

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KÜÇÜK YUVARLAK MAVİ HÜCRELİ TÜMÖRLERDE
FISH METODU İLE EWS/FLI 1
TRANSLOKASYONU, N-MYC AMPLİFİKASYONU VE PTEN
MUTASYONUNUN GÖSTERİLEREK AYIRICI TANIDA
KULLANILMALARI VE C-KİT (CD 117) EKSPRESYONUNUN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. ÇİĞDEM VURAL**

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ÖMER ULUOĞLU**

ANKARA, 2007

TEŞEKKÜR

Asistanlığım süresince bilgi ve deneyimleri ile yetişmemde büyük katkıları bulunan değerli hocalarım, başta Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gülen Akyol ve tez danışmanım Prof. Dr. Ömer Uluoğlu olmak üzere, Prof. Dr. Leyla Memiş, Prof. Dr. Ömür Ataoğlu, Prof. Dr. Ayşe Dursun, Doç. Dr. Aylar Poyraz, Yrd. Doç. Dr. Nalan Akyürek, Yrd. Doç. Dr. Özlem Erdem, Uzm. Dr. İpek Işık Gönül, Uzm. Dr. Özgür Ekinci, Uzm. Dr. Pınar Uyar Göçün'e, birlikte çalışmaktan zevk duyduğum araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve tezimin teknik kısmındaki yardımlarından dolayı tüm laboratuvar personeline en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Çiğdem Vural

Ankara,2007

İÇİNDEKİLER

I.	GİRİŞ.....	1- 2
II.	GENEL BİLGİLER.....	3- 37
III.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	38- 42
IV.	BULGULAR.....	43- 62
V.	TARTIŞMA.....	63- 101
VI.	ÖZET.....	102- 103
VII.	SUMMARY.....	103-104
VIII.	KAYNAKLAR.....	105- 123

GİRİŞ

Küçük yuvarlak mavi hücreli tümörler genellikle pediatrik yaş grubunda görülen ve kötü prognoza sahip bir tümör grubudur. Bu grup içerisinde Ewing sarkom/Primitif nöroektodermal tümör(ES/PNET), rabdomyosarkom, nöroblastom, malign lenfoma, dezmoplastik yuvarlak hücreli tümörler, nöroendokrin karsinom, hepatoblastom, az diferansiye sinoviyal sarkom, mezenkimal kondrosarkom, küçük hücreli osteosarkom, erişkinlerde küçük hücreli anaplastik karsinom ve yuvarlak hücreli liposarkom sayılabilir. Morfolojik olarak benzerlik göstermelerine rağmen prognoz ve tedavi protokollerindeki farklılıklar nedeniyle bu tümörler arasında ayırıcı tanı yapılması önemlidir. İmmünohistokimyasal özelliklerinin de örtüşmesi, ayırıcı tanı yapabilmek için elektron mikroskopisi ve sitogenetik gibi yöntemlere başvurulmasına neden olmuştur. Son zamanlarda moleküler patolojideki gelişmeler; fleuroscent in situ hybridisation (FISH) ve reverse transcriptase polimerase chain reaction (RT-PCR) analizleri; küçük yuvarlak mavi hücreli tümörlerin sınıflandırılması ve ayırıcı tanısında kolaylıklar sağlamıştır (22, 34, 35, 40). ES/PNET vakalarındaki EWS/FLI1 translokasyonu (t(11;22)(q24;q12)), rabdomyosarkomdaki PAX3/NCOA1 translokasyonu (t(2;2)(q35;p23)), nöroblastomdaki N-Myc amplifikasyonu, dezmoplastik yuvarlak hücreli tümörlerdeki EWS/WT1 translokasyonu (t(11;22;21)(p13;q12;q22-1)) ve Willm's tümörlerindeki WT-1 gen ekspresyonu FISH yöntemi ile çeşitli problemler kullanılarak gösterilebilmektedir (15, 40, 64, 98, 124).

Ayrıca; özellikle ES/PNET ailesi olmak üzere küçük yuvarlak mavi hücreli tümörlerde bir tirozin kinaz reseptörü olan c-kit ekspresyonu da saptanmıştır ve bunun tümör progresyonunda rolü olabileceği düşünülmektedir. 4. kromozomda lokalize olan kit geni, anti-apoptotik rolü olan bir proto-onkogendir. Tümörde bu ekspresyonunun saptanması, tedavide c-kit inhibitörü olan imatinib mesylate kullanımı yönünden ümit vericidir (2, 26, 75).

Bu çalışmada 58 küçük yuvarlak mavi hücreli tümör olgusu retrospektif olarak incelenmiş, H&E kesitleri ve immünhistokimyasal boyaları tekrar gözden geçirilmiş, yaş, klinik evre, tümör boyutu, tümör lokalizasyonu ve klinik gidiş gibi klinikopatolojik parametreler değerlendirilmiştir. Ayrıca küçük yuvarlak mavi hücreli tümörlerin ayırıcı tanısında EWS/FLI1 translokasyonu, N-MYC amplifikasyonu ve PTEN mutasyonu araştırılmış ve bu tümörlerin tedavisinde mit olabilecek olan c-kit ekspresyonu değerlendirilmiştir.

GENEL BİLGİLER

“Küçük yuvarlak mavi hücreli tümörler” terimi; genellikle pediatrik yaş grubunda görülen, nükleus/sitoplazma oranı artmış, küçük ve monoton, undiferansiye hücrelerden oluşan, son derece agresif giden bir grup tümörü tanımlamak için kullanılmaktadır (22). Benzer morfolojik görünimleri nedeniyle ayırıcı tanıları problem yaratmaktadır ama bu kategoriye giren tümörlerin prognoz ve tedavileri farklı olduğu için doğru tanıyı tam koymak önemlidir (124, 126). Küçük yuvarlak mavi hücreli tümörlerin ayırıcı tanısı geniştir ve Ewing’s sarkom/Primitif nöroektodermal tümör (ES/PNET), rabdomyosarkom, nöroblastom, az diferansiye sinovial sarkom, mezenkimal kondrosarkom, küçük hücreli osteosarkom, yuvarlak hücreli liposarkom, malign lenfoma, dezmoplastik küçük yuvarlak hücreli tümör ve erişkinlerde küçük hücreli anaplastik karsinomları bulundurur . Bu tümörlerin ayırıcı tanısında ışık mikroskopik özellikler ve klinik özelliklerin sınırlı olarak kullanılabilmesi ve immünohistokimyasal özelliklerin tümörlerin birçoğunda örtüşmesi nedeni ile genellikle elektron mikroskopisi, sitogenetik ve moleküler genetik çalışmalara (FISH ve RT-PCR) başvurulmaktadır (34, 35, 40).

EWING’S SARKOM/ PNET AİLESİ

Ewing’s sarkom/PNET ailesi (ES/PNET) sıklıkla çocuk ve genç erişkinlerde görülen, kemik-yumuşak dokunun malign tümörüdür, Ewing’s sarkom, Primitif nöroektodermal tümör ve Askin tümörünü bulundurur (58, 73, 87).

Ewing sarkomu (ES) olarak bilinen patolojik süreç ilk olarak 1866 yılında Lucke tarafından tarif edilmiştir. Daha sonra 1918’de Arthur Purdy Stout undiferansiye yuvarlak hücrelerden oluşan, rozet formasyonları içeren ulnar sinir tümörü rapor etmiş, bundan 3 yıl sonra James Ewing 14 yaşında kız çocuğunda, radiusta yuvarlak hücreli neoplazm raporlamış,

buna “kemiğin diffüz endotelyomasi” adını vermiştir. 1975 yılında Angervall ve Enzinger tarafından ilk defa yumuşak dokunun Ewing’s sarkomu (ekstraskletal Ewing’s sarkom) tanımlanmış, 1979’da Askin ve arkadaşları PNET ile benzer histolojik özellikler ve klinikopatolojik profil içeren “torakopulmoner bölgenin malign küçük hücreli tümörü”(Askin tümörü)nü rapor etmişlerdir (36, 124).

Orjinalinde ES ve PNET tamamen farklı antiteler olarak tanımlansalar da 1975’de Angervall ve Enzinger’in “ES’a benzeyen ekstraskletal neoplazmi”ve 1984’de Jaffe ve arkadaşlarını “kemiğin nöroektodermal tümörü” tanımlamaları ile bu ayırım bozulmaya başlamış, en sonunda ES ve PNET vakalarının her ikisinde birden %90’dan fazla oranda benzer genetik özelliğin saptanması üzerine ortak histolojik spektruma sahip bu tümörler “Ewing ailesi tümörler” başlığı altında toplanmışlardır. Bu iki tümörde de proto-onkogen (c-myc, c-myb, c-src, c-mil/raf) ekspresyon patternleri aynıdır ve hem Ewing’s sarkom hem de PNET’in %95’inde MİC2 gen ürünü ekspresyonu bulunmuştur (36, 124).

Köken aldıkları hücre hala bilinmemektedir. Günümüzde kabul edilen hipotez kaynak hücrenin birçok hücreye farklılaşabilme yeteneğini koruyan bir mezenkimal kök hücre ya da erken primitif nöroektodermal hücre olduğudur (56).

ES/PNET primer malign kemik tümörlerinin %6-8’ini oluşturur ve çocuklarda kemik ve yumuşak doku sarkomları arasında osteosarkomdan sonra ikinci sırada yer almaktadır. Çok belirgin olmamakla beraber erkeklerde daha sık görülmekte olup erkek/kadın oranı 1.4/1 dir (34, 51, 58). Beyazlar daha sık etkilenirler. En sık 5-20 yaş arasında (ortalama 14 yaş) görülür. 40 yaşından sonra ve 5 yaşından önce görülmesi seyrekir (3, 56, 58).

Herhangi bir ailesel yatkınlık veya çevresel faktörle ilişkisi saptanamamıştır. Ama ES/PNET ailesi tümörlerin tedavisi sonrası sekonder kanser insidansı artmıştır. Bunlardan en sık görülenler özellikle radyasyon nedenli osteosarkom ve tedavi ilişkili akut lösemidir.

Genellikle uzun kemiklerde, bunlardan da en sık femur, daha sonra tibia, fibula ve humerusta görülür. 2. sıklıkta görüldüğü pelvik kemiklerden başka kosta, skapula, vertebra, klavikula ve kafatası dahil olmak üzere tüm kemikleri etkileyebilir. Yumuşak doku, deri ve visseral organlar gibi vücudun herhangi bir yerinden de kaynaklanabilir. Nadiren ES/PNET intrakranial yerleşimli de olabilir (santral PNET) (56, 93).

Tümörler genel olarak hızlı büyürler, sıklıkla derin lokalizasyonlu olmakla birlikte nadiren süperfisyal de olabilirler. Tanı anında belirti ve bulgular hem konstitüsyonel, hem de hastalığın çıktığı yer ile ilgilidir. Çoğunlukla ilk ortaya çıkan semptomlar primer tümör bölgesinde lokalize ağrı ve kitledir. Uzun kemiklerde lokalize tümörlerde %15 vakada patolojik fraktür, özellikle ileri evreli hastalarda ateş, kilo kaybı gibi sistemik semptomlar da olabilir (56, 125). Düz grafilerde tipik olarak kemiğin diafizinde veya daha seyrek olarak metafizyal/diafizyal bölgede sınırları belirsiz destrüktif lezyonlar, soğan zarı şeklinde periost reaksiyonu ve yumuşak doku kitlesi görülür. MRI ve CT kemik ve yumuşak dokuda yayılımın gösterilmesinde yardımcı çalışmalardır (34).

Çıplak gözle genellikle 5-10 cm boyutunda, multilobüle, yumuşak ve çabuk parçalanan kitleler oluşturur. Kesit yüzü sarı-gri renkli olmakla birlikte nekroz, kist ve hemoraji alanları sıktır. Yaygın nekroza rağmen kalsifikasyon seyrek. Histopatolojik görünüm bir spektrum göstermektedir. Ewing sarkom bu spektrumun daha undiferasiye, PNET ise nöral diferansiasyonun bulunduğu formudur. Klasik Ewing sarkom lobüler patternde dizilim gösteren, küçük hiperkromatik nükleuslu, belirsiz nükleollü, dar sitoplazmalı monomorfik yuvarlak hücre tabakalarından oluşur. Bazı vakalarda intrasellüler glikojen depolanması sonucu irregüler vakuoller bulunur. Bunların miktarı tümörden tümöre değiştiği gibi benzer neoplazmların farklı alanlarında değişkendir. Mitotik figür sayısı değişkendir. Vasküler yapılardan zengin bir tümördür. Yaygın nekroz ve damarlar çevresinde

korunmuş tümör hücreleri bulunabilir. Özellikle nüks ve tedavi sonrası belirgin sitolojik atipi ortaya çıkabilir. Tipik PNET tabakalar ve lobüller şeklinde dizilmiş, koyu boyanan yuvarlak veya oval nükleuslu hücrelerden ibarettir. Sitoplazmanın sınırlarının düzensiz olduğu alanlarda hücreler daha matürdür, saç benzeri sitoplazmik uzantılar bulundurlar ve rozet formasyonları oluştururlar. Rozetler sıklıkla santralinde nörofibriler materyalden ibaret solid kor içeren Homer-Wright rozetleri veya daha nadiren merkezinde bir lümen veya vezikül içeren Flexner-Vintersteiner rozetleri şeklindedirler. Bazı tümörler küçük yuvarlak hücre kordonları veya trabeküllerinden ibarettirler. PNET'lerin yaklaşık %10-20'sinde iğsi alanlar vardır ve primitif fibrosakom veya malign schwannoma benzerler. Nadiren tümörler glial, ependimal, kartilajinöz veya epitelyal diferansiasyon da bulundurabilirler (17, 56, 124).

Bu histolojilerin yanında ES/PNET ailesi içinde bazı varyantlar da bulunmaktadır (56, 64, 124):

- “Adamantinoma benzeri” ES/PNET: Adalar tarzında büyüme patterni gösteren, orta derecede pleomorfik ve hiperkromatik hücrelerden oluşan, belirgin periferik palizadlanma ve belirgin dezmoplastik konak cevabı oluşturan tümöral lezyondur. Bazı vakalarda pearl formasyonu olabilir.
- Spindle hücreli sarkoma benzeri ES/PNET: Tipik PNET'te görülenden fazla iğsileşme vardır. İyi gelişmiş dallanan damarlara sahiptir. Sinovial sarkomu andırır.
- Sklerozan ES/PNET: Sklerozan epitelioid fibrosarkom veya sklerozan rabdomyosarkomu andıran abondan hiyalinize matriksi vardır.

- Büyük hücreli ES/PNET (“Atipik ES”): Tipik ES'un yapısal özelliklerini gösterir ama orta derecede nükleer genişleme, irregüler nükleer kontür ve sık, belirgin nükleol nedeniyle “Atipik ES” adı verilmiştir. ES, Atipik ES (large cell varyant) ve PNET ayrımının bazı

kriterleri tanımlanmıştır (Tablo-I). Bu lezyonlar histogenetik olarak ilişkili tümörler oldukları için ES, atipik ES veya PNET’li bir vakada bu kriterlerin varlığı çok da kritik değildir.

Tablo-I: ES/PNET ailesinin ışık mikroskopik özellikleri:

ÖZELLİK	KLASİK ES	ATİPİK ES	PNET
Hücre şekli	Uniform, yuvarlak	irregüler	irregüler
Kromatin	İnce	Kaba	Kaba
Nükleol	Toplu iğne başı	Sıklıkla belirgin	Belirgin
Glikojen	Abondan	Orta	Dar
Rozet	Yok	Yok	Var

Histokimyasal olarak %65’i abondan intrasitoplazmik glikojen içerir (91).

İmmünohistokimyasal olarak FLI-1 ve CD-99 yüksek oranda sensitif markerlardır (35). ES/PNET ailesinde NSE, NF, CD-56, Leu-7, S-100, Sinaptofizin, kromogranin, PGP 9.5 gibi nöral markerlar da pozitifdir. Sitokeratin, SMA ve desmin pozitifliği de gösterilmiştir (40, 47, 124).

- FLI-1 (Friend Leukaemia virus integration 1) , CD-99 ile karşılaştırıldığında daha spesifik bir markerdır ve nükleer boyandığı için bunun pozitifliğini saptamak membranöz boyanma gösteren CD-99’un pozitifliğini saptamaktan daha kolaydır. Ayrıca doku içinde hemen her zaman bulunan endotelial hücrelerinde pozitif kontrol olarak kullanılması CD-99’a göre avantajdır. Normalde endotelial hücreler, T-lenfositler gibi hematopoetik hücrelerde ekspresse edilir ve sellüler proliferasyon, endotelial diferansiasyon, kan damarı gelişimi ve tümörögeneziste rol alır. FLI-1 proteini ES/PNET için %71-94 oranında sensitif ve yüksek oranda (%92) spesifik bir markerdır (35, 36, 56, 73). FLI-1 protein ekspresyonu sadece ES/PNETlerde değil lenfoblastik lenfoma, Non-Hodgkin lenfomalar, nöroblastom, Merkel hücreli karsinom, melanom, vasküler tümörler (benign ya da malign), meme karsinomu,

akciğer karsinomu ve DKYHT’de de görülebilmektedir (35, 36, 99). Mhavech- Fauceglia ve ark ile Llombart- Bosch ES/PNET tanısı için CD-99 ve FLI-1’in kullanılabileceklerini rapor etmişlerdir (66, 73).

Histolojik özellikleri gibi ultrastrüktürel özellikleri de geniş bir spektrum içerir. Tipik ES spesifik özellikleri olmayan uniform yuvarlak hücrelerden ibarettir ve abondan glikojen depozitleri ile karakterlidir. Ribozomlardan fakirdir. Diğer yandan PNET dens-kor granüller, nöritik hücre uzantıları, nörofilamanlar ve nörotübüller gibi değişik derecelerde nöral diferansiasyon bulguları gösterir.

ES/PNET ailesi tümörlerde karakteristik olarak 22q12 bölgesindeki EWS genini ilgilendiren resiprokal bir translokasyon bulunur. t(11;22)(q24;q12) translokasyonu olguların %85-95’inde görülür Bu translokasyondan başka 4 farklı translokasyon daha göze çarpmaktadır. En sık görülen 2. translokasyon EWS/ERG t(21;22)(q22;q12)’ye tümörlerin %5-10’unda raslanmaktadır. Seyrek görülen diğer translokasyonlar ise sırasıyla EWS-ETV1 t(7;22)(p22;q12), EWS-EIAF t(17;22)(q12;q12) ve EWS-FEV t(2;22)(q33;q12)’dir. Bu tümörlerde belirleyici kromozomal translokasyonlara ek olarak Trizomi 8, Trizomi 12; del(22), del(16q) ve del(1p36) gibi kromozom anomalilerine de rastlanır.

Lokalize tümörü olan hastalarda tedavi küratif cerrahi, radyasyon terapisi/ multiajan kemoterapisidir. Yüksek riskli hastalarda kemik iliği transplantasyonu yapılabilir (124).

Başlıca prognostik faktörler, tanı anında tümörün yaygın olması, kemoterapiye tümör cevabı, cerrahi tedavi sonrası tümör nekrozunun derecesidir. Ayrıca, tümörün yumuşak dokudan kaynaklanması, metastaz, pozitif cerrahi sınır, nöral diferansiasyon, Tip-1 dışındaki gen füzyon transkriptlerinin de kötü prognostik faktörler oldukları bilinmektedir (64,124).

RABDOMYOSARKOM

Rabdomyosarkom (RMS), çocuklarda en sık görülen yumuşak doku sarkomu olup morfolojik, immünohistopatolojik veya ultrastrüktürel olarak çizgili kas diferansiasyonu gösteren hücreler içerir (25, 55, 81, 90). Çocuklarda malign yumuşak doku tümörlerinin yaklaşık %50'sini oluşturur (25).

Sıklıkla sporadik olarak meydana gelir. Genetik faktörlerin rol oynayabileceği düşünülmüş olup konjenital anomalilerle beraberliği tanımlanmıştır (124).

Başlıca 3 histolojik alt gruba ayrılır: 1- Alveolar rabdomiosarkom (ARMS), 2- Embriyonel rabdomyosarkom (ERMS) ve 3- Pleomorfik rabdomyosarkom (PLRMS). () ERMS'un kendi içinde botroid, iğsi hücreli ve anaplastik varyant olmak üzere 3, ARMS'un tipik özellikli, solid pattern ve hem alveolar hem de embriyonel RMS'un histolojik özelliklerini gösteren mikst tip olmak üzere 3 alt tipi vardır (25, 34, 64).

Genel olarak rabdomyosarkomlar en sık baş-boyun bölgesi, genitoüriner sistem ve retroperiton, alt ve üst ekstremitelerden kaynaklanmakla birlikte klinik özellikleri ve lokalizasyonları, histolojik alt tiplerine göre değişkenlik göstermektedir (124).

RABDOMYOSARKOM ALT TİPLERİ

Embriyonel Rabdomyosarkom

Embriyonik çizgili kasın fenotipik ve biyolojik özelliklerini gösteren primitif, malign bir yumuşak doku sarkomudur. Tüm rabdomyosarkomların yaklaşık %49'unu oluşturur.

Genel olarak 3-12 yaş arasındaki çocuklarda görülür. Erkeklerde görülme sıklığı kadınlardan biraz daha fazladır. Beyaz ırkta görülme oranı daha sıktır.

En sık baş-boyun bölgesinden (özellikle orbita, nazofarenks, orta kulak ve oral kavite) kaynaklanır. Retroperitoneum, bilier kanal, ürogenital sistem, daha az sıklıkla ekstremiteler, torakal kavite ve deriden de gelişebilir.

Embriyonel rabdomyosarkom farklı anatomik yerleşimlerine bağlı olarak genellikle kitle etkisi ve obstrüksiyon ile ilişkili çeşitli klinik semptomlar ile gelir. Baş-boyun bölgesindekiler proptozis, diplopi, sinüzit ve unilateral işitme kaybına neden olurlar. Genitoüriner lezyonlar skrotal kitle ve üriner retansiyon, bilier tümörler sarılık yaparlar. Kitlenin hızlı büyümesine bağlı semptomlar da olabilir.

Histolojik olarak embriyonik çizgili kasın analogu olan embriyonel rabdomyosarkom myogenezisin çeşitli evrelerindeki primitif mezenkimal hücrelerden yani rabdomyoblastlardan oluşur. Sık görülen özellikleri: 1-) yoğun, genellikle perivasküler alanlarda ve epitel altında lokalize hipersellüler alanlar ile daha gevşek yapıda miksoid alanları değişen oranlarda içeren çeşitli derecelerde sellülarite, 2-) oryantasyonları bozulmuş, küçük, hiperkromatik, yuvarlak veya iğsi şekilli undiferansiye hücreler ve karakteristik eozinofilik sitoplazması ile rabdomyoblastların yani diferansiye hücrelerin karışımı, 3-) az sayıda kollajen ve değişen miktarlarda miksoid materyal içeren bir matriks. Açık amfofilik sitoplazmalı ve santral oval nükleuslu stellat hücreler sıklıkla bu spektrumun en primitif halleridir. Bu hücreler diferansiye oldukça progressif olarak daha fazla sitoplazmik eozinofili ve uzamış şekil kazanırlar, %50-60 oranında görülen sitoplazmik enine çizgilenmeler, belirgin myotüp oluşumları ve çok nükleusluluk terminal diferansiasyonun göstergesidir. Tümörde değişen derecelerde anaplazi saptanabilir (64, 124).

Embriyonel rabdomyosarkom terimi iğsi hücreli, botroid ve anaplastik varyantları içine alır (34).

Embriyonel Rabdomyosarkomun İğsi Hücreli Tipi: İlk defa 1992 yılında Cavazzana ve arkadaşları tarafından genellikle erkeklerde görülen ve özellikle paratestiküler alanda lokalize olan, sellüler diferansiasyonun geç evresinde fetal myotüpleri taklid eden belirgin elonge, iğsi hücrelerden ibaret ve iyi prognoza sahip farklı bir antite olarak tanımlanmıştır. EM-RMS'un

nadir bir tipidir, tüm RMS'ların %5'inden azını oluşturur. Paratestiküler alan (%38) yanı sıra baş-boyun bölgesi (%27) , ekstremiteler (%10), genitoüriner sistem (%10) ve diğer alanlarda (%15) da görülebilir. Histolojik olarak dens dizilen, girdap veya fasiküller oluşturan iğsi hücreleri içerir. Sigara şeklinde nukleuslu, belirgin nükleollü, elonge fuziform hücrelerden ibarettir. Tümör hücreleri ileri evre fetal myoblastlara benzer şekilde hücre sınırları belirgin eozinofilik fibriler sitoplazmaya sahiptirler (25, 64, 124).

Embriyonel Rabdomyosarkom'un Botroid Tipi: Yunanca “üzüm” kelimesinden türetilen ve çıplak gözle üzüm benzeri polipoid büyüme ile karakterize, tüm rabdomyosarkomların yaklaşık %6'sını oluşturan, sıklıkla nazal kavite, nazofarinks, bilier kanal, mesane ve vajina gibi mukoza ile döşeli içi boş organlarda bulunan bir tümördür. Undiferansiye tümör hücrelerinin subepitelyal yoğunlaşması ile karakterize “kambium tabakası” intakt yüzey epiteli ile gevşek stroma zonunu birbirinden ayırır ve tanı koymak için bu tabakanın varlığı önemlidir. Tümör hücreleri primitif küçük hücrelerden myoblastik diferansiasyonunu tamamlamış hücrelere kadar değişen görünümde olabilir. Stroma tipik olarak gevşek sellüler, miksoid görünümündedir (64, 124).

Embriyonel Rabdomyosarkom'un Anaplastik Tipi: Anaplastik varyant ERMS'lar nadirdir. Anaplazi kriterleri; büyük, lobüle, hiperkromatik nükleus (normal nükleusun en az 3 katı kadar) ve atipik (aşık, multipolar) mitotik figürdür. Anaplastik hücrelerin dağılımına göre 2 gruba ayrılır: 1-) fokal (grup I) anaplazi; non-anaplastik hücrelerin arasında dağılmış tek veya birkaç hücreden ibarettir. 2-) diffüz (grup II) anaplazide anaplastik hücreler kümeler veya tabakalar oluşturmuştur. Diffüz anaplazi kötü gidişli bir histolojidir ve 5 yıllık sağ kalım %2 civarındadır. Kodet ve arkadaşları sellüler pleomorfizmin sadece diffüz olduğunda kötü yorumlanabileceğini ve tüm tümörlerde bulunabileceğini söylemişlerdir. Anaplastik varyant

ERMS'un erişkin pleomorfik RMS'dan ayırımının yapılması zordur ve tipik ERMS alanlarının tanımlanması yardımcı olabilir (9, 124).

Alveolar Rabdomyosarkom

ARMS ve ERMS'un klinik gidiş ve tedavi yaklaşımlarındaki farklılıklar nedeniyle birbirlerinden ayırımlarının yapılması gerekmektedir (90). Alveolar rabdomyosarkom, sitolojik olarak lenfomaya benzeyen ve parsiyel iskelet kası diferansiasyonu gösteren primitif, malign, yuvarlak hücreli bir neoplazmdır. Mikroskopta akciğer benzeri yapısı nedeniyle bu isim verilmiştir (124).

İkinci sıklıkta görülen alt tiptir, tüm rabdomyosarkom'ların yaklaşık %31'ini oluşturur. Her yaşta görülebilmekle birlikte genellikle ERMS'dan daha büyük yaş grubunu etkiler. En sık görüldüğü yaşlar 10-25 yaş arasındır. Erkek/kadın oranı hemen hemen eşittir. Coğrafi veya ırksal yatkınlık göstermez (69, 97, 124).

ARMS sıklıkla ekstremitelerin derin yumuşak dokularından kaynaklanır, tüm ekstremitte rabdomyosarkomlarının yaklaşık %50'sini meydana getirir. Ek olarak baş-boyun bölgesi, gövde, pelvis, retroperitoneum, paraspinal, perineal bölge ve paranazal sinüslerde de görülebilir (69, 124).

Tipik olarak hızlı büyüyen ekstremitte kitlesi ile kendini gösterir. Paranazal lezyonlar proptozis veya kranial sinir defisiti ile gelebilirler, perirektal tümörler ise konstipasyona neden olabilirler.

3 majör histolojik alt tipi vardır: 1-tipik özellikli 2- solid patternli 3- mikst embryonel ve alveolar pattern. Genel histopatolojik özellikleri; fibrokollajenöz septa ile ayrılmış, kohezyonunu kaybetmiş minimal primitif kas diferansiasyonu gösteren "küçük yuvarlak mavi hücre" gruplarının varlığı, tipik olarak alveolar hücre adalarında ayrışma artefaktları ve santral kümelerde yüzüyormuş gibi kistik bir görünümüdür. Alveollerin periferindeki hücreler

fibröz septaya yapışıkırlar ve fibröz septa üzerinde tek sıralı olarak dizilirler. Multinükleer dev hücreler belirgindir ve alveolar rabdomyosarkomlarda tanımsal önemli bir özelliktir.

ARMS'un solid varyantı alveolar patternin kaybolduğu, fibrovasküler stroma içermeyen ve çeşitli rabdomyoblastik diferansiasyon gösteren yuvarlak hücrelerin sıkı gruplar halinde diziliminden oluşur. Bu haliyle embriyonel rabdomyosarkomun yuvarlak hücreli alanlarına benzer ama sellüler uniforme daha fazladır ve fibrozis yok veya çok azdır.

Mikst embriyonel/alveolar rabdomyosarkom adında da anlaşılacağı gibi hem alveolar hem de ERMS özellikleri gösterir.

Granüler sitoplazmalı neoplastik rabdomyoblastlar ERMS'dan daha az sıklıktadır, vakaların yaklaşık %30'unda bulunur. Alveolar alandaki rabdomyoblastların çoğu yuvarlak veya oval konfigürasyondadır, fibröz septa içindeki veya septaya bağlı olan hücreler şerit şeklinde veya iğsi olma eğilimindedirler. Eğer çapraz striasyonlar varsa hemen hemen daima iğsi hücrelerdedir (90, 124).

Pleomorfik Rabdomyosarkom

Pleomorfik rabdomyosarkom, hemen hemen sadece erişkinlerde görülen, bizar, poligonal, yuvarlak veya spindle hücrelerden oluşan, iskelet kası diferansiasyonu gösteren yüksek dereceli bir sarkomdur. Embriyonel ve alveoler komponent içermeyen ve tüm RMS'lar arasında en az görülen gruptur.

Bu lezyonlar hemen hemen daima 45 yaşından büyük erişkinlerde görülürler (ortalama 56 yaş). Erkekler daha sık etkilenirler.

Genellikle ekstremitelerde, özellikle de kalça bölgesinde görülürler. Daha nadiren göğüs duvarı, retroperitoneum ve baş-boyun bölgesinden de kaynaklanabilirler. Sıklıkla hastalar birkaç ayda hızlı büyüyen ağrısız şişlik ile başvururlar.

Histopatolojik olarak gevşek bir zeminde dağılmış hiperkromatik nükleuslu ve koyu eozinofilik sitoplazmalı büyük, yuvarlak veya pleomorfik hücrelerden ibarettir. Var olan rabdomyoblastlar genellikle daha büyük ve daha irregüler şekillidirler. Tümör hücreleri dağınık bir patternde dizilmiş olabilirler ama malign fibröz histiositomdaki gibi storiform bir pattern veya leiomyosarkom benzeri fasiküler bir pattern görülebilir. Tanıda en yardımcı ışık mikroskopik özellik koyu eozinofilik sitoplazmalı büyük bizar tümör hücrelerinin bulunmasıdır. Nadiren lezyonlar belirgin nükleolus içeren periferik yerleşimli veziküler nükleus ve intrasitoplazmik eozinofilik hiyalin inklüzyon bulunduran rabdoid morfoloji ile karakterize hücreler içerebilir. Diğer özellikleri tümör hücrelerinin fagositozu, intrasitoplazmik glikojen varlığı ve orta yoğunlukta lenfositik infiltrattır.

Agresif neoplazmlardır ve sıklıkla erken dönemlerde metastaz yaparlar (64, 124).

Tüm RMS alt tiplerinde tanıda fosfotungstik asid-hematoksilen gibi özel boyalar kullanarak çapraz-striasyonların gösterilmesi kullanılabilir. Ayrıca immünohistokimyasal olarak myojenik diferansiasyonu değişik derecelerde gösteren desmin, MSA (HHF35), myoglobin, sarkomerik α -aktin (%73), Miyozin (%81), Tropomiyozin, α -aktinin, titin ve Z-protein gibi markerların pozitifliği olabilir ve myojenik regülatör gen ailesinin üyeleri olan myogenin ve myoD1 kullanılabilir (64, 89, 124). Vimentin tüm RMS'larda ekspresse edilmektedir ama undiferansiye olanlarda iyi diferansiyelerden daha belirgindir (124). RMS'ların küçük bir kısmında NSE, sitokeratin ve NF gibi nonmyojenik markerlar da rapor edilmiştir (89).

Bu tümörlerde ışık mikroskopik ve elektron mikroskopik bulgular koreledir. Z-band, hegzagonal yerleşimli ince ve kalın filamentler, kalın filament içeren bir A bandı, H ve M bandı, leptomerik yapılar gibi sarkomer ilişkili yapıların tanımlanması ile RMS tanısı konfirme edilebilir (64).

ERMS'da kromozom 11q'da delesyon meydana gelir (24, 43, 61). Alveolar rabdomyosarkom tanısı konan tümörlerin %75-80'İ PAX3-FKHR veya PAX7-FKHR füzyon transkriptlerini ekspresse ederler. ARMS'ların yaklaşık yarısında N-myc amplifikasyonu varken ERMS'da bulunmaz (64, 124).

Multimodal tedaviler sayesinde RMS'da sağ kalım 1970'lerde %25 iken günümüzde %70'lere ulaşmıştır. Multimodal tedaviler cerrahi, radyoterapi ve kemoterapiden ibarettir (25).

Sık kullanılan prognostik parametreler; prezentasyon anında hastanın yaşı, hastalığın yaygınlığı, primer tümör alanı ve boyutu, histolojik tipi ve verilen tedavi tipidir (55).

NÖROBLASTİK TÜMÖRLER

Periferal nöroblastik tümörler; nöroblastom, ganglionnöroblastom ve ganglionörom'u bulundurlar ve çocukluk çağının en sık görülen nöroblastik ekstrakranial solid tümörlerini oluştururlar (35, 109). Bunlar ortak bir neoplazmin matürasyonları farklı 3 alt grubudurlar. Nöroblaston bu yelpazenin en ilkel kısmını oluştururken ganglionnöroblastom primitif nöroblastlar ve matüre ganglion hücrelerini içerir ve içerdği bu hücrelerin sayısı ile dizilimi sonucu biyolojik davranışı farklılıklar gösterir. Ganglionörom tümü ile diferansiye bir tümördür ve matür schwann hücreleri ile ganglion hücrelerinin karışımı ile karakterizedir (124).

Nöroblastom adrenal medulla veya sempatik ganglionlarda normalde bulunan primordial nöral krest hücrelerinden köken alır ve tüm çocukluk çağı kanserlerinin %8-10'unu oluşturur. Erkeklerde 1,22-1,26 kat daha sık görülmektedir. Genellikle erken çocukluk döneminde görülmekte olup en sık prezentasyon yaşı 18 aydır. Nöroblastom'un etyolojisi bilinmemektedir. Beckwith-Wiedemann Sendromu, Hirschsprung hastalığı, ailede

feokromasitom tanısı, fetal hidantoin sendromu, fetal alkol sendromu ve nesidioblastozis gibi bazı hastalıklarla birlikteliği söz konusudur (15, 64, 124).

Yaklaşık %70'i retroperitoneal yerleşimlidir ve bunların da büyük çoğunluğu adrenalde lokalizedir. Mediasten, servikal bölge, sakral bölge gibi diğer alanlardan da kaynaklanabilir. Genel prezentasyonu ilk olarak ailenin fark ettiği abdominal kitledir. Seyrek olarak vakalarda sulu diare, Cushing Sendromu, heterokromia iridis, Horner Sendromu (tümör servikal veya mediastinal ise), opusklonus/ myoklonus (paraneoplastik, otoimmün sendrom da olabilir) görülebilir. Tanıda laboratuvar bulguları ve radyolojik bulgular yardımcıdır. Radyolojik olarak kalsifikasyon karakteristik bir bulgudur ve tümörlerin yaklaşık yarısında vardır. Tipik olarak kalsifikasyon tümörün santral kısmında ince noktasal dansite şeklindedir. Nöroblastomlu hastaların %80-90'ında katekolamin (epinefrin ve norepinefrin) seviyesi ve bunların metabolitlerinin (vanilmandelik asit (VMA), homovalinik asit (HVA) ve 3- metoksi-4- hidroksifenilglikol (MHPG)) seviyesi artar. Bu maddelerin ölçümü tanı koymada ve tedavi boyunca hastalığın monitörizasyonunda kullanılabilir (64, 124).

Çıplak gözle genellikle büyük, yumuşak, gri renkli ve nispeten iyi sınırlı, lobüle tümörlerdir. Hemoraji, nekroz ve kalsifikasyon alanları sıklıkla bulunur. Histopatolojik incelemede kullanılan Uluslararası Nöroblastom Patolojik Sınıflaması (Shimada klasifikasyonunun modifikasyonu ile oluşturulmuş) tümörün morfolojik özellikleri ve prognoza dayanan bir sınıflamadır (15, 44, 64).

Sınıflandırma (International Neuroblastoma Pathology Committee-1999)

1. Ganglionörom (GN)

- GN, matürleşmekte : Tümörün tamamına yakını ganglionöromatöz komponentten oluşmakta, ancak sınırları belirsiz odaklarda ya da serpintiler halinde nöroblastomatöz komponent vardır.

- GN, matür : Tümörün tamamı ganglionöromatöz komponentten oluşmaktadır.

2. Ganglionöroblastom (GNB)

- GNB, nodüler (klasik) : Tümörün %50' sinden fazlası ganglionöromatöz komponentten oluşmaktadır. Bu komponente ek olarak, makroskopik iyi sınırlı nöroblastomatöz (hemorajik) nodül/nodüller vardır.

- GNB, intermikst : Tümörün %50' sinden fazlası ganglionöromatöz komponentten oluşmaktadır. Bu alanların içerisinde mikroskopik olarak sınırları ayırt edilebilen nöroblastomatöz foküsler vardır.

- GNB, atipik : Tümör daha baskın olarak nöroblastomatöz komponentten oluşmaktadır. Ancak tümörün çevresinde ya da içlerindeki septalarında ganglionöromatöz komponent alanları vardır.

3. Nöroblastom (NB)

- NB, andifferansiye: Nöroblast differansiyasyonu ya da matürasyonu kriterleri olan nükleer vezikülasyon, nükleol belirginleşmesi, sitoplazmanın genişlemesi ve eosinofilik-amfofilik özellik kazanması ve nöropil zemini yoktur.

- NB, az differansiye: Nöroblastların %5' inden azında differansiyasyon kriterleri vardır.

- NB, differansiye: Nöroblastların %5' inden fazlasında differansiyasyon kriterleri vardır.

- NB, NOS (not otherwise specified) Subtipleme ya da prognostik kategorinin değerlendirilemediği yetersiz biyopsilerde bu terminoloji kullanılmalıdır .

Genel olarak nöroblastom ince inkomplet fibröz septalar nedeniyle belli-belirsiz nodüler bir büyüme patterni gösterir. Hemoraji sıktır, bazen psödoasküler veya alveolar yapılar meydana getirebilir. Kalsifikasyon çok belirgin bir özellik olabilir, toz gibi bazofilik

noktalanmalar gibi görünebilir, yuvarlak konsantrik agregatlar oluşturabilir veya tümör hücrelerini tek tek çevreleyerek “kümes teli” görünümüne neden olabilir. Nekroz yaygın olabilir ve kan damarları çevresinde viabl tümör hücreleri bulunur. Tümör hücreleri lenfositten hafif büyük, koyu boyanmış yuvarlak nükleuslara sahip, sınırları belirsiz dar sitoplazmalı küçük ve regüler hücrelerdir. $\frac{3}{4}$ vakada belirgin bir kan damarı ile ilişkisiz ve santral lümen bulundurmayan, ortada fibriler bir materyal ile dolu alan çevresinde dizilmiş tümör hücrelerinden ibaret HomerWright rozetleri bulunur (44, 97, 124).

Nöroblastik tümörlerde nöroendokrin antijenler (NSE, NF protein, S-100 protein, PGP-9,5, Kromogranin, vazoaktif intestinal peptid ve sinaptofizin) değişen oranlarda pozitif boyanırlar. Ayrıca monoklonal bir antikor olan NB-84 nöroblastoma hücrelerinde bulunan 57kDa'luk sensitif ama spesifik olmayan bir markerdir.

- NB84, 57 kDa ağırlığında bir moleküldür (85). Nöroblastik tümörlerde yüksek sensitif bir antikor olarak tanımlanmakla birlikte komplet spesifikliği yoktur (124). Medulloblastom, rabdomyosarkom, nefroblastom, küçük hücreli osteosarkom, ONB ve lenfoblastik lenfomada da pozitif olabileceği rapor edilmiştir (85). Miettinen ve ark, NB-84'ün KYMHTlerin ayırıcı tanısından ziyade NB olduğu düşünülen vakaların tanısında kullanılabileceğini rapor etmişlerdir (74).

- NB hücreleri 66/ α -internexin, periferin, Gangliozyd-2 antikor, sekretogranin II, vazoaktif intestinal peptid ve mikrotübül ilişkili protein ile de pozitif olabilirler (64, 74).

Ultrastrüktürel olarak NB'lar geniş bir sitolojik diferansiasyon aralığına sahiptirler. Daha az diferansiye hücreleri diğer tümörlerin primitif hücrelerinden ayırmak zordur, çünkü; dar rim şeklinde sitoplazma, serbest ribozomlar haricinde az sayıda organeller ve az sayıda 50 nm. boyutunda heterojenöz granüle sahiptirler. Daha diferansiye hücelerde ince nöroflamentler (8-12nm.) ve mikrotübüller (24-26 nm.) boyutunda sitoplazmik prosesler

bulunur. Böyle tümörlerde ganglionik diferansiasyon mitokondri, ribozom, polizom ve perinükleer golgi aparatlarında artış sonucu sitoplazmada artış ile ilişkilidir. Ganglionöromatöz alanlar matür ganglion hücrelerine ek olarak bazal lamina ile ilişkili uzun koni şeklinde sitoplazmik proseslerle karakterli schwann hüceleri içerirler (124).

Nöroblastom'da tümör hücrelerinde gösterilmiş genetik değişiklikler hastalığın patogenezinde ve prognozunda rol oynayabilmekte ve tümörün biyolojik yapısı hakkında bize bilgi vermektedir. Ayrıca olguların risk gruplarına ayrılması ve hedeflenmiş tedavilerin planlanması yönünden çok önemlidir.

- Nöroblastom hücresindeki DNA miktarı normal (diploid) veya artmış (near-triploid) olabilir. Özellikle infantlarda prognostik önemi vardır. Hiperdiploid tümör, diploid tümöre göre daha iyi prognozu gösterir (15). Hastalarda hiperdiploidi iyi gidişle korele iken diploidili hastalarda kemoterapötik ajanlara direnç söz konusudur. Hiperdiploid hastalar diploid hastalarda daha az yoğun kemoterapötik ajanlarla tedavi edilirler (14).

- 17q bölgesinde dengesiz fazlalık: Nöroblastom'ların yaklaşık yarısında 17. kromozom uzun kolunda allelik fazlalık saptanmaktadır. Varlığı agresif tümör ve kötü prognozla ilişkilidir.

- 1p delesyonu: Tanı sırasında tümör dokusunda %25-35 oranında saptanmaktadır. İleri evre hastalarda daha sık olup N-myc amplifikasyonu ile birlikteliği fazladır. 1p36 bölgesindeki delesyon bu bölgedeki tümör supresör genin kaybına sebep olmaktadır. Varlığı kötü prognozla ilişkilidir (15). Caron ve ark 1p delesyonunun N-myc'den bağımsız olarak kötü gidişle ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (14).

- 11q delesyonu: Tanıda olguların %35'inde vardır. İlginç olarak 11q delesyonu varsa MYCN amplifikasyonu asla bulunmaz. Ancak yine de yüksek risk özellikleri (ileri evre, büyük yaş, kötü patoloji) ile birliktelik göstermekte ve kötü prognostik gösterge olarak değerlendirilmektedir.

- Nörotrofin Reseptörlerinin ekspresyonları: Sempatik sisteme ait nöroblastların nasıl nöroblastom hücrelerine malign dönüşüm gösterdiği hala tam bilinmemektedir. Nöroblastların normal diferansiasyonunu uyaran nörotropin reseptör yolaklarının bu malign dönüşümde rol oynadığı düşünülmektedir. Nörotrofin reseptörleri olan TrkA, TrkB ve TrkC'nin ligandları NGF, BDNF ve NT-3'dür. TrkA aktivasyonu hücrelerin diferansiasyonunu sağlarken, bu aktivitenin inhibisyonu hücreyi apoptozise yönlendirir. TrkA/NGF yolağı nöroblastların ganglion hücresine diferansiasyonunu veya apoptozis yoluyla tümörün spontan regresyonunu kontrol eder. Tümör dokusunda TrkA yüksek ekspresyonu iyi klinik özellikler (küçük yaş, düşük evre), MYCN amplifikasyonunun yokluğu ile ilişkilidir ve iyi prognozu işaret eder. TrkB yüksek ekspresyonu ise agresif tümör ve MYCN amp. ile güçlü olarak ilişkilidir. TrkB/BDNF yolağı hücrenin ilaç direncini belirler. TrkC ise TrkA reseptörü ile aynı özelliklere sahiptir, ek bir prognostik önemi yoktur (14, 15).
- Telomeraz aktivitesi: Nöroblastom hücrelerinde hücre diferansiasyonu ve apoptozisle ilişkili genlerin ekspresyonu arttığında telomeraz aktivitesi düşük bulunurken, hücre siklusu ile ilişkili genler ve transkripsiyon faktörlerinin overekspresyonu yüksek telomeraz aktivitesi ve kötü prognozla ilişkilidir (15).

NB tedavisi hastalığın evresine bağlıdır. Cerrahi eksizyon, multiajan kemoterapi ve kemik iliği transplantasyonunu içerir.

3 yıllık sağ kalım %30 civarındadır. Prognostik faktörler; hastanın yaşı, tümörün lokalizasyonu, evresi, histolojik tipi, S-100 protein boyasının yaygınlığı, üriner VMA/HVA düzeyi, kromozom 1p'nin allelik kaybı, kromozom 17q artışı, N-myc amplifikasyonu, TRK gen ekspresyonu, ve serum ferritin, NSE ve laktat dehidrogenaz seviyesi gibi bazı laboratuvar bulguları olarak sayılabilir (64, 124).

OLFAKTÖR NÖROBLASTOM

Olfaktor nöroblastom; ilk defa 1924 yılında Berger ve Luc tarafından tanımlanan, olfaktör membranının primitif bazal hücrelerinden kaynaklanan nazal kavitenin nadir görülen özel bir malign nöroektodermal tümörüdür (1, 8, 114). Tüm intranasal kitle nedenlerinin %3'ünü oluşturur (23). Farklı morfolojik görünümünün olmasından dolayı orijini tartışma konusudur ve histolojik prekürsör lezyonlar henüz tanımlanmamıştır. Tümör hücrelerinin embriyogenezis sırasında gelişen ve adolosan yaşta yerini respiratuar mukozaya bırakan nöroepitelyumdan kaynaklandığı düşünülmektedir. Diğer olası orijin alanları olfaktör plakod, Jacobson'un vomeronasal organı ve sfenopalatin ganglionudur. Sıklıkla nazal kavitede görülmekle birlikte nadiren nazofarinks, maksiler sinüs ve etmoid sinüsten de kaynaklanabilir (8, 83, 114). 2-90 yaşları arasında her yaşta görülebilir ama daha çok 20'li ve 50'li yaşlarda bimodal yaş dağılımı gösterir. Erkek ve kadında eşit sıklıkta meydana gelir. Beyazlarda daha sık görülür. Yüksek vaskülaritesi olan bu tümörlerde en sık görülen klinik semptomlar, lokalize lezyonlar için nasal obstrüksiyon, anosmi ve epistaksistir. Radyografik olarak tümörde benekli kalsifikasyon saptanabilir. Tümörün yayılımına bağlı spesifik kemik değişiklikleri olabilir (23, 57, 124).

Çıplak gözle lezyonlar yumuşak, vaskülarize, gri, polipoid kitlelerdir. Hemoraji ve nekroz içerebilirler. Histolojik olarak 2 patterni vardır: "nöroblastom benzeri" ve "nöroendokrin karsinom benzeri" pattern. "Nöroblastom benzeri" olfaktör nöroblastomun tipik mikroskobik görünümü yuvarlak nükleuslu, dar sitoplazmalı uniform küçük hücrelerden oluşan sellüler bir tümör olmasıdır. Diğer nörojenik tümörlerde olduğu gibi fibriller veya retküler bir zemini vardır. Rozetler bulunabilir. Tümör hücre adalarını ayıran abondan fibrovasküler bir stroma bulunabilir. Vasküler proliferasyon bazen tümörün gerçek doğasını kapatacak kadar florid olabilir. bazı vakalarda tümör hücrelerinin sitoplazmalarında melanin

bulunabilir. Bazen büyük hücrelerden oluşan solid büyüme patterni gösterebilir ve bazen de bunun bir modifikasyonu olarak uniform-ovoid nükleus, belirsiz nükleol, rölatif olarak abondan , hafif eozinofilik, granüler sitoplazmalı hücrelerin oluşturduğu orta büyüklükte poligonal sellüler organizasyon yapar, kollajen bandlarla lobülasyonlara ayrılabilir ve paragangliomayı andıran zellballen görünümü ortaya çıkabilir. “Nöroendokrin karsinom benzeri” patternde ise görünüm karsinoid tümörü andırır ve tümör daha büyük, daha bol sitoplazmaya sahip, solid adalar oluşturmuş, epitelyal görünümdeki hücrelerden oluşur (57, 97, 124).

İmmünohistokimyasal olarak tüm tümörlerde bir veya daha fazla nöral marker (sinaptofizin(%64-100), kromogranin, NSE (%84-100), NF(%73)) ekspresyonu görülür. Paraganglioma varyantında periferde lokalize sustentaküler hücrelerde S-100 pozitifdir (48, 57, 124).

Ultrastrüktürel olarak hücreler primitif nöroblast özelliklerine sahiptirler: nörosekretuar granüller ve mikrotübül içeren hücre uzantıları, sıklıkla çok sayıda pleomorfik mitokondri ve yaygın paranükleer golgi kompleksi vardır. Sustentaküler benzeri hücrelerin uzun silendir uzantılarının tümör hücrelerinin her birini veya gruplarını kapladığı görülebilir (1, 124).

Tedavi yaklaşımı komplet cerrahi rezeksiyon ve postoperatif radyoterapidir (23).

Olfaktor nöroblastomun 5 yıllık yaşam süresi %50-66 olarak bildirilmektedir. Rekürrens sıktır. Mikroskobik pattern, histolojik özellikler ve ultrastrüktürel özellikler ile klinik davranış arasında bir ilişki yoktur (64).

DEZMOPLASTİK KÜÇÜK YUVARLAK HÜCRELİ TÜMÖRLER

Dezmoplastik küçük yuvarlak hücreli tümörler (DKYHT), ilk olarak 1989 yılında Gerald ve Rosai tarafından tanımlanan, genç erkeklerde abdominal ve/ veya pelvik peritonda

birlikte lokalize olan agresif klinik gidişe sahip, tedaviye cevabı çok kötü olan seyrek görülen bir antitedir (38, 85, 95).

Özellikle 2. ve 3. dekaddaki erkek hastaları (6 ile 49 yaş arasında, ortalama 22 yaş) etkiler. Erkek/ kadın oranı: 2/1- 5/1 arasında değişmektedir. Tipik olarak çok sayıda peritoneal implantların bulunduğu büyük intraabdominal kitlelerle prezente olurlar (38, 124). Paratestiküler alan, over, plevra, tunika vajinalis, parotis bezi ve santral sinir sisteminde de tanımlanmıştır (38, 84, 95, 124). En sık semptom ve bulguları, karın ağrısı, palpabl abdominal kitle, abdominal distansiyon ve hepatomegalidir (38).

Çıplak gözle büyük, solid, multilobüle kitleler oluşturur. Kesit yüzü gri, gri-beyaz renktedir, bazen distorsiyone olarak kistik değişiklikler ve nekroz alanları bulundurur. Bazen miksoid değişiklikler içerebilir. Mikroskopik olarak tümörlerin çoğu hipervasküler dezmoplastik bir stroma içine gömülmüş küçük yuvarlak veya oval hücrelerin değişken boyutlu, keskin sınırlı adalarından ibarettir. Büyük tümör hücre adaları sıklıkla santral nekroz alanları bulundurur. Tipik olarak sellüler agregatlar sadece dağılmış iğsi şekilli fibroblastlar ve myofibroblastlardan oluşan abondan fibröz bağ doku ile ayrılır ve çevrelenir. Tümör hücreleri küçük hiperkromatik nükleus, belirsiz nükleol ve dar eozinofilik sitoplazma içerir ve undiferansiye görünümündedir. Mitoz görülebilir. Vakaların çoğunda nükleus uniform görünümde iken bazı tümörlerde fokal alanlarda artmış atipi vardır. Hücreler değişik patternlerde dizilebilirler: santral nekrozlu büyük adalar, tübül benzeri yapılar, “zelballen” patternine benzer şekilde fibrovasküler septalarla ayrılan trabeküller ve memenin lobüler karsinomuna benzer şekilde tek hücre kordonları oluşturabilirler. Hücre adaları çevresinde palizadlanmalar görülebilir (38, 84, 124).

Tümör epitelyal, mezenkimal ve nöral markerların ekspresyonunun görüldüğü polifenotipik bir profil ile karakterlidir. En sık kullanılan markerlar epitelyal diferansiasyon

için EMA ve CK, mezenkimal diferansiasyon için Vimentin ve desmin, nöral diferansiasyon için NSE ve CD-57 (Leu 7)'dir. Ayrıca WT-1 ile kuvvetli pozitiflik gösterir.

- WT-1: DKYHT'lerin büyük çoğunluğunda WT-1 ile kuvvetli pozitiflik olduğu belirtilmiştir (85). Barnoud ve arkadaşları WT (C-19)'un DKYHT'ler için sensitif ve spesifik bir marker olduğunu, diğer KYMHT'lerden ayırımlarında kullanılabileceğini rapor etmişlerdir (5). Ama WT-1'in böbrek, gonadlar, uterus, beyin, mezotel ve dalak gibi normal dokularda da saptanabileceği, DKYHT'e ek olarak Wilms' tumorü, renal hücreli karsinom, mezotelyoma, papiller seröz karsinom, melanom ve bazı lösemilerde de pozitif olabileceği unutulmamalıdır (5, 85).

- Myojenik diferansiasyonun göstergesi olan myogenin ve myo-D1 gibi nükleer myojenik regülatuar proteinler sıklıkla negatif olmasına rağmen nadiren lezyonlar MSA veya SMA ekspresse edebilirler. Ama bu çok yoğun ve kuvvetli değildir (85, 124).

- CD-99 DKYHT'lerin 1/3'ünde pozitifdir.

- NB-84 %50'sinden fazlasında pozitifdir.

- Yüksek molekül ağırlıklı bir glikoprotein olan CA-125'in de DKYHT hücrelerinde ekspresyonu bulunmuştur (124).

Bu tümörün en belirgin ultrastrüktürel özelliği genellikle nükleus kenarında lokalize intrasellüler mikrofilament girdapsı yapıları ve paketleridir. Sıklıkla nükleus komprese ve periferde doğru itilmiştir. Orta sayıda mitokondri, serbest ribozomlar ve küçük glikojen gölcükleri vardır. Myojenik diferansiasyon için Z band materyali, kalın veya ince filamentler görülmez.

DKYHT'ler 22. kromozomda lokalize EWS geni (Ewing's sarkoma geni) ile 11. kromozomda lokalize WT1 geni (Willm's tümör geni) arasında karakteristik bir

translokasyona sahiptir. Nadir bazı tümörlerde ES/PNET ailesi için karakteristik olarak tanımlanan EWS/ERG ve EWS/FLI-1 de rapor edilmiştir (98, 124).

Tümörün sınırlarının düzensiz olması ve peritonda multipl implantlarının varlığı nedeniyle komplet eksizyon sıklıkla mümkün olmamaktadır (124). Çok fatal seyirlidir. Hastalar genellikle tanı anından sonra 6 ay ile 4 yıl içinde ölürlür. Cerrahi rezeksiyon kemoterapi ve radyoterapi ile kombine edilerek hastanın sağ kalım süresi uzatılabilir (38, 48).

KÜÇÜK HÜCRELİ OSTEOSARKOM

Küçük hücreli osteosarkom (KHO); ilk defa 1979 yılında tanımlanan, değişik derecelerde osteoid üreten küçük hücrelerden ibaret, nadir görülen bir osteosarkom formudur (80, 34). Tüm osteosarkomların yaklaşık %1.5'ünü oluşturur. Hastaların yaş aralıkları 5-83 olmakla birlikte en sık 2. dekatta görülür. Kadın-erkek oranı 1.1/1'dir. Genellikle uzun kemiklerin metafizlerinde görülür. Nadiren multipl kemik tutulumu da olabilir (34). Hastalar genellikle kısa sürede gelişen şişlik ve ağrı şikayetleri ile başvurular. Radyolojik görünüm geniştir; litik-sklerotik, permeatif-destrüktif lezyonlar olabilir (37).

Çıplak gözle konvansiyonal osteosarkoma benzer. Histolojik olarak osteoid üretimi ile ilişkili küçük hücrelerden ibarettir (34). Küçük hücreli osteosarkomun histolojik spektrumu ilk defa Ayala ve ark tarafından tanımlanmış, o dönemde Ewing sarkom benzeri, lenfoma benzeri ve iğsi hücre olmak üzere üç alt tipinin olduğu belirtilmiştir (80). Günümüzde ise yuvarlak hücreli ve kısa iğsi hücreli tip olarak iki gruba ayrılır. Yuvarlak hücrelerin boyutları değişkenlik göstermekte olup küçük-orta arasındadır. Daha küçük olanlar Ewing sarkoma, daha büyük olanlar büyük hücreli lenfomaya benzerler. Sitoplazmaları dar ve nükleusları ince dağınık kromatine sahip, yuvarlak-ovaldır. Daha az görülen iğsi hücreli tipte nükleuslar kısa, oval-iğsi, belirsiz nükleollü ve granüler, dar

sitoplazmalıdır. Tümör hücreleri arasında dantela benzeri osteoid üretiminin görülmesi önemlidir ve Küçük hücreli osteosarkom tanısı sadece osteoid üretiminin görülmesi ile konulmaktadır. Ama bu genellikle fokal alanlarda vardır ve özellikle küçük bir biyopsi geldiğinde doğru ayırıcı tanı çok zor olabilir (33, 34, 37, 80).

KHO'a spesifik bir immünohistokimyasal boya yoktur. Tümör hücreleri CD-99, vimentin, osteokalsin, osteonektin ve alkalen fosfataz pozitifdir. Hücrelerin büyük çoğunluğu MSA, Leu-7, S-100 ve CK pozitif olabilirler.

Elektron mikroskopik olarak nükleus irregüler veya düz konturlu olabilir ve büyük bir nükleol içerirler. Sitoplazma az diferansiyedir, değişen miktarlarda mikrofilament, ribozom, mitokondri ve düz endoplazmik retikulum bulundurur. %30 vakada glikojen bulunur. İçerdiği ribozomları sayesinde ribozomdan fakir olan ES/PNET'ten ayırımında MGP pozitifliği yardımcı olabilir. Ayrıca, hidroksiapatit kristalleri veya matrikste belirgin depozitler mevcuttur (34, 37).

Tedavi cerrahi ve neoadjuvan kemoterapidir (80).

Küçük hücreli osteosarkomun prognozu konvansiyonal osteosarkomdan daha kötüdür. Prognoz histoloji ve görüntüleme bulguları ile ilişkili değildir (34, 37).

MALİGN LENFOMA

Malign lenfoma kemikte tüm malign kemik tümörlerinin yaklaşık %5'ini, yumuşak dokuda ise tüm yumuşak doku tümörlerinin %1'ini oluşturur ve primer veya daha sıklıkla jeneralize bir hastalık tutulumu olarak bulunur (48, 86, 97). Erkekler ve genç erişkinlerde daha sık görülür. İskelet sisteminin herhangi bir yerinden kaynaklanabileceği gibi en sık femur, vertebra ve pelvik kemikler etkilenir. Hastalar genellikle ağrı ile başvururlar. Sistemik semptomlar da görülebilir. Radyolojik olarak litik ve sklerotik lezyonların karışımı ile

karakterli, destrüktif permeatif lezyonların bulunduğu yaygın kemik tutulumu mevcuttur. Periost reaksiyonu da görülebilir. (48)

%70'i diffüz büyük B-hücreli lenfomadır. Daha az sıklıkla Hodgkin lenfoma, anaplastik büyük hücreli lenfoma, Burkitt lenfoma, folliküler lenfoma, plazma hücreli myelom, plazmositom veya retikulum hücreli (dentritik veya fibroblastik) tümörler de olabilir. Çocuklarda kemiğin primer lenfoması sık olmamakla birlikte vakaların önemli bir kısmını lenfoblastik lenfoma oluşturur. (86, 98)

Çıplak gözle balık eti görünümündedir. Bazen tümör görülemez ve lezyon aşırı kemik yapımı ile karakterlidir (48). Spesifik morfolojik bir özelliği olmadığı için diğer küçük yuvarlak mavi hücreli tümörlerle karışabilir. Histolojik olarak kortikal kemik, komşu kıkırdak ve yumuşak doku invazyonu gösterebilen küçük-orta büyüklükte ve büyük hücrelerin karışık olarak bulunduğu hücre tabakalarından meydana gelir. Tümör hücreleri dar, eozinofilik sitoplazmalı, sitoplazmik sınırları belirgin, irregüler veya konvüle nükleuslu, ince, dağınık nükleer kromatin ve belirgin nükleollü hücrelerdir. Mitoz değişken derecededir ve yaygın nekroz bulunabilir. Tek tek hücreleri veya hücre gruplarını çevreler tarzda retikülin lifleri vardır. Zeminde tümör hücreleri arasında dağınık matür küçük lenfosit ve plazma hücresi bulunabilir (86, 97). Yaygın apoptotik cisimciklerin varlığı, nöroblastom ve lenfomalarda dikkati çeken bir bulgudur.

Malign lenfomalar hemen daima LCA ekprese ederler. Sıklıkla T hücreli lenfoblastik lenfomalarda CD-99 bulunması ve nadiren bunlarda LCA ekspresyonunun olmaması nedeniyle T ve B hücre markerlarını (CD-20 ve CD-79a gibi) ve TDT'yi de bulunduran bir panelin yapılması hatalı tanı vermemek için önemlidir (124).

Tedavide genellikle radyoterapi ve kemoterapi kombinasyonu kullanılır (97).

Bazı çalışmalarda kemiğin malign lenfomasının prognozunun histolojik alt tip ile ilişkili olduğu, diğerlerinde ise hastalığın evresinin histolojik alttıpten daha önemli olduğu belirtilmiştir. Genel olarak kemikte malign lenfoması bulunan bir hastada iskelet sisteminin diğer alanlarında tümör bulunsu bile yumuşak doku ve organ tutulumu yoksa prognoz daha iyidir (48).

MEZENKİMAL KONDROSARKOM

Mezenkimal kondrosarkom (MK), ilk defa 1953 yılında tanımlanan, seyrek görülen bir neoplazmdır ve tipik olarak genç erişkinlerde meydana gelir. Kadın ve erkekte eşit sıklıkta görülür (43, 33). Kemikte geniş bir dağılım gösterir. Kraniofasial kemikler (özellikle çene), kosta, ilium ve vertebra en sık tuttuğu bölgelerdir. Multipl kemik tutulumları da olabilir (34). 1/3'ü yumuşak doku ve meninkslerden kaynaklanır (33). Kardinal semptom günler-yıllar içinde gelişen şişlik ve ağrıdır.

Çıplak gözle gri-beyaz, gri-pembe renkte yumuşak, nispeten düzgün sınırlı, 3-30 cm boyutlarında tümörlerdir (34). Histolojik olarak iyi diferansiye kartilaj nodülleri ile hiperkromatik nükleuslu, dar sitoplazmalı, yuvarlak veya hafif içsi undiferansiye hücrelerin karışımından ibaret bifazik bir görünümü vardır. Hemanjioperisitomatöz vasküler pattern sıktır. Bifazik patternin görülemediği küçük biyopsilerde diğer küçük yuvarlak hücreli tümörlerden ayırımı zor olabilir (43).

Ayırıcı tanı için kullanılabilecek spesifik bir boyası yoktur. Leu-7, vimentin ve CD-99 pozitif olabilir. Kondroid alanlarda S-100 pozitifliği görülebilir.

Elektron mikroskopik olarak tümör hücrelerinin bifazik natürü gösterilebilir. Kartilajinöz odaklar konvansiyonal kondrosarkomda görülen kondrosit benzeri görünüme

sahiptirler. Undiferansiye küçük hücreli alanlar primitif mezenkimal hücelere benzer az intersellüler matriks içeren yuvarlak veya oval uniform hücre tabakalarından ibarettirler (34).

Prognozu belirsiz olmakla birlikte uzun süreli prognozu kötüdür. Histolojik özelliklerin prognoz üzerine etkisi yoktur (33).

AZ DİFERANSİYE SİNOVİAL SARKOM

Az diferansiye sinovial sarkom (ADSS) tüm sinovial sarkomların yaklaşık %20-36'sını oluşturan, yüksek oranda metastaz görülen agresif bir formudur. Tipik sinovial sarkomlara benzer şekilde daha çok genç erişkinleri etkiler ve genellikle ekstremitelerde lokalizedir (34, 110).

Histolojik olarak 3 pattern gösterir: 1- büyük hücre veya epiteloid pattern: belirgin nükleollü, değişken boyutta yuvarlak nükleuslardan ibarettir. 2- küçük hücreli pattern: diğer KYMHT'lere benzer nükleer özelliklere sahiptir. 3- işçi hücreli pattern:kaba kromatin, yüksek dereceli nükleer özellikler ve yüksek mitotik oran gösteren işçi şekilli hücrelerden ibarettir. Genel olarak ADSS'lar küçük büyütmede genellikle hiyalin materyal, band ve kalsifikasyon içermeyen sellüler mavi alanlar olarak tanımlanırlar. Büyük büyütmede nükleer atipi ve artmış proliferatif aktivite ile karakterlidirler. Sıklıkla nekroz eşlik eder. Tümörler sıklıkla hemanjioperisitomaya benzeyen ince duvarlı vasküler alanların bulunduğu zengin vasküler pattern gösterirler. Diğer alanlarında düşük gradeli bifazik veya monofazik alanlar bulunmadığı sürece bu tümörleri diğer küçük yuvarlak mavi hücreli tümörlerden ayırmak son derece zordur (110, 124).

Sadece %50'sinde CK ve bir kısmında CD-99 pozitifliği vardır. %60-70 oranında CK-7 ve CK-20 pozitifliği görülür (124).

Elektron mikroskopik çalışmalarda intersellüler yarık benzeri alanlar oluşturan tümör fragmanları ve fibroblast benzeri tümör hücrelerinde erken epitelyal diferansiasyon ile ilişkili olabilecek az gelişmiş junctional kompleksler vardır (128).

Sinovial sarkom t(X; 18), SYT-SSX1 veya SYT-SSX2 füzyon transkriptleri ile ilişkilidir ve daha iyi gidişli hastalarda görülen SYT-SSX1 lokalize hastalıkla karakterlidir (115).

Az diferansiye alanların bulunması lokal rekürrens, metastaz ve ölümle yakın ilişkilidir. Az diferansiye alanların oranı arttıkça metastaz ve ölüm oranı da artar. Bir seride ortalama sağ kalımın 33 ay olduğu rapor edilmiştir (34, 110).

YUVARLAK HÜCRELİ LİPOSARKOM

Yuvarlak hücreli liposarkom (YHL), spesifik bir subtip değil, düşük gradeli bir tümör olan miksoid liposarkomun az diferansiye bir formudur ve tipik olarak yüksek dereceli sarkom gibi davranır (97, 111). Tüm liposarkomların yaklaşık %15'ini oluşturur ve miksoid liposarkomla benzer yaş, lokalizasyon, sitogenetik anormallikler gösterirler. Miksoid/yuvarlak hücreli liposarkomlar en sık 5. dekatta görülürler. %75'i alt ekstremitte, özellikle kalça ve popliteal bölge ve daha az sıklıkla retroperitoneal alanda lokalizedirler. Radyolojik görüntüleri değişkendir. Tipik olarak heterojenöz kitleler oluştururlar (32, 124).

Çıplak gözle miksoid liposarkom multinodüler, jelatinöz kitleler oluşturur. Yuvarlak hücreli liposarkom alanları miksoid kitle içerisinde yerleşmiş opak, beyaz kitleler şeklinde görülür. Histolojik olarak yuvarlak hücreli liposarkom iki şekilde görülür: miksoid liposarkom zemininde pür yuvarlak hücreli liposarkom veya tabakalar şeklinde nükleus/sitoplazma oranları artmış ve belirgin nükleollü primitif yuvarlak hücre tabakaları şeklinde olabilir. Hücreler nispeten uniform, küçük, yuvarlak, veziküler nükleus ve belirgin

asidofilik sitoplazmalıdır. Mitoz miksoid formdan daha sıktır. Miksoid liposarkom için karakteristik olan pleksiform vaskülarizasyon yuvarlak hücreli alanlarda sıklıkla belirsizdir. Dağınık lipoblastların varlığı tanıyı koydurur. Özellikle miksoid liposarkom komponentinin bulunmadığı küçük biyopsilerde bu tümörü tanımak zor olabilir (97, 111, 124).

Vakaların çoğunda immünohistokimyaya gerek duyulmaz. Genellikle S-100 diffüz, kuvvetli pozitifdir (34).

Miksoid/ yuvarlak hücreli liposarkomlar t(12;16)(q13;p11) ile karakterlidirler ve bu RT-PCR ile saptanabilen CHOP/TLS füzyon proteininin üretimi ile sonuçlanır.

Smith ve ark yuvarlak hücre komponenti %5'in üzerinde olduğunda rekürrens, metastaz ve hastalıktan ölüm oranının arttığını rapor etmişlerdir (111).



KÜÇÜK YUVARLAK MAVİ HÜCRELİ TÜMÖRLERDE MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR

Küçük yuvarlak mavi hücreli tümörlerde sitogenetik ve moleküler çalışmalar, özellikle histolojik ve immünohistokimyasal olarak ayırıcı tanının yapılamadığı durumlarda tanıya yardımcı olur ve tümör patogenezi anlamamızı sağlar. Tablo-II'de bazı mezenkimal tümörlerdeki genetik değişiklikler ve bunların sıklığı görülmektedir.

Tablo-II: Mezenkimal tümörlerde füzyon genleri

TÜMÖR TİPİ	TRANSLOKASYON	FÜZYON GENİ	İNSİDANS
ES/PNET	t(11;22)(q24;q12)	EWS-FLI1	85
ES/PNET	t(21;22)(q22;q12)	EWS-ERG	10
ES/PNET	t(7;22)(p22;q12)	EWS-ETV1	Nadir
ES/PNET	t(17;22)(q12;q12)	EWS-E1AF	Nadir
ES/PNET	t(2;22)(q33;q12)	EWS-FEV	Nadir

TÜMÖR TİPİ	TRANSLOKASYON	FÜZYON GENİ	İNSİDANS
DKYHT	t(11;22)(p13;q12)	EWS-WT1	95
Mikzoid/yuvarlak hücreli liposarkom	t(12;16)(q13;p11)	TLS-CHOP	95
Mikzoid/yuvarlak hücreli liposarkom	t(12;22)(q13;q12)	EWS-CHOP	5
Ekstraskeletal mikzoid kondrosarkom	t(9;22)(q22;q12)	EWS-CHN	75
Yumuşak dokunun malign melanomu (şeffaf hücreli sarkom)	t(12;22)(q13;q12)	EWS-ATF1	Bilinmiyor
Sinovial sarkom	t(X;18)(p11.23;q11)	SYT-SSX1	65
Siyovial sarkom	t(X;18)(p11.21;q11)	SYT-SSX2	35
Alveolar RMS	t(2;13)(q35;q14)	PAX3-FKHR	75
Alveolar RMS	t(1;13)(p36;q14)	PAX7-FKHR	10
DFSP	t(17;22)(q22;q13)	COL1A1-PDGFB	Bilinmiyor
Konjenital fibrosarkoma ve mezoblastik nefroma	t(12;15)(p13;q25)	ETV6-NTRK3	Bilinmiyor

DFPS: Dermatofibrosarkoma protuberans yerine kullanılmıştır.

EWS/FLI1 TRANSLOKASYONU

Neredeyse tüm ES/PNET grubu tümörlerde 22q12 bölgesindeki EWS genini ilgilendiren resiprokal bir translokasyon vardır ve bu ilk olarak 1983 yılında Aurias ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Bu translokasyonlar, konvansiyonel sitogenetik çalışmalar, Southern blot ve Northern blot analizler, fluoresan in situ hibridizasyon ve RT-PCR teknikleri ile saptanabilir. EWS/FLI1 t(11;22)(q24;q12) translokasyonu olguların %85-95'inde görülür ve 11. kromozom üzerindeki ets transkripsiyon faktörleri ailesinin bir üyesi olan murin FLI 1 geninin insan homologunun DNA bağlayıcı bölgesi ile 22. kromozom üzerindeki EWS geninin 5' ucunun üst üste gelmesi ile sonuçlanır. Bu translokasyondan başka ES/PNET grubu tümörlerde 4 farklı translokasyon daha göze çarpmaktadır. En sık görülen diğer 2. translokasyon EWS/ERG t(21;22)(q22;q12)'ye tümörlerin %5-10'unda

raslanmaktadır. Seyrek görülen diğer translokasyonlar ise sırasıyla EWS-ETV1 t(7;22)(p22;q12), EWS-EIAF t(17;22)(q12;q12) ve EWS-FEV t(2;22)(q33;q12)'dir. ES/PNET grubu tümörlerin tümünde büyük çoğunlukla EWS-FLI1 ve EWS-ERG translokasyonlarının olması ortak bir histogeneze sahip olduklarını gösterir ve bu tümörleri çocukluk çağıının diğer küçük yuvarlak hücreli tümörlerinden ayırmaya yarayan özgün bir tanısal karakteristik oluşturur

EWS-FLI1 füzyon transkripti FLI1'in transkripsiyonel aktivasyon özelliğini değiştirir ve hücre kültürlerinde NIH3T3 fibroblastlarını transforme etme yeteneği olan bir kimerik protein meydana getirir. Bu ve diğer translokasyonlarla meydana gelen proteinler hücre sinyal iletisi, hücre proliferasyonu ve büyümesi, apoptoz , doku invazyonu ve tümör metastazı gibi durumlarla ilişkili genlerin fonksiyonlarını bozarlar. Sitolojik touch preparasyonu üzerindeki interfazik hücrelere veya tümör arşivinden elde edilen dokulara FISH yöntemi uygulanarak translokasyonlar saptanabilir. Bu yöntem 10 Kb'lık bir rezolüsyonda iki kırılma noktasının yerini belirleyebilen ve hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Benzer şekilde RT-PCR da az miktarda doku üzerine uygulanabilen bir tekniktir.

Moleküler düzeyde EWS-FLI1 füzyonu birçok farklı şekilde gerçekleşir. EWS ve FLI1 den birçok farklı ekson kombinasyonları farklı uzunlukta ve içerikte kimerik proteinler oluştururlar (91, 94). 8 farklı EWS/FLI1 füzyon transkripti vardır. En sık görüleni EWS/FLI1 tip-1'dir (41). Bu füzyon transkriptlerinin moleküler farklılıkları fonksiyonel ve klinik öneme sahiptirler. Tip 1 EWS-FLI1 füzyonunun varlığı sağ kalımı olumlu yönde etkileyen bir özelliktir (91, 94).

EWS/FLI1 veya EWS/ERG füzyon genleri çok nadiren başka tümörlerde de rapor edilmekle birlikte ES/PNET tanısı için son derece spesifiktir (14, 22, 40, 49).

t(11;22)(q24;q12) içeren tümörler (124):

- Skletal ve ekstraskletal Ewing sarkom
- PNET
- Askin tümörü (torakopulmoner bölgenin malign küçük hücreli tümörü)
- Olfaktör nöroblastom
- Küçük hücreli osteosarkom
- Mezenkimal kondrosarkom
- Polifenotipik yuvarlak hücreli tümör
- DKYHT

De Alava ve Pardo ES/PNET'te moleküler değişikliklerin saptanmasının tanı, klasifikasyon, prognoz ve hatta gelecekte tedavi açısından önemli yer tuttuğunu rapor etmişlerdir (19).

N-MYC AMPLİFİKASYONU

Myc genleri, DNA' ya bağlanan üç nükleer fosfoproteini kodlar. Bu proteinler hücre proliferasyon ve diferansiyasyonunda etkilidirler ve DNA sentezinin başlamasında rol alırlar. Klonlandıkları kültürlerle ve elde edilme şartlarına göre bu genler, c-myc, N-myc ve L-myc dan oluşur.

N-myc geni ilk defa 1983 yılında tanımlanan 2p23-24 de lokalize sellüler bir protoonkogendir ve nöroektodermal gelişim ve diferansiyasyonun düzenlenmesinde önemli bir transkripsiyon faktörü olan N-myc'i kodlar (103, 125). N-myc proteini hücre siklus progresyonunun arttırılması ve hücre diferansiyasyonunun inhibe edilmesi gibi pek çok yolda etki eder ve dolayısıyla pek çok tümörde overekspres ve amplifiye edilir. En karakteristik N-myc amplifikasyonu NB'da görülür ve NB hücre dizilerinde N-myc amplifikasyonunun

normalden 700 kat fazla olduğu gösterilmiştir (125). NB için kötü prognostik faktördür, erken evreli hastalarda amplifikasyon görülme oranı %5 iken ileri hastalığı bulunanlarda bu oran %30-40'tır (70, 125). Ayrıca N-myc amplifikasyonu retinoblastom, küçük hücreli akciğer karsinomu, medlloblastom ve RMS'ların küçük bir kısmında da tanımlanmıştır. N-myc durumunu belirlemede southern blot yöntemi altın standarttır, ama bazen düşük ampl ları tanımlaması zor olabilir. son yıllarda FISH alternatif bir metoddur ve tek tek hücrelerde MYCN kopya sayısını vermesi nedeniyle yüksek sensitiviteye sahiptir (125).

PTEN DELESYONU

İlk defa 1997 yılında Cowden's Sendromunda tanımlanan PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) geni kromozom 10q23 bölgesinde lokalize olan, tümör baskılayıcı bir gendir (30). Bu genin kodladığı 403 aa.lik bir protein olan PTEN, fosfotidilinozitol 3,4,5-trifosfatın D3 pozisyonundaki fosfatı ortadan kaldıran bir lipid fosfatazdır ve direk olarak fosfotidilinozitol 3-kinazın (PI3K) etkisini antagonize eder (12, 13).

PTEN yokluğuunda hücrelerde PIP3 birikimi AKT/PKB sinyal onkoproteinini aktive eder. Aktive AKT kaskad şeklinde apoptozis ve hücre siklus regülasyonunda önemli olan BAD, CASP3, CASP9, MDM2, p27 ve FOXO transkripsiyon faktörlerini de bulunduran pekçok hedefi uyarır ve mammalian target of rapamycin (mTOR) ve WNT/CTNNB1 gibi diğer AKT substratları; sellüler proliferasyon, diferansiasyon ve invazyona neden olurlar (101, 129). Yani tümör oluşumunda PTEN inaktivasyonunun asıl rolü, PI3K/AKT yolağı üzerine negatif düzenleyici etkisinin ortadan kalkmasıdır (13).

PTEN gen delesyonu veya mutasyonu özellikle glioblastoma multiforme ve prostat kanserlerinde tanımlanmıştır ama endometrium, meme, akciğer, böbrek, mesane, testis, baş-

boyun kanserleri, malign melanom ve lenfomada da görülebilir. Ayrıca Cowden Hastalığı ve Bannayan-Zonana Sendromu gibi bazı genetik hastalıklarda da olabilir.

Çalışmalar PTEN'in hücre büyümesi, apoptozis, ekstrasellüler matriks ile ilişkiler, hücre migrasyonu ve invazyonun düzenlenmesinde rolü olduğunu göstermiştir. PTEN geninin birçok dokuda onkogeneze kritik rol oynadığı ileri sürülmektedir (117).

C-KİT EKSPRESYONU

KIT geni 1986'da Besmer ve arkadaşları tarafından tanımlanan, 4. kromozomun uzun kolunda lokalize olan bir protoonkogendir ve tip-III reseptör tirozin kinazın 145-165 kD'luk bir transmembran proteinini kodlar (26, 75). KIT normalde gastrointestinal sistemdeki kılcal hücreleri, mast hücreleri, hematopoetik kök hücreler, germ hücreleri, osteoblast, myofibroblast ve melanositler gibi değişik hücre tiplerinde ekspresse edilir (2, 25, 75, 82, 100). KIT'in önemi mutasyon ile inaktive olduğunda ilişkili hücre tiplerinin tamirinde bozukluk ile makrositik anemi, sterilit ve deri pigmentasyonunda kayba yol açtığı görülünce anlaşılmıştır (75).

C-kit proteinin ekstrasellüler kısmına bunun ligandı olan stem cell faktör (SCF)(mast cell growth faktör, önceleri Stem faktör olarak bilinirdi.) bağlandığı zaman sonuçta fosforilizasyon olur ve intrasitoplazmik sinyal kaskadı başlar. Bu, apoptozisin düzenlenmesi , hücre proliferasyonu, diferansiasyonu, adezyonu ve motilitesinde artış ile sonuçlanır. Bu normal rollerine ek olarak GİST, seminom, mastositozis, memenin fillodiyal tümörü, sinovial sarkom, yumuşak dokunun leiomyosarkomu, RMS, anjiosarkom, adenoid kistik karsinom ve diğer yumuşak doku tümörleri gibi bazı tümörlerde KIT deregülasyonunun önemli rol oynadığı düşünülmektedir (2, 25, 26, 42, 64, 75, 82).

ES/PNET'te C-kit ekspresyonu ilk defa Ricotti ve arkadaşları ile Landuzzi ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Bu immünohistokimyasal olarak gösterilebilir ve Western blotting yöntemi ile konfirme edilmiştir. Çeşitli serilerde ES/PNET'te C-kit ekspresyon düzeyleri %20-82 arasında rapor edilmiştir. İmatinib mesylat C-kit tirozin kinaz reseptörünü bloke eder ve özellikle ES/PNET'li hastalarda C-kit ekspresyonunun saptanması İmatinib Mesylat ile tedavi için hasta ve doktorları ümitlendirmiştir. ES/PNET'te imatinib mesylatın in-vitro ortamda tümörün büyümesini süprese ettiği saptanmıştır. Ama imatinib'in ES'da etkili olabilmesi için genel klinik dozundan daha fazla konsantrasyonda kullanılması gerekmektedir (2, 22, 51, 75).

KIT gen mutasyonu veya doku ekspresyonunun farklı tümörlerde büyüme ve metastaz yeteneğini arttırdığı rapor edilmiştir. Örneğin, bir NB serisinde 75 tümörün 10'unda Kit ekspresyonu saptanmış ve bu vakaların daha agresif gittiği ve N-myc amplifikasyonu ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. İmatinib in vivo ve in-vitro koşullarda nöroblastoma hücrelerinin büyümesini inhibe eder (25, 51, 123).

RMS'larda C-kit ekspresyonu ile ilgili olarak sadece 2 büyük çalışma vardır İlginç olarak KIT ekspresyonu daha agresif gidiş gösteren ARMS'da bulunmazken ERMS'da yüksek oranda (%77) vardır (25).

GEREÇ VE YÖNTEM

HASTALAR:

1999-2007 yılları arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na gelen küçük yuvarlak mavi hücreli tümör tanısı almış toplam 57 olgu incelendi. Vakaların dağılımı 24 olgu ES/PNET, 12 olgu rabdomyosarkom, 11 olgu nöroblastom, 1 olgu desmoplastik küçük yuvarlak hücreli tümör, 1 olgu polifenotipik küçük yuvarlak hücreli tümör ve 7 olgu undiferansiye küçük yuvarlak mavi hücreli tümör şeklinde idi. Tüm olguların Hematoksilen-Eozin boyalı ve immünohistokimyasal inceleme preparatları retrospektif olarak değerlendirildi. Ayrıca vakaların büyük çoğunluğu için immünohistokimyasal panel uygulandı. Hastaların klinik takip dosyalarından yaş, tümör boyutu, radyoloji bilgileri, tedavi ve prognoz bilgilerine büyük oranda ulaşıldı.

İMMÜNHİSTOKİMYASAL YÖNTEM:

Formalin ile tespit edilen dokulara ait parafin bloklardan 4 mikrometre kalınlıkta kesitler polilizinli lamlara alındı. C-kit ekspresyonunu belirlemek için streptavidin-biyotin üçlü indirekt immünperoksidaz yöntemi kullanılarak immünohistokimyasal boyama yapıldı. Kullanılan antikor anti-C-kit (CD117), poliklonal rabbit, anti-human (DAKO) olup, 1:20 oranında PBS ile dilüe edildi. Kullanılan biyotinlenmiş bağlayıcı (sekonder) antikor, streptavidin-biyotin kompleksi ve kromojen olarak kullanılan 3,3-diaminobenzidine (DAB) ticari olarak kullanıma hazır kitler şeklinde idi.

Pozitif doku kontrolü için C-kit pozitif gastrointestinal stromal tümör (GİST) kullanıldı.

Hazırlanan parafin doku kesitleri C-kit antikoruna ile aşağıdaki prosedüre göre boyandı:

- 1- Polilizinli lam üzerine alınan 4 mikron kalınlığındaki kesitler, 56°C'lik etüvde 12 saat bekletilerek deparafinize edildi.

- 2- 30 dakika ksilolde bekletildi.
- 3- Her birinde beşer dakika bekletilerek sırasıyla %100, %95 ve %90'lık alkolden geçirilerek dokuların hidrasyonu sağlandı.
- 4- Çeşme suyu ile yıkandı.
- 5- Endojen peroksidazı bloke etmek için %3'lük hidrojen peroksitte 10 dakika süre ile oda sıcaklığında bekletildi.
- 6- PBS buffer (pH 7.6) ile 5 dakika süresince yıkandı.
- 7- 0,01 M. Sodyum sitrat buffer (pH 6.0) içinde toplam 30 dakika mikrodalga fırında işleminden geçirildi.
- 8- 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- 9- Distile su ile 3 kez yıkandı.
- 10- Kesitler 10 dakika süre ile non-immün protein bloklama serumunda bekletildi.
- 11- Primer antikor olan CD-117, c-kit (clone: A4502, DakoCytomation) lam üzerindeki doku kesitlerini kapatacak şekilde damlatıldı ve oda sıcaklığında 2 saat süre ile bekletildi.
- 12- 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkandı ve kurulandı.
- 13- Bağlayıcı (sekonder) antikor (Multi-species ultra streptavidin detection system-HRP; Signet, Massachusetts, USA) ile oda sıcaklığında 20 dakika süre ile inkübasyon yapıldı.
- 14- 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkandı.
- 15- Streptavidin-biyotin kompleksi uygulanarak 30 dakika bekletildi (DakoCytomation).
- 16- 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkandı.
- 17- Renk vererek görüntülemeyi sağlamak amacıyla DAB (diaminobenzidine tetraklorid; Lab-Vision, Neomarkers, USA) ile 10 dakika süre ile inkübasyon yapıldı.

18- 5 dakika distile su ile yıkandı.

19- Hızlı boyama yöntemi Mayers Hematoksilen ile zemin boyaması yapıldı.

20- Dehidrasyon için kesitler sırayla 590, %95 ve %100'lük alkollerde 5'er dakika tutuldu.

21- Ksilolde şeffalaştırıldı.

22- Doku kesitleri entellan kullanılarak kapatıldı.

Boyama derecelerinin değerlendirilmesi:

Boyama derecesi yarı kantitatif bir yöntemle farklı zamanlarda iki kez değerlendirildi. Pozitif boyanan tümör hücrelerinin tüm tümör dokusuna oranı belirlendi. Tümör hücrelerinin %20'den fazlası boyanmışsa pozitif olarak kabul edildi (26). Boyanan tümör hücreleri oranı %20'den az ise negatif olarak kabul edildi. Ayrıca antijenlerin ekspresyon kuvvetini karşılaştırmak için pozitif ekspresyon oranları derece-I, derece-II ve derece-III olarak derecelendirildi. Buna göre; boyanan tümör hücreleri GİST kontrolünde olduğu gibi diffüz kuvvetli boyanırsa derece-I, diffüz zayıf, sitoplazmik boyanırsa derece-II ve orta kuvvette boyanırsa derece-III olarak kabul edildi.

FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION (FISH) YÖNTEMİ:

Pozitif şarjlı lam üzerine alınan 3 mikron kalınlığındaki kesitler 56°C'lik etüvde 12 saat bekletilerek deparafinize edildi.

- 1- 3 kez 10'ar dakika süre ile %100 xylol içeren şalede oda sıcaklığında bekletildi.
- 2- 2 kez 5'er dakika süre ile %100 etanol içeren şalede oda sıcaklığında bekletildi.
- 3- 45-50 derecelik hotplate üzerinde 2-5 dk. kurutuldu.
- 4- 20 dk. süre ile 2 N HCL içeren şalede oda sıcaklığında bekletildi.
- 5- 3 dk. süre ile distile su içeren şalede oda sıcaklığında bekletildi.
- 6- 3 dk. süre ile wash buffer içeren şalede oda sıcaklığında bekletildi.

- 7- 30 dk. süre ile 80 derecelik su banyosunda önceden bu ısıya getirilmiş pretreatment solüsyonu (Paraffin Pretreatment Kit, Vysis) içeren şalede inkübe edildi.
- 8- Lamlar 1 dakika süre ile distile su içeren şalede oda sıcaklığında bekletildi.
- 9- 2 kez 5'er dakika süre ile wash buffer içeren şalede oda sıcaklığında bekletildi.
- 10- 10 dk. süre ile 37 derecelik etüvde önceden bu ısıya getirilmiş protease solution içeren şalede bekletildi.
- 11- 2 kez 5'er dakika süre ile wash buffer içeren şalede oda sıcaklığında bekletildi.
- 12- 45-50 derecelik hotplate üzerinde 2-5 dk. kurutuldu.
- 13- 10 dk. süre ile %10 tamponlanmış formalin içeren şalede oda sıcaklığında bekletildi.
- 14- 2 kez 5'er dakika süre ile wash buffer içeren şalede oda sıcaklığında bekletildi.
- 15- 45-50 derecelik hotplate üzerinde 2-5 dk. kurutuldu.
- 16- Her birinde 3'er dakika bekletilerek sırasıyla %70, %85 ve %100'lük etanolden geçirildi.
- 17- 45-50 derecelik hotplate üzerinde 2-5 dk. kurutuldu.
- 18- Bundan sonraki aşamalar karanlıkta gerçekleştirildi.
- 19- Önceden oda ısısına getirilmiş prob tüpü vortekslendi, mikrosantrifüjde spin atıldı ve tekrar vortekslendi.
- 20- Herbir lamanın hedef alanına 10 µl prob (LSI® EWSR1 (22q12) Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe, Vysis; LSI N-MYC (2p24.1) SpectrumOrange™ Probe, Vysis; LSI® PTEN (10q23) / CEP® 10 Dual Color Probe, Vysis) damlatıldı ve hemen uygun boyutta bir lamelle hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatıldı.
- 21- Lamellerin etrafı rubber cement ile çevrelendi.
- 22- Lamlar Hybrite cihazına yerleştirilip kapağı kapatıldı ve önceden programlanan prosedür başlatıldı. (denatürasyon 73°C → 5 dk., Hibridizasyon 37°C → 16 saat)

- 23- Bir gece hibridizasyondan sonra lamaların üzerinden rubber cement ayrıldı ve oda ısısındaki yıkama solüsyonu içerisinde çalkalanarak lamellerin ayrılması sağlandı.
- 24- 2 dk. süre ile su banyosunda önceden 73°C a getirilmiş olan yıkama solüsyonu içerisinde bekletildi.
- 25- Lamalar oda ısısında distile su içeren şaleye batırılıp çıkarıldıktan sonra karanlıkta kurumaya bırakıldı.
- 26- Herbir hibridizasyon alanına 10 µl. 4',6-diamidino-2-phenylinodole (DAPI II Counterstain, Abbott Laboratories) damlatılarak uygun boyutta lamelle kapatıldı.
- 27- Lamalar analiz öncesi en az 15 dakika buzdolabında bekletildi.

FISH değerlendirilmesi:

LSI® EWSR1 (22q12) ve LSI® PTEN (10q23) / CEP® probeları için her bir preparatta 200 tümör hücresi sayıldı ve bu 200 hücre içinde pozitif hücrelerin yüzdeleri hesaplandı. LSI® EWSR1 (22q12) Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe için %20 ve üzerindeki hücrede bir füzyon, bir kırmızı ve bir yeşil sinyalin varlığı, LSI® PTEN (10q23) / CEP® 10 Dual Color Probe için %30 ve üzerindeki hücrede bir kırmızı ve iki yeşil sinyalin bulunması pozitif kabul edildi. LSI N-MYC (2p24.1) Spectrum Orange™ Probe için ise 40 hücre sayıldı ve bu tümör hücrelerinde N-myc gen/ CEP2 oranı 2 ve üzerinde ise amplifikasyon var, 10'un üzerinde ise yüksek düzeyde amplifikasyon var olarak kabul edildi.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ:

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS for windows paket programı kullanıldı. Elde edilen sonuçlar ortalama $\pm$ std. sapma olarak ifade edildi. Gruplar arasında farklılık olup olmadığı Chi-Square testi ile değerlendirildi. Anlamlılık düzeyi olarak $p < 0,05$ alındı.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 57 küçük yuvarlak mavi hücreli tümör tanısı alan hastanın 32'si (%56.1) kadın, 25'i (%43.9) erkekti. (tüm küçük yuvarlak mavi hücreli tümör olgularının histopatolojik tanıların cinsiyete göre dağılımı Tablo-III'de gösterilmektedir.) Ortalama yaş 14.89 ± 13.2 yıl (1-79 yıl) idi.

Tablo-III: Küçük Yuvarlak Mavi Hücreli Tümörlerin Histopatolojik Tanılarına Göre Dağılımı

Histopatolojik tanı	Erkek n(%)	Kadın n(%)	Toplam (%)
ES/PNET	10 (41.7)	14 (58.3)	24 (42.1)
Rabdomyosarkom	5 (41.7)	7 (58.3)	12 (21.1)
Nöroblastom	6 (60)	4 (40)	10 (17.4)
ONB	1 (50)	1 (50)	2 (3.5)
PYHT	0	1 (100)	1 (1.8)
DKYHT	0	1 (100)	1 (1.8)
Undiferansiye KYHT	3 (42.9)	4 (57.1)	7 (12.3)
Toplam	25 (43.9)	32 (56.1)	57 (100)

ES/PNET: Ewing Sarkom/Periferik Nöroektodermal Tümör, ONB: Olfaktör Nöroblastom, PYHT: Polifenotipik Yuvarlak Hücreli Tümör, DKYHT: Dezmozplastik Küçük Yuvarlak Hücreli Tümör, Undiferansiye KYHT: Undiferansiye Küçük Yuvarlak Hücreli Tümör yerine kullanılmıştır.

Tümör boyutu 2,8-18 cm. arasında olup ortalama 7.1 ± 3.4 cm idi.

Tüm küçük yuvarlak mavi hücreli tümörlerin lokalizasyonlara göre dağılımı saptandı (Tablo-IV). Buna göre bizim olgularımızda en sık yerleşim yerinin baş-boyun bölgesi olduğu dikkati çekti.

Tablo-IV: Küçük yuvarlak mavi hücreli tümörlerin lokalizasyonlarına göre dağılımı

Histopatolojik tanı	Abdomen n(%)	Ekstremiteler n(%)	Baş- boyun n(%)	İntrakranial (santral) n(%)	Toraks n(%)	Pelvis n(%)	Adrenal n(%)	GÜS n(%)	Vertebra (periferik) n(%)
ES/PNET	3 (13)	5(21,7)	2 (8.6)	11 (47.8)	1 (4,3)	0	0	0	1 (4,3)
RMS	0	1 (8,3)	7 (58,3)	0	1 (8,3)	1 (8,3)	0	2(16,6)	0
Nöroblastom	0	0	1 (10)	0	0	2 (20)	6 (60)	0	1 (10)
ONB	0	0	2 (100)	0	0	0	0	0	0
PYHT	0	1 (100)	0	0	0	0	0	0	0
DKYHT	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Undiferansiye KYHT	0	2 (28,6)	2 (28,6)	0	1 (14,3)	0	0	0	1 (14,3)
Toplam	4 (7,3)	9 (16,4)	14(25,4)	11 (20)	3 (5,5)	3 (5,5)	6 (10,9)	2 (3,6)	3 (5,5)

Toplam 33 olgunun klinik izlem verilerine ulaşıldı. Hastaların ortalama takip süreleri 31 ± 25 aydı. Takipli hastaların %27.2'sinin hastalık nedeniyle öldüğü, %30.3'ünde daha sonra hastalığın nüks ettiği veya metastaz ortaya çıktığı ve %48.9'unun takip süresi sonunda hayatta olduğu gözlemlendi.

Bu 57 olgunun 24 tanesi Ewing sarkom/PNET, 12 tanesi rabdomyosarkom, 10 tanesi nöroblastom, 2 tanesi olfaktör nöroblastom, 1 tanesi polifenotipik yuvarlak hücreli tümör, 1 tanesi dezmoplastik küçük yuvarlak hücreli tümör ve 7 tanesi undiferansiye küçük yuvarlak mavi hücreli tümör olarak tanı almıştı. Retrospektif olarak incelenen preparatların ikinci inceleme ile ilk tanıları karşılaştırıldığında , tanımlar arasında bir farklılık dikkati çekmedi. Ayrıca var olan ve ek olarak uygulanan immünohistokimyasal çalışmalar sonrasında küçük yuvarlak mavi hücreli tümörlerde immünohistokimyasal parametreler belirlendi (Tablo-V). İmmünohistokimyasal olarak CD-99 boyası 19 ES/PNET vakasına uygulandı ve bunların 12 tanesinde (%63.2) pozitif boyanma saptandı. Negatif olan 7 vakadan 6 tanesi intrakranial 1 tanesi ekstremiteler yerleşimli idi. Bu vakaların 19 tanesine vimentin boyası uygulandı ve intrakranial yerleşimli tümörlerin 3 tanesi negatif, 6 tanesi pozitif saptanırken periferik

tümörlerin 2 tanesinde negatiflik, 8 tanesinde pozitiflik görüldü. ES/PNET vakalarının yanında 1 polifenotipik yuvarlak hücreli tümör, 2 undiferansiye küçük yuvarlak mavi hücreli tümör ve 2 rabdomyosarkom vakasında da CD-99 pozitifliği izlendi. Hiçbir nöroblastom vakasında boyanma mevcut değildi. Tümör tipleri ile CD-99 immünreaktiviteleri arasında istatistiksek olarak Ki-kare testi ile anlamlı bir fark saptanmadı.

Tablo-V: Küçük yuvarlak mavi hücreli tümörlerde immünhistokimyasal bulgular

Tanı	Potansiyel Pozitif /negatif Belirleyici	Pozitif Saptanan Belirleyici	Negatif Belirleyici	İmmünhistokimyasal çalışma yapılmayan
ES/PNET	Vimentin	14/24	5/24	5/24
	CD-99	12/24	7/24	5/24
	Nöral markerlar*	15/24	9/24	-
Rabdomyosarkom	Vimentin	3/12	2/12	7/12
	Aktin, desmin	6/12	2/12	4/12
	Myojenik regülatuar proteinler†	6/12	2/12	4/12
Nöroblastom	Vimentin	-	8/10	2/10
	CD-99	-	4/10	6/10
	Nöral markerlar*	9/10	-	1/10
ONB	Vimentin	1/2	1/2	-
	Nöral markerlar*	2/2	-	-
DKYHT	Vimentin	1/1	-	-
	Nöral markerlar*	-	1/1	-
	EMA	1/1	-	-
	Desmin	1/1	-	-
PYHT	Vimentin	1/1	-	-
	CD-99	1/1	-	-
	Nöral markerlar*	1/1	-	-
	GFAP	1/1	-	-
	Faktör-13a	1/1	-	-

*Nöral markerlar: Sinaptofizin, Kromogranin, NSE, NF, PGP-9.5

†Myojenik regülatuar proteinler: Myogenin, Myo-D1

Toplam 54 vakaya immünhistokimyasal olarak C-kit uygulandı (Tablo-VI). Farklı tümör tipleri ile C-kit boyanması ve bu boyanmanın derecesi arasında bir farklılık saptanmadı. Ayrıca C-kit boyanma patternleri de değerlendirildi ve 23 ES/PNET vakasının 5 tanesinde (%21.7), 10 nöroblastom vakasının 1 tanesinde (%10) sitoplazmik+membranöz boyanma saptanırken diğer tüm vakalarda sadece sitoplazmik boyanma görüldü.

Tablo-VI: Küçük yuvarlak mavi hücreli tümörlerde c-kit boyanma dereceleri

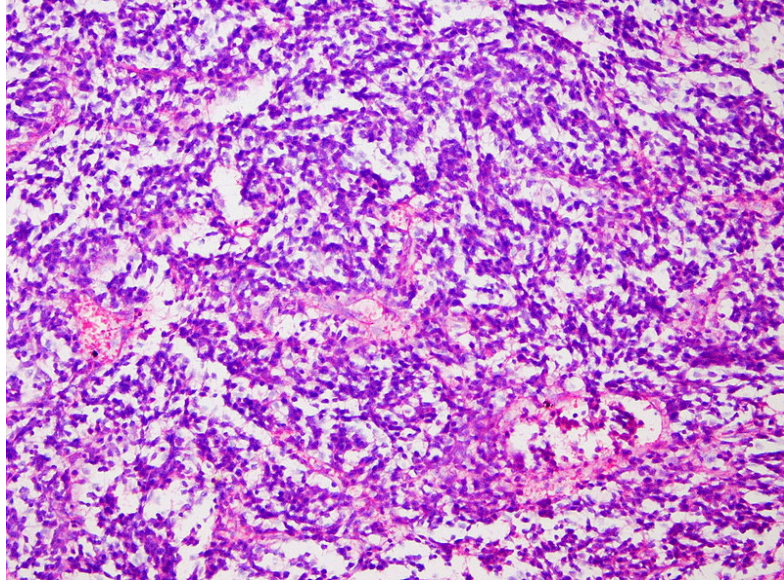
Histopatolojik tanı	Negatif n(%)	Pozitif n(%)	Derece-I n(%)	Derece-II n(%)	Derece-III n(%)
ES/PNET	12 (52.2)	11 (47.8)	1 (4.3)	5 (21.7)	5 (21.7)
Rabdomyosarkom	5 (41.6)	7 (58.4)	1 (8.3)	2 (16.7)	4 (33.4)
Nöroblastom	1 (11.1)	7 (88.9)	1 (11.1)	2 (22.2)	5 (55.6)
ONB	1 (50)	1 (50)	0	1 (50)	0
PYHT	0	1 (100)	0	1 (100)	0
DKYHT	1 (100)	0	0	0	0
Undiferansiye KYHT	1 (14.3)	6 (85.7)	0	0	6 (85.7)
Toplam	21 (38.8)	33 (61.2)	3 (5.6)	11 (20.4)	19 (35.2)

ES/PNET AİLESİ

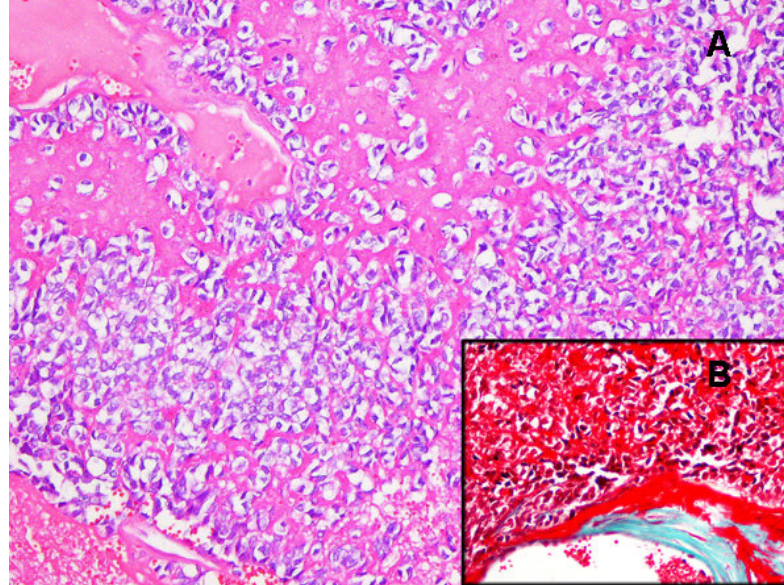
İncelenen 24 olgunun 14 tanesi (%58,3) kadın, 10 tanesi (%42,7) erkekti. Hastaların ortalama yaşları $15,22 \pm 6,78$ yıl (2-29 yıl) idi. Tümör boyutu 4-15 cm. arasında olup ortalama 7.97 ± 3.86 cm idi. Hastaların ortalama takip süreleri 29.3 ± 25.9 ay (1-81 ay) idi. Tümörlerin en sık intrakranial bölgede (11 vaka, %47.8) yerleştikleri, sonra sırası ile ekstremiteler (5 vaka, %21.7), abdomen (3 vaka, %13), baş-boyun (2 vaka, 8.7), toraks (1 vaka, %4.3) ve vertebrada (1 vaka, %4.3) lokalize oldukları saptandı.

Tümörler, dar sitoplazmalı, irregüler nükleer kontur bulunduran hiperkromatik nükleolu ve belirsiz nükleollü hücre tabakalarından oluşuyordu (Resim-I). Bazı vakalarda yaygın nekroz alanları ve damarlar çevresinde viabl tümör hücreleri izlendi. Ayrıca bazı vakalarda Homer-Wright rozetleri ve Flexner-Wintersteiner rozetleri görüldü. 1 vakada tümör hücreleri arasında osteoid benzeri eozinofilik amorf materyal izlendi. Bu vakada uygulanan trikrom boyası ile bunun kollajen değil intersellüler fibrinoid materyal olduğu saptandı (Resim-II).

Resim-I: ES/PNET. Dar sitoplazmalı, hiperkromatik nükeluslu hücrelerden oluşan tümör (Hematoksilen-eozin x 200)



Resim-II: A ve B, Küçük hücreli osteosarkom benzeri ES/PNET. A, Tümör hücreleri arasında osteoid benzeri eozinofilik amorf materyal (Hematoksilen-eozin x 200). B, Trikrom boyası ile boyanmayan intersellüler fibrinoid materyal (Trikrom x 200).

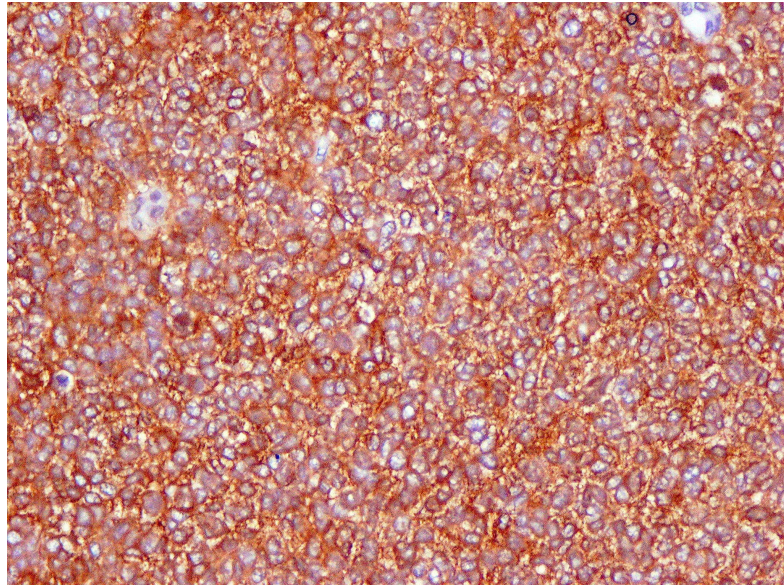


İmmünohistokimyasal olarak CD-99 19 vakaya uygulandı. 12 vakada (%63.2) diffüz membranöz boyanma saptanırken 7 vakada (%36.8) boyanmanın olmadığı gözlemlendi.

Boyanma olmayan bu vakalardan 6 tanesinin intrakranial yerleşimli , 1 tanesinin ekstremitelerinde yerleşimli olduğu dikkati çekti. İntrakranial lokalizasyonlu bu santral PNET'ler ile diğer bölgelerdeki ES/PNET'lerin CD-99 immünreaktiviteleri arasında anlamlı ilişki olduğu saptandı ($p=0.02$). Bu iki grup arasında hastalığın gidişi açısından anlamlı bir fark saptanmadı.

Olguların 23 tanesine immünohistokimyasal olarak C-kit uygulandı. 12 olguda (%52.2) ekspresyon saptanmazken 11 olguda (%49,8) C-kit ekspresyonu görüldü. Bu olgularda 1 tanesinde (%4.3) derece-I, 5 tanesinde (%21.7) derece-II ve 5 tanesinde (%21.7) derece-III düzeyinde boyanma gözlemlendi (Resim-III). Klinikopatolojik özellikler (cinsiyet, lokalizasyon, tümör boyutu ve hastalığın gidişi) ile olgulardaki C-kit ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (Tablo-VII).

Resim-III: ES/PNET'te immünohistokimyasal olarak C-kit boyası ile tümör hücrelerinde sitoplazmik boyanma (C-kit x 400)

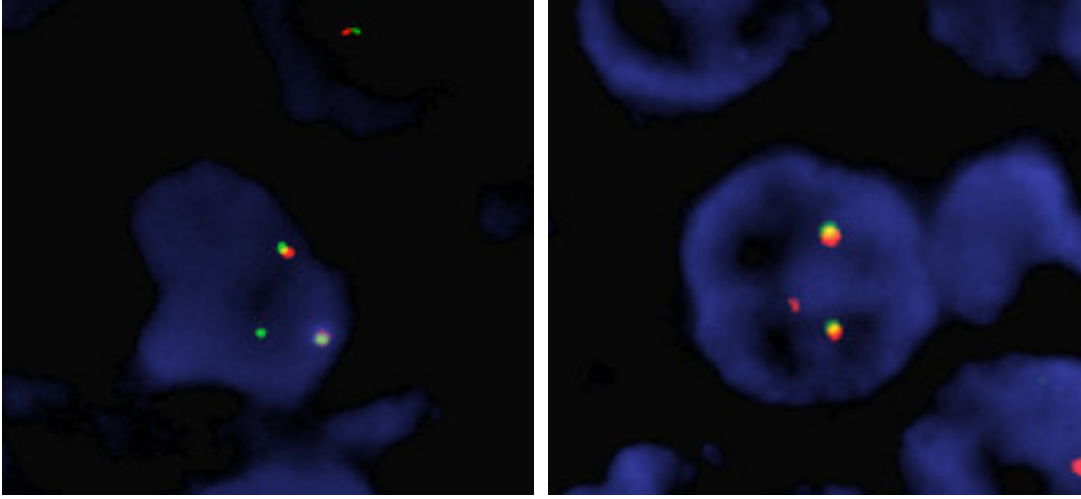


Tablo-VII: ES/PNET olgularında klinikopatolojik özellikler ile C-kit ekspresyonlarının ilişkisi

	Olgu sayısı (%)	Negatif (%)	Pozitif (%)	p değeri
<u>Cinsiyet</u>				
Kadın	14 (60.9)	8 (57.1)	6 (42.9)	0.784
Erkek	9 (39.1)	4 (44.4)	5 (55.6)	
<u>Lokalizasyon</u>				
Abdomen	3 (13.6)	2 (66.7)	1 (33.3)	0.593
Ekstremiteler	5 (22.7)	2 (40)	3 (60)	
İntrakranial	11 (50)	7 (63.6)	4 (36.4)	
Baş-boyun	1 (4.5)	0	1 (100)	
Toraks	1 (4.5)	1 (100)	0	
Vertebra	1 (4.5)	0	1 (100)	
<u>Tümör boyutu</u>				
< 5 cm.	2 (16.7)	2 (100)	0	0.336
≥ 5 cm.	10 (83.7)	6 (60)	4 (40)	
<u>Hastalığın gidişi</u>				
HNE	3 (21.4)	1 (33.3)	2 (66.7)	0,231
Remisyon	4 (28.6)	3 (75)	1 (25)	
Nüks	2 (14.3)	1 (50)	1 (50)	
Metastaz	2 (14.3)	1 (50)	1 (50)	
Rezidü	3 (21.4)	3 (100)	0	

20 olguda FISH yöntemi ile EWS/FLI1 translokasyonu bakıldı. Bunların 13 tanesinde (%65) EWS/FLI1 translokasyonu saptanırken 6 tanesinde (%30) mevcut değildi (Resim-IV). Asit takip sonrası incelenen bir vakada probe çalışmadı. ES/PNET olgularında klinikopatolojik özellikler ile EWS/FLI1 translokasyonlarının ilişkisi Tablo-VIII'da gösterilmektedir. Buna göre EWS/FLI1 translokasyonu ile hastaların cinsiyetleri, tümör lokalizasyonları, tümör boyutları, C-kit ekspresyonları ve hastalığın gidişi arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. FISH yöntemi ile EWS/FLI1 translokasyonu değerlendirilen olgulardan 11 tanesi intrakranial bölgeden kaynaklanmakta iken 1 tanesi primer tümör lokalizasyonu böbrekte olup beyin metastazı bulunan olgu idi. Bu toplam 12 olgudan beyin metastazı bulunan olgu ve primer santral sinir sistemi yerleşimli 6 olguda translokasyon saptanırken kalan 5 olguda translokasyon görülmedi. Santral yerleşimli ES/PNET'ler ve periferik ES/PNET'lerde EWS/FLI1 translokasyonları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p=0.044$).

Resim-IV: ES/PNET'te FISH yöntemi ile LSI® EWSR1 (22q12) Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe'u kullanarak saptanan EWS/FLI1 translokasyonu



Olgulardan 9 tanesinde FISH yöntemi ile PTEN delesyonu değerlendirildi ve vakaların hiçbirinde delesyon saptanmadı.

Tablo-VIII: ES/PNET Olgularında Klinikopatolojik Özellikler İle EWS/FLI1 Translokasyonunun İlişkisi

	Olgu sayısı (%)	Negatif (%)	Pozitif (%)	p değeri
<u>Cinsiyet</u>				
Kadın	13 (65)	4 (30.8)	9 (69.2)	0.523
Erkek	7 (35)	2 (28.6)	4 (57.1)	
<u>Lokalizasyon</u>				
Abdomen	2 (10)	0	2 (100)	0.492
Ekstremité	4 (20)	0	3 (75)	
Intrakranial	11 (55)	5 (45.5)	6 (54.5)	
Baş-boyun	1 (5)	0	1 (100)	
Toraks	1 (5)	1 (100)	0	
Vertebra	1 (5)	0	1 (100)	
<u>Tümör boyutu</u>				
< 5 cm.	2 (15.4)	0	2 (100)	0.584
≥ 5 cm.	11 (84.6)	4 (36.4)	7 (63.6)	
<u>Hastalığın gidişi</u>				
HNE	3 (21.4)	2 (66.7)	1 (33.3)	0.605
Remisyon	4 (28.6)	2 (50)	2 (50)	
Nüks	2 (14.3)	0	2 (100)	
Metastaz	2 (14.3)	0	2 (100)	
Rezidü	2 (14.3)	2 (100)	0	
<u>C-kit</u>				
Negatif	10 (50)	4 (66.7)	6 (46.2)	0.366
Pozitif	10 (50)	2 (33.3)	5 (43.8)	
Derece-I	1 (5)	0	1 (7.7)	
Derece-II	5 (25)	1 (16.7)	3 (23.1)	

Derece-II Derece-III	4 (20)	1 (16.7)	3 (23.1)	
-------------------------	--------	----------	----------	--

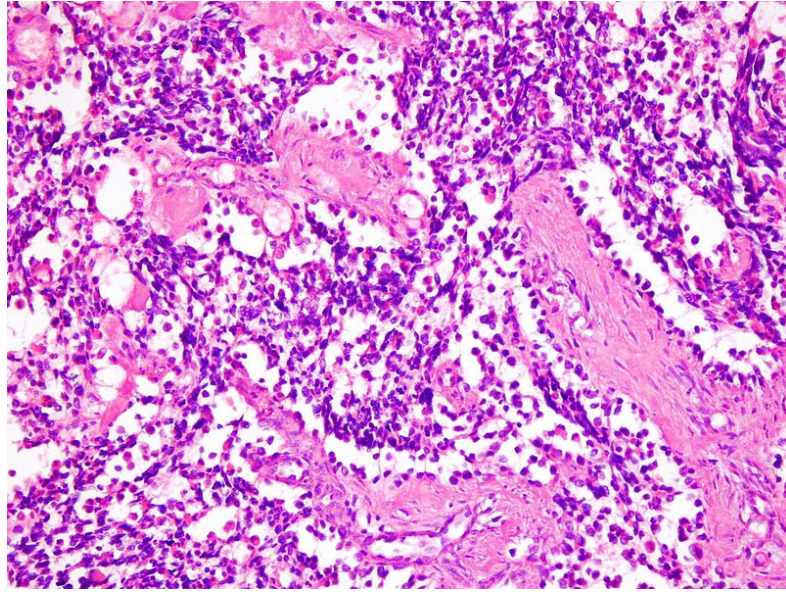
RABDOMYOSARKOM

İncelenen 12 olgunun 7 tanesi (%58,3) kadın, 5 tanesi (%42,7) erkekti. Hastaların ortalama yaşları 21.09 ± 22.44 yıl (2-79 yıl) idi. Tümör boyutu 2.8-8 cm. arasında olup ortalama 5.45 ± 1.61 cm idi. Hastaların ortalama takip süreleri 35.8 ± 24.4 ay (6-74ay) idi.

Olgulardan 6 tanesi alveolar tip, 4 tanesi embriyonel tip, 1 tanesi iğsi hücreli tip ve 1 tanesi de pleomorfik tip rabdomyosarkom olarak tanı aldı. ERMS vakalarının kesitlerinde yer yer hipersellüler, yer yer hiposellüler alanların bulunduğu, arada miksoid matriksin yer aldığı, oryantasyonları bozulmuş, küçük, hiperkromatik, yuvarlak veya iğsi şekilli undiferansiye hücreler ve rabdomyoblastlardan oluşan tümöral lezyon izlendi. ARMS'lar fibrokollajenöz septa ile ayrılmış alveolar bir yapı gösteriyorlardı. Bu yapının merkezinde kohezyonunu kaybetmiş minimal primitif kas diferansiasyonu gösteren dar sitoplazmalı, hiperkromatik hücreler yer yer hücre adaları oluşturuyorlardı. Alveollerin periferindeki hücreler fibröz septa üzerinde tek sıralı olarak dizili idiler (Resim-V). İğsi hücreli RMS vakasının histolojik olarak dens dizilen, girdap veya fasiküller oluşturan iğsi hücrelerden oluştuğu izlendi. Pleomorfik RMS vakası ise koyu eozinofilik sitoplazmalı, hiperkromatik nükleuslu, pleomorfik hücrelerden oluşuyordu.

Tüm olgular göz önüne alındığında en sık yerleşim bölgesi baş-boyun (%58.3) olarak saptandı. Rabdomyosarkom alt tiplerinin lokalizasyonlarına göre dağılımı Tablo-IX'de gösterilmektedir.

Resim-V: Alveolar rabdomyosarkom. Fibrokollajenöz septa ile ayrılmış alveolar pattern gösteren yer yer kohezyonunu kaybetmiş hücre adaları ve bu alveollerin periferinde fibröz septa üzerinde tek sıralı olarak dizilen tümöral hücreler (Hemotoksilen-eozin x 200)



Tablo-IX: Rabdomyosarkom alt tiplerinin lokalizasyonlarına göre dağılımı

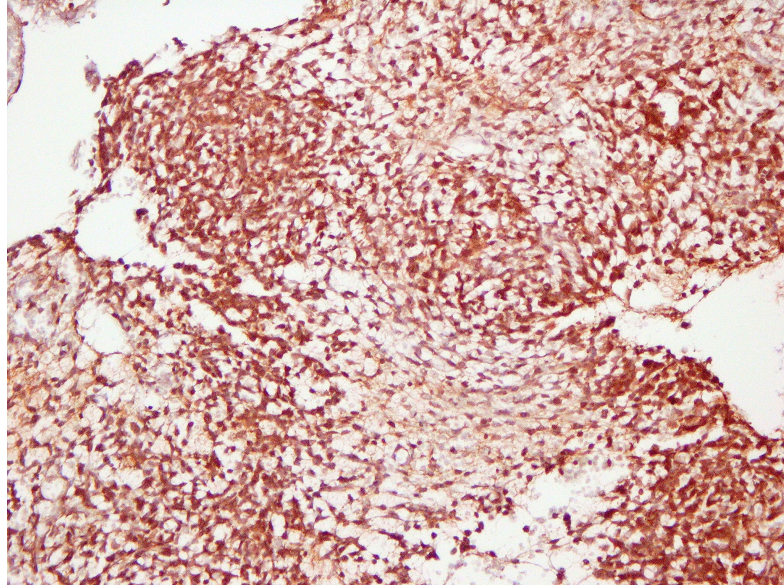
Rabdomyosarkom alt tipi	Baş-boyun n(%)	Toraks n(%)	Pelvis n(%)	Ekstremiteler n(%)	Genitoüriner n(%)
Alveolar RMS	3 (50)	1 (16.7)	1 (16.7)	1 (16.7)	0
Embriyonel RMS	3 (75)	1 (25)	0	0	0
İğsi hücreli RMS	0	0	0	0	1 (100)
Pleomorfik RMS	1 (100)	0	0	0	0
Toplam	7 (58.3)	2 (16.7)	1 (8.3)	1 (8.3)	1 (8.3)

Toplam 12 olgunun 7 tanesinin klinik izlem verilerine ulaşıldı. Buna göre 1 olgunun hastalık nedeniyle öldüğü, 1 hastada metastaz geliştiği ve 5 hastanın remisyonda takip edildiği

görüldü. Ayrıca hastalık nedeniyle ölen hastanın alveolar RMS, metastaz gelişen hastanın ise pleomorfik tipte RMS olduğu tespit edildi ve tümör tipleri ile hastalığın gidişi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p=0.029$). Tümör lokalizasyonu ve boyutu ile hastalığın gidişi arasında ilişki görülmedi.

Tüm olgularda C-kit ekspresyonları değerlendirildi ve 5 olguda (%41.6) ekspresyonun olmadığı, 7 olguda (%58.4) ekspresyonun bulunduğu, bunlardan da 1 tanesinde (%8.3) C-kit ekspresyonunun derece-I, 2 tanesinde (%16.7) derece-II ve 4 tanesinde (%33.3) derece-III düzeyinde olduğu izlendi. Tüm vakalarda sitoplazmik boyanma saptandı (Resim-VI).

Resim-VI: Embriyonel rabdomyosarkomda immünohistokimyasal olarak C-kit boyası ile tümör hücrelerinde sitoplazmik boyanma (C-kit x 400)



6 tane ARMS olgusunda FISH yöntemi ile N-myc amplifikasyonu değerlendirildi ve hiçbirinde amplifikasyonun olmadığı saptandı.

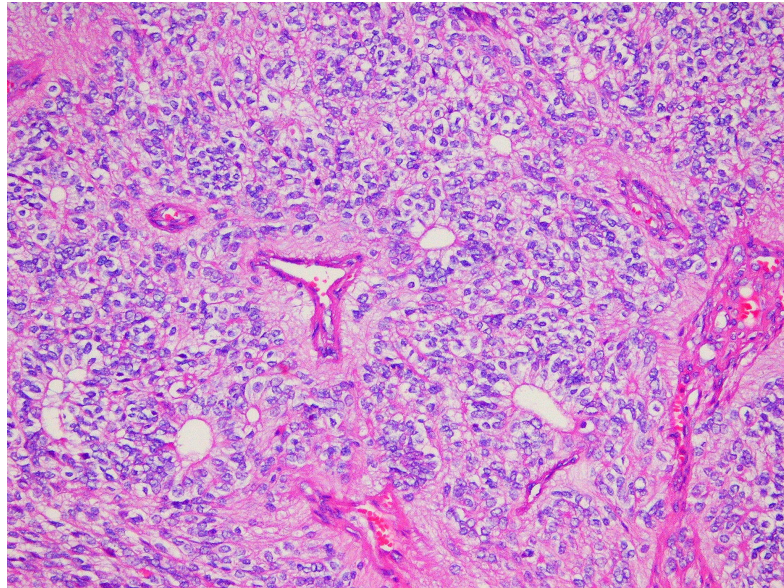
FISH yöntemi ile PTEN delesyonu değerlendirilen 8 olgunun hiçbirinde delesyon saptanmadı.

NÖROBLASTOM

İncelenen 10 olgunun 6 tanesi (%60) kadın, 4 tanesi (%40) erkekti. Hastaların ortalama yaşları $2,69 \pm 4,16$ yıl (1-7 yıl) idi. Tümör boyutu 5.5-12cm. arasında olup ortalama 7.31 ± 3.23 cm idi. Hastaların ortalama takip süreleri 27.7 ± 31.1 ay (0-102 ay) idi.

Tümör kesitlerinde yer yer nodüler büyüme patterni gösteren, arada nörofibriler bir zeminin bulunduğu, dar sitoplazmalı, hiperkromatik nükleuslu hücreler ve merkezindeki nörofibriler materyal çevresinde tümör hücrelerinin dizilmesi ile oluşan rozet formasyonları izlendi (Resim-VII).

Resim-VII: Nöroblastom. Nörofibriler zeminde yer yer rozet formasyonları oluşturan dar sitoplazmalı, hiperomatik nükleuslu hücrelerden oluşan tümör (Hemotoksilen-eozin x 200)



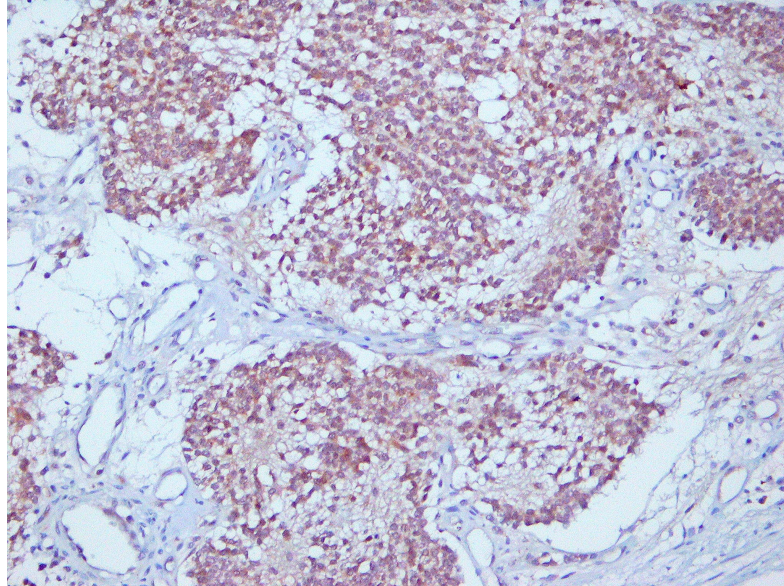
Olgulardan 6 tanesi (%60) adrenal gland, 2 tanesi (%20) pelvis, 1 tanesi (%10) baş-boyun bölgesi ve 1 tanesi (%10) vertebrada lokalize idi. Tümör lokalizasyonu ile N-myc

amplifikasyonu, C-kit boyanma derecesi ve patterni, hastalığın gidişi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

Klinik izlemlerine ulaşılan 8 hastadan 4 tanesinin (%40) hastalık nedeniyle öldüğü, 2 tanesinin (%20) remisyonda olduğu, 1 tanesinde (%10) metastaz geliştiği ve 1 tanesinin (%10) operasyon sonrası hemen öldüğü gözlemlendi. Ayrıca 7 olgunun evresine ulaşılabildi ve tümünün ileri evre (Evre III ve IV) oldukları saptandı.

9 olguya immünohistokimyasal olarak C-kit uygulandı ve 1 olguda (%11.1) ekspresyon saptanmazken 8 olguda (%88.9) C-kit ekspresyonu gözlemlendi. 1 hastada (%11.1) sitoplazmik+membranöz boyanma saptanırken diğer tüm vakalarda sadece sitoplazmik boyanma görüldü (Resim-VIII). NB'lu hastalarda C-kit ekspresyonu ile hastalığın gidişi, hastaların yaşları, cinsiyet ve tümör lokalizasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo-X).

Resim-VIII: Nöroblastomda immünohistokimyasal olarak C-kit boyası ile tümör hücrelerinde sitoplazmik pozitiflik (C-kit x 400)

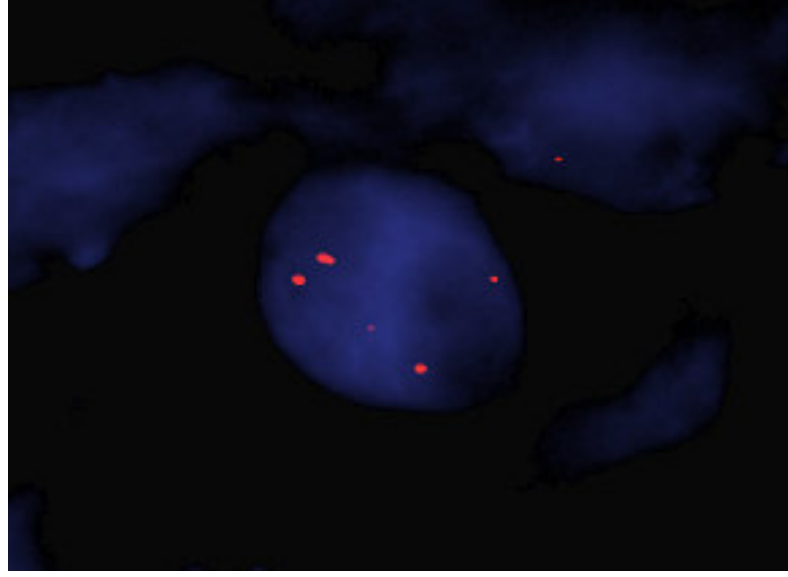


Olguların tümüne N-myc amplifikasyonu değerlendirildi. 3 olguda (%30) amplifikasyon saptanmazken 4 olguda (%40) N-myc amplifikasyonu (Resim-IX), 3 olguda (%30) da N-myc overamplifikasyonu (Resim-X) görüldü. N-myc amplifikasyonu ve overamplifikasyonu bulunan olgularda hastalığın gidişleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı saptandı. Ayrıca bu hastalarla yaş, cinsiyet ve tümör lokalizasyonları arasında da ilişki olmadığı izlendi (Tablo-X).

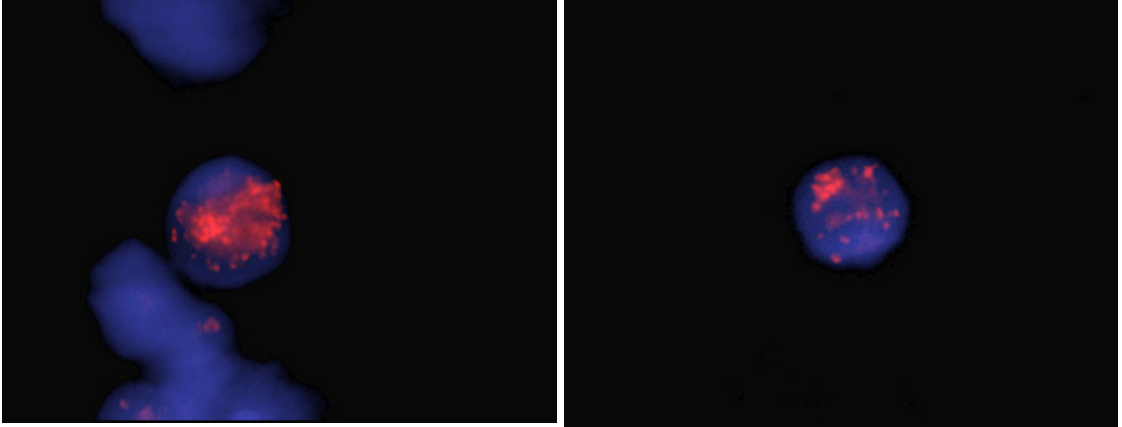
Tablo-X: Nöroblastom olgularının klinikopatolojik özellikleri ile C-kit ekspresyon ve N-myc amplifikasyonları arasındaki ilişki

	N-myc amplifikasyonu				C-kit ekspresyonu			
	Olgu sayısı (%)	Negatif (%)	Pozitif (%)	p değeri	Olgu sayısı (%)	Negatif (%)	Pozitif (%)	p değeri
Cinsiyet								
Kadın	4 (40)	1 (25)	3 (75)	0.691	3 (33.3)	0	3 (100)	0.667
Erkek	6 (60)	2 (33.3)	4 (66.7)		6 (66.7)	1 (16.7)	5 (83.3)	
Yaş								
<1 yaş	5 (50)	1 (20)	4 (80)	0.741	4 (44.5)	1 (25)	3 (75)	0,261
≤1 yaş	5 (50)	2 (40)	3 (60)		5 (55.6)	0	5 (100)	
Lokalizasyon								
Adrenal	6 (60)	1 (16.7)	5 (83.3)	0.492	6 (66.7)	1 (16.7)	5 (83.3)	0.856
Pelvis	2 (20)	0	2 (100)		1 (11.1)	0	1 (100)	
Baş-boyun	1 (10)	1 (100)	0		1 (11.1)	0	1 (100)	
Vertebra	1 (10)	1 (100)	0		1 (11.1)	0	1 (100)	
Hastalığın gidişi								
HNE	4 (40)	3 (75)	1 (25)	0,349	4 (44.5)	0	4 (100)	0,035
Remisyon	2 (20)	0	2 (100)		2 (22.2)	0	2 (100)	
Metastaz	1 (10)	0	1 (100)		1 (11.1)	0	1 (100)	
Lezyon (+)	1 (10)	0	0		1 (11.1)	0	1 (100)	
	1 (10)	0	1 (100)		1 (11.1)	1 (100)	0	

Resim-IX: Nöroblastomda FISH yöntemi ile LSI N-MYC (2p24.1) Spectrum Orange™ Probe'u kullanarak saptanan N-myc amplifikasyonu



Resim: X: Nöroblastomda FISH yöntemi ile LSI N-MYC (2p24.1) Spectrum Orange™ Probe'u kullanarak saptanan N-myc overamplifikasyonu



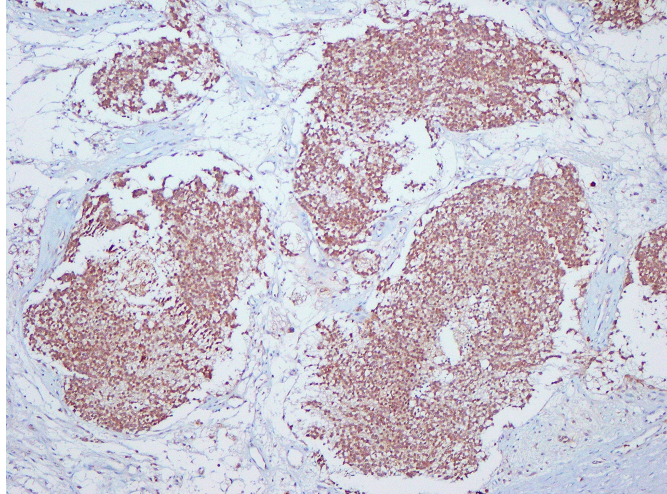
7 olguda FISH yöntemi ile PTEN delesyonu değerlendirildi ve hiçbirinde delesyon saptanmadı.

OLFAKTÖR NÖROBLASTOM

İncelenen 2 olgudan 1'i nazal kavitede 7 cm. boyutunda, çevre dokulara invazyonu bulunan 18 yaşında kadın hasta, diğeri ise olfaktör nöroblastom nedeniyle 4 kez opere olan ve lomber 5 hizasına metastazı bulunan 30 yaşında erkek hasta idi.

İlk lezyonun kesitlerinde; fibrotik bir zeminde adalar tarzında büyüme patterni gösteren ve yer yer rozet formasyonları oluşturan dar sitoplazmalı, hiperkromatik nükleuslu küçük-orta boyuttaki hücrelerden oluşan tümöral lezyon izlendi . İmmünohistokimyasal olarak tümör hücrelerinde sinaptofizin ve NSE ile pozitiflik görüldü. Bu hücreler vimentin, CD-99 ve myogenin ile negatif idi. Ama vimentin ile zemin ve rozetlerin merkezindeki nöropilde ve yer yer adalar içindeki sustentaküler benzeri hücrelerde pozitiflik dikkati çekti. Orta derecede (derece-II) ve sitoplazmik C-kit ekspresyonu mevcuttu (Resim-XI). FISH yöntemi ile N-myc amplifikasyonu ve PTEN delesyonunun bulunmadığı saptandı.

Resim-XI: Olfaktör nöroblastomda immünohistokimyasal olarak C-kit ile tümör hücrelerinde sitoplazmik boyanma (C-kit x 100)



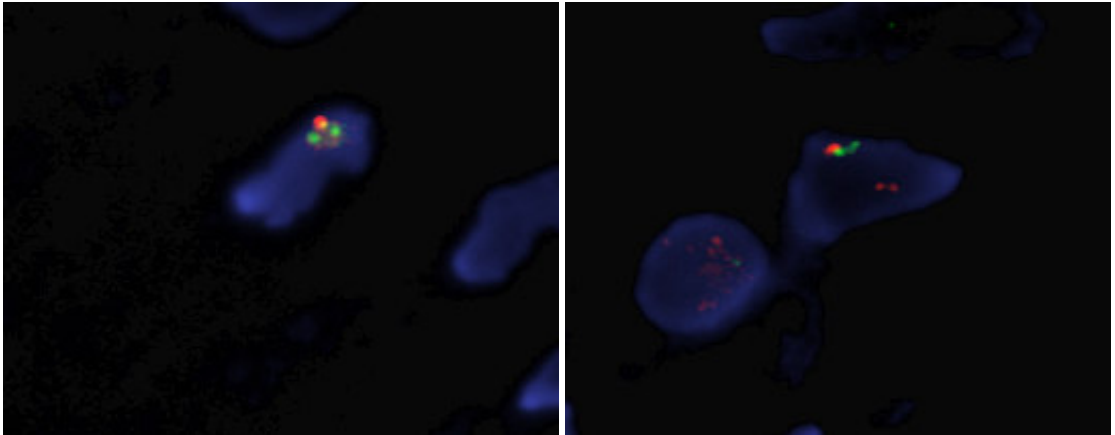
İkinci olgunun metastatik kitlesinin kesitlerinde; uniform görünümde, tabakalar halinde gelişim patternine sahip, küçük nükleus, dar sitoplazma ve belirsiz nükleol bulunduran tümör hücreleri izlendi. Tümör hücreleri CD-99, fokal S-100 ve seyrek vimentin pozitif olup sinaptofizin, kromogranin, NSE, NF, PGP-9.5, MSA, myogenin, LCA, TDT ve CK negatifti. Olguda C-kit ekspresyonu saptanmadı. FISH yöntemi ile N-myc amplifikasyonu ve PTEN delesyonu görülmedi.

DEZMOPLASTİK KÜÇÜK YUVARLAK HÜCRELİ TÜMÖR

13 yaşında kadın hastada intraabdominal bölgede saptandı. Lezyonun kesitlerinde dezmoplastik bir stromada uniform, dar sitoplazmalı, hiperkromatik-küçük nükleuslu hücreler izlendi (Figür-XV). İmmünohistokimyasal çalışmada vimentin, desmin ve EMA ile pozitiflik saptanırken sinaptofizin, kromogranin, PGP-9.5, NSE, S-100, CD-99, myogenin, Myo-D1, LCA ve CK ile boyanma görülmedi.

İmmünohistokimyasal olarak C-kit ekspresyonu görülmezken FISH yöntemi ile EWS/FLI1 translokasyonu saptandı (Resim-XII).

Resim-XII: DKYHT’de FISH yöntemi ile LSI® EWSR1 (22q12) Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe’u kullanarak saptanan EWS/FLI1 translokasyonu



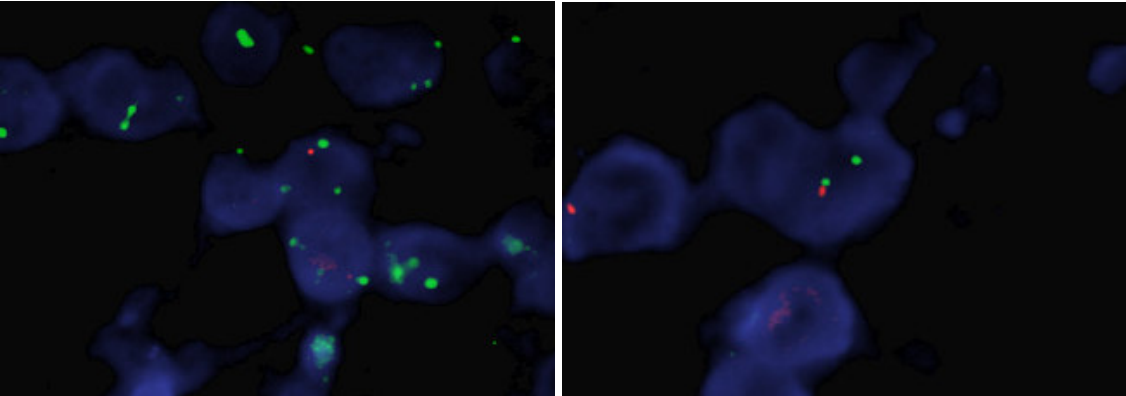
POLİFENOTİPİK YUVARLAK HÜCRELİ TÜMÖR

48 yaşında kadın hastanın tümörü sağ omuzda lokalize idi. Lezyonun kesitlerinde; kemik dokuya infiltrasyon gösteren, histolojik olarak polifenotipik görünümde tümöral lezyon izlendi. Bazı alanlarda immatür mezenkimal görünümdeki tümör hücreleri demetler ve girdaplar oluşturuyordu. Yer yer miksoid bir zeminde yıldızsı veya iğsi hücrelerin oluşturduğu alanların yanı sıra yer yer epiteloid ya da gangliomatöz diferansiasyonu düşündüren küçük gruplar halinde eozinofilik sitoplazmalı epiteloid hücrelerin oluşturduğu alanlar görüldü. Yaygın hemanjioperisitomatöz pattern, jeografik nekroz ve kanama alanları izlendi. İmmünohistokimyasal olarak tümör hücrelerinde vimentin, CD-99, sinaptofizin, kromogranin, NSE, NF, PGP-9.5, faktör-13a, GFAP ve Leu-7 ile boyama görüldü. S-100, EMA ve CK negatifti.

Tümör hücrelerinde derece-II düzeyinde sitoplazmik C-kit boyanmsı görüldü.

FISH yöntemi ile olguda PTEN delesyonunun bulunduğu saptandı (Resim-XIII). N-myc amplifikasyonu mevcut değildi.

Resim-XIII: PYHT’de FISH yöntemi ile LSI® PTEN (10q23) / CEP® 10 Dual Color Probe’u kullanarak saptanan PTEN delesyonu



UNDİFERANSİYE KÜÇÜK YUVARLAK HÜCRELİ TÜMÖRLER

Bu grupta bulunan 7 olgun 6 tanesinde C-kit ekspresyon düzeyleri değerlendirildi. 1 olguda (%16.7) boyanma saptanmazken 5 olguda (%83.3) kuvvetli boyanma görüldü. 1 hastada sitoplazmik+membranöz, 5 olguda sadece sitoplazmik boyanma izlendi.

Tablo-XI: KYMHT’lerde C-kit ekspresyon düzeyi ve patterni, EWS/FLI1 translokasyon, N-myc amplifikasyon ve PTEN delesyon durumları

Vaka	Tanı	C-kit	EWS/FLI1	N-myc	PTEN
1	ES/PNET	(-)			
2	ES/PNET	(-)			
3	ES/PNET	Derece-III, S+M	25/200 hc.		
4	ES/PNET	Derece-II, S	(-)		
5	ES/PNET	Derece-III, S	(-)		
6	ES/PNET	Derece-II, S	20/200 hc.		
7	ES/PNET	Derece-II, S	Çalışmadı		
8	ES/PNET	(-)	(-)		(-)
9	ES/PNET	Derece-I, S	25/200 hc.		
10	ES/PNET	(-)			
11	ES/PNET	(-)	N		
12	ES/PNET	(-)	31/200 hc.		(-)
13	ES/PNET	(-)	27/200 hc.		
14	ES/PNET	(-)	180/200 hc.		(-)
15	ES/PNET	Derece-II, S+M	80/200 hc.		
16	ES/PNET	Derece-III, S+M	180/200 hc.		(-)
17	ES/PNET	Derece-III, S+M	160/200 hc.		(-)
18	ES/PNET	(-)	21/200 hc.		
19	ES/PNET	Derece-III, S			
20	ES/PNET	(-)	(-)		
21	ES/PNET	Derece-II, S+M	60/200 hc.		(-)
22	ES/PNET	(-)	(-)		(-)
23	ES/PNET	(-)	190/200 hc.		(-)
24	ES/PNET	(-)	200/200 hc.		(-)
25	NB	(-)		Amplifikasyon (ort 3 hc.)	
26	NB	Derece-III, S		Overamplifikasyon	
27	NB	Derece-III, S		(-)	(-)
28	NB	Derece-II, S		Overamplifikasyon	(-)

Vaka	Tam	C-kit	EWS/FLI1	N-myc	PTEN
29	NB	(-)		Amplifikasyon (ort 3 hc.)	(-)
30	NB	Derece-III, S		Amplifikasyon (ort 5 hc.)	(-)
31	NB	Derece-III, S		(-)	(-)
32	ONB	Derece-II, S		(-)	(-)
33	NB	Derece-III, S		(-)	
34	NB	Derece-II, S+M		Amplifikasyon (ort 6 hc.)	(-)
35	NB	Derece-I, S		Overamplifikasyon	(-)
36	ARMS	(-)		(-)	
37	ARMS	Derece-III, S		(-)	
38	ARMS	Derece-II, S		(-)	(-)
39	ARMS	Derece-III, S		(-)	(-)
40	PIRMS	Derece-II, S			(-)
41	ERMS	Derece-III, S			(-)
42	ARMS	Derece-II, S		(-)	
43	ERMS	(-)			(-)
44	İHRMS	(-)			(-)
45	ARMS	Derece-I, S		(-)	(-)
46	ERMS	(-)			(-)
47	ERMS	(-)			
48	UKYMHT	Derece-III, S			
49	UKYMHT	Derece-III, S			
50	UKYMHT	(-)			
51	UKYMHT	Derece-III, S			
52	UKYMHT	Derece-III, S+M			
53	ONB	(-)			
54	PYHT	Derece-II, S		(-)	Delesyon
55	DKYHT	(-)		(-)	(-)
56	UKYMHT	Derece-III, S			
57	UKYMHT				

ES/PNET: Ewing sarkom/primitif nöroektodermal tümör, NB: Nöroblastom, ONB: Olfaktör nöroblastom, ARMS: Alveolar rabdomyosarkom, ERMS: Embryonel rabdomyosarkom, İHRMS: İğsi hücreli rabdomyosarkom, PIRMS: Plemorfik rabdomyosarkom, PYHT: Polifenotipik yuvarlak hücreli tümör, DKYHT: Dezmozplastik küçük yuvarlak hücreli tümör

* S+M: Sitoplazmik+membranöz, S: Sitoplazmik

TARTIŞMA

Yumuşak doku tümörlerinin ilk tanımlandığı dönemlerde özellikle çocukluk çağında görülen birkaç tümör tipi histolojik görünimleri göz önüne alınarak malign yuvarlak hücreli neoplazmlar içinde gruplandırılmıştır. Klinik, laboratuvar ve radyolojik bulguları benzerlik gösteren bu tümörlerde ayırıcı tanı için; rabdomyosarkomlarda sitoplazmik çapraz-striasyonlar veya nöroblastomlarda nörofibriler zemin ve rozet varlığı gibi histolojik parametreler kullanılmıştır. Daha sonra tanısal elektron mikroskopisinin kullanılması ile bu sınıflama genişlemiş, undiferansiye NB gibi tümörler tanımlanabilmiştir. İmmünohistokimyanın da gelişmesi ile ES/PNET ve DKYHT gibi farklı ve daha nadir görülen tümörler tanınmış, en sonunda genetik analizin de ilerlemesi ile yuvarlak hücreli tümörlerde son şema oluşturulmuştur (87).

Literatürde “küçük yuvarlak mavi hücre” fenotipine sahip, spesifik moleküler değişiklikler gösteren, sık görülen embriyonel pediatrik tümörlerin tanısında immünohistokimyasal marker panelinin kullanılabileceği belirtilmektedir. KYMHT’lerin sık kullanılan immünohistokimyasal özellikleri Tablo-XII gösterilmektedir (106).

Tablo-XII: KYMHT’lerde immünohistokimyasal profili

	Vimentin	CD-99	NSE	NF	S-100	NB-84	Myogenin/Myo-D1	Desmin	LCA	CK
ES	+	+	+/-	-	-	+/-	-	-	-	-
PNET	+	+	+	+	+/-	+/-	-	-	-	-
RMS	+	+/-	+/-	+/-	-	+/-	+	+	-	-
NB	+	-	+	+	+/-	+	-	-	-	-
DKYHT	+	+/-	+	+	-	+/-	-	+	-	+
Lenfoma	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	+	-

ES/PNET’TE İMMÜNHİSTOKİMYASAL BULGULAR:

- CD99: HBA-71 antijen, O-13, p30/32MIC2 veya MIC2 gene ürünü olarak da bilinir ve X-Y seks kromozomlarında lokalize psödootozomal genin kodladığı 30-32 kDa’luk bir yüzey glikoproteinidir (83). ES/PNET’lerin yaklaşık %90’ında pozitif olan bu markerın başlangıçta çok spesifik olduğu düşünülmüş daha sonra ayırıcı tanıdaki diğer tüm yuvarlak hücreli tümörlerde de görülebildiği saptanmıştır. Ayrıca daha birçok neoplastik ve normal dokuda da pozitifliği gösterilmiştir (Tablo-XIII). CD-99’un fonksiyonel rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Monoklonal anti-CD-99 antikorlarının apoptozisi indüklediği, büyümeyi inhibe ettiği ve ES/PNET’de kemoterapötik ajanların sensitivitesini arttırdığı bulunmuştur (17, 47, 49, 56, 99, 119). Bizim çalışmamızda CD-99 pozitifliği ES/PNET’te %63.2 oranında saptanmış olup 1 polifenotipik yuvarlak hücreli tümör, 2 undiferansiye küçük yuvarlak mavi hücreli tümör ve 2 rabdomyosarkom vakasında da CD-99 pozitifliği gözlenmiş ve hiçbir nöroblastom vakasında boyanma görülmemiştir. Literatürle benzer bu bulgular sonucunda CD-99 pozitifliğinin ES/PNET ailesi için yüksek oranda sensitif olduğu ama spesifikliğinin bulunmadığı ve immünhistokimyasal panelin bir parçası olarak kullanılması gerektiği düşünülmüştür.

Literatürde en az %80 olarak belirtilen CD-99 pozitifliği bizim çalışmamızda %63.2 oranında bulunmuştur. Bunun sebebinin; ES/PNET çalışma grubumuzun büyük çoğunluğunun (%55) intrakranial yerleşimli olması ve bu lokalizasyonda ES/PNET’te CD-99 negatifliğinin sık görülmesi olduğu düşünülmüştür. Literatürde nadir olarak görülen beyin ve sinir sisteminde lokalize olan ES/PNET santral veya periferik olarak ikiye ayrılır (71). Santral PNET ilk defa 1999 yılında Jay ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (93). Her iki grup tümör mikroskop altında aynı görünse de klinik-biyolojik davranışları ve tedavi protokollerinin farklı olması nedeniyle ayrımları yapılmalıdır. t(11;22) translokasyonu ve

CD-99 pozitifliğinin genellikle santral PNET'lerde bulunmaması ve dura mater-komşu kemik yapılara invazyon göstermemesi nedeniyle tümörün beyin-kafatası kemikleri ile ilişkisi santral PNET ile periferel PNET'i ayırmada yardımcı olabilmektedir (27, 47, 71). Bizim çalışmamızda intrakranial yerleşimli 11 olguda başka bir yerde tümör olmaksızın lezyonların primer oldukları, kafatası kemikleri ile ilişkisiz, intraparakimal yerleştikleri görülmüş ve bu olgular santral PNET olarak kabul edilmişlerdir. %85.7 oranında CD-99 negatif oldukları saptanmıştır. Ayrıca primer böbrek lokalizasyonunda tümörü bulunan 1 vakada beyine intraparakimal metastaz görülmüş ve bu olguda CD-99'un pozitif olduğu gözlenmiştir. Santral/periferel PNET'ler ile CD-99 immünreaktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuş ($p=0.02$), intraparakimal yerleşimli ES/PNET'lerde bu ayırımın yapılabilmesi için radyolojik bulgulara ek olarak CD-99 negatifliğinin kullanılabileceği düşünülmüştür.

Tablo-XIII: Normal ve Neoplastik dokulardaki CD-99 immünreaktivitesi ile küçük yuvarlak mavi hücreli tümörlerde CD-99 immünreaktivite sıklığı

Normal dokular	Neoplastik dokular	Sıklığı (%)
Lenfositlerin bir kısmı	ES/PNET	95
Kolumnar epitelin bir kısmı	T-hücreli lenfoblastik lenfoma	92
Pankreatik adalar	Az diferansiye sinovial sarkom	50
Renal toplayıcı kanallar ve distal tübüller	Küçük hücreli osteosarkom	23
Ürotelyum	RMS	21
Vajinal skuamöz epitel	DKYHT	16
Sertoli hücreleri	Küçük hücreli karsinom	9
Granuloza hücreleri	Merkel hücreli karsinom	9
Fibroblastlar (değişken)	Nöroblastom	0
Endotelyum (değişken)	Leiomyosarkoma	
	Malign fibröz histiositom	
	Kondrosarkoma	
	Fibrosarkoma	
	Timoma	
	Schwannom	
	Astrositom	
	Nöroendokrin tümörler	
	Mesane tümörleri	
	Özofageal karsinomlar	

	Glioblastom Ependimom Wilm's tümörü Uterin stromal sarkom
--	--

- ES/PNET ailesinde NSE, NF, CD-56, Leu-7, S-100, Sinaptofizin, kromogranin, PGP 9.5 gibi nöral markerlar çeşitli derecelerde pozitif olabilmektedir. PNET'lerde nöral marker pozitifliği ES'lardan daha fazla olmakla birlikte ES'larda da pozitiflik görülebilmektedir (40, 124). Bizim çalışmamızda ES/PNET tanısı alan 19 olguya uygulanan immünohistokimyasal çalışmalarda 11 olguda en az bir nöral marker pozitif bulunmuştur.

RABDOMYOSARKOM'DA İMMÜNHİSTOKİMYASAL BULGULAR:

- Sitoplazmik filamentler (desmin ve MSA):

Desmin; RMS tanısı için oldukça sensitif bir markerdır ama spesifik değildir. Leiomyosarkom, nöroblastoma, DKYHT, alveolar soft part sarkom, inflamatuvar myofibroblastik tümör, anjiomatoid fibröz histiositom, blastemal komponent pozitif Willm's tümörü, malign mezotelyoma, schwannoma, PNET gibi pek çok tümörde pozitif olabilir. Özellikle frozen dokularda sensitif bir markerdır ama formalin fiske dokuda bu sensitivitesini kaybeder. RMS'da negatifliği nadirdir. Morotti ve ark ileri derecede undiferansiye tümörlerde desminin negatif olabileceğini ileri sürmüşlerdir (77, 121, 124). Bizim çalışmamızda immünohistokimyasal olarak 8 olguya desmin uygulanmış ve 6 tanesinde pozitif saptanmıştır.

MSA ise rabdomyosarkom için sensitif bir marker olmakla birlikte bu tümörün leiomyosarkomdan ayırımı için faydalı değildir. Morotti ve ark yaptıkları çalışmalarında MSA'nın RMS tanısı ve ekartasyonu için sensitivite ve spesifitesinin düşük olduğunu rapor

etmişlerdir (77, 124). Bizim çalışmamızda immünohistokimyasal olarak 7 olguya MSA uygulanmış ve 6 tanesinde pozitif saptanmıştır.

- Oksidatif proteinler (myoglobin): Embryonik myogeneziste desminden daha sonra ekspresse edilir ve daha büyük, abondan sitoplazmalı, elektron mikroskopik olarak myogenezisin saptanabildiği myoblastlarda pozitifdir. RMS'larda %29 oranında ekspresse edilir (77, 89, 121). Bizim çalışmamızda immünohistokimyasal olarak sadece 1 olguya myoglobin uygulanmış ve negatif saptanmıştır.

- Myogenin, myoD-1: Myojenik diferansiasyon yolu; mezodermal prekürsörlerin myoblastlara dönüşmesi, myoblastların myotüblere farklılaşması ve son olarak myotüblerin iskelet kası myofibrillerine dönüşmesi şeklinde özetlenebilir. Myojenik regülatuar proteinler (MyoD1, myogenin, MRF4 ve myf-5) desmin, aktin miyozin gibi yapısal proteinler ile karşılaştırıldıklarında normal çizgili kas diferansiasyonunun daha erken fazında (myoD1 myoblastların diferansiasyonu öncesinde, myogenin ise diferansiasyonu sonrasında) ekspresse edilirler ve diğerlerinden daha primitif hücreleri boyarlar (77, 85, 121). Dolayısıyla her ikisi de myogenezisin erken fazlarında boyanırlar (77). Myogenin ve myoD1 ekspresyonu RMS'larda %91 oranında bulunur. Bu ikisinin ekspresyon oranları arasında önemli derecede fark yoktur ama myogeninin MyoD1 üzerine bazı avantajları vardır. MyoD1, normal doku, NB ve ES/PNET'in bir kısmında sitoplazmik ve granüler pozitif olabilir. Myogeninin böyle yalancı pozitif sitoplazmik boyanması yoktur ve sadece fetal çizgili kas dokusunda, RMS'da ve rabdomiyojenik diferansiasyon gösteren malign tümörlerde, nükleer boyanır (121). Myogenin, sadece RMS'u diğer KYMHT'lerden ayıran bir marker değil, aynı zamanda ERMS ile ARMS'un da ayırımında kullanılabilen bir markerdir (24). Morotti ve ark 956 vakalık çalışmalarında ARMS'da %50-100 oranında, kuvvetli ve homojen, ERMS'da ise daha az, daha zayıf ve saçılmış görünümdeki hücrelerde myogenin pozitifliği olduğunu

bulmuşlardır (77). Bunun nedeni ARMS'un myogenin pozitif progenitör hücrelerden kaynaklanırken ERMS'in myogenin ekspresyonu öncesi myogeneziste bloke olan hücrelerden kaynaklanmasıdır. ERMS'da myogenin pozitif hücrelerin bulunması ise çevreyle ilişkili fenotipik varyasyona bağlıdır. ARMS kötü prognoz ile ilişkili olduğu için myogeninin kuvvetli ekspresyonu RMS'larda kötü prognozun bir markeri gibi kullanılabilir. Ayrıca PAX3-7/FKHR translokasyonu ile myogenin ekspresyonu arasında kuvvetli bir ilişki olduğu saptanmıştır. Myo-D1 hem ARMS hem de ERMS'da ekspresse edildiği için bu ikisini ayırımında kullanılmaz (24).

Nonneoplastik dokularda da (reaktif lenf nodu gibi) benign nükleuslarda nükleer myogenin ve myoD-1 pozitifliği olabileceği, bu hücrelerin orjininin çok açık olmadığı, myojenik potansiyeli olan basit nonneoplastik hücreleri yansıtabileceği belirtilmektedir. Ayrıca rabdomyoblastik komponenti bulunan plöropulmoner blastom, germ hücreli tümör ve postkemoterapotik doku, ülser yatağı gibi dokulardaki reaktif myositlerde (nekrotizan fasiitis vb.) de hem myogenin hem de myoD1 ile pozitiflik olabilmektedir (77). Bizim çalışmamızda immünohistokimyasal olarak 8 olguya myogenin uygulanmış ve 6 tanesinde pozitif saptanmıştır. Myo-D1 ise 3 olguya uygulanmış, tümünde pozitif bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda genel olarak 12 RMS olgusunun 9 tanesinde MSA, desmin, myogenin veya myoD-1 ile pozitiflik saptanmış olup kalan 3 olguda koyu eozinofilik sitoplazmalı karakteristik rabdomyoblastlar görülmüş ve rabdomyosarkom tanısı doğrulanmıştır.

NÖROBLASTOM'DA İMMÜNHİSTOKİMYASAL BULGULAR:

- Nöroendokrin antijenler: Tüm nöroblastik tümörlerde tanımlanmakla birlikte genel olarak bunların yaygınlığı ve kuvveti diferansiasyon seviyesine göre değişir.

NSE; NB'da oldukça sensitif ama daha az spesifik bir markerdir. Az diferansiye tümörlerde daha az, fokal olmakla birlikte GNB ve GN gibi daha diferansiye tümörlerde yoğunluğu artar. NF protein, nöronal hücrelerin intermediate filamentlerine özgüdür. NB'ların çoğunda tanımlanmakla birlikte immünreaktivite büyük oranda diferansiasyon derecesi ve fiksasyon metoduna bağlıdır.

S-100 protein bu tümörlerin ganglionöromatöz kısmında kuvvetle ekspresse edilir. Shimada ve ark S-100'ün tümör adaları çevresindeki stromada bulunan elonge-spindle hücrelerde de bazı tümörlerde pozitif olabileceğini ve bu hücrelerin diferansiye nöromatöz stromayı üreten prekürsör hücreler olabileceğini, S-100 protein varlığının iyi prognostik kriter olduğu rapor etmişlerdir.

NB'un tanısına yardımcı diğer markerlar PGP-9.5, kromogranin ve sinaptofizindir (124).

Bizim çalışmamızda 10 nöroblastom olgusunun 9 tanesinde immünhistokimyasal olarak nöral markerlar uygulanmış ve tümünde en az bir nöral marker pozitif saptanmıştır.

Literatürde birçok çalışmada CD-99'un ES/PNET'li hastaların hemen hemen tümünde ve diğer yuvarlak hücreli tümörlerde düşük oranda saptanmakla birlikte NB'da bulunmadığı ve CD-99'un membranöz immünreaktivitesinin NB tanısını ekarte ettireceği rapor edilmektedir (47). Bizim çalışmamızda da NB olgularının tümünde nöroendokrin marker pozitifliği saptanırken hiçbir olguda CD-99 pozitifliği görülmemiştir. Ayrıca vimentin de tüm NB olgularında negatif bulunmuş, istatistiksel olarak fark saptanmamasına rağmen literatürde böyle bir bilgiye rastlanmamakla birlikte vimentin negatifliğinin, büyük oranda vimentin immünreaktivitesi gösteren ES/PNET'ten ayırıcı tanıda kullanılabileceği düşünülmüştür.

ONB'DA İMMÜNHİSTOKİMYASAL BULGULAR:

- Nöroendokrin antijenler: ONB'da bir veya daha fazla nöroendokrin marker (sinaptofizin(%64-100), kromogranin, NSE (%84-100), NF(%73)) ekspresyonu görülür.

Sinaptofizin ve kromogranin daha çok paraganglioma benzeri tümörlerde ekspresse edilirken NF sıklıkla nöroblastoma benzeyen tümörlerde ekspresse edilir (48, 124).

- Paraganglioma varyantında periferde lokalize sustentaküler hücrelerde S-100 pozitifdir (57). Paragangliomada S-100 pozitif olan sustentaküler hücreler S-100 ve vimentin ile pozitifdir ve bu ayırıcı tanılarındadır önemlidir (124).

- NB benzeri tümörlerde CK (1/3 vakada) ve EMA gibi epitelyal markerlar negatifken NE-karsinoma benzer tümörlerde pozitifdir (48, 57). Bu nöroendokrin karsinomun tipik diffüz sitokeratin pozitifliğinin tersi bir durumdur (124).

- NB benzeri ONB'lar yüksek proliferasyon indekslerine (%10-50) sahiptirler (57).

Bizim çalışmamızda nazal kavite lokalizasyonunda tümörü bulunan 18 yaşında kadın hastada uygulanan immünohistokimyasal çalışmalarda tümör hücrelerinde sadece sinaptofizin ve kromogranin ile boyanma izlenmiştir. Vimentin ile blastik hücrelerde boyanma görülmemiş olup tümör adaları çevresindeki sustentaküler benzeri hücrelerde ve blastik hücreler arasındaki denritik hücre benzeri hücrelerde pozitiflik saptanmıştır. Olgu sayısındaki sınırlılık nedeniyle genelleme yapılamamakta olup literatürde böyle bir bilgiye rastlanmamakla birlikte bu boyanma patterninin tanı koymada faydalı olabileceği düşünülmüştür.

DKYHT'DE İMMÜNHİSTOKİMYASAL BULGULAR:

- Epitelyal markerlar: Sitokeratin ile %86- 95, EMA ile %93-96 oranında pozitif boyanma rapor edilmektedir. Bazen CK sitoplazmik dot-like patterninde boyanır. CK-20 (merkel hücreli karsinomda (+)) ve CK 5/6 (malign mezotelyomada (+)) DSRCT'de negatiftir. Bununla birlikte MOC-31 ve BerEP4'ü de içeren epitelyal markerlar sıklıkla ekspresse edilirler (85, 124).

- Tümü vimentin ile boyanır. Bu antijen ile boyanan vakaların %90'ından fazlasında tipik olarak perinükleer noktasal boyanma patterni vardır.
- Desmin ile noktasal boyanma patternini gösterir.
- Nöroendokrin antijenler: DKYHT'lerde en sık NSE ve Leu-7 olmak üzere nöral antijenler saptanır. NSE %82, Leu-7 %49 şeklinde rapor edilmiştir. Bununla birlikte nöroendokrin diferansiasyonun daha spesifik marekerları olan sinaptofizin ve kromogranin nadiren pozitifdir (124).

Literatürde DKYHT'lerde %10-20 oranında keratin, desmin, NSE negatif olduğu rapor edilmiştir (78). Bizim çalışmamızdaki DKYHT tanısı alan olgu, DKYHT'lerin tipik prezentasyonu olan palpabl intraabdominal kitle nedeniyle başvuran bir hastadır ve immünohistokimyasal olarak vimentin , desmin ve EMA ile boyanma saptanmıştır. Olgumuzda nöroendokrin markerlardan sinaptofizin, kromogranin, NSE ve PGP-9.5 uygulanmış ve negatif bulunmuştur.



Görüldüğü gibi KYMHT'lerde immünohistokimyasal parametrelerden spesifik olarak tanımlanan çoğu markerın daha sonraları başka pek çok tümörde de bulunabildiği saptanmıştır. Bazen bu immünohistokimyasal boyanma patternlerinin çakıştıkları ya da vakaların geleneksel boyanma patternlerini göstermedikleri görülmüştür. Literatür bilgileri ile birleştirildiğinde çalışmamız sonucunda özellikle sınırlı bir panel uygulamanın yanlışlıklara neden olabileceği, vimentin, desmin, CD99, iki veya daha fazla nöroendokrin marker (sinaptofizin, kromogranin, NSE, NF, Leu-7, veya PGP-9.5), myogenin veya myo-D1,

sitokeratin, S-100 protein, CD45, TDT, CD-43 ve CD-79a'nın bulunduğu bir paneli uygulamanın KYMHT'lerin ayırıcı tanısını yapmak için gerekli olduğu düşünülmüştür.

Literatürde ışık mikroskopik özellikler, klinik özellikler (yaş, tümörün lokalizasyonu) ve immünohistokimyasal özellikler birleştirildiklerinde bile KYMHT'lerin ayırıcı tanılarının yapılamayabileceği, bunun için elektron mikroskobisi, sitogenetik ve hatta moleküler genetik çalışmaların (FISH ve RT-PCR) gerektiği belirtilmektedir (40, 73). Bulgularımızın ışığında bu yaklaşım biçimi akılcı ve doğru gözükmektedir.

ES/PNET'TE MOLEKÜLER GENETİK

ES/PNET'te olguların %85-95'inde görülen t(11;22)(q24;q12) translokasyonu, 2. sıklıkta görülen EWS/ERG t(21;22)(q22;q12) translokasyonu ve diğer translokasyonlar olan EWS-ETV1 t(7;22)(p22;q12), EWS-EIAF t(17;22)(q12;q12) ve EWS-FEV t(2;22)(q33;q12) translokasyonları sonucu medyana gelen füzyon transkriptleri hücre sinyal iletilisi, hücre proliferasyonu ve büyümesi, apoptoz , doku invazyonu ve tümör metastazı gibi durumlarla ilişkili genlerin fonksiyonlarını bozarlar (19). Bizim çalışmamızda ES/PNET'li olgularda EWS/FLI1 translokasyon oranı %65 olarak saptanmıştır. Bu değerin literatürde belirtilen değerden (%85-95) daha düşük olmasının nedeninin, olgularımızın %55'lik kısmını santral PNET'in oluşturması ve santral PNET'lerde EWS/FLI1 translokasyonun genellikle bulunmaması olduğu düşünülmüştür. Santral PNET'ler dışında sadece göğüs duvarı yerleşimli bir olguda translokasyon negatif bulunmuş ve ES/PNET tanısında EWS/FLI1 translokasyonunun gösterilmesi oldukça sensitif olarak değerlendirilmiştir.

Literatürde diğer translokasyonlarla karşılaştırıldığında EWS/FLI-1 içeren hastaların sağ kalımının önemli ölçüde fazla olduğu ve EWS-ERG füzyonu bulunan vakaların ¾'ünün hızlı progresyon gösterdikleri rapor edilmiştir (72, 94). Bizim çalışmamızda ES/PNET

olgularında EWS/FLI1 translokasyonu ile hastalığın gidişi , hastaların yaşı, cinsiyeti ve tümör lokalizasyonu gibi bazı klinik parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilmemiştir.

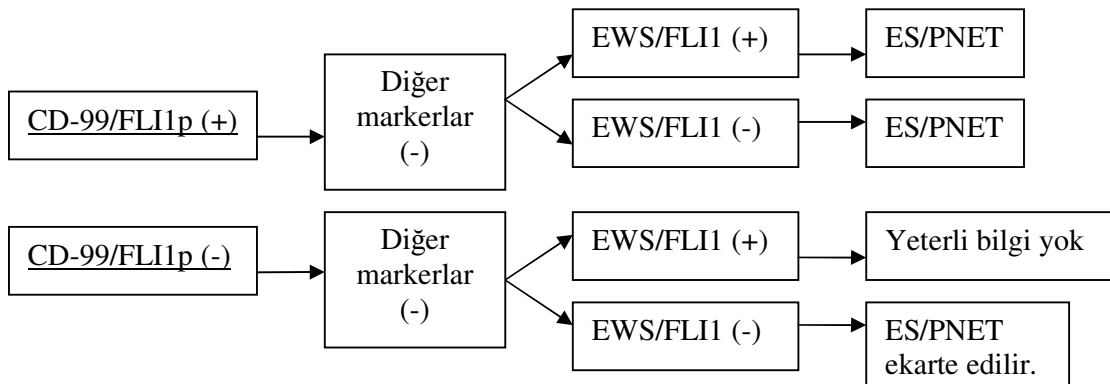
EWS/FLI-1'in en az 18, EWS/ERG'nin ise en az 4 füzyon tipi tanımlanmıştır (18, 56). t(11;22)(q24;q12) sırasında en sık görülen füzyon EWS'ye ait ekson 7 ile FLI1'e ait ekson 6 (tip 1; olguların %55-60'ında) ve EWS'ye ait ekson 7 ile FLI1'e ait ekson 5 arasında (tip 2; olguların %25'inde) meydana gelir (41). Bu füzyon yapıları ve klinik davranış arasındaki ilişkinin altında yatan biyolojik mekanizma çok açık değildir. Tip-1'in kodladığı transkripsiyon faktörlerinin daha zayıf transkripsiyon etkisinin olduğu, hedef genlerde daha az aktivasyon yaptığı ve daha düşük proliferasyon indeksine sahip olduğu bulunmuştur (12, 18, 87). Tip-I EWS/FLI-1 transkriptine sahip olan hastalarda hastalıksız sağ kalım %60-70 iken diğer EWS/FLI-1 transkriptine sahip olan hastalarda hastalıksız sağ kalım %20 civarındadır (87).

Bu translokasyonlar, kovansiyonel sitogenetik çalışmalar, Southern blot ve Northern blot analizler, fluoresan in situ hibridizasyon ve RT-PCR teknikleri ile saptanabilir. Özellikle nitrik asitte dekalsifiye edilmiş preparatlarda translokasyon gösterilemeyebilir (91). Bizim çalışmamızda formik asit ile dekalsifikasyon işlemi sonrasında işleme alınan ekstremiteler yerleşimli bir olguda FISH yöntemi ile EWS/FLI1 translokasyonu saptanamamıştır.

Bridge ve ark KHMHT'lerde FISH ve RT-PCR yöntemlerini karşılaştırmışlar ve FISH yönteminin sensitivite ve spesifitenin %90 gibi oranlarla çok yüksek olduğunu, yalancı pozitifliğin olmadığını, RT-PCR ile ise yalancı pozitifliklerin olabileceğini, spesifitesinin %85, sensitivitesinin ise %54 olduğunu bulmuşlardır. Bu oransızlığın teknikten, doku fiksasyonundan, sekonder bir değişiklik ile bu translokasyonun geliştiği tümör hücrelerinin minör bir klonunu saptamasından, arşivde kalan bloklardaki dokularda RNA

degradasyonunun olmasından veya parafin materyali ile çapraz kontaminasyonlardan kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir (7). Qian ve ark ları ise RT-PCR'ın daha avantajlı bir teknik olduğunu, FISH yöntemi ile EWS'nin tüm tiplerini aralarında ayırım yapmadan saptarken RT-PCR ile translokasyon tiplerini ayrı ayrı saptayabildiklerini, spesifik translokasyon tiplerinin prognostik değeri olabileceğini rapor etmişlerdir. Ama FISH ile tüm EWS translokasyonlarını saptanabildiği için t(7;22) ve t(2;22) gibi RT-PCR'ın saptayamadığı vakaların da bulunabileceği unutulmamalıdır (94). Sonuç olarak günümüzde yine de FISH ile RT-PCR'ın spesifikite ve sensitiviteyi arasında farklılık yok gibi kabul edilmekte olup sadece FISH yönteminin daha pratik bir teknik olduğu söylenmektedir (107).

EWS/FLI-1 veya EWS/ERG füzyon genleri çok nadiren polifenotipik yuvarlak hücreli tümörler, NB , RMS ve DKYHT'lerde de rapor edilmekle birlikte ES/PNET tanısı için son derece spesifik olarak kabul edilmektedir ve bu translokasyonların gösterilmesinin ES/PNET tanısı için altın standart olduğu söylenmektedir (14, 22, 36, 40, 49). Thorner ve ark sadece sitogenetik veya RT-PCR ile t(11;22(q24;q12))'nin saptanmasının kesin tanı koymak için çok da yeterli olmadığını, fenotipik özelliklerin ve CD-99 pozitifliğinin de buna eşlik etmesinin tanıya faydalı olacağını belirtmişlerdir (119). Bridge ve arkadaşları derlemelerinde tanıda bir algoritma öne sürmüşler (73):



Visseral, kemik ve yumuşak dokudan kaynaklanan ES/PNET'lerde genetik çalışmalarda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamakla birlikte intrakranial yerleşimli ES/PNET'lerde t(11;22) translokasyonunun özellikle periferal ve santral PNET ayırımında yardımcı olduğu bilinmektedir. Çünkü primer santral PNET'lerde EWS/FLI1 translokasyonu genellikle bulunmaz (27, 40). Bizim çalışmamızda da santral PNET olarak kabul edilen 11 vaka ile diğer bölgelerde yerleşen ES/PNET'ler arasında EWS/FLI1 translokasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür ($p=0.04$). Ayrıca intrakranial metastazı bulunan primer böbrek yerleşimli olgunun metastatik kitlesinde EWS/FLI1 translokasyonu saptanmıştır. Literatür bilgileri ışığında intrakranial yerleşimli bir ES/PNET olgusunda santral/periferal PNET ayırımında EWS/FLI1 translokasyonunun saptanmasının kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Santral PNET'lerin prognozunun daha kötü olması nedeniyle bu iki ES/PNET tipini birbirinden ayırmanın önemli olduğu bilinmekle birlikte bizim çalışmamızda klinik gidişleri yönünden santral/periferal PNET'ler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0.536$).

ES/PNET'te görülen moleküler değişikliklerin gösterilmesinin tedavide önemli olabileceği düşünülmektedir (19). Deneysel çalışmalar aberan bir transkripsiyon faktörü olan EWS/FLI-1'in tümöröenezisi başlattığını, transforme hücrelere spesifik olduğunu ve normal hücrelerde ekspresse olmadığını göstermiştir. Buna yönelik çeşitli tedavi yaklaşımları

kullanılmaktadır. EWS/FLI1 antisens oligonükleotidlerinin veya siRNA'larının her birinin inhibisyonunun EWS/FLI1 bulunduran hücrelerde in-vitro olarak büyümeyi inhibe ettiği, apoptozisi arttırdığı ve hücrelerin metastatik fenotiplerini azalttığı görülmektedir. Bununla birlikte bu ilaçların in-vivo etkileri sınırlıdır çünkü çabuk yıkılır ve intrasellüler penetrasyonu azdır (18, 19, 58).

Bu tümör grubunda trizomi-8 (vakaların %44'ü) , trizomi-12 (vakaların %16'sı), 16q ve 19q kaybı ve t(1;16) (vakaların %18'i) gibi sekonder sitogenetik anormallikler tanımlanmıştır (10, 19, 56, 124). Bunların tanı için spesifite ve sensitivitesi yoktur ama daha agresif gidiş ile ilişkili oldukları düşünülmektedir (3, 124).

RMS'DA MOLEKÜLER GENETİK

Embryonel ve alveolar rabdomyosarkomlardaki sitogenetik anomaliler farklıdır. Sıklıkla embriyonel rabdomyosarkomda 11p15 kromozomunda allel kaybı karakteristiktir (14, 124). Ayrıca Embriyonel rabdomyosarkomun sitogenetik incelenmesinde kromozom 2, 8 ve 13'de kompleks yapısal ve sayısal kromozomal değişiklikler bulunmuştur (9, 24, 25, 61, 64, 124).

ARMS'ların büyük bir kısmı (%80) kromozom 2 ve 13 veya daha az sıklıkla kromozom 1 ve 13 arasında spesifik kromozomal traslokasyonlarla ilişkilidir. İlki PAX3 transkripsiyon faktörü ile, 2. si ise PAX7 transkripsiyon faktörü ile başka bir transkripsiyon faktörü olan FKHR (FOXO1A) arasında füzyona yol açar (43, 44, 61, 69, 81). PAX3/FKHR füzyonu %76 hastada, PAX7/FKHR %10 hastada meydana gelir (19). PAX7/FKHR daha genç hasta, daha lokalize hastalık ve primer ekstremitte tutulumu ile ilişkilidir (4, 44, 55, 61). Kalan %20-25 vaka translokasyon veya füzyon negatif vakalardır. Mikst alveolar-embryonel RMS'lu vakalar gerçek füzyon negatif vakaların büyük çoğunluğunu oluştururlar. Bununla

birlikte varyant translokasyonlar da (PAX3-AFX ve PAX3-NCOA1) tanımlanmıştır. Bu translokasyonların arasında ayırım yapılması önemlidir çünkü histolojik olarak ayırım yapılamasa da t(2;13)'e sahip hastalar daha kötü klinik gidişe sahiptirler (4, 81, 90). PAX3/FKHR gen füzyonu kötü gidişli hastalarda bağımsız bir prognostik faktörken PAX7/FKHR çok daha iyi bir gidişe ilişkilidir. Füzyon negatif olan grup, bu iki grup arasında intermadiate bir gidişe sahiptir (44). Proliferasyon, apoptozis ve diferansiasyonun kontrolünü değiştirerek onkojenik etki gösterirler. Scheidler ve arkadaşları bu chimeric füzyon proteininin doku kültüründe fibroblastlara değişme yeteneği verdiğini göstermiştir.

Ek olarak sitogenetik çalışmalarda reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) veya fluorescence in situ hybridization (FISH) yöntemleri ile bu moleküler anomaliler ortaya çıkarılabilir. Yüksek sensitiviteye sahip bu teknikler fikse edilmiş parafin bloklardaki dokuların az bir kısmı ile başarılı sonuçlar verir. bu diğer rabdomyosarkom subtiplerinden ve ayırıcı tanıdaki diğer yuvarlak hücreli neoplazmlardan ayrılmasını sağlar.

Alveolar rabdomyosarkomun bir kısmında tipik PAX/FKHR gen füzyonu rol oynamaz ve genetik olarak heterojenözdür. Bazı vakalarda diğer genlerle alternatif füzyonlar gösterilmiştir, bazılarında ise gerçek bir füzyon ve füzyon ürünü gösterilememiştir. ARMS'da çok sık görülen amplifikasyonlar hemen hemen her 3 vakanın birinde meydana gelir ve 12q13-15 ve 2p24 kromozomal alanları içerir. 12q13-15 alanı GLI, CDK4 ve MDM2 gibi birçok büyüme ilişkili geni ve 2p24 alanı da nöroblastom gibi birçok tümörde amplifiye edilen MYCN onkogenini barındırır. Daha az sıklıkla görülen amplifikasyonlar ise 13q31, 2q34-qter, 15q24-26 ve 1q36'dır.

PLRMS: Sadece 6 pleomorfik rabdomyosarkomda kromozomal aberasyon raporlanmıştır. Hepsi fazla kompleks karyotipe sahiptir ve hiçbirinde t(1;13) ve t(2;13) translokasyonları saptanmamıştır (124).

Literatürde RMS’da N-myc amplifikasyonları üzerine pek çok çalışma yapılmış ve bunun ARMS’da olduğu, ERMS’da bulunmadığı rapor edilmiştir (61, 64). Driman ve ark; ARMS’ların %43’ünde N-myc amplifikasyonu saptarlarken ERMS’ların hiçbirinde amplifikasyon saptamamışlar, ayrıca klinik gidiş ile arasında önemli bir ilişki olmadığını rapor etmişlerdir. Toffolatti ve ark da RMS’larda N-myc ampl ile histoloji veya klinik gidiş arasında bir ilişki olmadığını belirtmişlerdir. Hachitanda ve ark ise ARMS’da %60 ampl olduğunu ve bunun sağ kalımla önemli bir ilişkisinin olduğunu rapor etmişlerdir. Kouraklis ve ark RMS hücre dizisinde yüksek N-myc eksp nun biyolojik davranış üzerine etkisini araştırmışlar, yüksek N-myc eksp bulunduran hücre dizilerinde xenogaftlarda daha invaziv bir büyüme patterni olduğunu bulmuşlardır. Williamson ve ark ları 155 RMS (44 ARMS, 53 ERMS ve 6 ayırım yapılamayan RMS) vakasının bulunduğu çalışmalarında N-myc overekspresyon ve gen kopyalarının artmasının ARMS ve ERMS’da ortak bir fenomen olduğu ama ekspresyon ve gen kopya sayısının ARMS’da çok daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca gen kopya sayısı ve overekspresyonunun ARMS’li hastalarda kötü prognozla ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Vakalarda N-myc proteini immünohistokimyasal olarak da gösterilebilmektedir (125). Bizim çalışmamızda 6 ARMS’lu olguda FISH yöntemi ile N-myc amplifikasyonu değerlendirilmiş, hiçbir olguda amplifikasyon olmadığı saptanmıştır. Literatürde %50’lere varan N-myc amplifikasyonunun hiçbir ARMS’da bulunmamasının nedeninin; olgu sayısındaki azlık, dokulardaki tespit problemi veya teknikle ilişkili problemler olabileceği düşünülmüştür.

NB’DA MOLEKÜLER GENETİK

- N-myc amplifikasyonu : En önemli prognoz göstergelerinden biridir (15). N-myc 2p23’de lokalize bir protoonkogendir (103). İlk defa 1983 yılında tanımlanmasından bu yana NB’da

N-myc onkogeninin prognostik rolü üzerinde durulmaktadır. Bu transkripsiyon faktörünün hücre siklus progresyonu üzerine etkisi vardır ve apoptozise sesitiviteyi arttırır (116). Bu genin amplifikasyonu sitogenetik olarak 2 şekilde gösterilmektedir; d-mins (double minutes kromatin cisimcikleri) ekstra küçük kromozom parçalarının olması, HSR (homojen boyanan bölgeler) ise aynı kromozom içinde bir bölgenin yinelenmesi şeklinde tanımlanmaktadır.

Tümör hücresinde N-myc amplifikasyonu değişik moleküler tekniklerle (southern blot, FISH, kantitatif PCR, immunhistokimya gibi) gösterilebilir (15). Southern blot ve RT-PCR teknikleri için yeterli miktarda DNA'nın izole edilmiş olması gerekmektedir. Bu yaklaşımlarda tümör dokusu normal lökosit, lenfosit, non-malign stromal hücrelerle büyük oranda karışır ve bunlar küçük undiferansiye alanlarda N-myc amplifikasyonu değerlendirilmesini zorlaştırabilir. FISH imprint veya doku kesitlerinde hücre nükleuslarındaki spesifik nükleotidleri saptar. NB'da immatür alanlarda daha fazla N-myc amplifikasyonu olur ve FISH bu tümör içi N-myc amplifikasyon heterojenitesini saptayabilir. Sartelet ve ark FISH ile NB larda heterojenitenin olduğunu, amplifikasyonun değişken derecelerde olup yalnızca undiferansiye alanlarda bulunduğunu ve FISH tekniğinin NB'larda N-myc amplifikasyonu saptamada son derece sensitif olduğunu rapor etmişlerdir (103). Hachitanda ve ark da benzer sonuçlar elde etmişler, FISH'in daha hızlı olduğunu ve aynı tümör dokusunda hücreler arasında N-myc amplifikasyonu heterojenliğini gösterebildiği için daha avantajlı olduğunu rapor etmişlerdir. Onlar GNB'larda veya daha diferansiye NB'larda N-myc amplifikasyonu olmadığını belirterek bu tümörlerde karışık ya da odaklar halinde diferansiye alanlar bulunduğunu söylemişler ve N-myc heterojenliğini daha diferansiye alanlarda N-myc amplifikasyonu bulunmamasına bağlamışlardır (46). Tanaka ve ark benzer sonuçlar elde etikleri çalışmalarında FISH yönteminin yüksek oranda sensitif ve spesifik

olduğunu, PCR sistemi ile FISH metodunun kombinasyonunun NB'da N-myc amplifikasyonunu değerlendirmede son derece efektif olduğunu belirtmişlerdir (118).

NB'da N-myc amplifikasyon oranı %20-25'tir. NB'un prognozu üzerine N-myc amplifikasyonunun önemi hakkında pek çok çalışma yapılmıştır (124). Genel olarak N-myc amplifikasyonu ile ileri evre, kötü prognoz, tedaviye kötü cevap, hızlı tümör büyümesi ve yüksek relaps arasında kuvvetli bir ilişki vardır. İleri evre hastaların %30-50'sinde N-myc amplifikasyonu varken erken evreli hastalıkta bu oran % 5-10 arasındadır (14, 70, 124).

Amplifikasyon görülen tümörlerde hasta yaşı ve tümör evresi klinik gidişte önemli belirteçlerdir. Amplifikasyon bulunan 1 yaşından küçük ve evre-4 dışı tümörler diğerlerinden daha iyi prognoza sahiptirler (103, 116). Yine Spitz ve ark, Cohn ve ark, Alvarado ve ark amplifikasyon bulunan lokalize NB'lu hastalarda daha iyi klinik gidiş olduğunu rapor etmişlerdir (116). Bizim çalışmamızda 10 NB'lu olgunun 4 tanesinde N-myc amplifikasyonu, 3 tanesinde N-myc overamplifikasyonu saptanmış olup toplam N-myc amplifikasyonu görülme oranı %70 olarak bulunmuştur. N-myc amplifikasyonu saptanan hastaların 3 tanesinin evrelerine ulaşamamakla birlikte diğerlerinin hepsinin ileri evre (Evre III ve IV) oldukları izlenmiştir. Olgu sayısının az olması nedeniyle bu fark istatistiksel olarak değerlendirilememekle birlikte amplifikasyon oranının literatürde belirtilen orandan (%20-25) daha fazla olmasının, vakaların daha çoğunun ileri evre olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Ayrıca N-myc amplifikasyonu ile hastaların cinsiyetleri, yaşları ve tümör lokalizasyonları karşılaştırıldığında fark saptanmamıştır.

Kopya sayısı arttıkça gen ekspresyonu da artmaktadır. Kopya sayısının 10 ve üzerinde olması prognostik öneme sahiptir (15). Seeger ve arkadaşları düşük seviyede amplifikasyonunun (3-10 kat) yüksek amplifikasyonundan daha iyi prognoza sahip olduğunu belirtmişlerdir. Spitz ve arkadaşları ise yüksek ve düşük seviyede amplifikasyonu olan tümörlerde prognoz arasında

bir fark olmadığını rapor etmişlerdir (116). Bizim çalışmamızda overamplifikasyonun görüldüğü 1 hastanın hastalık nedeniyle öldüğü, 1 hastada rezidü tümör bulunduğu ve 1 hastanın da remisyonda takip edildiği görülmüştür. Yine remisyonda 1 hastada, metastazı bulunan 1 hastada ve operasyon sırasında ölen bir hastada N-myc amplifikasyonu saptanmış, hastalık nedeniyle ölen 4 hastada hiçbir amplifikasyonun bulunmadığı görülmüştür. Overamplifikasyon/ amplifikasyon görülen ve hiçbir amplifikasyon görülmeyen olgularda klinik gidişler karşılaştırıldığında sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır.

ONB'DA MOLEKÜLER GENETİK

Morfolojik olarak benzerliklerine rağmen ONB'lar genetik olarak klasik NB'lardan farklı neoplazmlardır. NB benzeri ONB'larda NB'da bulunan 1q delesyonu, MYCN ampl, tirozin hidroksilaz ve nörotrofin reseptör TrkA ekspresyonları bulunmaz (57).

Olfaktör NB'un %75'i anöplöid veya poliplöiddir ama plöidi durumu ile klinik gidiş arasında ilişki yoktur. Olfaktör NB sitogenetik olarak daha az değerlendirilmekle birlikte bazılarında kompleks sitogenetik aberasyonlar görülmektedir. ES/PNET ailesi için karakterisitik olan t(11;22)(q24;q12) bazı olfaktör NBlarda da tanımlanmıştır (124). Sorensen ve ark RT-PCR, FISH ve Southern blot yöntemlerini kullanarak ONB vakalarında t(11;22)(q24;q12) EWS/FLI1 gene füzyonunu göstermişler ve EWS/FLI-1 füzyon transkriptlerini ekspresse ettikleri için ONB'ların ES/PNET'ten ayrılamayacağını, belki bu aileden bir grup olabileceğini rapor etmişlerdir (1, 114). Yine 4 ONB vakasının 2'sinde EWS/FLI1 füzyonunun saptandığı benzer çalışmalar vardır. Argani ve ark 12 ONB vakasında EWS/FLI-1'i negatif bulmuşlar ve sonuç olarak moleküler ve immünohistokimyasal bulguların kombinasyonu ile ONB'un ES/PNET'ten farklı bir antite olduğunu belirtmişlerdir (1).

Bizim çalışmamızda nazal kavite yerleşimli ONB olgusunda FISH yöntemi ile N-myc amplifikasyonu değerlendirilmiş, negatif saptanmıştır. Literatür bilgilerinde benzer bu bulgu sonucunda ONB'un klasik NB'dan farklı bir moleküler değişiklik gösterdiği düşünülmüştür.

DKYHT'DE MOLEKÜLER GENETİK

Bu tümörlerde tanımlanan sitogenetik anormallik t(11;22)(p13;q12) DSRCT'ün farklı bir klinikopatolojik antite olarak kabul edilmesine yardımcıdır. Kırılma noktası 22q12'de EWS geni ve 11p13'de Willm's tümör geni (WT1)ndedir. WT-1 bir tümör süpresör gendir. Normalde PDGF-A gibi büyüme faktörlerinin kontrol ekspresyonunu başlatır. Potent bir mutajen, fibroblastlar ve endotelyal hücreler için kemoatraktandır. Böylece bu tümörlerin histolojik karakteristikleri ve translokasyonları arasında potansiyel bir bağlantı var gibi görünmektedir.

Füzyon transkripti moleküler genetik teknikler (RT-PCR ve FISH gibi) ile saptanabilir. Bu füzyon en sıklıkla EWS'nin 7. eksonu ve WT-1'in 8. eksonundadır. Nadir varyant füzyonlar tanımlanmıştır (124). EWS-WT1 füzyon ürünü sadece DSRCT'de tanımlanmakla birlikte bazı tümörlerde ES/PNET ailesi için karakteristik olarak tanımlanan EWS/ERG ve EWS/FLI-1 de rapor edilmiştir (40, 78, 98, 124). Bizim olgumuzda da EWS/FLI1 translokasyonunun bulunduğu saptanmıştır. Vakaların çok büyük bir kısmında EWS/WT1 gösterilse de DSRCT'lerde t(2;21;22), 22q delesyonu ve 11p13 delesyonu gibi varyant genetik anomaliler de saptanabilmektedir (95).

Literatürde şimdiye kadar hiçbir DKYHT'de N-myc amplifikasyonu rapor edilmemekle birlikte bizim çalışmamızda N-myc amplifikasyonu değerlendirilmiş ve negatif bulunmuştur.



Ayrıca çalışmamızda tüm KYMHT’lerde PTEN delesyonu değerlendirilmiş, FISH yöntemi uygulanan 9 tane ES/PNET, 8 tane RMS, 8 tane NB ve 1 tane ONB vakasının hiçbirinde PTEN delesyonu görülmezken polifenotipik küçük yuvarlak hücreli tümörde PTEN delesyonunun varlığı saptanmıştır. Literatürde glioblastoma multiforme, prostat kanserleri ve daha az sıklıkla endometrium, meme, akciğer, böbrek, mesane, testis, baş-boyun kanserleri, malign melanom ve lenfomada tanımlanan PTEN delesyonu daha önce polifenotipik yuvarlak hücreli tümörlerde hiç saptanmamıştır ve bizim olgumuz PTEN delesyonu saptanan ilk polifenotipik YHT’dür.



KYMHT’lerde özellikle farklı klinik prezentasyonlarla gelen vakalarda geniş bir immünohistokimyasal panele rağmen tümör tiplendirilmesi yapılamamaktadır ve KYMHT’lerin tanısında moleküler teknikler/sitogenetik analiz altın standart olarak kabul edilmektedir. Ayrıca bu analiz yöntemlerinin tanı yanında prognozu göstermede de önemleri bulunmaktadır (62). Ama KYMHT’lerin tanısında bazı genetik değişikliklerin birden fazla tümörde saptanabilmesi nedeniyle bazı otörler bu verilerin her zaman klinik, radyolojik, histopatolojik ve immünohistokimyasal parametrelerle beraber değerlendirilmesi gerektiğini ileri sürmektedirler (Tablo-XIV) (74, 119).

Tablo-XIV: Küçük Yuvarlak Mavi Hücreli Tümörlerde Ayırıcı Tanı:

Tanı	Klinik	Histopatoloji	Histokimya İmmünohistokimya	Moleküler teknikler
ES/PNET	Ort 14 yaş Lokalizasyon: uzun kemikler, pelvik kemikler, ekstraskeletal Semptom: lokalize ağrı ve şişlik	Lobüler büyüme patterni Dar sitoplazmalı, hiperkromatik nükleuslu, belirsiz nükleollü hücreler Rozet varlığı	İntrasitoplazmik PAS (+) glikojen varlığı CD-99 (%90) FLI1 (%92) NE markerlar Nadir görülenler: sitokeratin, SMA ve desmin	EWS/FLI1 trans. EWS/ERG trans. EWS-ETV1 trans. EWS-EIAF trans. EWS-FEV trans.
RMS	Genç erişkin Lokalizasyon: baş-boyun, genitoüriner sistem, ekstremiteler Semptom: kitle etkisi	ERMS'da hipo/hipersellüler alanlar, ARMS'da alveolar pattern Daha hiperkromatik ve daha irregüler kontürlü nükleuslar Sitoplazmik çapraz striasyonlar Daha eozinofilik, daha abondan sitoplazmalı rabdomyoblastlar	PTAH ile çapraz striasyon varlığı Desmin Aktin Myoglobin Myogenin MyoD1 Sarkomerik α -aktin Miyozin Tropomiyozin α -aktinin Titin Z-protein	ERMS'da: Kromozom 11q delesyonu ARMS'da: PAX3-FKHR trans. PAX7-FKHR trans.
NB	Erken çocukluk <u>Lokalizasyon:</u> retroperitoneal (en sık adrenal gland), mediasten, servikal bölge <u>Semptom:</u> abdominal kitle İdrar katekolamin seviyesi yüksekliği	Zeminde nöropil varlığı ve ganglionik diferansiasyon Kalsifikasyon Rozet varlığı	NB-84 NE markerlar CD-99 negatiftir.	1q delesyonu N-myc amplifikasyonu 11q delesyonu 17q artışı

Tanı	Klinik	Histopatoloji	Histokimya İmmünohistokimya	Moleküler teknikler
ONB	20 ve 50'li yaşlarda bimodal yaş dağılımı <u>Lokalizasyon:</u> nazal kavite <u>Semptom:</u> nazal obstrüksiyon, anosmi, epistaksis	Lobüler büyüme patterni Nörofibriler bir stromada dar sitoplazmalı, hiperkromatik nükleuslu hücreler Rozet varlığı	PAS (-) Retikülin ile lobüller) çevresinde boyanma NE markerlar Çevredeki sustentaküler hücrelerde S-100	EWS/FLI1 trans (+/-)
DKYHT	Genç erişkin, erkek <u>Lokalizasyon:</u> intraabdominal bölge, multipl peritoneal implantlar	Desmoplastik stroma ile ayrılmış keskin sınırlı tümör adaları Tümör adaları çevresinde palizadlanma ve santral nekroz	WT-1 Vimentin Desmin, dot-like EMA Sitokeratin NE markerlar CD-99 (%20)	EWS/WT1 trans. EWS/FLI1 trans.
KHO	2. dekad <u>Lokalizasyon:</u> uzun kemiklerin metafizleri <u>Semptom:</u> şişlik, ağrı	Osteoid üretimi	CD-99 Vimentin Osteokalsin Osteonektin Alkalen fosfataz Nadir görülenler: MSA, Leu-7, S-100, CK	EWS/FLI1 trans. (+/-)
ML	Genç erişkin <u>Lokalizasyon:</u> femur, vertebra, pelvik kemikler <u>Semptom:</u> ağrı	Küçük-orta büyüklükte hücre tabakaları sitoplazmik sınırları belirgin, irregüler veya konvüle nükleuslu, belirgin nükleollü hücreler	Tek tek hücreleri veya hücre gruplarını çevreler tarzda retikülin lifleri LCA T veya B hücre markerları (CD-20, CD- 79a, CD-43) TDT CD-99 (+/-)	

Tanı	Klinik	Histopatoloji	Histokimya İmmünohistokimya	Moleküler teknikler
MK	Genç erişkin <u>Lokalizasyon:</u> kraniofasial kemikler, Kosta, ilium <u>Semptom:</u> şişlik, ağrı	Kıkırdak adaları Hemanjioperisitomatöz vasküler pattern	Leu-7 Vimentin S-100 CD-99 (+/-)	EWS/FLI1 trans. (+/-)
ADSS	Genç erişkin <u>Lokalizasyon:</u> ekstremitte	Düşük dereceli monofazik ve bifazik alanlar	CK (%50) CD-99 (bir kısmı). CK-7 (%60-70) CK-20 (%60-70)	SYT-SSX1 veya SYT-SSX2 trans.
YHL	5. dekad <u>Lokalizasyon:</u> alt ekstremitte, kalça, popliteal bölge	Zeminde miksoid liposarkom komponentinin varlığı Dağınık lipoblastlar	S-100	CHOP/TLS trans.

Her ne kadar bu grup tümörlerin spesifik klinik bulguları bulunmasa da yaş, lokalizasyon gibi bazı özellikler ayırıcı tanıda yol gösterici olabilmektedir. Örneğin; nöroblastom, grubun diğer tümörlerinden daha küçük yaştaki çocuklarda görülür. Nöroblastom en sık bebeklik ve erken çocukluk döneminde görülürken ES/PNET 5-20 yaş arasında (ortalama 14 yaş), rabdomyosarkom çocuk-adölesan-genç erişkinlerde (40 yaşından önce) ortaya çıkar (124). Bizim çalışmamızdaki olgularda ortalama yaşlar literatür bilgilerine benzer şekilde ES/PNET'te 15.2 yaş, rabdomyosarkomda 21.0 yaş ve nöroblastomda 2.6 yaş olarak saptanmıştır. Ayrıca erişkinlerde görülen bir RMS alt tipi olan pleomorfik RMS tanısı alan bir olgumuz da 43 yaşındadır.

Tümör lokalizasyonları arasında da farklılıklar olabilmektedir. ES/PNET daha sık olarak uzun kemiklerde, özellikle femurda yerleşmekle birlikte ekstraskeletal de görülebilir.

Rabdomyosarkomun en sık yerleştiği alan baş-boyun bölgesi iken nöroblastom %70 oranında retroperitneal, en sık adrenal gland lokalizasyonunda bulunur (34, 124). Bizim çalışmamızda tümörlerin en sık lokalize olduğu alanlar ES/PNET’li olgularda intrakranial bölge (%55), rabdomyosarkomlu olgularda baş-boyun bölgesi (%58.3) ve nöroblastomlu olgularda adrenal glanddır (%60). Rabdomyosarkom ve nöroblastomda tümör yerleşimleri literatürde belirtilen bölgelere benzerlik göstermekle birlikte ES/PNET’li olguların ekstremiteler yerine en sık intrakranial bölgede lokalize olmasının nedeninin santral formun fazla olması olduğu düşünülmektedir.

PNET ve ES arasında histolojik olarak ayırım yapılmaya çalışılsa da bu iki tümörün ayrılmasının klinik bir önemi yoktur. ES ve PNET gibi lezyonları sınıflandırmak için kriterler değiştikçe ayırım daha da zorlaşmaktadır. Bazı çalışmalar PNET tanısı için histolojik olarak rozet formasyonunun olması gerektiğini, diğer çalışmalar ise rozet olsun veya olmasın nöral diferansiasyonun immünohistokimyasal olarak gösterilmesi gerektiğini ileri sürerler (124). ES ve PNET ayırımında kullanılabilecek diğer kriterler; ES’da CD-99’un daha diffüz ve uniform boyanması, Vimentin ile pozitifliğin daha belirgin olması ve intrasitoplazmik glikojen varlığı, PNET’te sıklıkla NF varlığı olarak sayılabilir (40). Schmidt ve arkadaşları çalışmalarında PNET demek için Homer-Wright rozetlerinin olması ve 2 veya daha fazla nöral markerın immünohistokimyasal koekspresse edilmesi gerekmektedir sonucuna varmışlardır. Bu kriterler kullanılarak PNET tanısı konan vakaların kliniğinin ES’den daha agresif gideceğini bildirmişlerdir. Diğer otörler iyi tanımlanabilen Homer-Wright veya Fleksner Vintersteiner rozetleri varlığı, 2 veya daha fazla nöral marker pozitifliği veya ultrastrüktürel olarak nöral diferansiasyon varlığında PNET tanısı koyduklarını, yaptıkları prospektif çalışmalarda bu iki tümör arasında klinik bir farklılık olmadığını belirtmişlerdir. Raporlamada; bu tümörleri ES/PNET ailesi olarak tanımlayıp ışık mikroskopik,

immünohistokimyasal veya ultrastrüktürel olarak nöral diferansiasyonun olup olmadığını belirtmek uygun olabilir.

Küçük hücreli osteosarkom ES/PNET’te görülene benzer hücrelerden ibarettir ve tanı sadece osteoidin tanınması ile konabilir ama osteoid genellikle fokal alanlarda bulunduğu için özellikle küçük bir biyopsi geldiğinde bu tanıyı koymak çok zor olabilir (124). Asıl problem mineralizasyon olmadığı zaman olmaktadır ki bu osteoidi hiyalinize kollajenden ayıran en önemli kriterdir. Polarize ışıktaki kollajen ile osteoidin refraksiyon patternlerinin farklılığı yardımcı olabilir. ES/PNET’te hücreler arasında fibrin depozitleri sık olarak görülmektedir ve bazen bunu osteoidden ayırmak son derece zor olabilir (80). Bizim çalışmamızda da sol uyluk anterolateralinde 18 cm. boyutlarında kistik komponent de içeren tümöral lezyonu bulunan 18 yaşındaki erkek hastanın lezyonundan hazırlanan kesitlerde dar sitoplazmalı, küçük-orta boyutta, hiperkromatik nükleuslara sahip belirsiz nükleollü tümör hücrelerinin arasında eozinofilik, homojen, osteoid benzeri matriks izlenmiştir. KHO’daki mineralize olmayan osteoidden ayırmak için trikrom boyası uygulanmış ve zemindeki bu maddenin fibrin olduğu saptanmıştır. Literatür bilgilerine benzer şekilde küçük hücreli osteosarkom-ES/PNET ayırımını yapmak için ışık mikroskopik olarak osteoidin dikkatlice arandıktan sonra arada kalınan vakalarda bu maddeyi fibrinden ayırmak için trikrom ve fibrin boyalarını faydalı olabileceği düşünülmüştür.

Malign lenfomayı diğer anitetelerden, özellikle ES’dan ayırmak önemlidir çünkü tedavi ve klinik gidişleri son derece farklılık göstermektedir. Özellikle çocuklarda primer kemik lenfomaları genellikle yanlış tanı alırlar. Bunlara en sık yanlış olarak konulan tanı ES’dur (86). ES/PNET’te nükleusların daha monoton- uniform görünmesi, ince fibröz septalarla ayrılmış hücre tabakaları ve lobüler görünüm, ince nükleer rim ve nükleolün bulunmaması, boyanabilir glikojenin varlığı, tümör lobüllerinde retikülin liflerinin

yokluğu ve yaygın apoptozis olmaması ile ayrımları genellikle yapılabilir (48, 124). Ayrıca malign lenfomalarda hemen daima LCA ekspresyonu görülmektedir. Ama özellikle lenfoblastik lenfomalarda CD-99 bulunması ve nadiren bunlarda LCA ekspresyonunun olmaması durumunda bu ayırım çok zorlaşmaktadır. Özellikle alt tiplendirme yapılamayan KYMHT'lerde LCA negatifliği ile yetinilmemeli, T ve B hücre markerlarını (CD-20, CD-43 ve CD-79a gibi) ve TDT'yi de bulunduran bir panel uygulanmalıdır (124). Bizim çalışmamızda klinik olarak hematolojik malignensi düşünülmeyen 38 yaşında bir kadın hastadan gönderilen kemik iliği biyopsisinde bulunan dar sitoplazmalı, hiperkromatik nükleuslu, nükleoller belirsiz olan tümör hücrelerinde sadece vimentin ve CD-99 ile pozitiflik saptanmış ve o dönemde uygulanan LCA ile negatiflik görülmesi üzerine olguya ES/PNET tanısı verilmiştir. Hastanın klinik tablosunun düzelmemesi üzerine daha sonra gönderilen kemik iliği biyopsisinde immünohistokimyasal olarak TDT'de uygulanmış ve görülen benzer tümör hücrelerinde pozitiflik saptanması üzerine tanı lenfoblastik lenfoma olarak değiştirilmiştir. Bu olguda FISH yöntemi ile EWS/FLI1 translokasyonu değerlendirilmiş ve negatif saptanmıştır. Literatürde de belirtilen şekilde immünohistokimyasal panele TDT, CD-20, CD-79a ve CD43'ün de eklenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

ONB'ü özellikle nazal kavite lokalizasyonlu ES/PNET'ten ayırmak önemlidir çünkü bu iki tümörün tedavi ve prognozları farklılık göstermektedir. ONB'un cerrahi ve radyoterapi ile 5 yıllık sağ kalım oranı %58-75 iken ES/PNET'te bu oran %30 civarındadır (39). ES/PNET'lerde %95 oranında pozitif olan CD-99'un ONB'larda negatif olması, PAS ile yapılan histokimyasal çalışmada tümör hücre sitoplazmasında glikojen birikiminin görülmemesi ve tümör lobüllerinin çevresindeki sustentaküler benzeri hücrelerde S-100 pozitifliğinin saptanması bu ayırimda yardımcı olmaktadır (1, 8). Bizim çalışmamızda

ES/PNET tanısı alan olgulardan bir tanesi intranazal yerleşimlidir. 18 yaşında kadın hastanın tümöründen hazırlanan kesitlerde hiperkromatik nükleuslu, sitoplazmadan fakir, yer yer nükleol belirginliği olan, bazı alanlarda rozet yapıları oluşturan monoton hücreli popülasyon izlenmiştir. CD-99 ve vimentin ile diffüz kuvvetli boyanma saptanan olguda FISH yöntemi ile EWS/FLI1 translokasyonu değerlendirilmiş ve 180 hücrede translokasyonun bulunduğu (pozitif olduğu) görülmüştür. Ayrıca ONB'dan farklı olarak hiçbir nöroendokrin marker ile boyanma saptanmamıştır.



Küçük yuvarlak mavi hücreli tümörler genel olarak son derece agresif tümörlerdir ve multimodal terapötik yaklaşımlara rağmen 5 yıllık sağ kalım süreleri oldukça düşüktür. Tedavilerinde efektif ilaçların bulunmaması, yüksek dozlarda yan etkilerin oluşması nedenleri ile yeni terapötik stratejilere ihtiyaç olduğu bilinmektedir. Bu tedavilerde patogeneze ve progresyonda kritik rol oynayan moleküller üzerinde durulmaktadır. Özellikle ES/PNET ailesi tümörlerde üzerinde durulan ilaçlardan biri olan imatinib mesylate (Gleevec, Novartis Pharma, Basel, Switzerland, formerly known as ST1571), ABL, KIT ve PDGFRA/B'nin tirozin fosforilasyonunu bloke eden selektif bir tirozin kinaz inhibitörüdür ve günümüzde metastatik ve rezeke edilemeyen GİSTs'lerin tedavisi ile kronik myeloid lösemilerde etkili olduğu bilinmektedir (26, 75).

ES/PNET AİLESİ TÜMÖRLERDE C-KİT EKSPRESYONU: KIT aktivasyonu apoptozisin azalması, hücre proliferasyonu, diferansiasyonu, adezyonu ve motilitesinde artış ile sonuçlanır. ES/PNET'lerde tümör patogenezinde bu yolun önemli olduğu ileri sürülmektedir (75, 112). C-kit downregülasyonu yapılmış ES/PNET hücreleri fareye enjekte

edildiğinde akciğer ve kemik metastazlarının azaldığı ve in-vitro ortamda tümörün büyümesinin süprese olduğu saptanmış olup C-kit'in farmakolojik inhibisyonunun ES/PNET tedavisinde kullanılabileceği ileri sürülmüştür (2, 105). Gonzalez ve arkadaşları da imatinibin KIT reseptör sinyalini inhibe ederek ES/PNET hücre proliferasyonunu inhibe edebileceğini ve KIT inhibisyonunun bu hücrelerde doksorubisin ve vinkristin sensitivitesini arttıracaklarını rapor etmişler, KIT ekspresse eden refrakter veya metastatik vakalarda diğer kemoterapötik ajanlarla birlikte imatinibin kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir (42). Hotfilder ve arkadaşları diğer tümörlerde kullanıldığı dozu ile ES/PNET'in in vitro koşullarda İmatinibe dirençli olduğunu göstermişler ve İmatinib'in ES/PNET'te etkili olabilmesi için genel klinik dozundan daha fazla konsantrasyonda (10mikrom'den fazla) kullanılması gerektiğini belirtmişlerdir (2, 51, 75).

ES/PNET'lerde immünhistokimyasal olarak KIT pozitifliği sıktır ve bu Western blotting yöntemi ile doğrulanabilmektedir (75). Çeşitli serilerde ES/PNET'te C-kit ekspresyon oranı %20-82 arasında bulunmuştur. Bu geniş aralık; metodlardaki farklılık, teknik farklılıklar, vaka seçimi, antikor seçimi ve immünhistokimyasal protokol (örneğin; antijen retrieval kullanıp kullanmama, antikor spesifikliği (poliklonal-monoklonal)) nedenleri ile olabilmektedir (2, 22).

Scotlandi ve arkadaşları 101 ES/PNET'li hastada C-kit ekspresyonlarını değerlendirmişler ve bu hastalarda C-kit'in %31 oranında pozitif olduğunu rapor etmişlerdir. C-kit boyanması ile yaş, anatomik saha ve kemoterapi sonrası tümör nekrozu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığını bulmuşlar ve sonuç olarak C-kit pozitifliğinin prognostik bir önemi olmadığını, sadece tedavi açısından öneminin bulunabileceğini belirtmişlerdir (105). Benzer şekilde Shimithey ve arkadaşları da %71 oranında C-kit

pozitifliği saptadıkları çalışmalarında boyanma ile hastalığın gidişi veya metastatik hastalık arasında ilişki bulamamışlardır (112).

Ahmed ve arkadaşları ES/PNET ailesinde C-kit boyanma oranının %65 olduğunu, C-kit ekspresyonunun metastatik hastalık ve yüksek Ki-67 oranı ile ilişkili olabileceğini, tümörün progresyonunda rol oynayabileceğini ileri sürmüşler ama bunun istatistiksel olarak önemini saptayamamışlardır (2).

Do ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında bu oranı %38 olarak saptarlarken en yüksek oran De alava ve arkadaşlarının 110 vakalılık ES/PNET'li olguda antijen retrieval kullanarak, poliklonal C-kit ile yaptıkları çalışmada elde edilmiştir ve %82 olarak bulunmuştur (20, 26).

Bizim çalışmamızda ES/PNET olgularında C-kit ekspresyon oranı %49.8 olarak bulunmuş olup C-kit ekspresyonu ile hastaların cinsiyetleri, tümör lokalizasyonları, tümör boyutları ve hastalığın gidişi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı saptanmıştır. Scotlandi ve arkadaşları ile Shimithey ve arkadaşlarının sonuçlarına benzer bulgular elde edilen bu çalışma sonucunda; yine onlara benzer şekilde C-kit ekspresyonunun ES/PNET'in prognozuna etkisinin olmadığı ama olguların yaklaşık yarısında pozitifliğinin bulunması nedeniyle buna yönelik tedavinin ES/PNET'lerde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

RMS'DA C-KİT EKSPRESYONU: RMS'larda C-kit ekspresyonu ile ilgili olarak yapılan 2 büyük çalışmanın ilki Schimithey ve arkadaşlarındandır ve onlar 31 RMS olgusunda C-kit boyanma oranını %48.3 olarak saptarlarken bu tümörler içinde en yüksek boyanma oranının ERMS'da (%77) olduğunu rapor etmişlerdir. Hiçbir ARMS olgusunda pozitiflik izlememişler, KIT ekspresyonunun daima kötü prognostik etki ile ilişkili olduğunu ve daha agresif gidiş gösteren ARMS'da bulunmamasının ilginç olduğunu belirtmişlerdir (25, 112).

İkinci büyük çalışmayı yapan Hornick ve Fletcher 365 tane yumuşak doku sarkomunda KIT ekspresyonunu değerlendirmişler ve bunların arasında bulunan 25 RMS'lu olgunun hiçbirinde pozitiflik saptamamışlardır. Tüm sarkomlarda düşük bir oranda (sadece %6) oranında, zayıf ve fokal bir boyanma bulmuşlar ve daha önceki çalışmalardaki yüksek orandaki boyanmaları zemin boyanmaları nedeniyle yanlış değerlendirmeye bağlamışlardır (25, 52).

Diniz ve arkadaşları da Hornick ve Fletcher'inkine benzer sonuçlar elde etmişler, sadece ERMS olgularında %4.34 oranında boyanmanın bulunduğunu, bunu da iğsi hücreli varyantın oluşturduğunu rapor etmişlerdir. Onlar iğsi hücreli RMS'da tümörögenезisin farklı olabileceğini, bunların daha iyi prognozlu olduklarını, KIT pozitifliklerinin bulunduğunu ve ileri evre iğsi hücreli RMS olgularının imatinib mesylat tedavisinden fayda görebileceklerini belirtmişlerdir. Ayrıca; C-kit ekspresyonu ile histoloji ve yaş arasında anlamlı ilişki saptarlarken sağ kalım arasında ilişki bulamamışlardır (25).

Landuzzi ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında hem alveolar hem de emryonel RMS'da soluble SCF üretiminin ve C-kit ekspresyonun olduğunu ve bunun myojenik diferansiasyondan bağımsız olduğunu rapor etmişlerdir (64).

Sabah ve arkadaşları ise 144 vakalık yumuşak doku sarkomunun bulunduğu çalışmalarında 10 tane RMS'lu vakanın 2 tanesinde %10'un altında zayıf, 3 tanesinde diffüz kuvvetli boyanma saptamışlardır (100).

Bizim çalışmamızda ise 12 RMS olgusunda C-kit ekspresyonu %58.4 oranında (7 olguda) saptanmış olup bunların %71.4'ünü (5 olgu) ARMS, %13.4'ünü (1 olgu) ERMS, %13.4'ünü (1 olgu) pleomorfik RMS'un oluşturduğu ve iğsi hücreli RMS olgusunda ekspresyonun bulunmadığı saptanmıştır. Olgu sayısı az olmakla birlikte literatürde belirtilen oranlardan farklı bulunan bu değerler ışığında C-kit ekspresyonun daha çok, daha agresif

gidişli olan ARMS ve pleomorfik RMS olgularında saptanması, iyi prognozlu işçi hücreli RMS olgusunda negatif olması nedeniyle agresif gidişle ilişkili olduğu, buna yönelik tedavinin RMS olgularında kullanılabileceği, ama tüm bu bulguların daha fazla olgu sayısının bulunduğu başka çalışmalarla doğrulanması gerektiği sonucuna varılmıştır.

NÖROBLASTİK TÜMÖRLERDE TÜMÖRLERDE C-KİT EKSPRESYONU: Korja

ve arkadaşları nöroblastik tümörlerde C-kit ekspresyonunu %10.8 oranında , Vitali ve arkadaşları %13 oranında, Krams ve arkadaşları %32.4 oranında ve Shimithey ve arkadaşları %55 oranında bulmuşlardır (59, 112). Başka bir çalışmada nöroblastik tümörlerde immünohistokimyasal olarak %27 oranında C-kit ekspresyonunun bulunduğu, özellikle bu oranın diferansiye formlarda daha yüksek olduğu, ganglionöroblastomların yaklaşık yarısında var olduğu ve undiferansiye nöroblastomlarda %13-%19 oranında bulunduğu rapor edilmiştir.

Nöroblastik tümörlerin klinik davranışında C-kit ve SCF'in rolü hala tartışmalıdır. Bazıları bunlar arasında korelasyon olmadığını söylerlerken Uccini ve arkadaşları C-kit/SCF ekspresyonunun N-myc amplifikasyonu ile korele olduğunu ve agresif klinik gidiş ile ilişkili bulmuşlardır (120). Benzer başka bir seride 75 tümörün 10'unda Kit ekspresyonu saptanmış ve bu vakaların daha agresif gittiği ve N-myc amplifikasyonu ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu otörler C-kit ekspresyonunun agresif tümörlerde in-vivo olarak daha fazla olduğunu, bu sinyallerin in-vitro olarak nöroblastom hücre proliferasyonunu aktif olarak arttırdığını ve imatinib mezilatın bunu selektif olarak inhibe ettiğini göstermişlerdir (123). Vitali ve arkadaşları da N-myc amplifikasyonu görülen tümörlerde C-kit ekspresyonunun daha fazla olduğunu ve bunlarda daha agresif bir gidiş görüldüğünü rapor etmişlerdir. Krams ve arkadaşları ise 155 nöroblastom olgusunda yaptıkları çalışmalarında C-kit ekspresyonu ile düşük tümör evresi ve düşük N-myc amplifikasyonu ve dolayısıyla iyi prognostik gidiş arasında ilişki saptamışlardır (6, 59, 61).

NB hücre dizisinde in-vitro ve in-vivo koşullarda C-kit'in inhibe edilmesi hücre proliferasyonunu azaltır. Ayrıca tedavide kullanılan retinoik asitle de in-vitro koşullarda sinerjizm gösterir. Bu oldukça agresif olan nöroblastomda bu tedavi protokolünün kombinasyon olarak veya tek başına verilebileceğini düşündürmektedir (6).

Bizim çalışmamızda 10 NB olgusunda C-kit ekspresyon oranının %88.9 olduğu saptanmış olup bu oranın literatürdeki değerlerden çok farklı ve yüksek olmasının nedeninin olgu sayısındaki azlık yanı sıra olguların büyük çoğunluğunu ileri evre hastaların oluşturması olduğu, ayrıca tümör içindeki heterojenlik ve teknik farklılıkların da rol oynayabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda NB'lu hastalarda C-kit ekspresyonu ile hastalığın gidişi, hastaların yaşları (1 yaş altı ve üstü), tümör lokalizasyonları ve N-myc amplifikasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamış olmakla birlikte kötü prognoza sahip olan 1 yaşın üzerindeki olgularda C-kit ekspresyonun daha yüksek derecelerde saptanması (%50 derece-II ve %50 derece-III düzeyinde) nöroblastik tümörlerde C-kit ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

DKYHT'LERDE C-KİT EKSPRESYONU: L. Fine ve arkadaşları DKYHT'lerde immünohistokimyasal olarak C-kit ekspresyonun değerlendirmeler ve 35 hastanın 7 tanesinde (%35) pozitiflik saptamışlardır. Onlar DSRCT'lerde mutant C-kit reseptör düzeylerinin değerlendirilmediğini, bu agresif gidişli tümörlerde İmatinib ile tedavi olasılığını değerlendirmek için buna yönelik çalışmalar yapılması gerektiğini belirtmişlerdir (31). Shimithey ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmalarında DKYHT'lerde boyanma saptamamışlardır (112). Bizim çalışmamızda da DKYHT olgumuzda C-kit ekspresyonu saptanmamıştır.

Primer ONB olgumuzda derece-II düzeyinde sitoplazmik C-kit boyanması saptanmakla birlikte metastatik ONB olgumuzda C-kit ekspresyonu görülmemiştir. Literatürde benzer bir çalışmaya rastlanmamakla birlikte tedaviye cevap vermeyen ve C-kit ekspresyonu saptanan ONB'lu olgularda buna yönelik tedavinin denenebileceği düşünülmüştür.



SONUÇ OLARAK ÇALIŞMAMIZDA;

1- İmmünohistokimyasal boyanma patternleri çıkıřabilecekđ için KYMHT'lerde sınırlı bir panel uygulamanın yanlışlıklara neden olabileceği, vimentin, desmin, CD99, iki veya daha fazla nöroendokrin marker (sinaptofizin, kromogranin, NSE, NF, Leu-7, veya PGP-9.5), myogenin veya myo-D1, sitokeratin, S-100 protein, CD45, TDT, CD-43 ve CD-79a'nın bulunduğu bir paneli uygulamanın KYMHT'lerin ayırcı tanısını yapmak için gerekli olduğu düşünülmüştür.

2- Santral PNET'lerde %85.7 oranında CD-99 negatifliği saptanmış, beyin metastazı olan bir hastada CD-99'un pozitif olduğu görölmüş ve santral/periferel PNET'ler arasında CD-99 immünreaktivitesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (p=0.02). Santral sinir sisteminde intraparakimal yerleşimli ES/PNET'lerde bu ayırımın yapılabilmesi için radyolojik olarak kemik dokularla tümörün ilişkisi gibi bulgulara ek olarak CD-99 negatifliğinin kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

3- ES/PNET olgularında CD-99 pozitiflik oranı %63.2 olarak saptanmış olup literatürde belirtilenden (%90) daha az oranda bulunmasının nedeninin olguların %55'ini santral PNET'in oluşturması olduğu düşünülmüştür.

4- CD-99 pozitifliği ES/PNET yanısıra 1 polifenotipik yuvarlak hücreli tümör, 2 undiferansiye küçük yuvarlak mavi hücreli tümör ve 2 rabdomyosarkom vakasında da gözlenmiş ve CD-99 pozitifliğinin ES/PNET ailesi için yüksek oranda sensitif olduğu ama spesifikliğinin bulunmadığı ve immünhistokimyasal panelin bir parçası olarak kullanılması gerektiği düşünülmüştür.

5- Diğer tüm KYMHT’lerde görülebilen CD-99 pozitifliği hiçbir nöroblastom olgusunda saptanmamış ve spesifik membranöz CD-99 immünreaktivitesinin ES/PNET ayırıcı tanısında yardımcı olabileceği sonucuna varılmıştır.

6- Tüm nöroblastom olgularında vimentin negatif bulunmuş, bunun büyük oranda vimentin immünreaktivitesi gösteren ES/PNET’ten ayırıcı tanıda kullanılabileceği düşünülmüştür.

7- ONB olgumuzda immünhistokimyasal çalışmada vimentin ile blastik hücrelerde boyanma görülmemiş olup tümör adaları çevresindeki sustentaküler benzeri hücrelerde ve blastik hücreler arasındaki denritik hücre benzeri hücrelerde pozitiflik saptanmıştır. Bu boyanma patterninin tanı koymada faydalı olabileceği düşünülmüştür.

8- Santral PNET olarak kabul edilen 11 olgu ile diğer bölgelerde yerleşen ES/PNET’ler arasında EWS/FLI1 translokasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür ($p=0.04$). Ayrıca intrakranial metastazı bulunan primer böbrek yerleşimli olgunun metastatik kitlesinde EWS/FLI1 translokasyonu saptanmıştır. İntrakranial yerleşimli bir ES/PNET olgusunda santral/periferel PNET ayırımında EWS/FLI1 translokasyonunun saptanmasının kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

9- Santral/periferel PNET’ler arasında klinik gidişleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0.536$).

10- ES/PNET’li olgularda EWS/FLI1 translokasyon oranı %65 olarak saptanmıştır. Bu değer literatürde belirtilen değerden (%85-95) daha düşük olmasının nedeninin,

olgularımızın %55'lik kısmını santral PNET'in oluşturması ve santral PNET'lerde EWS/FLI1 translokasyonun genellikle bulunmaması olduğu düşünülmüştür.

11- Santral PNET'ler dışında sadece göğüs duvarı yerleşimli bir olguda translokasyon negatif bulunmuş ve ES/PNET tanısında EWS/FLI1 translokasyonunun gösterilmesi oldukça sensitif olarak değerlendirilmiştir.

12- ES/PNET olgularında EWS/FLI1 translokasyonu ile hastalığın gidişi , hastaların yaşı, cinsiyeti ve tümör lokalizasyonu gibi bazı klinik parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilmemiştir.

13- 10 NB'lu olgunun 4 tanesinde N-myc amplifikasyonu, 3 tanesinde N-myc overamplifikasyonu saptanmış olup toplam N-myc amplifikasyonu görülme oranı %70 olarak bulunmuştur.

14- N-myc amplifikasyonu saptanan hastaların 3 tanesinin evrelerine ulaşamamakla birlikte diğerlerinin hepsinin ileri evre (Evre III ve IV) oldukları izlenmiştir. Amplifikasyon oranının literatürde belirtilen orandan (%20-25) daha fazla olmasının, vakaların daha çoğunun ileri evre olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

15- NB'larda N-myc amplifikasyonu ile hastaların cinsiyetleri, yaşları ve tümör lokalizasyonları karşılaştırıldığında fark saptanmamıştır.

16- NB'lu olgularda overamplifikasyon/ amplifikasyon görülen ve hiçbir amplifikasyon görülmeyen olgularda klinik gidişler karşılaştırıldığında sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır.

17- 6 ARMS'lu olguda FISH yöntemi ile N-myc amplifikasyonu değerlendirilmiş, hiçbir olguda amplifikasyon olmadığı saptanmıştır. Literatürde %50'lere varan N-myc amplifikasyonunun hiçbir ARMS'da bulunmamasının nedeninin; olgu sayısındaki azlık, dokulardaki tespit problemi veya teknikle ilişkili problemler olabileceği düşünülmüştür.

18- Primer ONB olgusunda FISH yöntemi ile N-myc amplifikasyonu değerlendirilmiş, negatif saptanmıştır. Bu bulgu sonucunda ONB'un klasik NB'dan farklı bir moleküler değişiklik gösterdiği düşünülmüştür.

19- DKYHT'de N-myc amplifikasyonu değerlendirilmiş ve negatif bulunmuştur.

20- Tüm KYMHT'lerde PTEN delesyonu değerlendirilmiş, FISH yöntemi uygulanan 9 tane ES/PNET, 8 tane RMS, 8 tane NB ve 1 tane ONB vakasının hiçbirinde PTEN delesyonu görülmezken polifenotipik küçük yuvarlak hücreli tümörde PTEN delesyonunun varlığı saptanmıştır. PTEN delesyonu daha önce polifenotipik yuvarlak hücreli tümörlerde hiç saptanmamıştır ve bizim olgumuz PTEN delesyonu saptanan ilk polifenotipik YHT'dür.

21- Çalışmamızdaki olgularda ortalama yaşlar literatür bilgilerine benzer şekilde ES/PNET'te 15.2 yaş, rabdomyosarkomda 21.0 yaş ve nöroblastomda 2.6 yaş olarak saptanmıştır. Ayrıca erişkinlerde görülen bir RMS alt tipi olan pleomorfik RMS tanısı alan bir olgumuz da 43 yaşındadır.

22- Tümörlerin en sık lokalize olduğu alanlar ES/PNET'li olgularda intrakranial bölge (%55), rabdomyosarkomlu olgularda baş-boyun bölgesi (%58.3) ve nöroblastomlu olgularda adrenal gland (%60) olarak saptanmıştır. Rabdomyosarkom ve nöroblastomda tümör yerleşimleri literatürde belirtilen bölgelere benzerlik göstermekle birlikte ES/PNET'li oguların ekstremiteler yerine en sık intrakranial bölgede lokalize olmasının nedeni olarak merkezimize başvuran hasta popülasyonunun farklı nitelikte olması olduğu düşünülmektedir.

23- Küçük hücreli osteosarkom-ES/PNET ayırımını yapmak için ışık mikroskopik olarak osteoidin dikkatlice arandıktan sonra arada kalınan vakalarda bu maddeyi fibrinden ayırmak için trikrom, fibrin boyaları ve polarize ışık özelliklerinin faydalı olabileceği düşünülmüştür.

24- Malign lenfomalarda CD-99 pozitifliği olabileceği gibi bunlarda LCA'nın da negatif olabilmesi nedeni ile immünohistokimyasal panele TDT, CD-20, CD-79a ve CD43'ün de eklenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

25- ES/PNET olgularında C-kit ekspresyon oranı %49.8 olarak bulunmuş olup C-kit ekspresyonu ile hastaların cinsiyetleri, tümör lokalizasyonları, tümör boyutları ve hastalığın gidişi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı saptanmıştır.

26- C-kit ekspresyonunun ES/PNET'in prognozuna etkisinin olmadığı ama olguların yaklaşık yarısında pozitifliğinin bulunması nedeniyle buna yönelik tedavinin ES/PNET'lerde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

27- 12 RMS olgusunda C-kit ekspresyonu %58.4 oranında (7 olguda) saptanmış olup bunların %71.4'ünü (5 olgu) ARMS, %13.4'ünü (1 olgu) ERMS, %13.4'ünü (1 olgu) pleomorfik RMS'un oluşturduğu ve iğsi hücreli RMS olgusunda ekspresyonun bulunmadığı saptanmıştır.

28- RMS'larda C-kit ekspresyonun daha çok, daha agresif gidişli olan ARMS ve pleomorfik RMS olgularında saptanması, iyi prognozlu iğsi hücreli RMS olgusunda negatif olması nedeniyle agresif gidişle ilişkili olduğu, buna yönelik tedavinin RMS olgularında kullanılabileceği, ama tüm bu bulguların daha fazla olgu sayısının bulunduğu başka çalışmalarla doğrulanması gerektiği sonucuna varılmıştır.

29- 10 NB olgusunda C-kit ekspresyon oranının %88.9 olduğu saptanmış olup bu oranın literatürdeki değerlerden çok farklı ve yüksek olmasının nedeninin olgu sayısındaki azlık yanı sıra olguların büyük çoğunluğunu ileri evre hastaların oluşturması olduğu, ayrıca tümör içindeki heterojenlik ve teknik farklılıkların da rol oynayabileceği düşünülmüştür.

30- NB'lu hastalarda C-kit ekspresyonu ile hastalığın gidişi, hastaların yaşları (1 yaş altı ve üstü), tümör lokalizasyonları ve N-myc amplifikasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamış olmakla birlikte kötü prognoza sahip olan 1 yaşın üzerindeki olgularda

C-kit ekspresyonun daha yüksek derecelerde saptanması (%50 derece-II ve %50 derece-III düzeyinde) nöroblastik tümörlerde C-kit ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

31- Primer ONB olgumuzda derece-II düzeyinde sitoplazmik C-kit boyanması saptanmakla birlikte metastatik ONB olgumuzda C-kit ekspresyonu görülmemiştir.

KAYNAKLAR

- 1) Argani P, Perez-Ordóñez B, Xiao H, Caruana SM, Huvos AG, Ladanyi M. Olfactory neuroblastoma is not related to the Ewing family of tumors: absence of EWS/FLI1 gene fusion and MIC2 expression. *The American Journal of Surgical Pathology* 22(4): 391-398, 1998
- 2) Ahmed A, Gilbert-Barnes E, Lason A. Expression of C-kit in Ewing family of tumors: a comparison of different immunohistochemical protocols. *Pediatric and Developmental Pathology* 7: 342-347, 2004
- 3) Amiel A, Ohali A, Fejgin M, Sardos-Albertini F, Bouaron N, Cohen IJ, Yaniv I, Zaizov R, Avigad S. Molecular cytogenetic parameters in Ewing sarcoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 140: 107-112, 2003
- 4) Anderson J, Gordon T, McManus A, Mapp T, Gould S, Kelsey A, McDowell H, Pinkerton R, Shipley J, Pritchard-Jones K. Detection of the Pax3/FKHR fusion gene in pediatric rhabdomyosarcoma: a reproducible predictor of outcome?. *British Journal of Cancer* 85(6): 831-835, 2001
- 5) Barnoud R, Sabourin JC, Pasquier D, Ranchère D, Bailly C, Terrier-Lacombe MJ, Pasquier B. Immunohistochemical expression of WT-1 by desmoplastic small round cell tumor: a comparative study with other small round cell tumors; *The American Journal of Surgical Pathology* 24(6): 830-836, 2000
- 6) Beppu K, Jabone J, Merchant MS, Mackall CL, Tiele CL. Effect of Imatinib Mesylate on neuroblastoma tumorigenesis and vascular endothelial growth factor expression. *Journal of the National Cancer Institute* 96(1): 46-55, 2004
- 7) Bridge RS, Rajaram V, Dehner LP, Pfeifer JD, Perry A. Molecular diagnosis of Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor in routinely processed tissue: a comparison of

- two FISH strategies and RT-PCR in malignant cell tumors. *Modern Pathology* 19: 1-8, 2006
- 8) Barifi S, Aydın O, Kefeli M, Erol H, Yıldız L, Kandemir B. Olfaktor Nöroblastom (Esthesioneuroblastoma): Olgu Sunumu. *Ondokuzmayıs Üniversitesi Tıp Dergisi* 21(4): 177–180, 2004
 - 9) Bridge JA, Liu J, Qualman SJ, Suijkerbuijk R, Wenger G, Zhang J, Wan X, Baker KS, Sorensen P, Barr FG. Genomic gains and losses are similar in genetic and histologic subsets of rhabdomyosarcoma, whereas amplification predominates in embryonal with anaplasia and alveolar subtypes. *Genes, Chromosomes & Cancer* 33: 310-321, 2002
 - 10) Burchill SA. Ewing's sarcoma: diagnostic, prognostic and therapeutic implications of molecular abnormalities. *Journal of Clinical Pathology* 56: 96-102, 2003
 - 11) Cavazzana AO, Schmidt D, Ninfo V, Harms D, Tollot M, Carli M, Treuner J, Betto R, Salviati G. Spindle cell rhabdomyosarcoma. A prognostically favorable variant of rhabdomyosarcoma. *American Journal of Surgical Pathology* 16(3): 229-235, 1992
 - 12) Changa H, Qi XY, Claudio J, Zhuang L, Patterson B, Stewart AK. Analysis of PTEN deletions and mutations in multiple myeloma. *Leukemia Research* 30: 262–265, 2006
 - 13) Cjow LML, Baker SJ. PTEN function in normal and neoplastic growth. *Cancer Letters* 241: 184-196, 2006
 - 14) Cohn SL. Diagnosis and classification of the small round cell tumors of childhood. *American Journal of Pathology* 155(1): 11-15, 1999
 - 15) Demirkaya M, Sevinir B. Nöroblastom. *Güncel Pediatri* 3: 128-132, 2006
 - 16) De Alava E, Lozano MD, Patiño A, Sierrasesúmaga L, Pardo-Mindán FJ. Ewing family tumors: Potential prognostic value of reverse-transcriptase polymerase chain reaction

- detection of minimal residual disease in peripheral blood samples. *Diagnostic Molecular Pathology* 7(3): 152-157, 1998
- 17) De Alava E, Gerald WL. Molecular Biology of the Ewing's Sarcoma/Primitive Neuroectodermal Tumor Family. *Journal of Clinical Oncology* 18: 204-213, 2000
 - 18) De Alava E, Panizo A, Antonescu CR, Huvos AG, Pardo-Mindan FJ, Barr FG, Ladanyi M. Association of EWS-FLI1 Type 1 fusion with lower proliferative rate in Ewing's sarcoma. *American Journal of Pathology* 156 (3): 849-855, 2000
 - 19) De Alava, Pardo J. Ewing tumor: Tumor biology and clinical applications. *International Journal of Surgical Pathology* 9(1): 7-17, 2001
 - 20) De Alava E, Gonzalez I, Panizo A, et al. C-kit expression in Ewing tumors. A potential therapeutic target; *Modern Pathology* 15: 12, 2002
 - 21) Deb RA, Desai SB, Amonkar PP, Aiyer PM, Borges AM. Primary primitive neuroectodermal tumour of the parotid gland. *Histopathology* 33: 375-378, 1998
 - 22) Devoe K, Weidner N. Immunohistochemistry of small round-cell tumors. *Seminars in Diagnostic Pathology* 17(3): 216-224, 2000
 - 23) Diaz EM, Johnigan RH, Pero C, El-Naggar AK, Roberts DB, Barker JL, Demonte F. Olfactory neuroblastoma: The 22-year Experience at one comprehensive cancer center. *Head & Neck* 27: 138- 149, 2005
 - 24) Dias P, Chen B, Diiday B, Plamer M, Hosoi J, Singh S, Parham D, Qualman S, Houghton P. Strong immunostaining for myogenin in rhabdomyosarcoma is significantly associated with tumors of the alveolar subclass. *American Journal of Pathology* 156(2): 399-408, 2000

- 25) Diniz G, Aktas S, Ortac R, Tunakan M, Unlu I, Vergin C. Kit expression in spindle cell rhabdomyosarcoma can possibly create a different approach for its tumorigenesis and therapy. *Pathology-Research and Practice* 202: 671-677, 2006
- 26) Do I, Araujo ES, Kalil RK, Bacchini P, Bertoni F, Unni KK, Park YK. Protein expression of KIT and gene mutation of c-kit and PDGFRs in Ewing sarcoma. *Pathology-Research and Practice* 203: 127-134, 2007
- 27) D' Antonio A, Caleo A, Garcia JF, Marsilia GM, De Dominics G, Boscaino A. Primary peripheral PNET/Ewing's sarcoma of the dura with FISH analysis. *Histopathology* 45: 642-656, 2004
- 28) Ecskchlager T, McClain K. Comparison of fluorescent in situ hybridization (FISH) and the polimerase chain reaction (PCR) for detection of residual neuroblastoma cells. *Neoplasma* 43 (5): 301-303, 1996
- 29) Ehrig T, Billings SE, Fanburg-Smith JC. Superficial primitive neuroectodermal tumor/Ewing sarcoma (PN/ES): same tumor as deep PN/ES or new entity. *Annals of Diagnostic Pathology* 11: 153-159, 2007
- 30) Eng C. PTEN: one gene, many syndromes. *Human Mutation* 22: 183-198, 2003
- 31) Fine RL, Shah SS, Moulton TA, Yu IR, Fogelman DR, Richardson M, Burris HA, Samuels BL, Assanasen C, Gorroochurn P, Hibshoosh H, Orjuela M, Garvin J, Goldman FD, Dubovsky D, Walterhouse D, Halligan G. Androgen and c-Kit receptor in desmoplastic small round cell tumors resistans to chemoterapy: novel targets for therapy. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 59: 429-437, 2007
- 32) Fiore M, Grosso F, Vullo SL, Pennacchioli E, Stacchiotti S, Ferrari A, Collini P, Lozza L, Mariani L, Casali PG, Gronchi A. Myxoid/Round Cell and Pleomorphic Liposarcomas

- Prognostic Factors and Survival in a Series of Patients Treated at a Single Institution. *Cancer* 109: 2522–31, 2007
- 33) Fletcher CDM. Tumors of the osteoarticular system: in *Diagnostic Histopathology of tumors*, Second edition, pp: 1562-1563
 - 34) Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F. *World Health Organization Classification of tumors: Pathology & Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone*, Lyon, 2002
 - 35) Folpe AL, Hill CE, Parham DM, O'Shea PA, Weiss SW. Immunohistochemical Detection of FLI-1 Protein Expression: A Study of 132 Round Cell Tumors With Emphasis on CD-99-Positive Mimics of Ewing's Sarcoma/Primitive Neuroectodermal Tumor. *The American Journal Surgical Pathology* 24 (12): 1657-1662, 2000
 - 36) Folpe AL, Goldblum JR, Rubin BP, Shehata BM, Liu W, Dei Tos AP, Weiss SW. Morphologic and immunophenotypic diversity in Ewing family tumors: a study of 66 genetically confirmed cases. *The American Journal of Surgical Pathology* 29(8): 1025-1033, 2005
 - 37) Forest M, Tmeno B, Vanel B. osteosarcoma variants: in *Orthopedic Surgical Pathology: Diagnosis of tumors Pseudotumoral Lesions of Bone and Joints*, 1997, pp:139-140
 - 38) Fuju Chang. Desmoplastic small round cell tumors: Cytologic, histologic and immunohistochemical features. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 130: 728-732, 2006
 - 39) Gaba RC, Cousins JP, Basil IS, Shadid HS, Valyi-Nagy T, Mafee MF. Metastatic Ewing sarcoma masquerading as olfactory neuroblastoma. *European Archives Otorhinolaryngology* 263: 960–962, 2006

- 40) Gardner LJ, Ayala AG, Monforte HL, Dunphy CH. Ewing Sarcoma/Peripheral Primitive Neuroectodermal Tumor Adult Abdominal Tumors With an Ewing Sarcoma Gene Rearrangement Demonstrated by Fluorescence In Situ Hybridization in Paraffin Sections. *Applied Immunohistochemistry&Molecular Morphology* 12 (2): 160-165, 2004
- 41) Ginsberg JP, De Alava E, Ladanyi M, Wexler LH, Kovar H, Paulussen M, Zoubek A, Dockhorn-Dworniczak B, Juergens H, Wunder JS, Andrulis IL, Malik R, Sorensen PHB, Womer RB, Barr FG. EWS-FLI1 and EWS-ERG Gene Fusions Are Associated With Similar Clinical Phenotypes in Ewing's Sarcoma. *Journal of Clinical Oncology* 17: 1809-1814, 1999
- 42) Gonzalez I, Andreu EJ, Panizo A, Inoges S, Fontalba A, Frenandez-Luna JL, Gaboli M, Sierrasesumaga L, Martin-Algarra S, Pardo J, Prosper F, De Alava E. Imatinib inhibits proliferation of Ewing tumor cells mediated by the stem cell factor/KIT receptor pathway, and sensitizes cell to Vincristine and Doxorubicin-induced apoptosis. *Clinical Cancer Research* 10: 751-761, 2004
- 43) Granter SR, Renshaw AA, Fletcher CD, Bhan AK, Rosenberg AE. CD99 reactivity in mesenchymal chondrosarcoma. *Human Pathology* 27: 1273-1276, 1996
- 44) Goto S, Umehara S, Gerbing RB, Stram DO, Brodeur GM, Seeger RC, Lukens JN, Matthay KK, Shimada H. Histopathology (International Neuroblastoma Pathology Classification) and MYCN Status in Patients with Peripheral Neuroblastic Tumors: A Report from the Children's Cancer Group. *Cancer* 92(10): 2699-2708, 2001
- 45) Hachitanda Y, Tsuneyoshi M, Enjoji M, Nakagawara A, Ikeda K. Congenital primitive neuroectodermal tumorwith epithelial and glial diferantiation. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 114: 101-105, 1990

- 46) Hachitanda Y, Saito M, Mori T, Hamazaki M. Application of Fluorescence in Situ Hybridization to Detect N-myc (MYCN) Gene Amplification on Paraffin-Embedded Tissue Sections of Neuroblastomas. *Medical and Pediatric Oncology* 29: 135–138, 1997
- 47) Hadfield MG, Quezado MM, Williams RL, Luo VY. Ewing's family of involving structures related to the central nervous system: a review. *Pediatric and Developmental Pathology* 3: 203-210, 2000
- 48) Hanby AM, Milis RR, Oberman HA. Disorders of soft tissue. In Stenberg's *Diagnostic Surgical Pathology*, fourth edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, 2004, pp.180-183 (oNB: 979-981, ES/PNET: 270-273, 203-204, ; DSRCT: 204-205,
- 49) Hasegawa SL, Davison JM, Rutten A, Fletcher JA, Fletcher CD. Primary cutaneous Ewing's sarcoma: immunophenotypic and molecular cytogenetic evaluation of five cases. *The American Journal of Surgical Pathology* 22(3): 310-318, 1998
- 50) Hill DA, O'Sullivan MJ, Zhu X, Vollmer RT, Humhrey PA, Dehner LP, Pfeifer JD. Practical application of molecular genetic testing as an aid to the surgical pathologic diagnosis. *The American Journal of Surgical Pathology* 26(8): 965-977, 2002
- 51) Hotfilder M, Lanvers C, Jürgens H, Boos J, Vormoor J. C-kit-expressing Ewing tumor cells are insensitive to imatinib mesylate (STI571). *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 5: 167-169, 2002
- 52) Hornick JL, Fletcher CD. Immunohistochemical staining for KIT (CD117) in soft tissue sarcomas is very limited in distribution. *American Journal of Clinical Pathology* 117(2): 188-193, 2002
- 53) Inda MM, Mercapide J, Munoz J, Coullin P, Danglot G, Tunon T, Martinez-Penuela JM, Rivera JM, Burgos JJ, Bernheim A, Castresana JS. PTEN and DMBT1 homozygous

- deletion and expression in medulloblastomas and supratentorial primitive neuroectodermal tumors. *Oncology Reports* 12(6): 1341-1347, 2004
- 54) Kang SH, Perle MA, Nonaka D, Zhu H, Chan W, Yung GCH. Primer Ewing sarcoma/PNET of the kidney: Fine needle aspiration, histology and dual color break apart FISH assay. *Diagnostic Cytopathology* 35(6): 353-357, 2007
 - 55) Kelly KM. PAX3/FKHR and PAX7/FKHR gene fusions in rhabdomyosarcoma. *Journal of Pediatric Hematology Oncology* 20(5): 517-518, 1998
 - 56) Khoury JD. Ewing sarcoma Family of Tumors. *Advances in Anatomic Pathology* 12(4): 212-220, 2005
 - 57) Kleihues P, Cavenee WK. Peripheral neuroblastic tumours: in World Health Organization Classification of Tumours, Pathology & Genetics of Tumours of the Nervous System, Lyon, 2000, pp: 149-153
 - 58) Kontny U. Regulation of apoptosis and proliferation in Ewing's sarcoma-opportunities for targeted therapy. *Hematological Oncology* 24: 14-21, 2006
 - 59) Korja M, Finne J, Salmi TT, Haapasalo H, Taner M, Isola J. No GIST-type c-kit gain of function mutations in neuroblastic tumours. *Journal of Clinical Pathology* 58: 762-765, 2005
 - 60) Kraus JA, Felsberg J, Tonn JC, Reifenberger G, Pietsch T. Molecular genetic analysis of the TP53, PTEN, CDKN2A, EGFR, CDK4 and MDM2 tumour-associated genes in supratentorial primitive neuroectodermal tumours and glioblastomas of childhood. *Neuropathology and Applied Neurobiology*; 28; 325-333: 2002
 - 61) Krams M, Parwaresch R, Sipos B, Heidorn K, Harms D, Rudolph P. Expression of the c-kit receptor characterizes a subset of neuroblastomas with favorable prognosis. *Oncogene* 23(2): 588-595, 2004

- 62) Kushner BH, LaQuaglia MP, Cheung NKV, Kramer K, Hamelin AC, Gerald WL, Ladanyi M. Clinically critical impact of molecular genetic studies in pediatric solid tumors. *Medical and Pediatric Oncology* 33: 530-535, 1999
- 63) Lammie A, Drobnjak M, Gerld W, Saad A, Cote R, Cordon-cardo C. Expression of c-kit and kit ligand proteins in normal human tissues. *Journal of histochemical and cytochemical* 42: 1417-1425, 1994
- 64) Landuzzi L, Strippoli P, Giovanni CD, Nicoletti G, Rossi I, Tonelli R, Frabetti F, Nanni P, Bagnara GP, Lollini PL. Production of stem cell factor and ezpression of C-kit in human rhabdomtosarcoma cells: Lack of autocrine growth modulation. *International Journal of Cancer* 78: 441-445, 1998
- 65) Landuzzi L, Giovanni CD, Nicoletti G, Rossi I, Ricci C, Scotlandi K, Sera M, Bagnara GP, Nanni P, Lollini PL. The metastatic ability of Ewing's sarcoma is modulated by stem cell factor and by its receptor c-kit. *American Journal of Pathology* 157: 2123-2131, 2000
- 66) Llombart-Bosch A, Navarro S. Immunohistochemical detection of EWS and FLI-1 proteinss in Ewing sarcoma and primitive neuroectodermal tumors: comparative analysis with CD99 (MIC-2) expression. *Applied Immunohistochemistry&Molecular Morphology* 9(3): 255-260, 2001
- 67) LSI[®] EWSR1 (22q12) Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe, LSI N-MYC (2p24.1) SpectrumOrange[™] Probe, LSI[®] PTEN (10q23) / CEP[®] 10 Dual Color Probe. Package insert.
- 68) Lund VJ, Howard D, Wei W, Spittle M. Olfactory neuroblastoma: past, present, and future? *Laryngoscope* 113: 502–507, 2003

- 69) Manucha V, Castellani R, Sun CC. Alveolar rhabdomyosarcoma of the paranasal sinuses in a 57-year-old woman with 1:16 translocation. *International Journal of Surgical Pathology* 14(3): 238-242, 2006
- 70) Mathew P, Valentine MB, Bowman LC, Rowe ST, Nash MB, Valantine VA, Cohn SL, Castleberry RP, Brodeur GM, Look AT. Detection of MYCN gene amplification in neuroblastoma by fluorescence in situ hybridization: a Pediatric Oncology Group study. *Neoplasia* 3(2): 105-109, 2001
- 71) Mazur MA, Gururangan S, Bridge JA, Cummings TJ, Mukundan S, Fuchs H, Larrier N, Halperin EC. Intracranial Ewing Sarcoma. *Pediatric Blood Cancer* 45: 850-856, 2005
- 72) Meier V, Kuhne T, Jundt G, Gudat F. Molecular diagnosis of Ewing tumors: improved detection of EWS/FLI-1 and EWS/ERG chimeric transcript and rapid determination of exon combinations. *Diagnostic Molecular Pathology* 7(1): 29-35, 1998
- 73) Mhawech-Fauceglia P, Hermann F, Penetrante R, Beck A, Sait S, Block AM, Odunsi K, Fisher J, Balos L, Cheney RT. Diagnostic utility of FLI-1 monoclonal antibody and dual-colour, break-apart probe fluorescence in situ (FISH) analysis in Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumour (EWS/PNET): a comparative study with CD99 and FLI-1 polyclonal antibodies. *Histopathology* 49: 569-575, 2006
- 74) Miettinen M, Chatten J, Paetau A, Stevenson A. Monoclonal Antibody NB84 in the Differential Diagnosis of Neuroblastoma and Other Small Round Cell Tumors. *The American Journal of Surgical Pathology* 22(3): 327-332, 1998
- 75) Miettinen M, Lasota J. KIT (CD117): A review on expression in normal and neoplastic tissue, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 13(3): 205-220, 2005

- 76) Min-Cheng Su, Yung-Ming Jeng, Yuang-Chung Chu. Desmoplastic small round cell tumor of the kidney. *American Journal of Surgical Pathology* 28: 1379-1383, 2004
- 77) Morotti RA, Nicol KK, Parham DM, Teot LA, Moore L, Hayes J, Meyer W, Qualmann SJ. An immunohistochemical algorithm to facilitate diagnosis and subtyping of rhabdomyosarcoma: The Children's Oncology Group Experience. *American Journal of Surgical Pathology* 30: 962-968, 2006
- 78) Murphy A, Stallings RL, Howard J, O'Sullivan M, Hayes R, Breatnach F, McDermott MB. Primary desmoplastic small round cell tumor of bone: report of a case with cytogenetic confirmation. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 156: 167-171, 2005
- 79) Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Baak JPA, Lees JA, Weng LP, Eng C. Altered PTEN Expression as a Diagnostic Marker for the Earliest Endometrial Precancers. *Journal of the National Cancer Institute* 92: 924-931, 2000
- 80) Nakajima H, Sim FH, Bond JR, Unni KK. Small Cell Osteosarcoma of Bone: Review of 72 Cases. *Cancer* 79: 2095-2106, 1997
- 81) Nishio J, Althof PA, Bailey JM, Zhou M, Neff JR, Barr FG, Parham DM, Teot L, Qualman SJ, Bridge JA. Use of a novel assay on parafin embedded tissues as an adjunct to diagnosis of alveolar rhabdomyosarcoma. *Laboratory Investigation* 86: 547-556, 2006
- 82) Noguera R, Pelin A, Navarro S, Carda C, Llombart-Bosch A. Translocation (10;11;12)(p14;q24;q12) characterized by fluorescence in situ hybridization in a case of Ewing's tumor. *Diagnostic Molecular Pathology*; 10(1): 2-8, 2001
- 83) Oğuz H, Arslan N, Felek S, Demirci M, Şafak MA. Olfaktör Nöroblastom: Olgu Sunumu. *Kulak burun boğaz ve baş boyun cerrahisi dergisi* 5(2): 85-87, 2006

- 84) Ordóñez, Nelson G. Desmoplastic Small Round Cell Tumor: I: A Histopathologic Study of 39 Cases with Emphasis on Unusual Histological Patterns. *The American Journal of Surgical Pathology* 22(11): 1303-1313, 1998
- 85) Ordóñez, Nelson G. Desmoplastic Small Round Cell Tumor: II: An Ultrastructural and Immunohistochemical Study with Emphasis on New Immunohistochemical Markers. *The American Journal of Surgical Pathology* 22(11): 1314-1327, 1998
- 86) Özdemirli M, Fanburg-Smith JC, Hartmann DP, Shad AT, Lage JM., Magrath IT, Azumi N, Harris NL, Cossman J, Jaffe ES. Precursor B-Lymphoblastic Lymphoma Presenting as a Solitary Bone Tumor and Mimicking Ewing's Sarcoma: A Report of Four Cases and Review of the Literature. *The American Journal of Surgical Pathology* 22(7): 795-804, 1998
- 87) O'Sullivan MJ, Perlman EJ, Furman J, Humhrey PA, Dehner LP, Pfeifer JD. Visceral Primitive Peripheral Neuroectodermal Tumors: a clinicopathologic and molecular study. *Human Pathology* 32(10): 1109-1115, 2001
- 88) Özer E, Kanlıkama M, Karakurum G, Şirikci A, Erkilic S, Aydın A. Primitive neuroectodermal tumour of the mandible. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 65: 257-261, 2002
- 89) Parham DM, Webber B, Holt H, Williams WK, Maurer H. Immunohistochemical study of childhood rhabdomyosarcomas and related neoplasms: Results of Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Project. *Cancer* 15: 3072-3080, 1991
- 90) Parham DM, Qualman SJ, Teot L, Barr FG, Morotti R, Sorensen PHB, Triche TJ, Meyer WH, for the Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children's Oncology Group. Correlation between histology and PAX/FKHR fusion status in alveolar

- rhabdomyosarcoma: a report from the Childre's Oncology Group. American Journal of Surgical Pathology 31(6): 895-901, 2007
- 91) Park YK, Chi SG, Park HR, Yung MH, Unni KK. Detection of t(11;22)(q24;q12) translocatin of Ewing's sarcoma in parafin embedded Tissue by nested reverse transcription- polymerase chain reaction. Journal of Korean Science 13: 395-399, 1998
 - 92) Paulussen M, Ahrens S, Lehnert M, Taeger D, Hense HW, Wagner A, Dunst J, Harms D, Reiter A, Henze G, Niemeyer C, Göbel U, Kremens B, Fölsch UR, Aulitzky WE, Voute PA, Zoubek A, Jürgens H. Second malignencies after Ewing tumor treatment in 690 patients from a cooperative German/ Austrian/ Dutch study. Annals of Oncology 12: 1619-1630, 2001
 - 93) Pekala JS, Gururangan S, Provenzale JM, Mukundan S. Central Nervous System Extraosseous Ewing Sarcoma: Radiologic Manifestations of This Newly Defined Pathologic Entity. American Journal of Neuroradiolgy 27: 580-583, 2006
 - 94) Qian X, Jin L, Shearer BM, Ketterling RP, Jalal SM, Lloyd RV. Molecular Diagnosis of Ewing's Sarcoma/Primitive Neuroectodermal Tumor in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues by RT-PCR and Fluorescence In Situ Hybridization. Diagnostic Molecular Pathology 14(1): 23-28, 2005
 - 95) Roberts P, Burchill SA, Beddiw RA, Wheeldon J, Cullinane C, Lewis IJ. A Combined Cytogenetic and Molecular Approach to Diagnosis in a Case of Desmoplastic Small Round Cell Tumor with a Complex Translocation (11;22;21). Cancer Genetics and Cytogenetics 108(1): 19-25, 1999
 - 96) Rodriguez-Perales S, Martinez-Ramirez A, De Andres SA, Vale L, Urioste M, Benitez J, Cigudosa JC. Molecular cytogenetic characterization of rhabdomyosarcoma cell lines. Cancer Gentics and Cytogenetics 148: 35-43, 2004

- 97) Rosai J. Bone and joints. In: Rosai J, ed. Ackerman's surgical Pathology, ninth edition, St. Louis: C. V. Mosby, 2004
- 98) Rosoff PM, Hatcher S, West DC. Biphenotypic Sarcoma With Characteristic Of Both a Ewing Sarcoma and a Desmoplastic Small Round Cell Tumor. Medical and Pediatric Oncology 34: 407-412, 2000
- 99) Rossi S, Orvieto E, Furlanetto A, Laurino L, Ninfo V, Dei Tos AP. Utility of the immunohistochemical detection of FLI-1 expression in round cell and vascular neoplasm using a monoclonal antibody. Modern Pathology 17: 547-552, 2004
- 100) Sabah M, Leader M, Kay E. The Problem With KIT: Clinical Implications and Practical Difficulties With CD117 Immunostaining. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology 11(1): 56-61, 2003
- 101) Sansal I, Sellers WR. The Biology And Clinical Relevance Of The PTEN Tumor Suppressor Pathway. Journal Of Clinical Oncology 22(14): 2954-2963, 2004
- 102) Sarangarajan R, Hill DA, Humphrey PA, Hitchcock MG, Dehner LP, Pfeifer JD. Primitive neuroectodermal tumors of the biliary and gastrointestinal tracts: clinicopathologic and molecular diagnostic study of two cases. Pediatric And Developmental Pathology 4: 185-191, 2001
- 103) Sartelet H, Grossi L, Pasquier D, Combaret V, Bouvier R, Ranchère D, Plantaz D, Munzer M, Philip T, Birembaut P, Zahm JM, Bergeron C, Gaillard D, Pasquier B. Detection of N-myc amplification by FISH in immature areas of fixed neuroblastomas: more efficient than Southern blot/PCR. Journal of Pathology 198: 83-91, 2002
- 104) Saxena R, Sait S, Mhawech- Fauceglia P. Ewing sarcoma/ primitive neuroectodermal tumor of the kidney: a case report. Diagnosed by immunohistochemistry and molecular analyses. Annals of Diagnostic Pathology 10: 363-366, 2006

- 105) Scotlandi K, Manara MC, Strammiello R, Landuzzi L, Benini S, Perdichizzi S, Sera M, Astolfi A, Nicoletti G, Bertoni F, Nanni P, Picci P. C-kit reseptor expression in Ewing sarcoma: Lack of prognostic value but therapotic targeting opportunities in appropriate conditions. *Journal of Clinical Oncology* 21(10): 1952-1960, 2003
- 106) Sebire N, Gibson S, Rampling D, Williams S, Malone M, Ramsay A. Immunohistochemical findings in embryonal small round cell tumors with molecular diagnostic confirmation. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 13(1): 1-5, 2005
- 107) Sheaff M, McManus A, Scheimberg I, Paris A, Shipley J, Baithun S. Primitive neuroectodermal tumor of the kidney confirmed by fluorescence in situ hybridization. *The American Journal of Surgical Pathology* 21(4): 461-468, 1997
- 108) Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata JI, Joshi VV, Roald B, Stram DO, Gerbing RB, Lukens JN, Matthay KK, Castleberry RP. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada System). *Cancer* 86: 364-72, 1999
- 109) Shimada H, Umehara S, Monobe Y, Hachitanda Y, Nakagawa A, Goto S, Gerbing RB, Stram DO, Lukens JN, Matthay KK. International Neuroblastoma Pathology Classification for Prognostic Evaluation of Patients with Peripheral Neuroblastic Tumors: A Report from the Children's Cancer Group. *Cancer* 92: 2451-61, 2001
- 110) Silva MVC, McMahon AD, Paterson L, Reid R. Identification of poorly differentiated synovial sarcoma: a comparison of clinicopathological and cytogenetic features with those of typical synovial sarcoma. *Histopathology* 43: 220-230, 2003
- 111) Smith TA, Easley KA, Goldblum JR. Myxoid/round cell liposarcoma of the extremities. A clinicopathologic study of 29 cases with particular attention to extent of

- round cell liposarcoma. *The American Journal of Surgical Pathology* 20(2): 171-180, 1996
- 112) Smithey B, Pappo A, Hill DA. C-kit expression in pediatric solid tumors: a comparative immunohistochemical study. *American Journal of Surgical Pathology* 26(4): 486-492, 2002
 - 113) Sorensen PHB, Shimada H, Liu XF, Lim JF, Thomas G, Triche TJ. Biphenotypic Sarcomas with Myogenic and Neural Differentiation Express the Ewing's Sarcoma EWS/FLI1 Fusion Gene1. *Cancer Research* 55: 1385-1392, 1995
 - 114) Sorensen PHB, Wut JK, Berean KW, Lim JF, Donn W, Frierson HF, Reynolds CP, Lopez-Terrada D, Triche TJ. Olfactory neuroblastoma is a peripheral primitive neuroectodermal tumor related to Ewing sarcoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 1038-1043, 1996
 - 115) Sorensen PHB, Lynch JC, Qualman SJ, Tirabosco R, Lim RF, Maure HM, Bridge JA, Christ WM, Triche TJ, Barr FG. PAX3/FKHR and PAX7/FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology* 20(11): 2672-2679, 2002
 - 116) Spitz R, Hero B, Skowron M, Ernestus K, Berthold F. MYCN-status in neuroblastoma: characteristics of tumours showing amplification, gain, and non-amplification. *European Journal of Cancer* 40: 2753-2759, 2004
 - 117) Tamura M, Gu J, Tran H, Yamada KM. PTEN Gene and Integrin Signaling in Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 91: 1820-1828, 1999
 - 118) Tanaka S, Tajiri T, Noguchi SI, Shono K, Ihara K, Hara T, Fukuoka SS. Clinical Significance of a Highly Sensitive Analysis for Gene Dosage and the Expression Level of MYCN in Neuroblastoma. *Journal of Pediatric Surgery* 39: 63-68, 2004

- 119) Thorner P, Squire J, Chilton-MacNeill S, Marrano P, Bayani J, Malkin D, Greenberg M, Lorenzana A, Zielenska M. Is the EWS/FLI-1 fusion transcript specific for Ewing sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor?: A report of four cases showing this transcript in a wider range of tumor types. *American Journal of Pathology* 148: 1125-1138, 1996
- 120) Uccini S, Mannrino O, McDowell HP, Pauser U, Vitali R, Natali PG, Altavista P, Andreano T, Coco S, Boldrini R, Bosco S, Clerico A, Cozzi D, Donfrancesco A, Inserra A, Kokai G, Losty PD, Nicotra MR, Dominici C. Clinical and molecular evidence for C-kit reseptor as a therapeutic marker in neuroblastic tumors. *Clinical Cancer Research* 11: 380-389, 2005
- 121) Van NP, Marc J, McNutt MA, Rutledge JC, Gown AM. Expression of myogenic regulatory proteins (myogenin and MyoD1) in small blue round cell tumors of childhood. *American Journal of Pathology* 147(6): 1799-1810, 1995
- 122) Vicha A, Stejskalova E, Sumeramuer D, Kodet R, Malis J, Kucerovala H, Bedrnicek J, Koutecky J, Eckschlager T. Malignant peripheral primitive neuroectodermal tumor of the kidney. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 139: 67-70, 2002
- 123) Vitali R, Cesi V, Nicotra MR, McDowell HP, Donfrancesco A, Mannarino O, Natali PG, Raschella G, Dominici C. C-kit is preferentially expressed in MYCN-amplified neuroblastoma and its effect on cell proliferations is inhibited in vitro by STI-571. *International Journal of Cancer* 106(2): 147-152, 2003
- 124) Weiss SW, Goldblum JR. Rhabdomyosarcoma. In Enzinger and Weiss's *Soft Tissue Tumors*, fourth edition, 2001, pp.785-829

- 125) Williamson D, Lu YJ, Gordon T, Sciort R, Kelsey A, Fisher C, Poremba C, Anderson J, Pritchard- Jones K, Shipley J. Relationship between MYCN copy number and expression in rhabdomyosarcoma and correlation with adverse prognosis in alveolar subtype. *Journal of Clinical Oncology* 4: 880-888, 2005
- 126) Wilson DJ, Dailey RA, Griffith MT, Newton CJ. Primary Ewing Sarcoma of the Orbita. *Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery* 17(4): 300-303, 2001
- 127) Yamaguchi U, Hasegawa T, Morimoto Y, Tateishi U, Endo M, Nakatani F, Kawai A, Chuman H, Beppu Y, Kurotaki H, Furuta K. A practical approach to the clinical diagnosis of paraffin wax Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumour and other small round cell tumours sharing EWS rearrangement using new fluorescence in situ hybridisation probes for EWSR1 on formalin fixed embedded tissue. *Journal of Clinical Pathology* 58: 1051-1056, 2005
- 128) Yang P, Hirose T, Hasegawa T, Hizawa K, Sano T. Dual-colour fluorescence in situ hybridization analysis of synovial sarcoma. *Journal of Pathology* 184(1): 7-13, 1998
- 129) Yoshimoto M, Cutz JC, Nuin PAS, Joshua AM, Bayani J, Evans AJ, Zielenska M, Squire JA. Interphase FISH analysis of PTEN in histologic section shows genomic deletions in 68% of primary prostate cancer and 23% of high grade prostatic intra-epithelial neoplasias. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 169: 128-137, 2006