

PIN'de Bazal Hücre Spesifik Anti-Sitokeratin Antikorum Boyanma Özellikleri

Dr. Füsün Filizel¹, Dr. Cuyan Demirkese¹, Dr. Nesrin Uygun¹,
Dr. Semahat Ertek², Dr. Nafi Oruç¹

ÖZET

Prostatik intraepitelial neoplazi (PIN) invaziv karsinomun prekürsörü olarak kabul edilir. Yüksek derece PIN ile karsinom arasındaki tek fark stromal invazyondur. Bazal hücre tabakasındaki kesinti invazyonun en erken dönemini temsil eder. Çalışmamızda bazal tabakadaki kesintinin derecesini saptamak amacı ile bazal tabakaya özgün yüksek molekül ağırlıklı anti-sitokeratin antikoru kullanıldı. Düşük derece PIN'li olguların %42'si kesintisiz, %58'i fokal kesintili olarak gözlemlendi. Ne var ki yüksek derece PIN'li olguların %13.7'sinde kesintisiz, %55.3'ünde fokal kesintili ve %31'inde geniş kesintili tarzda boyanma saptandı. Karsinomlu olguların hiçbirinde pozitif boyanma görülmedi. Sonuç olarak PIN'in derecesi yükseldikçe bazal hücre kesintisinin ve yaygınlığının arttığı tesbit edildi.

Anahtar Kelimeler : PIN, anti-sitokeratin antikoru, mikroinvazyon, yüksek molekül ağırlıklı sitokeratin

GİRİŞ

Orteil tarafından 1926'da tanımlanan prostatik intraepitelial neoplazi (PIN) prostat adenokarsinomunun potansiyel biyolojik prekürsördür ve morfolojik olarak stromal invazyon dışında kanser ile benzer özellikler gösterir^(1,2).

Benign ve hiperplastik prostat dokusunda duktus ve asinüsler sekretuar hücreler ile döşelidir ve bunların çevresinde bazal membrana paralel, lineer dizilim gösteren, yassı bazal hücre tabakası vardır⁽³⁾. Bazal tabaka hücreleri lokalizasyon, ultrastrüktürel özellikler ve proliferasyon kapasiteleri ile luminal sekretuar hücrelerden farklıdır⁽⁴⁾. Prostat karsinomunda bazal tabaka hücreleri tamamen ortadan kalkmıştır^(4,5,6,7,8). PIN'de ise bazal tabaka hücrelerinde kesinti ortaya çıkar^(1,2,47). Rutinde kullanılan Hematoksilen-eosin boyama yöntemi ile bazal hücre tabakası her zaman seçilemeyebilir. İmmünohistokimyasal tekniklerle anti-sitokeratin antikoları ile bazal tabaka hücrelerinin selektif olarak boyanması ilk olarak Brawer ve ark. tarafından tanımlanmıştır⁽²⁾.

Bu çalışmanın amacı PIN'in derecesi ile bazal tabaka hücrelerindeki kesintinin derecelerini karşılaştırarak aralarındaki korrelasyonun gösterilmesidir. Aynı zamanda benign ve malign prostat lezyonlarının ayırıcı tanısında yüksek molekül ağırlıklı sitokeratinler kullanılarak yapılan immünohistokimyasal boyama yönteminin değerinin vurgulanmasıdır.

THE STAINING PATTERN OF ANTI-CYTOKERATIN ANTIBODY IN PIN

Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) is considered as a precursor of invasive carcinoma. The major distinction between high grade PIN and carcinoma is stromal invasion. Basal cell layer disruption represents the earliest stage of invasion. In our study in order to quantitate the degree of disruption of the prostatic basal layer the high molecular weight anti-cytokeratin antibody, which is specific to the basal layer, was used. Of the low grade PIN, 42% showed no disruption and 58% showed focal disruption. Whereas in high grade PIN, 13.7% had no disruption, 55.3% had focal disruption and 31% had intensive basal cell disruption. All of the carcinoma cases were stained negative with this antibody. As a result, we concluded that the frequency of disruption of the basal cell layer is increased with the increasing grades of PIN.

Key words : .PIN, anti-cytokeratin antibody, microinvasion, high molecular weight anti-cytokeratin

GEREÇ VE YÖNTEM

50 ayrı hastanın total prostatektomi materyalinden normal, hiperplastik prostat dokusu, düşük ve yüksek dereceli PIN ve karsinom içeren bloklar seçilerek bunlara monoklonal anti-sitokeratin antikoru (high molecular weight 34 BE12, keratin 903, Enzo Biochemicals, New York, NY) uygulandı.

Bazal hücreler olarak bahsettiğimiz hücreler prostat glandlarında periferde bazal membrana paralel yerleşimli hücre tabakasıdır.

PIN en son belirlenen kriterlere göre düşük ve yüksek dereceli olarak iki grupta incelendi⁽²⁾. Düşük dereceli PIN'de duktus ve asinüsleri döşeyen hücreler üst üste yığılmıştır, aralarındaki mesafe düzensizdir ve çekirdeklerin boyutlarında farklılık vardır. Yüksek dereceli PIN'de ise düşük derecelide görülen özelliklere ek olarak hücrelerin üst üste yığılması daha belirgindir ve çekirdekler daha iridir, nükleoller belirgindir ve sayıca artmıştır.

İmmünohistokimyasal (İHK) boyamalar peroxidase antiperoxidase (PAP) metodu kullanılarak yapıldı. %10'luk formalinde tesbitli parafine gömülü bloklardan elde edilen 5 mikronluk kesitler poly-L-Lysine (Sigma, P8920) ile kaplı lamalar üzerine alındı. Kesitler 37°C'da 1 gece, 60°C'da 1 saat etüvede

1 Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji A.B.D., İstanbul

2 PTT Hastanesi Patoloji Laboratuvarı, İstanbul

bekletilerek deparafinizasyon aşamalarından geçirildikten sonra distile suda ve fosfat tamponlu serum fizyolojik (PBS) ile yıkandı 20 dakika trypsin ile 37°C da muamele edilip PBS ile 5 dakikaya yıkandı. Her kesite 50 mikrolitre anti-sitokeratin (Anti-Cytokeratin, 34 B E12) damlatıldı, 30 dakika bekletildi. Daha sonra 5 dakika PBS, 20 dakika bağlayıcı antikor (link antibody), 5 dakika PBS, 20 dakika işaretleyici, 5 dakika PBS, 30 dakika kromojen substrat uygulandı. Kontrast boya olarak Mayer hematoxilen kullanıldı ve mounting media ile (glycerol gelatin, GGI Sigma) kapatıldı.

Bazal hücre tabakasındaki kesintiyi değerlendirirken immunohistokimyasal yöntemlerle boyanmış preparatlarda Hedrick ve ark. (5) ve Shah ve ark.'nın (7) uyguladığı derecelendirme kullanıldı. Buna göre olgular kesintisiz (K), fokal kesinti alanları içeren (FK), geniş kesinti alanları içeren (GK), hiç boyanma göstermeyen (negatif) (N) duktus ve asini olarak gruplandırıldı. Bir asinüs veya duktusun çevresindeki tüm bazal hücrelerin boyandığı olgular kesintisiz, bazal hücrelerin hepsinin boyanmadığı ancak %80'inden daha az kısmının boyandığı olgular geniş kesintili olarak kabul edildi. Hiç bir bazal hücrenin boyanmadığı olgular negatif olarak değerlendirildi.

Çalışmamızda her PIN içeren asinüs ve/veya duktus için PIN'in derecesi ve immunohistokimyasal boyama ile bazal tabakadaki kesinti oranı yukarıda tarif edilen gruplandırma sistemine göre belirlendi.

BULGULAR

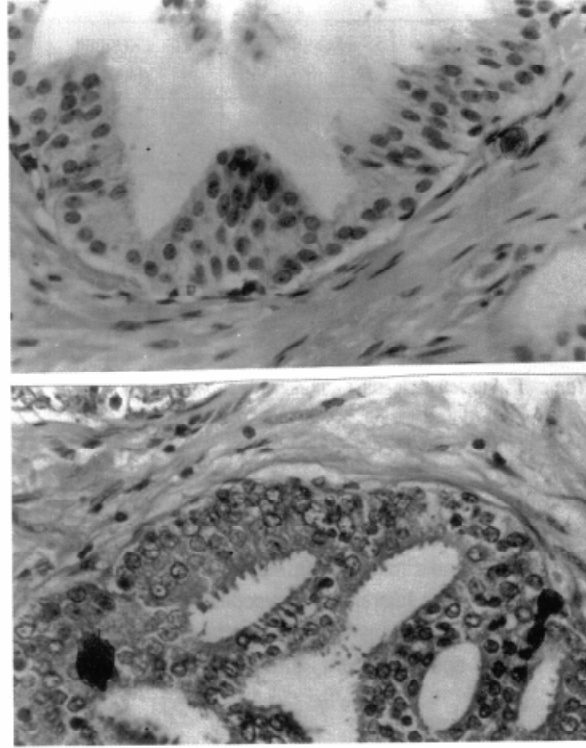
Anti-sitokeratin ile boyanan tüm kesitlerde sekretuar epitel, bağ dokusu, düz kas negatif boyanırken bazal hücreler pozitif boyandı. Tüm sonuçlar Tablo I de gösterilmiştir. 50 ayrı hastadan hazırlanan kesitlerde toplam 1981 asinüs ve duktus incelenmiştir. Bunlardan 767'si düşük derece PIN'li, 694'ü yüksek derece PIN'li, (Resim 1-2) 520'si normal veya hiperplastik asinüs ve duktuslar idi.

520 adet normal veya hiperplastik asinüsün 492'sinde (%94.6) bazal tabaka hücrelerinde kesintisiz (K) tarzda (Resim 3) 28'inde (%5.4) fokal kesintili (FK) tarzda boyanma gözlemlendi. Normal ve hiperplastik asinüslerde geniş kesintili (GK) ve negatif (N) tarzda boyanma saptanmadı.

Düşük derece PIN'li 767 asinüs ve duktusun 322'sinde (%42) kesintisiz (K) tarzda boyanma, 445'inde (%58.0) fokal kesintili (FK) tarzında boyanma görüldü. (Resim 4) Geniş kesintili (GK) ve negatif (N) tarzda boyanma hafif derece PIN de saptanmadı.

Yüksek derece PIN'li 694 asinüs ve duktusun 95'inde (%13.7) kesintisiz (K) tarzda, 384'ünde (%55.3) fokal kesintili (FK) tarzda, 215'inde (%31.0) geniş kesintili (GK) tarzda boyanma izlendi (Resim 5). Negatif (N) tarzda boyanma yüksek derece PIN de görülmüdü.

10 adet Gleason skoru 2 ile 6 arasında değişen karsinomun hepsinde (%100) negatif (N) tarzda boyanma söz konusu idi. Ancak arada kalmış birkaç asinüs çevresinde kesintisiz (K)



Resim 1 : Düşük dereceli PIN'li bir asinüs. Asinüsü döşeyen hücreler üst üste yığılmıştır ve aralarındaki mesafe düzensiz olarak izlenmektedir. (Hematoksilen-eosin x400)

Resim 2 : Yüksek dereceli PIN'li bir asinüs. Kribriform dizilim gösteren döşeyici hücrelerin çekirdekleri iri, nükleoller belirgindir. (Hematoksilen-eosin x400)



Resim 3 : Yüksek moleküler ağırlıklı anti-sitokeratin ile boyanan normal asinüslerde bazal tabaka hücrelerinde kesintisiz tarzda boyanma. (Immunoperoxidaz boyama x100)

ANTİKOR İLE BOYANMA					
MORFOLOJİ	Kesintisiz (K)	Fokal Kesintili (FK)	Geniş Kesintili (GK)	Negatif (N)	TOPLAM
Normal ve Hiperplastik	492 %94.6	28 %5.4	0	0	520
Hafif PIN	322 %42	445 %58	0	0	767
Yüksek PIN	95 %13.7	384 %55.3	215 %31	0	694

Tablo 1 : Yüksek moleküler ağırlıklı anti-sitokeratin antikoru ile boyanmış duktus ve asininin boyanma özellikleri.

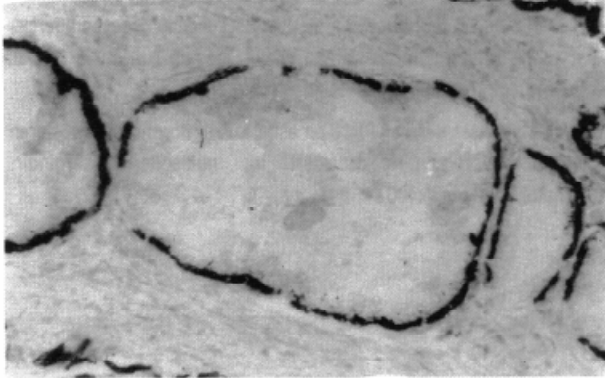
tarzda boyanma gözlemlendi.

TARTIŞMA

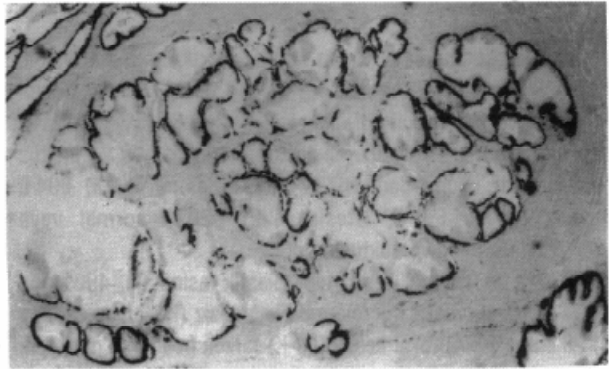
İmmünohistokimyasal yöntemlerle prostattaki bazal hücreler memenin asini ve ektrin glandlarının myoepitelial hücreleri gibi anti-sitokeratin antikolarıyla pozitif boyanırlar⁽⁹⁾. Ancak bazal tabaka hücrelerinin myoepitelial hücrelerden farklı enzim histokimyasına sahip oldukları ve anti-S-100 protein, anti-muscle spesifik aktin antikolarıyla boyanmadıkları

bilinmektedir^(7,10). Davranış olarak da myoepitelial hücreler prostatin bazal tabaka hücrelerinden farklıdır. Memenin myoepitel hücreleri intraluminal bir karsinom gelişmeye başladığında invazyon gerçekleşene kadar tam olarak kalırlarken prostat bazal hücrelerinde kayıp intraluminal olaylarla erkenden başlar⁽⁹⁾.

Bazal hücre tabakasının varlığı özellikle prostat adenokarsinomu ile bazı prostat lezyonlarının ayırıcı tanısında



Resim 4 : Yüksek moleküler ağırlıklı anti-sitokeratin ile boyanan düşük dereceli PIN'de bazal tabaka hücrelerinde fokal kesintili boyanma. (İmmunperoksidaz boyama x100)



Resim 5: Yüksek moleküler ağırlıklı anti-sitokeratin ile boyanan yüksek dereceli PIN'de bazal tabaka hücrelerinde geniş kesitli tarzda boyanma. (İmmunperoksidaz boyama x40)

önem kazanmaktadır. Morfolojik özellikleri nedeniyle prostat adenokarsinomuyla sıkça karışan bazı lezyonlar atrofik gland, atipik adenosis, bazal hücre hiperplazisi, PIN ve radyasyona bağlı değişikliklerdir^(1,5,6,8,11). Ancak bu lezyonların hepsinde bazal tabaka hücreleri kesintili veya kesintisiz olarak mevcuttur. Oysa prostat adenokarsinomlarında bazal tabaka hücreleri tamamen ortadan kalkmıştır. Bu lezyonlar içinde en çok tanı güçlüğü yaratan PIN ile kribriform tipte karsinomdur^(1,8).

Bu çalışmada PIN'in derecesi ile kesinti derecesi arasındaki

korelasyon incelenmiştir. Benzer amaçlı yapılan diğer çalışmalar gözden geçirildiğinde, Bostwick⁽⁴⁾ Shah⁽⁷⁾ ve PIN'in derecesi yükseldikçe bazal tabakadaki kesintinin sıklığının ve yaygınlığının arttığını vurgulamaktadırlar. Bostwick ve arkadaşları (4) bazal hücre tabakasındaki kesintinin yüksek dereceli PIN'in bir göstergesi ve erken invazyonun bir belirtisi olduğunu savunmaktadırlar. Aynı çalışmada yüksek dereceli PIN'lerin %52 sinde bazal hücre tabakasında kesinti oranının %30 dan fazla olduğu buna karşın düşük dereceli PIN'lerin

ancak %10'unda %1 oranında kesintinin varolduğu gösterilmiştir(4). Shah ve arkadaşları (7) ise PIN 1 olgularının %52 sinde; PIN 2 olgularının %60'ında; PIN 3 olgularının %37 sinde bazal tabaka hücrelerinde fokal kesinti alanları olduğunu saptamışlardır. Geniş kesinti alanlarını ise PIN 2 olguların %16 sinde, PIN 3 olguların %25'inde gözlemişlerdir. Karsinomların ise %97.5'inde antisitokeratin antikoruyla hiç boyanma izlenmemiştir.

Çalışmamızda PIN derecesi ile kesinti miktarı arasında literatürde gözlemlendiği gibi benzer korelasyon gözledik (Tablo 1) (4,7). Shah ve ark.nın (7) bulgularına paralel olarak, düşük dereceli PIN de %58 olguda fokal kesinti alanları saptanırken, geniş alanlarda kesinti ve tam kayba rastlanmadı. Ancak Shah ve ark.nın (7) bulgularının tersine bazal tabaka hücrelerinin tam kaybı yüksek dereceli PIN'lerde saptanmadı. Karsinomlarda tam bazal hücre kaybı literatür bilgileri ile uyumlu bir bulgudur (4,5,8).

Çalışmamızda bazı kesitlerde hiç boyanma gözlenmeyen asinus ve duktuslar mevcuttu, ancak bunlar morfolojik olarak şüpheli alanlar olmadığından bunlar artefakt olarak yorumlandı.

Normal ve hiperplastik prostatlardaki %5.4 oranında saptadığımız kesintinin de sebebinin aynı şekilde artefakt olabileceği düşünüldü. Hedrick ve Epstein (5) formalin tespitli parafin bloklarda kesinti oranının, frozen kesitlere oranla daha yüksek olduğunu belirtmişler ve bu sonucun formalin tespiti veya parafine gömülmeye bağlı bir artefakt olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu özellik iğine biopsileri için de söz konusudur. Bazı araştırmacılar immünohistokimyasal yöntemle iğne biopsilerinde negatif boyanma saptandığında eğer morfolojik olarak aynı görüntüde diğer asinüslerde pozitif boyanma mevcut ise negatif boyanan alanların değerlendirmeye alınmaması gerektiğini savunmaktadırlar (5,6,8). Normal ve hiperplastik prostata %5.4 oranında saptadığımız kesintiyi de aynı nedenlerle kayda değer kabul etmedik.

Çalışmamızın sonuçları ve literatürden elde edilen bilgiler, ışığında yüksek moleküler ağırlıklı anti-sitokeratin antikoru ile boyandığında PIN'in derecesi yükseldikçe bazal hücre kesinti sıklığının ve yaygınlığının arttığı söylenebilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Bostwick DG, Amin MB, Dundore P, Marsh W, Schulfz DS. Architectural Patterns of High-grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia. *Hum Pathol* 1993; 24: 298-310.
2. Brawer MK. Prostatic Intraepithelial Neoplasia: A Premalignant Lesion. *Hum Pathol* 1992; 23: 242-248.
3. McNeal JE. Prostate. In: Sternberg SS. *Histology for pathologist*. Raven Press. New York, 1992; 749-763.
4. Bostwick DG, Brawer MK. Prostatic Intra-Epithelial Neoplasia and Early Invasion in Prostate Cancer. *Cancer* 1987; 59: 788-794.
5. Hedrick L, Epstein JI. Use of Keratin 903 as an Adjunct in the Diagnosis of Prostate Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1989; 13(5): 389-396.
6. Kramer CE, Epstein JI. Nucleoli in Low-grade Prostate Adenocarcinoma and Adenosis. *Hum Pathol* 1993; 24: 618-623.
7. Shah A, Schlageter MO, Stinett P, Lechago J. Cytokeratin Immunohistochemistry as a Diagnostic Tool for distinguishing Malignant from benign Epithelial lesions of the Prostate. *Mod Pathol* 1991; 4(2): 220-224.
8. Wojna KJ, Epstein L. The Utility of Basal Cell-Specific Anti-Cytokeratin Antibody (34B12) in the Diagnosis of Prostate Cancer A review of 228 Cases. *Am J Surg Pathol* 1995; 19(3): 251-260.
9. Nagle RB, Ahmann FR, McDaniel KM, Paquin ML, Clark VA, Celniker A. Cytokeratin Characterization of Human Prostatic Carcinoma and Its Derived Cell Lines. *Cancer Res* 1987; 47: 281-286.
10. Grignon DJ, Ro JY, Ordonez NG, Ayala AG, Cleary KR. Basal Cell Hyperplasia, Adenoid Basal Cell Tumor, and Adenoid Cystic Carcinoma of the Prostate Gland: An Immunohistochemical Study. *Hum Pathol* 1988; 19: 1425-1433.
11. Brawer MK, Peehle DM, Stamey TA, Bostwick DG. Keratin Immunoreactivity in Benign and Neoplastic Human Prostate, *Cancer Res* 1985; 45: 3663-3667.