, AFP, β-hCG, αλλά και απεικονιστικές εξετάσεις(απλή ακτινογραφία θώρακα και αξονική τομογραφία κοιλιάς), ανά τρίμηνο τον πρώτο χρόνο, ανά εξάμηνο τον δεύτερο και με την πάροδο των ετών αραιότερα, ανάλογα και με τα αποτελέσματα.

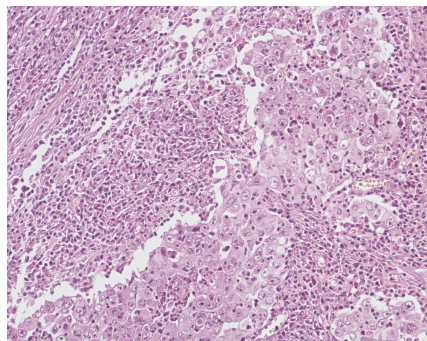
Σημειώνεται επίσης, ότι προεγχειρητικά σχεδόν όλοι οι ασθενείς, αφού οι περισσότεροι ήταν νεαροί και ενδιαφέρονταν για μελλοντική τεκνοποίηση, κατάθεταν σπέρμα για συντήρηση στην τράπεζα σπέρματος.

### 3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

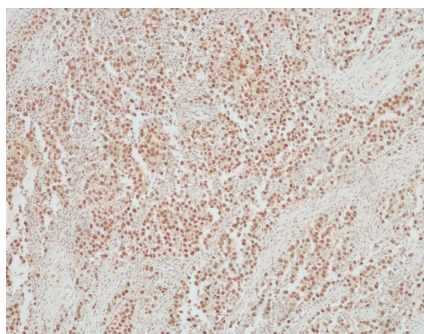
Οι ιστολογικοί τύποι των νεοπλασμάτων των όρχεων από γεννητικά κύτταρα που μελετήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 3 και παραστατικά στο Σχήμα 1. Από αυτά περίπου τα μισά(33) ήταν σεμινώματα και τα υπόλοιπα ήταν μη σεμινωμάτωση νεοπλάσματα και περιελάμβαναν, 22 μικτούς όγκους διαφόρων συνδυασμών, 8 αμιγή εμβρυικά καρκινώματα, 4 τερατώματα και 1 όγκο του λεκιθικού ασκού. Νεοπλάσματα της ομάδας του σπερματοκυτταρικού σεμινώματος και του αμιγούς χοριοκαρκινώματος δεν περιλαμβάνονται στην παρούσα μελέτη διότι δεν παρατηρήθηκαν στο χρονικό διάστημα 1998-2005 στο συγκεκριμένο Νοσοκομείο. Το χοριοκαρκίνωμα παρατηρείται μόνο ως συστατικό σε 3 από τους μικτούς όγκους που μελετήθηκαν.



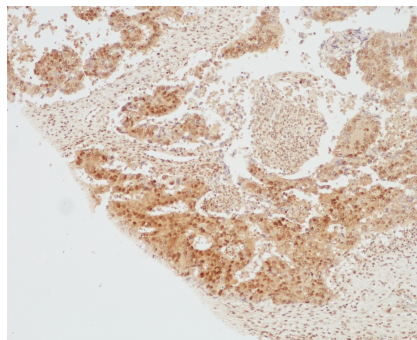
Εικόνα 1. Σεμίνωμα (HE)



Εικόνα 2. Εμβρυικό καρκίνωμα (HE)



Εικόνα 3. Σεμίνωμα-OCT 3/4

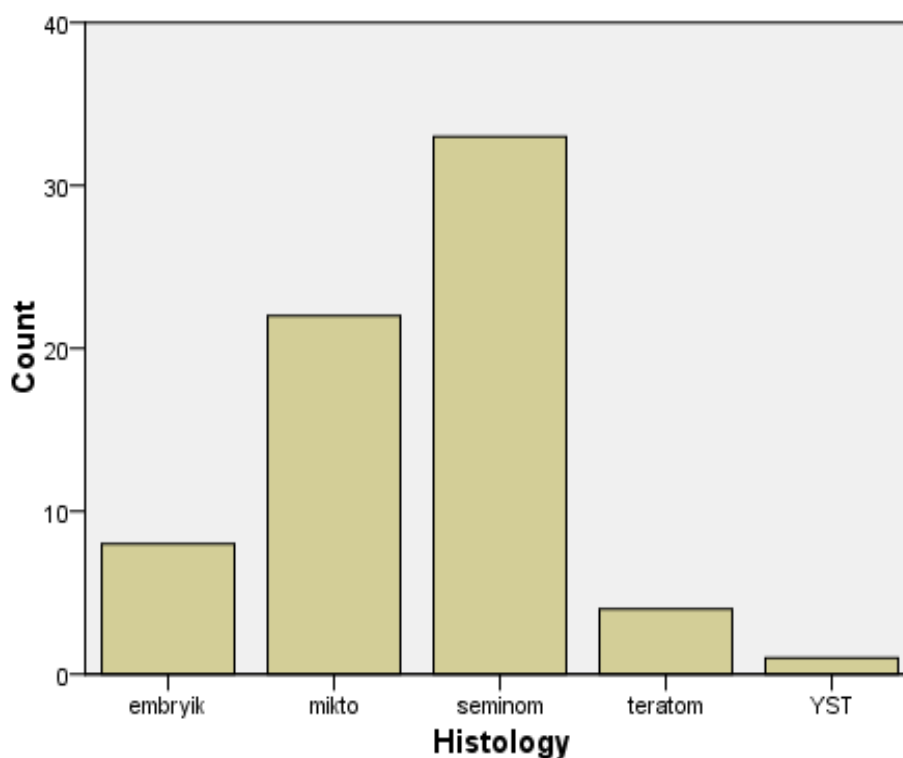


Εικόνα 4.Εμβρυικό καρκίνωμα -OCT 3/4

Σημειώνεται ότι χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης PASW Statistics Data Document 2009 το οποίο αναγνωρίζει μόνο λατινικούς χαρακτήρες.

**Πίνακας 3.** Ιστολογικοί τύποι ασθενών της μελέτης

Τύπος TGCT	Αριθμός ασθενών (N=68) %
Σεμίνωμα	33 (49%)
Μικτό νεόπλασμα	22 (32%)
Εμβρυικό καρκίνωμα	8 (12%)
Τεράτωμα	4 (6%)
Όγκος του λεκιθικού ασκού	1 (1%)

**Σχήμα 1.** Ιστόγραμμα ιστολογικών τύπων ασθενών μελέτης. Αριθμός περιπτώσεων ανά τύπο TGCT.

Από τα 33 σεμινώματα, τα 27 ήταν τυπικά(κλασικά), στα 5 παρατηρήθηκαν εστίες με συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα ενώ το ένα χαρακτηριζόταν από αυξημένο αριθμό μιτώσεων (9/ΜΟΠ). Όσον αφορά στα τερατώματα, τα 3 αποτελούνταν από ώριμους ιστούς και από τα τρία βλαστικά δέρματα ενώ το ένα εμφάνιζε σωματικού τύπου κακοήθεια με τη μορφή της εξαλλαγής προς αδenoκαρκίνωμα. Οι μικτοί όγκοι παρουσίαζαν ποικιλομορφία

στα συστατικά τους, όπως φαίνεται στον Πίνακα 4, αλλά και στο ποσοστό που καταλάμβανε το κάθε συστατικό στο σύνολο της μάζας του νεοπλάσματος. Εμβρυικό καρκίνωμα και τεράτωμα ήταν ο συχνότερος συνδυασμός που παρατηρήθηκε στους μικτούς όγκους.

**Πίνακας 4.** Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά όγκων

Σεμίνωμα	33 (49%)
Κλασικό	27 (38%)
Με συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτ.	5 (7%)
Σπερματοκυτταρικό	-
Με αυξημένο αριθμό μιτώσεων(>6/ΜΟΠ)	1 (1%)
Μη σεμινωματώδη νεοπλάσματα	35 (51%)
Αμιγή μη σεμινωματώδη νεοπλάσματα	13 (19%)
Εμβρυικό καρκίνωμα	8 (12%)
Όγκος λεκιθικού ασκού	1 (1%)
Χοριοκαρκίνωμα	-
Τεράτωμα	4 (6%)
Ώριμο	3 (4%)
Με σωματικού τύπου κακοήθεια	1 (1%)
Μικτοί όγκοι	22 (32%)
Εμβρυικό Ca+ Τεράτωμα	7 (10%)
Σεμίνωμα+ Τεράτωμα	2 (3%)
Σεμίνωμα+ Εμβρυικό Ca + Τεράτωμα	5 (7%)
Σεμίνωμα+ Εμβρυικό Ca	5 (7%)
ΧοριοCa +Εμβρυικό Ca+Τεράτωμα	2 (3%)
ΧοριοCa+ Εμβρυικό Ca	1 (1%)

Τα επιδημιολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών παρατίθενται στον Πίνακα 5. Υποτροπή με την έννοια της μετάστασης εμφάνισαν 9 ασθενείς κατά τη μετεγχειρητική διάρκεια παρακολούθησης. Από αυτούς ο ένας ήταν ασθενής με σεμίνωμα και οι υπόλοιποι



8 ασθενείς με μη σεμινωμάτωδη νεοπλάσματα, οι 3 με εμβρυικό καρκίνωμα και οι 5 με μικτό όγκο. Οι 6 υποτροπές συνέβησαν μέσα στα επόμενα 2 χρόνια από την ορχεκτομή. Σε ακτινοθεραπεία υποβλήθηκαν 25 ασθενείς με σεμίνωμα αρχικού σταδίου (12 σταδίου I, 7 σταδίου IIA και 6 σταδίου IIB) και σε χημειοθεραπεία, θεραπευτική και συμπληρωματική, οι υπόλοιποι 43 ασθενείς με προχωρημένου σταδίου σεμίνωμα (6 σταδίου IIC και 2 σταδίου III), όλοι οι ασθενείς με μη σεμινωμάτωδες νεόπλασμα. Απεβίωσαν οι 5 (7%) κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης (εύρος μέσου χρόνου παρακολούθησης 4-11 χρόνια).

**Πίνακας 5.** Επιδημιολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών

Ασθενείς	N:68
Ηλικία(έτη)	
Μέση	30,3
Εύρος	18-62
Υποτροπή όγκου (%)	9 (13%)
Χημειοθεραπεία (%)	39 (57%)
Ακτινοθεραπεία (%)	29 (43%)
Θάνατοι(%)	5 (7%)

Τα επί μέρους χαρακτηριστικά των όγκων συνοψίζονται στον Πίνακα 5. Από την άποψη της εντόπισης του πρωτοπαθούς όγκου, οι 32 ασθενείς εμφάνιζαν προσβολή του δεξιού όρχεως και οι 36 του αριστερού. Ως προς το μέγεθος των όγκων, η μέση διάμετρος, όπως εκτιμήθηκε κατά τη μακροσκοπική εξέταση των χειρουργικών παρασκευασμάτων στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο, ανερχόταν σε 5,1 cm(εύρος: 1,1 - 9 cm). Αξιοσημείωτο είναι ότι στις 46 περιπτώσεις (68%), παρατηρήθηκαν στο ορχικό παρέγχυμα παρακείμενα του όγκου, εστίες IGCNU. Επέκταση του νεοπλάσματος στο rete testis (ορχικό σωληναριακό δίκτυο) παρατηρήθηκε σε 31 ασθενείς. Σε 26 περιπτώσεις αναγνωρίστηκαν νεοπλασματικά έμβολα σε αγγειακούς χώρους και σε 42, νεκρώσεις στο υπόστρωμα του νεοπλάσματος. Όσον αφορά τη σταδιοποίηση κατά TNM, 22 περιστατικά χαρακτηρίστηκαν σταδίου I, 25 περιστατικά σταδίου IIA, 12 περιστατικά σταδίου IIB, 4 περιστατικά σταδίου IIC και 7 περιστατικά σταδίου III.

**Πίνακας 5.** Χαρακτηριστικά στοιχεία των όγκων

<b>Χαρακτηριστικά όγκου</b>	<b>N(%)</b>
Εντόπιση	
Δεξιά	32
Αριστερά	36
Μέγεθος/Εύρος (cm)	5,1/1,1-9
Συνύπαρξη με IGCNU	46 (68%)
Επέκταση στο rete testis	31 (46%)
Διήθηση αγγείων-λεμφαγγείων	26 (38%)
Νεκρώσεις	42 (62%)
Διήθηση (T)	
pT1	35 (51%)
pT2	26 (38%)
pT3	7 (10%)
pT4	-
Διήθηση λεμφαδένων (N)	
N0	50 (74%)
N1	16 (24%)
N2	2 (3%)
N3	-
Μεταστάσεις (M)	
M0	61 (90%)
M1	7 (10%)
Στάδιο TNM (κατά WHO)	
I	22 (32%)
IIA	25 (37%)

IIB	10 (15%)
IIC	4 (6%)
III	7 (10%)

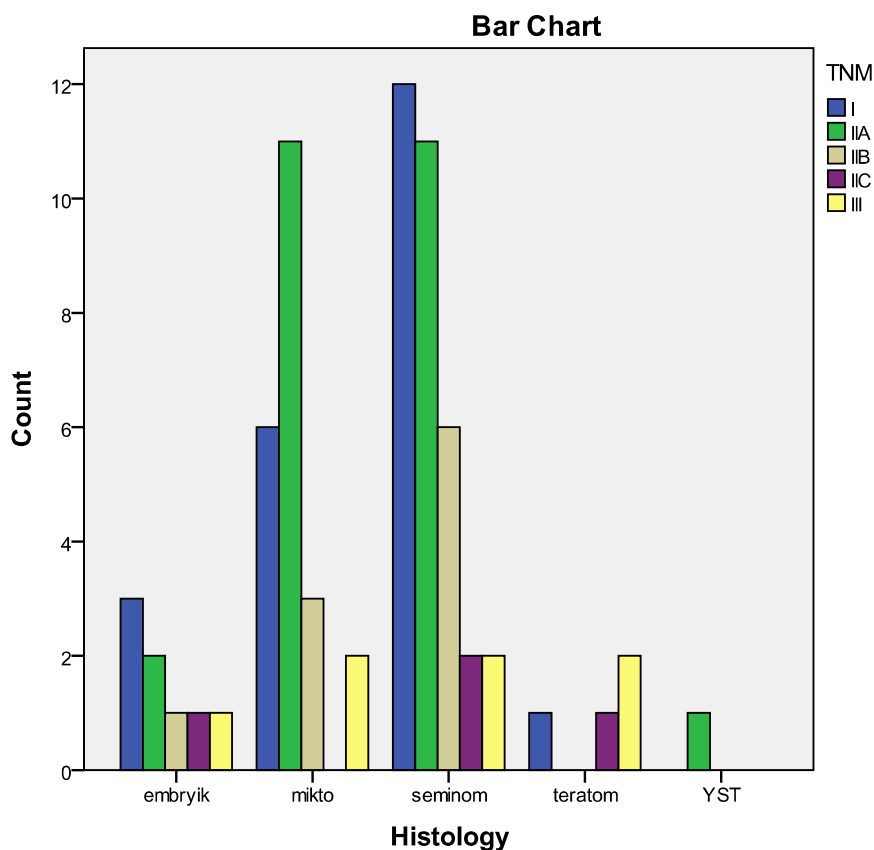
Στον Πίνακα 6 φαίνεται ο αριθμός των περιστατικών - σεμινωμάτων και των μη σεμινωματωδών νεοπλασμάτων - ανά στάδιο νόσου TNM. Στο σχήμα 2 φαίνεται η σχηματική απεικόνιση των ιστολογικών τύπων των περιστατικών σε σχέση με το στάδιο νόσου κατά TNM. Παρατηρούμε ότι οι περισσότεροι ασθενείς με στάδιο νόσου I (12/22, 56%) είχαν σεμίνωμα.

**Πίνακας 6.** Αριθμός σεμινωμάτων και μη σεμινωματωδών νεοπλασμάτων ανά στάδιο TNM

Στάδιο TNM	Σεμίνωμα	Μη σεμινωματώδες νεόπλ.
I	12	10
IIA	11	14
IIB	6	4
IIC	2	2
III	2	5

#### Histology \* TNM Crosstabulation

Count		TNM					Total
		I	IIA	IIB	IIC	III	
Histology	embryik	3	2	1	1	1	8
	mikto	6	11	3	0	2	22
	seminom	12	11	6	2	2	33
	teratom	1	0	0	1	2	4
	YST	0	1	0	0	0	1
Total		22	25	10	4	7	68



### 3.1. Ανοσοϊστοχημική έκφραση OCT 3/4

Το OCT 3/4 είναι πυρηνικός μεταγραφικός δείκτης και έτσι σε όλα τα περιστατικά μόνο τα νεοπλασματικά κύτταρα με πυρηνική χρώση προσμετρούνται ως θετικά.

Σεμινώματα: Από τα 33 σεμινώματα, στα 32 η έκταση της χρώσης στους όγκους αφορούσε ποσοστό κύτταρων >75%. Η ένταση της χρώσης χαρακτηρίστηκε μέτρια σε 5 και έντονη σε 28 σεμινώματα. Από τα ανωτέρω συμπεραίνουμε ότι η έκφραση του OCT 3/4 ήταν θετική (βαθμός κλίμακας 3-7) σε όλα τα σεμινώματα. Παράλληλα, θετική ήταν η έκφραση και στο σεμινωματώδες συστατικό των 12 από τους μικτούς όγκους που το περιείχαν. Έτσι, στο σύνολο το σεμινωματώδες στοιχείο εμφανίζει 6,8 μέση τιμή του βαθμού κλίμακας της υπερέκφρασης του OCT 3/4.

Μη σεμινωματώδη νεοπλάσματα: Από τα 8 εμβρυικά καρκινώματα, στα 6 η ένταση της χρώσης αφορούσε ποσοστό κυττάρων >75%. Η ένταση της χρώσης χαρακτηρίστηκε μέτρια σε 3 και έντονη σε 5 εμβρυικά καρκινώματα. Από τους 20 μικτούς όγκους που εμφάνιζαν το εμβρυικό καρκίνωμα ως συστατικό, στους 16 η ένταση της χρώσης ήταν έντονη και στους 4 μέτρια. Από τα ανωτέρω διαφαίνεται ότι η έκφραση του OCT 3/4 ήταν θετική σε όλες τις περιπτώσεις αμιγούς εμβρυικού καρκινώματος αλλά και στους μικτούς όγκους με εμβρυικό στοιχείο ( μέση τιμή βαθμού κλίμακας υπερέκφρασης του OCT 3/4 στο εμβρυικό στοιχείο

6,6). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι σε ορισμένους όγκους με εμβρυικό στοιχείο, επιπρόσθετα με την πυρηνική χρώση παρατηρήθηκε εστιακή διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση. Εντούτοις, σε καμία περίπτωση εμβρυικού καρκινώματος (ή εμβρυικού στοιχείου σε μικτό όγκο) δεν παρατηρήθηκε αποκλειστικά κυτταροπλασματική χρώση με απουσία πυρηνικής χρώσης, θεωρείται ότι η ταυτόχρονη έκφραση του OCT 3/4 στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα σε ορισμένα κύτταρα του εμβρυικού καρκινώματος, να αποτελεί ένα ενδογενές χαρακτηριστικό αυτού του νεοπλάσματος.

Στις περιπτώσεις των μικτών όγκων υπήρχε σαφές και διακριτό όριο της μετάβασης των νεοπλασματικών κυττάρων με θετική έκφραση και αυτών με αρνητική.

Σε όλες τις περιπτώσεις (46) στις οποίες αναγνωρίστηκαν εστίες IGCNU στο παρακείμενο ορχικό παρέγχυμα, τα κύτταρα αυτά, πρακτικά στο σύνολο τους, εμφάνιζαν έντονη έκφραση του OCT 3/4.

Στη μία περίπτωση του όγκου του λεκιθικού ασκού, σε όλα τα τερατώματα, στο χοριοκαρκίνωμα ως συστατικό σε 3 μικτούς όγκους, στα συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα που συνυπήρχαν σε 5 από τα σεμινώματα αλλά και στο παρακείμενο των όγκων φυσιολογικό ορχικό παρέγχυμα παρατηρήθηκε απουσία της έκφρασης του OCT 3/4.

Επίσης, αρνητικά για το OCT 3/4 ήταν και 5 νεοπλάσματα των όρχεων που δεν προέρχονταν από γεννητικά κύτταρα, δύο λεμφώματα Β-κυτταρικής αρχής, ένα όγκο από κύτταρα Sertoli, ένα όγκο από κύτταρα Leydig και ένα μεταστατικό νεόπλασμα από καρκίνωμα του προστάτη αδένου.

Στον Πίνακα 7 φαίνονται τα χαρακτηριστικά της χρώσης OCT 3/4 ως προς την έκταση και την ένταση της, στα σεμινώματα και στο σεμινωματώδες στοιχείο των μικτών όγκων.

**Πίνακας 7.** Ένταση και έκταση της χρώσης OCT 3/4 στα σεμινώματα και στο σεμνωματώδες στοιχείο των μικτών όγκων (N=33+12)

---

**Έκταση OCT 3/4**

0	0
1	0
2	0
3	1
4	44

**Ένταση OCT 3/4**

0	0
1	0
2	5
3	40

**Βαθμός κλίμακας έκφρασης OCT 3/4**

Μέση τιμή	6,8
Τιμή $\geq$ 3(θετική έκφραση)	45 (100%)

---

Στον Πίνακα 8 φαίνονται τα χαρακτηριστικά της χρώσης OCT 3/4 ως προς την έκταση και την ένταση της, στα αμιγή εμβρυικά καρκινώματα και στο στοιχείο εμβρυικού καρκινώματος των μικτών όγκων.

**Πίνακας 8.** Ένταση και έκταση της χρώσης OCT 3/4 στα εμβρυικά καρκινώματα και στο στοιχείο εμβρυικού καρκινώματος των μικτών όγκων (N=8+20)

---

**Έκταση OCT 3/4**

0	0
1	0
2	0
3	2
4	26

**Ένταση OCT 3/4**

0	0
1	0
2	7
3	21

**Βαθμός κλίμακας έκφρασης OCT 3/4**

Μέση τιμή	6,6
Τιμή $\geq$ 3(θετική έκφραση)	28 (100%)

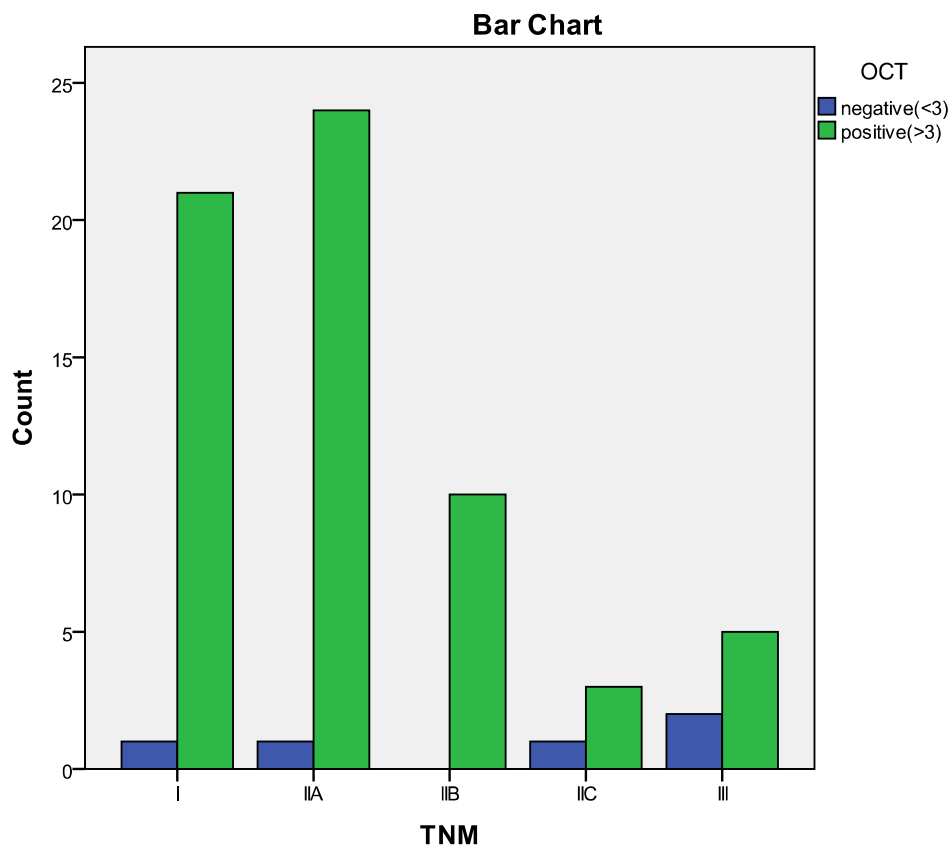
---

Στο Σχήμα 2 παρουσιάζεται σε πίνακα και σε ιστόγραμμα η ανοσοϊστοχημική έκφραση του OCT 3/4 ανά στάδιο νόσου κατά TNM.

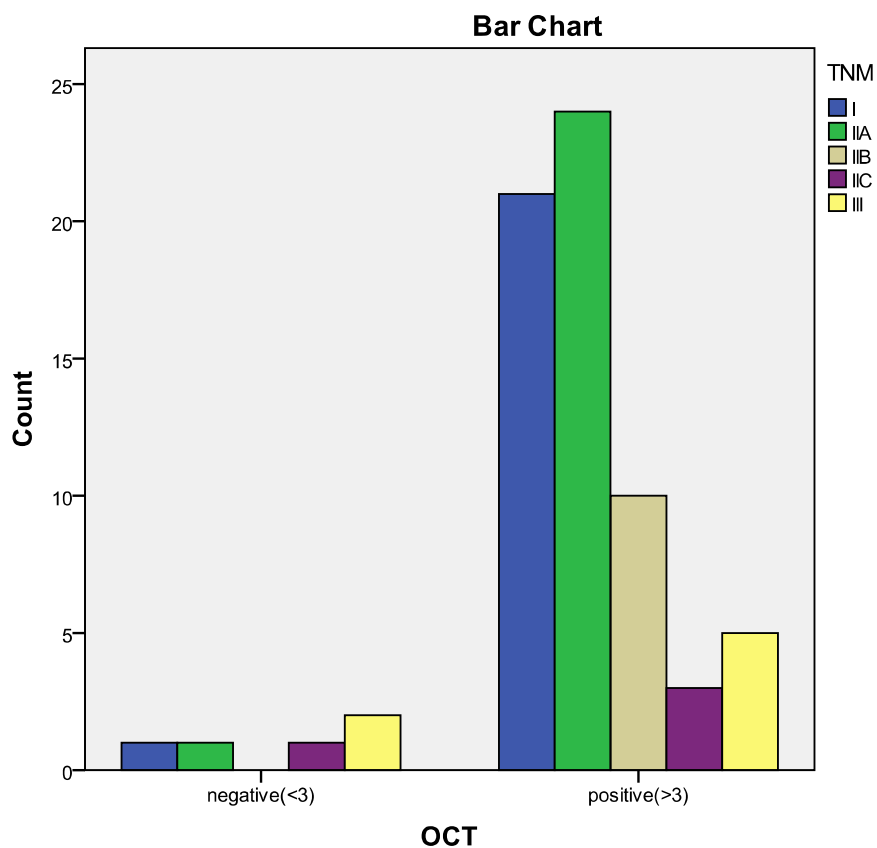
**Σχήμα 2.** Σχέση έκφρασης OCT 3/4 ανά στάδιο νόσου κατά TNM

**TNM \* OCT Crosstabulation**

		Count		Total
		OCT		
		negative(<3)	positive(>3)	
TNM	I	1	21	22
	IIA	1	24	25
	IIB	0	10	10
	IIC	1	3	4
	III	2	5	7
Total		5	63	68





**TNM \* OCT Crosstabulation**

			OCT		Total
			negative(<3)	positive(>3)	
TNM	I	Count	1	21	22
		% within TNM	4,5%	95,5%	100,0%
	IIA	Count	1	24	25
		% within TNM	4,0%	96,0%	100,0%
	IIB	Count	0	10	10
		% within TNM	,0%	100,0%	100,0%
	IIC	Count	1	3	4
		% within TNM	25,0%	75,0%	100,0%
	III	Count	2	5	7
		% within TNM	28,6%	71,4%	100,0%
Total		Count	5	63	68
		% within TNM	7,4%	92,6%	100,0%

Πίνακας 7. Συσχέτιση παραμέτρων των όγκων με την έκφραση του OCT 3/4

Παράμετρος	Αριθμός περιπτώσεων	(-) έκφραση στο OCT 3/4	(+) έκφραση στο OCT 3/4
Σύνολο	68	5 (7,4%)	63 (92,6%)
Σεμινώματα	33	0	33 (100%)
Μικτοί όγκοι	22	2 (9%)	20 (91%)
Αμ. Εμβρυικά Ca	8	0	8 (100%)
Τερατώματα	4	4 (100%)	0
Όγκ. λεκιθικού ασκού	1	1 (100%)	0
Εντόπιση			
ΔΕ	32	0	30
ΑΡ	36	0	33
Μέγεθος όγκου >4 εκ	26	2	24
Διήθηση αγγείων- λεμφαγγείων	26	1	25

### 3.2. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών PLAP, c-kit και CD 30

**3.2.1. PLAP:** Από τα 45 σεμινωμάτωδη νεοπλάσματα που μελετήθηκαν (τα 33 αμιγή και τα 12 ως συστατικό σε μικτό όγκο), τα 41 ήταν θετικά στο PLAP (ποσοστό 91%). Επίσης, θετική έκφραση στο PLAP και είχαν όλες οι εστίες IGCNU καθώς και εστιακά ο όγκος του λεκιθικού ασκού αλλά και το στοιχείο χοριοκαρκινώματος ως συστατικό στους μικτούς όγκους. Αρνητικά ήταν σε όλες τις περιπτώσεις τα κύτταρα εμβρυικού καρκινώματος και τα τερατώματα. Η χρώση για το PLAP ήταν κυτταροπλασματική/μεμβρανική, ιδιαίτερα διάχυτη, με συνοδό μη ειδική χρώση του υποστρώματος.

**3.2.2. c-kit (CD117):** Από τα 45 σεμινωματώδη νεοπλάσματα που μελετήθηκαν (τα 33 αμιγή και τα 12 ως συστατικό σε μικτό όγκο), τα 43 ήταν θετικά στο c-kit (ποσοστό 96%). Επίσης, θετική έκφραση στο c-kit είχαν σχεδόν όλες οι εστίες IGCNU(44/46, ποσοστό 96%). Όλα τα άλλα νεοπλάσματα ήταν αρνητικά στο c-kit.

**3.2.3. CD 30 (ki-1):** Όλα τα αμιγή εμβρυικά καρκινώματα αλλά όλα τα συστατικά εμβρικού καρκινώματος στους μικτούς όγκους ήταν θετικά στο CD 30. Όλα τα υπόλοιπα νεοπλάσματα ήταν αρνητικά στο CD 30.

#### 4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα νεοπλάσματα των όρχεων από γεννητικά κύτταρα (TGCTs) είναι οι πιο συχνές κακοήθειες στους άντρες από 20-40 ετών. Αυτοί οι όγκοι σήμερα, με τον συνδυασμό χειρουργικής επέμβασης, ακτινοθεραπείας και χημειοθεραπείας, θεωρούνται ιάσιμοι με 5ετή και 10ετή επιβίωση να κυμαίνεται από 90-95%. Εντούτοις, παρά την καλή τους πρόγνωση, εμφανίζουν συνεχώς αυξανόμενη συχνότητα με την ετήσια επίπτωση να φθάνει το 2-5% σε ορισμένες, κυρίως Ευρωπαϊκές χώρες.

Τα διηθητικά νεοπλάσματα των όρχεων από γεννητικά κύτταρα παρουσιάζουν ένα ευρύ και ετερογενές φάσμα ιστολογικών τύπων αλλά ουσιαστικά διαχωρίζονται σε δύο μεγάλες ομάδες, τα σεμινώματα και τους μη σεμινωμάτωδεις όγκους που είναι το εμβρυικό καρκίνωμα, το τεράτωμα, το χοριοκαρκίνωμα και ο όγκος του λεκιθικού ασκού. Τα νεοπλασματικά κύτταρα του σεμινώματος προσομοιάζουν με τα γεννητικά κύτταρα του εμβρύου και εμφανίζουν παρόμοια μορφολογία με τα κύτταρα της ενδοσωληνιακής νεοπλασίας από γεννητικά κύτταρα. Το εμβρυικό καρκίνωμα είναι το ομόλογο κακόηθες νεόπλασμα των γεννητικών κυττάρων του εμβρύου, εξ'ορισμού πολυδύναμο, με ικανότητα να διαφοροποιείται σε ιστούς και από τα τρία βλαστικά δέρματα. Το τεράτωμα εμφανίζει σωματική διαφοροποίηση ενώ ο όγκος του λεκιθικού ασκού και το χοριοκαρκίνωμα διαφοροποιούνται προς εξωεμβρυικούς ιστούς. Το φάσμα των ιστολογικών τύπων των νεοπλασμάτων των όρχεων από γεννητικά κύτταρα στην ουσία μιμείται την εμβρυική ανάπτυξη, μέχρι ενός σημείου.

Με την εισαγωγή της σισπλατίνης στη θεραπεία των TGCT, η πρόγνωση για αυτούς τους ασθενείς έχει βελτιωθεί δραματικά. Σε πολλές χώρες, πάνω από το 90% των ασθενών θεραπεύονται. Μετά από αυτή τη σημαντική βελτίωση της πρόγνωσης, οι TGCTs δεν θεωρούνται πλέον νεοπλάσματα που απειλούν σοβαρά τη ζωή και παρατηρείται μία επιβράδυνση των ερευνών σχετικών με την πρόωρη διάγνωση της ορχικής κακοήθειας<sup>188</sup>.

Παρά την ετερογένεια των νεοπλασμάτων των όρχεων από γεννητικά κύτταρα, όλα εμφανίζουν κοινή προέλευση, τη λεγόμενη ενδοσωληνιακή νεοπλασία από γεννητικά κύτταρα αταξινόμητου τύπου (IGCNU) ή αλλιώς γνωστή και ως καρκίνωμα *in situ*, με εξαίρεση το σπερματοκυτταρικό καρκίνωμα που απαντάται σε ηλικιωμένους άντρες.

Η διάγνωση των TGCTs στηρίζεται κυρίως στη μορφολογία των κυττάρων αλλά πολλές φορές απαιτεί ανοσοϊστοχημική διερεύνηση. Η πιθανότητα ενός μεταστατικού νεοπλάσματος στον όρχι θα πρέπει να θεωρείται μεγάλη εάν παρατηρούνται τα εξής μορφολογικά χαρακτηριστικά: απουσία εστιών IGCNU, συχνά νεοπλασματικά έμβολα σε αιμοφόρα αγγεία και διάμεση νεοπλασματική διήθηση που δεν εμπλέκει τα σπερματικά σωληνάρια. Το επιθηλιακό μεμβρανικό αντιγόνο(EMA) και το καρκινοεμβρυικό αντιγόνο(CEA), είναι συχνότερα θετικό σε μεταστατικά νεοπλάσματα.

Το OCT 3/4 καλούμενο επίσης και ως OCT 3, OCT4 και POU5F1 είναι ένας μεταγραφικός ρυθμιστής ο οποίος εκφράζεται στα αδιαφοροποίητα, πολύδυναμα εμβρυικά κύτταρα και στα γεννητικά κύτταρα, σε μελέτες που έγιναν σε πειραματόζωα και σε ανθρώπους. Ουσιαστικά, αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή που λειτουργεί ως διακόπτης στη διαφοροποίηση των κυττάρων που εμφανίζουν ή θα μπορούσαν να αναπτύξουν πολυδυναμικότητα.

Τα ευρήματα της μελέτης αυτής φαίνεται να διευκρινίζουν για πρώτη φορά σύμφωνα με την έρευνα της βιβλιογραφίας, το ρόλο του OCT 3/4 στη διάγνωση των TGCTs σε δείγμα Ελληνικού πληθυσμού.

Στην παρούσα μελέτη θετική έκφραση του OCT 3/4 παρατηρήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις σεμινώματος, σε όλες τις περιπτώσεις εμβρυικού καρκινώματος, σε όλα τα σεμινωμάτωδη και εμβρυικά συστατικά των μικτών όγκων αλλά και σε όλες τις περιπτώσεις εστιών IGCNU στο παρακείμενο ορχικό παρέγχυμα. Σε όλα τα υπόλοιπα νεοπλάσματα που μελετήθηκαν, δηλαδή στα τερατώματα, στον όγκο του λεκιθικού ασκού, σε 5 αλλά νεοπλάσματα που δεν προέρχονται από γεννητικά κύτταρα καθώς και στα συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα, τα οποία συνυπήρχαν σε 5 περιπτώσεις σεμινωμάτων, παρατηρήθηκε αρνητική έκφραση του OCT 3/4. Τα ευρήματα της μελέτης είναι σε απόλυτη συμφωνία με όλα τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα. Πράγματι, υπερέκφραση του OCT 3/4 περιγράφεται πρακτικά σε όλες τις περιπτώσεις σεμινώματος, εμβρυικού καρκινώματος και IGCNU ενώ αντιθέτως, στο φυσιολογικό ορχικό παρέγχυμα, στα συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα, στα υπόλοιπα νεοπλάσματα από γεννητικά κύτταρα αλλά και στα υπόλοιπα ορχικά νεοπλάσματα που δεν προέρχονται από γεννητικά κύτταρα, δεν παρατηρείται έκφραση του OCT 3/4.

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε ανοσοϊστοχημική μέθοδος και εκτιμήθηκε η ένταση και η έκταση της χρώσης, ως ποσοστιαία αναλογία των καρκινικών κυττάρων με θετική χρώση OCT 3/4 σε σχέση με τη συνολική έκταση του καρκινικού ιστού. Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων των δύο βαθμολογιών χρησιμοποιήθηκε ως τελικός βαθμός της υπερέκφρασης OCT 3/4, σε κλίμακα 0-7. Ως θετικά χαρακτηρίστηκαν τα νεοπλάσματα με τελικό βαθμό  $\geq 3$ . Η μέθοδος αυτή, η οποία συνδυάζει και τις δύο παραμέτρους εκτίμησης της χρώσης, έχει χρησιμοποιηθεί και σε άλλες μελέτες ως απλή και εύκολα αναπαραγωγίμη από ανεξάρτητους παρατηρητές. Τα νεοπλασματικά κύτταρα που προσμετρούνταν ως θετικά εμφάνιζαν πυρηνική χρώση, όπως αναμένεται για ένα μεταγραφικό δείκτη. Επιπρόσθετα, η χρώση αυτή ήταν, πρακτικά σε όλες τις περιπτώσεις, έντονη και ιδιαίτερα διακριτή, με καθόλου ή ελάχιστο θετικό υπόστρωμα και αυτό είχε ως αποτέλεσμα τα κύτταρα που εξέφραζαν το OCT 3/4 να είναι ιδιαίτερα εμφανή. Σε κάθε περίπτωση μικτού όγκου παρατηρούνταν ένα σαφές όριο μετάβασης από τα θετικά συστατικά (σεμίνωμα και εμβρυικό καρκίνωμα) στα παρακείμενα αρνητικά συστατικά. Διαφοροποιημένα νεοπλάσματα του όρχεως αλλά και νεοπλάσματα που δεν προέρχονταν από γεννητικά κύτταρα ήταν αρνητικά για το OCT 3/4, γεγονός που αντικατοπτρίζει την απώλεια της πολυδυναμικότητας στους όγκους αυτούς.

Η διάγνωση των TGCTs στηρίζεται κυρίως στη μορφολογία των κυττάρων. Κάποιες φορές η ταυτοποίηση ενός νεοπλάσματος αλλά και η αναγνώριση όλων των συστατικών ενός μικτού όγκου είναι προβληματική, αλλά προγνωστικά και θεραπευτικά σημαντική. Διαγνωστικές δυσκολίες προκύπτουν για πολλούς λόγους όπως σε περιπτώσεις που το νεόπλασμα εμφανίζει εκτεταμένη νέκρωση ή όταν το υλικό μίας ορχικής βιοψίας είναι ιδιαίτερα περιορισμένο και περιλαμβάνει συγκεκριμένους ιστολογικούς τύπους που δεν αντιπροσωπεύονται επαρκώς ή ακόμα όταν πρόκειται για μία περίπτωση όπου ένας όγκος μιμείται ιστολογικά ένα άλλο όγκο με αποτέλεσμα λανθασμένη διάγνωση. Αρκετά συχνό σφάλμα με σοβαρές κλινικές και θεραπευτικές συνέπειες, είναι να δυσερμηνευτεί ένα

νεόπλασμα του στρώματος-γεννητικής ταινίας ως ένα νεόπλασμα από γεννητικά κύτταρα, και κυρίως ως σεμίνωμα. Η απουσία έκφρασης των κυττάρων του νεοπλασματος του στρώματος-γεννητικής ταινίας για το OCT 3/4 και αντίθετα η ομοιόμορφη υπερέκφραση του στο σεμίνωμα, θα μπορούσε να συμβάλει ιδιαίτερα στη σωστή διάγνωση ώστε να αποφεύγονται τόσο σοβαρά λάθη. Άλλα νεοπλάσματα που μορφολογικά μιμούνται ένα κλασικό σεμίνωμα είναι το σπερματοκυτταρικό σεμίνωμα, η σπάνια περίπτωση ενός μονοφασικού χοριοκαρκινώματος και οι συμπαγείς τύποι των όγκων του λεκιθικού ασκού. Το OCT 3/4 και σε αυτές τις περιπτώσεις μπορεί να βοηθήσει σημαντικά και για αυτό το λόγο είναι διαγνωστικά και προγνωστικά ιδιαίτερα χρήσιμος.

Χρησιμοποιούνται διάφοροι ανοσοϊστοχημικοί δείκτες σήμερα για τη διερεύνηση ενός TGCT. Η υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα για το σεμίνωμα και το εμβρυικό καρκίνωμα, σε συνδυασμό με την ευδιάκριτη, ομοιόμορφη και έντονη χρώση του, κάνουν το OCT 3/4 μία χρήσιμη προσθήκη στην ήδη υπάρχουσα ομάδα ανοσοϊστοχημικών χρώσεων που χρησιμοποιούνται σήμερα για να βοηθήσουν στην ακριβή ταξινόμηση των ορχικών νεοπλασμάτων.

Οι Looigenga και συν το 2003, σε μία μεγάλη μελέτη που αφορούσε την ανοσοϊστοχημική έκφραση του OCT 3/4 σε 3439 νεοπλάσματα από διάφορα όργανα, με περισσότερο από 100 ιστολογικούς τύπους, έδειξαν ότι η IGCNU, όλα τα σεμινώματα και η πλειονότητα των ορχικών εμβρυικών καρκινωμάτων ήταν θετικά στο OCT 3/4. Στην ίδια μελέτη θετικά αποδείχθηκαν επίσης, τα γερμινώματα και τα εμβρυικά καρκινώματα της μέσης γραμμής και του εγκεφάλου. Σε αντίθεση, κανένα σπερματοκυτταρικό σεμίνωμα αλλά και κανένας από τους διαφοροποιημένους μη σεμινωμάτωδεις όγκους (τεράτωμα, όγκος του λεκιθικού ασκού και χοριοκαρκίνωμα), δεν εμφάνιζε έκφραση στο OCT 3/4, ανεξάρτητα από την ανατομική του εντόπιση. Επίσης, όλα τα υπόλοιπα νεοπλάσματα από άλλα όργανα (καρκινώματα, μεσοθηλιώματα, θυμώματα, GIST, σαρκώματα, κλπ) ήταν παντελώς αρνητικά για το OCT 3/4. Ο δείκτης και σε αυτή τη μελέτη χαρακτηρίζεται από τους συγγραφείς, ευαίσθητος και ειδικός.

Οι Jones και συνεργάτες το 2004 επιβεβαίωσαν και επέκτειναν τα ανωτέρω ευρήματα, αποδεικνύοντας ότι αρνητικά για το OCT 3/4 είναι τα νεοπλάσματα των όρχων του στρώματος-γεννητικής ταινίας, συμπεριλαμβανομένων των όγκων από κύτταρα Leydig, από κύτταρα Sertoli, αταξινόμητων όγκων του στρώματος-γεννητικής ταινίας, κοκκιοκυτταρικών όγκων τύπου ενήλικα και ορχικών όγκων στο επινεφριδιογεννητικό σύνδρομο.

Παρόμοια αποτελέσματα για τα σεμινώματα και τα εμβρυικά καρκινώματα αναφέρουν οι Palumbo και συν, το 2002, οι οποίοι ταυτοποίησαν το OCT 3/4 (POU5F1) mRNA στις υποομάδες αυτές των TGCTs. Μελετήθηκαν με ιστική μικροσυστοιχία νεοπλάσματα που δεν προέρχονταν από γεννητικά κύτταρα. Θετικά αποδείχθηκαν μόνο ένα από τα 50 καρκινώματα του πνεύμονα από πλακώδες επιθήλιο, ένα από τα 47 μεγαλοκυτταρικά καρκινώματα του λάρυγγα και ένα από τα 50 διαυγοκυτταρικά καρκινώματα του νεφρού. Οι συγγραφείς συμπεραίνουν ότι, ενώ γενετική έκφραση του OCT 3/4 παρατηρείται σε πολλούς φυσιολογικούς ανθρώπινους ιστούς αλλά και σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές με τη χρήση PCR, αυτή δεν φαίνεται να αντικατοπτρίζεται με ανοσοϊστοχημική θετικότητα, παρά μόνο σε σπανιότερες εξαιρέσεις.

Το σπερματοκυτταρικό σεμίνωμα αντιμετωπίζεται επαρκώς με ορχεκτομή χωρίς να είναι απαραίτητη άλλη επιπρόσθετη θεραπεία. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να διαχωρίζεται από τα κλασικό σεμίνωμα που απαιτεί επιπλέον ακτινο- ή/και χημειοθεραπεία. Η διάκριση του σπερματοκυτταρικού από το κλασικό σεμίνωμα αλλά και από το συμπαγή τύπο του εμβρυικού καρκινώματος, είναι ορισμένες φορές δύσκολη στις τομές αιματοξυλίνης-ηωσίνης, ειδικά σε περιπτώσεις που συνυπάρχει σημαντική λεμφοκυτταρική διήθηση ή εάν το σπερματοκυτταρικό σεμίνωμα είναι αναπλαστικού τύπου. Το σπερματοκυτταρικό σεμίνωμα είναι αρνητικό στους περισσότερους ανοσοϊστοχημικούς δείκτες που χρησιμοποιούνται σήμερα στα νεοπλάσματα των όρχεων, όπως στο PLAP, στη βιμεντίνη, στο NSE, στο CD 30 και σε πολλούς άλλους. Η αρνητικότητα του σπερματοκυτταρικού σεμινώματος στο OCT 3/4 και σε αντίθεση, η έντονη και ομοιόμορφη θετικότητα στο κλασικό σεμίνωμα αλλά και το εμβρυικό καρκίνωμα, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι και σε αυτή την περίπτωση διαφορικής διάγνωσης, ο δείκτης OCT 3/4 είναι ιδιαίτερα βοηθητικός.

Το CD 30 (ki-1), ένα μέλος της οικογένειας TNF (tumor necrosis factor) των υποδοχέων των κυτταροκινών, είναι μία μεμβρανική πρωτεΐνη που εκφράζεται στα περισσότερα εμβρυικά καρκινώματα. Το CD 30 και το μόριο πρόσδεσης του μπορεί να εμπλέκονται στην αυτοκρινή ρύθμιση της ανανέωσης των αρχέγονων κυττάρων του εμβρυικού καρκινώματος. Στην παρούσα μελέτη πάνω από το 90% των εμβρυικών καρκινωμάτων (αμιγών και των συστατικών των μικτών όγκων) που εξετάστηκαν, βρέθηκαν θετικά για το CD 30, με ποικιλία στην ένταση της χρώσης. Η ανοσοαντιδραστικότητα για το CD 30 βρέθηκε να είναι ειδική για κύτταρα του εμβρυικού καρκινώματος ενώ άλλοι TGCTs, συμπεριλαμβανομένου του σεμινώματος, αποδείχθηκαν αρνητικοί. Βιβλιογραφικά, αναφέρεται ότι ένα μικρό ποσοστό σεμινωμάτων μπορεί να είναι θετικά στο CD 30. Στην παρούσα όμως μελέτη κανένα σεμίνωμα ( αμιγές ή ως συστατικό των μικτών όγκων) δεν εμφάνιζε θετικότητα στο CD 30. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι το CD 30 σε συνδυασμό με το CD117 (c-kit), είναι χρήσιμοι δείκτες για το διαχωρισμό του σεμινώματος και του εμβρυικού καρκινώματος. Το OCT 3/4 δεν συμβάλλει σε αυτή τη διάκριση γιατί και τα δύο νεοπλάσματα εμφανίζουν παρόμοιου τύπου αντίδραση. Εντούτοις, μπορεί σημαντικά να κατευθύνει τη διάγνωση, υποδεικνύοντας ότι πρόκειται για νεόπλασμα που προέρχεται από τα γεννητικά κύτταρα.

Ενώ ο πρωταρχικός σκοπός της μελέτης αυτής, ήταν η εκτίμηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του OCT 3/4 σε νεοπλάσματα από γεννητικά κύτταρα στους όρχεις, είναι λογικό να υποθέσουμε ότι το OCT 3/4 μπορεί να αποδειχθεί αξιόλογος δείκτης και στη διάγνωση μεταστατικών νεοπλασμάτων που προέρχονται από γεννητικά κύτταρα. Τα μεταστατικά εμβρυικά καρκινώματα συχνά παρουσιάζουν απώλεια της έκφρασης στο CD 30 μετά τη χημειοθεραπεία, και το γεγονός αυτό θα μπορούσε να καταστήσει πιθανά το OCT 3/4 έναν χρήσιμο δείκτη σε αυτές τις περιπτώσεις. Σαφώς όμως, είναι απαραίτητες επιπλέον μελέτες για να διερευνηθούν εάν η έκφραση του OCT 3/4 διαφοροποιείται σε μεταστατικά νεοπλάσματα ή μετά από χημειοθεραπεία.

Οι Hattab και συν το 2005, έδειξαν ότι το OCT 3/4 υπερτερεί διαγνωστικά του PLAP στη διάγνωση των γερμινωμάτων του κεντρικού νευρικού συστήματος. Το PLAP είναι ένας βασικός δείκτης διάγνωσης για τα γερμινώματα και τα σεμινώματα με κάποιους όμως περιορισμούς γιατί είναι μη ειδικός και γιατί πολλές φορές είναι δύσκολο να εκτιμηθεί λόγω παράλληλης έντονης χρώσης του υποστρώματος. Στα 25 γερμινώματα που

μελετήθηκαν όλα (100%) ήταν θετικά στο OCT3/4 και τα 23 ήταν θετικά στο PLAP. Η χρώση για το OCT 3/4 ήταν έντονη σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις, πυρηνική, ευδιάκριτη με ελάχιστο ή καθόλου artifact υποστρώματος. Αντίθετα, η χρώση για το PLAP ήταν κυτταροπλασματική/μεμβρανική, ιδιαίτερα διάχυτη, με συνοδό μη ειδική χρώση του υποστρώματος, καθιστώντας δύσκολη την εκτίμηση της.

Στην παρούσα μελέτη από τα 45 σεμινωματώδη νεοπλάσματα που μελετήθηκαν (τα 33 αμιγή και τα 12 ως συστατικό σε μικτό όγκο), τα 41 ήταν θετικά στο PLAP (ποσοστό 91%) και το εύρημα αυτό είναι συμβατό με αυτό που αναμένεται από ανάλογα βιβλιογραφικά δεδομένα. Όμως, και στα δικά μας περιστατικά η χρώση εμφάνιζε τα μειονεκτήματα όπως αυτά που αναφέρθηκαν. Οι Hattab και συν, αναφέρουν ότι τα γερμινώματα του ΚΝΣ είναι ιδιαίτερα ακτινο- και χημειουαίσθητοι όγκοι, δεν χρήζουν χειρουργικής επέμβασης και συνεπώς ο διαχωρισμός τους από άλλα νεοπλάσματα είναι πολύ σημαντικός. Σε αντίθεση με το ορχικό τους ανάλογο (σεμίνωμα), η μορφολογία των κυττάρων δεν είναι αρκετή για τη διάγνωση και η ανοσοϊστοχημική διερεύνηση είναι απαραίτητη, η οποία όμως εφαρμόζεται τις περισσότερες φορές σε περιορισμένο υλικό βιοψίας, συχνά με αλλοιώσεις από προηγούμενη ακτινοθεραπεία. Αυτό το 'δύσκολο' υλικό ενδέχεται να εμπλέκεται επιπρόσθετα και με συνυπάρχουσα έντονη λεμφοκυτταρική διήθηση ή εκτεταμένη νέκρωση ή συνθλιπτικές αλλοιώσεις (crushing artifact) που σχετίζονται με τη διαδικασία λήψης της βιοψίας. Η ύπαρξη ενός αξιόπιστου δείκτη, ο οποίος να αναδεικνύει τον πυρήνα κάθε μεμονωμένου νεοπλασματικού κυττάρου, με ελάχιστο ή καθόλου μη ειδικά θετικό υπόστρωμα, είναι ζωτικής σημασίας.

Οι Jung και συν το 2006, μελέτησαν νεοπλάσματα στο μεσοθωράκιο και έδειξαν ότι όλα τα σεμινώματα, ένα εμβρυικό καρκίνωμα και το σεμινωματώδες στοιχείο ενός μικτού όγκου που εξέτασαν, ήταν θετικά για το OCT 3/4 με έντονη (+3) πυρηνική χρώση. Αντιθέτως, όλα τα θυμώματα και τα άλλα στοιχεία των μικτών όγκων (τεράτωμα, όγκος λεκιθικού ασκού) ήταν αρνητικά για το OCT 3/4. Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψη την κακή πρόγνωση των νεοπλασμάτων του μεσοθωρακίου από γεννητικά κύτταρα, είναι πολύ σημαντικός ο ρόλος του OCT 3/4 γιατί συμβάλλει αποτελεσματικά στο διαχωρισμό τους από άλλα νεοπλάσματα και βοηθάει στην έγκαιρη διάγνωση τους.

Θα πρέπει πάντως να σημειωθεί ότι, πολλές φορές, τα ειδικά για κάποιους ιστούς αντισώματα ('tissue specific antibodies'), με επιπρόσθετες μελέτες, αποδείχθηκαν, τελικά, όχι και τόσο ειδικοί δείκτες. Ενδεχόμενα, το ίδιο να συμβεί και με το OCT 3/4, και να αποδειχθεί τελικά ότι δεν είναι τόσο ειδικός για τα νεοπλάσματα από γεννητικά κύτταρα όπως αρχικά έδειξαν οι μελέτες. Εντούτοις, προς το παρόν φαίνεται να είναι πολλά υποσχόμενος και το λογικό είναι η αξία του να μην ανατραπεί, αν βασιστούμε στις βιολογικές του ιδιότητες. Συμπερασματικά, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται στην ομάδα των ανοσοϊστοχημικών δεικτών που χρησιμοποιούνται για τα νεοπλάσματα των όρχεων από γεννητικά κύτταρα αλλά και στις περιπτώσεις μεταστατικών όγκων όπου ένα νεόπλασμα από γεννητικά κύτταρα αποτελεί μία από τις νόσους της διαφορικής διάγνωσης.

Το 1972, ο Skakkebaek έκανε την πρώτη αναφορά στα μορφολογικά ανώμαλα κύτταρα στον όρχι, τα ονόμασε καρκίνωμα in situ (carcinoma in situ-CIS,IGCNU) και τα συνέδεσε με την επακόλουθη ανάπτυξη των TGCTs<sup>189</sup>. Η ανακάλυψη αυτών των κυττάρων ήταν μία



επανάσταση στην κατανόηση της βιολογίας των TGCTs. Επιπλέον, ήταν ένα μέσο για την πρόληψη αυτής της νόσου, με διάγνωση της σε προδιηθητικό στάδιο<sup>190</sup>. Εντούτοις, μέχρι σήμερα απαραίτητη είναι η ορχική βιοψία για τη διάγνωση του CIS-IGCNU και εκτός από τη Δανία μόνο ελάχιστες χώρες έχουν εντάξει την βιοψία του ετερόπλευρου όρχι ως ρουτίνα στην πρόληψη δεύτερου ορχικού καρκίνου σε ασθενείς με ιστορικό TGCT. Η εξαιρετική πρόγνωση αυτής της νόσου είναι ο κυριότερος λόγος για την αποφυγή προληπτικών διαδικασιών.

Όμως, σήμερα οι ασθενείς που επιβιώνουν από TGCT έχουν σημαντικά αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης σοβαρών ασθενειών που σχετίζονται με τη θεραπεία, όπως δευτεροπαθείς κακοήθειες και καρδιοαγγειακές νόσους<sup>191</sup>.

Οι van Casteren και συνεργάτες<sup>185</sup> το 2008, σε μία μελέτη τους, πραγματοποιείται την ανίχνευση των κυττάρων CIS-IGCNU σε σπέρμα με τη χρήση του OCT 3/4 ως ανοσοϊστοχημικό δείκτη. Αυτή η δημοσίευση, όπως και μία άλλη των Hoei-Hansen συν το 2007 με παρόμοιο θέμα, θέτουν μία νέα διάσταση στην ανίχνευση των κυττάρων CIS-IGCNU με μη διηθητικά μέσα. Σίγουρα πολλά προβλήματα μεθοδολογίας θα πρέπει να λυθούν για να βελτιώσουν αυτήν τη μέθοδο, πριν αυτή χρησιμοποιηθεί ως αξιόπιστη διαδικασία screening των TGCT σε προδιηθητικό στάδιο. Επίσης θα πρέπει να αναλυθεί η σχέση κόστους-όφελους για να αποφασισθεί αν θα καθιερωθεί μία τέτοια μέθοδος ως μέσο screening σε όλους τους νεαρούς άνδρες ή μόνο σε επιλεγμένες ομάδες υψηλού κινδύνου<sup>194</sup>, όπως αυτές ορίστηκαν από τον Harland και συν, οι οποίοι είναι οι ασθενείς με πρόβλημα υπογονιμότητας ή ιστορικό κρυφορχίας ή μονόπλευρο TGCT. Σε αυτές τις ομάδες, η συχνότητα CIS-IGCNU πλησιάζει το 34% και ειδικά σε ασθενείς με κρυφορχία ο κίνδυνος ανάπτυξης TGCT, είναι τετραπλάσιος σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό<sup>195</sup>.

Η χρήση της κυτταρολογίας για τη διάγνωση και τον χειρισμό ουρολογικών κακοήθων νεοπλασμάτων έχει εφαρμογή εδώ και μερικά χρόνια, ειδικά για το μεταβατικό καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης και πολύ πρόσφατα στον καρκίνο του προστάτη με την νέα μέθοδο DDA<sub>3</sub> assay. Συνεπώς, θα είναι ένα μεγάλο άλμα αν και στα ορχικά νεοπλάσματα καθιερωθεί μία μη διηθητική μέθοδος που στηρίζεται στην κυτταρολογία αλλά σίγουρα είναι απαραίτητες επιπρόσθετες μελέτες και σε άλλα κέντρα που να επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα αυτών των ερευνητών.

Οι ασθενείς με IGCNU έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης TGCT, περίπου 70% σε διάστημα 7 ετών<sup>192</sup>. Η θεραπεία της IGCNU γίνεται συνήθως με χαμηλές δόσεις ακτινοθεραπείας. Όπως αναφέρθηκε, η ορχική βιοψία είναι ο μοναδικός τρόπος διάγνωσης του IGCNU, με δύο όμως σοβαρά μειονεκτήματα. Είναι διηθητική μέθοδος με σημαντικό αριθμό ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων. Οι ερευνητές της Γερμανικής ομάδας ορχικού καρκίνου<sup>193</sup>, αναφέρουν ότι η IGCNU είναι ετερογενής αλλοίωση και εάν γίνει μόνο μία βιοψία, η πιθανότητα να είναι αυτή ψευδώς αρνητική, είναι πολύ μεγάλη. Έτσι, η τεχνική της ανίχνευσης των κυττάρων αυτών ανοσοκυτταροχημικά, με τη χρήση του δείκτη OCT 3/4, μπορεί να βοηθήσει στη λύση αυτών των προβλημάτων.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα νεοπλάσματα των όρχεων από γεννητικά κύτταρα είναι οι πιο συχνές κακοήθειες στους άντρες από 20-40 ετών. Αυτοί οι όγκοι σήμερα, με τον συνδυασμό χειρουργικής επέμβασης, ακτινοθεραπείας και χημειοθεραπείας, θεωρούνται ιάσιμοι με 5ετή και 10ετή επιβίωση να κυμαίνεται από 90-95%. Εντούτοις, παρά την καλή τους πρόγνωση, εμφανίζουν συνεχώς αυξανόμενη συχνότητα με την ετήσια επίπτωση να φθάνει το 2-5% σε ορισμένες, κυρίως Ευρωπαϊκές χώρες.

Τα διηθητικά νεοπλάσματα των όρχεων από γεννητικά κύτταρα παρουσιάζουν ένα ευρύ και ετερογενές φάσμα ιστολογικών τύπων αλλά ουσιαστικά διαχωρίζονται σε δύο μεγάλες ομάδες, τα σεμινώματα και τους μη σεμινωμάτωδεις όγκους που είναι το εμβρυικό καρκίνωμα, το τεράτωμα, το χοριοκαρκίνωμα και ο όγκος του λεκιθικού ασκού. Παρά την ετερογένεια στην ομάδα των νεοπλασμάτων των όρχεων από γεννητικά κύτταρα, όλα εμφανίζουν κοινή προέλευση, τη λεγόμενη ενδοσωληναριακή νεοπλασία από γεννητικά κύτταρα αταξινόμητου τύπου ή αλλιώς γνωστή και ως καρκίνωμα *in situ*, με εξαίρεση το σπερματοκυτταρικό καρκίνωμα.

Το OCT 3/4 καλούμενο επίσης και ως OCT 3, OCT4 και POU5F1 είναι ένας μεταγραφικός ρυθμιστής ο οποίος εκφράζεται στα αδιαφοροποίητα, πολύδυναμα εμβρυικά κύτταρα και στα γεννητικά κύτταρα, σε μελέτες που έγιναν σε πειραματόζωα και σε ανθρώπους. Ουσιαστικά, αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή που λειτουργεί ως διακόπτης στη διαφοροποίηση των κυττάρων που εμφανίζουν ή θα μπορούσαν να αναπτύξουν πολυδυναμικότητα. Τα ευρήματα της μελέτης αυτής φαίνεται να διευκρινίζουν για πρώτη φορά σύμφωνα με την έρευνα της βιβλιογραφίας, το ρόλο του OCT 3/4 στη διάγνωση των TGCTs σε δείγμα Ελληνικού πληθυσμού. Στην παρούσα μελέτη θετική έκφραση του OCT 3/4 παρατηρήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις σεμινώματος, όλες τις περιπτώσεις εμβρυικού καρκινώματος, σε όλες τις περιπτώσεις σεμινωμάτωδους και εμβρυικού συστατικού μικτών όγκων αλλά και σε όλες τις περιπτώσεις εστιών IGCNU στο παρακείμενο ορχικό παρέγχυμα. Σε όλα τα υπόλοιπα νεοπλάσματα που μελετήθηκαν, τερατώματα, όγκος του λεκιθικού ασκού, σε 5 αλλά νεοπλάσματα που δεν προέρχονται από γεννητικά κύτταρα καθώς και στα συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα, τα οποία συνυπήρχαν σε 5 περιπτώσεις σεμινωμάτων, παρατηρήθηκε αρνητική έκφραση του OCT 3/4. Τα ευρήματα της μελέτης είναι σε απόλυτη συμφωνία με όλα τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα. Η διάγνωση των TGCTs στηρίζεται κυρίως στη μορφολογία των κυττάρων. Κάποιες φορές η ταυτοποίηση ενός νεοπλάσματος αλλά και η αναγνώριση όλων των συστατικών ενός μικτού όγκου είναι προβληματική, αλλά προγνωστικά και θεραπευτικά σημαντική. Η υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα για το σεμίνωμα και το εμβρυικό καρκίνωμα, σε συνδυασμό με την ευδιάκριτη, ομοιόμορφη και έντονη χρώση του, κάνουν το OCT 3/4 μία χρήσιμη προσθήκη στην ήδη υπάρχουσα ομάδα ανοσοϊστοχημικών χρώσεων που χρησιμοποιούνται σήμερα για να βοηθήσουν στην ακριβή ταξινόμηση των ορχικών νεοπλασμάτων. Το OCT 3/4 φαίνεται να είναι ένας αξιόπιστος δείκτης, ο οποίος να αναδεικνύει τον πυρήνα κάθε μεμονωμένου νεοπλασματικού κυττάρου, με ελάχιστο ή καθόλου μη ειδικά θετικό υπόστρωμα. Συμπερασματικά, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται στην ομάδα των ανοσοϊστοχημικών δεικτών που χρησιμοποιούνται για τα νεοπλάσματα των όρχεων από γεννητικά κύτταρα

αλλά και στις περιπτώσεις μεταστατικών όγκων όπου ένα νεόπλασμα από γεννητικά κύτταρα αποτελεί μία από τις νόσους της διαφορικής διάγνωσης.

## SUMMARY

An immunohistochemical study of testicular germ cell tumours in relation with prognosis and survival

Pastelli Nikoleta

Testicular germ cell tumors (TGCTs) of adolescents and adults are the most common malignancies in men in the second to fourth decade of life. The incidence rate of TGCTs has doubled in the past 30 years, and although the vast majority of patients present with early-stage curable disease, the continued rising incidence of these tumors presents a major challenge. They are classified into two main histologic categories of seminoma and nonseminoma. Seminoma resembles primordial germ cell and nonseminoma are composed of neoplastic tissues exhibiting either somatic, embryonal or extraembryonal differentiation. Primordial germ cells are widely accepted as the cells of origin of TGCTs and are believed to give rise to carcinoma in situ (CIS), the so called intratubular germ cell neoplasia, unclassified type (IGCNU).

OCT 3/4 also known as OCT 3, OCT 4, OTF 3, POU5F1, is an 18-kDa POU-domain transcription factor encoded by the POU5F1 gene, located on human chromosome 6p21.3 and acts as a candidate master regulator for initiation, maintenance and differentiation of pluripotent and germline cells during normal development. This transcription regulator is expressed in undifferentiated pluripotent cells including embryonic stem cells and germ cells, both mouse and human. Knockout mice are not viable, because they fail to initiate fetal development and consist primarily of cells committed to the trophoblast lineage.

Multiple types of adult testicular germ cell tumors exist, and each type differs in its degree of differentiation. Seminomas display the phenotype of early germ cells and possess pluripotent potential. Embryonal carcinomas are also intrinsically pluripotent. Thus, these two germ cell tumour components are expected to express OCT 3/4. Other germ cell tumour types, including yolk sac tumours, mature teratomas, immature teratomas and choriocarcinomas, are more differentiated and thus would not be expected to express this transcription factor.

The aim of this study was to establish the specificity of OCT 3/4 immunohistochemistry in the diagnosis of a variety of primary testicular tumours. We therefore investigated the immunohistochemical staining pattern of a number of primary testicular neoplasms using anti-OCT 3/4 antibodies to assess this marker's usefulness as a diagnostic tool.

Archival materials from 68 cases of primary germ cell testicular neoplasms from 1998-2005 were retrieved from the surgical pathology files of the Anticancer Hospital of Thessaloniki "Theageneion", and included the following tumour types: 33 seminomas, 18 mixed tumors, 7 embryonal carcinomas, 8 mature teratomas, 1 immature teratoma and 1 yolk sac tumor. All tumours were classified according to accepted criteria.

Four –micrometer-thick sections were cut from the paraffin blocks and stained with hematoxylin and eosin. Additional sections of selected blocks were obtained for immunohistochemical studies, which were performed on an automated immunostainer. All cases were analyzed with a polyclonal goat anti-OCT 3/4 antibody.

OCT 3/4 is a nuclear transcription factor involved in gene regulation; thus only nuclear staining is considered a positive result. The percentage of cells staining positively for OCT 3/4 was estimated and the staining was classified as negative(0), weak(1+), moderate(2+), or strong(3+).

In all cases of seminomas, embryonal carcinomas and mixed tumors with seminoma and embryonal component, there was near 100% staining of the tumor cells for OCT 3/4 with little or no background staining. In all cases, the staining pattern was nuclear. All of the seminoma components showed strong (3+) staining intensity. All but two of the embryonal carcinoma components showed strong (3+) staining intensity. The two exceptional cases showed a moderate (2+) staining intensity; however there was still nearly 100% OCT 3/4 positivity among the embryonal carcinoma cells of this tumour.

Other GCT components were immunohistochemically negative for OCT 3/4, including yolk sac tumor, mature teratomas and immature teratoma.

In our study of 68 primary testicular neoplasms, we show OCT 3/4 to be sensitive and specific for seminoma and embryonal carcinoma tumour cells. These components showed a nuclear staining pattern, as expected for a transcription factor. The staining was so intense and distinct and with so little background staining that cells expressing OCT 3/4 were unmistakable. In the cases of mixed tumours, the OCT 3/4 staining pattern showed sharp and definite transition between the positively staining elements (seminoma and embryonal carcinoma) and the adjacent negatively staining components. More differentiated testicular tumours of germ cell origin were immunohistochemically negative for OCT 3/4, reflecting their loss of pluripotentiality. Also, the syncytiotrophoblast cells associated with seminomas and embryonal carcinomas, were immunohistochemically negative for OCT 3/4.

The diagnosis of testicular tumours is normally made based solely on histologic morphology. Identifying all components of a mixed GCT is often challenging but is potentially both prognostically and therapeutically important. Diagnostic difficulty arises for a number of reasons: the lesion may be obscured by extensive necrosis; a testicular biopsy specimen may be very small with certain tumor components poorly represented; or the tumour may mimic another type of tumour.

The high sensitivity and specificity of anti OCT 3/4 antibodies for seminoma and embryonal carcinoma in the testis, combined with this stain's easy readability and uniformly high staining intensity, make this immunostain a useful addition to the panel of immunohistochemical stains that are currently being used to accurately classify testicular tumours.

While the primary aim of our study was to establish the specificity of OCT 3/4 immunostaining within the testis, it is reasonable to predict that OCT 3/4 may also prove to be a valuable tool in the diagnosis of metastatic germ cell tumours. Metastatic embryonal carcinomas frequently show loss of CD 30 expression after chemotherapy, making OCT 3/4 immunostains of potential value for its recognition in this particular setting. Additional studies are needed to determine whether OCT 3/4 expression changes in metastatic lesions or after chemotherapy.

In summary, immunostaining with anti OCT 3/4 antibodies is a useful diagnostic tool in the identification of primary testicular embryonal carcinomas and seminomas due to the high

specificity for these types of GCT and the complete lack of immunoreactivity in other types of testicular GCTs and testicular non GCTs.





**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* 2009 Aug 20; 460(7258): 1044.
2. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, et al. Cancer incidence in five continents. IARC Scientific Publications No 155, IARC Press 2003
3. Bergstrom R, Adami HD, Mohner M, et al. Increase in testicular cancer incidence in six European countries: a birth cohort phenomenon. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88:727-733.
4. Moller H. Clues to the aetiology of testicular germ cell tumours from descriptive epidemiology. *Eur Urol* 1993; 23: 8-13.
5. Sharpe RM, Shakkebaek NE. Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and potential new downstream effects. *Fertil Steril* 2008 Feb; 89 (2 Suppl): e 33-8.
6. Skakkebaek NE, Holm M, Hoei-Hansen C, et al. Association between testicular dysgenesis syndrome (TDS) and testicular neoplasia: evidence from 20 adult patients with signs of maldevelopment of the testis. *APMIS* 2003 Jan;111(1): 1-11.
7. Sonne SB, Hoei-Hansen CE, Fisher JS, et al. Do environmental factors play a role in the aetiology of carcinoma in situ of the testis and the testicular dysgenesis syndrome? *Verch Dtsch Ges Pathol* 2004;88: 144-51.
8. Daling JR, Doody DR, Sun X, et al. Association of marijuana use and the incidence of testicular germ cell tumours. *Cancer* 2009 Mar 15; 115(6): 1215-23.
9. Giwercman A, Müller J, Skakkebaek NE. Prevalence of carcinoma in situ and other histopathological abnormalities in testes from 399 men who died suddenly and unexpectedly. *J Urol* 1991; 145: 77-80.
10. Skakkebaek NE. Carcinoma in situ of the testis: frequency and relationship to invasive germ cell tumours in infertile men. *Histopathology* 1978; 2:157-70.
11. Moller H, Skakkebaek NE. Risk of testicular cancer in subfertile men: case control study. *BMJ* 1999;318: 559-62.
12. Giwercman A, Bruun E, Frimodt-Moller C, et al. Prevalence of carcinoma in situ and other histopathological abnormalities in testes of men with history of cryptorchidism. *J Urol* 1989;142:998-1001.
13. Müller J, Skakkebaek NE. Testicular carcinoma in situ in children with the androgen insensitivity (testicular feminization) syndrome. *Br Med J(Clin Res Ed)* 1984; 288:1419-20.

14. Dieckmann KP, Loy V, Buttner P. Prevalence of bilateral testicular germ cell tumours and early detection based on contralateral testicular intra-epithelial neoplasia. *Br J Urol* 1993; 71:340-5.
15. Roth M, Rajpert-De Meyts E, Andresson L, et al. Carcinoma in situ in the testis. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 2000; 205:166-86.
16. Moller H, Skakkebaek NE. Testicular cancer and cryptorchidism in relation to Eprenatal factors. *Cancer Causes Control* 1997; 8:904-12.
17. Depue RH, Pike MC, Henderson BE. Estrogen exposure during gestation and risk of testicular cancer. *J Natl Cancer Inst* 1983; 71:1151-5.
18. Weir HK, Marrett LD, Kreiger N, et al. Prenatal and perinatal exposures and risk of testicular germ cell cancer. *Int J Cancer* 2000; 87:438-43.
19. World Health Classification of Tumours-Pathology and Genetics of tumours of the urinary system and male genital organs, 2004.
20. Angulo JC, Gonzalez J, Rodriguez N, et al. Clinicopathological study of regressed testicular tumours (Apparent Extragonadal Germ cell Neoplasms). *J Urol* 2009 Sep 15 (Epub ahead of point).
21. Weissbach L, Bussar-Maatz R, Mann K. The value of tumor markers in testicular seminomas. Results of a prospective multicenter study. *Eur Urol* 1997; 32:16-22.
22. Bates SE. Clinical application of serum tumor markers. *Ann Int Medicine* 1991; 115:623-638.
23. Bosl GJ, Geller NL, Bajorin D. Serum tumor markers and patient allocation to good- risk and poor-risk clinical trials in patients with germ cell tumors. *Cancer* 1991; 67:1299-1304.
24. Hibi H, Takashi M, Yamada Y, et al. A case of intraperitoneal testicular cancer with ascites. *Urol Int* 1996; 56:259-61.
25. Doherty AP, Bower M, Christmas TJ. The role of tumour markers in the diagnosis and treatment of testicular germ cell cancers. *Br J Urol* 1997; 79:247-52.
26. De Takats PG, Jones SR, Penn R, et al. Alpha fetoprotein heterogeneity: what is its value in managing patients with germ cell tumours? *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 1996; 8:323-6.
27. Bjurlin MA, August CZ, Weldon-Linne M, et al. Histologically pure stage I seminoma with an elevated beta-hCG of 4497 IU/l. *Urology* 2007;70(5):1007.e13-5.
28. Von Eyben FE. A systematic review of lactate dehydrogenase isoenzyme 1 and germ cell tumors. *Clin Biochem* 2001; 34(6):441-54.

- 29.Von Eyben FE. Laboratory markers and germ cell tumours. *Crit Rev Lab Sci* 2003;40(4):377-427.
- 30.Von Eyben FE. Lactate dehydrogenase and its isoenzymes in testicular germ cell tumours: an overview. *Oncoder Biol Med* 1983;4(6):395-414.
- 31.Thorup J, Cortes D. Surgical treatment and follow up on undescended testis. *Pediatr Endocrinol Rev*2009; 7(1): 38-43.
- 32.Vassilis A, Vassilis P, Eleni P, et al. Bilateral testicular intratubular germ cell neoplasia, unclassified in an azoospermic patient, *Int J Urol* 2007; 14(11):1051-3.
- 33.Chen ZF. Clinical significance and management of testicular microlithiasis. *Zhonghua Nav Ke Xue.* 2007; 13(6):483-6.
- 34.Buchler T, Freeman A, Harlands. Contralateral intratubular germ cell neoplasia in a patient with testicular cancer. *Nat Clin Pract Urol* 2008; 5(5):284-8.
- 35.Planelles Gomez J, Beltran Armada JR, Tarin Planes H, et al. Bilateral testicular cancer:a report of four cases. *Actas Urol Esp* 2007; 31(10):1117-22.
- 36.Mikuz G. WHO classification of testicular tumours. *Verh Dtsch Ges Pathol* 2002; 86:67-75.
- 37.Van Casteren NJ, Boellaard WP, Dohle GR, et al. Heterogeneous distribution of IGCNU in an adult testis:Consequences for biopsy-based diagnosis. *Int J Surg Pathol* 2008; 16(1):21-4.
- 38.Balzer BL, Ulbright TM. Spontaneous regression of testicular germ cell tumours: an analysis of 42 cases. *Am J Surg Pathol* 2006; 30(7):858-65.
- 39.Meissner A, Mamoulakis C, de la Rossette JJ, et al. Clinical update on testicular microlithiasis. *Curr Opin Urol* 2009;28(Epub ahead of print).
40. Van Casteren NJ, Looijenga LH, Dohle GR. Testicular microlithiasis and carcinoma in situ overview and proposed clinical guideline. *Int J Androl* 2009; 32:278-87.
- 41.Esposito F, Libertini S, Franco R, et al. Aurora B expression in post-pubertal testicular germ cell tumours. *J Cell Physiol* 2009; 221(2):435-9.
- 42.Chieffi P, Troncona G, Caleo A, et al. Aurora B expression in normal testis and seminomas. *J Endocrinol* 2004; 181(2):263-70.
- 43.Kimura M, Okano Y. Aurora kinases and cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 2005; 32(1):1-5.
- 44.Kollareddy M, Dzubak P, Zheleva D, et al. Aurora kinases: structure, functions and their association with cancer. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2008; 152(1): 27-33.

45. Kristensen DM, Sonne SB, Ottensen AM, et al. Origin of pluripotent germ cell tumours: the role of microenvironment during embryonic development. *Mol Cell Endocrinol* 2008; 288(1-2):111-8.
46. Bierman K, Heukmanp LC, Nettersheim D, et al. Embryonal germ cells and germ cell tumors. *Verh Dtsch Ges Pathol* 2007; 91:39-48.
47. Hori K, Vematsu K, Yososhima H, et al. Testicular seminoma with human chorionic gonadotropin production. *Pathol Int* 1997; 47(9):592-9.
48. Hechelhammer L, Storkel S, Odermatt B, et al. Epidermal growth factor receptor is a master for syncytiotrophoblastic cells in testicular germ cell tumors. *Virchows Arch* 2003; 443(1):28-31.
49. Liu DL, Lu Y, Shi HY, et al. Expression of CD117 in human testicular germ cell tumors and its diagnostic value for seminoma and nonseminoma. *Zhonkua Nan Ke Xue* 2008; 14(1):38-41.
50. Iczkowski KA, Buttler SL, Shanks JH, et al. Trials of new germ cell immunohistochemical stains in 93 extragonadal and metastatic germ cell tumors. *Hum Pathol* 2008; 39(2):275-81.
51. Nikolaou M, Valavanis C, Aravantinos G, et al. kit expression in male germ tumors. *Anticancer Res* 2007; 27(313):1685-8.
52. Emerson RE, Ulbright TM. Morphological approach to tumors of the testis and paratestis. *J Clin Pathol* 2007; 60:866-880.
53. Skakkebaek Ne, Berhtelsen JG, Giwercman A, et al. Carcinoma in situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of all types of germ cell tumours except spermatokytoma. *Int J Androl* 1987; 10:19-28.
54. Guinad S, Hedinger C. Atypical intratubular germ cells and testicular germ cell tumors in children. *Am Pathol* 1981;1:251-7.
55. Sigg C, Hedinger C. atypical germ cells of the testis. Comparative ultrastructural and immunohistochemical investigations. *Virchows Arch* 1984; 402:439-50.
56. Manivel JC, Jessurum J, Wick MR, et al. Placental alkaline phosphatase innunireactivity in testicular germ cell neoplasms. *Am J Surg Pathol* 1987; 11:21-9.
57. Jorgensen N, Rajpert-De Meyts E, Graem N, et al. Expression of immunohistochemical markers for testicular carcinoma in situ by normal human fetal germ cells. *Lab Invest* 1995;72:223-31.
58. Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek Ne. Expression of the c-kit protein product in carcinoma in situ and invasive testicular germ cell tumours. *Int J Androl* 1994; 17:85-92.
59. Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Brondum-Nielsen K, et al. Developmental arrest of germ cell neoplasia. *APMIS* 1998; 106:198-204.

60. Giwercman A, Marks A, Bailey D, et al. A monoclonal antibody as a marker for carcinoma in situ germ cells of the human adult testis. *APMIS* 1988; 96:667-70.
61. Giwercman A, Lindernberg S, Kimber SJ, et al. Monoclonal antibody 43-9F as a sensitive immunohistochemical marker of carcinoma in situ of human testis. *Cancer* 1990; 65:1135-42.
62. Giwercman A, Andrews PW, Jorgensen N, et al. Immunohistochemical expression of embryonal marker TPA-1-60 in carcinoma in situ and germ cell tumors of the testis. *Cancer* 1993; 72:1308-14.
63. Rajpert-De Meyts E, Kvist M, Skakkebaek Ne. Heterogeneity of expression of immunohistochemical tumour markers in testicular carcinoma in situ: pathogenetic relevance. *Virchows Arch* 1996;428:133-9.
64. Aubry F, Satie AP, Rioux-Leclercq N, et al. MAGE A4, a germ cell specific marker, is expressed differentially in testicular tumors. *Cancer* 2001; 92:2778-85.
65. Muller J, Skakkebaek Ne, Lundsteen C. Aneuploidy as a marker for carcinoma-in situ of the testis. *Acta Pathol Microbiol Scand(A)* 1981; 89:67-8.
66. De Graaf WE, Oosterhuis JW, de Jong B, et al. Ploidy of testicular carcinoma in situ. *Lab Invest* 1989; 61:527-31.
67. Ottensen AM, Kirchhoff M, De Meyts ER, et al. Detection of chromosomal aberrations in seminomatous germ cell tumours using comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 20:412-8.
68. Van Echten J, Van Gurp RJ, Stoepker M, et al. Cytogenetic evidence that carcinoma in situ is the precursor lesion for invasive testicular germ cell tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; 85:133-7.
69. Looijenga LH, Rosenberg C, Van Gurp RJ, et al. Comparative genomic hybridization of microdissected samples from different stages in the development of a seminoma and a non-seminoma. *J Pathol* 2000; 92:187-92.
70. Summersgill B, Osin P, Lu YZ, et al. Chromosomal imbalances associated with carcinoma in situ and associated testicular germ cell tumours of adolescents and adults. *Br J Cancer* 2001; 85:213-20.
71. Strohmeyer T, Reissman P, Cordon-Cardo C, et al. Correlation between retinoblastoma gene expression and differentiation in human testicular tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:6662-6.
72. Bartkova J, Rajpert-De Meyts E, Thullberg M, et al. Lack of p19INK4d in human testicular tumours contrasts with high expression during normal spermatogenesis. *Oncogene* 2000; 19:4146-50.

73. Bartkova J, Bartek J, Lukas J, et al. p53 protein alterations in human testicular cancer including pre-invasive intratubular germ cell neoplasia. *Int J Cancer* 1991; 49:196-202.
74. Heinddal K, Lothe RA, Lystad S, et al. No germline TP53 mutations detected in familial and bilateral testicular cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1993; 6:92-7.
75. Kuszyk MA, Serth J, Bokemeyer C, et al. Alterations of the p53 tumor suppressor gene in carcinoma in situ of the testis. *Cancer* 1996; 78:1958-66.
76. Oosterhuis JW, Looijenga LH. The biology of human germ cell tumours: retrospective speculations and new prospectives. *Eur Urol* 1993; 23:245-50.
77. Bergstrom R, Adami HO, Mohner M, et al. Increase in testicular cancer incidence in six European countries: a birth cohort phenomenon. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88:727-33.
78. Moller H. Trends in incidence of testicular cancer and prostate cancer in Denmark. *Human Reprod* 2001; 16:1007-11.
79. Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE. Possible role of sex hormones in the development of testicular cancer. *Eur Urol* 1993; 23: 54-9.
80. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, et al. Germ cell cancer and disorders of spermatogenesis: an environmental connection? *APMIS* 1998; 106:3-11.
81. Holstein AF, Lauke H. Histologic diagnostics of early testicular germ cell tumor. *Int J Urol* 1996; 3:165-72.
82. Von der Maase H, Giwercman A, Muller J, et al. Management of carcinoma in situ of the testis. *Int J Androl* 1987; 10:209-20.
83. Einhorn LH. Curing metastatic testicular cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:4592-5.
84. Large H, Dietal M. Involvement of the DNA mismatch repair system in antineoplastic drug resistance. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125:156-65.
85. Fossa SD, Horwich A, Russel JM, et al. Optimal planning target volume for stage I testicular seminoma: a Medical Research Council randomized trial. *J Clin Oncol* 1998; 17:1146-1154.
86. Eble JN. Spermatocytic seminoma. *Human Pathology* 1994; 25:1035-1042.
87. Parkinson MC, Harland SJ, Harnden P, et al. The role of the histopathologist in the management of testicular germ cell tumour in adults (review). *Histopathology* 2001; 38:183-194.
88. Fishman WH, Inglis NI, Stolbach LL, et al. A serum alkaline phosphatase isoenzyme of human neoplastic cell origin. *Cancer Res* 1968; 28: 150-154.
89. Seargeant LE, Stinson RA. Evidence that three structural genes code for human alkaline phosphatases. *Nature* 1979; 281:152-154.

90. Millan JL. Molecular cloning and sequence analysis of human placental alkaline phosphatase. *J Biol Chem* 1986; 261:3112-3115.
91. Griffin CA, Smith M, Henthorn PS, et al. Human placental and intestinal alkaline phosphatase genes map to 2q34-937. *Am J Hum Genet* 1987; 41:1025-1034.
92. Swallow PM, Povey S, Parker M. Mapping of the gene coding for the human liver/bone/kidney isoenzyme of the alkaline phosphatase to chromosome 1. *Ann Hum Genet* 1986; 50:229-235.
93. Hua JC, Berger J, Pan YC, et al. Partial sequencing of human adult, human fetal, and bovine intestinal alkaline phosphatases: Comparison with the human placental and liver isoenzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:2368-2372.
94. Mc Langlin PJ, Cheng HM, Slade MB, et al. Expression on cultured human tumor cells of placental trophoblast membrane antigens and placental alkaline phosphatase defined by monoclonal antibodies. *Int J Cancer* 1982; 30:21-26.
95. Tucker DF, Oliver RTD, Travers P, et al. Serum marker potential of placental alkaline phosphatase-like activity in testicular germ cell tumours evaluated by H17E2 monoclonal antibody assay. *Br J Cancer* 1985; 51:631-639.
96. Cheville JC, Rao S, Iczkowski KA, et al. Cytokeratin expression in seminoma of the human testis. *Am J Clin Pathol* 2000; 113:583-588.
97. Ulbright TM, Amin MB, Young RH. Tumors of the testis, adnexa, spermatic cord and scrotum. AFIP: Washington 1999.
98. Burke AP, Mostofi FK. Placental alkaline phosphatase immunohistochemistry of intratubular malignant germ cells and associated testicular germ cell tumors. *Hum Pathol* 1988; 19:663-670.
99. Burke AP, Mostofi FK. Spermatocytic seminoma: A clinicopathologic study of 79 cases. *J Urol Pathol* 1993; 1:21-32.
100. Decker I, Rozeboom T, Delemarre J, et al. Placental-like alkaline phosphatase and DNA flow cytometry in spermatocytic seminoma. *Cancer* 1992; 69:993-996.
101. Manivel JC, Jessurum J, Wick MR, et al. Placental Alkaline phosphatase immunoreactivity in testicular germ cell neoplasms. *Am J Surg Pathol* 1987; 11:21-29.
102. Nikolaou M, Valavanis C, Aravantinos G, et al. Kit expression in male germ cell tumors. *Anticancer Research* 2007; 27:1685-1688.
103. Niehans GA, Manivel JC, Copland GT, et al. Immunohistochemistry of germ cell and trophoblastic neoplasms. *Cancer* 1988; 62:113-23.

104. Shah VI, Amin MB, Linden MD, et al. Utility of a selective immunohistochemical(IHC) panel in the detection of components of mixed germ cell tumors(GCT) of testis. *Mod Pathol* 1988; 11:95A.
105. Mostofi AK, Sesterhenn IA, Davis CJ. Immunopathology of germ cell tumours of the testis. *Sem Diagn Pathol* 1987; 4:320-341.
106. Uchida T, Shimoda T, Miyata H, et al. Immunoperoxidase study of alkaline phosphatase in testicular tumor. *Cancer* 1981; 48:1455-1462.
107. Heinrich MC, Blanke CD, Druker BJ, et al. Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. *J Clin Oncol* 2002; 20:1692-1703.
108. Schwab H, Syein H, Gerdes J, et al. Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin's and Reed-Sternberger cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. *Nature* 1982; 299:65-67.
109. Stein H, Masson DY, Gerdes J, et al. The expression of Hodgkins disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberger cells and hystiotic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood* 1985; 66:848-858.
110. Berney DM, Shamash J, Pieroni K, et al. Loss of CD30 expression in metastatic embryonal carcinoma: the effects of chemotherapy? *Histopathology* 2001; 39: 382-385.
111. Smith CA, Gruss HJ, Davis T, et al. CD30 antigen, a marker for Hodgkin's lymphoma, is a receptor whose ligand defines an emerging family of cytokines with homology to TNF. *Cell* 1993; 73:1349-1360.
112. Bowen MA, Olsen KJ, Cheng L, et al. Fuctional effects of CD30 on a large granular cell lymphoma cell line,YY. *J Immunol* 1993; 11:5896-5906.
113. Ferreiro JA. Ber-H2 expression in testicular germ cell tumours. *Hun Pathol* 1994; 25:522-524.
114. Pallesen G, Hamilton-Dutoit SJ. Ki-1(CD30) antigen is regurarly expressed by tumour cells of embryonal carcinoma. *Am J Pathol* 1988; 133:446-450.
115. Latza U, Foss HD, Durkop H, et al. CD30 antigen in embryonal carcinoma and embryogenesis and release of the soluble molecule. *Am J Pathol* 1995; 140: 463-471.
116. Durkop H, Foss HD, Eitelbach F, et al. Expression of the CD30 antigen in non-lymphoid tissues and cells. *J Pathol* 2000; 190:613-618.
117. Hittmar A, Rogatch H, Hobish A, et al. CD30 expression in seminoma. *Hum Pathol* 1996; 27:1166-1171.
118. Michael H, Lucia J, Foster RS, et al. The pathology of late recurrence of testicular germ cell tumours. *Am J Surg Pathol* 2000; 24:257-273.



119. Okamoto K, Okazawa H, Okuda A, et al. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* 1990; 60:461-472.
120. Scholer HR, Dressler GR, Balling R, et al. OCT 4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *EMBO J* 1990; 9:2185-95.
121. Hansis C, Grifo JA, Krey LC. OCT 4 expression in inner cell mass and trophectoderm of human blastocysts. *Mol Hum Reprod* 2000; 6:999-1004.
122. Hansis C, Tang YX, Grifo JA, et al. Analysis of OCT 4 expression and ploidy in individual human blastomeres. *Mol Hum Reprod* 2001; 7:155-161.
123. Pesce M, Wang YX, Wolgemuth DJ, et al. Differential expression of the OCT 4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech Dev* 1998; 71:89-98.
124. Rosner MH, Vigano MA, Ozako K, et al. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* 1990; 345:686-692.
125. Looijenga LH, Stoop H, de Leeuw HP, et al. POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. *Cancer Res* 2003; 63:2244-2250.
126. Palumbo C, Van Roozendaal K, Gillis AJ, et al. Expression of the PDGF alpha-receptor 1,5 KD transcript, Oct 4 and c-kit in human normal and malignant tissues: implications of the early diagnosis of testicular germ cell tumours and for our understanding of regulatory mechanisms. *J Pathol* 2002; 196:467-477.
127. Pesce M, Scholer HR. OCT4: control of totipotency and germline determination. *Mol Reprod Dev* 2000; 55:452-457.
128. Pesce M, Scholer HR. OCT4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells* 2001; 19:271-278.
129. Gaskell TL, Esnal A, Robinson LL, et al. Immunohistochemical profiling of germ cells within the human fetal testis: identification of three subpopulations. *Biol Reprod* 2004; 71:2012-2021.
130. Honecker F, Stoop H, de Kringer RR, et al. Pathobiological implications of the expression of markers of testicular carcinoma in situ by fetal germ cells. *J Pathol* 2004; 203:849-857.
131. Rajpert-De Meyts SE, Hanstein R, Jorgensen N, et al. Development expression of POU5F1 (OCT3/4) in normal and dysgenetic human gonads. *Hum Reprod* 2004; 19: 1338-1344.
132. Hughers IA, Houk C, Ahmed SF, et al. Consensus statement of management of intersex disorders. *Arch Dis Child* 2006; 91:554-563.
133. Cools M, Van Aerde K, Kersemaekers AM, et al. Morphological and immunohistochemical differences between gonadal maturation delay and early germ cell neoplasia in patients with undervirilization syndromes. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:5295-5303.

- 134.Cools M, Drop SL, Woffenbuttel KH, et al. Germ cell tumors in the intersex gonad: old paths, new detections, moving frontiers. *Endocr Rev* 2006; 27:468-484.
- 135.Nichols J, Zenvik B, Anastassiadis K, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription Factor OCT 4. *Cell* 1998; 95:379-391.
- 136.Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantative expression of OCT 3/4 defines differentiation dedifferentiation or selfrenewal of ES cells. *Nat Genet* 2000; 24:372-376.
- 137.Kraft HJ, Mosselman S, Smiths HA, et al. OCT 4 regulates alternative platelet-derived growth factor alpha receptor gene promoter in human embryonal carcinoma cells. *J Biol Chem* 1996; 271:12873-12878.
- 138.Lau S, Chang K. OCT: A sensitive and specific immunohistochemical marker for metastatic germ cell tumours. *Adv Anat Pathol* 2006; 13(2):76-79.
- 139.Gidekel S, Pizov G, Bergman Y, et al. OCT 3/4 is a dose dependent oncogenic fate determinant. *Cancer Cell* 2003; 4:361-370.
- 140.Sperger JM, Chen X, Draper JS, et al. Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumours. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:13350-13355.
- 141.Jones TD, Ulbright TM, Eble JN, et al. OCT staining in testicular tumors: a sensitive and specific marker for seminoma and embryonal carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2004; 28:935-940.
- 142.Almstrup K, Høe-Hansen CE, Wirkner U, et al. Embryonic stem cell-like features of testicular carcinoma in situ revealed by genome-wide gene expression profiling. *Cancer Res* 2004; 64:4736-4743.
- 143.Cheng L, Thomas A, Roth LM, et al. OCT 4: a novel biomarker for dysgerminoma of the ovary. *Am J Surg Pathol* 2004; 28:1341-1346.
- 144.Cheng L. Establishing a germ cell origin for metastatic tumors using OCT immunohistochemistry. *Cancer* 2004; 101:2006-2010.
- 145.Jones TD, Ulbright TM, Eble JN, et al. OCT 4: a sensitive and specific biomarker for intratubular germ cell neoplasia of the testis. *Clin Cancer Res* 2004; 10:8544-8547.
- 146.de Jong J, Stoop H, Dohle GR, et al. Diagnostic value of OCT 3/4 for pre-invasive and invasive testicular germ cell tumors. *J Pathol* 2005; 206:242-249.
- 147.Pavlidis N, Briasoulis E, Hainsworth J, et al. Diagnostic and therapeutic management of cancer of an unknown primary. *Eur J Cancer* 2003; 39: 1990-2005.
- 148.Varadhachary GR, Abbruzzese JL, Lenzi R. Diagnostic strategies for unknown primary cancer. *Cancer* 2004; 100:1776-1785.
- 149.Sporn JR, Greenberg BR. Empiric chemotherapy in patients with carcinoma of unknown primary site. *Am J Med* 1990; 88:49-55.

150. Haainsworth JD, Greco FA. Poorly differentiated carcinoma and germ cell tumors. *Hematol Oncol Clin North Am* 1991; 5:1223-1231.
151. Enhorn LH. Treatment of testicular cancer: a new and improved model. *J Clin Oncol* 1990; 8:1777-1781.
152. Bosl GJ, Motzer RJ. Testicular germ cell cancer. *N Engl J Med* 1997; 337:242-253.
153. Wick MR, Swanson PE, Manivel JC. Placental-like alkaline phosphatase reactivity in human tumors: an immunohistochemical study of 520 cases. *Hum Pathol* 1987; 18: 946-954.
154. Hamilton-Dutoit SJ, Lou H, Pallesen G. The expression of placental alkaline phosphatase (PLAP) and PLAP-like enzymes in normal and neoplastic human tissues. An immunohistological survey using monoclonal antibodies. *APMIS* 1990; 98:797-811.
155. Arber DA, Tamayo R, Weiss LM. Paraffin section detection of the c-kit gene product (CD117) in human tissues: value in the diagnosis of mast cell disorders. *Human Pathol* 1998; 29:498-504.
156. Miettinen M, Lasota J. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005; 13:205-220.
157. Schwarting R, Gerdes J, Durkop H, et al. Ber-H2: a new anti-ki-1 (CD30) monoclonal antibody directed at a formol-resistant epitope. *Blood* 1989; 74:1678-1689.
158. Durkop H, Foss HD, Eitelbach F, et al. Expression of the CD30 antigen in non lymphoid tissues and cells. *J Pathol* 2000; 190:613-618.
159. Dieckmann KP, Skakkebaek NE. Carcinoma in situ of the testis: review of biological and clinical features. *International Journal of Cancer* 1999; 83:815-822.
160. De Gouveia Brazao CA, Pierik F, Oosterhuis JW. Bilateral testicular microlithiasis predicts the presence of the precursor of testicular germ cell tumors in subfertile men. *J Urol* 2004; 171:158-160.
161. Loy V, Wigand I, Dieckman KP. Incidence and distribution of carcinoma in situ in testes removed for germ cell tumour: possible inadequacy of random testicular biopsy in detecting the condition. *Histopathology* 1990; 16: 198-200.
162. Prym C, Lauke H. Carcinoma in situ of the human testis: tumour cells are distributed focally in the seminiferous tubules. *Andrologia* 1994; 26:231-234.
163. Rajpert-de Meyts, Skakkebaek NE. Expression of the ckit protein product in carcinoma-in-situ and invasive testicular germ cell tuours. *Int J Androl* 1994; 17:85-92.

164. Giwercman A, Cantell L, Marks A. Placental-like alkaline phosphatase as a marker of carcinoma-in situ of the testis. Comparison with monoclonal antibodies M2A and 43-9F. *APMIS* 1991; 99:586-594.
165. De Jong J, Stoop H, Dohle G, et al. Diagnostic value of OCT 3/4 for preinvasive and invasive testicular germ cell tumours. *J Pathol* 2005; 206:242-249.
166. Jones TD, Ulbright TM, Eble JN, et al. OCT 4: a sensitive and specific biomarker for intratubular germ cell neoplasia of the testis. *Clin C Res* 2004; 10:8544-8547.
167. Cheng L, Sung MT, Cossu-Rocca P, et al. OCT4: biological functions and clinical applications as a marker of germ cell neoplasia. *J pathol* 2007; 211:1-9.
168. Jones TD, MacLennan GT, Bonnin JM. Screening for intratubular germ cell neoplasia of the testis using OCT4 immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 2006; 30(11):1427-1431.
169. Van Casteren NJ, de Jong J, Stoop H, et al. Evaluation of testicular biopsies for carcinoma in situ: immunohistochemistry is mandatory. *Int J of Andrology* 2008;1-9.
170. Hoei-Hansen CE, Carlsen E, Jorgensen N, et al. Towards a non-invasive method for early detection of testicular neoplasia in semen samples by identification of fetal germ cell specific markers *Human Reproduction* 2007; 22(1):167-173.
171. Van Casteren NJ, Stoop H, Dohle GR, et al. Noninvasive detection of testicular carcinoma in situ in semen using OCT 3/4. *European Urology* 2008; 54:153-160.
172. Masunga R, Kohno H, Dhar KD, et al. Cyclooxygenase-2 expression correlates with tumor neovascularization and prognosis in human colorectal carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 2000; 6:4064-4068.
173. Peterson S, Haroske G, Helmich G, et al. COX-2 expression in rectal carcinoma: immunohistochemical pattern and clinical outcome. *Anticancer Res* 2002; 22:1225-1230.
174. Greene LF, Page DL, Fleming D, et al. American Joint Committee on Cancer(AJCC). *Cancer Staging Manual*. 6<sup>th</sup> Edition. Springer-Verlag: New York,2002.
175. UICC(2002). *TNM Classification of Malignant Tumours*. 6<sup>th</sup> Edition. Wiley & Sons: New York.
176. Emerson RE, Ulbright TM. Morphological approach to tumours of the testis and paratestis. *J Clin Pathol* 2007; 60:866-880.
177. Giwercman A. Editorial comment on: Noninvasive detection of testicular cancer in situ in semen using OCT 3/4. *European Urology* 2008; 54:153-160.
178. Skakkebaek NE. Possible carcinoma in situ of the testis. *Lancet* 1972; 2:516-7.
179. Giwercman A, Berthelsen JG, Muller J, et al. Screening for carcinoma in situ of the testis. *Int J Androl* 198; 10:173-80.

180. Van den belt –Dusebout AW, de Wit R, Glettem JA, et al. treatment specific riskw of second malignancies and cardiovascular disease in 5-year survivors of testicular cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:4370-8.
181. Skakkebaek N, Berthelsen J, Muller J. Carcinoma in situ of the undescended testis. *Urol Clin North Am* 1982; 9:377-85.
182. Dieckmann KP, Kulejewski M, Dichlkeier U, et al. Diagnosis of controlateral testicular intraepithelial neoplasia (TIN) in patients with testicular germ cell cancer: systematic two-site biopsies are more sensitive than a single random biopsy. *Eur Urol* 2007; 51: 175-85.
183. Harland SA, Cook PA, Fossa SD, et al. Intratubular germ cell neoplasia of the controlateral testis in testis cancer: defining a high risk group. *J Urol* 1998; 160:1353-7.
184. Myrup C, Schanack T, Wohlfahrt J. Correlation of cryptorchidism and testicular cancer(letter). *N Engl J Med* 2007; 357:825.
185. Pera MF, Bennett W, Ceretti DP. CD30 and its ligand: possible role in regulation of teratoma stem cells. *APMIS* 1998; 106:169-173.
186. Haigh T, Chen C, Jones CJ, et al. Studies of mesenchymal cells from first trimester human placenta: expression of cytokeratin outside the trophoblast lineage. *Placenta* 1999; 20:615-625.