



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

ÇOCUKLUK ÇAĞI SOLİD TÜMÖRLERİNDE KANSER
KÖK HÜCRE BELİRTECİ OLARAK PİWİL2
EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI VE PİWİL2'NİN
BİYOMARKER OLARAK KULLANILABİLECEĞİNİN
GÖSTERİLMESİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Yılmaz SEÇİLMİŞ

KAYSERİ-2013



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**ÇOCUKLUK ÇAĞI SOLİD TÜMÖRLERİNDE KANSER
KÖK HÜCRE BELİRTECİ OLARAK PİWİL2
EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI VE PİWİL2'NİN
BİYOMARKER OLARAK KULLANILABİLECEĞİNİN
GÖSTERİLMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Danışman
Doç. Dr. Musa KARAKÜKCÜ

Dr. Yılmaz SEÇİLMİŞ

KAYSERİ-2013

TEŞEKKÜR

Tezin her aşamasında titizlikle duran, değerli vakitlerini benimle paylaşan, bana güven ve cesaret veren, engin bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli hocam Doç. Dr. Musa Karakükücü'ye teşekkür eder sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Benden hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen, hayata ve insanlara her zaman pozitif bakan, bu düşünceyi bana da öğreten ve yetişmemde emekleri olan başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Tamer Güneş olmak üzere, Anabilim Dalımız diğer öğretim üyelerine saygı ve şükranlarımı sunarım.

Birlikte çalışmaktan her zaman onur ve mutluluk duyduğum, kliniğimizin değerli uzmanlarına ve asistan doktor arkadaşlarıma, kliniğimizin hemşirelerine sevgilerimi sunarım.

Tıp Fakültesinden uzmanlığa kadar yetişmemde her aşamada desteklerini esirgemeyen anne ve babama sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Uzmanlık eğitimimin başından, tezimin son aşamasına kadar sabırla, sevgiyle bana destek olan biricik eşim Derya'ya, varlığıyla eşimle hayatımızı dolduran ve renk katan canımdan çok sevdiğim oğlum Kutay'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------|
| TEŞEKKÜR | i |
| İÇİNDEKİLER | ii |
| KISALTMALAR | iv |
| TABLolar LİSTESİ..... | vi |
| RESİM VE ŞEKİL LİSTESİ | vii |
| ÖZET..... | viii |
| ABSTRACT | x |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 3 |
| 2.1. ÇOCUKLUK ÇAĞI SOLİD TÜMÖRLERİ..... | 5 |
| 2.1.1. Nöroblastom..... | 5 |
| 2.1.2. Wilm's Tümörü..... | 8 |
| 2.1.3. Sarkomlar..... | 12 |
| 2.1.4. Germ Hücreli Tümörler | 15 |
| 2.2. KÖK HÜCRE BİYOLOJİSİ | 19 |
| 2.3. KÖK HÜCRENİN TARİHÇESİ..... | 19 |
| 2.3.1. Totipotent Kök Hücreler..... | 20 |
| 2.3.2. Pluripotent Kök Hücreler..... | 21 |
| 2.3.3. Multipotent Kök Hücre..... | 21 |
| 2.4. ELDE EDİLDİKLERİ KAYNAKLARA GÖRE KÖK HÜCRELER..... | 22 |
| 2.4.1. Embriyonik Kök Hücreler | 22 |
| 2.4.2. Erişkin Kök Hücreler | 22 |
| 2.4.3. Fetal Kök Hücreler..... | 23 |
| 2.4.4. Kanser Kök Hücreleri | 24 |
| 2.5. KANSER KÖK HÜCRE MODELİ | 25 |
| 2.5.1. Kanser Kök Hücrelerinde Tedaviye Dirençlilik..... | 26 |

| | |
|---|-----------|
| 2.6. ÇALIŞMADA DEĞERLENDİRİLEN DİĞER PARAMETRELER | 31 |
| 2.6.1. Ki67 | 31 |
| 2.6.2. Nekroz..... | 31 |
| 2.6.3. Mitoz..... | 32 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM..... | 33 |
| 4. BULGULAR..... | 39 |
| 5. TARTIŞMA..... | 58 |
| 6. SONUÇLAR..... | 65 |
| KAYNAKLAR..... | 68 |
| EKLER..... | 76 |
| KABUL ONAY..... | 79 |

KISALTMALAR

| | |
|---------------|---|
| ABC | : ATP-Binding Cassette |
| AFP | : Alfafetoprotein |
| BclXL | : B-cell lymphoma-extra large |
| BT | : Bilgisayarlı Tomografi |
| CIN | : Cervical intraepithelial neoplasia |
| CSC | : Cancer Stem Cell |
| EWS | : Ewing Sarkomu |
| GHT | : Germ Hücreli Tümörler |
| Gy | : Gray |
| HCG | : Human Chorionic Gonadotropin |
| HKH | : Hemapoetik Kök Hücre |
| INSS | : International Neuroblastoma Staging system |
| kd | : Kilodalton |
| LDH | : Laktat Dehidrogenaz |
| MIBG | : Meta-iyodobenzilguanidin |
| MRG | : Manyetik Rezonans Görüntüleme |
| NF-kB | : Nuclear Factor Kappa B |
| NHL | : Non-Hodgkin Lenfoma |
| NWTS | : National Wilm's Tumor Study |
| PAS | : Periodic Acid-Schiff |
| PCNA | : Proliferatif Hücre Çekirdek Antijeni |
| piRNAs | : Piwi-Etkileşimli RNA |
| Piwil2 | : P-Element-Induced Wimpy Testis |
| PLAP | : Plesental Alkalen Fosfataz |
| RMS | : Rabdomyosarkom |
| RT-PCR | : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction |

| | | |
|--------------|---|--|
| SIOP | : | International Society of Pediatric Oncology |
| SPSS | : | Statistical Package for the Social Sciences |
| SSS | : | Santral Sinir Sistemi |
| Stat3 | : | Signal Transducer And Activator of Transcription 3 |
| TPOG | : | Türk Pediatrik Onkoloji Grubu |
| USG | : | Ultrasonografi |

TABLolar LİSTESİ

| | |
|------------------|--|
| Tablo 1. | Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG)/Türk Pediatrik Hematoloji Derneği (TPHD) Pediatrik Tümör Kayıtları, 2009-2011. Tanı Gruplarının Dağılımı. 4 |
| Tablo 2. | Hastaların Tümör Grup ve Alt Gruplarına Göre Dağılımı 40 |
| Tablo 3. | Hastaların Tümör Grupları ve Alt Gruplarına Göre Yaş Ortalamaları 41 |
| Tablo 4. | Hastaların Tümör Grupları ve Alt Gruplarında Cinsiyete Göre Dağılımı ... 42 |
| Tablo 5. | Hastaların Tümör Gruplarında Piwil2 Boyanma Sayı ve Yüzdeleri..... 43 |
| Tablo 6. | Hastaların Tümör Gruplarında Zayıf, Orta ve Kuvvetli Piwil2 Boyanma Sayı ve Yüzdeleri 44 |
| Tablo 7. | Nöroblastom Grubunda Tümör Alt Tiplerinin Piwil2 Boyanma Oranları ... 45 |
| Tablo 8. | Nöroblastom Evrelerine Göre Piwil2 Boyanma Oranları 46 |
| Tablo 9. | Nöroblastomda N-Myc Amplifikasyonuna Göre Piwil2 Boyanma Oranları 46 |
| Tablo 10. | Nöroblastomda Tümör Lokalizasyonuna Göre Piwil2 Boyanma Oranları .. 47 |
| Tablo 11. | Nöroblastomda Prognoza Göre Piwil2 Boyanma Oranları 47 |
| Tablo 12. | Sarkom Grubunda Tümör Alt Tiplerinin Piwil2 Boyanma Oranları 50 |
| Tablo 13. | Osteosarkomda Prognoza Göre Piwil2 Boyanma Oranları..... 52 |
| Tablo 14. | Germ Hücreli Tümörler Grubunda Tümör Alt Tiplerinin Piwil2 Boyanma Oranları..... 53 |
| Ek Tablo. | Çalışmaya Alınan Hastaların Detaylı Bilgileri..... 76 |

RESİM VE ŞEKİL LİSTESİ

| | | |
|-----------------|--|----|
| Şekil 1. | Germ hücreli tümörlerin sınıflaması..... | 16 |
| Şekil 2. | Kök Hücre Çeşitleri | 21 |
| Şekil 3. | Kanser kök hücre yenilenmesinde sinyal ileti yolları..... | 24 |
| Şekil 4. | Kanser kök hücre modeli | 25 |
| Şekil 5. | Piwil2'nin Stat3/BcL yolu üzerinde apoptozu inhibe etmesi | 30 |
| Şekil 6. | Olguların Tümör Gruplarına Göre Dağılımı | 39 |
| Resim 1. | Fare ve insan testisinde Piwil2; Piwil2'nin testisteki ekspresyon paterni | 28 |
| Resim 2. | Serviks Karsinomu Piwil2 boyanma paternleri | 29 |
| Resim 3. | Normal Testis Dokusu | 36 |
| Resim 4. | Osteosarkom Dokusu, 3+ (Kuvvetli Oranda) Boyanma..... | 49 |
| Resim 5. | Disgerminom Tanılı Preparatta 3+ Boyanma ve Nükleer Boyanma Paterni. | 56 |
| Resim 6. | Aynı Hastada 20x Büyütme ve Farklı Kesimden Nükleer Boyanma Paterni | 56 |
| Resim 7. | Negatif boyanan Wilm's tümörü dokusu yanında kuvvetli pozitif (3+) boyanan böbrek dokusu | 57 |

**ÇOCUKLUK ÇAĞI SOLİD TÜMÖRLERİNDE KANSER KÖK HÜCRE
BELİRTECİ OLARAK PİWİL2 EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI VE
PİWİL2’NİN BİYOMARKER OLARAK KULLANILABİLECEĞİNİN
GÖSTERİLMESİ**

ÖZET

Giriş ve Amaç: Piwil2 (P-element-Induced wimpy testis like) germ hücre gelişiminde ve onarımında esansiyel bir role sahip olan argonaute proteinlerinin alt grubudur. Germ kök hücresinin kendi kendini yenilemesinden, hücre döngüsü, RNA interferansı, epigenetik modülasyon ve kromatinin yeniden düzenlenmesinden sorumludur. Ayrıca kanser kök hücrelerinde sinyal ileti yollarında proliferasyon ve apoptozisi düzenleyen anahtar görevleri vardır. Yapılan çalışmalarda kolon kanserlerinde, over ve endometrium tümörlerinde, böbrek, gastrointestinal ve pankreas tümörlerinde kök hücre belirteci olarak Piwil2 gösterilmiştir. Bu çalışmada amaç, çocukluk çağı solid tümörlerinde bir kanser kök hücre belirteci olan Piwil2 ekspresyonunun araştırılması ve biyomarker olarak kullanılabileceğinin gösterilmesidir.

Hastalar ve Metod: Çalışmaya Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim dalı, Pediatri Hematoloji-Onkoloji Departmanı tarafından 2000-2011 yılları arasında takip edilen, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı tarafından solid tümör tanısı verilmiş ve parafin blokları arşivlenmiş 150 hasta dahil edildi. İmmünohistokimyasal yöntemler kullanılarak Piwil2 poliklonal antikoru ile solid tümör preparatları boyandı. Boyanan preparatlarda Piwil2 boyanma oranları bir uzman patolog ve bir pediatri hematoloji uzmanı tarafından değerlendirildi.

Bulgular: 150 hastadan oluşan çalışma grubunda; solid tümörlerde Piwil2 immünohistokimyasal boyanması ile kanser kök hücre ilişkisi ve klinik özellikler karşılaştırıldı. 30 hasta (%20) nöroblastom, 42 hasta (%28) Wilm’s tümörü, 44 hasta (%29,3) sarkom, 34 hasta (%22,7) ise germ hücreli tümör tanısı almıştı. Tümör gruplarına göre bakıldığında nöroblastom tanısı alan 30 hastanın 11’inde (%36) zayıf boyanma, 5’inde (%16,7) orta derecede boyanma, 5’inde (%16,7) kuvvetli boyanma görüldü. Wilm’s tümöründe ise 42 boyamadan 15’i zayıf boyanırken (%35), orta veya kuvvetli boyanma görülmedi. Sarkom tanısı almış olan 44 hastanın 10’ unda (%22,7)

zayıf boyanma, beşinde (%11,4) orta derecede boyanma, 4'ünde (%9,1) ise kuvvetli boyanma görüldü. Bu grupta osteosarkom vakalarında Pivwil2 ile kuvvetli boyanma diğerlerine göre anlamlı idi. Otuzdört germ hücreli tümör dokusunun boyanmasında 6'sında (%17,6) zayıf boyanma, 6'sında (%17,6) orta derecede boyanma ve 6'sında (%17,6) kuvvetli boyanma görüldü. Nöroblastom ve germ hücreli tümör gruplarında orta ve kuvvetli Pivwil2 boyanma paterni diğer tümör gruplarına göre anlamlı yüksek idi ($p<0,05$). Germ hücreli tümörde hem nükleer hem sitoplazmik patern görülürken diğer tümörlerde sitoplazmik boyanma paterni görüldü.

Sonuç: Çocukluk çağı solid tümörleri içerisinde nöroblastom ve germ hücreli tümörlerde istatistiksel açıdan anlamlı Pivwil2 pozitifliği görüldü. Bu durum özellikle kök hücrelerin germ hücrelerde olması ve Pivwil2'nin germ hücrelerde ilk kez tespit edilmesi ile açıklanabilir. Diğer tümörlerde sadece stoplazmik boyanma varken germ hücreli tümörlerde hem nükleusta hem de stoplazmada boyanma görüldü. Nükleusta boyanma olması ise Pivwil2'nin germ hücre gelişimi ve döngüsünde rolü olmasından kaynaklanabilir. Nöroblastomda yaklaşık 1/3 vakada belirgin Pivwil2 ekspresyonu, zaten prognozu kötü ve tedavisi sıkıntılı nöroblastom vakaları için anlamlı olabilir. Sarkom grubunda osteosarkom vakalarında tespit edilen anlamlı Pivwil2 pozitifliği, bu grupta tedavilerdeki zorluklardan dolayı anlamlı olabilir. İlginç olarak Wilm's tümörü vakalarında, Pivwil2 normal böbrek dokusunda belirgin izlenirken, tümör dokusunda çok az vakada görüldü. İleri çalışmalarda Pivwil2, Wilm's tümörü için negatif marker ve cerrahi sınır belirlemede kullanılabilir.

Anahtar kelimeler: Pivwil 2, Kanser Kök Hücre, Biyomarker, Çocukluk Çağı Solid Tümörleri

**INVESTIGATION OF PIWIL2 EXPRESSION AS A CANCER STEM CELL
MARKER AND DEMONSTRATION OF ITS AVAILABILITY AS A
BIOMARKER IN SOLID TUMORS OF CHILDHOOD**

ABSTRACT

Objective: Piwil2 (P-element-Induced wimpy testis like) belongs to a subgroup of argonaute proteins, which has an essential role in germ cell development and repair. Piwil2 is associated with cell cycle, RNA interference, epigenetic modulation and chromatin rearrangement in the regeneration of germ stem cell. In addition, it has a pivotal role in the regulation of proliferation, and apoptosis in signaling pathways in cancer stem cells. Recent studies reported that Piwil2 has been demonstrated as a stem cell marker in colon cancers and ovarian endometrial, gastrointestinal and pancreatic tumors. In the present study, we aimed to evaluate the expression of Piwil2, as a cancer stem cell marker in childhood solid tumors, to demonstrate the availability of Piwil2 as a biomarker.

Patients and method: The study included 150 patients who have diagnosed with pediatric solid tumor and have available paraffin blocks at the Pathology Department of Erciyes University Medicine School and had been followed between 2000-2011 years in Pediatric Hematology and Oncology Department of Erciyes University.. Solid tumor preparations were stained with polyclonal Piwil2 antibody by using immunohistochemical methods. The Piwil2 staining was assessed by an experienced pathologist and pediatric hematologist.

Results: The clinical characteristics and features of Piwil2 immunohistochemical staining, and cancer stem cells in the study group that consisted 150 pateint were evaluated. . 30 patients (20%) were diagnosed with neuroblastoma, while 42 patients (28%) have Wilm's tumor, 44 patients (29.3%) have sarcoma; 34 patients (22.7%) were diagnosed with germ cell tumor. Assessment of the tumor sub-groups showed that, of 30 patients with neuroblastoma, there was weak staining in 11 (36.0%), moderate staining in 5 (16.7%), and strong staining in 5 (16.7%). Of 42 patients with Wilm's tumor, it was seen that there was weak staining in 15 (35.0%), but no moderate or strong staining. Of 44 patients with sarcoma, it was seen that there was weak staining in

10 (22.7%), moderate staining in 5 (11.4%), and strong staining in 4 (9.1%). In the sarcoma group Piwil2 staining was stronger in the patients with osteosarcoma. .Of 34 patients with germ cell tumor, there was weak staining in 6 (17.6%), moderate staining in 6 (17.6%) and strong staining in 6 (17.6%). The staining rates were statistically significant in neuroblastoma and germ cell tumors ($p<0,05$). Both nuclear and cytoplasmic staining patterns were observed in germ cell tumors, whereas only cytoplasmic staining pattern was observed in other tumor types.

Conclusion: Among the solid tumors of childhood, significant Piwil2 positivity was observed in neuroblastoma, and germ cell tumors. This finding can be explained that cancer stem cell in these tumors are associated with germ cells, and Piwil2 expression was previously shown in the germ cells. Staining was observed in both nucleus and cytoplasm in germ cell tumors while only cytoplasmic staining was observed in other tumor types. The presence of nuclear staining may be related to the role of Piwil2 in germ cell development and cycle. In the patients with neuroblastoma, 1/3 of the cases showed significant expression of Piwil2, this may be significant in this kind of patients with poor prognosis. In the sarcoma group, significant Piwil2 expression was observed in the pateins with osteosarcoma, which has treatment refractory, and dismal prognosis. Interestingly in cases of Wilm's tumor, significant Piwil2 was observed in the normal kidney tissue, whereas Piwil2 expression was rarely observed in the tumor tissue. Piwil2 expression can be used for determining the surgical margin in further studies .

Keywords: Piwil 2, cancer stem cell, biomarker, solid tumors of childhood.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Gelişen kök hücre ve moleküler biyoloji çalışmaları sayesinde kanser etyopatogenezinde kök hücre çalışmaları önem kazanmaktadır. Son geliştirilen hipotezlere göre kanserin tümör dokusunda oluşan kök hücrelerden köken aldığı öne sürülmektedir (1). Kanser kök hücrelerinin, kanseri başlatan, ilerleten ve klasik tedavi şekillerine direnç geliştirmesinden sorumlu olan ve cerrahi veya kemotereapi sonrası relaps ve metastazı sağlayan hücreler olduğu düşünülmektedir (1, 2, 3).

İnsanda bulunan doku veya hücrelerin birtakım eksojen veya endojen uyarılarla uyarılması sonucu aktive olan kanser kök hücreleri normal devam eden hücre siklusunu bozup programlanmış hücre ölümü olan apoptoz kontrolden çıkar ve onkojenik aktivite başlamış olur. Tümör oluşum ve yayılım safhasına kadar oluşan olaylara çok sayıda medyatör aracılık etmektedir. Bütün bu olaylar dizisinde başlangıç noktada bulunan kök hücrelerinin tespit edilmesi hastalığın teşhisinden tedavisine kadar her aşamada aydınlatıcı olacaktır. En önemli faz olan teşhis noktasında kök hücrelere özgü ve saptanabilen bir biyomarker ile tümörün tespit edilebilmesi mümkün olabilir (2,3).

PİWİL2, kelime anlamı olarak “P element induced wimpy testis-like2” kelimelerinden oluşmaktadır. PİWİL2 fare ve insanda piwi gen ailesinin üyesidir (1,4,5,7). Özellikle testiste exprese edilir. Toplam 973 aminoasidden oluşur ve 100-110 kiloDalton (kd) ağırlığındadır. PAZ ve C terminal olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. PAZ alanı 384-496 aminoasidden oluşur. C terminal kısmı ise 668-959 aminoasidden oluşmaktadır. C terminal alanı hücre RNA'sı ile etkileşmektedir. (6,7)

Piwil2 germ hücrelerde exprese edilir. Özellikle premayotik ve erken mayotik germ hücrelerinde ve çeşitli kanser kök hücrelerinde üretilmektedir.(9) Normal hücrelerde ve inflamatuvar hücrelerde bulunmaz. Germ hücrelerde sessiz bir şekilde beklerken, hücre siklusu genlerinin ekspresyonu inhibe olduğu zaman normal kök hücre proliferasyonunu deprese etmek için ortaya çıkar. Piwil2 ekspresyonunun artışı apoptozu baskılamaktadır. Bununla korele olarak Piwil2 proteininin kaybı hücre çoğalma hızı ve bölünme kapasitesinin azalması ile sonuçlanmaktadır. Piwil2'nin başta seminomatöz tümörler olmak üzere insanda prostat, meme, gastrointestinal sistem, over, endometriyum, farede ise meme, rabdomyosarkom ve medulloblastomda exprese edildiği gösterilmiştir. (8)

Çocukluk çağı solid tümörleri içinde nöroblastom, rabdomyosarkom, Wilm's tümörü ve germ hücreli tümörler önemli bölümü oluşturur. Bu hastaların erken tanı alabilmeleri, bu hastalıklara ilişkin bulgu ve belirtilerin bilinmesi ve hızla tanıya gidilmesi ile mümkündür. Ülkemizde çocuk hastaların çoğu ileri evrelerde tanı almaktadır. Kanser kök hücre belirteci olan Piwil2'nin solid tümörlerde gösterilmesi erken tanı, tedavi, tümörün relapsı ve metastazı açısından önemlidir. Tümör dokusunda bulunan hücrelerden sadece bir kısmı kök hücre özelliğindedir ve bu hücreler kemoterapi ve diğer tedavi şekillerine dirençlidir. Kanser kök hücreleri ile Piwil2 proteini ilişkisi gösterilerek, tümörün daha kolay tanı alması ve tedavi sonrası nüksün ve metastazın gelişip gelişmeyeceği anlaşılabilir. (2)

Bu çalışmada amaç çocukluk çağı solid tümörlerinde immunohistokimyasal yöntemlerle, Piwil2 ekspresyonunu gösterebilmektir. Böylece literatürde ilk kez çocukluk çağı solid tümörlerinden nöroblastom, Wilm's tümörü, rabdomyosarkom ve germ hücreli tümörler için Piwil2 ekspresyonları belirlenmiş olacaktır. Bu çalışmada çocukluk çağı tümörleri için Piwil2'nin bir kanser kök hücre belirteci olarak kullanılabileceği ve Piwil2 ekspresyonu ile bu tümörlerin klinik ve prognostik özellikleri arasındaki ilişkiler aydınlatılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

Her yıl dünyada 10 milyon yeni kanserli hasta tanımlanmaktadır. Kanserler her yıl 6 milyon insanın ölümüne neden olmaktadır. Dünyadaki tüm ölümlerin %12 si kanser sonucu olmaktadır. Gelişmiş ülkelerde kanserden ölüm kardiyovasküler hastalıklardan sonra en sık ikinci nedeni olarak görülmektedir (7).

Çocuklarda kanser görülme sıklığı 15 yaş altında milyonda 110-150 arasındadır. Ülkemizde 0-14 yaş grubunda her yıl 2,500-3,000 civarında kanser vakasının görülmesi beklenmektedir. Çocuklarda kanser erişkinlere kıyasla daha nadir olup, tüm kanserlerin % 0,5'i 15 yaşından küçüklerde görülmektedir. Bununla birlikte, tedavi başarısının yüksekliği ve çocukların beklenen yaşam süresinin uzunluğu erken ve etkin tedaviyi, yaşam kalitesini, psikososyal yaklaşımı daha da önemli hale getirmektedir (8).

Çocukluk çağı kanserleri içinde lösemi ve lenfomalar en sık görülen kanser tipleridir. Lösemi ve lenfomalardan sonra sırasıyla santral sinir sistemi tümörleri, nöroblastom, yumuşak doku sarkomları, Wilm's tümörü, kemik tümörleri ve germ hücreli tümörler gelmektedir (8).

Ülkemizdeki ve Amerika Birleşik Devletleri'ndeki çocukluk çağı kanserlerinin dağılımı aşağıdaki gibidir.

ABD’de çocukluk çağında görülen kanserlerin sıklık sırasına göre dağılımı şöyledir:

- Lösemiler %30
- Santral sinir sistemi tümörleri %19
- Lenfomalar %13
- Nöroblastom %8
- Yumuşak doku sarkomları %7
- Wilm’s tümörü %6
- Kemik tümörleri %5
- Diğer tümörler %12 (Retinoblastom, Germ hücreli tümörler, Karaciğer kanserleri ve diğer kanserler) (7,10)

Ülkemizdeki dağılım ise tablo 1’de verilmiştir. Lenfomalar ikinci sıklıkta görülmektedir (8).

Tablo 1. Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG)/Türk Pediatrik Hematoloji Derneği (TPHD) Pediatrik Tümör Kayıtları, 2009-2011. Tanı Gruplarının Dağılımı (8)

| | Tümör Tipi | n | % |
|--------|---|----------|----------|
| 1 | Lösemiler, miyeloproliferatif ve miyelodisplastik hastalıklar | 1098 | 27,2 |
| 2 | Lenfomalar | 764 | 18,9 |
| 3 | Santral sinir sistemi tümörleri | 546 | 13,5 |
| 4 | Nöroblastom | 304 | 7,5 |
| 5 | Yumuşak doku sarkomları | 301 | 7,4 |
| 6 | Malign kemik tümörleri | 265 | 6,6 |
| 7 | Germ hücreli tümörler | 233 | 5,8 |
| 8 | Renal tümörler | 215 | 5,3 |
| 9 | Retinoblastom | 140 | 3,5 |
| 10 | Diğer malign epitelyal tümörler ve melanom | 96 | 2,4 |
| 11 | Hepatik Tümörler | 65 | 1,6 |
| 12 | Diğer malign tümörler | 15 | 0,4 |
| Toplam | | 4042 | 100,0 |

2.1. ÇOCUKLUK ÇAĞI SOLİD TÜMÖRLERİ

Bu çalışmada çocuklarda lenfomalar ve beyin tümörleri dışında kalan solid tümörler çalışılmıştır.

2.1.1. Nöroblastom

Nöroblastom adrenal medulla ve sempatik ganglionlarda görülen ve ilkel nöral krest hücrelerinden orijin alan bir tümördür. Diğer tümörlerle karşılaştırıldığında primer tümörün, metastatik hastalığın ve paraneoplastik sendromların farklı klinik presentasyonu olabilir. Spontan regresyonlar (benign hastalığa farklılaşma) ve büyük çocuklarda prognozun kötü seyretmesi, nöroblastomun farklı davranışlarına örnek olarak verilebilir. Tüm çocukluk çağı malignitelerinin %8-10 kadarını oluşturur. Prevalansı 7000 canlı doğumda 1'dir. Onbeş yaş altı çocuklarda yıllık insidansı ortalama milyonda 10'dur. Tanı %36 olguda 1 yaşın altında, %75 olguda 4 yaşın altında, %90 olguda 10 yaşın altında konulur. Erkek/kız oranı 1,2'dir (11,12).

Çevresel faktörlerin etyolojide major rolü gösterilememiştir. Hamilelikte ilaç kullanımı, kimyasallar, virüsler ve radyasyonla güçlü ilişkisi yoktur. Daha çok embriyolojik olarak nöral krest gelişim bozukluğuna bağlı geliştiği düşünülmektedir. Nöroblastomlu hastaların bir bölümünde bu hastalığın gelişiminde bir yatkınlık olduğu ve bu yatkınlıkta kalıtımın otozomal dominant bir yolunun bulunduğu gösterilmiştir. Tüm nöroblastomlu hastaların %22 kadarında germinal mutasyon olduğu düşünülmektedir. Nöroblastomdaki genetik çalışmalarla 16. kromozomun kısa kolunda kalıtsal yatkınlık bölgesi tespit edilmiştir (11).

Nöroblastom sempatoadrenal yolda nöral krest hücrelerinden gelişir. Nöroblastomların kaynaklandığı bölgeler spinal sempatik gangliyon ve adrenal kromaffin hücrelerini içeren sempatik sinir sistemidir. Maturasyon ve diferansiyasyona göre 3 klasik histopatolojik örneği vardır. Nöroblastom malign; ganglionöroblastom heterojen; ganglionörom tam farklılaşmış ve benign grupta yer almaktadır.

N-myc (Nöroblastoma miyelomatosis onkogeni), nöroblastom için kötü prognoz göstergesi olan bir belirteçdir. N-myc ekspresyonunun artışı hücre siklusu progresyonunu ve DNA sentezini artırır. Nöroblastom tedavisinde kullanılan

farmakolojik ajanların n-myc ekspresyonuna etkisi tam olarak açıklanmamıştır. Kullanılan sitotoksik ajanlar bir miktar ekspresyonu azaltasa da amplifikasyon aynı kalmaktadır.

Nöroblastom sempatik sinir sisteminin bir tümörüdür ve sempatik nöral yol boyunca herhangi bir yerde görülebilir. Çoğunlukla primer tümör abdomende görülür (%65) ve en yaygın başvuru semptomu asemptomatik abdominal kitledir. Tümörün adrenal bölgede görülme oranı çocuklarda (%40) bebeklere göre (%25) biraz daha yüksektir. Ayrıca bebeklerde servikal ve torasik primer tümör daha fazla görülmektedir. Yaklaşık %1 hastada primer tümör saptanamayabilir. Tanı anında olguların %75 kadarında metastaz mevcuttur. Metastaz, lenfatik ve hematojen yolla oluşur. Lokalize tümörlü hastaların %35'inde bölgesel lenf nodu metastazı görülebilir. Diğer bölgelere metastaz olmaksızın bu durumun görülmesi iyi prognostur. Hematojen yayılım, sıklıkla kemik iliği, kemik, karaciğer ve deri (subkutan doku), nadiren akciğer ve beyin parankimine olur. Akciğer ve beyin parankimine metastaz genellikle relaps ve son dönem hastalıkta görülür. Klinik bulgular tümörün primer anatomik bölgesi veya metastaz yaptığı bölgeye göre değişmektedir.

Abdominal kitle varlığı, lokalizasyonu ve boyutu, hepatomegali, lenf nodu varlığı, Horner sendromu, ataksi, opsomyoklonus varlığı dikkatli bir şekilde araştırılmalıdır. Görüntüleme yöntemleri düz radyografi, kalsifiye abdominal kitle veya posterior mediastinel kitle varlığının araştırılması amacıyla istenmelidir. Abdominal USG ve komputeze tomografi, abdomen, pelvis, posterior mediasten görüntülemesi için, magnetic rezonans ise paraspinal lezyonların değerlendirilmesi açısından faydalıdır. Meta-iyodobenzilguanidin (MIBG) sintigrafisi; evreleme ve tedavi cevabını değerlendirmede kullanılabilir. İskelet survey ve kemik sintigrafisi kemik metastazını değerlendirmede kullanılabilir. Kemik iliği aspirasyonu ve biyopsisi kemik iliği tutulumunu değerlendirmek için yapılmalıdır (11,15).

Nöroblastom tutulum yerleri ve cerrahisine göre evrelenir. Nöroblastom da evre hastalığın tedavisi ve prognozu ile ilişkilidir.

Evreleme (International Neuroblastoma Staging system-INSS)

Evre 1: Makroskopik olarak tam çıkarılmış lokalize tümör (mikroskopik rezidü olsun veya olmasın)

Evre 2A: Makroskopik olarak tam çıkarılmamış lokalize tümör, aynı taraf lenf nodu tutulumu yoktur.

Evre 2B: Makroskopik olarak tam veya kısmen çıkarılmış lokalize tümörle birlikte aynı taraf lenf nodu tutulmuştur.

Evre 3: Orta hattı geçen ve çıkarılmayan tümör

Evre 4: İskelet sistemi, kemik iliği, yumuşak doku, uzak lenf bezleri gibi uzak organ ve doku tutulumu

Evre 4S: Evre 1 veya 2'deki lokal hastalıkla beraber başka uzak metastaz olmaksızın deri, karaciğer ve/veya kemik iliği tutulumunun olmasıdır (kemik metastazı olmaksızın)(13,14)

Patoloji; Küçük-yuvarlak-mavi hücreli tümörler grubundadır. Bu grupta; Nöroblastom, Ewing sarkomu, non-Hodgkin Lenfoma, Wilm's tümörü ve rabdomyosarkom bulunmaktadır. Küçük, homojen, yuvarlak hücreler arasında nöropil tipiktir. Eosinofilik nöropil çevresindeki nöroblastlar "Homer-Wright pseudorozet"lerini oluşturur. Ganglionöroblastom: Histolojik bulguları nöroblastom ve ganglionörom'un bulgularını birlikte içeren heterojen bir tümördür. Diffuz veya fokal olabilir, fokal ganglionöroblastom daha agresiftir ve nöroblastik komponent MYCN amplifikasyonu taşıyabilir. Ganglionörom: Tamamen diferansiye beniyen tümördür. Matür ganglion hücreleri, nöropil ve Schwann hücreleri tümörü oluşturur. Nöroblastomu çocukluk çağının diğer "küçük, mavi, yuvarlak hücreli tümör"lerinden sadece ışık mikroskobu ile ayırt etmek zordur ve diğer teknikleri gerektirir. İmmunhistokimyasal analiz ile tümör hücreleri sinaptofizin ve NSE (nöron spesifik enolaz) (+) bulunur. Elektron mikroskopik bulguları da tipiktir.

Tedavi; Evre 4S hastalık dışında, tümörün en az %90'nını güvenle çıkartmak mümkünse, tanıda tümör eksizyonu yapılmalı, diğer durumlarda biyopsi ile tanı konulmalıdır. Eğer cerrahi sonrası rezidüel tümör kaldıysa kemoterapi sırasında

izlenmeli ve kemoterapi sonrası kalan rezidüel tümör ikincil cerrahi ile çıkarılmalıdır. Nöroblastomda metastatik hastalık sıklığı yüzünden radyoterapinin (RT) küratif etkisi sınırlıdır. Kabul edilmiş tümör öldürücü doz 15–30 Gy'dir ve bu doz hastanın yaşı, tümörün yerleşim yeri, volümü ve lokalizasyonuna göre değişir. Son yıllarda özellikle geç yan etkileri arttırmadan hastalık kontrolündeki başarıyı arttırmak amacıyla hiperfraksiyone RT artan sıklıkla kullanılmaktadır. Kemoterapi özellikle orta ve yüksek risk grubundaki hastaların ya da düşük risk grubu olup hayati organların tutulumu nedeniyle cerrahi tedavinin uygulanamadığı olgularda temel tedavidir. Kemoterapi protokolleri hastanın risk grubuna göre belirlenmektedir. Son zamanlarda özellikle relaps nöroblastom vakalarında metaiodobenzylguanidine (I-131MIBG) tedavisi uygulanmaktadır. İntravenöz yolla verildikten sonra tümör dokuları tarafından absorbe edilir ve tümör hücreleri öldürülür. Normal dokulara ise seçisi olarak zarar vermemektedir. Kemoterapi ile kıyaslandığında yaşam kalitesine daha az negatif etkisi bulunmaktadır (14). Evre 4 vakalarda kemik iliği nakli bu hastaların prognozlarını artırmaktadır. Bununla birlikte nöroblastomlarda tedaviye cevap özellikle ileri vakalarda iyi değildir ve prgonoz kötüdür. Bu nedenle yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç vardır.

2.1.2. Wilm's Tümörü

Çocukluk çağında görülen primer böbrek tümörleri, Wilm's (nefroblastoma), şeffaf hücreli sarkom (clear cell sarkom), böbreğin rabdoid tümörü, konjenital mezoblastik nefroma, renal hücreli sarkom ve renal meduller karsinomlardır. Wilm's tümörü çocukluk çağında en sık görülen böbrek tümörü olup, Wilm's dışı primer böbrek tümörleri ise tüm böbrek tümörlerinin %10'dan azını oluşturur. Wilm's tümörü multidisipliner yaklaşımla büyük oranda başarı ile tedavi edilebilen çocukluk çağı kanserlerinden birisidir. Geçmişte yalnızca cerrahi ile tedavi edilen hastalarda % 8'lerde olan yaşam oranları günümüzde %90'ın üzerine çıkmıştır. Pek çok pediatrik tümörde olduğu gibi Wilm's tümöründe de yaşam oranlarındaki bu artış özellikle etkin kemoterapi kombinasyonlarının kullanılması, uygun destekleyici tedaviler, cerrahi ve radyoterapi tekniklerindeki ilerlemelerin birlikteliği ile elde edilmiştir. Wilm's tümörü tedavisi çocuk onkolojisi alanında önemli bir başarıya sahip olmakla birlikte günümüzde birden fazla ülkede çok merkezli çalışma grupları halen tedavi protokolleri üzerinde çalışmakta ve yüksek kür oranlarının korunması ve artırılması yanında, yaşam

süresi uzayan hastalarda ortaya çıkan tedaviye bağlı geç yan etkilerinin azaltılmasına çalışılmaktadır (16,17).

Wilm's tümörü tüm çocukluk çağı malign tümörleri içinde yaklaşık %6 sıklıkla görülür. Vakaların % 98'i 7 yaş altında olup hastalık en sık 3-4 yaşta ortaya çıkar. Tek taraflı ve iki taraflı tümör varlığı farklı epidemiyolojik özelliklere sahiptir. Tek taraflı hastalığa göre iki taraflı hastalık daha erken yaşlarda ortaya çıkar. Türk Pediatrik Onkoloji Grubu'nun (TPOG) Ulusal Wilm's tümörü çalışmasına dahil olan 16 yaş altındaki 131 hastanın incelenmesinde ortanca yaş 3 yıl bulunmuştur. Araştırmalarda çevresel risk faktörleri ile Wilm's tümörü gelişmesi arasında doğumdan önce veya doğumdan sonra bir ilişki gösterilememiştir (16). Genetik ve herediter risk faktörleri bazı hastalıkların gelişmesinde rol alabilmektedir. Wilm's tümürlü çocukların % 1-2'sinde bir veya daha çok yakınında aynı kanserler görülebilir. Bu çocuklar aileden gelen bir anormal genden dolayı Wilm's tümör gelişme riski taşıyabilirler. Wilm's tümörü ile doğum anomalileri arasında güçlü bir ilişki vardır. Wilm's tümürlü hastaların yaklaşık %10'unu doğumsal anomalilere sahiptir. Bunlar aniridi, hemihipertrofi veya hızlı büyüme sendromları ve genitoüriner anomalilerdir. Hastaların % 0,5'inde at nalı böbrek anomalisi de görülebilir. Hipospadias, kriptorşidizm ve renal füzyon anomalileri Wilm's tümörü ile birliktelikleri % 4,5 oranında görülen genitoüriner anomalilerdir. Kriptorşidizm ve Wilm's tümörü olan hastaların dörtte birinde WT1 gen mutasyonu vardır. Hemihipertrofi hastalarda Wilm's tümörü gelişme riski %3-5 arasındadır. Anomalisi olan çocukların ilk 6 yıl 3 ayda bir, daha sonra vücut gelişimi tamamlanana dek yılda bir abdominal ultrasonografi ile izlenmesi önerilir. Bu yöntemle gelişebilecek bir tümörün erken evrede tanı alması mümkün olacaktır (16,17).

Hastaların çoğu rutin doktor muayenesi sırasında, banyo yaptırılırken veya giydirilirken tesadüfen farkedilen kitle veya karın şişliği ile getirilir. Karın ağrısı, makroskobik hematüri, yüksek ateş, kabızlık veya kilo kaybı eşlik eden diğer bulgulardır. Fizik incelemede karındaki kitlenin yerleşimi ve büyüklüğüne dikkat edilmelidir. Genellikle karında solunumla hareket etmeyen, ağrısız, büyük kitle palpe edilir. Fizik incelemede splenomegali veya nöroblastom ile karışabileceği unutulmamalıdır. Solunumla hareket etmemesi Wilm's tümörünün ayırt edici bir özelliğidir. Renin aktivitesinde artışa bağlı olarak yaklaşık %25 hastada hipertansiyon olabilir (18).

Radyolojik inceleme karşı böbreğin durumu, inferior vena kava ve kalpte trombüs olup olmadığının ve akciğerlerde metastazın gösterilmesi amacıyla planlanmalıdır. İlk tercih edilen radyolojik inceleme genellikle abdominal ultrasonografi olup kitlenin kökeni, boyutları kistik-solid özellikleri, doppler USG ise renal ven ve inferior vena kava gibi büyük damarların durumu ve kan akımı hakkında bilgi verir. Kontrast kullanılarak yapılan abdominal bilgisayarlı tomografi (BT), USG ile edinilen bilgilere ek olarak böbreklerin fonksiyonu, içerdikleri küçük lezyonlar, kitle uzanımı ve komşu yapılar ile ilgili daha ayrıntılı bilgi verir. Inferior vena kavanın açıklığı mutlaka değerlendirilmelidir (18).

Tedavi; Hastalığın evresi ve tümörün histopatolojisi iki ana risk faktörüdür. Tüm çalışmalarda tedavide amaç en yüksek yaşam oranları yanında en düşük morbiditeye neden olacak tedavi yaklaşımlarının uygulanmasıdır. Wilm's tümörlü hastaların yaşam oranlarında ulusal ve uluslararası çalışmalarla önemli ilerlemeler olmuştur. Bu alanda "(NWTS)", önce primer nefrektomi, ardından adjuvan kemoterapi ve radyoterapi verilmesini önerirken, "International Society of Pediatric Oncology (SIOP)" grubu preoperatif kemoterapi verilmesini, daha sonra nefrektomi yapılarak postoperatif histolojik tanı ve evrelendirme ile kemoterapinin planlanmasını önerir. Preoperatif tedavi ile düşük riskli hastalarda cerrahi sırasında tümör rüptürü olasılığı düşürülerek morbiditenin azaldığı ve sağ kalım oranının düşük olduğu bildirilmektedir (19).

Evreleme; Hastalığın evresi doğrudan yaşam ile ilişkili olduğundan doğru evreleme hastanın doğru tedavi planı için çok önemlidir. Bu nedenle evreleme çalışmaları, klinik ve radyolojik bulgular, cerrahi bulgular ve histopatolojinin birlikte değerlendirilmesi ile çabuk ve doğru yapılmalıdır. Tümörün zedelenmeden cerrahi sınırlar negatif olacak şekilde tam çıkartılması çok önemlidir. Hastalığın kesin evrelendirmesi cerrahi sonrasında belirlenen anatomik tümör yayılımına göre yapılır.

Wilm's tümöründe "(NWTS)", ye göre evreleme kriterleri aşağıda verilmiştir (20).

Evre I: Böbrekte sınırlı, tümör tam çıkmış (cerrahi sınırlar negatif), renal kapsül veya sinüs damarlarında tutulum yok (intrarenal damar tutulum olabilir)

Evre II: Böbrek dışına çıkmış, renal kapsülü ve/veya perirenal yağ dokusunu penetre etmiş veya renal parankim dışındaki renal sinüs damarlarına invazyon yapmış ama tam rezeksiyon yapılmış (cerrahi sınır ve lenf nodu negatif)

Evre III: Ameliyat sonrası gözle görülür veya mikroskopik tümör var (vital yapılara infiltrasyon nedeniyle tam rezeksiyon yapılamamış, cerrahi sınırdaki tümör var, intraabdominal veya pelvik lenf nodu metastazı var, operasyon öncesinde veya sırasında tümör peritona yayılmış veya tümör trombusu parçalanmış olabilir.

Evre IV: Hematojen metastaz (genellikle akciğer) veya karın ve pelvis dışında lenf nodu metastazı

Evre V: Tanı anında her iki böbrekte Wilm's tümörü (her iki böbrek yukarıdaki kriterlere göre ayrı ayrı evrelenir)(20)

Patoloji; Wilm's tümörü primitif metanefrik blastemin gelişimindeki bozukluklar sonucunda ortaya çıkan embriyonal bir neoplazmdir. Çoğunlukla soliter tek lezyon şeklinde görülen Wilm's tümörü %6 iki taraflı, %12 oranında ise tek böbrekte birden fazla odaklı olabilir. Wilm's tümörü çok nadir olarak böbrek dışında genellikle retroperitoneal olarak da yerleşim gösterebilir. Wilm's tümörü blastemal, stromal ve epitelyal komponentleri olan embriyonal ve trifazik özellikte olup bu alt grupların her biri farklı histolojik yapı ve farklılaşma özellikleri gösterebilir. Hakim olan hücre tipine göre de histopatolojik alt grup tanımlanır. Histopatolojik alt tiplerin tanımlanmasının klinik seyir ve prognoz bakımından önemi vardır. Wilm's tümörü histopatolojik değerlendirmede anaplazinin varolup olmamasına göre iyi (favorable) ve kötü (unfavorable) histolojili olarak iki grupta tanımlanır. Anaplazi varlığı tümörün 'kötü histolojili' olduğunu gösterir. Anaplazi %5 oranında görülür, sıklığı yaşla birlikte artar. Küçük bebeklerde nadiren görülürken 5 yaş üstünde sıklık%10'a yükselir (21).

Tedavi Sonuçları ve Prognostik Faktörler; Günümüzde çok merkezli çalışmalarda Wilm's tümöründe tüm hastalarda genel yaşam hızları %90'ın üzerinde bildirilmektedir. Evre 4 hastalarda bile yaşam oranları % 80 ve üzerinde olup tanı anında metastatik hastalığı olan hastalarda yaşam % 80 ve bilateral hastalıkta ise %73 olarak bildirilmektedir. Yüksek riskli hastalarda ve tekrarlayan hastalık sonrasında ise yaşam oranları %50'ye düşmektedir. Tedavi yöntemlerinin çok etkili olması sonucunda

prognostik göstergelerde değişkenlikler olsa da tümörün evresi ve büyüklüğü, histopatolojik özellikler (anaplazi varlığı), lenf nodu metastazı ve çevre yapılarına invazyon durumu prognostik parametreler olmakla birlikte en önemli prognostik göstergeler evre ve anaplazi varlığıdır. Tanı anında 2 yaş altında olan vakalarda prognozun daha iyi olduğu bildirilmişse de etkin tedaviler ile son yıllarda hasta yaşının önemi azalmıştır. Günümüzde yeni biyolojik prognostik göstergeler üzerinde çalışmalar artmış olup 16q ve 1p'deki heterozigosite kaybının ve ayrıca anöploidide varlığının kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (21).

2.1.3. Sarkomlar

Bu grup içerisinde yumuşak doku ve kemik kaynaklı sarkomlar incelenmiştir.

Rabdomiyosarkom;

Yumuşak doku sarkomları, primitif mezenkimden kaynaklanan çizgili veya düz kas, sinir, yağ, damarsal dokular ve diğer destek dokulara farklılaşma potansiyeli gösteren heterojen bir grup malign hastalıktır. Yumuşak doku sarkomları tüm çocukluk çağ kanserlerinin %8-10'unu oluşturur. Rabdomiyosarkom çocuklarda en sık görülen yumuşak doku sarkomudur ve çocukluk çağı yumuşak doku sarkomlarının yarıdan fazlasını oluşturur. Rabdomiyosarkom çocukluk çağı malignitelerinin %5-8'ini oluşturur. Ortanca görülme yaşı 5 yaştır; 2-6 ve 15-19 yaş arasında iki pik yaparlar. Erkeklerde, kız çocuklardan biraz daha fazla görülür (22).

Tümörün yerleşim yerine göre farklı belirti ve bulgular görülür. En sık bulgu çoğunlukla ağrısız olan şişliktir (22,23).

Rabdomiyosarkom vücudun herhangi bir bölgesinde ortaya çıkabilir. Sıklık sırasına göre primer yerleşim bölgeleri baş boyun (orbita, paramenengeal, orbita ve paramenengeal dışı baş boyun), genitoüriner bölgeler (erkeklerde paratestiküler, mesane, prostat, kızlarda vajen, uterus ve diğer) ve ekstremitelerde sayılabilir (22,23).

Patoloji; Rabdomiyosarkom embriyonal mezenkimden kaynaklanan ve çizgili kasa farklılaşma potansiyeli gösteren malign bir tümördür. Ancak çizgili kas olmayan yerlerde de görülür. Horn ve Enterline'a göre histolojik alt gruplar şöyledir:

1. Embriyonal
2. Botrioid (embriyonalin alt tipidir)
3. Alveolar
4. Pleomorfik

Tedavi; Çocukluk çağının en sık görülen yumuşak doku tümörü olan rabdomiyosarkomlarda cerrahi ve/veya radyoterapiden oluşan lokal tedaviye, sistemik kemoterapinin eklenmesi ile sağkalım % 20'lerden % 70'lere çıkmıştır. Tümörün yerleşim yeri, evresi, histopatolojik alt tipi ve hastanın yaşı dikkate alınarak cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi uygulanır (24).

Osteosarkom

Osteosarkom ve Ewing ailesi tümörleri ile çocukluk çağı kemik kanserlerinin %6'sını oluşturur. Ülkemizde 15 yaş altında her yıl yaklaşık 150 yeni osteosarkom olgusu beklenmektedir. Pediatrik onkolojideki tüm gelişmelere karşın, osteosarkomdaki sağ kalım hızlarında son 10 yılda belirgin değişiklik yoktur (25).

Ergenlik döneminde görülme sıklığı doruğa ulaşan bu tümör, iskelet büyümesinin hızlı olduğu yaşlarda siktir. Dolayısıyla ergenlik öncesi osteosarkom olguları daha az beklenmektedir. Hastalar genelde erkek çocuklar olup uzun boyludurlar (25).

Hastalar ortalama 3 aylık belirti ve bulgularla doktora başvururlar. En sık olarak ağrı (%90), kemikte şişlik (%50), hareket kısıtlılığı (%45) ve patolojik kırık (%8) görülür. Bazen uzun kemiklerin hızlı büyümesi ve eklem efüzyonu nedeniyle eklem şişliği de görülebilir. En önemli tutulan alanlar yük binen eklem yakın tübüler kemiklerin metafizleridir: Femur distali (%50), tibia proksimali (%25) ve humerus proksimali (%10), fibula proksimali (%5) ve çene sık tutulan bölgelerdir. Nadiren diafizlerden de tümör başlayabilir. Osteosarkomda genel olarak başka metastaz odakları aranmaz. Hastalık metastazı neredeyse akciğerle özdeşleşmiştir ve ileride rekürensler buradan olur (25).

Patoloji; Osteosarkom, osteoid üreten bir tümördür. Anaplastik stromal hücrelerin ve onların ürettiği osteoid üretiminin gösterilmesi tanı koydurucudur (25).

Tedavi; Osteosarkom tedavisinde cerrahi ve kemoterapi çok önemlidir. İkisi de mutlaka yapılmak zorundadır. Parosteal ve periosteal tümörlerde bazen cerrahi yeterli olabilir. Günümüzde izlenen sıra önce kemoterapi (neoadjuvan veya pre-operatif), cerrahi ve sonra tekrar kemoterapi şeklindedir (adjuvan veya post-operatif). Osteosarkomda radyoterapinin sağaltıcı özelliği yoktur. Olabilmesi için 80 Gy ve üzeri dozlar gerekir ki, bu da olası değildir (26).

Ewing sarkom

Ewing sarkomu, osteosarkomdan sonra en sık karşılaşılan primer malign kemik tümörüdür. Hastaların %75'i, tanı sırasında ilk iki dekatta ve ortalama 13 yaşında olup nadiren 30 yaşın üzerindedir. Ewing sarkomu her kemiği tutabilir. Kemiğin meduller kanalından çıkan bir tümördür. Yapılan araştırmalar tümörlerin %53'ünün ekstremitelerden, %47'sinin ise santral aksisten kaynaklandığını, ekstremitte tümörlerinin %52'sinin distal %48'inin proksimal olduğunu, santral aksis tümörlerinin %45'inin pelvisten, %34'ünün göğüs duvarından, %12'sinin omurga veya paravertebral bölgeden, %9'unun baş boyun bölgesinden çıktığını göstermiştir. Genetik altyapı olarak neredeyse tüm küçük yuvarlak mavi hücreli tümörlerde 22q12 bölgesindeki EWS genini ilgilendiren resiprokal bir translokasyon vardır (27,28).

Ağrı ve şişlik en sık rastlanılan semptomdur. Ağrı başlangıçta aralıktır ancak zamanla ciddi ve sürekli bir hal almaya başlar (29).

Primer tümörün yerini ve büyüklüğünü tayin edebilmek optimal lokal tedavinin planlanması ve uygulanabilmesi açısından çok önemlidir. Bu amaçla hastalığın evreleme incelemeleri olarak düz grafiler, primer bölgenin MR görüntülemesi, akciğer BT'si ve kemik sintigrafilerinin yapılması gerekmektedir (29).

Patoloji; Ewing sarkomu, klasik olarak; geniş tabakalar, büyük yuvalar oluşturan, üniform, ufak, hücre sınırları belirsiz, dar soluk sitoplazmalı, poligonal hücrelerden oluşur (30).

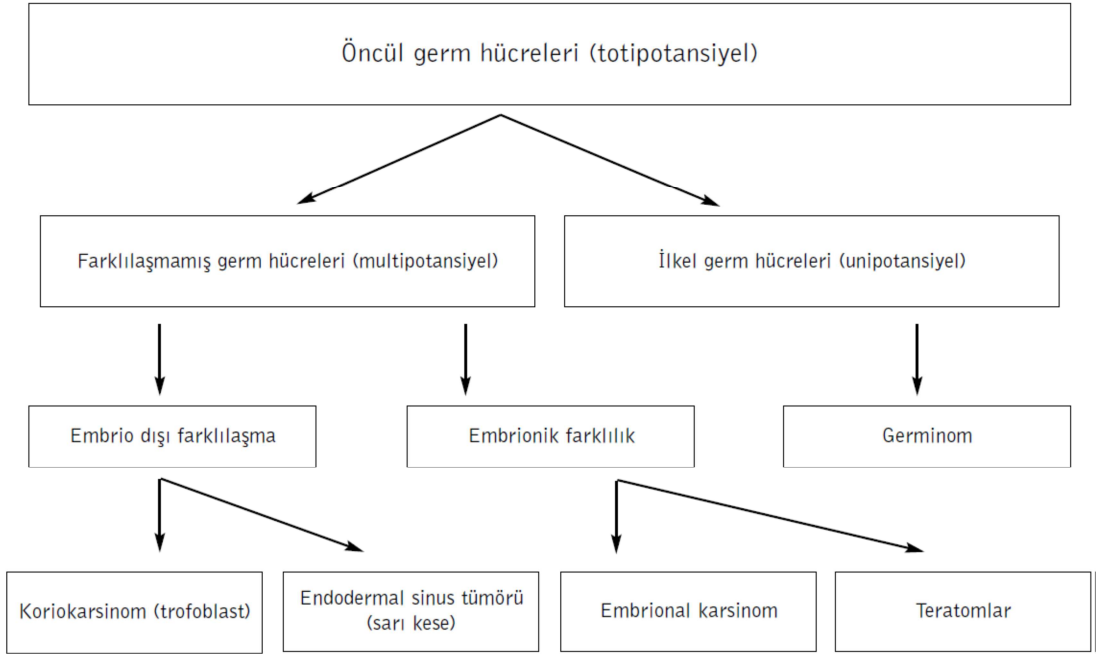
Tedavi; Tedavi protokolü, genellikle lokal ve sistemik kontrollerin ışığında belirlenir. Sistemik kemoterapi, mikroskopik ve makroskopik metastazlara etkili olmanın yanında, lokal tümör volümünü azaltmada da etkilidir. Tümör volümünün azalması, radyoterapi

ile lokal kontrol şansını arttırır ve cerrahi rezeksiyonu kolaylaştırır. Lokal hastalığı cerrahi veya radyoterapi ile kontrol altına alınan olguların, %90'dan fazlası metastatik hastalık nedeni ile ölür. Lokal radyoterapi genellikle amputasyona tercih edilir, çünkü; hastanın kalan hayatında ekstremitte fonksiyonları korunmuş olur. Radyoterapi ile primer tümörün lokal kontrolü, %50–77 oranında sağlanır. Etkili çoklu kemoterapinin devreye girmesiyle, hem mikroskopik metastazların hem de radyoterapi sonrası primer tümörün lokal kontrolünde gelişme sağlanmıştır. Buna bağlı olarak da hastaların toplam yaşam süreleri uzamıştır (31,32,33).

2.1.4. Germ Hücreli Tümörler

Germ hücreli tümörler (GHT) çocukluk çağı tümörlerinin %2-3'ünü oluşturmaktadır. En sık üç yaş altı ve 12 yaş üstünde görülür. Kız erkek oranı genel olarak eşit olmakla beraber yaşa, tümörün lokalizasyonuna ve histolojik tipine göre değişkenlik gösterir. Germ hücreli tümörler öncül (primordial) germ hücrelerinden köken alır. Öncül germ hücreleri çeşitli embrionik ve embrio dışı (stromal) yapılara farklılaşma kapasitesine sahip ("totipotent") hücreler olup, normalde sperm ve ovumu oluşturmaya yönelmiştir. Öncül germ hücreleri ilk kez embriyonun 4. haftasında sarı kesede ortaya çıkar ve arka barsak çevresinden dolaşarak ileride gonadları oluşturacak olan genital kabartıya göç eder. Bu hareket germ hücreleri üzerindeki c-kit reseptörü ve onun bağlayıcısı kök hücre faktörü ("steel faktör") sayesinde gerçekleşir (34).

Tümörün köken aldığı primordial germ hücrelerinin gelişim evresine göre ve embrionik veya embrio dışı dokulara farklılaşma kapasitesine göre farklı germ hücreli tümörler oluşur (Şekil1).



Şekil 1. Germ hücreli tümörlerin sınıflaması(36)

Embriyonik farklılaşma kapasitesine sahip hücrelerden embriyal karsinom ve teratomlar, embrio dışı yapılara farklılaşma kapasitesine sahip hücrelerden koriokarsinom ve endodermal sinüs tümörü, farklılaşma kapasitesine sahip olmayan ilkel germ hücrelerinden ise germinomlar meydana gelir (35).

Teratomlar

Teratom over ve ekstraponadal bölgelerde en sık görülen germ hücreli tümörlerdir. Yaklaşık 1/3'ü sakrokoksigeal bölgede görülür. Üç germ yaprağına (endoderm, ektoderm, mezoderm) ait dokuları içeren bir tümördür. Tümör dokusunda cilt ve ekleri, yağ dokusu, beyin, kemik, kıkırdak, diş, intestinal epitel, intestinal bez yapıları izlenebilir. Bazı dokular ise sadece belli bölgelere özgün olarak görülür. Örneğin hematopoetik, pankreatik ve pitüiter dokular mediastinal teratomlarda görülebilirken diğer bölgelerde oldukça nadirdir. Tümördeki komponentler biyolojik olarak aktif olup enzim, hormon aktivitesi gösterebilir. Gonadal teratomlar kapsüllü olup gonad dışındakilerde kapsül aşıkardır. Teratomlar makroskopik olarak solid ve kistik alanlar içerebilir. Tümör tamamen matür dokuları içeriyorsa “matür teratom”, beraberinde özellikle nöroepitelium omak üzere inmatür dokular da varsa “inmatür teratom” şeklinde ifade edilmektedir. İmmatür teratomlar, inmatür dokunun miktarına göre 1’den 3’e kadar derecelendirilir. Over teratomlarında peritonda ve/veya lenf

nodlarında matür glial elementlerden oluşan nodüller bulunabilir. Bu durum “gliomatozis peritonei” olarak adlandırılır (35).

Tümörün evresini ve prognozu etkilemez Teratomlarda öncelikle endodermal sinus tümörü olmak üzere malign germ hücre elementleri bulunabilir. Bu taktirde “malign teratom” olarak adlandırılmaktadır. Tanıda serumdaki tümör belirleyicilerinin yüksek olması faydalı olabilir. Dört yaş üstündeki teratomların %50’ sinde malign komponentlerin mevcut olduğu saptanmıştır. Bazen endodermal sinus tümörü komponenti çok küçük olabildiğinden ve alfafetoprotein (AFP) ile boyanmayabildiğinden kolaylıkla gözden kaçabilmektedir (35).

Embriyonel Karsinom; Çocuklarda nadiren saf formda görülür. Genellikle mikst germ hücreli tümörün komponenti olarak bulunur. Testiküler veya over kaynaklı olabilir. Hastaların %60’ında HCG ve AFP yüksekliği mevcuttur (36,37).

Endodermal Sinüs Tümörü; Küçük çocukta en sık görülen malign germ hücreli tümörlerdir. Gonadal ve gonad dışı yerleşimli olabilir. Adölesanda gonad dışı bölgelerde saf olarak bulunması nadirdir, ancak mikst tipin komponenti olarak bulunabilir. Dört patolojik tipi olup psödopapiller tip ve retiküler tip çocukta en sık görülenleridir. Küçük, undiferansiye embrional hücreler ve yıldız şeklinde mezodermal hücrelerden oluşan bir tümördür. Santral yerleşimli küçük kan damarları ve onu kuşatan iki sıra tümör hücrelerinden oluşan “SchullerDuvall” cisimcikleri tipiktir. Yassı hücrelerle kaplı küçük kaviteler oluşturan kistik yapılar bulunabilir. Tümör hücrelerinin sitoplazmasında ve hücre dışında, PAS, eozinofilik globüllerde AFP pozitifliği saptanabilir. Serum AFP düzeyi genellikle yüksektir. Fakat AFP seviyesi ile prognoz arasında ilişki yoktur (36,37).

Germ Hücreli Tümörlerde Klinik Özellikler

Koryokarsinom; Gestasyonel trofoblastik hastalığın alt tipidir. Vajinal kanama ve ağrı şeklinde bulgular verir. Hastalarda serum Beta HCG düzeyi artmıştır. Hızlı büyümesine rağmen kemoterapiye oldukça iyi cevap verir. Prognozu iyidir nadiren histerektomi gerekir.(36)

Disgerminom; Overler ve santral sinir sisteminde en sık görülen germ hücreli tümörlerdir. Testiste ve nadiren mediastende de görülür. Overdeki disgerminom, testisteki seminom olarak adlandırılır. Seminom asıl olarak genç erişkin yaşta görülmekle birlikte özellikle inmemiş testisle birlikte çocuklarda da görülebilmektedir. Germinom kapsüllü bir tümördür. Fibröz doku bantlarıyla ayrılmış kümeler halinde tümör hücreleri ve değişken miktarda lenfositler izlenir. Tümör içinde dev hücre içeren granülomlar görülebilir. İmmunhistokimyasal olarak plasental alkalen fosfataz (PLAP) ve c-kit ile kuvvetle pozitif boyanır. Tümörde insan korionik gonadotropinin, alt ünitesi Beta HCG ile pozitif boyanan sinsityotrofofoblast benzeri dev hücreler bulunabilir, ancak bu prognozu değiştirmez. Tümörde sitotrofoblastların bulunduğu embrional karsinom adacıklarına rastlanabilir. Bu durumda prognoz daha kötüdür (38).

Klinik özellikler patolojinin yanı sıra tümörün lokalizasyonuna, evresine ve hastanın yaşına bağlı olarak değişmektedir. Kız/erkek oranı genel olarak 1.1/1'dir. Germ hücreli tümörler gonadlarda (testis, over), ekstraponadal bölgelerde (sakrokoksigeal bölge, mediasten, pelvis, pineal bölge) görülebilmektedir. En sık sakrokoksigeal bölgede (%42), ikinci olarak da overlerde (%24) lokalizedir. Diğer vakaların %9'u testiste, %7'i mediastende, %4'ü retroperitonda, %6'i santral sinir sisteminde ve %8'i diğer gonad dışı bölgelerde görülür. Yaş dağılımı tümörün patolojisine göre farklılık göstermektedir. Median yaş germinom için 12 koriokarsinom için 11, embrional karsinom için 8, endodermal sinus tümörü için 2 yaş, teratomlar için 5 aydır. Tümörün lokalizasyonuna göre de görülme yaşı değişmektedir. Sakrokoksigeal teratomlar en sık yenidoğan döneminde görülürken overian teratomlar 6-14 yaşlarda tanı almaktadır. Endodermal sinus tümörü testiste 2 yaş altında görülürken, overlerde 14-18 yaşlarda daha sık tanı almaktadır. Germ hücreli tümörler en sık lenf nodları (bölgesel, paraaortik, prerenal ve supradiagfragmatik) ve peritoneal yüzey olmak üzere akciğer, karaciğer, kemik, kemik iliği ve santral sinir sistemine metastaz yapabilirler (37,38).

Tedavi; Teratom gibi benign tümörlerin tedavisinde sadece cerrahi eksizyon yeterlidir. Sakrokoksigeal bölgede koksiksin de eksizyonu gereklidir. Koksiks eksize edilmez ise nüks oranı %37'e yükselmektedir. Matür lezyonlarda sağ kalım oranları %95'e ulaşmaktadır. Bu hastaların dikkatli monitorizasyonu gerekir. Çünkü rezidü dokunun nüksü malign transformasyon gösterebilir veya patolojik olarak fark edilmeyen malign odaklar nedeniyle nüks görülebilir (38).

2.2. KÖK HÜCRE BİYOLOJİSİ

Kök hücreler vücudumuzda bütün doku ve organları oluşturan ana hücrelerdir. Henüz farklılaşmamış olan bu hücrelerin kendilerine özgü üç önemli özelliği vardır. Bunlar; sınırsız bölünebilme, kendini yenileme, organ ve dokulara dönüşebilme yeteneğidir. Kök hücreler, diğer vücut hücrelerimiz gibi rutin işlevlere sahip olmadığı için gerekli koşullar sağlandığında istenilen hücre tipine dönüşebilmektedir. Yaklaşık 50 yıllık bir geçmişe sahip olan kök hücre araştırmalarında oldukça yol kat edilmiş ve büyük gelişmeler yaşanmıştır.

Yeteneklerine göre üç tip kök hücre bulunmaktadır. Bunlar Totipotent, pluripotent ve multipotent kök hücrelerdir. Kök hücrelerin bu şekilde sınıflandırılmasının nedeni kök hücrelerin farklılaşma yetilerinin birbirinden farklı olmasıdır. Totipotent kök hücre tek başına bir organizmayı oluşturacak güce sahipken, pluripotent kök hücre bilinen tüm hücre tiplerine dönüşebilmekte ancak bir organizmayı oluşturamamaktadır. Multipotent kök hücre ise bulunduğu doku ve organdaki hücre tiplerine dönüşebilmesine karşın diğer hücre tiplerine dönüşememektedir (39).

2.3. KÖK HÜCRENİN TARİHÇESİ

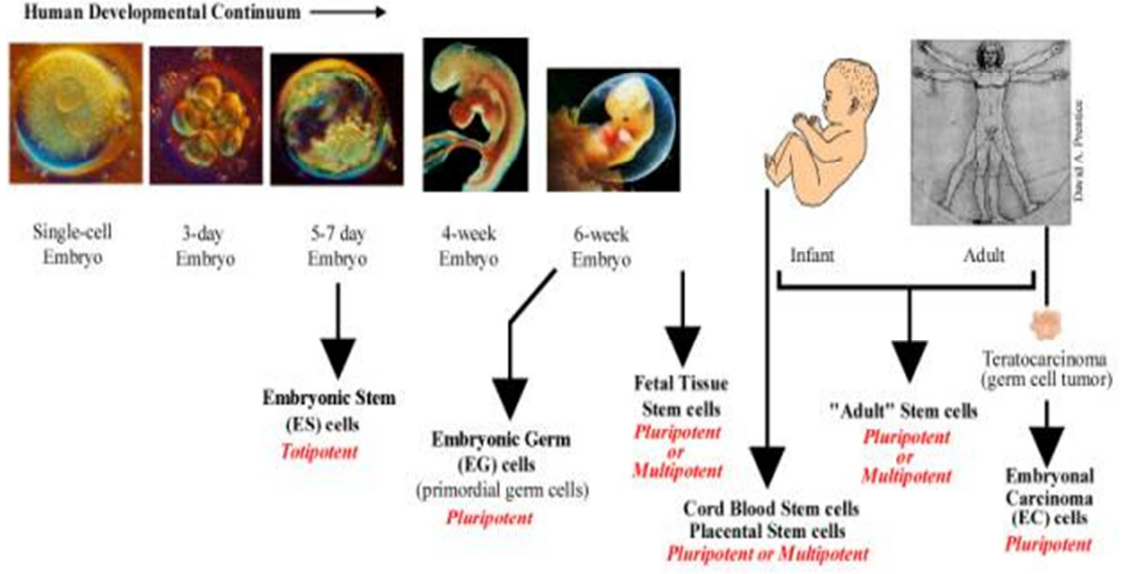
İnsanoğlunun kök hücreler ile tanışıklığı 1960'lı yıllara kadar uzanmaktadır. O yıllarda kemik iliğimizde bulunan bir grup hücrenin kan sistemini oluşturan hücreleri yaptığının belirlenmesiyle, "kök hücre" terimi tıp terminolojisine girdi. Kemik iliğindeki bu hücrelerin tüm kan sistemi hücrelerini oluşturma yeteneğinden oldukça yararlandı. Başta lösemiler olmak üzere birçok genetik kan hastalığının tedavisinde, kemik iliğinin sağlıklı bireylerden hastalara nakliyle başarılı sonuçlar elde edildi. Bu yöntem kemik iliği nakli olarak başarı ile uygulanmaktadır. İlerleyen yıllarda vücutta dolaşan periferik kandaki kök hücrelerin kullanılabileceği anlaşılmıştır. Bunun için önce hastaya büyüme faktörü verilerek kemik iliğindeki kök hücrelerin hızla çoğalıp kana geçmesi sağlanır. Daha sonra, filtre (aferez) yardımıyla kandan toplanır ve kalan kan vücuda geri verilir. Bu yöntem de periferik kök hücre nakli olarak uygulanmaktadır. 80'li yılların başında, yeni doğan bebeklerin kordon kanında da kök hücrelerin bol miktarda bulunduğu ve bu hücrelerin tedavide kullanılabileceği fikri ortaya atılmıştır. Elde edilen kordon kanı belirli koşullar altında toplanıp dondurularak saklanabilmekte, daha sonra gerek duyulduğunda çözülerek kullanılmaktadır. İlk olarak Dr. David Harris, 1992 yılında

oğlunun kordon kanını kendi laboratuvarında dondurarak sakladı. Daha sonra bu uygulamanın halka açması ile 1994 yılında dünyadaki ilk Kordon Kanı Bankası Amerika Birleşik Devletleri'nde kuruldu (40,41).

2.3.1. Totipotent Kök Hücreler

1998 yılında ABD’li bilim adamı James Thomson ve ekibi, ilk defa “insan embriyonik kök hücrelerini” laboratuvarında embriyondan ayrıştırdılar ve çoğalttılar.(40) Bu oldukça önemli bir gelişmeydi, çünkü bu hücrelerin çoğalma ve farklılaşma potansiyelleri erişkin bir insandan elde edilen kök hücrelere (kemik iliği kök hücreleri gibi) oranla çok daha fazlaydı. Thomson ve ekibi, insan embriyonik kök hücrelerini kısırlık tedavisi amacıyla yapay dölleme ya da tüp bebek yöntemiyle laboratuvar koşullarında elde edilen embriyonlardan ayrıştırdılar. Bu hücreleri uzun zaman dilimleri boyunca laboratuvarında çoğalttılar ve farklı uyarımlarla değişik vücut hücrelerine dönüşümlerini gerçekleştirdiler. Sonraki birçok çalışmayla, bu hücrelerin vücudumuzdaki hemen tüm hücre çeşitlerine dönüştürebileceği saptandı (40,41).

Embriyonik kök hücreler, tam olarak fonksiyonel bir organizmanın gelişimini sağlayabilen hücrelerdir. Ayrıca memelilerde bir totipotent kök hücre, yani fertilize olmuş bir oosit, yaklaşık 200 özelleşmiş somatik hücre tipini içeren karmaşık bir organizmayı oluşturabilme yeteneğine sahiptir. Erkeğin spermi ile kadının yumurtası birleştiğinde yani dölleme meydana geldiğinde oluşan hücre (zigot) tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye ve güce sahiptir. Bu hücrelere herşeyi yapabilen anlamına gelen totipotent hücre denir (Şekil2).



Şekil 2. Kök Hücre Çeşitleri (15)

Ancak hücrenin totipotent olma özelliği döllenmeden sonraki 5. güne kadar devam eder. Bu da blastula evresine denk gelir. Beşinci günden yani blastula evresinden itibaren hücre bütün organizmayı oluşturabilecek gücünü kaybeder (41,42).

2.3.2. Pluripotent Kök Hücreler

Döllenmeden sonraki 5. günden itibaren meydana gelen hücreler **blastosist** denilen küresel bir şekil alır. Bu kürenin içindeki hücreler vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip olmalarına rağmen, artık tek başlarına tüm organizmayı oluşturacak güce sahip değildirler. İşte bu tür hücrelere pluripotent hücreler denir. (Şekil2) Bu hücreler bilinen yaklaşık 200 hücre çeşidine dönüşebilme yeteneğine sahiptir (41,42).

2.3.3. Multipotent Kök Hücre

Anne karnındaki organizmanın sonraki gelişim aşamalarında hücreler biraz daha özel görevlere sahip olurlar ve erişkin kök hücrelerine dönüşürler. Hematopoetik kök hücreleri, kemik iliğinde bulunur ve gerektiğinde lökositler, eritrositler veya trombositlere dönüşebilirler. Yani hücreler gelişim aşamaları ilerledikçe farklılaşma özelliklerini de yavaş yavaş kaybederler. Sonuçta multipotent hücreler sadece buldukları doku ve organlardaki hücre tiplerine dönüşebilirler. (Şekil2) Burada

zamanın etkisiyle farklılaşma özelliklerinde çıkan hiyerarşik bir sıralamadan söz edilir (43,44).

2.4. ELDE EDİLDİKLERİ KAYNAKLARA GÖRE KÖK HÜCRELER

2.4.1. Embriyonik Kök Hücreler

İnsanı oluşturan ilk hücre, babadan gelen sperm ile anneden gelen yumurtanın birleşmesiyle meydana gelir. Bu ilk hücreye yani döllenmiş yumurtaya “zigot” denir. Daha sonra bu hücre bölünüp 2, 4, 8 hücre oluşturularak her 36 saatte bir sayısını ikiye katlar. İlk dört gün içerisindeki hücrelerin her biri tek başlarına bir insan oluşturabilecek potansiyele sahiptir. Blastosist adı verilen bu hücre kümesinden alınan hücrelerin her birine “embriyonik kök hücre” denir. Daha sonra bu hücreler kültürlerde çoğaltılarak bilimsel araştırmalarda kullanılabilir (45,46,47).

Erişkin kök hücrelerden farklı olarak embriyonik kök hücreler çok daha hızlı çoğalma gücündedir. Çoğalma çeşitliliği olarak da embriyonel kök hücreler, daha geniş bir yelpazeye sahiptirler. Yani farklılaşma potansiyeli erişkin kök hücrelere göre daha fazladır. Embriyonel kök hücrelerin telomerleri çok uzun olduğu için çok uzun süre çoğalabilirler. Laboratuvar ortamında bu hücreler iki yıldan uzun süre yaşatılabilirler (47,48).

2.4.2. Erişkin Kök Hücreler

Erişkin kök hücreler, farklılaşmış dokularda bulunan farklılaşmış hücrelerdir. Her yaştaki insanda bulunan bu hücreler kendilerini yenileyebilir ve ihtiyaç duyulduğunda buldukları dokulardaki değişik hücre türlerine dönüşebilirler. Erişkin kök hücreler, organizma yaşadığı süre boyunca kendilerinin kopyalarını üreterek çoğalırlar. Bu hücreler buldukları dokulardaki yaşlı, defektif veya ölü hücrelerin yerine yenilerini üreten yedek parça kaynakları olarak görev yaparlar. Erişkin kök hücreler kemik iliği, kas göz, sinir karaciğer ve deri gibi dokularda bulunabilirler. İnsan vücudunda en fazla erişkin kök hücrelerinin bulunduğu yer ise kemik iliğidir. Bu tür hücreler çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabilir. Örneğin kemik iliğinden elde edilen hematopoetik kök hücreleri lösemi tedavisinde nakil amaçlı kullanılabilir. Erişkin

hematopoetik kök hücrelerinden, sinir, kas ve karaciğer hücreleri elde edilebilmektedir (49,50).

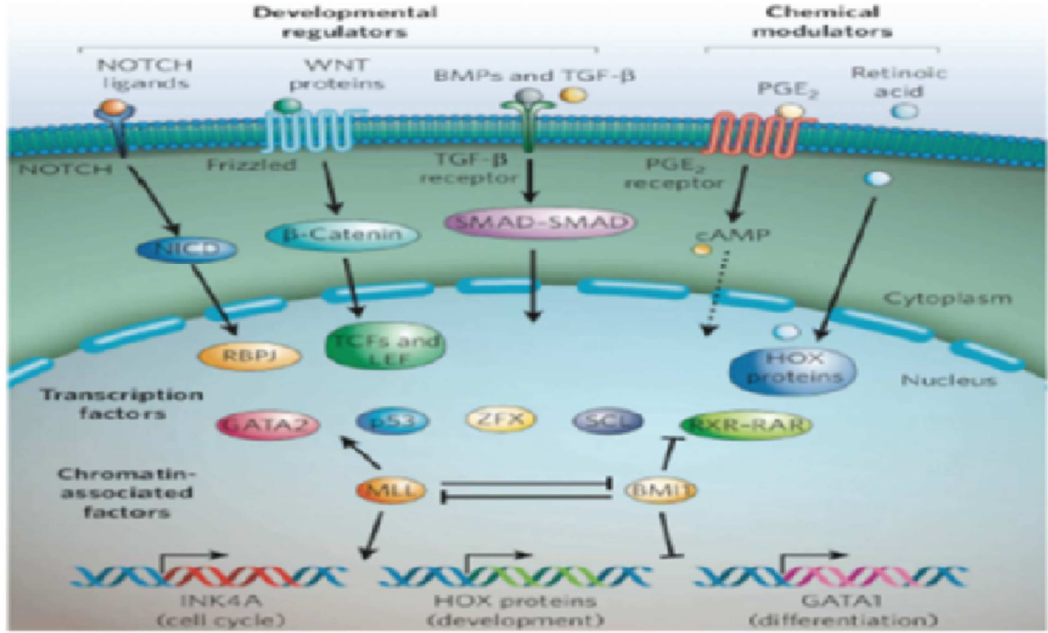
Erişkin kök hücrelerin kültürlerde üretilmesi, embriyonik kök hücrelerin üretilmesinden daha zordur. Erişkin kök hücrelerin büyümeleri ve çoğalmaları daha uzun zaman gerektirir. Ayrıca, erişkin kök hücrelerin eldesi ve birçok dokuda tespit edilmesi oldukça zordur. Günümüze kadar sadece beyin, kemik iliği, kan, iskelet kası, deri, sindirim sistemi, diş, göz ve pankreastaki erişkin kök hücreleri tespit edilmiştir. Diğer organ ve dokulardaki kök hücreleri bulmak için çalışmalar devam etmektedir. Erişkin kök hücrelerin bölünme ve değişim potansiyelinin az olması ve zor elde edilebilmeleri nedeniyle bilimsel çalışmalarda tüp bebek ünitelerinden sağlanan embriyonik kök hücreler tercih edilmektedir. Ancak embriyonik kök hücre kullanımında ciddi etik, kültürel ve dini problemler vardır (50,51,52).

2.4.3. Fetal Kök Hücreler

Bu kök hücreler sınırsız sayıda bölünme ve kendilerini yenileme özelliğine sahiptir. Embriyolardan elde edilen fetal kök hücreler “pluripotent” yapıda, yani gerekli koşullar sağlandığında kas, sinir, karaciğer gibi her hücre türüne dönüşebilme kapasitesindedirler (Şekil2). Bu hücreler tekrar farklılaşarak kromozom sayılarını yarıya indirip yumurta veya sperm hücresine de dönüşebilirler. Ancak tek başlarına yeni bir organizma oluşturamazlar, yani “totipotent” değildirler. İntrauterin biraz daha büyümüş olan organizmada, ileride sperm veya yumurta olacak üreme hücreleri de kök hücresi olarak kullanılabilir. Bu hücreler de kültür ortamında tüm hücre türlerine dönüşebilirler. Yani embriyonik kök hücrelerine benzer davranış gösterebilirler. Bu nedenle bilimsel çalışmalarda embriyonik kök hücrelerine alternatif olarak kullanılabilirler. Ancak fetüsten elde edilen bu kök hücreler gelişimin daha geç safhasında olduğu için çoğalma potansiyeli bir miktar daha düşüktür. Düşük yapan kadınlardan elde edilen fetüsler veya çeşitli sakatlıklar nedeniyle gebeliğe son verilip alınan fetüsler bu tür kök hücreler için kaynak oluşturabilir (53,54,55).

2.4.4. Kanser Kök Hücreleri

Farklı organlardaki kök hücrelerin gelişim potansiyelinin değişik olmasına karşın, bütün kök hücreler kendi kendini yenileme ve farklılaşma arasındaki dengeyi korumakla yükümlüdür. Kanserle ilgili birçok sinyal ileti sistemi kök hücrelerin kendi kendini yenileme ve farklılaşmasını da düzenlemektedir. Şekil3'de bu sinyal ileti sistemi özetlenmiştir. Wnt, Hedgehog, Shh ve Notch sinyal ileti yollarının kök hücrelerinin kendi kendini yenileme özelliğinin düzenlenmesindeki rollerinin anlaşılması, tümör oluşumunun anlaşılmasına yeni ışık açmıştır.



Şekil 3. Kanser Kök Hücre Yenilenmesinde Sinyal İleti Yolları (58)

Normalde kök hücrelerinin kendi kendilerini yenilemesini düzenleyen sinyal ileti sistemlerindeki bozukluk tümör oluşumuna öncülük eder (56,57).

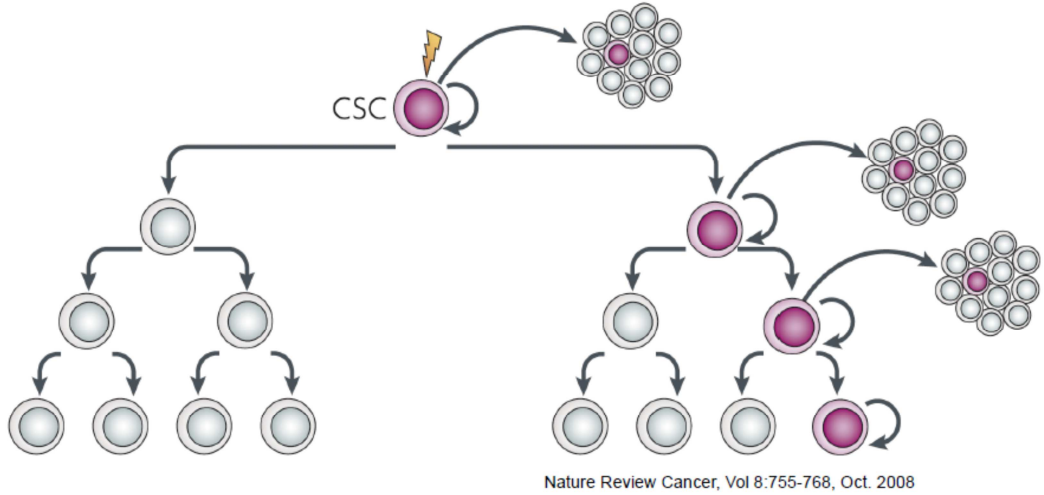
Örnek olarak BCL- 2 onkogeninin ekspresyonuyla apoptozisin engellenmesi in vivo olarak hemapoetik kök hücre (HKH) sayısının artması ile sonuçlanır, bu da HKH'lerin homeostasisin düzenlenmesinde hücre ölümünün rol oynadığını göstermektedir. Kanser kök hücresi ile normal kök hücre arasındaki kendi kendini yenilemenin mekanistik farklılığı kanser tedavisinde kullanılabilir, böylece normal kök hücrelere zarar vermeden

kanser kök hücreleri hedef olarak kullanılabilir. Kanser kök hücre teorisine göre, bunlar kanser hücrelerinin kendi kendilerini yenileme “self-renewal” ve farklılaşma özelliği olan alt gruplarıdır. Yalnız bu iki özelliğe sahip hücreler kanser kök hücresi olarak adlandırılır. Son zamanlarda kan, meme, beyin, dalak, baş ve boyun, kolon, deri ve over kanserlerinde kanser kök hücrelerinin olduğu bildirilmektedir (59).

Son yıllarda kanser kök hücre hipotezi ile kanserin tümör dokusunda oluşan kök veya öncü hücrelerden oluştuğu öne sürülmektedir. Kanser kök hücreleri veya kanseri başlatan hücreler olarak da adlandırılan kanser öncü hücrelerinin, kanserin başlaması, ilerlemesi ve klasik tedavi şekillerine direnç göstermesinden sorumludurlar. Tümör gelişimindeki kanser kök hücre modeli, hasta tümör dokusundan izole edilen son derece tümörojenik kanser kök hücrelerinin in vivo ve ex vitro olarak farklılaşmış kanser hücre kitlesi oluşturduğu ve bunların tümör oluşumundan sorumlu olduğunun gösterilmesi ile desteklenmektedir (60,61).

2.5. KANSER KÖK HÜCRE MODELİ

Kanser kök hücrelerin bir tanesi hiyerarşik olarak kanseri başlatma sürdürme-çoğaltma kapasitesine sahiptir. Şekil4’de kanseri başlatan kök hücre ve tümör dokusunun oluşumu gösterilmiştir (62).



Şekil 4. Kanser Kök Hücre Modeli (62)

2.5.1. Kanser Kök Hücrelerinde Tedaviye Dirençlilik

Kanser tedavisinde son yıllarda önemli ilerlemeler kaydedilmektedir. Daha etkili tedavi ve prognostik yöntemlerin gelişmesi klinikte daha erken tedavi olanağı sağlamaktadır. Günümüzde klinik olarak tanısı konmuş farklı kanser tiplerinde en sık kullanılan tedavi yöntemleri, tümör dokusunun cerrahi olarak çıkarılması, radyoterapi, kemoterapi ve hormonal tedavidir. Bu klasik tedaviler, tedavinin başlangıç aşamasında etkilidir. Kanserin invaziv veya metastatik olarak ilerlemesi veya relaps durumunda genellikle bu tedaviler yetersiz kalır. Kanserin tekrarlama kanser hücrelerindeki genetik ve/veya epigenetik değişikliklerin birikimi ile ilişkilidir. Bu genetik ve/veya epigenetik değişiklikler kontrolsüz hücre çoğalmasına, hücrenin yaşaması ve invazyonuna olduğu kadar klinik olarak tedaviye dirençlilikten de sorumludurlar. Kanser hücrelerinde sayısız büyüme faktörünün, “adenosine 5'-triphosphate (ATP)-binding cassette (ABC) multidrug efflux transporters”, antiapoptotik faktörlerin (MYC, Bcl2, NF-kB ve survivin) aktivasyonun değişmesi ve/veya aşırı sentezlenmesi kadar tümör baskılayıcı genlerin (TP53, PTEN) aktivasyonun azalması veya sentezinin azalması da ilaca dirençlilik ve hastalığın relapsı ile ilgili olabilir (63,64). Bunun yanında kanser kök hücre hipotezinde olduğu gibi tedavi sırasında öldürülemeyen bir kanser kök hücresi, hastalığın tekrar başlamasından sorumlu olabilir.

Tüm farklı kanser kök hücrelerinin limitsiz çoğalma potansiyeli ve diğer organlara yayılma (metastaz) yeteneği vardır. Bu nedenle, kanseri tedavi için kanser kök hücrelerini belirlemek ve hedefleyerek öldürmek gerekmektedir. Kanser kök hücreleri izole edilip tanımlanabildiğine göre, daha etkili olabilecek teşhiste kullanılacak yeni hücre yüzey belirteçleri ve tedavi hedefleri de bulunabilir (65,66).

Tümör büyümesi ve metastazı küçük orandaki kanser kök hücreleri tarafından sağlanıyorsa, bu şu andaki tedavilerin neden başarısız olduğu da açıklanabilir. Konvansiyonel tedaviler gerek birincil ve gerekse metastaz yapmış tümörün küçülmesini sağlar ancak kök hücreye etki etmez ise kanser tamamen tedavi edilmiş olmaz. Bunu iki şekilde açıklamak mümkündür; birincisi, kanser hücrelerinde tedaviye karşı direnç gelişmesi; ikincisi ise, güncel kullanılan tedavilerin kanser kök hücrelerini etkili bir şekilde öldürmemesidir. Bugün var olan tedavi şekilleri tümör hücre

topluluğunu öldürecek şekilde geliştirilmiştir, çünkü tümörün boyutunu küçültmektedirler (67).

Değişik dokulardaki normal kök hücreler, aynı dokudaki olgun hücre tiplerine göre ilaca daha dirençlidirler. Bunun sebebi bilinmemektedir, ancak anti-apoptotik proteinlerin veya ilaca dirençlilik geni gibi ABC taşıyıcılarının yüksek düzeyde sentezlenmesi ile ilgili olabilir. Aynı durum kanser kök hücreleri için de geçerli ise kanser kök hücrelerinin tümör hücrelerinden ilaca daha dirençli olmaları beklenir. Son zamanlarda farklı tip kanserlerden elde edilen kanser kök hücrelerinin günümüzde kullanılan ilaçlara dirençlilik gösterdikleri bildirilmektedir. Bu da kanserle mücadele etmek için kanser kök hücrelerini öldürecek daha etkili tedavilerin geliştirilmesi gerektiğini düşündürmektedir (68,69).

PIWIL2

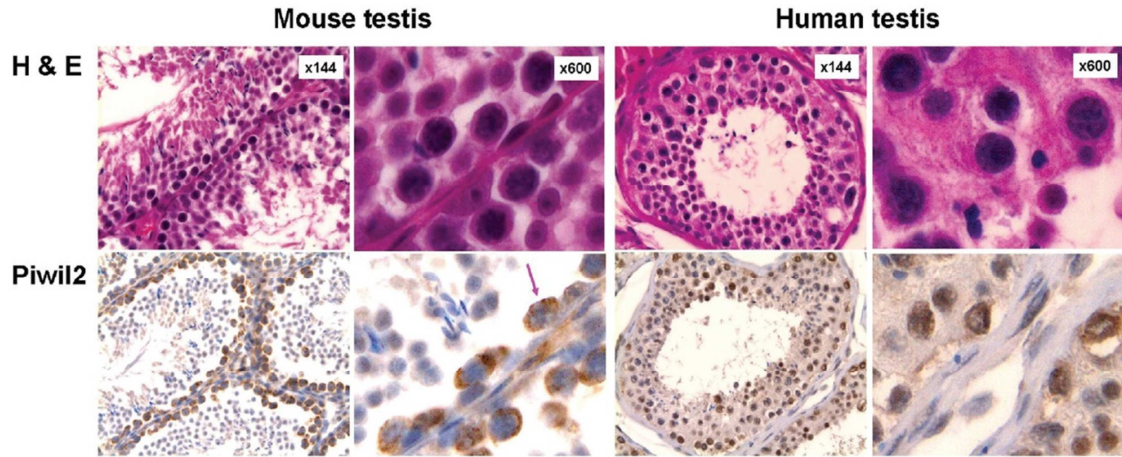
Piwi(P-element-induced wimpy testis) germ hücre gelişiminde ve onarımında esansiyel bir role sahip olan argonaute proteinlerinin alt grubudur. PİWİ/AGO gen ailesi oldukça korunmuş ve kompleks bir yapıdır. Bu grup insanda 8. kromozomda, farede 14. kromozomda yerleşmiş 973 aminoasitten oluşmuş 110 kDalton ağırlığında, 23 exondan oluşan bir gen topluluğudur. İnsan ve fare gen sekansları %88 benzerlik taşırlar. Piwi/AGO proteinler Piwi ve PAZ domainleri içerirler ve germ kök hücresinin kendi kendini yenilemesinden, hücre döngüsü, RNA interferansı, epigenetik modülasyon ve kromatinin yeniden düzenlenmesinden sorumludurlar. Piwi/AGO alt grubunda 4 üye (Piwil 1,2,3 ve 4) insan genomunda tespit edilmiştir. Bütün bu genlerin hepsinin ana kaynağı testis ve embriyonik dokulardır (70).

Piwil 2 Fonksiyonel Bölgeleri

1-Piwi gen ailesi; korunmuş PAZ ve Piwil bölgesi olarak tanımlanır ve kök hücrede kendini yenileme, RNA baskılama ve çeşitli organizmalarda translasyonel regülasyonda rol oynar.

2- PAZ; Paz bölgesi siRNA dubleksine bağlanır ve efektör kompleks içindeki öncü RNA'ya takılmayı kolaylaştırır (71-74).

Bu grupta yer alan Piwil2 (Piwi-like2), erişkin testisinde germ hücrelerinde bulunmuştur. Bu nedenle fonksiyonlarından birinin de spermatogonial kök hücrelerin kendilerini yenilemeleri olduğu düşünülmüştür. Piwil2 geni böylece hem germ hücrelerinin kendi kendilerini yenilemelerini hem de gametogenezisi hücre bölünmesi sırasında kontrol altında tutar. Piwil2 kanser kök hücrelerinde sinyal ileti yollarında proliferasyon ve apoptozisi düzenleyen anahtar görevindedir. Onkogenezde etkili olan Piwil2'nin birçok genle etkileşimde olduğu ve birlikte eksprese olduğu bilinmektedir. Bunların arasında onkogenik mekanizmalarda etkili olduğu en çok düşünülen genler *Piwil1* ve *DDX4* 'tür. *Piwil1* ve *Piwil2*'nin spesifik olarak premyotik eşey hücreleri tarafından eksprese edildiği çeşitli araştırma grupları tarafından daha önce gösterilmiştir. Fakat bunların atipik olarak farklı tümör türlerinde de eksprese edildiği belirlenmiştir (75).



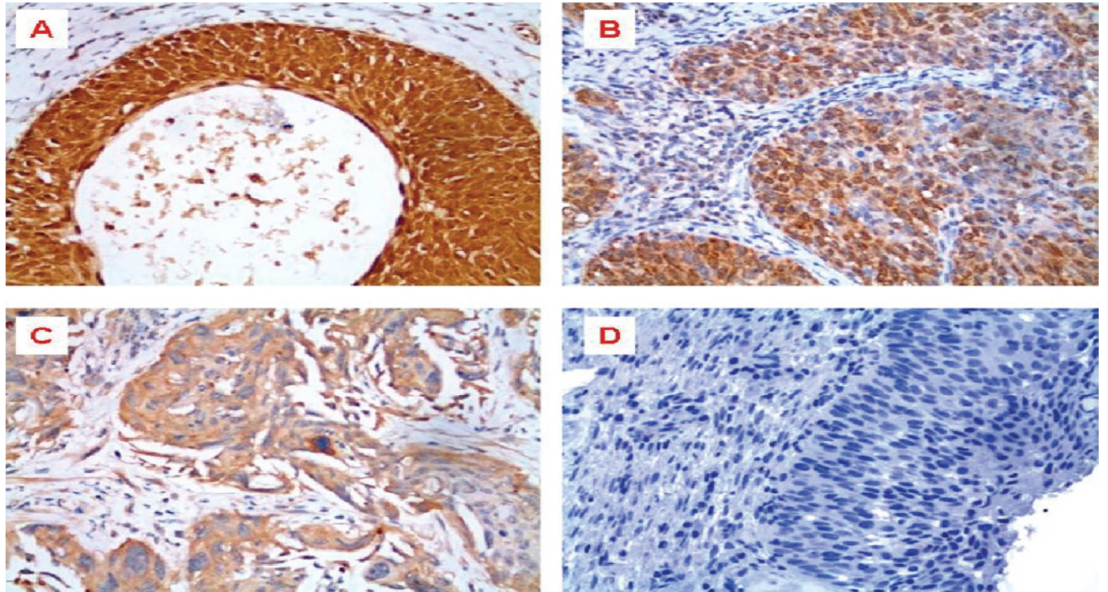
Resim 1. Fare ve insan testisinde Piwil2; Piwil2'nin testisteki ekspresyon paterni (76)

Resim1'de üstteki resimler normal fare testis dokusu ve hiperplazi gösteren insan testisinin hematoxilen eosin ile boyanmasıdır. Altta resimlerde ise fare testisinde Piwil2 stoplazmik olarak saptanırken insan hiperplastik hücrelerinde stoplazmik ve nükleer patern görülmüştür (76).

Piwil2 ilk olarak *Drosophila* overinde saptanmıştır. Overdeki kök hücre bölünmesinin hücre otonomisinde önemli rolü vardır. Piwi proteinin uzaklaştırılması veya üretiminin durdurulması kök hücre bölünmesini anlamlı ölçüde düşürürken, piwinin aşırı ekspresyonu germ hücre sayısını ve bölünme oranını önemli ölçüde artırmaktadır. Farelerde 2 piwi homoloğu saptanmıştır. (Miwi ve Mili veya Piwil2) Miwisiz fareler

spermatogenezisi tamamlayamazlar, bunlarda spermatid evrenin başında duraksamalar başlar ve kök hücre bölünmesi de anlamlı ölçüde azalır. Milisiz fareler ise spermatosit evresinde arreste uğramaktadır. İnsanlarda argonaute ailesi iki alt tipe ayrılır; piwi ailesi Piwil1 (hiwi), Piwil2 (hili), Piwil3 and Piwil4 (hiwi2) ve eIF2C/AGO alt ailesi. Tüm piwi alta ailesinin dört üyesi de testiste üretilmektedir. Bunların içinde en aktif olan Piwil2 görülmektedir (77,78,79).

Germ kök hücrelerinde Piwil2 proteininin kaybı hücrenin bölünme kapasitesini önemli ölçüde düşürmekte, artması ise bölünmesini artırmaktadır. Piwil2 gen ekspresyonu germ hücreleri dışında sadece bazı kanser hücrelerinde gösterilebilmiştir, normal hücrelerde veya inflamatuvar hücrelerde bulunmaz. Bu nedenle tümör oluşumunda önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Piwil2 geni tümörün çoğalması ve apoptozisten kaçmasında etkili olduğu özellikle meme kanseri hücrelerinde gösterilmiştir. Bunun dışında kolon kanserlerinde, over ve endometrium tümörlerinde, böbrek, gastrointestinal ve pankreas tümörlerinde de Piwil2 gösterilmiştir (80) (Resim2).

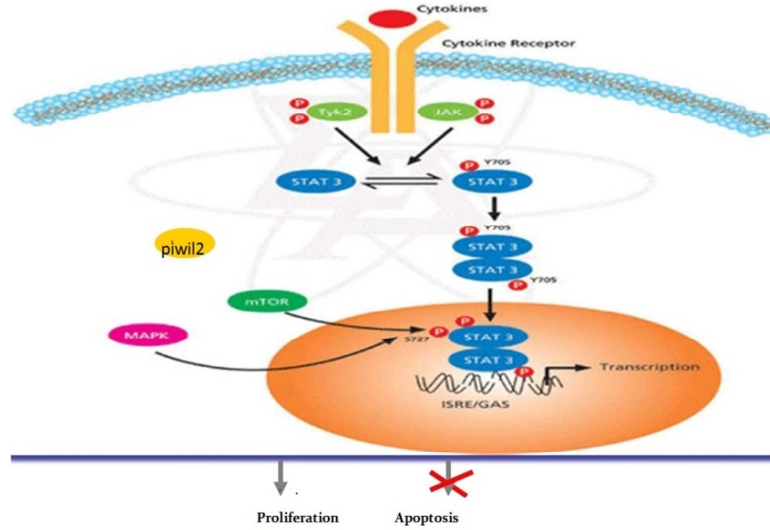


Resim 2. Serviks Karsinomu Piwil2 boyanma paternleri.(36) A, Kuvvetli boyanma: +++; B, Orta Derecede Boyanma: ++; C, Zayıf Boyanma: +; D, Negatif kontrol: Poliklonal Piwil2 antikoru yerine tavşan IgG kullanılmıştır (81).

Yapılan çalışmalarda Piwil2nin 4 farklı alt tipi bulunmuştur. Bu alt tipler; PL2L80, PL2L60, PL2L50 and PL2L40 olarak sıralanır. Bunlardan PL2L60 daha dominant olarak prekanseröz kök hücrelerde bulunur ve hem insan hem de hayvanda başta kan,

cilt ve yumuşak doku olmak üzere çok çeşitli tümörlerde eksprese edilmektedir. PL2L60 hücrelerin hayatta kalmasını desteklediği ve proliferasyonunu artırdığı için Stat3 ve BCLXL genleri up regüle olur (82,83).

Yapılan çoğu çalışmada tümör dokusunda antiapoptotik bir gen olan BCLXL'nin aşırı ekspresyonu saptanmıştır. BCLXL'nin PL2L60'ın indüklemesi sonucu artışı ile bir sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü olan stat3 aktivitesi de artar. Buna zıt olarak Piwil2 gen sessizleşmesi ile BCLXL stat3 aktivitesi de azalır ve apoptoz artar. Tüm bu kaskadların sonucu olarak ise Piwil2 tümörlerde sıkça eksprese edilmesiyle pozitif yönde onkogeni etkiler ve apoptozu baskılar (Şekil5). Sonuçta tümörün aşırı çoğalmasından sorumlu olur (83).



Şekil 5. Piwil2'nin Stat3/BcL yolu üzerinde apoptozu inhibe etmesi (58)

Piwil2'nin somatik hücrelerde sessiz durumda iken, kanser kök hücrelerinde neden ve nasıl aktiflendiği konusu tam olarak açıklık kazanmamıştır. Olası mekanizmalardan biri Piwil2 ilişkili gen regülasyonunun küçük RNA ve metilasyon vasıtasıyla olabileceğidir. Bu doğrultuda piwi-etkileşimli RNA'lar (piRNAs) olarak adlandırılan küçük RNA türleri, memeli testislerinde tanımlanmıştır. Bu küçük RNA'lar eşey hücrelerin genomundaki transpozon fonksiyonunu baskılamak için PIWI proteinleri ile (Piwil1 ve Piwil2) etkileşime girmektedirler. Bu da piRNA'ların, kanser hücrelerinde gen regülasyonunun anahtar bileşeni olarak bilinen DNA metilasyonunun spesifik belirleyicileri olduğunu göstermektedir (84).

2.6. ÇALIŞMADA DEĞERLENDİRİLEN DİĞER PARAMETRELER

2.6.1. Ki67

Hücre proliferasyonu genel olarak mitoz sayımı, flow sitometri, timidin labelling indeks veya immunohistokimyasal olarak, hücre siklusu içerisinde bulunan proteinlerin (Ki67, PCNA, siklinler vb.) tayini ile ölçülebilir. Yüksek proliferasyon hızına sahip tümörler daha hızlı büyürler ve prognozları daha kötü olabilir (85).

Ki67, ilk defa 1983'de Gerdes ve arkadaşları (86) tarafından tanımlanmış, tonsil germinal merkez hücreleri, epitelyum bazal hücreleri ve intestinal epitelin kript hücreleri gibi proliferatif hücrelerde gösterilmiştir. Ki67, hücre siklusunun Go fazı dışında tüm fazlarında bulunan nonhiston nükleer proteindir. 345 ve 395 kd ağırlığındaki iki molekülden oluşur ve geni 10. kromozom üzerinde yer alır. İmmunhistokimya ile Ki67 için pozitif nükleer boyanma gösteren hücre yüzdesi, proliferatif indeksi gösterir (86,87).

Agresif tümörlerde bu oran yüksektir. Birçok tümör de (meme, akciğer, özofagus, böbrek ve prostat kanseri, malign melanom, nonhodgkin lenfoma, glial tümörler) yüksek Ki67 oranı, kötü prognostik faktör olarak gösterilmiştir (88,89).

2.6.2. Nekroz

Canlı organizmada bir grup hücre veya lokal doku ölümü sonucu meydana gelen lezyona nekroz denir. Nekroz, irreversibl ve ağır bir hücre zedelenmesinin sonudur. Hücreler ölür ölmez herhangi bir lezyon görülmez. Ölümü izleyen olaylar, hücre içi enzimlerinin kendi organellerini ve nükleusunu parçalayıp eritmesidir. İşte, bu enzimatik aktivite etkisi ile dokuda nekroz denilen patolojik görünüm ortaya çıkar. Ölen hücreler artık fonksiyon göremez. Nekrozun etyolojisinde rol oynayan faktörler, fiziksel (travma, sıcak, soğuk, radyasyon, elektrik akımı vs.), kimyasal (asitler, alkaliler, çeşitli ilaçlar vs.), canlı hastalık etkenleri, damarsal nedenler (anoksi), organizmanın kendi sekresyonları (midede hidroklorik asit, pankreasta lipaz), immün mekanizmada bozukluk olarak özetlenebilir. Hücre ölümünden birkaç saat sonra sitoplazma bulanık ve vakuollu görülür. Daha sonra sitoplazma koyu pembe ve hiyalin gibi görülür. Nükleusda görülen erken değişiklik "piknozis"dir. Çekirdek büzüşür, zarı kırışır ve

rengi koyulaşır. Piknozis'i "Karyolizis" ya da "Karyoreksis" takip eder. Karyolizis ile çekirdek nükleik asitleri erir ve görülemez. Karyoreksis olursa nüve zarı parçalanır ve kromatin küçük tanecikler halinde hücre içinde dağılır. Nekroz, etyolojisi ve mikroskopik görünümü açısından, koagülasyon (pıhtılaşma) nekrozu, kazeifikasyon (peynirleşme) nekrozu, kolliküasyon (erime) nekrozu, yağ nekrozu ve gangren olmak üzere tiplere ayrılabilir (90,91).

2.6.3. Mitoz

Mitoz, hücrelerde kromozom sayısını sabit tutarak hücre sayısını arttıran bir bölünme şeklidir. Bölünecek hücrenin hazırlık safhasında (interfaz) kromozomların kimyâsal bileşimi olan DNA'lar kendilerini eşleyerek iki katına çıkar. Böylece kromozomun maddesi iki kat arttırılmış olur. Hücre bölünmesinde enerjiye ihtiyaç duyulacağından bu safhada hücrede ATP de depolanır. Mitoz sonucu meydana gelen hücrelerdeki DNA'ların nitelik ve niceliği birbirinin aynıdır. Mitoz muntazam bir şekilde ardarda meydana gelen bir dizi olaylar hâlinindedir. Dört safhada incelenir. Mitozun bu safhaları; profaz, metafaz, anafaz, telofaz adlarını alırlar (90,91).

2.6.4. Alfafetoprotein

AFP 70.000 Da. moleküler ağırlığında tek zincirden oluşan onkofetal bir glikoproteindir. Bilinen karsinoembriyonik proteinlerden biridir. Karaciğer, yolk kesesi ve fetusun gastrointestinal sisteminden sentezlenir. Bir yılın sonunda AFP seviyesi erişkin seviyelerine düşer. AFP seviyesi özellikle KC hücre rejenerasyonu olan hepatoselüler karsinom gibi KC neoplazmlarında %80 oranında, germ hücreli tümörlerde %60 oranında, yüksek olarak bulunur. Üst limiti 25µg/L'dir. AFP saf seminomlarda, koryokarsinomlarda veya embriyonal karsinomada görülmez. Bu tümörlerin varlığında, AFP saptanması yolk salk tümör varlığını gösterir (38).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 05.07.2011 tarihinde onay alındıktan sonra yürütülmüştür.

Çalışmaya 2000-2011 yılları arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Hematoloji-Onkoloji Departmanı tarafından takip edilen ve Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı tarafından çocukluk çağı solid tümörü tanısı verilmiş 150 hasta dahil edildi.

Çalışmaya alınan solid tümörlü hastalar 4 gruba ayrıldı. İlk gruba Nöroblastom grubu adı verildi. Bu grup 24 nöroblastom, 6 ganglionöroblastom tanısı almış 30 hastadan oluşturuldu. İkinci grup Wilm's tümörü grubu olarak adlandırıldı. Bu grupta toplam 42 Wilm's tümörlü hasta mevcuttu. Üçüncü grup Sarkom grubu olarak adlandırıldı. Bu grupta 16 rabdomyosarkom, 14 osteosarkom, 14 Ewing sarkomu tanısı almış toplam 44 hasta bulunmakta idi. Son grup ise Germ hücreli tümörler grubu olarak adlandırıldı. Bu grupta da 11 matür teratom, 8 immatür teratom, 14 yolk salk tümörü, 1 disgerminom tanısı almış toplam 34 hasta mevcuttu.

Çalışmaya 2000-2011 yılları arasında tanı almış toplam 209 hastanın dahil edilmesi planlandı. Bunlardan 30 hastanın parafin bloğu arşivde bulunamadı. 17 hastanın parafin bloğunda yeterli materyali olmaması nedeniyle çalışmadan çıkarıldı. Kalan 12 hastanın preparatları ise boyanma sırasındaki teknik sebeplerden dolayı değerlendirme dışı bırakıldı. Kalan 150 hastanın parafin blokları değerlendirmeye alındı ve boyamaları yapıldı.

Çalışmada ilk olarak patoloji arşivinden parafin bloklar alındı. Patoloji raporuna göre tümör dokusundan zengin uygun blok seçildi. Bloklardan uygun ölçülerde preparatlar hazırlandı. Çalışmada kullanılacak Pivil2 immünohistokimya boyaması için üretici tarafından verilen standart protokol kullanıldı. Çalışmada kullandığımız immünohistokimya protokolü aşağıda verilmiştir.

İmmünohistokimya protokolü

1. Deparafinizasyon amaçlı 1 saat 60°C'de bloklar etüvde bekletildi.
2. Ardından dehidrasyon amaçlı 15 dakika ksilolde bekletildi.
3. Sırasıyla azalan derişimlerde alkoller uygulandı. Preparat 5 dakika %99, 5 dakika %96, 5 dakika %70 alkolde bekletildi.
4. Preparat 5 dakika distile suda bekletildi.
5. Sitrat buffer ve distile su kullanılarak %10'luk solusyon hazırlandı.
6. Bloklar antijen retrieval amaçlı %10'luk Sitrat buffer solüsyonu içerisinde mikrodalga fırında iki kez 15'er dakika bekletildi.
7. Antijen retrieval sonrası soğumaya bırakıldı.
8. Ardından 5 dakika distile suda bekletildi.
9. Antikor uygulamasını sınırlandırma amaçlı hidrofobik doku sınırlama kalemi uygulandı.
10. Ardından hidrojen peroksit uygulandı ve 10 dakika bekletildi.
11. Ardından 5 dakika distile suda bekletildi.
12. 5 dakika fosfat buffer uygulandı.
13. Ardından sekonder antikor solusyonuundan ultra v blok damlatılıp 10 dakika bekletildi.

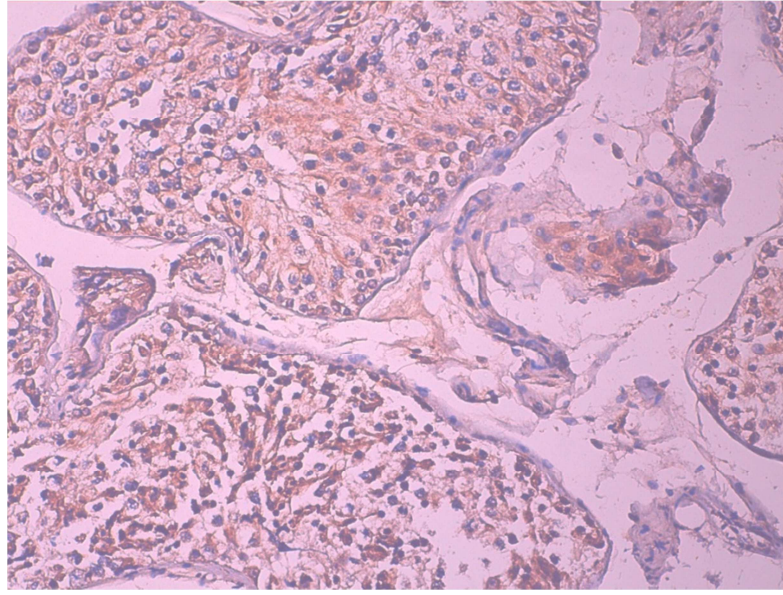
14. Sonrasında 1/100 oranında tavşan kaynaklı poliklonal Piwil2 primer antikoru damlatıp gece boyu (overnight) inkübe edildi.
15. Primer antikor sonrası 10 dakika fosfat buffer uygulandı.
16. Daha sonra ikinci sekonder antikor solüsyonu olan biotin eklenerek 10 dakika bekletildi.
17. 10 dakika fosfat buffer uygulandı.
18. Sonrasında üçüncü sekonder antikor solüsyonu streptavidin damlatılıp 10 dakika bekletildi.
19. Ardından 10 dakika fosfat buffer uygulandı.
20. 1/1 oranında DAB kromojen solüsyonu dilue edilerek dokulara uygulandı. 10 dakika bekletildi.
21. Ardından distile suda 10 dakika bekletildi.
22. 2 dakika Mayer's hematoksilen uygulandı.
23. Ardından distile suda 5 dakika bekletildi.
24. Sonrasında artan alkol derişimleri uygulandı. 5 dakika %70 alkolde bekletildi.
25. Ardından 5 dakika %96 alkolde bekletildi.
26. Ardından 5 dakika %99 alkolde bekletildi.
27. Ardından 15 dakika ksilolde bekletildi.
28. En son olarak lamlar balsamla kapatılarak işleme son verildi.

İnsan normal testis dokusu kontrol dokusu olarak kullanıldı. Tavşan kaynaklı poliklonal Piwil2 antikorunun pozitif sonuç verdiği görüldükten sonra 10'arlı camlar halinde immunohistokimya boyama yapıldı. Her boyama döngüsünde mutlaka kontrol dokusu boyaması da yapıldı ve pozitif boyama yaptığı görüldü. Boyamalar bir uzman patolog

ve bir pediatrik hematolog tarafından değerlendirildi. Değerlendirme sonucuna göre farklı tümör dokularında Piwil2 boyanma paterninin ne ölçüde olduğu tespit edildi.

Kontrol Doku

Kullanmış olduğumuz antikor olan Piwil2 (Piwi-like2), erişkin testisinde germ hücrelerinde bulunmuştur. Antikoru veri sayfasında pozitif kontrol doku olarak testis dokusu belirtilmesi nedeniyle biz de çalışmada erişkin normal testis dokusu kullandık. Resim 3’de testis dokusunda kuvvetli boyanma paterni görülmektedir.



Resim 3. Normal Testis Dokusu; özellikle 3+ boyanma seminifer tübüllerde ve sitoplazmik boyanma dikkati çekmektedir.

Boyanma skorları;

1. %0-5 Piwil2 boyanmış hücre, boyanma skoru 0 veya negatif
2. %5-25 Piwil2 boyanmış hücre, boyanma skoru 1 (+) veya zayıf pozitif
3. %25-50 Piwil2 boyanmış hücre, boyanma skoru 2 (++) veya orta pozitif
4. %50 üzeri Piwil2 boyanmış hücre, boyanma skoru 3 (+++) veya kuvvetli pozitif boyanmış olarak belirlendi.

Çalışmada Kullanılan Histolojik Parametreler

1. Nekroz: Çalışma öncesinde parafin blok değerlendirmesi yapılırken patoloji raporları yardımı ile ve boyama sonrası mikroskopi ile değerlendirme sırasında çok geniş nekroz alanları olan tümörlü dokular yanlış pozitifliğe sebep olabileceğinden çalışmadan çıkarıldı. Diğer dokular ise nekroz oranına göre; nekroz yok, hafif, orta ve ileri derece nekroz olarak sınıflama yapıldı. Nekroz oranı ile boyanma paterni arasındaki ilişki değerlendirildi.

2. Mitoz: Çalışmaya alınan dokularda mitoz oranı patoloji raporlarına göre alındı. Mitoz oranını; mitoz yok, az sayıda mitoz ve fazla miktarda mitoz olarak sınıflandırıldı. Mitoz oranının antikör boyanma ilişkisi çalışma sırasında değerlendirildi.

3. Ki67: Proliferasyon indeksi olan Ki67 2008 öncesinde patoloji departmanı tarafından değerlendirmesi ve boyanması yapılmadığı için bu tarihten önceki vakalarda değerlendirilemedi. 2008 sonrası tanı almış hastalardan 27'sinde Ki67 skoru patoloji raporlarından alındı. Ki67 skoru yüzde 1 ile yüzde 100 arasında değişen oranlarda belirtildi. Tümör boyanması ile Ki67 skoru arasındaki ilişki değerlendirildi.

4. Histolojik Tip: Özellikle Wilm's tümöründe prognozda da etkisi olan, tümörün favorable (iyi histolojili) veya unfavorable (kötü histolojili) histolojili olması nedeniyle, çalışmada Wilm's tümör gruplarında histolojik tip de değerlendirmeye alındı. Tümörün kötü histolojili olmasıyla Pivl2' nin kuvvetli boyanması arasında ilişki olup olmadığı değerlendirildi.

Çalışmada Değerlendirilen Tümör Belirteçleri

1. N-myc: Nöroblastom için kötü prognoz göstergesi olan n-myc amplifikasyonu, hücre siklusu progresyonunu ve DNA sentezi ile ilişkili olduğu için hastaların takibinde prognozları ile ilişkilidir. Çalışmada Pivl2 boyanma oranı ile n-myc amplifikasyonunun ilişkili olup olmadığını göstermek amacıyla nöroblastom tanısı almış hastalarda değerlendirme yapıldı. 2008 yılı öncesi kayıtlarda n-myc amplifikasyonu bulunmadığı için sadece kayıtlarına ulaşılan 9 hastanın sonucu değerlendirildi.

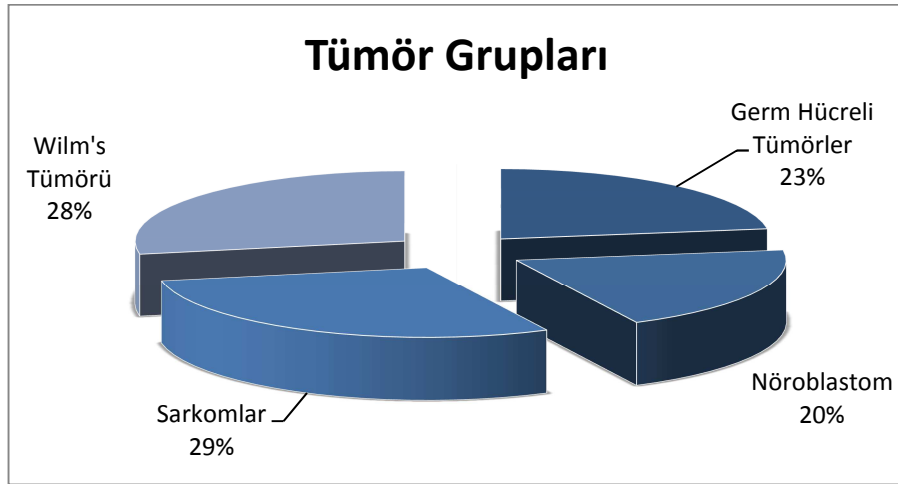
2. Alfafetoprotein: Özellikle yolk salk tümörlü hasta grubunda pozitifliği olan bir belirteç olması nedeniyle çalışmada değerlendirilmiştir. Çalışmada değerlendirilen 14 yolk salk tümörlü hastada Pivil2 boyanma oranı ve AFP yüksekliğinin ilişkisi değerlendirildi.

İstatistik yöntem: Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi 'SPSS for Windows, Version 17.0, SPSS Inc, U.S.A' paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Hastaların özellikleri ve bulguları için deskriptif istatistiksel değerlendirme yapıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart sapma, frekans) yanısıra niteliksel verilerin karşılaştırılmasında Ki-Kare testi (Pearson Chi-Square) veya Fisher' s Exact Test kullanıldı. Sonuçlar %95'lik güven aralığında, anlamlılık $p<0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya yaşları 1 ile 18 yaş arasında değişen Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji-Onkoloji Departmanı tarafından takip edilen ve biyopsisi yapılmış solid tümör tanısı almış toplam 150 hasta dâhil edildi.

Çalışmaya alınan hastalar Nöroblastom, Wilm's tümörü, Sarkomlar ve Germ hücreli tümörler olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Toplam 150 hastanın 30'u (%20) Nöroblastom, 42'si (%28) Wilm's tümörü, 44'ü (%29,3) Sarkom, , 34'ü (%22,7) ise Germ hücreli tümör grubunda idi (Şekil6).



Şekil 6. Olguların Tümör Gruplarına Göre Dağılımı

Tümör alt gruplarına göre bakıldığında Nöroblastom grubunda 24 (%16) hasta nöroblastom, 6 hasta (%4) ganglionöroblastom tanısı almıştı.

Wilm's tümörü grubunda bulunan bütün hastalar (%28) Wilm's tümörü tanısı almıştı.

Sarkom grubunda bulunan 16 (%10,7) hasta rabdomyosarkom, 14 (%9,3) hasta osteosarkom, 14 (%9,3) hasta da Ewing sarkomu tanısı ile takip edilmekte idi.

Germ hücreli tümör grubunda ise 11(%7,3) matür teratom, 8 (%5,3) immatür teratom, 14 (%9,3) yolk salk tümörü, 1(%0,7) disgerminom tanısı alan hasta vardı (Tablo 2).

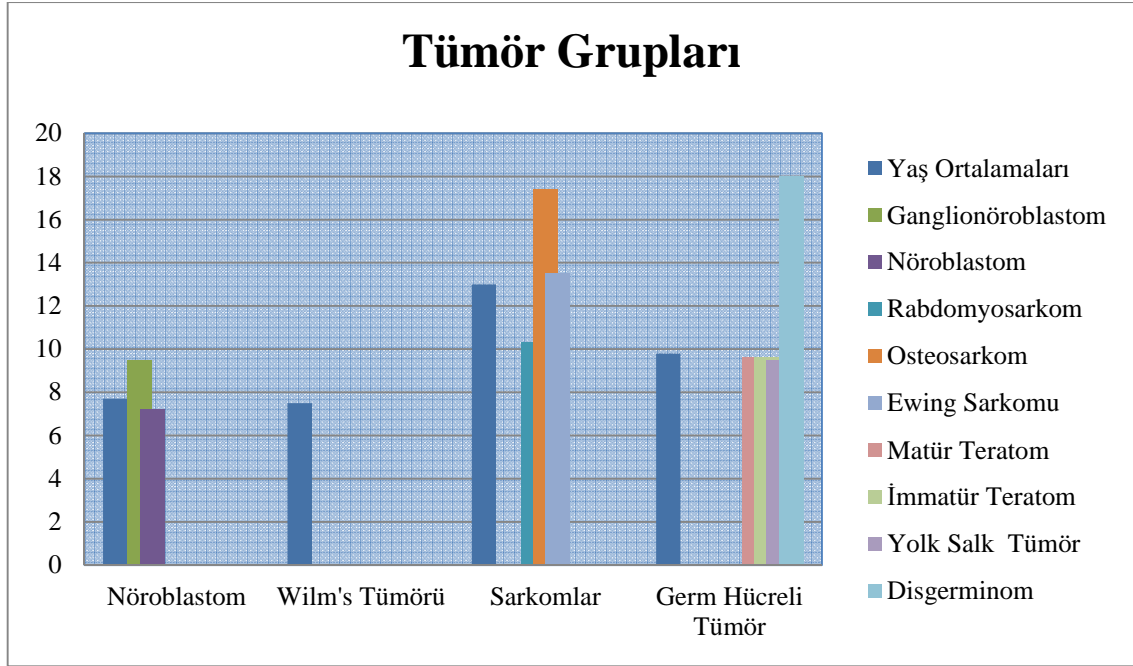
Tablo 2. Hastaların Tümör Grup ve Alt Gruplarına Göre Dağılımı

| | Tümör Grupları | n (%) | Alt Gruplar | n (%) |
|---|--------------------|-----------|--------------------|-----------|
| 1 | Nöroblastom | 30(%20) | Nöroblastom | 24(%16) |
| | | | Ganglionöroblastom | 6(%4) |
| 2 | Wilm's Tümörü | 42(%28) | | 42(%28) |
| 3 | Sarkomlar | 44(%29,3) | Rabdomyosarkom | 16(%10,7) |
| | | | Osteosarkom | 14(%9,3) |
| | | | Ewing Sarkomu | 14(%9,3) |
| 4 | Germ Hücreli Tümör | 34(%22,7) | Matür Teratom | 11(%7,3) |
| | | | İmmatür Teratom | 8(%5,3) |
| | | | Yolk Salk Tümörü | 14(%9,3) |
| | | | Disgerminom | 1(%0,7) |
| | Toplam | 150(%100) | | 150(%100) |

Yaş

Çalışmaya alınan hastaların yaş ortalaması $9,87 \pm 5,3$ yıl idi. Tablo 3'de çalışmaya dahil edilen hastaların tümör gruplarına göre yaş ortalamaları görülmektedir. Nöroblastom grubundaki hastaların yaş ortalaması $7,7 \pm 4,3$ yıl, Wilm's tümörü grubundaki hastaların yaş ortalaması $7,5 \pm 4$ yıl, Sarkom grubundaki hastaların yaş ortalaması $13,6 \pm 5$ yıl, Germ hücreli tümör grubundaki hastaların yaş ortalaması $9,8 \pm 5,2$ yıl olarak hesaplandı (Tablo 3).

Tablo 3. Hastaların Tümör Grupları ve Alt Gruplarına Göre Yaş Ortalamaları



Tümör alt gruplarına göre bakıldığında Nöroblastom grubundaki ganglionöroblastom tanısı olan hastaların yaş ortalaması $9,5 \pm 2,5$ yıl, nöroblastom tanısı olanlar ise $7,2 \pm 4,5$ yıl olarak hesaplandı. Sarkom grubunda rabdomyosarkom tanısı alan hastaların yaş ortalaması $10,3 \pm 4,8$ yıl, Osteosarkom tanısı olan hastaların yaş ortalaması $17,4 \pm 0,7$ yıl, Ewing sarkomu tanısı olan hastaların yaş ortalaması ise $13,5 \pm 5$ yıl olarak hesaplandı. Germ hücreli tümör grubunda yer alan Matür teratom tanısı olan hastaların yaş ortalaması $9,6 \pm 5,5$ yıl, İmmatür teratom tanısı olan hastaların yaş ortalaması $9,6 \pm 4,9$ yıl, Yolk salk tümör tanısı olan hastaların yaş ortalaması $9,5 \pm 5,2$ yıl olarak hesaplandı. Disgerminom tanısı olan bir hastada yaş 18 idi (Tablo 3).

Cinsiyet

Çalışmaya katılan 150 hastanın 76'sı (%50,7) erkek 74'ü (%49,3) kızdı. Tablo4'de çalışmaya alınan hastaların cinsiyetlere göre dağılımı görülmektedir. Buna göre 30 nöroblastom vakasının 17'si (%56,7) erkek 13'ü (%43,3) kızdı. Wilm's tümörü olan 42 hastanın 23'ü (%54,8) erkek 19'u (%45,2) kız, sarkom tanısı alan 44 hastanın 29'u (%65,9) erkek 15'i (%34,1) kız, germ hücreli tümör tanısı olan 34 hastanın 7'si (%20,6) erkek 27'si (%79,4) kızdı. Tümör alt gruplarına göre cinsiyet farklılıkları da Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4. Hastaların Tümör Grupları ve Alt Gruplarında Cinsiyete Göre Dağılımı

| Tümör Tipi | | n (%) | Erkek (%) | Kız (%) |
|--------------------|--------------------|------------|------------|------------|
| Nöroblastom | | 30(%20) | 17 (%56,7) | 13 (%43,3) |
| | Nöroblastom | 24(%16) | 15(%67,5) | 9 (%32,5) |
| | Ganglionöroblastom | 6(%4) | 2(%33,3) | 4(%66,6) |
| Wilm's Tümörü | | 42(%28) | 23 (%54,8) | 19 (%45,2) |
| Sarkomlar | | 44(%) | 29 (%65,9) | 15 (%34,1) |
| | Rahabdomyosarkom | 16 (%10,7) | 12(%75) | 4(%25) |
| | Osteosarkom | 14 (%9,3) | 10(%71,4) | 4(%28,6) |
| | Ewing Sarkomu | 14(%9,3) | 7(%50) | 7(%50) |
| Germ Hücreli Tümör | | 34 (%22,6) | 7 (%20,6) | 27 (%79,4) |
| | Matur Teratom | 11(%7,3) | 2(%18,2) | 9(%81,8) |
| | İmmatur Teratom | 8(%5,3) | 1(%12,5) | 7(%87,5) |
| | Yolk Salk Tümörü | 14(%9,3) | 4(%28,6) | 10(%71,4) |
| | Disgerminom | 1(%0,7) | 0 | 1(%100) |
| Toplam | | 150 (%100) | 76 | 74 |

PIWIL2 İmmunohistokimya Boyaması

Elde edilmiş olan preparatlar tavşan kaynaklı poliklonal Piwil2 antikoru ile immunohistokimyasal olarak boyandı.

Toplam olarak değerlendirdiğimiz de 150 hastanın 77'sinde (%50,7) boyanma görülmedi. Kalan 73 (%48,7) hastada ise zayıf, orta, kuvvetli düzeylerde olmak üzere pozitif boyanma tespit edildi.

Tümör Gruplarında Pozitif Piwil2 Boyanma Paterni

Nöroblastom tümör grubunda 9 (%30) hastada negatif boyanma bulunurken, 21 (%70) hastada pozitif Piwil2 boyaması görüldü. Wilm's tümörü grubunda 27(%64,3) hastada negatif boyanma bulunurken, 15 (%35,7) hastada pozitif boyanma görüldü. Sarkomlar grubunda 25(%56,8) hastada negatif boyanma bulunurken, 19(%43,2) hastada pozitif boyanma görüldü. Germ Hücreli Tümör grubunda ise 16(%47,1) hastada negatif

boyanma bulunurken, 18(%52,9) hastada pozitif boyanma görüldü. Tümör gruplarında Piwil2 ile immunohistokimyasal boyanmalar Tablo 5’de gösterilmiştir.

Tablo 5. Hastaların Tümör Gruplarında Piwil2 Boyanma Sayı ve Yüzdeleri

| Tümör Tipi | N (%) | Boyanma Oranı | | p |
|--------------------|-----------|---------------|-----------|-----------------|
| | | Negatif | Pozitif | |
| Nöroblastom | 30(%20) | 9(%30) | 21(%70) | <i>p</i> =0,02* |
| Wilm’s tümörü | 42(%28) | 27(%64,3) | 15(%35,7) | <i>p</i> =0,1 |
| Sarkomlar | 44(%29,3) | 25(%56,8) | 19(%43,2) | <i>p</i> =0,08 |
| Germ Hücreli Tümör | 34(%22,7) | 16(%47,1) | 18(%52,9) | <i>p</i> =0,04* |
| TOPLAM | 150(%100) | 77(%51,3) | 73(%48,7) | |

**p*<0,05 istatistiksel olarak anlamlı

Nöroblastom ve Germ Hücreli Tümör grubundaki pozitif boyanma diğer gruplara göre anlamlı bulundu (*p*<0,05). Wilm’s tümörü grubundaki negatif boyanma da diğer gruplara göre anlamlı bulundu (*p*>0,05).

Preparatlarda Piwil2 immunohistokimya boyamalarda orta ve kuvvetli boyanmalar anlamlı kabul edildi. Negatif ve zayıf boyanmalar ise anlamsız olarak yorumlandı. Buna göre hastalar değerlendirildiğinde, benzer şekilde, Nöroblastom ve Germ hücreli tümör gruplarında istatistiksel olarak anlamlı boyanma elde edildi (*p*<0,05).

Tümör Gruplarında Kuvvetli Piwil2 Boyanma Paterni

Tümör gruplarına göre bakıldığında nöroblastom tanısı olan 30 hastanın 5’inde (%16,7) kuvvetli boyanma görüldü. Wilm’s tümöründe ise 42 boyamadan hiçbir hastada orta veya kuvvetli boyanma görülmedi. Sarkom tanısı almış olan 44 hastanın 4’ünde (%9,1) kuvvetli boyanma izlendi. 34 germ hücreli tümör dokusunun boyanmasında 6 (%17,6) hastada kuvvetli boyanma izlendi. Kuvvetli Piwil2 boyanma oranları ve tümör tipleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde Nöroblastom ve Germ hücreli tümör grubunda istatistiksel açıdan anlamlı fark bulundu (*p*<0,05) (Tablo 6).

Tablo 6. Hastaların Tümör Gruplarında Zayıf, Orta ve Kuvvetli Pivil2 Boyanma Sayı ve Yüzdeleri

| Tümör Tipi | N (%) | Negatif (%) | Zayıf Boyanma (%) | Orta Derece Boyanma (%) | Kuvvetli Boyanma (%) | p |
|---------------------------|------------|-------------|-------------------|-------------------------|----------------------|----------------|
| Nöroblastom | 30 (%20) | 9 (%30) | 11 (%36,7) | 5 (%16,7) | 5 (%16,7) | p=0,02* |
| Wilm's Tümörü | 42 (%28) | 27 (%64,3) | 15 (%35,7) | 0 | 0 | p=0,2 |
| Sarkomlar | 44 (%29,3) | 25 (%56,8) | 10 (%22,7) | 5 (%11,4) | 4 (%9,1) | p=0,18 |
| Germ Hücreli Tümör | 34 (%22,7) | 16 (%47) | 6 (%17,6) | 6 (%17,6) | 6 (%17,6) | p=0,02* |
| TOPLAM | 150 (%100) | 77 (%51,3) | 42 (%28) | 16 (%10,7) | 15 (%10) | |

*p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı

Germ hücreli tümör ve nöroblastom gruplarında diğer gruplara göre daha kuvvetli boyanan preparat sayısı daha fazlaydı. Pivil2 antikorunun stoplazmik boyanma paterni olmasına rağmen germ hücreli tümörde zayıf boyanmadan kuvvetli boyanmaya kadar tüm olgularda hem stoplazmik hem de nükleer (nükleus) boyanma paterni izlendi.

TÜMÖR GRUPLARINDA KLİNİK ÖZELLİKLER VE PİVİL2 İLİŞKİSİ

NÖROBLASTOM

A. Boyanma Oranları

Çalışmaya dahil edilen nöroblastom tanısı almış olan 30 hastanın 24'ü nöroblastom 6'sı ise ganglionnöroblastomdu. Her iki grup için bakıldığında nöroblastom tanısı olan hastaların 7'sinde (%29,2) negatif, 8'inde (%33,3) zayıf boyanma, 5'inde(%20,8) orta derecede boyanma, 4'ünde (%16,7) kuvvetli boyanma görüldü. Ganglionnöroblastom olan hastaların 2'si (%33,3) negatif, 3'ü (%50) zayıf, 1 hastada ise (%16,7) kuvvetli boyanma izlendi. Nöroblastom alt tipleri ile boyanma oranları kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki bulunamadı (p>0,05) (Tablo 7).

Tablo 7. Nöroblastom Grubunda Tümör Alt Tiplerinin Piwil2 Boyanma Oranları

| Tümör Alt Tipi | N (%) | Negatif (%) | Zayıf Boyanma (%) | Orta Derece Boyanma (%) | Kuvvetli Boyanma (%) | <i>p</i> |
|--------------------|----------|-------------|-------------------|-------------------------|----------------------|----------------|
| Ganglionöroblastom | 6(%20) | 2(%33,3) | 3(%50) | 0 | 1(%16,7) | <i>p</i> >0,05 |
| Nöroblastom | 24(%80) | 7(%29,2) | 8(%33,3) | 5(%20,8) | 4(%16,7) | <i>p</i> >0,05 |
| Toplam | 30(%100) | 9(%30) | 11(%36,6) | 5(%16,6) | 5(%16,6) | |

**p*<0,05 istatistiksel olarak anlamlı

B. Tümör Evresi

Hastalar evrelerine göre değerlendirildiğinde; 30 hastanın 3'ü evre 1(%10), 3'ü evre 2(%10), 2'si evre 3(%6,2) ve 22'si(%73,3) ise evre 4 olan hastalardan oluşmakta idi. Evre 1 olan 3 hastanın 1'inde (%33,3) negatif, 1'inde (%33,3) zayıf boyanma, 1'inde (%33,3) orta derecede boyanma olurken kuvvetli boyanan görülmedi. Evre 2 olan 3 hastanın 2'si (%66,7) negatif, 1 (%33,3) hasta zayıf boyanırken orta ve kuvvetli boyanma görülmedi. Evre 3 olan grupta ise 2 hastanın 1'i (%50) negatif, 1'i ise (%50) zayıf boyandı. Evre 4 olan 22 hastanın ise 5'i (%22,7) negatif, 8'i (%36,4) zayıf, 4'ü (%18,2) orta derecede, 5'i de (%22,7) kuvvetli boyanmıştı. Tablo 8'de hastaların evreleri ve boyanma özellikleri görülmektedir. Hastaların evreleri ve boyanma özellikleri istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde, gruplarda hasta sayılarının çok fazla olmasından dolayı anlamlı ilişki saptanamadı. Ancak oran olarak bakıldığında evre 4 hastalarda kuvvetli Piwil2 boyanma oranı fazla idi.

Tablo 8. Nöroblastom Evrelerine Göre Pivil2 Boyanma Oranları

| Tümör Evresi | N(%) | Negatif (%) | Zayıf Boyanma (%) | Orta Derece Boyanma (%) | Kuvvetli Boyanma (%) | <i>p</i> |
|--------------|-----------|-------------|-------------------|-------------------------|----------------------|----------------|
| Evre 1 | 3(%10) | 1(%33,3) | 1(%33,3) | 1(%33,3) | 0 | |
| Evre 2 | 3(%10) | 2(%66,6) | 1(%33,3) | 0 | 0 | |
| Evre 3 | 2(%6) | 1(%50) | 1(%50) | 0 | 0 | |
| Evre 4 | 22(%73,3) | 5(%22,7) | 8(%36,4) | 4(%18,2) | 5(%22,7) | <i>p</i> >0,05 |
| TOPLAM | 30(%100) | 11(%33,3) | 5(%16,6) | 5(%16,6) | | |

**p*<0,05 istatistiksel olarak anlamlı

C. N-myc Amplifikasyonu

Nöroblastom tanısı almış olan 30 hastanın 9'unda amplifikasyon çalışıldı. 7'sinde (%77) n-myc amplifikasyonu pozitif saptandı. 7 hastanın 1'i (%14,3) negatif, 4'ü (%57,1) zayıf, 1'i (%14,3) orta derece, 1 (%14,3) hasta ise kuvvetli boyandı. Bu verilere göre yüksek amplifikasyon ile kuvvetli Pivil2 boyanma oranı arasında ilişki bulunamadı (*p*>0,05). Tablo 9'da N-myc pozitif olan hastalarda antikor boyanma oranı görülmektedir.

Tablo 9. Nöroblastomda N-Myc Amplifikasyonuna Göre Pivil2 Boyanma Oranları

| | N(%) | Negatif (%) | Zayıf Boyanma (%) | Orta Derece Boyanma (%) | Kuvvetli Boyanma (%) |
|-------|------|-------------|-------------------|-------------------------|----------------------|
| N-myc | 7 | 1(%14,3) | 4(%57,1) | 1(%14,3) | 1(%14,3) |

D. Tümör Lokalizasyonu

Nöroblastom tanısı alan 30 hastanın 2'si (%6,7) karaciğer kaynaklı, 1'i (%3,3) böbrek, 1'i (%3,3) sakral bölge, 1'i (%3,3) mediastinal lenfadenopati, 1'i (%3,3) toraks, 6'sı (%20) batın içi, 1'i (%3,3) kafa kasesi, 4'ü (%13,3) mediasten, 12'si (%40) sürrenal, 1 (%3,3) hasta ise spinal kord kaynaklı idi. Hastalar tümör lokalizasyonuna göre değerlendirildiğinde nöroblastom için sürrenal kaynaklı ve diğer bölgeler olarak ayrıldı. Tablo 10'da sürrenal veya diğer tutulan organ dağılımına göre boyanma özellikleri

görülmektedir. Organ tutulumlarına göre değerlendirme yapıldığında sürrenale özgü kuvvetli boyanma paterni istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 10. Nöroblastomda Tümör Lokalizasyonuna Göre Pivil2 Boyanma Oranları

| Tümör Lokalizasyonu | N (%) | Negatif (%) | Zayıf Boyanma (%) | Orta Derece Boyanma (%) | Kuvvetli Boyanma (%) | <i>p</i> |
|---------------------|-----------------|---------------|-------------------|-------------------------|----------------------|----------|
| Sürrenal | 12(%40) | 3(%25) | 5(%41,6) | 2(%16,6) | 2(%16,6) | $p>0,05$ |
| Diğer | 18(%60) | 6(%33,3) | 6(%33,3) | 3(%16,6) | 3(%16,6) | $p>0,05$ |
| Toplam | 30(%100) | 9(%30) | 11(%36,6) | 5(%16,6) | 5(%16,6) | |

* $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı

E. Prognoz

Hastalar prognozları açısından değerlendirildiğinde nöroblastom grubu içinde 30 hastanın 8'inin (%26,6) kaybedildiği görüldü. 22 (%73,3) hastanın ise takibine devam edilmektedir. Ölen 8 hastaya bakıldığında 1 (%12,5) hastada negatif boyanma, 5 (%62,5) hastada zayıf boyanma, 2 (%25) hastada orta derece boyanma görülürken hiçbir hastada kuvvetli boyanma görülmedi. Yaşayan 22 hastaya bakıldığında ise 8 (%36,4) hasta negatif, 6'sı (%27,3) zayıf, 3'ü (%13,6) orta derecede, 5'i ise (%22,7) kuvvetli boyandı (Tablo11). İstatistiksel değerlendirme yapıldığında ise kötü prognozla Pivil2 pozitifliği arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 11. Nöroblastomda Prognoza Göre Pivil2 Boyanma Oranları

| Tümör Prognozu | N (%) | Negatif (%) | Zayıf Boyanma (%) | Orta Derece Boyanma (%) | Kuvvetli Boyanma (%) | <i>p</i> |
|----------------|-----------------|---------------|-------------------|-------------------------|----------------------|----------|
| Ölen | 22(%73,3) | 8(%36,4) | 6(%27,3) | 3(%13,6) | 5(%22,7) | 0,1 |
| Yaşayan | 8(%26,7) | 1(%12,5) | 5(%62,5) | 2(%25) | 0 | |
| Toplam | 30(%100) | 9(%30) | 11(%36,6) | 5(%16,6) | 5(%16,6) | |

* $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı

WILM'S TÜMÖRÜ

Çalışmaya dahil edilen Wilm's tümörü tanısı olan 42 hastanın 27'sinde (%64,3) negatif boyanma, 15'inde(%35,7) orta derece boyanma boyanma görülürken hiçbir hastada orta ve kuvvetli boyanma görülmedi.

A. Tümör Evresi

Hastalar evrelerine göre değerlendirildiğinde 42 hastanın 18'i (%42,9) evre 1, 9'u (%21,4) evre 2, 11'i (%26,2) evre 3, 4 (%9,5) hasta ise evre 4 olan hastalardan oluşmakta idi. Evrelerine göre boyanma özellikleri değerlendirildiğinde Piwil2 boyanma özelliği arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

B. Tümör Histolojisi

Wilm's tümörü değerlendirmesinde histoloji tipi prognoz açısından önemli bir özelliktir. Çalışmaya dahil edilen hastalarda histoloji tipi favorable (iyi histoloji) ve unfavorable (kötü histoloji) olarak 2 gruba ayrıldı. 42 hastanın 29'u (%69) favorable, 14 (%31) hasta ise unfavorable histolojili olarak saptandı. Favorable histoloji olan 29 hastanın 18'i (%62,1) negatif boyanırken, 11 (%37,9) hastada ise zayıf boyanma saptandı. Hiçbir hastada orta ve kuvvetli boyanma görülmedi. Unfavorable histolojili olan grupta ise 14 hastanın 9'u (%69,2) negatif boyanırken 4'ünde (%30,8) zayıf boyanma saptandı. Bu grupta da orta ve kuvvetli boyanan hasta görülmedi. İstatistiksel değerlendirme yapıldığında hastaların histolojik olarak iyi ya da kötü tip olması ile Piwil2 boyanma özelliği arasında anlamlı ilişki saptanamadı ($p>0,05$).

C. Prognoz

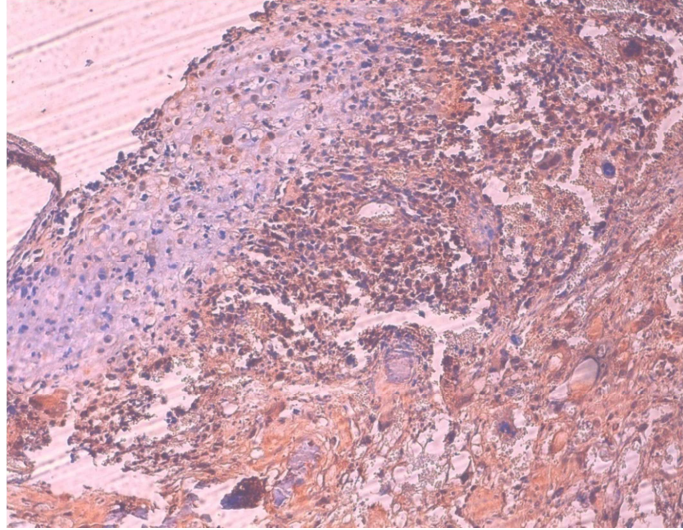
Hastaları prognozlarına göre değerlendirdiğimizde 42 hastanın 10 yıllık takibinde 33 (%78,6) hasta iyi prognozlu olarak seyrederken, 9 (%21,4) hasta kaybedilmişti. Ölen 9 hastanın 6'sı (%66,7) negatif boyanırken, 3 (%33,3) hasta zayıf boyandı. Takiplerine devam edilen iyi prgonozlu grupta ise 33 hastadan 21'i (%63,6) negatif boyanırken 12 (%36,4) hasta zayıf boyandı. Her iki grupta da orta ve kuvvetli boyanma görülmedi. İstatistiksel değerlendirme yapıldığında ise yaşayan grupla, ölen hastaların Piwil2 boyanmaları arasında anlamlı ilişki bulunmadı ($p>0,05$).

SARKOMLAR

Çalışmaya aldığımız sarkomlar rabdomyosarkom, osteosarkom ve Ewing sarkomu olmak üzere 3 gruptan ve 44 hastadan oluşmaktaydı. Bunlardan 16'sı (%36,4) rabdomyosarkom, 14'ü (%31,8) osteosarkom ve 14'ü (%31,8) ise Ewing sarkomuydu.

Boyanma Oranları

Çalışmaya dahil edilen sarkomlar grubunda 16 rabdomyosarkom hastasının sadece 1'inde (%6,3) kuvvetli boyanma görüldü. 14 ewing sarkom hastasının hiçbirinde kuvvetli boyanma görülmedi. 14 osteosarkom hastasında ise 3 (%21,4) kuvvetli boyanma görüldü. (Resim 4)



Resim 4. Osteosarkom Dokusu, 3+ (Kuvvetli Oranda) Boyanma

Sarkomlar grubunda osteosarkom hastalarında görülen kuvvetli Piwil2 boyanması istatistiksel olarak anlamlı idi ($p < 0,05$) (Tablo 12).

Tablo 12. Sarkomlar Grubunda Tümör Alt Tiplerinin Pivwil2 Boyanma Oranları

| Tümör Alt Tipi | N (%) | Negatif (%) | Zayıf Boyanma (%) | Orta Derece Boyanma (%) | Kuvvetli Boyanma (%) | p |
|-----------------------|--------------|--------------------|--------------------------|--------------------------------|-----------------------------|----------------|
| Rabdomyosarkom | 16 (%10,7) | 10 (%62,5) | 4(%25) | 1(%6,3) | 1(%6,3) | |
| Osteosarkom | 14(%9,3) | 6(%42,9) | 4(%28,6) | 1(%7,1) | 3(%21,4) | <i>P=0,03*</i> |
| Ewing Tümörü | 14(%9,3) | 9(%64,3) | 2(%14,3) | 3(%21,4) | 0 | |
| Toplam | 44(100) | 25(%56,8) | 10(%22,7) | 5(%11,3) | 4(%9) | |

* $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı

Tümör Alt Grupları

Rabdomyosarkom

Tümör Evresi

Bu alt gruplarda hasta sayısı az olduğundan evreler lokalize ve metastatik hastalık olarak ayrıldı. Hastalar evrelerine göre değerlendirildiğinde 16 hastanın 11'i (%68,7) lokalize 5 (%31,3) hasta ise metastatik hastalık grubunda idi. Evrelerine göre boyanma oranları değerlendirildiğinde ise lokalize olan 11 hastanın 6'sı (%54,5) negatif, 4'ü (%36,4) zayıf, 1 (%9,1) hasta ise orta derece boyandı. Kuvvetli boyanan hasta olmadı. Metastatik olanlara bakıldığında ise 5 hastanın 4'ü (%80) negatif boyanırken, 1 (%20) hastada kuvvetli boyanma görüldü. Zayıf ve orta derecede boyanan hasta yoktu. Hastaların evresi ile Pivwil2 boyanma ilişkisi istatistiksel değerlendirildiğinde anlamlı farklılık görülmedi ($p > 0,05$).

Patolojik Alt Tipleri

Hastalar patolojik alt tiplerine göre bakıldığında, 16 hastanın 8'i (%50) embriyonel, 3'ü (%18,8) pleomorfik, 3'ü (%18,8) botiroid, 1'i (%6,3) malign mezenkimal tümör, 1 (%6,3) hasta da alveolar tip rabdomyosarkom olarak saptandı. Embriyonel ve diğer histolojik gruplar karşılaştırıldığında, Pivwil2 boyanması açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p > 0,05$).

Prognoz

Çalışmaya alınan 16 hastanın 11'i (%73,3) iyi prognozlu seyrederken, 4'ünde (%26,7) kötü idi. Bir hasta ise takipten çıktığı için bu açıdan değerlendirme dışı kaldı. Boyanma oranı açısından değerlendirdiğimizde iyi prognozlu 11 hastanın 8'i (%72,7) negatif, 2'si (%18,2) zayıf, 1'i (%9,1) ise orta derecede boyandı. Kuvvetli boyanan bu grupta yoktu. Kötü prognozlu seyreden 4 hastanın 2'si (%50) negatif, 1'i (%25) ise zayıf boyanma olarak saptandı. Bu grupta orta ve kuvvetli boyanma saptanmadı. Prognozu iyi ve kötü olanlar arasında, Piwil2 boyanma oranı istatistiksel olarak anlamlı farklı değildi ($p>0,05$).

Osteosarkom

Tümör Evresi

Hastalar evrelerine göre değerlendirildiğinde temel kriter olarak akciğer metastaz olup olmaması baz alındı. Akciğer metastazı olanlar metastazik olmayanlar lokalize hastalık şeklinde değerlendirildi. 14 hastanın 12'i (%85,7) lokalize, 2 (%14,3) hasta ise metastatik hastalık olarak saptandı. Evrelerine göre boyanma oranları değerlendirildiğinde ise lokalize olan 12 hastanın 5'i (%41,7) negatif, 3'ü (%25) zayıf, 1 (%8,3) hasta ise orta derece, 3 hasta (%25) ise kuvvetli boyandı. Metastatik olanlara bakıldığında ise 2 hastanın 1'i (%50) negatif boyanırken, 1 (%50) hastada zayıf boyanma görüldü. Orta ve kuvvetli derecede boyanan hasta yoktu. Hastaların evresi ile Piwil2 boyanma ilişkisi istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde anlamlı fark görülmedi ($p>0,05$).

Prognoz

Çalışmaya alınan Osteosarkom tanılı 14 hastanın 7'si (%50) iyi prognozlu seyrederken, 7'sinin (%50) kötü prognozlu seyrettiği saptandı. Boyanma oranı açısından değerlendirdiğimizde iyi prognozlu 7 hastanın 4'ü (%57,1) negatif, 2'si (%28,6) zayıf, 1'i (%14,3) ise kuvvetli derecede boyandı. Orta derecede boyanan hasta görülmedi. Kötü prognozlu seyreden 7 hastanın 2'si (%28,6) negatif, 2'si (%28,6) ise zayıf boyanma 1 (%14,3) hasta orta derece, 2 hasta (%28,6) ise kuvvetli boyandı. İstatistiksel açıdan bakıldığında ise Piwil2 boyanma oranı ile prognoz arasında anlamlı ilişki

bulunamadı. ($p>0,05$) Tablo 16’da osteosarkomda prognoz boyanma ilişkisi görülmektedir.

Tablo 13. Osteosarkomda Prognoza Göre Piwil2 Boyanma Oranları

| Tümör Prognozu | N (%) | Negatif (%) | Zayıf Boyanma (%) | Orta Derece Boyanma (%) | Kuvvetli Boyanma (%) | p |
|-----------------------|--------------|--------------------|--------------------------|--------------------------------|-----------------------------|----------|
| Ölen | 7 (%50) | 2 (%28,6) | 2 (%28,6) | 1 (%14,3) | 2 (%28,6) | 0,57 |
| Yaşayan | 7 (%50) | 4 (%57,1) | 2 (%28,6) | 0 | 1 (%14,3) | |
| Toplam | 14 (%100) | 6 (%42,9) | 4 (%28,6) | 1 (%7,1) | 3 (%21,4) | |

* $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı

Ewing Sarkomu

Tümör Evresi

Hastalar evrelerine göre lokalize ve metastatik hastalık olarak değerlendirildi. 14 hastanın 11’i (%78,6) lokalize, 3 (%21,4) hasta ise metastatik hastalık olarak saptandı. Evrelerine göre boyanma oranları değerlendirildiğinde ise lokalize olan 11 hastanın 6’sı (%54,5) negatif, 2’si (%18,2) zayıf, 3 (%27,3) hasta ise orta derece, boyanma görüldü. Kuvvetli boyanan hasta ise yoktu. Metastatik olanlara bakıldığında ise 3 hastanın 3’ü (%100) negatif boyanırken diğer boyanma oranları görülmedi. Hastaların evresi ile Piwil2 boyanma ilişkisi istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde anlamlılık görülmedi ($p>0,05$).

Prognoz

Çalışmaya alınan 14 Ewing sarkom tanılı hastanın 9’u (%64,3) iyi prognozlu seyrederken, 5’inin (%34,3) kötü prognozlu seyrettiği saptandı. Boyanma oranı açısından değerlendirdiğimizde iyi prognozlu 9 hastanın 6’sı (%66,7) negatif, 1’i (%11,1) zayıf, 2’si (%22,2) ise orta derecede boyandı. Kuvvetli derecede boyanan hasta görülmedi. Kötü prognozlu seyreden 5 hastanın 3’ü (%60) negatif, 1’i (%20) zayıf boyanma, 1(%20) hasta ise orta derece kuvvetli boyandı. İstatistiksel açıdan

bakıldığında ise Piv2 boyanma oranı ile prognoz arasında anlamlı ilişki bulunamadı ($p>0,05$).

GERM HÜCRELİ TÜMÖRLER

Germ hücreli tümörler çalışmada matür teratom, immatür teratom, yolk salk ve disgerminom olmak üzere 4 alt gruba ayrıldı. Bu grupta 34 hasta değerlendirmeye alındı. Bunlardan 11'i (%32,4) matür teratom, 8'i (%23,5) immatür teratom, 14'ü (%41,2) yolk salk tümörü ve 1 (%2,9) hasta disgerminomdu. Disgerminom hasta sayısının sadece 1 olması nedeni ile bu grupta istatistik yapılamadı. Tablo 14'de tümör alt grupları ve boyanma oranları görülmektedir.

Tablo 14. Germ Hücreli Tümörler Grubunda Tümör Alt Tiplerinin Piv2 Boyanma Oranları

| Tümör Alt Tipi | N (%) | Negatif (%) | Zayıf Boyanma (%) | Orta Derece Boyanma (%) | Kuvvetli Boyanma (%) | <i>p</i> |
|------------------|-------------------|----------------|-------------------|-------------------------|----------------------|--------------|
| Matür Teratom | 11(%7,3) | 5(%45,5) | 3(%27,3) | 1(%9,1) | 2(%18,2) | |
| İmmatür Teratom | 8(%5,3) | 5(%62,5) | 1(%12,5) | 1(%12,5) | 1(%12,5) | |
| Yolk Salk Tümörü | 14(%9,3) | 6(%42,9) | 2(%14,3) | 4(%28,6) | 2(%14,3) | |
| Disgerminom | 1(%0,7) | 0 | 0 | 0 | 1(%100) | |
| Toplam | 34 (%22,7) | 16(%47) | 6(%17,6) | 6(%17,6) | 6(%17,6) | 0,02* |

* $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı

Matür Teratom

Hastalar yerleşim yerlerine göre değerlendirildiğinde 11 hastanın 5'i (%45,5) over, 4'ü (%36,4) sakral bölgeden, 1'i (%9,1) testis, 1'i (%9,1) ise batın içi kaynaklı idi. Boyanma oranları yerleşim yerine göre değerlendirildiğinde kuvvetli Piv2 boyanan iki hastadan biri testis diğeri sakral kaynaklı idi.

İmmatür Teratom

Bu grupta değerlendirmeye 8 hasta alındı. Bunlardan 4'ü (%50) sakral bölge kaynaklı, 3'ü (%37,5) over, 1'i (%12,5) ise batın içi kaynaklı idi. Piv2 boyanma oranları

yerleşim yerine göre değerlendirildiğinde kuvvetli boyanan bir hasta sakral bölgeden, orta dereceli boyanan bir hasta ise over kaynaklı idi.

Yolk Salk Tümörü

Bu grupta değerlendirmeye 14 hasta alındı. Bunlardan 4'ü (%28,6) sakral bölge kaynaklı, 3'ü (%21,4) over, 3'ü (%21,4) testis, 1'i mediastinal lenfadenopati (%7,1), 1'i (%7,1) mesane, 1'i (%7,1) vajen, 1'i (%7,1) barsak kaynaklı idi. Boyanma oranları yerleşim yerine göre değerlendirildiğinde kuvvetli boyanan 2 hastadan biri mediastinal lenfadenopati diğeri ise vajen kaynaklı idi. Orta dereceli Piwil2 boyanan 4 hasta over ve testis kaynaklı idi.

Hastaların tanı anındaki alfafetoprotein (AFP) düzeyleri değerlendirildi. AFP değerleri 14 hastanın 11'inde (%78) yüksek olarak saptandı. Hastaların ortalama AFP değeri 11983 ± 16584 olarak hesaplandı. AFP yüksekliği ile Piwil2 boyanma oranı istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde sınırda anlamlı değer elde edildi. ($p=0,058$)

Disgerminom

Çalışmaya dahil edilen bir disgerminom tanılı hasta mevcuttu. Disgerminom over kaynaklı idi. Bu hastada Piwil2 ile kuvvetli boyanma paterni görüldü.

TÜMÖR PROLİFERASYON İNDEKSLERİ

Mitoz

Çalışmaya alınan tümör gruplarında mitoz oranının değerlendirmesi yapıldı. 150 hastanın 81'inde (%53,3) mitoz görülmedi veya dikkate alınmayacak kadar önemsiz oranda görüldü. 47 hastada (%30,9) mitoz az oranda görüldü. 24 hastada (%15,8)ise fazla miktarda mitoz belirlendi. Mitoz izlenmeyen 81 hastada Piwil2 boyanma oranları ise 40'ı (%49,4) negatif, 22'sinde (%27,2) zayıf, 11'inde (%13,6) orta derecede, 8'inde (%9,9) kuvvetli idi. Az miktarda mitoz izlenen 47 hastanın 26'sı (%55,3) negatif, 12'sinde (%25,5) zayıf, 3'ünde (%6,4) orta derecede, 6'sında (%12,8) kuvvetli boyanma paterni izlendi. Aşırı mitoz izlenen 24 hastanın 11'i (%45,8) negatif, 10'u (%41,7) zayıf, 2'si (%8,3) orta derecede, 1'i ise (%4,2) kuvvetli Piwil2 boyandı. Mitoz

izlenmeyen, az izlenen ve aşırı mitoz izlenen hastaların Pivil2 antikoru ile boyanma oranları açısından bakıldığında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).

Ki67

Çalışmaya alınan 150 hastadan 27'sinde ki67 skoru değerlendirildi. Buna göre 15 (%55,6) hastanın ki67 değeri düşük bulunurken 12 (%44,4) hastanın yüksek saptandı. Boyanma ilişkisine bakıldığında ise ki67 skoru düşük olan 15 hastanın 7'si (%46,7) negatif 6'sı (%40) zayıf pozitif, 2 (%13,3) hasta ise kuvvetli boyandı. Ki67 skoru yüksek bulunan 12 hastadan ise 6'sı (%50) negatif, 3'ü (%25) zayıf, 2'si (%16,7) orta, 1 (%8,3) hasta ise kuvvetli boyandı. Ki67 skoru ile Pivil2 boyanma oranı istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı sonuç bulunamadı. ($p>0,05$)

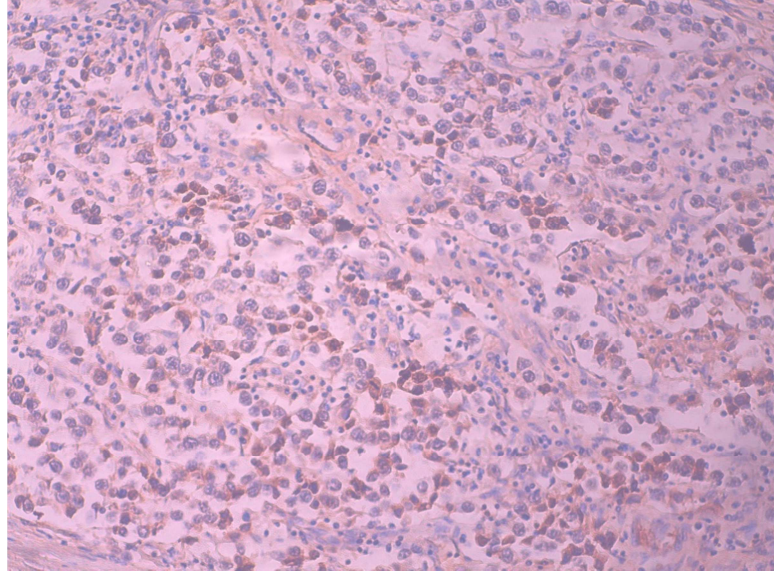
Nekroz

Hastalar çalışmaya alınma ve değerlendirme yapılmadan önce çok fazla nekroz gösteren veya tümörün çoğunluğu nekrozdan oluşan parafinler değerlendirmede hataya sebep olabileceğinden çalışma dışı bırakıldı. Değerlendirilen 150 hastanın ise 95'inde (%62,5) nekroz görünmezken, 32 (%21,1) hastada hafif derece, 5 (%3,3) hastada orta derecede, 20 hastada ileri derecede (%13,2) nekroz görüldü. Nekroz izlenmeyen 95 hastanın 51'i (%53,7) negatif, 25'i (%26,3) zayıf, 10'u (%10,5) orta derecede, 9'u (%9,5) ise kuvvetli boyandı. Hafif nekroz görülen 32 hastanın 15'i (%46,9) negatif, 10'u (%31,3) zayıf, 4'ü (%12,5), orta derecede, 3'ü (%9,4) ise kuvvetli boyandı. İleri derece nekroz izlenen 20 hastanın 8'i (%40) negatif, 7'si (%35) zayıf, 2'si (%10) orta derecede, 3'ü (%15) ise kuvvetli boyandı. Nekroz oranı ve Pivil2 ile yüksek oranda boyanma ilişkisi açısından değerlendirme yapıldığında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunamadı. ($p>0,05$).

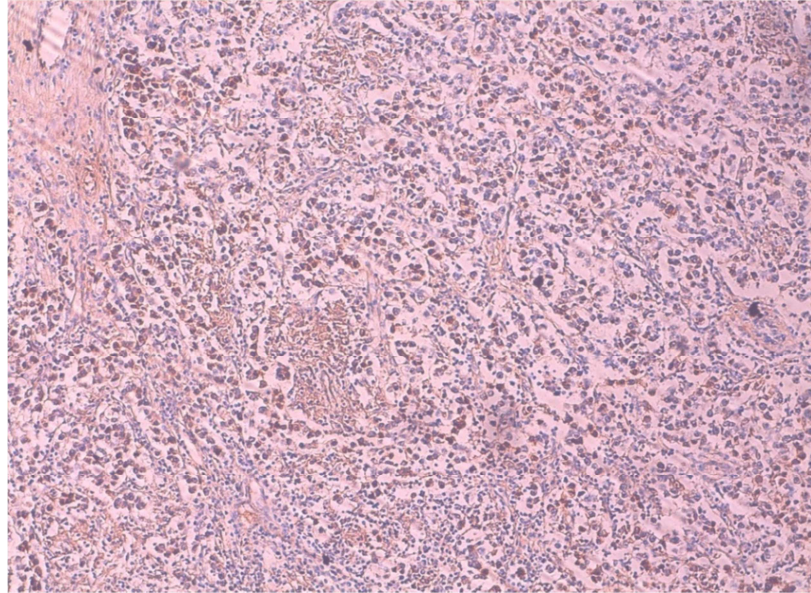
Nükleer Boyanma Paterni

Stoplazmik boyanma paterni olan Pivil2 poliklonal antikoru germ hücreli tümör hariç diğer tüm tümör gruplarında stoplazmik boyandı. Stoplazmik boyanma paterni zayıf veya kuvvetli boyanan tümörlerde de aynen izlendi. Germ hücreli tümörlerde ise hem stoplazmik hem de çekirdek de boyanma izlendi. Aynı zamanda bu boyanma oranı diğer tümör gruplarına göre anlamlı ölçüde fazla bulundu. Resim 5 ve 6'da disgerminom

tanılı vakanın hem stoplazmik hem de nükleer 3+ kuvvetli boyanma paterni mikroskopik olarak görülmektedir.



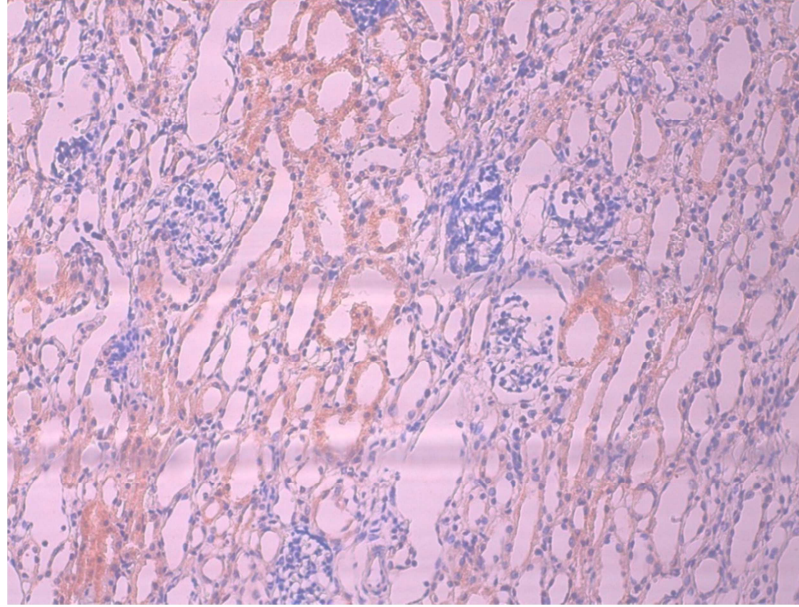
Resim 5. Disgerminom Tanılı Preparatta 3+ Boyanma ve Nükleer Boyanma Paterni



Resim 6. Aynı Hastada 20x Büyütme ve Farklı Kesimden Nükleer Boyanma Paterni

TÜMÖR DIŞI DOKU TUTULUMU

Yapılan boyamalarda Wilm's tümörü dokusunda negatif boyanma izlenen bazı olgularda tümörün çıkarılırken çevre böbrek dokusu ile beraber rezeksiyon işlemi yapılması nedeniyle tümör dokusu yanında kalan normal böbrek dokusunda da pozitif boyanma izlenmiştir. Boyanma bazı olgularda ise kuvvetli pozitif olarak izlenmiştir. Boyanmanın ağırlıklı olarak glomerüller değil böbrek tübülüslerinde olduğu görülmektedir (Resim 7). Bu sonucun önemi ileri çalışmalarda Piwil2 bir ilaç olarak kullanılabilirse ilacın normal doku üzerine etkisi veya hangi doku üzerine yan etki/toksik etki oluşturacağı konusu açısından fikir verecektir.



Resim 7. Negatif boyanan Wilm's tümörü dokusu yanında kuvvetli pozitif (3+) boyanan böbrek dokusu (tübüller boyanırken glomerüller boyanmamaktadır) görülmektedir.

5. TARTIŞMA

Çocukluk çağı kanserleri içinde lösemi ve lenfomalar en sık görülen kanser tipleridir. Lösemi ve lenfomalardan sonra sırasıyla SSS tümörleri, sempatik sistem tümörleri, yumuşak doku sarkomları, malign kemik tümörleri, germ hücreli tümörler, böbrek tümörleri, retinoblastom ve karaciğer tümörleri gelmektedir. Bu çalışmada çocukluk çağı solid tümörlerinden nöroblastom, Wilm's tümörü, yumuşak doku ve kemik sarkomları ve germ hücreli tümörlerde kanser kök hücresinin araştırılması planlandı (38).

Son zamanlarda kanser kök hücre hipotezi ile kanserin tümör dokusunda oluşan kök veya öncü hücrelerden oluştuğu öne sürülmektedir. Kanser kök hücreleri veya kanseri başlatan hücreler olarak da adlandırılan bu hücreler, kanserin başlaması, ilerlemesi ve klasik tedavi şekillerine direnç göstermesinden sorumludurlar (60,61).

Piwil2 ilk olarak erişkin testisinde tespit edilmiş olan ve kanser kök hücrelerinde sinyal ileti yollarında proliferasyon ve apoptozisi düzenleyen bir gen ve onun proteiniidir. Onkogeneizde etkili olan Piwil2'nin birçok genle etkileşimde olduğu ve birlikte eksprese edildiği bilinmektedir (75).

Bu çalışmada çocukluk çağında görülen solid tümörlerde bir kök hücre belirteci olarak Piwil2'nin gösterilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya 1 ile 18 yaş arasında solid tümör tanısı almış toplam 150 hasta dahil edildi, 150 hastanın 76'sı (%50,7) erkek 74'ü (%49,3) kızdı. Çalışmada en fazla sayıda sarkom grubu tümörler (n=44) yer alırken

daha sonra sırasıyla Wilm's tümörü (n=42), germ hücreli tümör (n=34) ve nöroblastom (n=30) yer aldı.

Tümör gruplarında nöroblastomda 10 (%33,4) hasta, sarkomlarda 9 (%20,5) hasta, germ hücreli tümörlerde 12 (%35,2) hastada orta ve kuvvetli boyanma oranı izlenirken Wilm's tümöründe hiçbir hastada orta ve kuvvetli boyanma izlenmemiştir.

Tümör preparatları pozitif Pivil2 boyanması açısından değerlendirildiğinde germ hücreli tümör ve nöroblastomda diğer solid tümörlere göre istatistiksel açıdan anlamlı fark saptandı ($p<0,05$). Germ hücreli tümörlerde antikorun hem sitoplazmayı hem de çekirdeği pozitif boyadığı saptandı. Tümör alt gruplarına göre bakıldığında ise osteosarkom ve nöroblastom alt gruplarında istatistiksel açıdan diğer gruplara göre anlamlı fark saptandı ($p<0,05$). Tümör gruplarından en fazla negatiflik Wilm's tümörü dokusunda saptanırken öte yandan Wilm's tümörü dışı normal böbrek dokusu glomerül ve çevre dokusunda kuvvetli pozitiflik görülmüştür. Bu durum ileri çalışmalarda anti-Pivil2'nin ilaç olarak kullanılması durumunda organ toksisitesi veya normal dokulara negatif etkisi açısından anlamlı olabilecektir. Aynı zamanda cerrahi sınır belirlemede de faydalı olabilir.

Pivil2'nin biyomarker olarak gösterilmesini konu alan 2010 yılında Liu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 126 arşivlenmiş parafin gömülü meme kanseri dokusu çalışmaya dahil edilmiş, bunların %51'inde zayıf boyanma %32'sinde orta derecede boyanma ve %17'sinde ise kuvvetli boyanma izlenmiş, negatif boyanan doku olmamıştır (92). Boyanma paterni ise nükleer, sitoplazmik ve hem nükleer hem stoplazmik bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise sadece germ hücreli tümörlerde hem stoplazmik hem nükleer boyanma vardı, diğer tümörlerde ise sadece stoplazmik boyanma izlendi. Ayrıca bizim çalışmamızda tümör tipine bakılmaksızın toplam 150 hastanın 77'si negatif olarak boyanırken 42'si zayıf, 16'sı orta derece, 15'ise kuvvetli boyandı.

Yine aynı çalışmada Ki67 ekspresyonu çalışılmış ve %47 olarak bulunmuş, Pivil2 ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştı (92). Bizim çalışmamızda ise patoloji raporunda Ki67 skoru belirtilen 27 hasta için yapılan istatistiksel değerlendirmede de benzer şekilde anlamlı korelasyon saptanmadı ($p>0,05$).

2005 yılında Jae Ho ve arkadaşlarının (93) yaptığı insan ve rat dokuları kullanılarak yapılan bir çalışmada, 20 farklı insan organı ve 9 rat dokusu kullanılmış ve bu dokulardan sadece testis dokusunda Pw12 pozitifliği hem insan hem de ratlarda gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada germ hücreli tümörlerde bizim çalışmaya benzer şekilde Pw12 ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Bizim çalışmamızda ise kontrol dokusu olarak normal insan testis dokusu kullanıldı. 34 germ hücreli tümör dokusundan 6'sı kuvvetli 6'sı ise orta derecede kuvvetli boyanma paterni göstermişti ve bu değerler istatistiksel olarak anlamlıydı. ($p<0,05$). Buna ek olarak germ hücreli tümörlerde hem stoplazmik hem nükleer boyanma paterni elde edilmişti.

2010 yılında Gang ve arkadaşları (81) tarafından yapılan bir çalışmada 91 servikal lezyonu olan hastaya immunohistokimyasal boyama yapılmış ve çok farklı tümör grupları çalışmaya dahil edilmiştir. Bunlardan 36 invazif skuamöz karsinom tanısı olan kesitlerin tümünde Pw12 pozitif bulunmuştur. Ortalama boyanma skoru ise 2+ (orta derecede boyanma) olarak tespit edilmiştir. Normal serviks dokusu dışında diğer prekanseröz dokularda ise yine aynı şekilde pozitif boyanma saptanmış olup, ortalama boyanma skoru ise yine 2+(orta derecede boyanma) olarak tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise belirli bir organa ait değil çok farklı dokulardan elde edilen tümörler kullanıldı. Ortalama boyanma yerine belli gruplara özel boyanma paterni ve oranı hesaplandı. Ancak belli tümörlerde tümör kaynağı ile Pw12 boyaması arasında ilişki bulunamadı.

2010 yılında Lee ve arkadaşlarının (83) yaptığı bir çalışmada, invazif 149 meme biyopsisi Pw12 monoklonal antikoru ile boyanmış ve 125 invazif duktal karsinom tanısı olan vakanın %90'ında ekspresyon gösterilmiştir. Ekspresyon gösterilen dokuların yaklaşık %50'si orta (2+) ve kuvvetli (3+) derecede boyanma gösterirken, karsinoma in situ olan vakalarda bu oran %25'de kalmıştır. Bizim hastalarımızda ise çok farklı tümör grupları olmasına rağmen 150 hastanın %20,4'ünde orta (2+) ve kuvvetli (3+) derecede boyanma tespit edildi. Zayıf boyanan dokular %28,9 olarak hesaplandı. Aynı çalışmada vakaların büyük çoğunluğunda sitoplazmik boyama elde edilmişti. Data verilmemekle birlikte çok az miktarda nükleer boyanma saptanmıştı. Bizim çalışmamızda yine buna benzer şekilde büyük oranda stoplazmik boyanma elde edildi. Oran olarak bakıldığında anlamlı boyanma gösteren germ hücreli tümör ve nöroblastom dışındaki dokular tüm vakaların %58'ini oluşturmaktaydı. Bizim

kullandığımız dokularda germ hücreli tümör dışında doku boyanmalarının hiçbirinde nükleer boyanma görülmedi.

2009 yılında Parvaneh ve arkadaşlarının (94) yaptığı bir çalışmada Pivil2 ekspresyonu mesane kanserinde araştırılmıştır. 70 mesane kanseri dokusu ve 6 normal üroepitelyal dokuda, hücre kültürü ve RT-PCR ile tarama yapılmış ancak dokuların hiçbirinde Pivil2 ekspresyonu gösterilememiştir. Bizim çalışmada ise hücre kültürü ve RT-PCR çalışması yapılmadı, bunun yerine immünohistokimyasal boyama tercih edildi.

2012 yılında Sun Ju ve arkadaşlarının (95) yaptığı çalışmada 60 kolorektal adenokanser vakasının dokuları Pivil2 ile immunohistokimyasal olarak boyanmış ve oranların klinik ve patolojik etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada kemoradyasyon alan hastalar çalışmadan çıkarılmıştır. Vakaların 44'ü (%73) yüksek oranda ($\geq 2+$) ekspresyon göstermiştir. Yüksek ekspresyon derecesinin, derin invazyon, düşük diferansiyasyon derecesi ve perinöral invazyon ile ilişkili olduğu ve bu ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. 5 yıllık sağ kalım oranının ise ekspresyon oranı düşük olanlarda yüksek olanlara göre daha fazla olduğu görülmüştür. Yüksek ekspresyon vaka takibinde kötü prognoz olarak değerlendirilmiştir. Bunların dışında yaş, cins, uzak metastaz, lenf nodu tutulumu, tümör evresi ve venöz invazyon arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Bizim çalışmada ise Pivil2 ekspresyon derecesi ile hastalığın evresi, köken aldığı organ, yaş ve cins açısından anlamlı fark olmadığı saptandı. Bu çalışmaya zıt olarak prognoz açısından değerlendirildiğinde ise sağ kalım oranı ile ekspresyon oranı açısından anlamlı fark bulunamadı. Sağ kalım açısından, nöroblastom vakalarının çoğunlukla (%70) evre 4 iken tanı alması ve klinik takibinde kötü prognoz olması açısından bu tümör grubuyla ilişkili anlamlı yüksek ekspresyon saptanmış olmasına rağmen fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$) (Tablo15).

Tablo15. Evre 4 Nöroblastomda Boyanma Paterni

| | N(%) | Negatif Boyanma | Zayıf Boyanma | Orta Boyanma | Kuvvetli Boyanma | <i>p</i> |
|--------------------|------|-----------------|---------------|--------------|------------------|----------|
| Evre 4 Nöroblastom | 22 | 5(%22,7) | 8(%36,4) | 4(%18,2) | 5(%22,7) | 0,8 |

* $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı

2010 yılında Li ve arkadaşlarının (96) yaptığı bir çalışmada 75 kolon kanserli ve 75 kanserli olmayan doku argonaute ailesi üyeleri (piwil1, Piwil2, piwil3, piwil4) ile immunohistokimyasal olarak boyanmıştır. Tümöral dokularda sitoplazmik boyanma paterni saptanmış ve Piwil2'nin boyanması açısından bakıldığında, 75 kanser vakasının 1'i negatif, 1'inde zayıf boyanma (1+), 46'sında orta derece boyanma (2+), 27 hastada ise kuvvetli boyanma(3+) saptanmıştır. Nontümöral dokularda 75 vakanın 23'ü negatif 30'u zayıf pozitif, 20'si orta derece pozitif ve 2 vaka ise kuvvetli boyanmıştır. Hastaların yaşı, cinsiyeti, uzak metastazı ve lenf nodu tutulumu açısından bakıldığında ise istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmamıştır. Bu çalışmadaki temel tespit Piwil2'nin tümöral dokularda anlamlı ölçüde daha fazla eksprese edilmesi olmuştur. Bizim çalışmamızda ise tümör dışı doku kullanılmadı. Ancak birden fazla tümör dokusunun karşılaştırmasını yapma olanağı vardı. Bizde de yine bu çalışmaya benzer şekilde yaş, cinsiyet, evre ve uzak metastaz açısından boyanma oranları ile değerlendirildiğinde istatistiksel açıdan anlamlı fark tespit edilemedi ($p > 0,05$).

2012 yılında Yang ve arkadaşlarının (97) gastrik kanserli hastalarda yaptığı bir çalışmada 182 hasta değerlendirilmiştir. Çalışmada tüm argonaute ailesi proteinleri ile boyama yapılmıştır. (Piwil1,2,3,4) Bütün hastaların doku spesmeni alınırken tümörün en az 1,5 cm ötesinde bulunan sağlam dokudan da örnek alınmıştır. Piwil2 antikoru dilusyonu olarak 1/300 oranı kullanılarak boyama yapılmıştır. Piwil2 ile malign dokularda sitoplazmik olarak boyanma tespit edilmiştir. Tüm argonaute proteinleri (Piwil1,2,3,4) tümöral dokularda anlamlı oranda pozitif boyanma göstermiştir. Bu çalışmada, boyanma oranları ile 5 yıllık sağ kalım arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Ancak diğer benzer çalışmalar ve bizim çalışmada olduğu gibi yaş, cinsiyet, evre ve metastaz gibi parametlerde anlamlı ilişki saptanamamıştır. Sonuç olarak bu çalışmada

Piwil2'nin artan ekspresyonu kötü prognostik faktör olarak değerlendirilmiştir. Bizim çalışmamız boyama aşamasında ancak 1/100 oranında dilüsyonlar ile kontrol doku pozitif olarak boyanabildi. Yine bu çalışmayla benzer şekilde malign dokularda sitoplazmik boyanma elde edildi. 5 yıllık sağ kalım açısından daha önce de belirtildiği gibi antikör boyanma ilişkisinin germ hücreli tümör ve nöroblastomda olması, çoğu evre 4 vakalardan oluşan kötü prognozlu bir tümörde anlamlı pozitiflik saptanmış olması bizim sonuçlarımız ve bu çalışmanın ortak özellikleridir.

Literatürde yapılan çalışmalarla mukayese edildiğinde bu çalışma vaka sayısı bakımından yeterli olmasına rağmen tümör çeşitliliği veya alt tipleri bakımından fazla miktarda doku içermekte idi. Yapılan diğer çalışmalarda genellikle tek bir tümör tipi değerlendirilmiş ve karşılaştırmalar normal bir dokuyla kıyaslama şeklinde yapılmıştır. Bizim çalışmamızda ise farklı tümör tiplerindeki antikör boyanma oranları değerlendirildi ve bu oranların diğerleri ile olan farkları araştırıldı.

Bizim çalışmamız çocukluk çağı solid tümörlerinde yapılan ilk çalışma idi. Daha önce yapılan çalışmalara bakıldığında tümü erişkin çalışması idi. Bu yönü ile bu çalışma aynı zamanda çocuk kanserlerinde yapılan ilk çalışmadır.

Literatürdeki çalışmalar ile ilgili genelleme yapılacak olursa materyal ve metod açısından çoğunlukla immunohistokimya, hücre kültürü ve genetikte çalışılan RT-PCR kullanılmıştır. Dokuların immunohistokimyasal boyanması yapıldıktan sonra cell-line kültürü ve RT-PCR ile doğrulama veya sonuçları destekleme yapılmıştır. Bizim çalışmamızı kısıtlayan en önemli unsur hücre kültürü ve PCR yapılamaması olmuştur. (94)

Çalışmalar incelendiğinde gerek immunohistokimya gerek cell-line kültürü gerekse RT-PCR sonucunda hemen hemen tüm çalışmalarda benzer sonuçlar alınması bizim çalışmada da rasyonel sonuçlar elde ettiğimizi göstermesi açısından önemlidir.

Elde ettiğimiz verilere göre antikörün boyanma oranı ile hastanın yaşı, cinsiyeti, tümör evresi, uzak metastaz olup olmaması açısından anlamlı ilişki bulunamadı. Yani orta derecede veya kuvvetli boyanan dokular belli bir kritere uymuyordu.

Proliferasyon indeksini gösteren Ki67 açısından önceki çalışmalarda değerlendirme bildirilmemiştir. Bizim çalışmada ise sadece 2008 sonrası tanı alan vakalarda Ki67 belirtildiği için sadece 27 hastada değerlendirme yapıldı. Hastaların Ki67 değerleri %1-95 arasında değişmekte idi ve ortalaması %30 civarında idi. Ki67 pozitifliği ile Pivil2 boyanma paterni arasında ilişki tespit edilemedi. Çalışmada yer alan ve değerlendirdiğimiz nekroz ve mitoz oranlarını ise önceden kullanan bir çalışma yoktu. Her iki parametreye baktığımızda mitoz açısından anlamlı değer saptanamadı, ancak nekroz açısından sınırdaki değer ($p=0,06$) bulundu.

Literatürde organ tutulumu açısından en sık böbrek kaynaklı tümörler çalışmada mevcuttu. Ancak çok fazla sayıda organ tutulumunu içeren vaka olması nedeniyle anlamlı bir değerlendirme yapılamadı. Pivil2 en fazla germ hücreli tümör ve nöroblastom grubunda kuvvetli boyanma gösterdi. Bu grupta özellikle yolk salk tümörlerde belirgin boyanma vardı. En sık tutulan organ ise germ hücreli tümör grubunda over iken nöroblastomda batin içi sempatik zincirdi. Yine aynı zamanda over dokusu ve sempatik zincirde orta derece ve kuvvetli boyanma daha fazla görüldü. Tek disgerminom tipi ise yine over kaynaklı ve 3+ boyanma paternine sahipti.

Bu çalışmada çocukluk çağı solid tümörlerinde ilk kez Pivil2 ile immünohistokimyasal olarak boyanma paterni gösterildi. Nöroblastom ve germ hücreli tümörde Pivil2'nin istatistiksel açıdan anlamlı ölçüde pozitif olduğu gösterildi. Sarkomlar içerisinde osteosarkomda kuvvetli Pivil2 boyanması da anlamlı idi. Diğer solid tümörlerde ise Pivil2 boyanmasında anlamlı pozitiflik görülmedi. Özellikle Wilm's tümöründe negatif boyanma dikkati çekti. İleri araştırmalar nöroblastom ve germ hücreli tümörler üzerinden hücre kültürü ve PCR çalışılarak çalışmanın yürütülmesi ve ekspresyonu fazla olan dokularda argonoute proteinine karşı antikor kullanılarak yeni tedavi yaklaşımlarının değerlendirilmesi olacaktır.

Bu çalışma sonucunda, nöroblastom hastalarında, germ hücreli tümör hastalarında ve osteosarkom hastalarında Pivil2 pozitifliği literatürde ilk kez gösterilmiştir. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda bu kanserlerde Pivil2 ile hedef tedavileri gündeme gelebilir.

6. SONUÇLAR

1. Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Pediatri Hematoloji Onkoloji Departmanı tarafından 2000-2011 yılları arasında takip edilen ve Erciyes Üniversitesi Patoloji Ana Bilim Dalı tarafından solid tümör tanısı verilmiş 150 hasta değerlendirildi.
2. 150 hastanın 30 hasta (%20) nöroblastom, 42 hasta (%28) Wilm's tümörü, 44 hasta (%29,3) sarkom, 34 hasta ise (%22,7) germ hücreli tümör tanısı almıştı.
3. Çalışmaya yaşları 1 ile 18 yaş arasında değişen hastalar alındı. Hastaların yaş ortalaması $9,87 \pm 5,3$ yıl idi.
4. Hastaların 76'sı (%50,7) erkek, 74'ü (%49,3) kız idi.
5. Toplam 150 hastanın 77'sinde (%50,7) Piv12 antikör boyanması görülmedi. 42 hastada (%28) zayıf boyanma (+), 16 hasta (%10,7) orta düzeyde (++), 15 hastada (%10) ise kuvvetli boyanma (+++) saptandı.
6. Tümör gruplarına göre bakıldığında nöroblastom tanısı olan 30 hastanın 5'inde (%16,7) orta derecede boyanma, 5'inde (%16,7) kuvvetli boyanma görüldü.
7. Nöroblastomda görülen Piv12 ile pozitif boyanma oranı istatistiksel açıdan anlamlıydı ($p < 0,05$).
8. Nöroblastom hastalarında yaş, cinsiyet, evresi, n-myc amplifikasyonu ve metastaz durumunun boyanma oranını etkilemediği görüldü ($p > 0,05$).

9. Wilm's tümöründe ise 42 boyamadan hiçbir hastada orta veya kuvvetli boyanma görülmedi ($p<0,05$).
10. Wilm's tümöründe görülen Pivil2 ile negatif boyanma oranı istatistiksel açıdan anlamlıydı ($p<0,05$).
11. Wilm's tümöründe hastalığın evresi, histoloji tipi ve prognoz ile Pivil2 kuvvetli pozitif boyanma açısından anlamlı fark görülmedi ($p>0,05$).
12. Sarkom tanısı almış olan 44 hastanın 5'inde (%11,4) orta derecede boyanma, 4'ünde (%9,1) ise kuvvetli boyanma görüldü ($p>0,05$).
13. Sarkomlar grubunda osteosarkomda görülen Pivil2 ile pozitif boyanma oranı rabdomyosarkom ve Ewing sarkoma göre istatistiksel olarak anlamlı farklı idi ($p<0,05$).
14. Sarkomlar grubunda evre ve prognoz açısından Pivil2 kuvvetli pozitif boyanma açısından anlamlı fark görülmedi ($p>0,05$).
15. Germ hücreli tümör tanısı olan 34 dokunun boyanmasında 6'sında (%17,6) orta derecede boyanma, 6'sında (%17,6) kuvvetli boyanma görüldü.
16. Germ hücreli tümörlerde görülen bu boyanma oranı istatistiksel açıdan anlamlıydı ($p<0,05$).
17. Germ hücreli tümörlerde diğer tümörlerde görülmeyen hem stoplazmik hem nükleer boyanma paterni izlendi. Bu durum Pivil2'nin germ hücre gelişim yollarında etkili olmasıyla ilişkili olabilir.
18. Hastaların yaşı, cinsiyeti, evresi, metastaz durumu, histolojik olarak ise nekroz ve mitoz durumunun boyanma oranını etkilemediği görüldü ($p>0,05$).
19. Çalışmaya alınan 150 hastadan 27'sinde Ki67 skoru değerlendirildi. 15 (%55,6) hastanın Ki67 değeri düşük bulunurken 12 (%44,4) hastanın yüksek saptandı. Yüksek Ki67 değeri bulunan 12 hastadan 1'inde (%8,3) kuvvetli boyanma görüldü. Yüksek Ki67 skoru ile Pivil2 boyanma oranı istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).

20. Mitoz oranı açısından hastalar değerlendirildiğinde fazla miktarda mitoz olan hastalarla Pivl2 boyanma oranı istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).
21. Nekroz oranı açısından hastalar değerlendirildiğinde fazla miktarda nekroz olan hastalarla Pivl2 boyanma oranı istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).

KAYNAKLAR

1. Kakarala M, Wicha MS. Cancer stem cells: implications for cancer treatment and prevention. *Cancer J* 2007;13:271-5.
2. Cho RW, Clarke MF. Recent advances in cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 2008;18:48-53.
3. Justyna Gil, Agnieszka S, Karolina AP, et al. Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy *J App Genet* 49, 2008, pp. 193–199
4. Jun Zhao, Huaqin Sun, Wenqian Deng, Piwi-Like 2 Mediates Fibroblast Growth Factor Signaling during Gastrulation of Zebrafish Embryo. *Tohoku J. Exp. Med.*, 2010,222, 63-68
5. Thatchawan T, Chureerat P, Apiwat M. The association between Piwil2 expression and LINE-1methylation in cancer cells. *Asian Biomedicine*, 2009,3;279-285
6. Ye Y, Yin D-T, Chen L, Zhou Q, Shen R, et al. Identification of Piwil2-Like (PL2L) Proteins that Promote Tumorigenesis. *PLoS ONE* 2010,5 :10
7. Stil ler CA. Epi de mi o logy and genetics of childhood cancer. *Oncogene* 2004; 3:6429-44.
8. Tezer Kutluk: Çocukluk Çağı Kanserlerinin Epidemiyolojisi ve Türkiye'deki Durum. 2009-2011. *Turkiye Klinikleri J Pediatr Sci* 2009;5:1-8
9. Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, Carmell MA. *Nature* 442, 199-202, 2006.
10. Par kin DM, Stil ler CA, Dra per GJ, Bi e ber CA. The in ter na ti o nal in ci den ce of child hood cancer. *Int J Cancer* 1998;42:511-20.
11. Brodeur GM, Maris JM. Neuroblastoma. In: Pizzo PA, Poplack DG (eds). *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. 4th edition. Lippincott Williams & Wilkins; 2001:933-70.
12. Gurney JG, Ross JA, Wall DA, Bleyer WA, Severson RK, Robison LL. Infant cancer in the U.S.: histology-specific incidence and trends, 1973 to 1992. *J Pediatr Hematol Oncol* 1997; 19:428-32

13. Brodeur GM, Seeger RC, Barrett A, et al. International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. *S Clin Oncol* 1988; 6:1874-81.
14. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* 1993; 11:1466-77.
15. Gatta G, Capocaccia R, Stiller C, et al; Eurocare Working Group. Childhood cancer survival trends in Europe: a Eurocare Working Group study. *J Clin Oncol* 2005; 23:3742-51.
16. Birch JM, Breslow N: Epidemiologic Features of Wilm's tumor. *Hematol Oncol Clin North Am* 9:1157, 1995.
17. Wiener JS, Coppes MJ, Ritchey ML: Current concepts in the biology and management of Wilm's tumor. *J Urol* 159: 1316, 1998
18. McLorie GA. Wilm's tumor (nephroblastoma). *Curr Opin Urol* 2001; 11:567-70.
19. Akyüz C., Yalcin B, Yidiz I, et al. Treatment of Wilm's tumor : A report from Turkish Pediatric Oncology Group (TPOG) *Pediatric Blood Cancer* 2004; 43:422
20. Neville HL, Ritchey ML. Wilm's tumor. Overview of National Wilm's tümörü' Tumor Study Group results. *Urol Clin North Am* 2000; 27: 435-42.
21. Qualman SJ, Bowen J, Amin MB, et al. Members of the Cancer Committee, College of American Pathologists. Protocol for the examination of specimens from patients with Wilm's tumor (nephroblastoma) or other renal tumors of childhood. *Arch Pathol LabMed* 2003; 127: 1280-9
22. Wexler LTT, Crist WM, Herman LJ. Rhabdomyosarcoma and the undifferentiated sarcomas. In: Pizzo PA, Poplack DG (eds), *Principles and Practice of Pediatric Oncology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2002, pp. 939-972
23. Horn RC Jr, Enterline HT. Rhabdomyosarcoma: a clinicopathological study and classification of 39 cases. *Cancer* 1958;1 pp.181.
24. Flamant F, Radary C, Rey A et al. Treatment of non metastatic rhabdomyosarcoma in childhood and adolescence: Results of the second study of the International Society of Pediatric Oncology-MMT 84. *Eur J Cancer* 1998;34:pp.1050-1062.

25. Akyüz C, İlhan, Kutluk T, Büyükpamukçu M. Primary osteosarcoma presenting in axial bones in childhood. Turk J Pediatr 1995; 37: s.375-81.
26. Atahan IL, Akyol FH, Gürkaynak M, Büyükpamukçu M, Gököz A, Ünsal M. Post-irradiation osteosarcoma of the iliac bone: A case report. Turk J Pediatr 1989; 31:s.227-31
27. Robert E, Fechner M.D, Stacey E, Mills MD. Armed Forces Institute of Pathology. Tumors of the bones and joints. 1993
28. K. Krishnan Unni. Dahlin's Bone Tumors; General Aspects and data on 11087 Cases Lippincott-Raven Philadelphia 1996
29. Jurgens H, Exner U, Gadner H, et al. Multidisciplinary treatment of primary Ewing's sarcoma of bone: a 6-year experience of a European Cooperative Trial. Cancer 1988;61:23
30. Schajowicz F, Ewing's sarcoma and reticulum-cell sarcoma of bone. With special reference to the histochemical demonstration of glycogen as an aid to the differential diagnosis. J Bone Joint Surg [Am] 1959;41:349-56.
31. Boyer CW Jr, Brickner TJ Jr, Perry RH. Ewing's sarcoma: case against surgery. Cancer 1967;10:1602
32. Suit HD. Ewing's sarcoma: treatment by radiation therapy. In Tumors of bone and soft tissue. Chicago: Year Book Medical Publishers, 1965;191
33. Jenkin RD. Long-term follow-up of Ewing's sarcoma of bone. (editorial: comment) Int J Radiat Oncol Biol Phys 1991;20:639
34. Cushing B, Perlman EJ, Marina NM, et al. Germ Cell Tumors In: Pizzo PA, Poplack DG, eds. Principles and Practice of Pediatric Oncology 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. 2006; 1116-1138.
35. Schneider DT, Schuster AE, Fritsch MK, et al. Multipoint imprinting analysis indicates a common precursor cell for gonadal and non-gonadal pediatric germ cell tumors. Cancer Res 2001;61:7268-7276.
36. Yarış N. Çocukluk Çağı Germ Hücre Tümörleri. Klinik Gelişim 2007 ;132

37. Cushing B, Giller R, Ablin A, et al. Surgical resection alone is effective treatment for ovarian immature teratoma in children and adolescent: a report of Pediatric Oncology Group and the Children's Cancer Group. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181:353-358
38. Dehner LP. Gonadal and extragonadal germ cell neoplasia of childhood. *Human Pathol* 1983; 14:493-511.
39. Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H. Critical parameters for isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*. 22:625-634:2004
40. Karagöz, E. (2007). Kordon Kanı Kök Hücreleri ve Kordon Kanı Bankacılığı Tarihiçesi. *Güneş Tıp Kitabevi*, 20, 325-346
41. Görkey Ş. Kutlay N., Güven T., ve ark. Türkiye Biyoetik Derneği Kök Hücre Araştırmaları ve Uygulamaları Kurulu Kök Hücre Araştırmalarının Etik ve Hukuki Boyutu (1st ed.) 2009
42. Rajasekhar VK, Vemuri MC, *Regulatory Networks in Stem Cells, Stem Cell Biology and Regenerative Medicine*, 13DOI 10.1007/978-1-60327-227-8 2, c Humana Press, a part of Springer Science+Business Media, LLC 2009
43. Spemann H. *Embryonic development and induction*. New Haven, London: Yale University Press; H. Milford, Oxford University Press; 1938.
44. Sell S. *Stem cells handbook*. Totowa, NJ: Humana Press; (18th ed) 2004.
45. Orkin SH. Stem cell alchemy. *Nature* 11:1212-1213,2000.
46. Keller G, Snodgrass HR. Human embryonic stem cells: The future is now. *Nature Med* 5:151-152, 1999
47. Annas GJ, Caplan A, Elias S. Stem cell politics, ethics and medical progress. *Nature Med* 5:1339-1341,1999.
48. Orkin SH. Diversification of hematopoietic stem cells to specific lineages. *Nature Review Genetics* 1:57-64,2000.
49. Fortier LA. Stem cells: classifications, controversies and clinical applications. *Vet Surg*. 2005 Sep;34:415-23
50. Verfaillie C. Stem cell plasticity. *Hematology*.2005;10 Suppl 1:293-6

51. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow derived stem cells. *Blood*.2003;102:3483-93.
52. Martin-Rendon E, Watt SM. Stem cell plasticity. *Br J Hematol*.2003;122; 877-91.
53. Assmus B, Schachinger V, Teupe C et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction. *Circulation* 2002;106:3009-17
54. Thomson JA, Itskowitz J, Sharipo SS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*.1998;282:1145
55. Stewart R, Stojkovic M, Lako M. Mechanisms of self renewal in human embryonic stem cells. *European J Cancer*. 2006;42;1257-72.
56. Daley GQ, Goodell MA, Synder EY. Realistic prospects for stem cell therapeutics. *Hematology*. 2003;398-418.
57. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK et al. Isolated allogeneic bone marrow derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jun 25;99:8932-7
58. Bertrand JY, Giroux S, Golub R, Klaine M, Jalil A, Boucontet L, Godin I, Cumano A. Characterization of purified intraembryonic hematopoietic stem cells as a tool to define their site of origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005;102:134–139.
59. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(7):3983-8.
60. Mimeault M, Hauke R, Mehta PP, et al. Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancers. *J Cell Mol Med* 2007;11:981-1011
61. Singh SK, Clarke ID, Hide T, et al. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 2004;23:7267-73
62. Visvader J, Lindem J, Jane E. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions *The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Melbourne, Victoria, Australia and Department of Medical Oncology* 2008; 8:(757)

63. Ailles LE, Weissman IL. Cancer stem cells in solid tumors. *Curr Opin Biotechnol* 2007;18:460-6.
64. Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 2004; 23:7274-82.
65. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:10158-63.
66. Woodward WA, Sulman EP. Cancer stem cells: markers or biomarkers? *Cancer Metastasis Rev* 2008;27:459-70.
67. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007;445:111-5.
68. Singh SK, Clarke ID, Hide T, et al. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 2004;23:7267-73.
69. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004;432:396-401.
70. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:10158-63.
71. Kakarala M, Wicha MS. Cancer stem cells: implications for cancer treatment and prevention. *Cancer J* 2007;13:271-5
72. Jun Z, Huaqin S, Wenqian DP. Like 2 Mediates Fibroblast Growth Factor Signaling during Gastrulation of Zebrafish Embryo. *Tohoku J. Exp. Med.*, 2010,222, 63-68
73. Thatchawan T, Chureerat P, Apiwat M. The association between Piwil2 expression and LINE-1methylation in cancer cells. *Asian Biomedicine Vol.3 No.* 2009;279-285
74. Qiuling W, Amber W, Nanette H. Bishopric: Expression Of The Argonaute Protein Piwil2 In Mitotic Mesenchymal Stem Cells. RMSB 1044, University of Miami School of Medicine, Miami, Florida 2008.

75. Lee JH, Engel W, Nayernia K. Stem cell protein Piwil2 modulates expression of murine spermatogonial stem cell expressed genes *Mol Reprod Dev.* 2006 Feb;7:173-9.
76. Liu JJ, Shen R, Chen L, et al. Piwil2 is expressed in various stages of breast cancers and has the potential to be used as a novel biomarker. *Int J Clin Exp Pathol.* 2010 Mar 20;3:328-37.
77. Jae Ho Lee1, Dorothea S, Gerald W. Stem-cell protein Piwil2 is widely expressed in tumors and inhibits apoptosis through activation of Stat3/Bcl-XL pathway. *Human Molecular Genetics*, 2006, Vol.15, No.2 201–211 doi:10.1093
78. Brower-Toland B, Findley SD, Jiang L, et al. Drosophila PIWI associates with chromatin and interacts directly with HP1a. *Genes &Development* 2007, 21: 2300–2311.
79. Yin H, Lin H. An epigenetic activation role of Piwi and a Piwi-associated piRNA in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 2007, 450: 304–308.
80. Ye Y, Yin DT, Chen L, et al. Identification of Piwil2-like (PL2L) proteins that promote tumorigenesis. *PLoS One.* 2010, 20;5:e13406.
81. Gang He, Li Chen, Yin Ye. Piwil2 expressed in various stages of cervical neoplasia is a potential complementary marker for p16INK4a *Am J Transl Res.* 2010; 2: 156–169.
82. Cox DN, Chao A, Baker J, et al. (1998) A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell selfrenewal. *Genes Dev* 12: 3715–3727
83. Lee JH, Schutte D, Wulf G, et al. (2006) Stem-cell protein Piwil2 is widely expressed in tumors and inhibits apoptosis through activation of Stat3/Bcl-XL pathway. *Hum Mol Genet* 15: 201–211.
84. Yin H, Lin H (2007) An epigenetic activation role of Piwi and a Piwi-associated piRNA in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 450: 304–308.
85. Rosai J. Respiratory tract. In: Rosai and Ackerman's *Surgical Pathology*. 9th ed. China, 2004, Mosby, pp.305-458.
86. McCluggage WG. Immunohistochemistry as a diagnostic aid in cervical pathology. *Pathology* 2007 ;39:97-111

87. Khleif SN, Degregori J, Yee CL. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Cell Biology* 1996; 93: 4350-4354.
88. Tavassoli FA. General consideration. In: *Pathology of the Breast*. ed.2. Connecticut, 1999, Appelton & Lange, pp.26-62.
89. Bai M, Agnantis NJ, Kamina S, et al. In vivo cell kinetics in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res* 2001; 3: 276-283.
90. Canda, Ş. ve Canda, T. *Temel Patoloji*, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları/A-1, İzmir, 1982.
91. Kissane, J.M. *Anderson's Pathology*, Chapter:2, pp.67-110, The C.V. Mosby Company, St. Louis, 1990
92. Liu JJ, Shen R, Chen L, et. al. Piwil2 is expressed in various stages of breast cancers and has the potential to be used as a novel biomarker. *Int J Clin Exp Pathol*. 2010, 20;3:328-37.
93. Jae HL, Dorothea S, Gerald Wulf: Stem-cell protein Piwil2 is widely expressed in tumors and inhibits apoptosis through activation of Stat3/Bcl-XL pathway. *Human Molecular Genetics*, 2006, Vol.15, No.2 201–211 doi:10.1093
94. Parvaneh N, Mehdi FM, et. al. Absence of PIWIL2 (HILI) expression in human bladder cancer cell lines and tissues *Cancer Epidemiology* 2009,33; 271–275
95. Sun Ju Oh, Su Mi Kim et al. Clinicopathologic Implications of PIWIL2 Expression in Colorectal Cancer 2012; 46: 318-323
96. Lan Li, Chaohui Yu et al. Argonaute proteins: potential biomarkers for human colon cancer *BMC Cancer* 2010, 10:38
97. Yang W, Yanxia L, et al. The PIWI protein acts as a predictive marker for human gastric cancer *Int J Clin Exp Pathol* 2012;5:315-325

EKLER

EK 1. Çalışmaya Alınan Hastaların Detaylı Bilgileri

| | patolojino | cins | yas | tm | cesit | ki67 | nekroz | mitoz | organ | yüzde | boyanmaoranı | dosyano | evre |
|----|------------|------|-----|-------|-------|------|--------|-------|-------|-------|--------------|---------|------|
| 1 | 8896.11 | K | 7 | wilms | wilms | . | hafif | az | bb | 75 | + | 1986381 | 3 |
| 2 | 339.10 | K | 9 | wilms | wilms | . | hafif | az | bb | 0 | negatif | 1813483 | 2 |
| 3 | 7074.10 | K | 7 | wilms | wilms | . | ileri | az | bb | 0 | negatif | 1788155 | 4 |
| 4 | 8103.10 | K | 6 | wilms | wilms | 10 | orta | fazla | bb | 0 | negatif | 1862091 | 3 |
| 5 | 11605.11 | E | 5 | wilms | wilms | 30 | yok | fazla | bb | 10 | + | 2001580 | 2 |
| 6 | 10312.11 | E | 4 | wilms | wilms | . | hafif | az | bb | 30 | + | 1993459 | 1 |
| 7 | 6278.12 | K | 6 | wilms | wilms | 95 | hafif | az | bb | 0 | + | 2077573 | 1 |
| 8 | 7574.12 | E | 2 | wilms | wilms | 50 | yok | az | bb | 0 | negatif | 2079924 | 1 |
| 9 | 853.00 | E | 4 | wilms | wilms | . | hafif | fazla | bb | 0 | negatif | 1024206 | 1 |
| 10 | 5499.02 | K | 2 | wilms | wilms | . | yok | az | bb | 0 | negatif | . | 1 |
| 11 | 4766.00 | K | 4 | wilms | wilms | . | hafif | fazla | bb | 0 | negatif | 1043648 | 3 |
| 12 | 7375.00 | E | 2 | wilms | wilms | . | hafif | az | bb | 10 | + | 1057863 | 1 |
| 13 | 11039.12 | K | 7 | wilms | wilms | 80 | yok | az | bb | 0 | negatif | 2084354 | 3 |
| 14 | 10466.07 | K | 11 | wilms | wilms | . | ileri | az | bb | 30 | + | 1877471 | 1 |
| 15 | 4515.03 | E | 18 | wilms | wilms | . | hafif | az | bb | 0 | negatif | 1208152 | 3 |
| 16 | 16644.12 | E | 2 | wilms | wilms | 70 | hafif | az | bb | 75 | + | 2168998 | 3 |
| 17 | 13966.12 | K | 5 | wilms | wilms | . | yok | yok | bb | 10 | + | 2151048 | 3 |
| 18 | 11074.08 | E | 9 | wilms | wilms | . | yok | yok | bb | 0 | negatif | 1678031 | 2 |
| 19 | 9534.05 | K | 9 | wilms | wilms | . | hafif | az | bb | 10 | + | 2125010 | 2 |
| 20 | 3748.03 | E | 10 | wilms | wilms | . | yok | fazla | bb | 0 | + | 1221756 | 1 |
| 21 | 11327.07 | E | 9 | wilms | wilms | . | yok | yok | bb | 0 | negatif | 1576342 | 3 |
| 22 | 1420.04 | K | 13 | wilms | wilms | . | yok | yok | bb | 30 | + | 1211062 | 3 |
| 23 | 11849.08 | E | 6 | wilms | wilms | . | yok | yok | bb | 0 | negatif | 1671633 | 2 |
| 24 | 8754.08 | E | 16 | wilms | wilms | . | yok | yok | bb | 50 | + | 1399453 | 1 |
| 25 | 7127.05 | E | 14 | wilms | wilms | . | yok | yok | bb | 80 | + | 1383841 | 3 |
| 26 | 9107.07 | K | 13 | wilms | wilms | 2 | ileri | az | bb | 80 | + | 1540480 | 4 |
| 27 | 13261.08 | E | 6 | wilms | wilms | . | yok | az | bb | 0 | negatif | 1652008 | 1 |
| 28 | 6535.05 | E | 9 | wilms | wilms | . | hafif | yok | bb | 0 | negatif | 1352205 | 2 |
| 29 | 5653.09 | E | 8 | wilms | wilms | . | ileri | yok | bb | 0 | negatif | 1705654 | 1 |

| | patolojino | cins | yas | tm | cesit | ki67 | nekroz | mitoz | organ | yüzde | boyanmaoranı | dosyano | evre |
|----|------------|------|-----|--------|---------------|------|--------|-------|--------|-------|--------------|---------|------------|
| 30 | 4792.05 | E | 10 | wilms | wilms | . | yok | fazla | bb | 40 | + | 1351909 | 1 |
| 31 | 14029.08 | E | 10 | wilms | wilms | . | yok | az | bb | 0 | negatif | 1216935 | 2 |
| 32 | 16625.10 | K | 3 | wilms | wilms | 1 | yok | az | bb | 0 | negatif | 1714564 | 1 |
| 33 | 1393.00 | K | 8 | wilms | wilms | . | hafif | fazla | bb | 0 | negatif | 1021133 | 2 |
| 34 | 10449.02 | E | 13 | wilms | wilms | . | hafif | az | bb | 0 | negatif | 1186448 | 3 |
| 35 | 7605.07 | K | 5 | wilms | wilms | . | yok | az | bb | 0 | negatif | 1540480 | 4 |
| 36 | 6683.04 | E | 12 | wilms | wilms | . | yok | fazla | bb | 0 | negatif | 1321228 | 2 |
| 37 | 13345.07 | E | 7 | wilms | wilms | . | yok | yok | bb | 0 | negatif | 1494697 | 1 |
| 38 | 2415.06 | E | 9 | wilms | wilms | . | yok | yok | bb | 0 | negatif | 1397499 | 4 |
| 39 | 9046.99 | K | 1 | wilms | wilms | . | yok | az | bb | 0 | negatif | 1015010 | 1 |
| 40 | 4567.99 | E | 2 | wilms | wilms | . | yok | yok | bb | 0 | negatif | 984108 | 1 |
| 41 | 1229.98 | K | 4 | wilms | wilms | . | yok | yok | bb | 0 | negatif | 881133 | 1 |
| 42 | 1026.00 | K | 8 | wilms | wilms | . | yok | yok | bb | 0 | negatif | 1021133 | 1 |
| 43 | 8160.07 | K | 13 | germhc | yolk salk | . | yok | yok | sakral | 0 | negatif | 1315079 | lokalize |
| 44 | 6146.05 | K | 18 | germhc | disgerminom | . | ileri | yok | over | 60 | +++ | 1390135 | lokalize |
| 45 | 4181.02 | K | 2 | germhc | yolk salk | . | ileri | yok | sakral | 10 | + | 1203568 | lokalize |
| 46 | 4240.09 | K | 6 | germhc | yolk salk | . | yok | yok | sakral | 0 | negatif | 1731356 | metastatik |
| 47 | 7603.09 | K | 17 | germhc | yolk salk | . | hafif | yok | over | 80 | ++ | 1713420 | lokalize |
| 48 | 999.05 | K | 10 | germhc | yolk salk | . | yok | yok | LAP | 75 | +++ | 1319579 | lokalize |
| 49 | 4044.98 | K | 15 | germhc | immatur te... | . | yok | yok | over | 0 | negatif | . | lokalize |
| 50 | 2467.09 | K | 6 | germhc | yolk salk | . | yok | yok | sakral | 0 | negatif | 1710703 | metastatik |
| 51 | 2123.08 | E | 7 | germhc | yolk salk | . | ileri | fazla | mesane | 75 | ++ | 1592588 | lokalize |
| 52 | 8125.06 | E | 11 | germhc | yolk salk | . | yok | yok | testis | 20 | + | 2169047 | lokalize |
| 53 | 6619.99 | E | 2 | germhc | yolk salk | . | orta | yok | testis | 0 | negatif | . | lokalize |
| 54 | 4667.06 | K | 9 | germhc | yolk salk | . | ileri | yok | vajen | 80 | +++ | 2101765 | metastatik |
| 55 | 11155.04 | K | 18 | germhc | yolk salk | . | hafif | yok | barsak | 0 | negatif | 1272900 | lokalize |
| 56 | 8344.04 | K | 16 | germhc | yolk salk | . | hafif | fazla | over | 0 | negatif | 1319793 | lokalize |
| 57 | 6284.11 | K | 11 | germhc | yolk salk | . | hafif | yok | over | 20 | ++ | 1968711 | lokalize |
| 58 | 8611.10 | E | 5 | germhc | yolk salk | . | hafif | yok | testis | 80 | ++ | 1827776 | lokalize |

| | patolojino | cins | yas | tm | cesit | ki67 | nekroz | mitoz | organ | yüzde | boyanmaoranı | dosyano | evre |
|----|------------|------|-----|--------|----------------|------|--------|-------|--------------|-------|--------------|---------|------------|
| 59 | 5617.04 | E | 9 | germhc | immatur te... | . | yok | yok | sakral | 20 | +++ | 1348960 | lokalize |
| 60 | 1436.05 | K | 8 | germhc | immatur te... | . | yok | az | sakral | 0 | negatif | . | lokalize |
| 61 | 7662.09 | K | 4 | germhc | immatur te... | . | yok | yok | sakral | 0 | negatif | 1713026 | lokalize |
| 62 | 16443.10 | K | 18 | germhc | immatur te... | . | yok | yok | over | 0 | negatif | 1874233 | lokalize |
| 63 | 4378.10 | K | 4 | germhc | immatur te... | . | yok | yok | batın içi | 0 | negatif | 1860782 | lokalize |
| 64 | 2409.11 | K | 11 | germhc | immatur te... | . | yok | yok | over | 30 | ++ | 1856347 | lokalize |
| 65 | 1442.05 | K | 8 | germhc | immatur te... | . | yok | az | sakral | 40 | + | 2078094 | lokalize |
| 66 | 9877.04 | K | 10 | germhc | matur terat... | . | yok | yok | sakral | 0 | negatif | 1342871 | lokalize |
| 67 | 13655.08 | K | 15 | germhc | matur terat... | . | yok | yok | over | 0 | negatif | 1673116 | lokalize |
| 68 | 12058.06 | E | 7 | germhc | matur terat... | . | yok | yok | sakral | 50 | +++ | 1489554 | lokalize |
| 69 | 7228.11 | K | 3 | germhc | matur terat... | . | yok | yok | batın içi | 0 | negatif | 1963562 | lokalize |
| 70 | 16014.10 | K | 14 | germhc | matur terat... | . | yok | yok | over | 40 | ++ | 1874511 | lokalize |
| 71 | 6920.10 | E | 4 | germhc | matur terat... | 60 | yok | az | testis | 40 | +++ | 1856171 | lokalize |
| 72 | 1605.10 | K | 14 | germhc | matur terat... | . | yok | yok | over | 30 | + | 1499818 | lokalize |
| 73 | 3270.10 | K | 18 | germhc | matur terat... | . | yok | yok | over | 0 | negatif | 1209338 | lokalize |
| 74 | 6015.10 | K | 13 | germhc | matur terat... | . | orta | yok | over | 50 | + | 1860761 | lokalize |
| 75 | 3999.06 | K | 7 | germhc | matur terat... | . | yok | yok | sakral | 30 | + | 1359470 | lokalize |
| 76 | 7695.02 | K | 1 | germhc | matur terat... | . | yok | yok | sakral | 0 | negatif | 1077041 | lokalize |
| 77 | 6501.06 | E | 18 | sarkom | osteosarkom | . | hafif | fazla | alt extremit | 20 | + | 2208620 | lokalize |
| 78 | 8382.09 | E | 15 | sarkom | ewing | 70 | yok | az | ust extremit | 0 | negatif | 1706481 | metastatik |
| 79 | 927.06 | K | 17 | sarkom | ewing | . | ileri | fazla | alt extremit | 0 | negatif | 1441710 | lokalize |
| 80 | 13508.08 | E | 17 | sarkom | osteosarkom | . | yok | yok | alt extremit | 0 | negatif | 1682987 | lokalize |
| 81 | 1377.04 | K | 12 | sarkom | rhabdomy... | . | yok | az | govde | 0 | negatif | 1116689 | lokalize |
| 82 | 771.07 | K | 8 | sarkom | rhabdomy... | . | yok | yok | alt extremit | 0 | negatif | 1359622 | metastatik |
| 83 | 5451.05 | E | 18 | sarkom | rhabdomy... | . | hafif | yok | batın içi | 30 | + | 1350839 | lokalize |
| 84 | 3535.03 | E | 18 | sarkom | osteosarkom | . | yok | fazla | alt extremit | 0 | negatif | 1201613 | lokalize |
| 85 | 8542.09 | K | 17 | sarkom | osteosarkom | . | yok | fazla | ust extremit | 30 | + | 1209592 | lokalize |
| 86 | 12273.08 | E | 6 | sarkom | rhabdomy... | 70 | yok | fazla | kc | 0 | negatif | 1669239 | metastatik |
| 87 | 4120.02 | E | 16 | sarkom | osteosarkom | . | hafif | yok | alt extremit | 50 | +++ | 1160233 | lokalize |

| | patolojino | cins | yas | tm | cesit | ki67 | nekroz | mitoz | organ | yüzde | boyanmaoranı | dosyano | evre |
|-----|------------|------|-----|--------|-------------|------|--------|-------|--------------|-------|--------------|---------|------------|
| 88 | 8537.06 | E | 13 | sarkom | rhabdomy... | . | yok | fazla | testis | 10 | ++ | 2169028 | lokalize |
| 89 | 3686-02 | E | 6 | sarkom | rhabdomy... | . | hafif | yok | kafa | 0 | negatif | 1055958 | lokalize |
| 90 | 6209.09 | K | 13 | sarkom | ewing | . | hafif | az | ust extremit | 75 | ++ | 1748519 | lokalize |
| 91 | 9809.03 | E | 18 | sarkom | ewing | . | ileri | yok | alt extremit | 10 | + | 1282141 | lokalize |
| 92 | 6693.06 | K | 18 | sarkom | rhabdomy... | . | hafif | yok | kafa | 0 | negatif | 1460172 | metastatik |
| 93 | 11619.11 | E | 4 | sarkom | rhabdomy... | 50 | yok | az | uretra | 0 | negatif | 1997663 | lokalize |
| 94 | 12955.08 | K | 17 | sarkom | ewing | . | yok | yok | mediasten | 50 | ++ | 1708062 | lokalize |
| 95 | 11858.11 | K | 11 | sarkom | ewing | 50 | ileri | az | alt extremit | 75 | ++ | 2005961 | lokalize |
| 96 | 16238.11 | E | 3 | sarkom | ewing | . | ileri | az | batın içi | 0 | negatif | 2030785 | metastatik |
| 97 | 13492.11 | K | 9 | sarkom | ewing | 1 | hafif | fazla | alt extremit | 30 | + | 2022352 | lokalize |
| 98 | 12348.10 | K | 18 | sarkom | osteosarkom | . | ileri | az | alt extremit | 0 | negatif | 1860829 | lokalize |
| 99 | 14677.11 | E | 5 | sarkom | ewing | 10 | yok | yok | batın içi | 0 | negatif | 2021392 | metastatik |
| 100 | 14588.10 | K | 17 | sarkom | osteosarkom | . | orta | fazla | alt extremit | 10 | + | 1894282 | metastatik |
| 101 | 9306.05 | E | 18 | sarkom | ewing | . | yok | yok | ust extremit | 0 | negatif | 1418593 | lokalize |
| 102 | 7448.03 | E | 18 | sarkom | osteosarkom | . | hafif | az | alt extremit | 75 | +++ | 1269400 | lokalize |
| 103 | 10090.04 | E | 18 | sarkom | osteosarkom | . | yok | az | alt extremit | 50 | +++ | 2191774 | lokalize |
| 104 | 3014.03 | E | 11 | sarkom | rhabdomy... | . | yok | yok | mesane | 0 | negatif | 1192250 | metastatik |
| 105 | 607.06 | E | 8 | sarkom | rhabdomy... | . | yok | fazla | govde | 10 | + | 2101714 | lokalize |
| 106 | 6219.03 | E | 18 | sarkom | osteosarkom | . | yok | yok | alt extremit | 40 | ++ | 1069019 | lokalize |
| 107 | 8235.11 | E | 4 | sarkom | rhabdomy... | . | yok | az | alt extremit | 80 | + | 1972370 | lokalize |
| 108 | 5733.10 | E | 18 | sarkom | osteosarkom | . | yok | yok | alt extremit | 0 | negatif | 1832470 | lokalize |
| 109 | 4588.02 | E | 16 | sarkom | osteosarkom | . | ileri | yok | alt extremit | 50 | + | 1027852 | lokalize |
| 110 | 15972.08 | K | 18 | sarkom | osteosarkom | . | yok | az | kafa | 0 | negatif | 1695530 | lokalize |
| 111 | 2468.00 | K | 10 | sarkom | ewing | . | orta | az | alt extremit | 0 | negatif | 1027852 | lokalize |
| 112 | 10322.10 | K | 18 | sarkom | ewing | 5 | yok | az | ust extremit | 0 | negatif | 1863271 | lokalize |
| 113 | 10064.09 | E | 18 | sarkom | ewing | . | yok | yok | ust extremit | 0 | negatif | 1761811 | lokalize |
| 114 | 9366.05 | E | 17 | sarkom | ewing | . | yok | yok | ust extremit | 0 | negatif | 1418593 | lokalize |
| 115 | 8476.05 | E | 9 | sarkom | rhabdomy... | . | yok | yok | spinal | 80 | + | 1412215 | lokalize |
| 116 | 6660.06 | K | 18 | sarkom | rhabdomy... | . | hafif | az | kafa | 80 | +++ | 1460172 | metastatik |

| | patolojino | cins | yas | tm | cesit | ki67 | nekroz | mitoz | organ | yüzde | boyanmaoranı | dosyano | evre |
|-----|------------|------|-----|-------------|---------------|------|--------|-------|--------------|-------|--------------|---------|------------|
| 117 | 16279.08 | E | 17 | sarkom | osteosarkom | . | hafif | fazla | alt extremit | 0 | negatif | 1344289 | metastatik |
| 118 | 3589.00 | E | 14 | sarkom | rhabdomy... | . | yok | az | kafa | 0 | negatif | 1037302 | lokalize |
| 119 | 10374.02 | E | 11 | sarkom | rhabdomy... | . | ileri | az | mesane | 0 | negatif | 1225513 | lokalize |
| 120 | 14676.10 | E | 5 | sarkom | rhabdomy... | 50 | yok | az | kafa | 0 | negatif | 1705650 | lokalize |
| 121 | 3248.06 | E | 5 | noroblastom | noroblastom | . | yok | yok | surrenal | 20 | ++ | 1351976 | metastatik |
| 122 | 5391.05 | K | 11 | noroblastom | ganglionör... | . | yok | yok | sakral | 0 | negatif | 1973273 | lokalize |
| 123 | 8235.07 | K | 18 | noroblastom | noroblastom | . | yok | yok | kafa | 80 | ++ | 1357142 | lokalize |
| 124 | 11594.07 | E | 9 | noroblastom | ganglionör... | . | hafif | fazla | batın içi | 0 | negatif | 1579146 | lokalize |
| 125 | 3610.11 | E | 8 | noroblastom | noroblastom | . | yok | yok | kc | 80 | ++ | 1768866 | 4 |
| 126 | 3215.02 | K | 2 | noroblastom | noroblastom | . | yok | yok | batın içi | 75 | + | 1079940 | 4 |
| 127 | 10347.03 | K | 10 | noroblastom | noroblastom | . | hafif | yok | LAP | 0 | negatif | 1214519 | 4 |
| 128 | 11436.04 | K | 14 | noroblastom | ganglionör... | . | yok | yok | mediasten | 75 | +++ | . | 4 |
| 129 | 2488.04 | K | 10 | noroblastom | noroblastom | . | yok | yok | govde | 50 | + | 1211423 | 4 |
| 130 | 7354.08 | E | 6 | noroblastom | noroblastom | 50 | yok | az | batın içi | 50 | ++ | 1652158 | 4 |
| 131 | 8476.05 | E | 10 | noroblastom | noroblastom | . | yok | yok | surrenal | 60 | ++ | 2124136 | 1 |
| 132 | 8803.09 | K | 8 | noroblastom | noroblastom | 5 | yok | az | surrenal | 10 | + | 1713586 | 3 |
| 133 | 4067.08 | K | 8 | noroblastom | ganglionör... | . | yok | yok | surrenal | 90 | + | 1598369 | 2 |
| 134 | 9753.05 | K | 18 | noroblastom | noroblastom | . | yok | yok | surrenal | 0 | negatif | 1416600 | 1 |
| 135 | 7645.03 | E | 12 | noroblastom | noroblastom | . | yok | yok | spinal | 80 | +++ | 2021586 | 4 |
| 136 | 8089.06 | K | 7 | noroblastom | noroblastom | 10 | yok | az | surrenal | 80 | +++ | 2076350 | 4 |
| 137 | 8665.07 | E | 6 | noroblastom | noroblastom | 5 | yok | az | mediasten | 0 | negatif | 2191759 | 4 |
| 138 | 2934.04 | E | 14 | noroblastom | noroblastom | . | hafif | yok | batın içi | 80 | + | 1221181 | 4 |
| 139 | 13245.07 | K | 7 | noroblastom | ganglionör... | . | yok | yok | batın içi | 50 | + | 1589577 | 4 |
| 140 | 4774.07 | E | 7 | noroblastom | noroblastom | 2 | hafif | yok | surrenal | 0 | negatif | 2169076 | 4 |
| 141 | 12478.11 | E | 4 | noroblastom | noroblastom | 2 | ileri | yok | surrenal | 60 | + | 2005847 | 4 |
| 142 | 1367.12 | E | 5 | noroblastom | noroblastom | 5 | yok | az | surrenal | 50 | + | 2021392 | 4 |
| 143 | 2365.10 | E | 5 | noroblastom | noroblastom | . | ileri | fazla | bb | 90 | +++ | . | 4 |
| 144 | 9874.11 | E | 4 | noroblastom | noroblastom | 1 | ileri | az | surrenal | 0 | negatif | 1939736 | 4 |
| 145 | 10196.11 | K | 3 | noroblastom | noroblastom | . | yok | yok | mediasten | 0 | negatif | 1936662 | 3 |
| 146 | 9200.11 | E | 2 | noroblastom | noroblastom | 25 | yok | az | surrenal | 40 | +++ | 1964908 | 4 |
| 147 | 1159.08 | E | 8 | noroblastom | ganglionör... | 50 | ileri | fazla | batın içi | 10 | + | 1352904 | 4 |
| 148 | 195.08 | E | 5 | noroblastom | noroblastom | . | yok | yok | surrenal | 50 | + | 1602719 | 1 |
| 149 | 3805.03 | K | 1 | noroblastom | noroblastom | . | ileri | yok | mediasten | 0 | negatif | 1214519 | 4 |
| 150 | 8243.07 | E | 5 | noroblastom | noroblastom | . | yok | yok | kc | 50 | + | 1490865 | 4 |

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Yılmaz SEÇİLMİŞ'e ait "Çocukluk Çağı Solid Tümörlerinde Kansere Kök Hücre Belirteci Olarak Pw12 Ekspresyonunun Araştırılması ve Pw12'nin Biyomarker Olarak Kullanılabileceğinin Gösterilmesi" adlı çalışma, jürimiz tarafından Çocuk Sağlığı Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

13/08/2013

İmza

Başkan : Prof. Dr. Türkan PATIROĞLU

Üye : Doç. Dr. Musa KARAKÜKCÜ

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ekrem ÜNAL