



T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI
İSTANBUL
ÜMRANİYE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ

T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
ÜMRANİYE SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
TIBBİ PATOLOJİ KLİNİĞİ

NÖROBLASTOM, GANGLİONÖROBLASTOM VE
GANGLİONÖROM HASTALARINDA ALK VE PAN-TRK
PROTEİN EKSPRESYONLARININ İNSİDANSI VE
PROGNOSTİK DEĞERİ

Dr. Bilge Konuk Demiröz

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

İSTANBUL-2024



T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
ÖMRANİYE SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
TIBBİ PATOLOJİ KLİNİĞİ

NÖROBLASTOM, GANGLİONÖROBLASTOM VE
GANGLİONÖROM HASTALARINDA ALK VE PAN-TRK
PROTEİN EKSPRESYONLARININ İNSİDANSI VE
PROGNOSTİK DEĞERİ

Dr. Bilge Konuk Demiröz

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nuray Başsüllü

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

İSTANBUL-2024

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimimiz boyunca her zaman ben ve asistan arkadaşlarıma bilgisini aktarmak için fedakarca çabalayan, iyi bir patolog olabilmemizde emeği çok büyük olan değerli hocam İtir Ebru Zemheri'ye, yoluma ışık tuttuğu, iyi bir insan, iyi bir hekim ve hocam olarak bana daima örnek olacağı için, bize verdiği sabır, şefkat, özen ve dahası için, tezimin hazırlanma sürecindeki tüm katkıları için içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecindeki yardımları, desteği ile güzel iş birliği sayesinde verimli şekilde süreçte ilerlediğimiz tez danışmanım ve değerli hocam Nuray Başsüllü'ye,

Eğitimim boyunca her biriyle çalışırken daima yardımcı, ilgili, insancıl olduklarını hissettiğim, tüm deneyimlerini ve bilgilerini aktaran, bizler için emek harcayan sevgili başasistanlarımız Uzm. Dr. Cumhur Selçuk Topal ve Uzm. Dr. İlkay Tosun'a, Doç. Dr. Ali Koyuncuer'e, uzmanlarımız Dr. Müberra Seğmen Yılmaz'a, Dr. Murat Hakan Karabulut'a, Dr. Şenay Çetin'e, Dr. Fatıma Gürsoy'a, Dr. Kamile Altundal'a, Dr. Nazan Aksoy'a, Dr. Ayşenur İhvan'a, Dr. Gülçiçek Ayrancı'ya, Dr. İlker Akın'a içtenlikle teşekkür ederim.

Bir arada olduğumuz için çok şanslı hissettiğim, işte olmayı her zaman keyifli hale getiren canım asistan arkadaşlarım Dr. Esra Yaylı'ya, Dr. Alaaddin Emre Taşkale'ye, Dr. Onur Şahin'e, Dr. Naz Özeroğlu Gencay'a, Dr. Ömer Faruk Çalış'a, Dr. Müzeyyen Müge Savaş'a, Dr. Merve Aydemir'e, Dr. Handenur İnceman'a, Dr. Begüm Çalım Gürbüz'e geçirdiğimiz tüm güzel zamanlar ve neşeli anılarımız için; Dr. İrem Güvendir Bakkaloğlu'na tüm bunların yanında ayrıca tezimin istatistiğini üstlendiği, oluştururken katkı sağladığı, fikir verdiği, yanımda olduğu için sevgiyle teşekkür ederim.

Hastanemiz pediatrik onkoloji bölümünden Dr. Begüm Şirin Koç'a klinik bilgilerin sağlanması hususunda içtenlikle teşekkür ederim.

Patoloji kliniğinin tüm çalışanlarına, çalıştığımız zamanlar boyunca süren yardımseverlikleri, çalışkanlıkları, samimiyetleri için çok teşekkür ederim.

Kimiyle çocukluk zamanlarından, kimiyle lise, üniversite yıllarından bugünlere getirdiğimiz içten bağlarımız için, desteklerini, sevgilerini hep yanımda hissettiğim canım arkadaşlarıma,

Varlığıyla beni mutlu eden, desteğini her zaman hissettiğim, sevgili eşim Dr. Candost Demiröz'e,

Son olarak, bu zorlu doktorluk yolunda ilk örneğim, en büyük destekçim, patoloji doktoru olması sebebiyle kariyerime öncü olmuş olan canım ablam Dr. Gözde Konuk Kurtuluş'a, sevgili aileme, canım anneme, canım babama, güzel yeğenim İlke'ye beni her zaman sevdikleri, desteklerini hiç esirgemedikleri için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Bilge Konuk Demiröz

İstanbul-2024



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
KISALTMALAR	v
TABLolar LISTESİ.....	V
ŞEKİLLER LISTESİ	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. PERİFERİK NÖROBLASTİK TÜMÖRLER	2
2.1.1. Tanım.....	2
2.1.2 Tarihçe	2
2.1.3 Epidemiyoloji	2
2.1.4 Klinik Bulgular.....	3
2.1.5 Radyolojik bulgular	5
2.1.6. Histopatolojik Tiplendirme	5
2.1.7. İmmünohistokimyasal Bulgular	9
2.1.8. Elektron Mikroskopik Bulgular.....	9
2.1.9. Genetik ve Moleküler Bulgular	10
2.1.10. Prognostik Sınıflandırma.....	16
2.1.11. Klinik Evreleme.....	19
2.1.12. Klinik Risk Grupları	22
2.1.13. Tedavi ve Prognoz	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Vaka seçimi.....	27
3.2. Klinik Özellikler	27
3.3. Mikroskopik İnceleme	27
3.4. İmmünohistokimyasal Yöntem.....	28
3.5. İmmünohistokimyasal Değerlendirme	28
3.6. İstatistiksel Değerlendirme	29

4. BULGULAR.....	30
4.1. ALK protein ekspresyonu ile demografik, histomorfolojik ve klinik ilişkiler	33
4.2. Tüm hasta popülasyonunda ALK protein ekspresyonu ile demografik, histomorfolojik ve klinik ilişkiler	37
4.3. Pan-TRK protein ekspresyonu ile demografik, histomorfolojik ve klinik ilişkiler.....	40
4.4. Tüm hasta popülasyonunda pan-TRK protein ekspresyonu ile demografik, histomorfolojik ve klinik ilişkiler	46
5. RESİMLER.....	50
6. TARTIŞMA	57
7. SONUÇ	70
8. KAYNAKÇA.....	71

KISALTMALAR

ABHL	: Anaplastik Büyük Hücreli Lenfoma
ALK	: Anaplastik Lenfoma Kinaz
BDNF	: Brain Derived Neurotrophic Factor
BMP	: Bone Morphogenic Protein
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
FISH	: Floresan In situ Hibridizasyon
GN	: Ganglionörom
GNB	: Ganglionöroblastom
FDA	: Food and Drug Administration
HVA	: Homovalinik Asit
INPC	: International Neuroblastoma Pathology Classification
INSS	: International Neuroblastoma Staging System
INRG	: The International Neuroblastoma Risk Group
INRGSS	: The International Neuroblastoma Risk Group Staging System
İMT	: İnflamatuar Myofibroblastik Tümör
KHDAK	: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomu
KGH	: Komperatif Genomik Hibridizasyon
MASH1	: Mammalian Achaete Scute Homolog-1
MIBG	: Metaiyodobenzilguanidin
MKİ	: Mitotik Karyotik İndeks
MR	: Manyetik Rezonans
NB	: Nöroblastom
NGF	: Neuron Growth Factor
NGS	: Next Generation Sequencing
NT	: Nöroblastik tümör
NTRK	: Nörotrofik tirozin reseptör kinaz
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PNT	: Periferel Nöroblastik Tümör
TPOG	: Türk Pediatrik Onkoloji Grubu
TRK	: Tirozin Reseptör Kinaz

US : Ultrasonografi
VIP : Vazointestinal Peptid
VMA : Vanilmandelik Asit



TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1. Diferansiye tümörlerin klasifikasyonu ve derecelendirilmesi (Uluslararası Nöroblastom Patoloji Komitesi (INPC), 1999)	6
Tablo 2. Yaş, nöroblast diferansiasyon derecesi, nodüler patern, Schwannian stroma gelişim derecesi ve mitoz-karyoreksis indeksi (MKİ) temelinde tanımlanan olumlu ve olumsuz histoloji gruplarıyla Uluslararası Nöroblastoma Patolojisi Sınıflandırması (INPC)(34).....	18
Tablo 3. Çocuk Onkoloji Grubu (COG) Nöroblastom Risk Gruplama Sistemi	20
Tablo 4. Görüntüye göre tanımlanan risk faktörleri (IDRF)	21
Tablo 5. Uluslararası Nöroblastom Klinik Evreleme Sistemi, INRGSS.....	22
Tablo 6. Uluslararası nöroblastom risk grup (INRG) fikir birliği tedavi öncesi sınıflandırma şeması (36).....	23
Tablo 7. Demografik veriler ve hasta bulguları.....	32
Tablo 8. NB hastalarında tedavi öncesi ve sonrası boyanma yoğunlukları, yaygınlıkları, paternlerinin karşılaştırılması	34
Tablo 9. ALK boyanma yoğunluğunun Shimada sınıflaması ile ilişkisi	34
Tablo 10. NB hastalarında ALK boyanma yoğunluğunun diferansiyasyonla ilişkisi.....	35
Tablo 11. ALK yoğunluk ve nüks durumu ilişkisi.....	35
Tablo 12. GNB hastalarında tedavi öncesi ve sonrası ALK boyanma yoğunlukları, yaygınlıkları, paternlerinin karşılaştırılması	36
Tablo 13. GN hastalarında boyanma yoğunlukları, yaygınlıkları, paternlerinin karşılaştırılması	37
Tablo 14. ALK boyanma durumu ile risk grubu ilişkisi	39
Tablo 15. PNT’lerde tümör tipi ile ALK boyanması ilişkisi.....	39
Tablo 16. NB hastalarında tedavi öncesi ve sonrası pan-TRK boyanma yoğunlukları, yaygınlıkları, paternlerinin karşılaştırılması.....	40
Tablo 17. NB’da Pan-TRK boyanma yoğunluğunun Shimada sınıflaması ile ilişkisi.....	41
Tablo 18. NB’da Pan-TRK boyanma yaygınlığının Shimada sınıflaması ile ilişkisi.....	41

Tablo 19. NB’da Pan-TRK boyanma yüzdesinin diferansiyasyonla ilişkisi.....	42
Tablo 20. NB’daPan-TRK boyanma yoğunluğu ve exitus durumu ilişkisi	42
Tablo 21. Pan-TRK boyanma yüzdesi ve exitus durumu ilişkisi	42
Tablo 22. Pan-TRK boyanma paterni ve exitus durumu ilişkisi	43
Tablo 23. GNB’da tedavi öncesi ve sonrası Pan-TRK boyanma yoğunlukları, yaygınlıkları, paternlerinin karşılaştırılması	45
Tablo 24. GN hastalarında Pan-TRK boyanma yoğunluğu yüzdesi paterni	46
Tablo 25. PANTRK boyanma yoğunluğu yüzdesi ve Shimada sınıflaması ilişkisi..	47
Tablo 26. Pan-TRK boyanma yoğunluğu, yüzdesi, paterni ve ölüm ilişkisi.....	48
Tablo 27. Klinik evre ile pan-TRK boyanma yoğunluğu ilişkisi	49
Tablo 28. Risk grubu ile pan-TRK boyanma yoğunluğu ilişkisi	49

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. TRK çalışma mekanizması	14
Şekil 2. ALK boyanma yoğunluğu ve yüzdesi ile hasta yaşı ilişkisi	38
Şekil 3. Pan-TRK boyanma yoğunluğu, sağ kalım ilişkisi	43
Şekil 4. Pan-TRK boyanma yüzdesi, sağ kalım ilişkisi	44
Şekil 5. Pan-TRK boyanma paterni, sağ kalım ilişkisi	44
Şekil 6. Diferansiye nöroblastom. (H&E x 400).....	50
Şekil 7. Az diferansiye nöroblastom (H&E x 400).....	50
Şekil 8. Az diferansiye nöroblastom (H&E x 100).....	51
Şekil 9. Andiferansiye nöroblastom (H&E x 400)	51
Şekil 10. Andiferansiye nöroblastom, kemik iliği metastaz alanı (H&E 100)	52
Şekil 11. Ganglionöroblastom, nodüler tip (H&E 100).....	52
Şekil 12. Ganglionöroblastom, intermikst tip (H&E x 100).....	53
Şekil 13. Ganglionöroblastom, intermikst tip (H&E x 400).....	53
Şekil 14. Ganglionörom, matürleşen tip (H&E x 100)	54
Şekil 15. Ganglionörom, matür tip (H&E x 100)	54
Şekil 16. NB;ALK: kuvvetli yoğunluk(+3) sitoplazmik ve membranöz boyanma ..	55
Şekil 17. NB; ALK orta kuvvette yoğunluk (+2) sitoplazmik boyanma	55
Şekil 18. NB; Pan-TRK: kuvvetli yoğunluk(+3) sitoplazmik ve membranöz boyanma.....	55
Şekil 19. NB; Pan-TRK zayıf yoğunluk (+1) sitoplazmik boyanma.....	56
Şekil 20. GN; Pan-TRK: zayıf yoğunluk(+1) sitoplazmik boyanma.....	56
Şekil 21. GN; ALK : zayıf yoğunluk(+1) sitoplazmik boyanma.....	56

ÖZET

NÖROBLASTOM, GANGLİONÖROBLASTOM VE GANGLİONÖROM HASTALARINDA ALK VE PAN-TRK PROTEİN EKSPRESYONLARININ İNSİDANSI VE PROGNOSTİK DEĞERİ

Amaç: NTRK VE ALK genlerindeki mutasyonlara yönelik hedefe yönelik tedaviler mevcut olup, nöroblastom hastalarında bu tedaviler rutinde uygulanmamaktadır. Pan-TRK ve ALK immünhistokimya boyamaları hastalığın patogeneğinde rol oynadığı bilinen NTRK ve ALK genlerindeki mutasyonları ortaya koymada başarılıdır. Yapılan çalışmalar immünhistokimyasal boyamaların periferik nöroblastik tümörlerin (PNT) tanısı kadar, spesifik tedavilerine yönelik tarama yöntemi olarak da kullanılmasını desteklemektedir. Çalışmamızın amacı nöroblastom (NB), ganglionöroblastom (GNB) ve ganglionörom (GN) hastalarında ALK ve Pan-TRK ekspresyonlarının insidansını ve prognostik değerini araştırarak tümör biyolojisi ve hastalık seyri üzerindeki etkilerini değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: 2016-2024 yılları arasında Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümü'nde tanı almış 24 nöroblastom, 6 ganglionöroblastom, 9 ganglionörom olgusu çalışmaya alınmıştır. NB, GNB ve GN vakaları retrospektif olarak incelenip tümör örnekleri, mikroskopik inceleme ve immünhistokimyasal boyama teknikleri, genetik profil verileri kullanılarak değerlendirilmiştir. ALK ve pan-TRK ekspresyonları, immünhistokimyasal yöntemlerle tespit edilmiştir. İmmünhistokimyasal veriler, hastaların yaş, tümör tipi, evre ve tedavi sonuçları gibi parametrelerle ilişkilendirilmiştir. Ekspresyon düzeyleri ile prognostik faktörler arasındaki ilişkileri belirlemek için Kolmogorov-Smirnov testi, Student's T testi, Tek Yönlü Anova, Pearson Korelasyon Analizi, Regresyon Analizi, Mann-Whitney U testi, Kruskal-Wallis H Testi, Spearman Korelasyon Analizi, Kaplan-Meier ve Log-Rank testleri kullanılmıştır.

Bulgular: NB hastalarında ALK immünpozitifliği istatistiksel olarak diğer tanı gruplarındaki (GNB ve GN) ALK pozitifliğine göre daha anlamlıdır ($p=0.004$). Bu

veri ALK immünpozitifliğinin NB’u saptamada seçici olduğunu ortaya çıkarmıştır. Kötü prognostik parametrelerden bazıları ALK protein ekspresyonu açısından anlamlıdır; NB’da az diferansiye grubun boyanma yüzdesi diğer gruptakilere göre anlamlı olarak daha yüksektir ($p<0.001$). Ayrıca risk grubu yükseldikçe ALK protein ekspresyon yoğunluğu ve yüzdesi de anlamlı olarak artmaktadır (sırasıyla $p=0.019$, 0.007). Demografik veriler incelendiğinde, yaş arttıkça ALK protein ekspresyon yoğunluğunun ve yüzdesinin anlamlı olarak azaldığı görülmektedir (sırasıyla $p=0.034$, $p=0.050$). ALK protein ekspresyonları MYCN, 1p36, 17q25 mutasyonları, DNA ploidi durumuyla ayrı ayrı kıyaslandığında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Ancak 11q23 mutasyonu pozitif olan 5 hastanın 4(%80)’inde ALK yoğunluğu %50’nin üzerinde olup bu vakalarda orta-çok yoğun olarak boyanmıştır. Pan-TRK boyanma yoğunluğu, tedavi sonrası grupta tedavi öncesi gruba göre anlamlı olarak azalmıştır ($p=0.48$). İyi prognostik parametrelerden bazıları pan-TRK protein ekspresyonu açısından anlamlıdır; pan-TRK protein ekspresyonu olumlu histoloji grubundaki vakalarda anlamlı olarak daha yoğun ve yüzdesel olarak daha fazladır (sırasıyla $p=0.01$, 0.042). Eksitus olmayan hastalarda boyanma yoğunluğu ve yüzdesi eksitus olanlara göre anlamlı olarak daha yüksektir (sırasıyla $p=0.028$, $p=0.006$). Pan-TRK protein ekspresyon yoğunluğuna az ve orta-çok yoğun olarak bakıldığında ekspresyon yoğunluğu az olanların istatistiksel olarak genel sağkalım süresi daha düşük bulunmuştur ($p=0.027$). Pan-TRK protein ekspresyon yüzdesi arttıkça sağkalım süresi de istatistiksel olarak artmıştır ($p=0.015$). Klinik evre arttıkça Pan-TRK protein ekspresyon yoğunluğu anlamlı olarak azalmaktadır ($p=0.045$). Risk grubu arttıkça pan-TRK protein ekspresyon yoğunluğu anlamlı olarak azalmaktadır ($p=0.025$). Pan-TRK protein ekspresyonu genetik profil ile ilişkilendirildiğinde, MYCN mutasyonu pozitif olan 4 hastanın 3 (%75)’ünde %50’nin üzerinde ve orta-çok yoğun ekspresyon göstermiştir. 11q23 mutasyonu pozitif olan 5 hastanın 4(%80)’inde NTRK yoğunluğu %50’nin üzerinde olup bu vakalarda orta-çok yoğun olarak boyanmıştır.

Sonuç: ALK, PNT’lerde kötü prognozla ilişkilidir. Klasik kemoterapi tedavilerinden sonra ALK protein ekspresyonunda anlamlı düzeyde değişiklik saptanmamıştır. Bu nedenle NB tedavisinde ALK gen inhibitörlerinin kullanımının olumlu klinik sonuçlar oluşturabileceğini düşünmekteyiz. Pan-TRK protein ekspresyonu ise daha iyi prognozla ilişkilidir. Klasik kemoterapi tedavilerinden sonra oluşan protein

ekspresyondaki anlamlı düzeyde değişiklik, NTRK geni için hedefe yönelik tedavilerin kemoterapi ile birlikte kullanımının hastalık seyrinde olumlu sonuçlar oluşturabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgular, nöroblastik tümörlerin tedavi yaklaşımlarının bireyselleştirilmesinde ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde değerli bilgiler sunmaktadır. Gelecekte yapılacak daha geniş kapsamlı çalışmalar, bu belirteçlerin prognostik ve terapötik değerlerini daha net ortaya koyacaktır.

Anahtar kelimeler: Nöroblastom, ganglionöroblastom, ALK, Pan-TRK, MYCN



ABSTRACT

THE INCIDENCE AND PROGNOSTIC VALUE OF ALK AND PAN-TRK PROTEIN EXPRESSIONS IN NEUROBLASTOMA, GANGLIONEUROBLASTOMA, AND GANGLIONEUROMA PATIENTS

Objective: Targeted therapies for mutations in NTRK and ALK genes are available, however these treatments are not routinely used in patients with neuroblastoma. Pan-TRK and ALK immunohistochemistry stains are successful in detecting mutations in NTRK and ALK genes known to play a role in the pathogenesis of the disease. Studies support the use of immunohistochemical stains not only for the diagnosis of peripheral neuroblastic tumors (PNT) but also as a screening method for specific treatments. The aim of our study is to evaluate the incidence and prognostic value of ALK and Pan-TRK expressions in neuroblastoma (NB), ganglioneuroblastoma (GNB), and ganglioneuroma (GN) patients and to assess their impact on tumor biology and disease progression.

Materials and Methods: A total of 24 neuroblastoma, 6 ganglioneuroblastoma, and 9 ganglioneuroma cases diagnosed between 2016 and 2024 at the Ümraniye Training and Research Hospital Pathology Department were included in the study. NB, GNB, and GN cases were retrospectively analyzed, and tumor samples were evaluated using microscopic examination, immunohistochemical staining techniques, and genetic profile data. ALK and Pan-TRK expressions were detected by immunohistochemical methods. Immunohistochemical data were correlated with parameters such as patient age, tumor type, stage, and treatment outcomes. The relationships between expression levels and prognostic factors were determined using Kolmogorov-Smirnov test, Student's T-test, One-Way ANOVA, Pearson Correlation Analysis, Regression Analysis, Mann-Whitney U test, Kruskal-Wallis H Test, Spearman Correlation Analysis, Kaplan-Meier, and Log-Rank tests.

Results: ALK immunopositivity in NB patients is statistically more significant compared to ALK positivity in other diagnosis groups (GNB and GN) ($p=0.004$). This

data suggests that ALK immunopositivity is selective for detecting NB. The percentage of staining in the less differentiated group in NB is significantly higher than in other groups ($p < 0.001$). Additionally, as the risk group increases, the intensity and percentage of ALK protein expression also increase significantly ($p = 0.019$, 0.007 , respectively). When demographic data are examined, it is seen that as age increases, the intensity and percentage of ALK protein expression decrease significantly ($p = 0.034$, $p = 0.050$, respectively). No significant relationship was found when ALK protein expressions were compared separately with MYCN, 1p36, 17q25 mutations, and DNA ploidy status. However, in 4 out of 5 patients with positive 11q23 mutations (80%), ALK intensity was over 50%, and these cases were stained as moderately to highly intense. The intensity of pan-TRK staining significantly decreased in the post-treatment group compared to the pre-treatment group ($p = 0.48$). Some good prognostic parameters are significant in terms of pan-TRK protein expression; pan-TRK protein expression is significantly more intense and higher in percentage in cases with favorable histology ($p = 0.01$, 0.042 , respectively). The intensity and percentage of staining in patients who are not deceased are significantly higher compared to those who are deceased ($p = 0.028$, $p = 0.006$, respectively). When the intensity of pan-TRK protein expression is considered as low and moderate-high, the overall survival time is statistically lower in those with low expression intensity ($p = 0.027$). As the percentage of pan-TRK protein expression increases, survival time also increases statistically ($p = 0.015$). As the clinical stage increases, the intensity of pan-TRK protein expression decreases significantly ($p = 0.045$). As the risk group increases, the intensity of pan-TRK protein expression decreases significantly ($p = 0.025$). When pan-TRK protein expression is correlated with the genetic profile, in 3 out of 4 patients with positive MYCN mutations (75%), the expression was over 50% and moderately to highly intense. In 4 out of 5 patients with positive 11q23 mutations (80%), NTRK intensity was over 50%, and these cases were stained as moderately to highly intense.

Conclusion: ALK is associated with poor prognosis in PNTs. No significant change in ALK protein expression was detected following conventional chemotherapy treatments. Therefore, we believe that the utilization of ALK gene inhibitors in NB treatment could produce positive clinical outcomes. Pan-TRK protein expression is

associated with a better prognosis. The significant change in protein expression after classical chemotherapy treatments suggests that targeted therapies for the NTRK gene in combination with chemotherapy could produce positive outcomes in the course of the disease. These findings provide valuable information for individualizing treatment approaches for neuroblastic tumors and developing new treatment strategies. Future large-scale studies are needed to elucidate the prognostic and therapeutic values of these markers.

Key Words: Neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, ALK, Pan-TRK, MYCN



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nöroblastik tümörler, sempatik ganglionlar ve adrenal medullanın primordial nöral krest hücrelerinden köken alan tümörlerdir. Bu tümörler diferansiyasyon derecelerine göre nöroblastom (NB), ganglionnöroblastom (GNB) ve ganglionöroma (GN) olarak alt tiplere ayrılır. İlk olarak 1864 yılında Virchow tarafından tanımlanan ve 1910 yılında Wright tarafından nöroblastom olarak isimlendirilen bu tümörler, çocukluk çağının en yaygın ekstrakraniyal solid tümörlerindendir ve pediatrik kanser ölümlerinin %15'inden sorumludur (1).

Nöroblastomlar, yaşamın ilk yılında en sık görülen neoplazmlar olup, yaklaşık 1/8.000-10.000 doğumda bir görülür. Erkek çocuklarda kızlara oranla daha yaygındır ve tanı anındaki ortalama yaş 18 aydır. Bu tümörlerin %40'ı bir yaşından önce teşhis edilir ve genellikle sporadik olarak ortaya çıkar. Bazı genetik ve konjenital faktörlerin NB patogeneğinde rol oynayabileceği düşünülmektedir (2).

Nöroblastik tümörlerin tedavisinde ve prognozunda, tümörün tipi ve evresi, hastanın yaşı ve genetik profili belirleyici faktörlerdir. Tedavi stratejileri, düşük riskli hastalarda cerrahi ve gözlemden, yüksek riskli hastalarda agresif kemoterapi, radyoterapi ve kök hücre nakline kadar değişkenlik gösterir. Yeni tedavi yaklaşımları arasında kişiselleştirilmiş tedavi stratejileri ve hedefe yönelik tedaviler öne çıkmaktadır (3).

Bu çalışmada, Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümü'nde 2016-2024 yılları arasında tanı almış NB, GNB ve GN olgularında ALK ve Pan-TRK ekspresyonlarının insidansı ve prognostik değeri araştırılmıştır. Çalışma kapsamında tümörlerin mikroskopik ve genetik özellikleri ile hastaların klinik ve prognostik verileri analiz edilmiştir. Araştırma, nöroblastik tümörlerin daha iyi anlaşılmasına ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlamayı amaçlamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. PERİFERİK NÖROBLASTİK TÜMÖRLER

2.1.1. Tanım

Sempatik ganglionlar ve adrenal medullanın primordial nöral krest hücrelerinden köken alan tümör grubuna nöroblastik tümörler denir (4). Çoğunlukla nöral krestten kaynaklanan tüm periferik nöroblastik tümör tipleri için genel bir kelime olarak kullanılan "nöroblastoma" terimi aslında bu daha büyük grup içindeki Schwannian stromal gelişim ve nöroblastik farklılaşma derecesine göre ayırt edilen belirli bir tümör tipini tanımlamak için kullanılmalıdır. Bu grup tümörler arasında nöroblastom (NB) (Schwannian stromadan zayıf), mikst ganglionöroblastom (GNB) (Schwanian stromadan zengin), nodüler ganglionöroblastom (kompozit Schwannian stroma zengin/stroma baskın ve stromadan fakir nöroblastik tümör) ve ganglionörom (GN) (schwanian stromadan zengin) yer alır (4).

2.1.2. Tarihçe

Periferik nöroblastik tümörler (PNT)'ler ilk olarak Virchow tarafından 1864 yılında PNT olarak tanımlanmıştır. 1910 yılında Wright, embriyonal nöroblastların saptanması üzerine burdan köken alan söz konusu tümörleri nöroblastom olarak isimlendirmiştir. Ganglionöroma matüre olabileceği bilgisi ise 1927 yılında Cushing ve Wolbach tarafından ortaya konulmuştur (5). 1963 yılında JB Beckwith ve R.F Martin ani çocuk ölümü sendromu ile vefat etmiş olgulara yapılan otopsi sonuçları ile "in situ nöroblastom" kavramını ortaya atmışlardır. Bu çocukların adrenal bezlerinde nöroblastom hücrelerinden oluşan küçük hücre toplulukları görmüş ve sebebinin nöral hücrenin gelişim sürecindeki bir duraklamadan kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir (1).

2.1.3. Epidemiyoloji

NB'lar yaşamın ilk yılında en sık görülen neoplazmlar olup, ilk 2 yılında ise en sık görülen ekstrakranyal solid tümörlerdir (6). Tahmini görülme sıklığı 1/8.000-10.000 doğumdur (2). Pediatrik kanser ölümlerinin %15 kadarının nedenidir (7).

Erkeklerde kızlara göre 1.2 kat daha yaygındır (6). ABD ve Avrupa'da pediatrik kanserlerin %8-10'unu, Türkiye'deki pediatrik kanserlerin %7'sini oluşturmaktadır (8). Tanı anındaki ortalama yaş 18 aydır ve vakaların %40'ına 1 yaşından önce tanı konur (2).

Hastalığın başlangıç yaşının erken olduğu göz önüne alındığında, gebelik öncesi veya doğum öncesi faktörler NB patonenezinde rolü olabilir. Yüksek riskle bağlantılı birçok ebeveyn faktörü olduğu da varsayılmıştır. Aslında nöroblastik tümörlerin konjenital tümörler olarak ortaya çıkması nadir değildir (9).

NB'ların bazılarının ailesel olduğu bildirilmiş olsa da çoğunlukla sporadik gelişir (10) Ailevi olguların %56'sı 1 yaşından önce tanı almakta ve %23'ü multipl odaklı primer tümör olarak karşımıza çıkmaktadır (5). BWS (Beckwith Wiedeman Sendromu), Von Recklinghausen hastalığı, Hirschprung hastalığı, opsoklonus/miyoklonus, heterokromi iridis, sulu diyare veya Cushing sendromu gibi bazı yapısal anomaliler ve sendromlarla birliktelikleri de ortaya konulmuştur (11).

GN'lar sıklıkla büyük çocuklarda görülür. Ortalama tanı yaşı 7 olup, kızlarda erkeklere göre yaklaşık 1.5 kat daha sık görülür. En sık görüldüğü bölgeler arasında posterior mediasten (%41.5), retroperiton (%37.5), adrenal gland (%21) ve boyun (%8) yer alır. GNB'lar %75 – 85 oranında hayatın ilk 4 yılında meydana gelir. Kız erkek çocuklarda eşit oranda görülür (12).

2.1.4. Klinik Bulgular

Periferik nöroblastik tümörler (PNT)/NB'lar en sık abdominal kitle varlığıyla presente olurlar ve en yaygın olarak sempatik sinir sistemi ile ilişkili olarak gelişirler. Primer odak olarak en sık (%40 oranında) adrenal bez yerleşimlidir. Adrenal bez dışı yerleşimler sıklık sırasına göre batın (%25), toraks (%15), servikal bölge (%5) ve pelvik sempatik ganglionlar (%5) olarak tespit edilmiştir (13).

Klinik olarak primer tümörün sebep olduğu abdominal kitleden kaynaklanan abdominal distansiyon ve kabızlık, mediastinal kitle sebepli solunum zorluğu, paraspinal tümörlerin spinal kanala yayılması nedenli nörolojik semptomlar olarak ortaya çıkarlar (14).

Lenfatik ve vasküler yayılım izlenebilir. Uzak metastaz en sık kemik iliğinde ve daha az olarak sırasıyla kemik, lenf düğümü, karaciğer, nadiren de akciğer ve beyinde görülür (13).

Metastazlar, lenfadenopati, hepatomegali, kemik ağrısı ve rakun gözü görünümüne (ekzoftalmi sebepli göz çevresinde morarma ve şişme) sebep olabilir. Santral sinir sistemi tutulumu olduğunda sıklıkla meningeal yüzeyler boyunca yayılım gösterir (13).

NT'lerle ilişkili bazı paraneoplastik sendromlar bildirilmiştir (1). Bunlar tümörün salgıladığı vazoaktif intestinal polipeptit (VIP) sebepli sulu diare, hipokalemi, aklorhidriye sebep olan Verner-Morrison sendromu (2), torasik ya da servikal yerleşimli tümöre sekonder unilateral pitosis, miyosis, ve anhidrosisle karakterize horner sendromu (3), muhtemel bir otoimmün mekanizma yoluyla opsoclonus-miyoklonus-ataksi sendromu (4), katekolamin salgılanmasına ve tümörün renal arter basısına bağlı oluşan hipertansiyondur (6).

Bildirilen bazı nadir vakalarda PHOX2B'nin yapısal mutasyonu mevcut olup, vakalar, konjenital santral hipoventilasyon ve Hirschprung hastalığı ile presente olmuşlardır (15).

GN'lar ise genellikle rutin radyolojik incelemelerde saptanan asemptomatik kitleler halinde ortaya çıkabildiği gibi bası etkisine yol açan büyük kitleler de oluşturabilirler. Katekolamin sekresyonuna bağlı semptomlar nadir de olsa görülebilir. Vakaların yalnızca % 37'sinde yüksek vanilmandelik asit (VMA) ya da homovalinik asit (HVA) düzeyleri saptanmıştır. Bu düzey, NB ve GNB'larda %90-95'e ulaşan orandadır (16).

PNT'de farklı klinik özellikler göz önüne alındığından, tedavi seçenekleri risk gruplarına yani öngörülen davranışa göre belirlenir. Bekle-gör stratejisi veya sadece cerrahi yaklaşım, kendiliğinden gerileyen tümörler için tercih edilirken, cerrahi ve ılımlı doz kemoterapi, kemoterapiye iyi yanıt veren tümörlerde kullanılır. Kemoterapiye dirençli tümörlerde ise agresif multimodal tedavi uygulanır. Düşük ve orta risk grubundaki hastaların 5 yıllık genel sağkalım oranları %90'ın üzerindeyken, yüksek risk grubundaki hastaların yaşam oranları genellikle %50'nin altındadır ve bu grup tüm hastaların yaklaşık yarısını oluşturur (17).

2.1.5 Radyolojik bulgular

Bu tümörlerin radyolojik görünümü, düz radyografiden başlayarak tüm görüntüleme yöntemleriyle tartışılmaktadır. Radyografiler posterior retroperitoneal, mediastinal veya boyunda kitleyi gösterebilir. Metastatik hastalık radyolojik olarak hepatomegali, şeffaf submetafiz bölgeleri, periostit ve kranyal sütür genişlemesi (dural metastazlarda) olarak ortaya çıkabilir. Ultrasonografide (US) NB ve GNB heterojen ekojeniktir. Tümör içinde kanama veya nekroza karşılık gelen anekoik alanlar, kalsifikasyon alanları olabilir Bilgisayarlı tomografi (BT), nöroblastik tümörlerin değerlendirilmesinde en sık kullanılan görüntüleme yöntemidir; çünkü tümörün boyutunu, köken aldığı organı, bölgesel invazyonu, vasküler kılıfı, adenopatiyi ve kalsifikasyonu ortaya çıkarır. Yeni teşhis edilen tüm vakalar için göğüs, karın ve pelvis BT'si standarttır. Manyetik rezonans (MR) görüntülemesinde, NB ve GNB tipik olarak heterojendir, değişken şekilde kontrastlanır. Mükemmel doku ayrımı ve çok düzlemli görüntüleme nedeniyle MR görüntüleme, orijin ve bölgesel invazyonun belirlenmesinde BT'den üstündür. MR görüntüleme yönteminin kemik iliği biyopsisi sonuçlarıyla iyi korelasyon gösterdiği gösterilmiştir. Metaiyodobenzilguanidin (MIBG) sintigrafisi NB, GNB, GN, karsinoid ve feokromasitoma gibi sempatik dokular için oldukça duyarlı (%88) ve spesifiktir (%99). Ancak bu tümörler arasında ayırım yapılmasına olanak sağlamaz (12,16).

2.1.6. Histopatolojik Tiplendirme

Morfolojik özelliklerin prognoz ile ilişkisini anlamak için çeşitli sınıflandırma ve derecelendirme kümeleri oluşturulmuştur (18). Önceki sınıflandırma kümelerine göre prognostik ve biyolojik açıdan anlamlı olduğu düşünülen üzerinde uzlaşılmış bir sınıflandırma, Uluslararası Nöroblastom Patoloji Komitesi'nin (International Neuroblastoma Pathology Committee (INPC)) patolog üyelerinin önerdiği Çocukluk Kanseri Grubu (childrens cancer group (CCG)) kaydı ile NT'e uygulanmıştır. Elde edilen sınıflandırma sistemi sadece Shimada sınıflandırmasını değil eski ve yeni şemaları da içeren kapsamlı bir sistemdir (Tablo 1)

INPC sınıflandırma sisteminde NT'ler dört ana sınıfta toplanır:

- 1- NB (Schwannian stromadan fakir NT)
- 2- GNB, intermikst (Schwannian stromadan zengin NT)

3- GN (Schwannian stroma baskın NT)

4- GNB, nodüler (kompozit schwannian stromadan zengin/ stroma baskın ve stromadan fakir NT) (18)

Nodüler tip GNB kompozit bir tümör iken, NB, intermikst tip GNB ve GN sırasıyla en az diferansiyeden en iyi diferansiyeye doğru bir süreç olarak ele alınır (19).

Tablo 1. Nöroblastik tümörlerin kategorileri ve alttipleri (Uluslararası Nöroblastom Patoloji Komitesi (INPC), 1999) (36)

1) Nöroblastom (schwannian stromadan fakir NT)	
Andiferansiye	Nöropil yok ve <%5 oranında ganglionik diferansiyasyon*
Az diferansiye	Nöropil var ve <%5 oranında ganglionik diferansiyasyon
Diferansiye	Nöropil var ve >%5 oranında ganglionik diferansiyasyon ve <%50 oranında Schwannian stroma
2) Ganglionöroblastom intermikst (Schwannian stromadan zengin NT)	Ganglion hücreleri ile iç içe nöroblast grupları ve nöropil ve >%50 schwannian stroma
3) Ganglionörom (Schwannian stroma baskın NT)	
Matürleşmekte olan	Nöroblast grupları olmadan tek tek nöroblastlar ile iç içe matür ganglion hücreleri ve Schwannian stroma
Matür	Nöroblast olmadan matür ganglion hücreleri ve Schwannian stroma
4) Ganglionöroblastom, nodüler (kompozit Schwannian stromadan zengin/stroma baskın ve stromadan fakir NT)	Ya intermikst tip ganglionöroblastom ya da ganglionöroblastom zemininde nöroblastom nodülünün kompozit tümörü

*Ganglionik diferansiyasyon, hücre çapının nükleus çapının iki katı veya daha büyük olması olarak tanımlanır.

2.1.6.1. Nöroblastom (schwannian stromadan fakir NT)

NB'lar makroskopik olarak genellikle yumuşak kıvamlıdır; gri-pembe renkte olup, milimetrik lezyonlar olabilecekleri gibi abdomeni dolduracak boyuta kadar büyüyebilirler. Daha diferansiye olan tipleri intermikst tip GNB ve GN gibi

görülebilir sarı-ten renginde ve sert kıvamda karşımıza çıkabilirler. Hemoraji, nekroz, kist oluşumu ve kalsifikasyon, tümör boyutları arttıkça ortaya çıkabilecek görünümüdür. Mikroskopik olarak, NB'lar, hiperkromatik nükleuslu ve dar sitoplazmalı küçük hücre topluluklarından oluşur. Tümör hücrelerinin arasında ince fibrovasküler septalar olduğundan lobüler görünüm ortaya çıkar. Miyelinsiz akson demetlerinin oluşturduğu nöropil denilen narin fibriler matriks, iyi diferansiye NB'larda görülebilir. NB'ların yaklaşık %30'unda Homer Wright psödoretleri mevcuttur. Bunlar, nöral uzantıların birleştiği merkezi boşluk etrafında dizilen 1-2 sıra nöroblast hücrelerinin oluşturduğu yapılardır (20).

Uluslararası Nöroblastom Patoloji Komitesi (INPC) (Tablo 1) sınıflandırmasında, andiferansiye NB nöropil içermez ve sitoplazma sınırları belirsiz küçük-orta boyutlu hücrelerden oluşur. Nükleus, içinde nükleolü net seçilemeyen ve kaba granüler kromatin yapısında (tuz ve biber) ve yuvarlak şekillidir. Dikkat edilmesi gereken unsurlardan biri koagülatif nekroz alanlarını nöropil ile karıştırmamaktır. Ayırıcı tanıda yer alan Ewing sarkomu/primitif nöroektodermal tümör (EWS/PNET), rabdomyosarkom, desmoplastik küçük yuvarlak hücreli tümör, blastemal Wilms tümörü ve lenfomayı kapsayan diğer küçük mavi hücreli tümörlerden ayırma, mature olmayan ganglion hücrelerinde diferansiyasyonu gösteren veziküler nükleuslu ve nükleolü belirgin olan az sayıdaki hücrelerin varlığı değerli bir mikroskopik bulgudur. Doğru teşhis için immünohistokimyasal (İHK) ve moleküler genetik çalışmalar önemli bir yer tutar (20).

Az diferansiye NB'da tanım olarak, diferansiye nöroblastlar neoplastik hücrelerin %5'inden azını oluşturur. Hem andiferansiye hem de az diferansiye NBların her ikisinde de ganglionöromatöz stroma ya yoktur ya da çok azdır (20).

Diferansiye olmakta olan NB'larda ganglionik diferansiyasyon gösteren hücrelerin oranı %5 ten fazladır. Genellikle diferansiye olmakta olan NB'lar az diferansiye NB'lara göre daha yoğun nöropil içerirler. Tanımsal açıdan, intermikst tip GNB'lardan farklı olarak ganglionik diferansiyasyon gösteren hücreler tümörün %50'sinden azını oluşturmaktadır (18).

2.1.6.2. Ganglionöroblastom intermikst tip (Schwannian stromadan zengin NT)

Bu kategori, ganglionöromatöz dokuda birbirine karışmış veya rastgele dağılmış, çıplak nöropil arka planında iyi tanımlanmış mikroskobik nöroblastik hücre yuvalarından oluşan tümörleri içerir. Bu yuvalar, disferansiyasyonun çeşitli aşamalarında olan genellikle de diferansiye olmakta olan nöroblastların hakimiyetindeki hücre karışımından oluşur. Tanım gereği, tümör dokusunun >%50'si, bol miktarda Schwannian stroma içine gömülmüş ganglion hücreleriyle birlikte, ganglionöromatöz bir görünüm gösterir (6).

İntermikst tip GNB, nodüler GNB'dan makroskopik açıdan belirgin hemorajik nodül oluşturmaması veya mikroskopik açıdan stromadan zengin ve stromadan fakir alanları arasındaki geçişlerin itici patern oluşturmayıp infiltratif patern göstermesiyle ayrılır (20).

2.1.6.3. Ganglionöroblastoma, nodüler (kompozit, Schwannian stromadan zengin/baskın ve Schwannian stromadan fakir NT)

Bu gruptaki tümörler, makroskopik olarak bir veya daha fazla görülebilen, genellikle hemorajik ve/veya nekrotik nöroblastik nodüllerin (stromadan fakir bileşen); ganglionöroblastomanın intermikst alt tipi (stromadan zengin bileşen) veya ganglionöroma (stromadan baskın bileşen) komponentlerinin birlikteliğiyle karakterizedir. "Kompozit" terimi, tümörün biyolojik olarak farklı klonlardan oluştuğunu belirtir. Nodüler tip GNB kategorisi PNT'lerin agresif histolojik özellikler içeren grubundadır (6,20).

2.1.6.4. Ganglionöroma (Schwannian stroma hakim NT)

Bu gruptaki tümörler Schwannian stromasında ayrı ayrı dağılmış ganglion hücrelerinin varlığı ile karakterizedir. Bu kategoride matür ve matürleşen olmak üzere iki alt tür mevcuttur. Matürleşen ganglionörom alt tipinde hem matür hem de matürleşen ganglion hücreleri bulunurken, matür ganglionöroma alt tipinde, sadece Schwannian stroma içinde matür ganglion hücreleri bulunur. Matür ganglion hücreleri satellit hücrelerle çevrilidir. Stromal doku genellikle perinöral hücrelerle biraraya gelmiş Schwann hücrelerinden oluşan iyi organize fasiküler haldedir (6).

Matür alt tip GN, geleneksel sınıflandırma şemalarındaki prototipik GN'dur. Bu tümörlerin %30'undan azı adrenal bezde gelişir ve sıklıkla da semptoma sebebiyet vermezler. Adrenal GN'lar (matür alt tip GN) genellikle mediastendeki ve retroperitondakilere göre daha küçüktür. Bu tümörler keskin sınırlı olsalar da gerçek bir kapsülleri yoktur. Kesitleri, gri-ten rengindedirler ve kıvamları yumuşak ve jelatinöz olabileceği gibi, leiomyomu anımsatan sert ve storiform görünümde de olabilir(20).

2.1.7. İmmünohistokimyasal Bulgular

Tümör hücreleri çeşitli nöronal belirteçleri değişken şekilde eksprese edebilirler. Sinaptofizin, kromogranin, PGP9.5, CD56 ve NFP içeren panellerin uygulanması önerilir. Ayrıca tümör hücreleri tirozin hidroksilaz ve PHOX2B gibi nöral krest belirteçleri ve NB84 gibi nöroblastom belirteçleriyle de pozitiflik gösterir (21) Bu pozitif belirteçlerin ayırıcı tanıda yer alan mavi yuvarlak hücreli tümör grubunda negatif olan belirteçlerle birlikte kullanılması tanısal açıdan faydalıdır. MYCN amplifiye tümörlerin çoğunda nöroblastlar MYCN proteini eksprese eder (22). GNB'un intermikst alt tipinde ve ganglionöromada matür Schwann hücreleri, S100 pozitifdir. S100 aynı zamanda bazı nöroblastomlarda, fibrovasküler septalarda olduğu varsayılan schwannian hücreleri boyayabilir. Böylelikle NT'in alt tiplendirilmesinde kolaylık sağlar (6).

2.1.8. Elektron Mikroskopik Bulgular

NB hücreleri, dağınık ribozomlar, az miktarda granüler endoplazmik retikulum, mitokondri ve küçük Golgi zonları içerir. Hücre uzantıları intermedier filamanlar ve mikrotübül demetleri yanısıra nörosekretuar granüller ve sinaptik veziküller içerir. Vakaların yaklaşık %10 unda glikojen birikimleri vardır. Andiferansiye NB ile Ewing sarkom/pirimitif nöroektodermal tümör (EWS/PNET) ayrımı ultrastrüktürel olarak mümkün olmayabilir. Bu yüzden tanısal ayırmada moleküler genetik ve biyokimyasal çalışmalar çok önemli bir rol oynamaktadır (20).

2.1.9. Genetik ve Moleküler Bulgular

2.1.9.1. Genetik Profil

Sempatikoadrenal zincirden köken alan NB'un biyolojisi, normal sempatik nörona çok benzerdir. Olağan gelişim sürecinde primordial nöron hücreleri göç ederek melanosit, duyu nöronu, enterik ganglion hücreleri ve sempatik nöronlar gibi çeşitli hücreleri oluştururlar. Primordial nöron hücrelerinin bu gelişim sürecinde ilk sinyal kaynağı "Bone Morphogenic Protein" (BMP)'dir. Sonrasında "Mammalian Achaete Scute Homolog-1" (MASH1) transkripsiyon faktörü, sempatik nörona dönüşümde önemli rol oynar. Bu dönemi etkileyen pek çok gen (PHOX2A, PHOX2B, MYCN vb.) mevcuttur. Diferansiyasyon sürecinin nihayetinde tirozin kinaz reseptörleri (TrkA, TrkB, TrkC) devreye girer. Bu gelişim sürecinde meydana gelen somatik genetik değişiklikler (allel kazanım, onkogen aktivasyonu, allelik kayıp, tümör baskılayıcı genler) ve anormal gen ekspresyon ürünü proteinler (nörotrofin reseptör ekspresyonları) tümör gelişimde görev alan önemli mekanizmalardır (23).

2.1.9.1.1. Somatik Genetik Değişiklikler

Allelik kazanımı, onkogenlerin aktivasyonunu, allelik kaybını ve tümör baskılayıcı genlerin kaybını içeren bir grup olarak incelenebilir (6).

2.1.9.1.1.1. Tümör Hücresi DNA İçeriği (Ploidi)

Yapısal anormallikler olmaksızın tam kromozom kopya sayısı kazanımları gösteren tümörler (hiperdiploid tümörler) mükemmel bir prognoz ile ilişkilidir. Diploid aralıktaki tümörler ise kötü prognozla seyredir. Hiperdiploidinin muhtemel sebebi mitoz sırasında kromozom ayrışmasının olması gerektiği gibi gerçekleşmemesidir. Akış sitometri analizi, DNA indeksinin belirlenmesi için toplam hücre DNA'sının ölçülmesinde basit ve yarı otomatik bir yöntem olarak kullanılır (6).

2.1.9.1.1.2. Segmental kromozom kaybı/kazanımı ve mutasyonları

Segmental kromozom kopya sayısı değişiklikleri (kayıplar veya kazançlar) ve somatik mutasyonlarla ortaya çıkan tümörler, bu değişiklikleri olmayan tümörlere göre daha yüksek bir nüksetme riski ile ilişkilidir. Kromozomal instabilite, bireysel

vakaların belirli bir noktasında ölçülebilir olmayıp, dinamik bir süreç olarak algılanmalıdır (6).

2.1.9.1.1.2.1. Kromozomal kayıp

Olguların %25-35'inde 1p kromozomunda heterozigotluk (LOH) kaybı tespit edilmiş olup delesyonların çoğu 1p36'nın distalinde yer almaktadır. Distal 1p'nin tümör baskılayıcı genleri veya nöroblastik hücrelerin farklılaşmasını kontrol eden genleri içerdiği düşünülmektedir. Çok değişkenli analizler bu delesyonun azalmış hastalıksız sağkalım ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. 1p'nin LOH'si ile MYCN amplifikasyonu arasında bir ilişki tanımlanmıştır. İlginç olarak, 1p alel kaybı, 17q kazanımı bulunmayan veya her iki değişikliğin de bulunmadığı durumlarda, MYCN amplifikasyonu neredeyse hiçbir zaman meydana gelmez. Ancak başka çalışmalarda, 17q kazanımlarının NB'da kötü prognoz ile ilişkili olmadığı belirtilmiştir. Vakaların %35-45'inde 11q kromozomunun LOH'si tanımlanmıştır; 11q23, delesyon işlemi için en yaygın alandır. LOH'ye yol açan kromozom 11q delesyonları sıklıkla hastanın yaşının ileri olmasıyla ilişkilidir ve nadiren MYCN amplifikasyonu ile kombinasyon halinde ortaya çıkar. Kromozom 11q23 delesyonunun lokalize veya evre 4S tümörlerde artmış relaps riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (6,20).

2.1.9.1.1.2.2. Kromozomal kazanç

Trizomi 17q, NB'ın yaklaşık %60'ında tespit edilmiştir. Kazanım bağımsız olarak meydana gelebilmesine rağmen sıklıkla kromozom 1 ve 17 arasındaki dengesiz translokasyonun bir parçası olarak meydana gelir. 17q sınır değerleri değişiklik gösterir ancak 17q22-qter'de bir bölge tanımlanmıştır. Nöroblastomlarda kromozom 1q kazancı da rapor edilmiştir (6).

2.1.9.1.1.3. MYCN amplifikasyonu

MYC proto-onkogeni tüm hücrelerde salınan nükleer transkripsiyon faktörlerinden biridir. MYC proteini aktif olmayan bir hücre ile ilişki kurduğunda hücreyi hızlıca bölünmeye götürür. Normal hücrede hücre çoğalma döngüsü başladığında MYC düzeyi normal bazal düzeye inerken; MYC geni onkogenik türü, proliferasyon olduğu halde azalmaz ve salınımına devam eder. MYC proteini diğer

genlerin transkripsiyonunu aktive veya suprese eder. MYC ile aktive olan genler, hücreyi döngüye sokan siklin-bağımlı kinazlar (CDKs) başta olmak üzere çeşitli büyüme uyarıcı genlerdir. MYC ile baskılananlar ise CDK inhibitörleridir (CDKIs). Böylelikle MYC hücre siklusuna ilerlemeyi sağlayan genleri aktive edip ilerlemeyi durduran genleri de baskılayarak tümör gelişimine katkı sağlar. Meme, kolon, akciğer ve diğer bazı kanserlerde MYC amplifiye olur. İlgili N-MYC ve L-MYC genleri nöroblastom ve küçük hücreli akciğer kanserinde amplifiye olur (24).

MYCN onkogeni, MYC-box genleri grubundan olup 2p24.3 kromozomunda yer alır. Nöroblastomun önemli bir onkojenik etkeni olarak değerlendirilmekte olup nöroblastoma hücrelerinin nöronal diferansiyasyonunu indüklediği gösterilmiştir. Southern Blot Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH), kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), immunhistokimya ve komperatif genomik hibridizasyon (KGH) gibi farklı moleküler tekniklerle tümör hücresinde MYCN amplifikasyonu ortaya konulabilir. MYCN amplifikasyonunun olduğu tümörlerde, RNA düzeyleri ve protein düzeylerinde de ekspresyon artışı vardır. FISH ile, MYCN durumu amplifiye (yani kromozom 2'nin referans sinyallerine göre > 4 kat daha fazla sinyalle), kazanç (artan sinyallerle ancak kromozom 2'nin referans sinyallerine göre < 4 kat daha fazla), amplifiye edilmemiş olarak belirlenir (6).

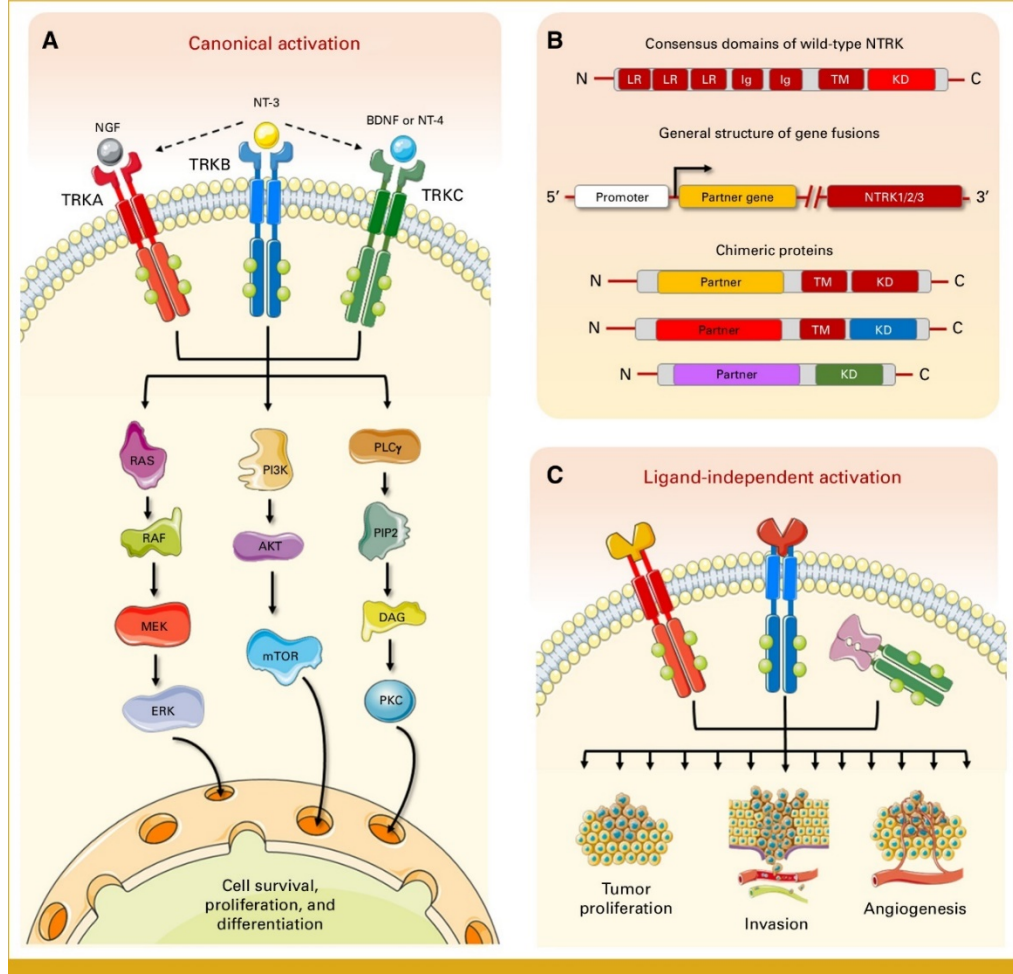
MYCN amplifikasyonu, tüm NB vakalarının yaklaşık %20-25'inde, hızlı tümör progresyonu ve kötü klinik seyir gösteren ileri evre hastalığı olan NB hastalarının %25-%30'unda bulunmaktadır. MYCN amplifikasyonu, evre 1, 2 ve 4S hastaların tedavisinde (daha ileri evre hastalıklarla benzer bir yaklaşım) daha yoğun tedavi protokollerinin kullanılmasını etkiler. MYCN amplifikasyonu genellikle NB'larda bulunurken, daha az sıklıkla nodüler GNB'larda da görülebilir. Ancak, intermikst tip GNB'lar veya GN'lar gibi diğer türlerde bulunmaz. Olumlu histoloji kategorisinde, MYCN amplifikasyonu olmayan (nonamplifiye) ve amplifiye tümörlerin beş yıllık genel sağkalım oranları sırasıyla %99 ve %50'dir. Öte yandan, olumsuz histoloji kategorisinde, nonamplifiye ve amplifiye tümörlerin sağkalım oranları %47,1 ve %23'dür (25).

2.1.9.1.2. Anormal Gen Ekspresyonları

2.1.9.1.2.1. Nörotrofin Reseptör Ekspresyonları

Nörotrofinler, nöronların yaşamını, farklılaşmasını ve büyümesini düzenleyen bir büyüme faktörü protein ailesidir. Nörotrofin reseptörleri arasında üç tirozin kinaz reseptörü (TrkA, TrkB ve TrkC) bulunur. Bu reseptörler NTRK 1,2,3 genleri tarafından kodlanmakta olup, ekspresyonları, nöroblastoma biyolojisinde önemlidir (Şekil 1) (26,27). Ligandları sırasıyla NGF (Neuron Growth Factor), BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), NT-4/5 (Neurotrophin 4/5) ve NT3 (Neurotrophin 3)'dür. TrkB'nin nörotrofin-4/5 ile etkileşime girdiği bilinmektedir. TrkA, NB'ların %91'inde mevcuttur. Yüksek TrkA ekspresyonu, MYCN amplifikasyonu ile ters ilişkilidir ve iyi klinik özellikler (küçük yaş, düşük evre) ve olumlu prognoz ile ilişkilendirilir. NGF/TrkA yolu, bazı hastalarda apoptoz yoluyla tümörün spontan regresyonu veya nöroblastik farklılaşmada kritik bir rol oynayabilir. Son zamanlarda, özellikle agresif seyirli tümörlerde, TrkA/NGF sinyalini engelleyen anjiogenetik ve onkogenik özelliklere sahip aktif bir TrkA izoformu (TrkAII-I) belirlenmiştir. TrkB, MYCN amplifikasyonu olan tümörlerde daha yaygın olarak ifade edilir ve agresif klinik seyir ile ilişkilidir. TrkB ve ligandı BDNF, aynı tümör hücrelerinde eksprese edilir ve tümöre hayatta kalma ve büyüme avantajı sağlayan bir otokrin veya parakrin döngüsü oluşturabilir. TrkB/BDNF yolağı aynı zamanda hücrenin ilaç direncini belirler. TrkC'nin ise TrkA reseptörü ile çok benzer özellikler içerdiği, ayrıca bir prognostik öneminin olmadığı bilinmektedir (6,20,27,28).

NTRK füzyonlarının taranması genellikle moleküler düzeyde yapılmakla birlikte bu yöntem pahalı, zahmetli ve zaman alıcıdır (4). Bu sorunları çözmek için TRK füzyon protein ekspresyonunu tespit eden kullanımı kolay, ucuz ve yaygın kullanılabilir pan-TRK İHK antikoru üretilmiştir.



Şekil 1. TRK çalışma mekanizması

(A) NTRK1, NTRK2 ve NTRK3 genleri, normal koşullar altında nörotrofinlerin (NGF, BDNF, NT-3 veya NT-4) bağlanmasına yanıt veren ve hücrenin hayatta kalması, çoğalması, diferansiyasyonu ile ilişkili temel hücre içi yolları aktive eden tirozin kinaz reseptörlerini kodlar. (B) Reseptörler, TM yapısı yoluyla iki Ig benzeri yüksek afiniteli reseptör ve üç LR motifinden oluşan hücre dışı bir alana bağlanan tirozin-KD'li bir hücre içi alandan oluşan bir konsensus yapısına sahiptir. Sayısız ilgisiz ortak gen ile gen füzyonları, yapısal aktivasyonu ligandtan bağımsız bir şekilde koruyan çeşitli kimerik proteinlerin aşırı ekspresyonuna yol açar. Bazı durumlarda TM alanı da kaybolabilir, bu da hücre içi kinazlar (yani ETV6-NTRK3) ile sonuçlanır; (C) Düzensiz yapısal aktivasyon, hücre dönüşümüne, kontrolsüz büyümeye ve tümörün ilerlemesine yol açar. (BDNF, beyin kaynaklı nörotrofik faktör; Ig, immünoglobulin; KD, kinaz alanı; LR, lösin açısından zengin; NGF, sinir büyüme faktörü; NT-3

(nörotrofin-3); NT-4, (nörotrofin-4); NTRK, nörotrofik tropomiyosin reseptör kinazı; TM, transmembran)

Şekil, “Beyond Clinical Trials: Understanding Neurotrophic Tropomyosin Receptor Kinase Inhibitor Challenges and Efficacy in Real-World Pediatric Oncology” isimli makaleden alıntılanmıştır (27).

2.1.9.1.2.2. ALK geninin konumu, yapısı ve değişiklikleri

ALK geni NB'da NB hücresi çoğalmasını ve hayatta kalmasını destekleyen onkogenik bir sürücüdür; kromozom 2'nin kısa kolunda (2p23) bulunur. ALK reseptörü, insülin reseptörü üst ailesinin bir üyesidir ve bir tirozin kinaz enzimidir. Yapısı hücre dışı alan (iki MAM, bir LDLa) ve bir glisin açısından zengin alan, bir bağlayıcı transmembran bölgesi ve bir hücre içi alandan (tirozin kinaz alanı) oluşur. ALK reseptörleri (CD246), FAM150 ligand bağlanması ve ardından kalıntıların oto ve transfosforilasyonu ile fizyolojik olarak aktive edilir ve bu, çekirdeğe sinyal iletimini destekler. Normal ALK proteini (CD 246) klasik bir tirozin kinaz reseptörüdür. Nöron ve bağırsak gelişiminde rol oynar ve kromozom 2'de (2p23) yer alan normal ALK geninden kopyalanır (29,30).

Tümörlerde, ALK proteinleri sıklıkla aşırı derecede veya anormal biçimde ifade edilir. Bu durum ALK geninde yeniden düzenlemeler, füzyonlar, kopya sayısı artışları veya gen amplifikasyonu ile aktive edici kinaz mutasyonlarından kaynaklanır. Kanserlerin yaklaşık %3,3'ünün ALK değişiklikleri içerdiği bilinmektedir. ALK genindeki değişiklikler, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC), inflamatuvar myofibroblastik tümör (IMT), nöroblastom, özofagus karsinomu, renal medüller karsinom, meme karsinomu, seröz over karsinomu, tiroid karsinomu ve kolorektal karsinom gibi birçok solid tümörde tanımlanmıştır (29,30).

Yeni tanı almış NB hastalarının %8-16'sında ALK değişiklikleri saptanmıştır. NB vakalarının ~%1-2'si kalıtsal (otozomal dominant) olup bunların yaklaşık yarısında germline fonksiyon kazanımlı ALK mutasyonu bulunmaktadır. ALK mutant NB'da hayatta kalma oranı ALK wild tip (WT) olanlara göre daha düşüktür. ALK mutasyon tiplerinden bazıları krizotinib'e direnç kazandıran agresif bir hastalık fenotipine sebep olabilmektedir. Ayrıca ALK F1174L ve MYCN amplifikasyonunun birlikte ekspresyonu, NB'da kötü prognoz ile ilişkilidir (6,29).

Alectinib, brigatinib, crizotinib, seritinib ve lorlatinib gibi birkaç ilaç, ALK geninde değişiklikler gösteren tümörlerin tedavisinde kullanılmak üzere onay almıştır. Bu onayların çoğu, özellikle NSCLC için geçerlidir. Ancak, FDA, krizotinib gibi ALK inhibitörlerini, İMT ve hematolojik malignite olan Anaplastik büyük hücreli lenfoma (ALBL) gibi diğer durumlar için de onaylamıştır (29).

ALK mutasyonu NB vakalarının %10'unda, gen amplifikasyonu veya protein aşırı ekspresyonu ise %25'inde görülür ve her iki durum da kötü prognoz ile ilişkilidir. ALK immunohistokimyası her zaman gen ekspresyonu ile uyumlu olmasa da, özellikle tedaviye dirençli vakalarda gen sekanslama teknolojisi (klasik veya NGS) kullanılarak yapılacak mutasyon analizi, hedefe yönelik tedavi seçenekleri için anlamlıdır. NB'larda prognostik ve prediktif belirteç olarak değerlendirilen diğer aday genler ise ATRX, TrkA ve PHOX2B'dir (17). Ayrıca yapılan çalışmalardan bazılarının ALK'yı aşırı eksprese eden tümörleri tanımlamak için yalnızca İHK'ya dayandığını ve İHK bulgularına dayanarak ALK pozitif kanser hastalarını kaydettiğini belirtmek önemlidir (29).

2.1.10. Prognostik Sınıflandırma

Prognostik sınıflama sistemleri ve risk grupları PNT'ler için oldukça önemlidir. Önceki yıllarda çeşitli sınıflandırma sistemleri geliştirilmiştir. Bunların uluslararası kabul görenlerinden biri Shimada sınıflandırmasıdır. Bu sınıflama sistemi, ilk olarak 1984'te ortaya konulduğu haliyle, tümörleri stromal gelişim derecesine ve nöroblastik hücrelerin diferansiyasyon derecesine göre ayırır (31). Shimada sınıflamasına göre tümörler, "Schwannian stromadan zengin" ve "Schwannian stromadan fakir" olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır. Schwannian stromadan zengin tümörler, olgun ganglion hücreleri ve iyi gelişmiş stromal dokular içerirken, Schwannian stromadan fakir tümörler, ince fibro-vasküler septalarla düzensiz bir şekilde ayrılan olgunlaşmamış nöroblastik hücrelerden oluşur. Schwannian stromadan zengin tümörler; iyi diferansiye, intermikst ve nodüler isimli alt gruplara ayrılır. Schwannian stromadan fakir tümörler ise "andiferansiye" ve "diferansiyasyon bulguları gösteren" isimli alt gruplara ayrılır. andiferansiye grup, %5'ten az farklılaşan popülasyon içeren neredeyse tamamen immatür nöroblastlardan oluşurken, diferansiyasyon bulguları gösteren grup en az %5 veya daha fazla farklılaşan

popülasyon içeren çeşitli olgunluk derecelerinde nöroblastik hücrelerin karışımından oluşur. İyi diferansiye ve intermikst gruplar iyi prognoza sahipken, nodüler grup kötü prognoz gösterir (31).

Mitotik Karyoreksis İndeksi (MKİ) tümör hücrelerinin mitotik aktivitesini ölçer. Mitotik figürleri karyoreksisten ayırt etmek genellikle zor olduğundan, bunlar mitoz-karyoreksis olarak toplanır ve bir indeks (MKİ) olarak hesaplanır. Rastgele seçilmiş, nekrozlu veya artefaktlı olmayan alanlarda 5.000 hücrede toplam mitoz ve karyoreksis sayılır. Sonuçlar, düşük MKİ: 5.000 hücrede 100'den az mitotik ve/veya karyorektik hücre; orta MKİ: 5.000 hücrede 100-200 mitotik ve/veya karyorektik hücre ve yüksek MKİ: 5.000 hücrede 200'den fazla mitotik ve/veya karyorektik hücre şeklinde sınıflandırılır. Düşük MKİ'li tümörler daha iyi prognoza sahiptir. Yüksek MKİ, tümör hücrelerinin agresif davranışını ve kötü prognozu gösterir. Shimada sınıflamasına göre tanı yaşı, önemli bir prognostik faktördür. Genç yaşta tanı konulan hastalar genellikle daha iyi prognoza sahiptir. 1.5 yaş altındaki hastalar, diferansiyasyon derecesine bakılmaksızın MKİ'ye göre sınıflandırılır. 1.5-5 yaş arasındaki hastalar hem diferansiyasyon derecesi hem de MKİ'ye göre değerlendirilir. 5 yaş üstü hastalar genellikle kötü prognoza sahiptir. Histolojik tip ve tanı yaşı, klinik evreleme ile karşılaştırıldığında prognozu daha iyi öngörür. İyi prognoz grubundaki tümörler, genellikle ileri olmayan evrelerde bulunurken, kötü prognoz grubundaki tümörler ileri evrelerde bulunur (31).

Shimada sınıflaması sonraki yıllarda, yapılan yeni araştırmalarla geliştirilmiştir. Daha sonraki yıllarda bu sınıflandırmayı geliştiren Uluslararası Nöroblastoma Patoloji Sınıflandırması (INPC), terminoloji ve sınıflandırılmada bazı kriterler belirlemiştir. INPC, orijinal Shimada sınıflandırmasının(31) benimsenmesiyle 1999 yılında oluşturulmuş ve 2003'te kısmen revize edilmiştir. Prognostik açıdan önemli ve biyolojik olarak anlamlı kabul edilen ve klinik çalışmalarda risk grubu belirlemesi için kullanılan morfolojik bir sınıflandırmadır. PNT'nin dört kategorisini tanımlamaktadır (31–34).

- I. Nöroblastoma (Schwannian stroma açısından fakir);
- II. Ganglionnöroblastoma, mikst (GNBi, Schwannian stroma açısından zengin);
- III. Ganglionnöroblastom nodüler (GNBn, kompozit Schwannian stroma açısından zengin/stroma dominant ve stroma fakir)

IV. Ganglionöroma (GN, Schwannian stroma baskın)

Orijinal Shimada sınıflamasından geliştirilen INPC sınıflamasındaki temel farklılıklardan söz etmek gerekirse, orijinal Shimada sınıflamasında andiferansiye ve diferansiyasyon bulguları gösteren isimli 2 nöroblastom alt grubu mevcutken, INPC’de “andiferansiye”, “az diferansiye” ve “diferansiye” olmak üzere üç alt grup bulunmaktadır. Ayrıca Shimada sınıflamasındaki GNB’un iyi diferansiye alt tipi, INPC’de “ganglionörom, matüre olan” şeklinde yeniden adlandırılmıştır. Ayrıca INPC’de ganglionöromun “matür” ve “matüre olan” şeklinde iki alt tipi mevcuttur (Tablo 1)(34).

Ayrıca yaş, nöroblast diferansiyasyon derecesi, nodüler patern, Schwannian stroma gelişim derecesi ve mitoz-karyoreksis indeksi (MKİ) temelinde değerlendirilen olumlu ve olumsuz olarak iki risk grubu belirlenmiştir (Tablo 2) (34).

Tablo 2. Yaş, nöroblast diferansiyasyon derecesi, nodüler patern, Schwannian stroma gelişim derecesi ve mitoz-karyoreksis indeksi (MKİ) temelinde tanımlanan olumlu ve olumsuz histoloji gruplarıyla Uluslararası Nöroblastoma Patolojisi Sınıflandırması (INPC)(34).

Teşhis sırasındaki hasta yaşı	Olumlu histoloji grubu	Olumsuz histoloji grubu
Herhangi bir yaş	-Ganglionöroblastom, intermixed (schwanian stroma-zengin) -Ganglinörom (schwanian stroma dominant) her iki alttip (mature olmakta olan veya matüre)	-Nöroblastom (schwanian stroma fakir) indiferansiye alt tip -Nöroblastom (schwanian stroma fakir) herhangi bir alt tip, yüksek MKİ ile birlikte
<18 ay (<547 gün)	-Nöroblastom (schwanian stroma fakir) az diferansiye alt tip, düşük veya orta MKİ ile birlikte	
18-60ay (547 gün-5 yıl)	-Nöroblastom (schwanian stroma fakir) diferansiye alt tip düşük MKİ ile birlikte	-Nöroblastom (schwanian stroma fakir) az diferansiye alt tip -Nöroblastom (schwanian stroma fakir) diferansiye alt tip orta MKİ ile birlikte
>60 ay (5 yıl)		-Nöroblastom (schwanian stroma fakir) herhangi

GNB, nodüler (kompozit, Schwannian stroma açısından zengin/baskın ve Schwannian stroma açısından fakir), nöroblastomatöz nodüllerin özelliklerine bağlı olarak olumlu veya olumsuz histoloji grubunda sınıflandırılır. Bu ayrım için, nöroblastoma (Schwannian stroma-fakir) kategorisinde kullanılan, nöroblastik diferansiyasyon derecesi ve MKI için aynı yaşa bağlı değerlendirme kriterleri nöroblastomatöz bileşenlere uygulanır (34).

2.1.11. Klinik Evreleme

1992 yılında İzmir’de dört pediatrik onkoloji merkezinin katılımıyla başlatılan IPOG-NBL-92 çalışması, German Pediatric Oncology (GPO)-NB-90 protokolünün modifikasyonuna dayanıyordu. Ekim 2002’de ulusal protokol olarak aktive edilen TPOG (Türk Pediatrik Onkoloji Derneği)-NB-2003 çalışmasında, risk gruplarının belirlenmesinde yaş ve evre dışında histopatolojik ve genetik özellikler de (örneğin MYCN amplifikasyonu) kullanılmaya başlandı. 2009’a gelindiğinde TPOG-NB 2009 protokolünde veri girişlerinin internet üzerinden yapılabileceği bir web sayfası oluşturuldu. Bu çalışmada Uluslararası Nöroblastom Evreleme Sistemi (INSS) kullanıldı. Histolojik değerlendirme için ise Uluslararası Nöroblastom Patoloji Sınıflaması (INPC) kullanıldı (Tablo 1). Risk Sınıflaması için Çocuk Onkoloji Grubu (COG) sistemi kullanıldı (Tablo 3). TPOG NB 2020 protokolüne geçerken bazı değişiklikler yapıldı. Evreleme sistemi tamamen güncellenerek, Görüntülemeye Dayalı Risk Faktörleri (IDRF) (Tablo 4) kullanımı ile Uluslararası Risk Gruplaması Evreleme Sistemi’ne (INRGSS) geçildi (Tablo 5). Buna ek olarak, TPOG-NB-2020 protokolünde risk sınıflaması, Uluslararası Nöroblastom Risk Gruplaması (INRG) (Tablo 6) temel alınarak yapıldı (8,17,31,34).

Tablo 3. Çocuk Onkoloji Grubu (COG) Nöroblastom Risk Gruplama Sistemi

INSS Evre	Hasta Yaşı	MYCN Durumu	DNA Ploidi İndeksi	INPC Histoloji Grubu	Diğer	Risk Grubu*
1	Herhangi		Herhangi	Herhangi		Düşük
2A/2B		Amplifikasyon yok	Herhangi	Herhangi	Rezeksiyon≥50%	Düşük
					Rezeksiyon<%50	Orta
					Sadece biyopsi	Orta
		Amplifiye	Herhangi	Herhangi	Herhangi bir derece rezeksiyon	Yüksek
3	≤547 Gün	Amplifikasyon yok	Herhangi	Herhangi		Orta
	>547 Gün	Amplifikasyon yok	Herhangi	Olumlu		Orta
				Olumsuz		Yüksek
	Herhangi	Amplifiye	Herhangi	Herhangi		Yüksek
4	Herhangi	Amplifikasyon yok	Herhangi	Herhangi		Orta
	365-547 Gün	Amplifiye	Herhangi	Herhangi		Yüksek
		Amplifikasyon yok	>1	Olumlu		Orta
		Herhangi	1	Herhangi		Yüksek
		Herhangi	Herhangi	Olumsuz		Yüksek
		Amplifiye	Herhangi	Herhangi		Yüksek
		>547 Gün	Herhangi	Herhangi	Herhangi	
4S	<365 Gün	Amplifikasyon yok	>1	Olumlu	Asemtomatik	Düşük
			Herhangi	Herhangi	Semptomatik	Orta
				Olumsuz	Herhangi	Orta
			1	Herhangi	Herhangi	Orta
		Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Biyopsi için çok hasta	Orta
		Amplifiye	Herhangi	Herhangi	Herhangi	Yüksek
INPC, Uluslararası Nöroblastom Patolojisi Sınıflandırması; INSS, Uluslararası Nöroblastoma evreleme sistemi.						
* Orta risk grubu ayrıca hasta yaşı, MYCN durumu, ploidi, INPC histoloji grubu ve 1p/11q nelerozigotluk yerinin varlığı veya yokluğu temelinde üç alt gruba (gösterilmemiştir) bölünmüştür.						

Tablo 4. Görüntüye göre tanımlanan risk faktörleri (IDRF)

Tümör yerleşimi	Kriterler
Boyun	-Karotis arter ve/veya vertebral arter, internal jugulervene uzanımı/ sarması/kaplaması -Kafa tabanına uzanım -Trakeal bası
Servikotorasik bileşke	-Brakial pleksus ve/veya subklavian, vertebral, karotit damar uzanımı/ sarması/kaplaması -Trakeal bası
Toraks	-Aort ya da majör dallara uzanımı/ sarması/kaplaması -Trakea/majör bronkuslara uzanımı/ sarması/kaplaması -T9-T12 arası kostovertebral bileşkeye infiltrate olan alt mediastinal yerleşimli olan tümör
Torakoabdominal	-Aort veya vena cava uzanımı/ sarması/kaplaması
Abdomen veya Pelvis	-Porta hepatis ve/veya hepatoduodenal ligameninin filtrasyonu -Superiormezenenterik arter kökü ve dallarına uzanım -Çölyakaxis ve/veya Superior Mezenenterik Arter uzanımı -Tek ya da bilateral renal kapsül -Aort ve/veya vena cava -İliak damarlar ya da siyatik çentik uzanımı/ sarması/kaplaması
İntraspinal tümör uzanımı	-Tümörün aksiyal planda spinal aralığın 1/3'ünü aşması -Perimeduller leptomeningeal aralığa uzanım -Spinal kordun anormal görüntülemesi
Komşu doku infiltrasyonu	-Perikardiyum, Böbrek, Karaciğer , Diyafram, Duodenum, Pankreas , Mezenenter
Tümörün iki vücut bölümü arasında uzanımı	-Boyun-göğüs, Göğüs-abdomen Abdomen-pelvis
Not edilen ancak risk faktörü kabul edilmeyen durumlar	-Multifokal tutulum, Plevral efüzyon, Asit

Tablo 5. Uluslararası Nöroblastom Klinik Evreleme Sistemi, INRGSS

Evre	Tanımı
L1	IDRFs parametrelerinin hiçbirini içermeyen lokalize tümör · Lokal olarak tek bir vücut kompartmanında (boyun, göğüs, karın, pelvis) sınırlı · İzole intraspinal sınırlı tümör olabilir (IDRFs içermeyen özellikte)
L2	Bir yada daha çok IDRFs içeren bölgesel lokalize tümör · Aynı taraftaki vücut kompartmanları (boyun-göğüs, göğüs-karın, karınpelvis) arasında tümör geçişi olabilir. · Üst batın yerleşimli tümör kaynaklı, alt mediastinal lenf nodu tutulumu, bölgesel lokalize tümör kabul edilir. · Pelvik kökenli tümörün kaynaklı inguinal lenf nodu tutulumu bölgesel lokalize tümör kabul edilir.
M	Uzak metastaz (MS hariç) · Primer hastalık uzanımı değildir. · Bölgesel olmayan lenf nodu tutulumu uzak metastaz kabul edilir. · Assit, plevralefüzyonda malign sitolojinin metastatik kabul edilmesi için primer tümörü farklı vücut kompartmanında yerleşmesi gereklidir
MS	18 aydan (547 gün) küçük hastalarda, cilt, karaciğer ve/veya kemik iliği <%10 sınırlı metastatik hastalık olmalı · Kemik/ kemik iliği MIBG negatif olmalı · Primer tümör MIBG pozitif ise ek kemik taramasına gerek yok · Primer tümör L1/ L2 özellikte olabilir
Multifokal hastalığı olan olgular, en büyük uzanımına göre değerlendirilerek evrelendirilmeli, Asit ve plevral efüzyonu olan olguların evrelendirmesine dikkat edilmelidir.	

2.1.12. Klinik Risk Grupları

NB'de tedavi, risk gruplarına göre düzenlenmektedir. Risk grupları hasta yaşı, INRG evrelemesi, tümörün histopatolojik ve genetik özellikleri (MYCN amplifikasyonu, 11q aberasyonu, DNA ploidy indeksi) göz önüne alınarak belirlenmiştir (Tablo 6) (6,35).

Tablo 6. Uluslararası nöroblastom risk grup (INRG) fikir birliği tedavi öncesi sınıflandırma şeması (36)

INRG Evre	Yaş (Ay)	Histolojik Kategori	Tümör Diferansiyasyon Değeri	MYCN Durumu	11q Aberasyon	Ploidi	Risk Grubu
L1/L2		GN Matürleşen GNB Intermikst					Çok Düşük
L1		Matürleşen GN Veya GNB Intermikst Dışında Herhangi Biri		Amplifikasyon yok			Çok Düşük
				Amplifiye			Yüksek
L2	<18	Matürleşen GN Veya GNB Intermikst Dışında Herhangi Biri		Amplifikasyon yok	Yok		Düşük
					Var		Orta
L2	≥18	GNB Nodüler Veya NB	Diferansiye	Amplifikasyon yok	Yok		Düşük
					Var		Orta
			Az Diferansiye Veya Andiferansiye	Amplifikasyon yok	Herhangi		Orta
L2	Herhangi			Amplifiye			Yüksek
M	<18			Amplifikasyon yok		Hiperdiploid	Düşük
M	<12			Amplifikasyon yok		Diploid	Orta
M	12-18			Amplifikasyon yok		Diploid	Orta
M	<18			Amplifiye			Yüksek
M	≥18						Yüksek
Ms	<18			Amplifikasyon yok	Yok		Çok düşük
					Var		Yüksek
				Amplifiye			Yüksek

Çok düşük risk grubu: Erken evrede olan ve kötü biyolojik özellikler içermeyen hasta grubudur. Bu gruptaki hastalarda sadece cerrahi tedavi ile % 90'larda kür oranı bildirilmektedir. Bu grupta yer alan hastalar şunlardır:

- tüm evre L1 hastalar (MYCN amplifikasyonu olmayan)
- klinik evresi L2 olup, matürleşen GN veya GNB intermikst tipte olan hastalar
- klinik evresi MS olup MYCN amplifikasyonu ve 11q aberasyonu olmayan hastalar (17).

Düşük risk grubu: bu gruptaki hastalara cerrahi tedavi dışında kemoterapi kürleri uygulanır.

- klinik evresi L2 olan 18 aydan küçük matürleşen GN veya GNB intermikst tip haricindeki MYCN amplifikasyonu ve 11q aberasyonu olmayan hastalar.
- klinik evresi L2 olup, 18 aydan büyük veya eşit olan, diferansiye tipte GNB nodüler tip ve NB tanılı MYCN amplifikasyonu ve 11q aberasyonu olmayan hastalar.
- klinik evresi M olup 18 aydan küçük olan, MYCN amplifikasyonu olmayan ve hiperdiploidi gösteren hastalar (17).

Orta risk grubu:

- klinik evresi L2, 18 aydan küçük matürleşen GN veya GNB intermikst tip haricindeki, MYCN amplifikasyonu olmayan 11q aberasyonu olan hastalar
- klinik evresi L2, 18 aydan büyük veya eşit, GNB nodüler veya NB tanılı, MYCN amplifikasyonu olmayan 11q aberasyonu olan hastalar
- klinik evresi M olan 18 aydan küçük, MYCN amplifikasyonu olmayan diploidi gösteren hastalar (17).

Yüksek risk grubu: Tekrarlayan kemoterapi kürleri dışında radyoterapi veya kemik iliği transplantasyonu endikasyonu oluşturabilecek, kötü klinik seyir gösteren hasta grubudur.

- diğer özellikleri farketmeksizin MYCN amplifikasyonu olan hastalar
- klinik evresi M olup 18 aydan büyük veya eşit hastalar (17).

Nöroblastomun güncel evrelemesi risk gruplarının belirlenmesi bu şekilde olmakla beraber 2021 yılında Nakazawa ve arkadaşları, olumlu ve olumsuz histolojiyi ayırt etmek için INPC'de odaklanılan tümör morfolojisi ve histolojisinin nöroblastomun genetik temeli ile ilişkisini araştırmışlardır. Yeni yapılacak sınıflamalarda ortaya konulabilecek yeni moleküler parametrelerin varlığına dikkat çekmişlerdir. Çalışmalarında MYCN amplifikasyonu, yanısıra ALK mutasyonu ve TERT yeniden düzenlemeleri gibi moleküler yeniliklerden söz edilmiştir. MYCN amplifikasyonunun, nöroblastomda kötü prognozun güçlü bir göstergesi olduğu vurgulanıp, ALK mutasyonunun, tümörlerin tedaviye direncini ve agresif büyümesini artırabileceği, TERT yeniden düzenlemelerinin ise tümörlerin telomeraz aktivitesini ve dolayısıyla hücrelölümsüzlüğünü artırarak kötü prognoza katkıda bulunabileceği ortaya konulmuştur. Ayrıca çalışmada MYCN amplifikasyonu olmayan olumsuz histolojiyi açıklayan moleküler mekanizmalardan bahsedilmiştir. Bu moleküler mekanizmalar arasında segmental kromozom anormallikleri (1p delesyon, 11q delesyon ve 17q kazanımı), MYC aşırı ekspresyonu, ALK mutasyonu/amplifikasyonu ve/veya yüksek ALK protein ekspresyonu, ATRX mutasyonu ve TERT yeniden düzenlemesi yer almaktadır (32). Yakın zamanda Ikegaki ve Shimadanın önerdiği olumsuz histolojideki nöroblastomları ayırmayı düşündükleri dört alt gruptan söz edilmiştir. Bunlar: MYC alt grubu, TERT alt grubu, ALT alt grubu ve Null alt grubudur. INPC nin nöroblastik hücreler ve Schwannian stromal hücreler arasındaki karşılıklı etkileşim (çapraz konuşma), TrkA ekspresyonu (yüksek afiniteli sinir büyüme faktörü reseptörü) ve MYCN onkogen durumu (amplifiye ve non-amplifiye) gibi üç ana biyolojik faktörün fenotipik belirtilerine dayanarak yaşa uygun ardışık tümör farklılaşma/olgunlaşma ve mitotik/karyorektik aktiviteler çerçevesini tanımladığı belirtilmiştir. Tümör büyümesi ve ilerlemesinde yer alan temel yollar ve anahtar moleküller üzerine yapılan son çalışmalarla birlikte, INPC'deki uygun olmayan histolojiye sahip nöroblastomun biyolojik alt grupları, etkili moleküler hedefli tedavi sağlamak amacıyla önerilmiştir (37).

2.1.13. Tedavi ve Prognoz

Düşük risk grubundaki nöroblastoma hastaları genellikle ameliyat veya biyopsiden sonra kemoterapi veya radyoterapi olmaksızın takip edilir. Orta riskli

hastalar cerrahi ve daha az agresif kemoterapi ile tedavi edilirken, yüksek riskli hastalar yoğun kemoterapi, cerrahi, radyoterapi, kemik iliği/kök hücre nakli ve biyolojik tedavilerle tedavi edilmektedir. Yüksek riskli olmayan hastalar için 5 yıllık sağkalım oranı %90 iken, yüksek riskli hastalar için bu oran %50'dir. INRG sınıflandırma sistemine göre, çok düşük riskli hastalar için 5 yıllık olaysız sağkalım oranı %85'in üzerindedir; düşük riskli hastalar için %75-85, orta riskli hastalar için %50-75 ve yüksek riskli hastalar için %50'nin altındadır (3,6).

Son yıllarda NB tedavisinde bireyselleştirilmiş tedavi stratejileri, ön plana çıkmaktadır. Bu yeni yöntemde temel amaç hastaya ve tümöre bağlı benzersiz faktörleri birleştirerek etkinliği artırmak ve toksisiteyi azaltmaktır. Hedefe yönelik tedavi yöntemleri arasında; MYCN İnhibitörleri, Aurora Kinaz İnhibitörleri: (AURKA ve AURKB'yi hedefleyerek, MYCN aktivitesi kontrol edilmeye çalışılmaktadır), CDK İnhibitörleri, ALK İnhibitörleri, TRK İnhibitörleri, Anjiyogenez İnhibitörleri, mTOR İnhibitörleri, İmmünoterapi (Anti-GD2 antikorları ve CAR-T hücre tedavileri ile immün yanıt artırılmaya çalışılır), Moleküler Biyomarkerlar (PHOX2B, PD-L1, PIM kinaz, AHR, UCHL1, TMOD ve PTPN11 gibi biyomarkerlar, NB tedavisinde önemli rol oynar) yer almaktadır (38).

ALK (anaplastik lenfoma kinaz) mutasyonları, nöroblastoma vakalarının yaklaşık %6-10'unda bulunur. En yaygın mutasyonlar R1275, F1174 ve F1245 bölgelerinde meydana gelir. Crizotinib, ilk nesil ALK inhibitörü olarak sınırlı etkinlik göstermiştir. Dirençli mutasyonlar için yeni nesil inhibitörler olan ceritinib, entrectinib ve lorlatinib umut vadetmektedir (39).

Yüksek TrkB ekspresyonu, yüksek riskli nöroblastoma ile ilişkilidir. Trk inhibitörleri, entrectinib ve larotrectinib gibi, çocuk hastalarda olumlu güvenlik profilleri ve önemli hastalık yönetimi başarıları göstermiştir. Bu inhibitörler, nöroblastoma tedavisinde sonuçları iyileştirmeyi amaçlayan kişiselleştirilmiş tıp yaklaşımının bir parçasıdır (40).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul toplantısının 02/11/2023 tarihli B.10.1.THK.4.34.H.GP.0.01/418 numaralı kararı ile onaylanmıştır. Bütçe desteği için Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Proje Birimi'ne başvurulmuştur ve çalışmamıza 2024/039 proje numarası verilerek bütçe desteği sağlanmıştır.

3.1. VAKA SEÇİMİ

Bu çalışmada 2016-2024 yılları arasında Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümü'nde tanı almış 24 nöroblastom, 6 ganglionöroblastom ve 9 ganglionörom vakası incelenmiştir. Tümörlerin, morfolojik, mikroskopik özellikleri, genetik profilleri, hastaya ait prognostik veriler araştırılmıştır. Hastaların prognostik ve klinik bulguları Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Onkoloji Bölümü'nden temin edilmiştir. Tedavi sonrası biyopsi örneği mevcut olan hastaların, tanı konulan ilk biyopsileri ve tedavi sonrası ilk biyopsileri çalışmaya dahil edilmiştir. Nekrotik dokular, artefaktı yoğun olan dokular, doku miktarı yetersiz örnekler çalışma dışı bırakılmıştır.

3.2. KLİNİK ÖZELLİKLER

Olgulara ait yaş, cinsiyet, primer tümör lokalizasyonu, evre gibi klinik göstergeler değerlendirilmiştir. Olguların klinik dosyalarından yapılan incelemeler ile ancak 7 adet olgunun MYCN amplifikasyon durumu elde edilebilmiştir. Vakalara ait risk grubu ve klinik evre belirlemesi INRGSS kullanılarak, histopatolojik sınıflama INPC kullanılarak yapılmıştır.

3.3. Mikroskopik İnceleme

Tümör dokularına ait parafin bloklar ve camlar yeniden taranmıştır. INPC sınıflamasına göre tipleri ve alt tipleri kaydedilmiştir. Kalsifikasyon varlığı, cerrahi sınır salimliği, en büyük tümör boyutu, MKİ durumu iki patolog tarafından bakılıp kaydedilmiştir.

3.4. İMMUNHİSTOKİMYASAL YÖNTEM

H&E boyalı camlardan çalışma için en uygun parafin bloklar seçilmiştir. Bloklardan alınan kesitlere ALK D5F3 klonu ve Pan-TRK 17341 klonu antikorları aşağıda belirtilen uygun yöntemlerle uygulanmıştır.

Pan-TRK: Parafine gömülen dokular 3 mikron kesitler halinde Leica marka Bond Max cihazında etüv ve deparafinizasyonu yapıldı ve edtada 20 dk kaynatılmıştır. Pan-TRK (rabbit monoclonal epr17341 clone Abcam (ab181560) marka primer antikor) 1:200 dilusyonda 30 dakika inkübe edilip, sekonder elemanlar için Leica marka HRP konjuge polimer detection kit kullanılmıştır (DS9800, New Castle, United Kingdom). Hidrojen peroksit 10 dakika, post polimer 8 dakika, polimer 8 dakika, dab 8 dakika, hematoksilen 10 dakika bekletilip her basamakta yıkama solüsyonuyla yıkandıktan sonra dehidre edilip entellanla kapatılmıştır.

ALK: Parafine gömülen dokular 3 mikron kesitler halinde Leica marka Bond Max cihazında etüv ve deparafinizasyonu yapıldı ve edtada 20 dk kaynatılmıştır. ALK (rabbit monoclonal D5F3 clone cellsignaling (3633s) marka primer antikor) 1:250 dilusyonda 30 dakika inkübe edilip, sekonder elemanlar için Leica marka HRP konjuge polimer detection kit kullanılmıştır. (DS9800, New Castle, United Kingdom) hidrojen peroksit 10 dakika, post polimer 8 dakika, polimer 8 dakika, dab 8 dakika, hematoksilen 10 dakika bekletilip her basamakta yıkama solüsyonuyla yıkandıktan sonra dehidre edilip entellanla kapatılmıştır.

3.5. İMMUNHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

Tüm vakalar tümörlü dokuların olgulara ait klinik morfolojik bulgularını bilmeyen iki patolog tarafından çift kör olarak değerlendirilmiştir.

ALK ve pan-TRK için aynı değerlendirme yöntemi kullanılmıştır. Tümör hücrelerinin boyanma paternlerine bakılarak, sitoplazmik, membranöz ve hem sitoplazmik hem membranöz boyananlar olarak ayrılmıştır. Boyanma yoğunlukları ve yaygınlıkları iki ayrı kategoride değerlendirilmiştir. Boyanmanın yaygınlığına göre örnekler şu şekilde sınıflandırılmıştır: %76-100 arası boyanma var ise 4+, %51-75 arası ise 3+, %26-50 arası ise 2+, %1-25 arası ise 1+ olarak değerlendirilmiştir. Boyanma şiddeti açısından ise güçlü boyanma 3+, orta şiddette boyanma 2+, zayıf

boyanma ise 1+ olarak sınıflandırılmıştır. Hiç boyanma görülmemesi durumunda ise 0 olarak değerlendirilmiştir.

3.6. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Veriler SPSS 29.0 paket programı kullanılarak analiz edildi. Verilerin dağılımının normalliği Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edilmiştir. Çalışma verilerini değerlendirmek için tanımlayıcı istatistiksel yöntemler (ortalama, standart sapma, frekans) kullanılmıştır. Parametrik veriler için Student's T testi, Tek Yönlü Anova, Pearson Korelasyon Analizi ve Regresyon Analizi uygulanmıştır. Parametrik olmayan veriler için Mann-Whitney U testi, Kruskal-Wallis H Testi ve Spearman Korelasyon Analizi kullanılmıştır. Kategorik değişkenler ise ki-kare testi ile değerlendirilmiştir. Anlamlılık bütün değerler için $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

Progresyonsuz sağkalım (PS), tedavi başlangıç tarihinden hastalığın ilerlediği tarihe, ilerleme görülmeyen hastalarda son kontrol tarihine veya ilerleme görülmeden ölen hastalarda ölüm tarihine kadar geçen süre olarak tanımlanmıştır. Genel sağkalım (GS) süresi, tedavi başlangıç tarihinden son kontrol tarihine veya ölüm tarihine kadar geçen süre olarak hesaplanmıştır. Bu parametreler Kaplan-Meier yöntemleri ve Log-Rank testi kullanılarak karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR

2016-2024 yılları arasında Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ümraniye Eğitim Araştırma Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı'nda NB, GNB ve GN tanısı alan toplam 39 olgu çalışmaya dahil edilmiştir. Hastaların tanı anındaki yaşları 0 gün ile 28 yıl arasında değişmekte olup, ortalama 4.64 yıldır. Tüm hastaların 12'i (%31) 18 aydan küçük, 16'ü (%41) 18 ay-5 yaş arası ve 11'i (%28) 5 yaş üzeri olarak saptanmıştır. Bunların 18'i (%53.8) kız, 21'i (%46.2) ise erkektir. Tümör, hastaların 10'unda (%25) adrenal, 11'inde (%28) mediasten, 6'sında (%15) retroperiton, 6'sında (%15) batin içi, 4'ünde (%10) periferik lenf nodu, 1'inde (%2) beyin, 1'inde (%2) rektum yerleşimlidir. Lezyonların büyüklüğüne bakıldığında en küçük lezyonun çapı 12 mm, en büyük çap 185 mm'dir. Hastalar Uluslararası Nöroblastom Risk Grup Evreleme Sistemi, (INRGSS)'e göre evrelenmiştir. Buna göre hastaların 11'i çok düşük risk grubunda, 4'ü düşük risk grubunda, 6'i orta risk grubunda ve 18'i yüksek risk grubunda olarak belirlenmiştir. Hastaların 10'u (%25.4) exitus olup genel sağkalım ortalama 36.1 aydır. Hastaların 14'ünde (%35.9) nüks gelişmiş olup progresyonsuz sağkalım ort: 32.28 aydır.

Hastaların ilk tanılarında 24'ü (%61.5) nöroblastom, 6'sı (%15.4) ganglionöroblastom, 9'u ise (%23) ganglionöromdur. Devam eden biyopsilerde ilk tanıda nöroblastom olan 4 hasta da GNB tanısı almıştır (Tablo 7).

Nöroblastom hastalarında: Lezyon boyutu ortalama 70.29 mm'dir. Tanı yaşı ortalama 3.25 olup, minimum 4 ay, maksimum 12 yaştır. Genel sağkalım ortalama 33.33 aydır. Progresyonsuz sağkalım ortalama 27.74 aydır. 14'ünde (%58.3) kemik iliği tutulumu mevcuttur. Cerrahi sınırı değerlendirilebilen 7 hastanın 4'ünde (%16.7) cerrahi sınır pozitifdir. Hastaların 13'ü (%54.2) olumsuz histoloji grubunda, 11'i (45.8) ise olumlu histoloji grubundaydı. Hastaların 4'ü (%16.7) diferansiye, 17'si (%70.8) az diferansiye, 3'ü (%12.5) andiferansiyedir. Hastaların 12'sinde (%25) kalsifikasyon mevcuttur. Hastaların 22'si düşük MKİ'e sahipken, 2'si orta MKİ'ye sahipti. Hastaların 9'unda (%37.5) nüks gelişmiş olup 15'inde (%62.5) gelişmemiştir. Hastaların 9'u (%37.5) eksitus olup 15'i (%62.5) sağdır. MYCN mutasyonu bakılabilen 20 hastanın 3'ünde (%12.5) mutasyon saptanırken 17'sinde (%70.8)

mutasyon yoktur. 17q25 mutasyonu bakılabilen 12 hastanın 7 'inde (%58.3) mutasyon saptanırken 5'inde (%41.6) mutasyon yoktur. 11q23 mutasyonu bakılabilen 18 hastanın 4'ü(%22.2) mutasyon saptanırken 14'ünde (%77.8) mutasyon yoktur. 1p36 mutasyonu bakılabilen 13 hastanın 3'ünde(%23) mutasyon saptanırken 10'unda (%76.9) mutasyon yoktur. DNA diploidi durumuna bakılabilen 13 hastanın 5'i(%38.5) hiperploidi iken 8'sinde (%61.5) diploidi mevcuttu (Tablo 7).

Ganglionöroblastom hastalarında: Lezyon boyutu ortalama 71.17 cm'dir. Tanı yaşı ortalama 3.67'dir. Genel sağkalım ortalama 35 aydır. Progresyonsuz sağkalım ortalama 32.33 aydır. Cerrahi sınırı değerlendirilebilen 3 hastanın 3'ünde (%100) cerrahi sınır pozitifdir. Hastaların 1'i (%16.7) olumsuz histoloji grubunda, 5'i (83.83) ise olumlu histoloji grubundadır. Hastaların 5(%83.3)'i intermikst, 1'i (%16.7) nodüler alt tipindedir. Hastaların 7'sinde kalsifikasyon mevcuttur. MKİ bakılabilen hastaların 1'i orta 1'i düşük MKİ'e sahiptir. Hastaların 1'(%16.6)ende nüks gelişmiş olup 5'inde (%83.3) gelişmemiştir. Hastaların 1'i(%16.6) eksitus olup 5'i(%83.3) sağdır. MYCN mutasyonu bakılabilen 4 hastanın 1'inde(%25) mutasyon saptanırken 3'ünde (%75) mutasyon yoktur. 17q25 mutasyonu bakılabilen 1 hastada mutasyon saptanmadı. 11p23 mutasyonu bakılabilen 4 hastanın 1'inde (%25) mutasyon saptanırken 3'ünde (%75) mutasyon yoktur. 1p36 mutasyonu bakılabilen 2 hastada da mutasyon yoktur. DNA diplioid mutasyonu bakılabilen 3 hastanın 1'i(%33.3) hipoploidi iken 2'sinde (%66.7) diploidi mevcuttur (Tablo 7).

Ganglionörom hastalarında: Lezyon boyutu ortalama 69.33'tür. Tanı yaşı ortalama 9.22'dir. Genel sağkalım ortalama 44.22 aydır. Progesyonsuz sağkalım ortalama 44.22 aydır. Cerrahi sınırı değerlendirilebilen 7 hastanın 4'ünde (%44.4) cerrahi sınır pozitifdir. Hastaların 3'ünde (%33.3) kalsifikasyon mevcuttur. Hastaların histolojik alt tipine bakıldığında 2'si(%22.2) matürleşen, 7'si(%77.7) matüre grubundadır. 9 hastanın hiçbirinde nüks gelişmemiştir. 9 hastanın hepsi sağdır (Tablo 7).

Tablo 7. Demografik veriler ve hasta bulguları

Değişkenler	Sınıflandırma		Hasta Sayısı
Yaş	0-18 ay		12 (%31)
	18-60 ay		16 (%41)
	>60 ay		11 (%28)
Cinsiyet	Kız		18 (%53.8)
	Erkek		21 (%46.2)
Yerleşim	Adrenal		10 (%25)
	Ekstraadrenal		29 (%75)
Tanı	NB	Diferansiye	4 (%16.7)
		Az diferansiye	17 (%70.8)
		Andiferansiye	3 (%12.5)
	GNB	İntermikst tip	5 (%83.3)
		Noduler tip	1 (%16.7)
	GN	Matür	7 (%77.7)
		Matürleşen	2 (%22.2)
Klinik evre (NB ve GNB hastalarına uygulanan)	Evre 1		1 (%3.3)
	Evre 2		8 (%26.6)
	Evre 3		19 (%63.3)
	Evre 4		1 (%3.3)
	Bilinmeyen		1 (%3.3)
Risk grubu (NB ve GNB hastalarına uygulanan)	Çok düşük		11 (%28.2)
	Düşük		4 (%10.3)
	Orta		6 (%15.4)
	Yüksek		18 (%46.2)
Shimada Prognostik Sınıfı	Olumlu		25 (%64.10)
	Olumsuz		14 (%35.90)
Prognoz	Progresyonsuz sağ kalım (ay)		15 (%38.46)
	Nüks		14 (%35.90)
	Ölüm		10 (%25.64)
MYCN durumu (NB ve GNB hastalarında bakılan)	Amplifiye		4 (%13.33)
	Amplifikasyon yok		20 (%66.67)
	Bilinmeyen		6 (%20)

4.1. ALK PROTEIN EKSPRESYONU İLE DEMOGRAFİK, HISTOMORFOLOJİK VE KLİNİK İLİŞKİLER

ALK ile immunhistokimyasal boyanmanın yoğunluğu, yaygınlığı ve boyanma paterni ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

Nöroblastom hastaları: Materyal ve metod kısmında anlatılan yaygınlık değerlendirmesine göre henüz tedavi almamış, ilk kez tanı konulan 24 nöroblastom hastasından 12 (%50) tanesi en yaygın boyanmanın gözleendiği 4. gruba, 8 (%33.3) tanesi 3. gruba, 3 (%12.5) tanesi 2. gruba, 1 (%4.2) tanesi 1. gruba dahil edilmiştir. Yoğunluk değerlendirmesine göre ise 7 (%29.2) hasta 3. gruba, 14 (%58.3) hasta 2. gruba ve 3 (%15.5) hasta da en düşük boyama yoğunluğunun gözleendiği 1. gruba dahil edilmiştir. Örneklerin 3 (%12.5) tanesi membranöz, 14 (%58.3) tanesi sitoplazmik, 7 (%29.2) tanesi hem sitoplazmik hem membranöz boyanma göstermiştir. Vakaların hepsinde boyanma izlenmiş olup hepsi pozitif olarak kabul edilmiştir.

Tedavi sonrasında alınan biyopsilerde hastaların 8 (%33.3) tanesi en yaygın boyanmanın gözleendiği 4. gruba, 2 (%8.3) tanesi 3. gruba, 2 (%8.3) tanesi 2. gruba, 2 (%8.3) tanesi 1. gruba dahil edilmiştir. Yoğunluk değerlendirmesine göre ise 5 (%20.8) hasta 3. gruba, 6 (%25) hasta 2. gruba ve 3 (%12.5) hasta da en düşük boyama yoğunluğunun gözleendiği 1. gruba dahil edilmiştir. Örneklerin 1 (%4.2) tanesi membranöz, 6 (%25) tanesi sitoplazmik, 7 (%29.2) tanesi hem sitoplazmik hem membranöz boyanma göstermiştir. 10 (%41.7) hastadan tedavi sonrası biyopsi alınmadığı veya alınan örneklere ait bloklar bulunamadığı için istatistiğe dahil edilmemiştir. Boyama uygulanabilen vakaların hepsinde boyanma izlenmiş olup hepsi pozitif olarak kabul edilmiştir.

Nöroblastom hastalarında tedavi öncesi-sonrası ALK protein ekspresyonu karşılaştırılmasında ALK boyanma yüzdesi tedavi öncesi ve sonrası grupta anlamlı bir fark göstermedi ($p=0.505$). ALK boyanma yoğunluğu tedavi öncesi ve sonrası grupta anlamlı bir fark göstermedi ($p=1.0$). ALK boyanma paterni tedavi öncesi ve sonrası grupta anlamlı bir fark göstermedi ($p=0.218$) (Tablo 8).

Tablo 8. NB hastalarında tedavi öncesi ve sonrası boyanma yoğunlukları, yaygınlıkları, paternlerinin karşılaştırılması

Boyanma özellikleri	SKOR	Tedavi öncesi (hasta sayısı)	Tedavi sonrası (hasta sayısı)	P değeri
ALK Yaygınlık n/N	1 (%0-25)	1/24 (%4.2)	2/14 (%8.3)	0.505
	2 (%26-50)	3/24 (%12.5)	2/14 (%8.3)	
	3 (%51-75)	8/24 (%33.3)	2/14 (%8.3)	
	4 (%76-100)	12/24 (%50)	8/14 (%33.3)	
ALK Yoğunluk n/N	+1 (az yoğun)	3/24 (%12.5)	3/14 (%12.5)	1
	+2(ortayığın)	14/24 (%58.3)	6/14 (%25)	
	+3(çok yoğun)	7/24 (%29.2)	5/14 (%20.8)	
Boyanma paterni n/N	Membranöz	3/24 (%12.5)	1/14 (%4.2)	0.218
	Sitoplazmik	14/24 (%58.3)	6/14 (%25)	
	Hem sitoplazmik hem membranöz	7/24 (%29.2)	7/14 (%29.2)	

NB hastalarında yoğunluk, yüzde, boyanma paterni ile cinsiyet, cerrahi sınır pozitifliği, MKİ skoru parametrelerinin ilişkisi ayrı ayrı incelendiğinde aralarında anlamlı bir ilişki bulunmadı. Yoğunluk, yüzde, boyanma paterni ile olumlu-olumsuz histoloji grubu arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı. Ancak; olumlu histoloji grubundaki hastaların tamamı (11 hasta) %50 üzerinde boyanma gösterirken olumsuz histoloji grubundaki hastaların (13 hasta) 9'u %50 üzerinde, 4'ü ise %50'in altında boyanma gösterdi (Tablo 9). Yoğunluk, boyanma paterni ile nöroblastom alt tipleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı. Ancak, az diferansiye grubun boyanma yüzdesi diğer gruptakilere göre anlamlı olarak daha yüksekti ($p<0.001$) (Tablo 10).

Tablo 9. ALK boyanma yüzdesinin Shimada sınıflaması ile ilişkisi

Shimada sınıfı	Yüzde >%50	Yüzde <%50
Olumlu histoloji grubu n/N	11/11 (%100)	0
Olumsuz histoloji grubu n/N	9/13 (%69.23)	4/13 (%30.77)

Tablo 10. NB hastalarında ALK boyanma yoğunluğunun diferansiyasyonla ilişkisi

Diferansiyasyon derecesi	ALK boyanma (%)			
	0-25	26-50	51-75	76-100
Diferansiye n/N	0/4	0/4	1/4 (%25)	3/4 (%75)
Az diferansiye n/N	1/14 (%5.88)	0/14	7/14 (%41.18)	9/14 (%52.94)
Andiferansiye n/N	0/3	3/3 (%100)	0/3	0/3

ALK boyanma yüzdesi, boyanma paterni ile nüks olanlar ve olmayanlar arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı. Ancak, ALK boyanma yoğunluğu nüks olmayan hastalarda anlamlı olarak daha yoğundu ($p=0.042$) (Tablo 11).

Tablo 11. ALK yoğunluk ve nüks durumu ilişkisi

	ALK Yoğunluk	
	Az	Orta-yoğun
Nüks durumu		
Yok n/N	0	15/15 (%100)
Var n/N	3/9 (% 33.3)	6/9 (% 66.7)

ALK protein ekspresyon yoğunluğu, yüzdesi, boyanma paterni istatistiksel olarak genel sağkalım ve progresyonsuz sağ kalımla kıyaslandığında anlamlı bir ilişki göstermemiştir. ALK proteini tüm NB hastalarında pozitif olduğu için pozitiflik durumu ve diğer incelenen tüm parametrelerin arasındaki ilişkiye istatistiksel olarak bakılamamıştır.

GNB hastaları: Henüz tedavi almamış, ilk kez tanı konulan 6 GNB hastasından 4 (%66.7) tanesi en yaygın boyanmanın gözlendiği 4. gruba, 1 (%16.7) tanesi 2. gruba, 1 (%16.7) tanesi 1. gruba dahil edilmiştir. Yoğunluk değerlendirmesine göre ise 3 (%50) hasta 3. gruba, 2 (%33.3) hasta 2. gruba ve 1 (%16.7) hasta da en düşük boyama yoğunluğunun gözlendiği 1. gruba dahil edilmiştir. Örneklerin 4 (%66.7) tanesi sitoplazmik, 2 (%33.3) tanesi hem sitoplazmik hem membranöz boyanma göstermiştir. Vakaların hepsinde boyanma izlenmiş olup hepsi pozitif olarak kabul edilmiştir.

Tedavi sonrası alınan ikinci biyopsilerde hastaların 3 (%100) tanesi en yaygın boyanmanın gözlendiği 4. gruba, dahil edilmiştir. Yoğunluk değerlendirmesine göre ise 1 (%33.3) hasta 3. gruba (çok yoğun), 2 (%66.7) hasta 2. gruba (orta yoğun) dahil

edilmiştir. Örneklerin 2 (%66.7) tanesi sitoplazmik, 1 (%33.3) tanesi hem sitoplazmik hem membranöz boyanma göstermiştir. 3 (%100) hastadan tedavi sonrası biyopsi alınmadığı veya alınan örnekler ait bloklar bulunamadığı için istatistiğe dahil edilmemiştir. Boyama uygulanabilen vakaların hepsinde boyanma izlenmiş olup hepsi pozitif olarak kabul edilmiştir (Tablo 12).

Gruplarda hasta sayısı az olduğundan istatistik çalışılamamıştır. Tedavi sonrasında değerlendirilebilen 3 hastanın birinin yoğunluk ve yaygınlık skorları aynı kalmış olup bir hastanın yoğunluk ve yaygınlık skoru artmış, diğer hastanın yaygınlık skoru aynı kalırken yoğunluk skoru azalmıştır. Paternlerine baktığımızda 2 hasta tedavi sonrasında da sitoplazmik boyanmaya devam ederken bir hastanın tedavi öncesinde sitoplazmik boyanırken tedavi sonrasında hem sitoplazmik hem membranöz boyandığı görülmüştür.

Tablo 12. GNB hastalarında tedavi öncesi ve sonrası ALK boyanma yoğunlukları, yaygınlıkları, paternlerinin karşılaştırılması

Boyanma özellikleri	SKOR	Tedavi öncesi (hasta sayısı)	Tedavi sonrası (hasta sayısı)
ALK Yaygınlık n/N	1 (%0-25)	1/6 (%16.7)	0
	2 (%26-50)	1/6 (%16.7)	0
	3 (%51-75)	0	0
	4 (%76-100)	4/6 (%66.7)	3/3 (%100)
ALK Yoğunluk n/N	+1 (az yoğun)	1/6 (%16.7)	0
	+2(ortayogun)	2/6 (%33.3)	2/3 (%66.7)
	+3(çok yoğun)	3/6 (%50)	1/3 (%33.3)
Boyanma paterni n/N	Membranöz	0	0
	Sitoplazmik	4/6 (%66.7)	2/3 (%66.7)
	Hem sitoplazmik hem mebranöz	2/6 (%33.3)	1/3 (%33.3)

GNB hastalarında ALK protein ekspresyon yoğunluğu, yüzdesi, boyanma paterni istatistiksel olarak genel sağkalımla anlamlı bir ilişki göstermemiştir. ALK protein ekspresyon yoğunluğu, yüzdesi, boyanma paterni istatistiksel olarak progresyonsuz sağkalımla anlamlı bir ilişki göstermemiştir (ALK proteini tüm GNB hastalarında

pozitif olduğu için pozitiflik durumu ve genel/progresyonsuz sağkalımla ilişkisine istatistiksel olarak bakılamamıştır).

GN hastaları: 9 GN hastasından 3 (%33.3)'ünde boyanma izlenmemiştir. GN hastaları tanı sonrasında tedavi almadığından dolayı tedavi sonrası ve öncesi boyanma parametreleri değerlendirilmemiştir. Boyanma yaygınlığı için 5 (%55.6) hasta en düşük boyanma yaygınlığının görüldüğü 1. gruba, 1 (%11.1) hasta 2. gruba dahil edilmiştir. Boyanma yoğunluğu için; 5 (%55.6) hasta en düşük boyanma yoğunluğunun görüldüğü 1. gruba, 1 (%11.1) hasta 2. gruba dahil edilmiştir. Boyanma izlenen 6 hastanın hepsinde sitoplazmik boyanma gözlenmiştir (Tablo 13). GN tanıli hastaların hepsi hayatta olduğundan ALK ekspresyon yoğunluğu, yüzdesi, boyanma paterni, ve pozitiflik durumu istatistiksel olarak genel sağkalımla ilişkisi hesaplanamamıştır.

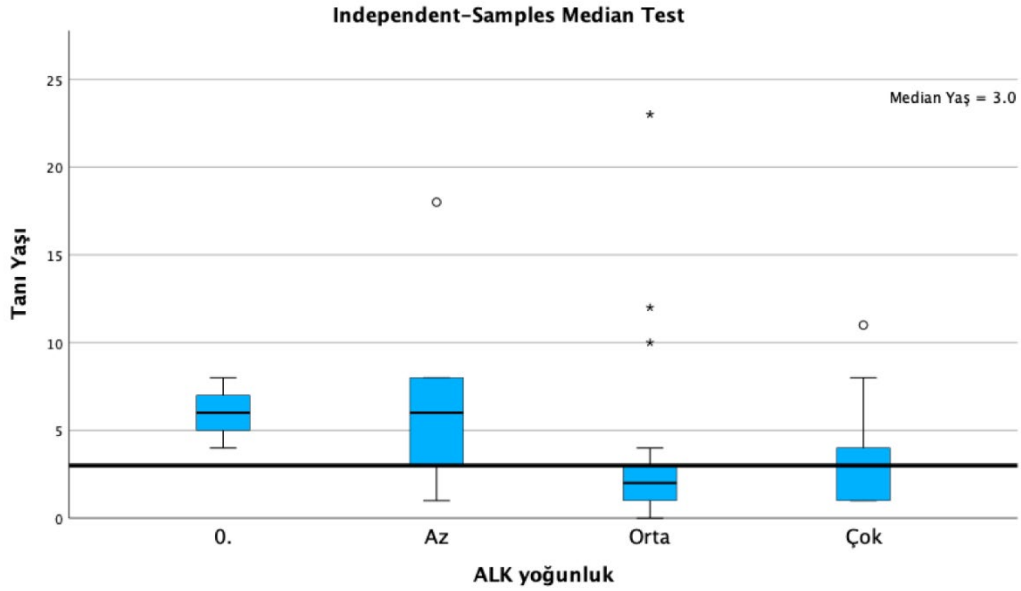
Tablo 13. GN hastalarında boyanma yoğunlukları, yaygınlıkları, paternlerinin karşılaştırılması

Boyanma özellikleri	SKOR	Hasta sayısı
ALK yaygınlık n/N	0 (boyanma yok)	3/9 (%33.3)
	1 (%0-25)	5/9 (%55.6)
	2 (%26-50)	1/9 (%11.1)
	3 (%51-75)	0
	4 (%76-100)	0
ALK yoğunluk n/N	0 (boyanma yok)	3/9 (%33.3)
	+1 (az yoğun)	5/9 (%55.6)
	+2(ortayogun)	1/9 (%11.1)
	+3(çok yoğun)	0
Boyanma paterni n/N	Membranöz	0
	Sitoplazmik	6/9 (%66.7)
	Hem sitoplazmik hem mebranöz	0

4.2. TÜM HASTA POPULASYONUNDA ALK PROTEİN EKSPRESYONU İLE DEMOGRAFİK, HİSTOMORFOLOJİK VE KLİNİK İLİŞKİLER

Yaş arttıkça ALK protein ekspresyon yoğunluğu anlamlı olarak azalmaktadır

($p=0.034$) (Şekil 2). Yaş arttıkça ALK boyanma yüzdesi anlamlı olarak azalmaktadır. ($p=0.050$). Yaşla ALK boyanma paterni arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0.933$).



Şekil 2. ALK boyanma yoğunluğu ve yüzdesi ile hasta yaşı ilişkisi

Progresyonsuz takip süresi, genel sağkalım süresi, exitus, nüks durumu incelendiğinde bu parametrelerin ALK protein ekspresyon yoğunluğu, yüzdesi, boyanma paterniyle aralarında anlamlı bir ilişki saptanmadı. Ancak risk grubu yükseldikçe ALK protein ekspresyon yoğunluğu ve yüzdesi de anlamlı olarak artmaktadır (sırasıyla $p=0.019$, 0.007). Ayrıca risk grubunu iki grup olarak ele aldığımızda (çok düşük- düşük vs orta-yüksek) ALK protein ekspresyonu yoğunluğu risk grubu yükseldikçe (orta-yüksek risk grubu hastalarda) anlamlı olarak artmıştır ($p=0.029$). Risk grubu arttıkça boyanma yüzdesi anlamlı olarak artmıştır ($p=0.008$) (Tablo 14). Klinik evre arttıkça ALK protein ekspresyon yoğunluğu ve yüzdesi de anlamlı olarak değişmemiştir (sırasıyla $p=0.176$, 0.220). Tümör boyutu, ve ALK protein ekspresyon yoğunluğu, yüzdesi, boyanma paterni arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. Olumlu ve olumsuz histoloji grubundaki vakalar ile ALK protein ekspresyon durumuna bakıldığında ALK yoğunluğu, yüzdesi, boyanma paterni arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. MKI düşük-orta grup vakalar ile ALK protein ekspresyonunda ALK yoğunluğu, yüzdesi, boyanma paterni iki grup arasında anlamlı

bir fark göstermemiştir. Kalsifikasyon varlığı ile ALK protein ekspresyonu parametreleri arasında anlamlı bir fark göstermemiştir. Ayrıca her iki cinsiyet kıyaslandığında ALK boyanma durumu ile aralarında anlamlı bir fark görülmedi.

Tablo 14. ALK boyanma durumu ile risk grubu ilişkisi

ALK boyanma durumu		Risk grubu		P değeri
		Çok düşük-düşük	Orta-yüksek	
Yoğunluk	0	3 (%20)	0	0.029
	+1	5 (%33.3)	4 (%16.67)	
	+2	3 (%20)	14 (%58.33)	
	+3	4 (%26.67)	6 (%25)	
Yaygınlık	0	3 (%20)	0	0.008
	0-25	5 (%33.33)	2 (%8.33)	
	26-50	1 (%6.67)	4 (%16.67)	
	51-75	0	8 (%33.33)	
	76-100	6 (%40)	10 (%41.67)	

ALK ekspresyonları MYCN, 1p36, 17q25 mutasyonları, DNA ploidi durumuyla ayrı ayrı kıyaslandığında anlamlı bir ilişki saptanmadı. Ancak 11q23 mutasyonu pozitif olan 5 hastanın 4(%80)'inde ALK yoğunluğu %50'nin üzerinde olup bu vakalarda orta-çok yoğun olarak boyanmıştır.

Nöroblastom hastalarında ALK pozitifliği istatistiksel olarak diğer tanı gruplarındaki (GNB ve GN) ALK pozitifliğine göre daha anlamlıdır (p=0.004) (Tablo 15). Ayrıca, 24 nöroblastom hastasında ALK protein ekspresyonu %100 pozitifken, 6 ganglionöroblastomda %100 pozitif, 9 ganglionörom hastasında %66 pozitifdir.

Tablo 15. PNT'lerde tümör tipi ile ALK boyanması ilişkisi

Tümör tipi	Yaygınlık %		Yoğunluk	
	0-50	51-100	Az	Orta-yoğun
NB n/N	4/24 (%16.67)	20/24 (%83.33)	3/24 (%12.50)	21/24 (%87.50)
GNB n/N	2/6 (%33.33)	4/6 (%66.67)	1/6 (%16.67)	5/6 (%83.33)
GN n/N	9/9 (%100)	0	8/9 (%88.89)	1/9 (%11.11)

4.3. PAN-TRK PROTEIN EKSPRESYONU İLE DEMOGRAFİK, HISTOMORFOLOJİK VE KLİNİK İLİŞKİLER

Nöroblastom hastaları: Materyal ve metod kısmında anlatılan yaygınlık değerlendirmesine göre henüz tedavi almamış, ilk kez tanı konulan 24 nöroblastom hastasından 9 tanesi en yaygın boyanmanın görüldüğü 4. gruba, 6 tanesi 3. gruba, 4 tanesi 2. gruba, 4 tanesi 1. gruba dahil edilmiştir. Yoğunluk değerlendirmesine göre ise 8 hasta 3. gruba, 5 hasta 2. gruba ve 10 hasta da en düşük boyama yoğunluğunun görüldüğü 1. gruba dahil edilmiştir. Örneklerin 14 tanesi sitoplazmik, 9 tanesi hem sitoplazmik hem membranöz boyanma göstermiştir. 1 hastanın bloğu bulunamadığı için boyamaya dahil edilmemiştir. Kalan vakaların hepsinde boyanma izlenmiş olup hepsi pozitif olarak kabul edilmiştir. Tedavi sonrasındaki değerlendirmelerde, yaygınlığa bakıldığında hastaların 5 tanesi en yaygın boyanmanın 4. gruba, 6 tanesi 3. gruba, 1 tanesi 2. gruba, 2 tanesi 1. gruba dahil edilmiştir. Yoğunluk değerlendirmesine göre ise 1 hasta 3. gruba, 8 hasta 2. gruba ve 5 hasta da en düşük boyama yoğunluğunun gözlendiği 1. gruba dahil edilmiştir. Örneklerin 9 tanesi sitoplazmik, 5 tanesi hem sitoplazmik hem membranöz boyanma göstermiştir. 10 hastanın bloğu bulunamadığından/dokusu tükendiğinden işleme dahil edilmemiştir (Tablo 16).

Tablo 16. NB hastalarında tedavi öncesi ve sonrası pan-TRK boyanma yoğunlukları, yaygınlıkları, paternlerinin karşılaştırılması

Pan-TRK Boyanma özellikleri	SKOR	Tedavi öncesi hasta sayısı	Tedavi sonrası hasta sayısı	P değeri
Yaygınlık n/N	1 (%0-25)	4/23 (%1.39)	2/14 (%14.29)	>0.05
	2 (%26-50)	4/23 (%17.39)	1/14 (%7.14)	
	3 (%51-75)	6/23 (%26.09)	6/14 (%42.86)	
	4 (%76-100)	9/23 (%39.13)	5/14 (%35.71)	
Yoğunluk n/N	+1 (az yoğun)	10/23 (%43.48)	5/14 (%35.71)	0.048
	+2(ortayogun)	5/23 (%21.74)	8/14 (%57.14)	
	+3(çok yoğun)	8/23 (%34.78)	1/14 (%7.14)	
Boyanma paterni n/N	Membranöz	0	0	>0.05
	Sitoplazmik	14/23 (%60.87)	9/14 (%64.29)	
	Hem sitoplazmik hem membranöz	9/23 (%39.13)	5/14 (%35.71)	

Pan-TRK boyanma yoğunluğu, tedavi sonrası grupta tedavi öncesi gruba göre anlamlı olarak azalmıştı ($p=0.048$) (Tablo 16). Pan-TRK boyanma yüzdesi, paterni ve pozitiflik durumunun tedavi öncesi ve sonrasındaki gruplar arasında anlamlı bir farklılığı yoktu.

NB hastalarında Pan-TRK pozitifliği istatistiksel olarak diğer tanı gruplarındaki (GNB ve GN) ALK pozitifliğine göre anlamlı değildi ($p=0.191$). Ancak 23 NB hastasında ALK protein ekspresyonu %100 pozitifken, 6 GNB'da %100 pozitif, 9 GN hastasında %88.8 pozitif.

NB hastalarında Pan-TRK protein ekspresyonu yoğunluk, yüzde, boyanma paterni ile cinsiyet, cerrahi sınır durumu, MKİ durumu, nüks varlığı arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı.

Pan-TRK boyanma yoğunluk, yüzde ile olumlu-olumsuz histoloji grubu arasındaki ilişki anlamlıydı (sırasıyla $p=0.01$, 0.042). Olumlu histoloji grubundaki vakalar anlamlı olarak daha yoğun ve yüzdesel olarak daha çok boyanmıştı. (Tablo 17,18). Olumlu-olumsuz histoloji grubundaki hastalarda boyanma paterni arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p=1.0$). Yoğunluk, boyanma paterni ile NB alt tipleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı (sırasıyla $p=0.315$, 0.217). Ancak, az diferansiye grubun boyanma yüzdesinin %50'nin üzerinde olması diğer gruptakilere göre anlamlı olarak daha yüksekti ($p=0.039$) (Tablo 19).

Tablo 17. NB'da Pan-TRK boyanma yoğunluğunun Shimada sınıflaması ile ilişkisi

Shimada sınıfı	Yoğunluk: Az	Yoğunluk: Orta-çok
Olumlu histoloji grubu n/N (%)	1/10 (%10)	9/10 (%90)
Olumsuz histoloji grubu n/N (%)	9/13 (%69.23)	4/13 (%30.77)
P değeri	0.01	

Tablo 18. NB'da Pan-TRK boyanma yaygınlığının Shimada sınıflaması ile ilişkisi

Shimada sınıfı	(%)0-25	(%)26-50	(%)51-75	(%)76-100
Olumlu histoloji grubu n/N	1/10 (%10)	1/10 (%10)	2/10 (%20)	7/10 (%70)
Olumsuz histoloji grubu n/N	4/13 (%30.77)	3/13 (%23.08)	4/13 (%30.77)	2/13 (%15.38)
P değeri	0.042			

Tablo 19. NB’da Pan-TRK boyanma yüzdesinin diferansiyasyonla ilişkisi

Diferansiyasyon derecesi	Pan-TRK boyanma (%)	
	0-50	51-100
Diferansiye n/N	1/4 (%25)	3/4 (%75)
Az diferansiye n/N	4/16 (%25)	12/16 (%75)
Andiferansiye n/N	3/3 (%100)	0
P değeri	0.039	

Yoğunluk ile eksitus olan-olmayanlar arasında anlamlı bir ilişki mevcuttu. Eksitus olmayan hastalarda boyanma yoğunluğu eksitus olanlara göre anlamlı olarak daha yoğundu ($p=0.028$) (Tablo 20). Yüzde ile eksitus olan-olmayanlar arasında anlamlı bir ilişki mevcuttu eksitus olmayan hastalarda boyanma yüzdesi eksitus olanlara göre anlamlı olarak daha fazlaydı ($p=0.006$) (Tablo 21). Paterni ile eksitus olan-olmayanlar arasında anlamlı bir ilişki mevcuttu eksitus olmayan hastalarda her ikisi birlikte boyanma paterni (hem sitoplazmik hem membranöz) eksitus olanlara göre anlamlı olarak daha fazlaydı ($p=0.040$) (Tablo 22).

Tablo 20. NB’da Pan-TRK boyanma yoğunluğu ve exitus durumu ilişkisi

Exitus durumu	PANTRK yoğunluk		
	Az	Orta	Çok
Yok n/N	3/14 (%21.43)	4/14 (%28.57)	7/14 (%50)
Var n/N	7/9 (%77.78)	1/9 (%11.11)	1/9 (%11.11)
P değeri	0.028		

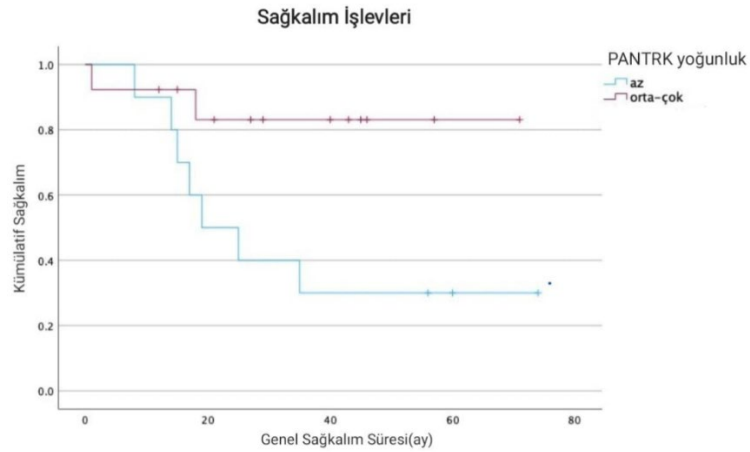
Tablo 21. Pan-TRK boyanma yüzdesi ve exitus durumu ilişkisi

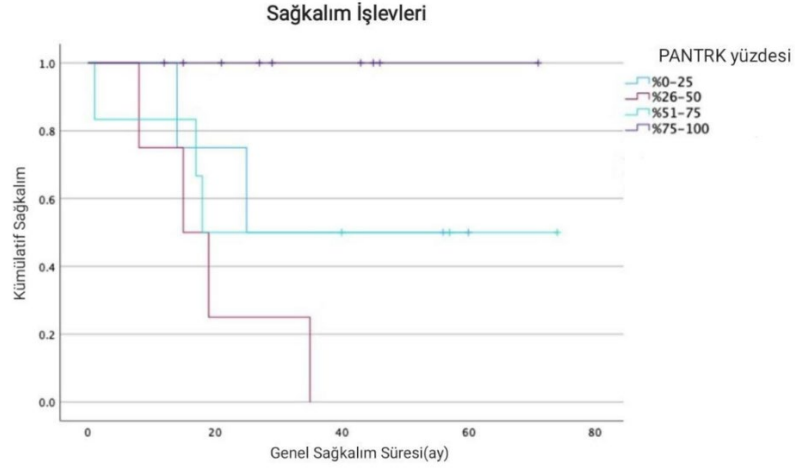
Exitus durumu	Pan-TRK %			
	0-25	26-50	51-75	76-100
Yok n/N	2/14 (%14.29)	0/23	3/14 (%21.43)	9/14 (%64.29)
Var n/N	2/9 (%22.22)	4/9 (%44.44)	3/9 (%33.33)	0
P değeri	0.006			

Tablo 22. Pan-TRK boyanma paterni ve exitus durumu ilişkisi

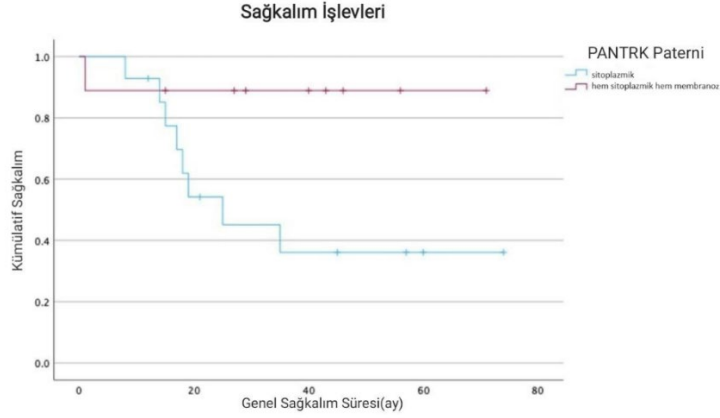
Exitus durumu	Pan-TRK boyanma paterni	
	Sitoplazmik	Hem sitoplazmik hem membranöz
Yok n/N	6/14 (%42.86)	8/14 (%57.14)
Var n/N	8/9 (%88.89)	1/9 (%11.11)
P değeri	0.04	

Pan-TRK protein ekspresyon yoğunluğu istatistiksel olarak genel sağkalımla anlamlı bir ilişki göstermemiştir ($p=0.086$). (Pan-TRK proteini tüm NB hastalarında pozitif olduğu pozitiflik durumu için sağ kalımla ilişkisine istatistiksel olarak bakılamamıştır.) Ancak Pan-TRK yoğunluğuna az ve orta-çok yoğun olarak bakıldığında az boyananların istatistiksel olarak genel sağkalım süresi daha düşüktür ($p=0.027$) (Şekil 3). Pan-TRK boyanma yüzdesi arttıkça sağkalım süresi de istatistiksel olarak artmıştır ($p=0.015$) (Şekil 4). Pan-TRK boyanma yüzdesi (%50 nin altında ve üstünde olarak iki grup şeklinde ayrıldığında) %50'nin üzerinde boyananların genel sağkalımları anlamlı olarak daha yüksektir ($p=0.028$). Pan-TRK boyanma paternine bakıldığında her ikisi de boyananlar sitoplazmik boyananlara göre anlamlı olarak daha yüksek genel sağkalım süresine sahiptir ($p=0.048$) (Şekil 5). PANTRK boyanma yoğunluğu, yüzdesi, boyanma paterni istatistiksel olarak progresyonuz sağkalımla anlamlı bir ilişki göstermemiştir.

**Şekil 3.** Pan-TRK boyanma yoğunluğu, sağ kalım ilişkisi



Şekil 4. Pan-TRK boyanma yüzdesi, sağ kalım ilişkisi



Şekil 5. Pan-TRK boyanma paterni, sağ kalım ilişkisi

GNB hastalarının tedavi öncesi yaygınlık değerlendirmesinde hastaların 4 (%66.7) tanesi en yaygın boyanmanın görüldüğü 4. Gruba, 1 (%16.7) tanesi 3. Gruba, 1 (%16.7) tanesi 1. gruba dahil edilmiştir. Yoğunluk değerlendirmesine göre ise 1 (%16.7) hasta yoğun şiddette boyanmanın görüldüğü 3. gruba, 5 (%83.3) hasta orta şiddette boyanmanın görüldüğü 2. gruba dahil edilmiştir. Örneklerin 3 (%50) tanesi sitoplazmik, 3 (%50) tanesi hem sitoplazmik hem membranöz boyanma göstermiştir. Vakaların hepsinde boyanma izlenmiş olup hepsi pozitif olarak kabul edilmiştir. Tedavi sonrasındaki yaygınlık değerlendirmelerinde 3 hastanın yeterli dokusu kalmadığından işleme dahil edilmemiş olup kalan 3 hastanın hepsi en yaygın boyanmanın görüldüğü 4. gruba (%100), en yoğun boyanmanın görüldüğü 3. gruba

(%100) dahil edilmiş olup, 3 hastanın hepsi de hem sitoplazmik hem membranöz boyanma göstermiştir (Tablo 23).

Tablo 23. GNB’da tedavi öncesi ve sonrası Pan-TRK boyanma yoğunlukları, yaygınlıkları, paternlerinin karşılaştırılması

Pan-TRK Boyanma özellikleri	SKOR	Tedavi öncesi hasta sayısı	Tedavi sonrası hasta sayısı
Yaygınlık n/N	1 (%0-25)	4/6 (%66.7)	0
	2 (%26-50)	0	0
	3 (%51-75)	1/6 (%16.7)	0
	4 (%76-100)	1/6 (%16.7)	3/3 (%100)
Yoğunluk n/N	+1 (az yoğun)	0	0
	+2(ortay yoğun)	5/6 (%83.33)	0
	+3(çok yoğun)	1/6 (%16.67)	3/3 (%100)
Boyanma paterni n/N	Membranöz	0	0
	Sitoplazmik	3/6 (%50)	0
	Hem sitoplazmik hem membranöz	3/6 (%50)	3/3 (%100)

GNB hastalarında Pan-TRK protein ekspresyon yoğunluğu, yüzdesi, boyanma paterni istatistiksel olarak genel sağkalımla ve progresyonuz sağkalımla anlamlı bir ilişki göstermemiştir. (Pan-TRK proteini tüm NB hastalarında pozitif olduğu için sağkalımla ilişkisine istatistiksel olarak bakılamamıştır.)

GN hastalarının yoğunluk durumu değerlendirildiğinde 4 (%44.4) tanesi orta yoğunlukta boyanmanın izlendiği 2. gruba dahil edilirken, 5 (%55.6) tanesi en az boyanmanın görüldüğü 1. gruba dahil edilmiştir. En yoğun boyanmanın görüldüğü 3. grupta hasta bulunmamaktadır. Yaygınlık durumlarına bakıldığında 1 hasta %1 in altında boyanmanın görüldüğü için herhangi bir pozitif gruba dahil edilmemiştir. 4 hasta en düşük boyanmanın görüldüğü 1. gruba, 1 hasta (%11.1) 2. gruba, 2 (%22.2) hasta 3. Gruba 1 hasta 4. gruba dahil edilmiştir. Hastaların 5’i (%55.6) sitoplazmik, 3’ü (%33.3) hem sitoplazmik hem membranöz boyanırken, 1 (%11.1) tanesi boyanan bir kaç hücreden ibaret olduğu için boyanma paterni değerlendirilememiştir. Pan-TRK pozitiflik durumu için 1 hasta negatif kabul edilmiş olup 8 hasta pozitif kabul

edilmiştir. Hastalara tedavi uygulanmamış olduğundan bu açıdan değerlendirme yapılmamıştır. GN tanılı hastaların hepsi hayatta olduğundan Pan-TRK ekspresyon yoğunluğu, yüzdesi, boyanma paterni, ve pozitiflik durumu istatistiksel olarak genel sağkalımla ilişkisi hesaplanamamıştır (Tablo 24).

Tablo 24. GN hastalarında Pan-TRK boyanma yoğunluğu yüzdesi paterni

Boyanma özellikleri	SKOR	Hasta sayısı
Pan-TRK yaygınlık n/N	0 (boyanma yok)	1 (%11.11)
	1 (%0-25)	4 (%44.44)
	2 (%26-50)	1 (%11.1)
	3 (%51-75)	2 (%22.2)
	4 (%76-100)	1 (%11.1)
Pan-TRK yoğunluk n/N	0 (boyanma yok)	0
	+1 (az yoğun)	5 (%55.56)
	+2(ortayoğun)	4 (%44.4)
	+3(çok yoğun)	0
Boyanma paterni n/N	boyanma yok)	1 (%11.11)
	Membranöz	0
	Sitoplazmik	5 (%55.56)
	Hem sitoplazmik hem mebranöz	3 (%33.3)

4.4. TÜM HASTA POPULASYONUNDA PAN-TRK PROTEİN EKSPRESYONU İLE DEMOGRAFİK, HİSTOMORFOLOJİK VE KLİNİK İLİŞKİLER

Yaş, boyut, cinsiyet, MKI durumu, kalsifikasyon varlığı, parametreleri ve PANTRK protein ekspresyon yoğunluğu, yüzdesi, boyanma paterni arasındaki ilişki ayrı ayrı değerlendirildi. Bu parametreler ve PANTRK protein ekspresyon parametreleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. Progresyonsuz takip süresi ve genel sağ kalım süresi ile PANTRK protein ekspresyon yoğunluğu, yüzdesi, boyanma paterni arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Olumlu-olumsuz histoloji grubundaki vakalar ile pan-TRK protein ekspresyon durumuna bakıldığında pan-TRK ekspresyonu her iki gruptaki vakaların tümünde pozitif. Ancak anlamlı olarak pan-TRK yoğunluğu olumlu histoloji grubundaki vakalarda olumsuz histoloji grubundaki vakalara göre daha fazlaydı ($p<0.001$);

anlamli olarak pan-TRK yüzdesi, olumlu histoloji grubundaki vakalarda olumsuz histoloji grubundaki vakalara göre daha fazlaydı (p= 0.020) (Tablo 25).

Tablo 25. PANTRK boyanma yoğunluğu yüzdesi ve Shimada sınıflaması ilişkisi

PANTRK boyanma yoğunluğu	Olumlu histoloji grubu	Olumsuz histoloji grubu
Az n/N	1/18 (%5.56)	9/14 (%64.29)
Orta n/N	12/18 (%66.67)	1/14 (%7.14)
Çok n/N	5/18 (%27.78)	4/14 (%28.57)
P değeri	<0.001	
PANTRK boyanma yüzdesi		
%0-25 n/N	1/18 (%5.56)	5/14 (%35.71)
%26-50 n/N	2/18 (%11.11)	3/14 (%21.43)
%51-75 n/N	3/18 (%16.67)	4/14 (%28.57)
%76-100 n/N	12/18 (%66.67)	2/14 (%14.29)
P değeri	0.02	

Nüks varlığı, ile Pan-TRK protein ekspresyonunda Pan-TRK durumu, yoğunluğu, yüzdesi, boyanma paterni iki grup arasında anlamlı bir fark göstermemiştir.

Eksitus durumu ile Pan-TRK protein ekspresyonunda Pan-TRK durumu eksitus olanlarla olmayanlar arasında anlamlı değildir (p=0.545) Ancak, Pan-TRK boyanma yoğunluğu eksitus olanlarda anlamlı olarak daha az bulunmuştur (p=0.021). Boyanma yüzdesi eksitus olanlarda anlamlı olarak daha az bulunmuştur (p=0.039) Boyanma paterni eksitus hastalarda sitoplazmik olarak daha anlamlı bulunmuştur (p=0.021) (Tablo 26).

Tablo 26. Pan-TRK boyanma yoğunluğu, yüzdesi, paterni ve ölüm ilişkisi

Pan-TRK boyanma yoğunluğu	Sağ kalım	Ölüm
Az	8/28 (%28.57)	7/10 (%70)
Orta-çok	20/28 (%71.43)	3/10 (%30)
P değeri	0.021	
Pan-TRK boyanma yüzdesi		
0	1/28 (%3.57)	0
<%50	7/28 (%25)	7/10 (%70)
>%50	20/28 (%71.43)	3/10 (%30)
P değeri	0.039	
Pan-TRK boyanma paterni		
Sitoplazmik	13/27 (%48.15)	9/10 (%90)
Hem sitoplazmik hem membranöz	14/27 (%51.85)	1/10 (%10)
P değeri	0.021	

Pan-TRK ekspresyon durumu ile mutasyon pozitifliği arasındaki ilişkiye bakıldığında; Pan-TRK İHK, MYCN mutasyonu pozitif olan olmayan tüm hastalarda pozitif ekspresyon göstermiştir (bu yüzden p değeri yok) ancak; Pan-TRK, MYCN mutasyonu pozitif olan 4 hastanın 3 (%75)'ünde %50'nin üzerinde ve orta-çok yoğun ekspresyon göstermiştir.

Pan-TRK ekspresyon durumu ile mutasyon pozitifliği arasındaki ilişkiye bakıldığında; Pan-TRK İHK, 11q23 mutasyonu pozitif olan olmayan tüm hastalarda pozitif ekspresyon göstermiştir (bu yüzden p değeri yok) Ancak mutasyon pozitif olan 5 hastanın 4(%80)'inde NTRK yoğunluğu %50'nin üzerinde olup bu vakalarda orta-çok yoğun olarak boyanmıştır.

Pan-TRK, mutasyon pozitif olan olmayan tüm hastalarda pozitif ekspresyon göstermiştir, bu yüzden p değeri bulunmadı. Ayrıca Pan-TRK boyanma yoğunluğu, yaygınlığı, paterni ile 1p36, 17q25 mutasyonu, dna diploidi durumu ilişkilerine ayrı ayrı bakıldığında anlamlı bulgu saptanmadı.

Klinik evre arttıkça Pan-TRK protein ekspresyon yoğunluğu anlamlı olarak azalmaktadır (p=0.045) (Tablo 27); yüzdesi ve paterni istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermemiştir (sırasıyla p=0.673, 0.215). Evre ile pan-TRK protein ekspresyon durumuna istatistiksel olarak bakılamamıştır. Çünkü vakaların hepsi Pan-

TRK pozitif boyanmıştır. Evre ile genel ve progresyonsuz sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

Tablo 27. Klinik evre ile pan-TRK boyanma yoğunluğu ilişkisi

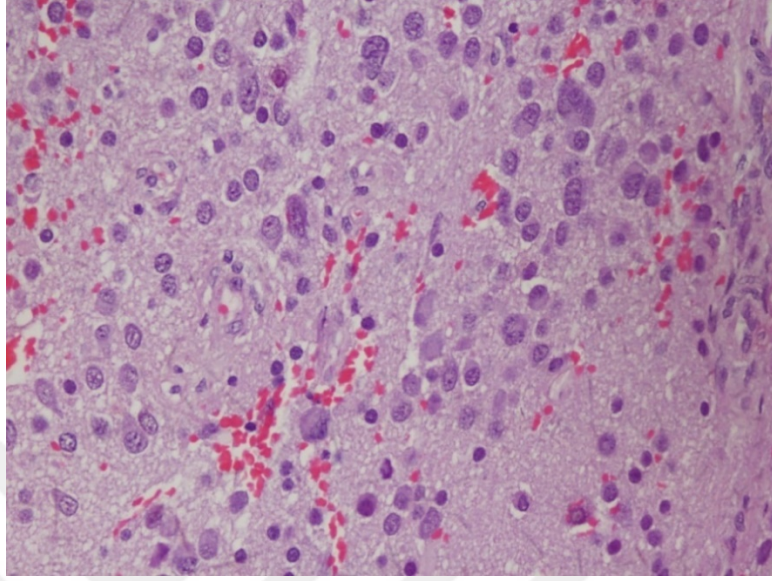
Klinik evre	Pan-TRK yoğunluk	
	Az	Orta-çok
L1	0	1/1 (%100)
L2	0	8/8 (%100)
M	10/18 (%55.56)	8/18 (%44.44)
MS	0	1/1 (%100)

Risk grubu arttıkça pan-TRK protein ekspresyon yoğunluğu anlamlı olarak azalmaktadır ($p=0.025$). Pan-TRK yüzdesi ve paterni istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermemiştir (sırasıyla $p=0.158$, 0.501) (Tablo 28). Risk grubu ile Pan-TRK protein ekspresyon durumuna bakıldığında evre arttıkça istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç çıkmasa da ($p=0.472$). Pan-TRK negatif olan 1 hastanın evresi (%100) çok düşük evre hastasıdır. Risk grubu ile genel ve progresyonsuz sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

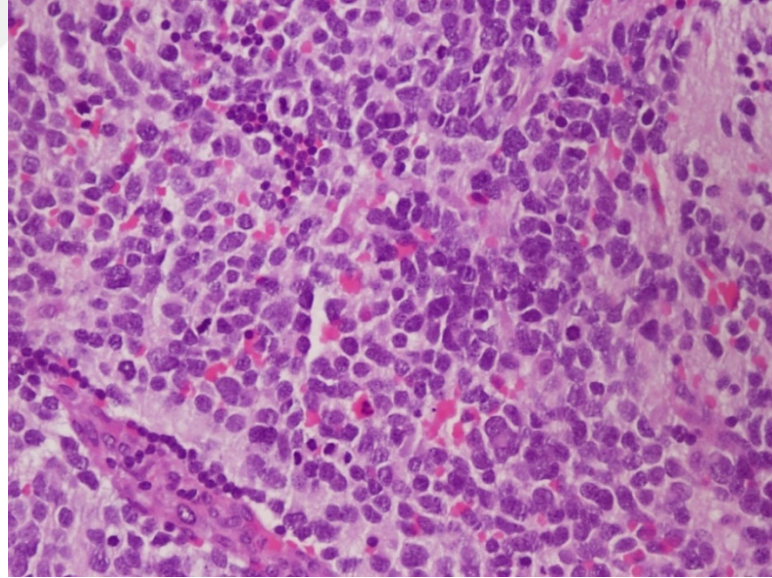
Tablo 28. Risk grubu ile pan-TRK boyanma yoğunluğu ilişkisi

Klinik evre	Pan-TRK yoğunluk		
	Az	Orta	Çok
Çok düşük	5/6 (%83.33)	1/6 (%16.67)	0
düşük	0	8/11 (%72.73)	3/11 (%27.27)
orta	1/11 (%8.33)	8/11 (%66.67)	3/11 (%25)
yüksek	9/13 (%69.23)	1/13 (%7.69)	3/13 (%23.08)

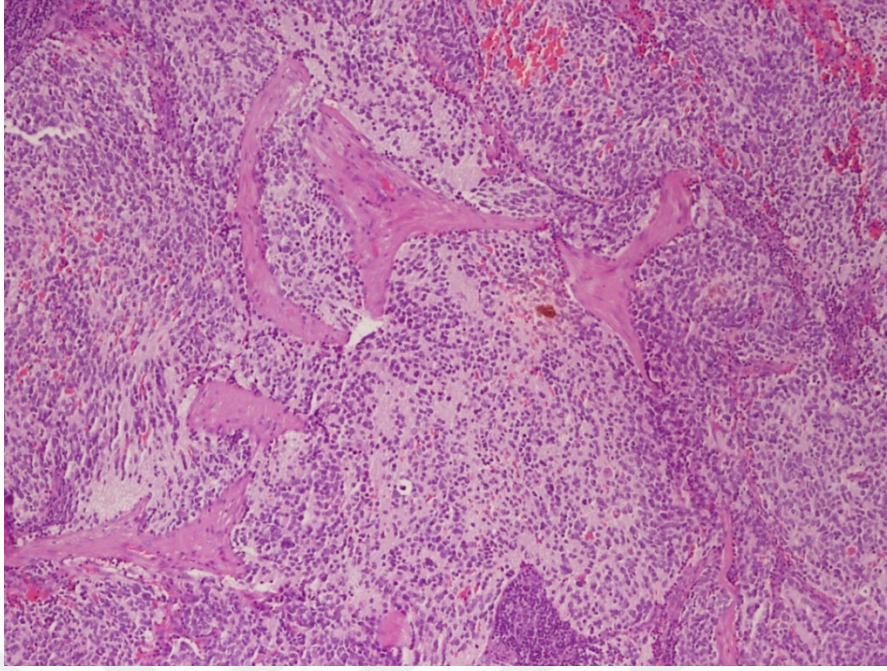
5. RESİMLER



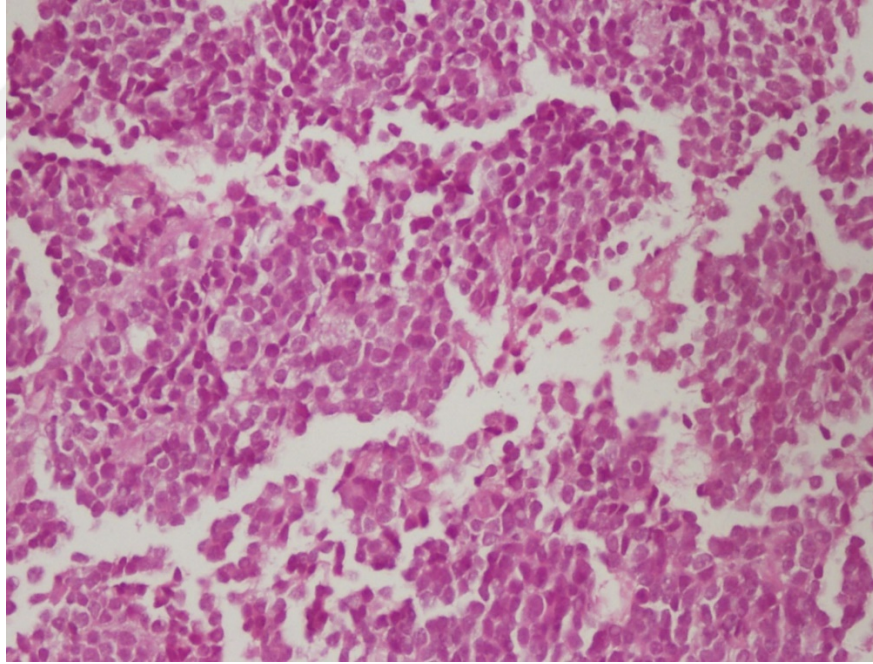
Şekil 6. Diferansiye nöroblastom. (H&E x 400)



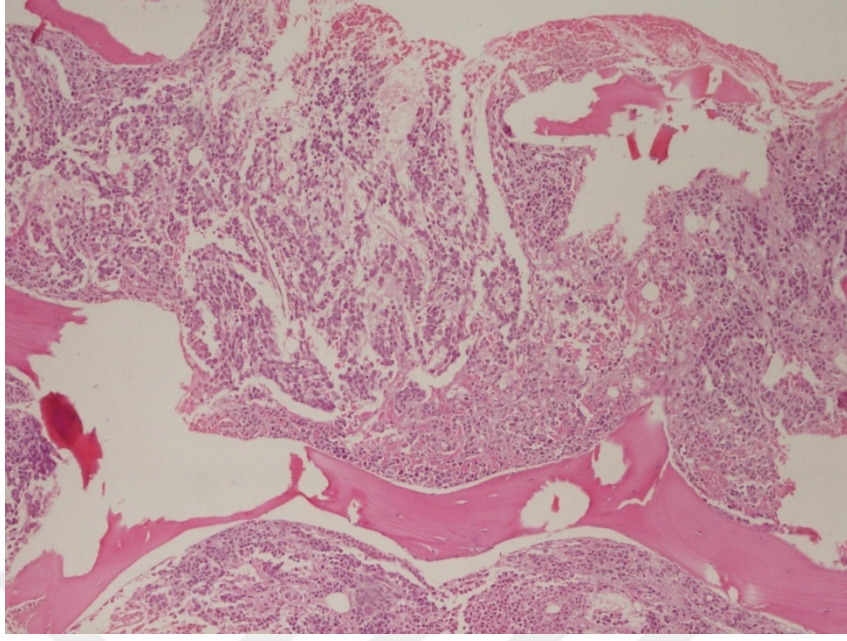
Şekil 7. Az diferansiye nöroblastom (H&E x 400)



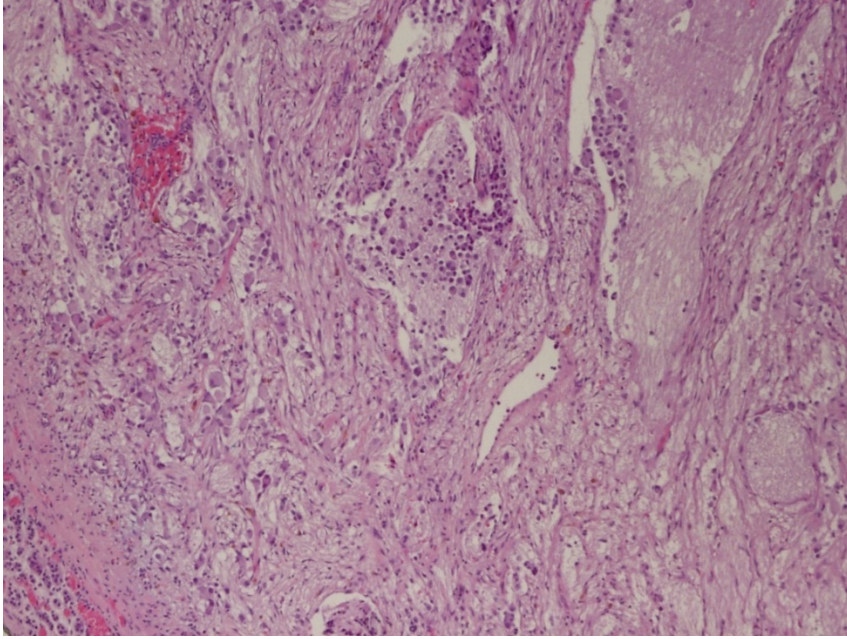
Şekil 8. Az diferansiye nöroblastom (H&E x 100)



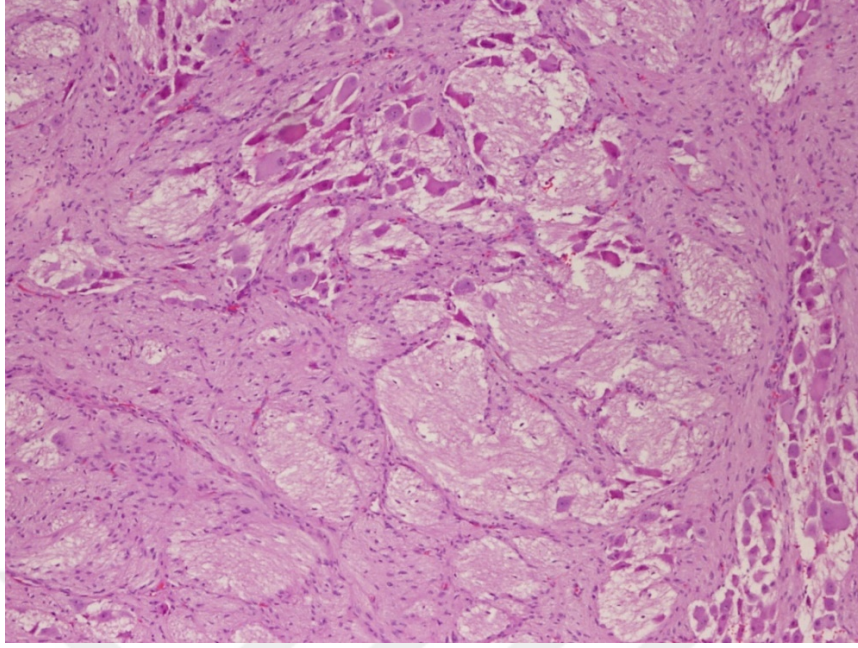
Şekil 9. Andiferansiye nöroblastom (H&E x 400)



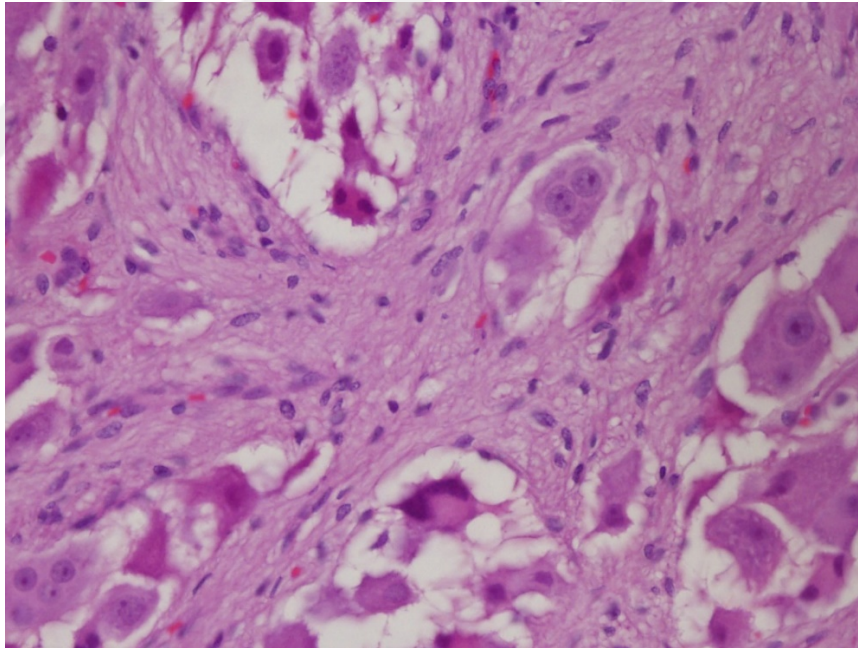
Şekil 10. Andiferansiye nöroblastom, kemik iliği metastaz alanı (H&E 100)



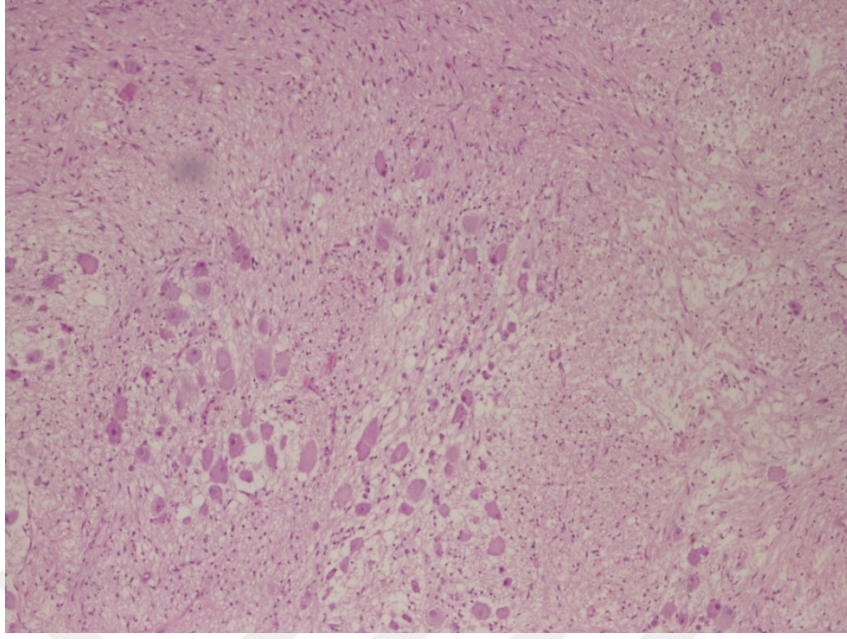
Şekil 11. Ganglionöroblastom, nodüler tip (H&E 100)



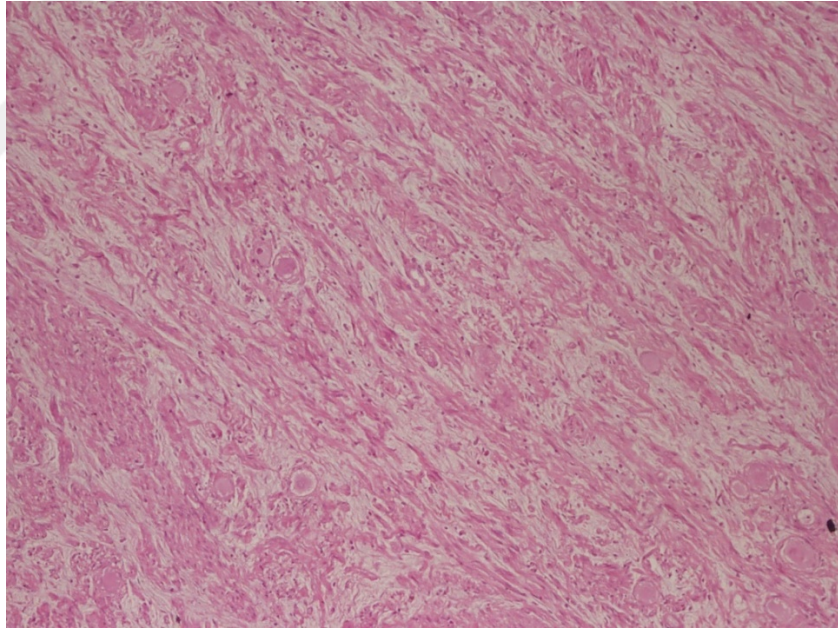
Şekil 12. Ganglioneuroblastom, intermikst tip (H&E x 100)



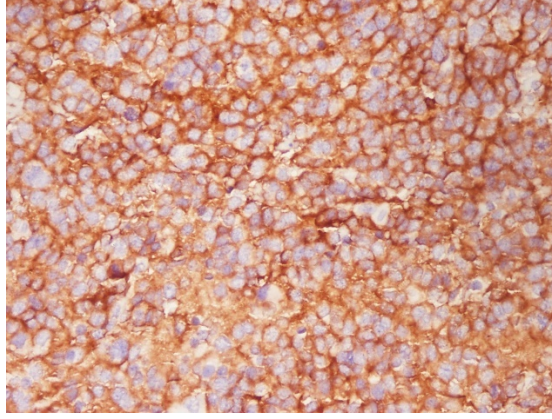
Şekil 13. Ganglioneuroblastom, intermikst tip (H&E x 400)



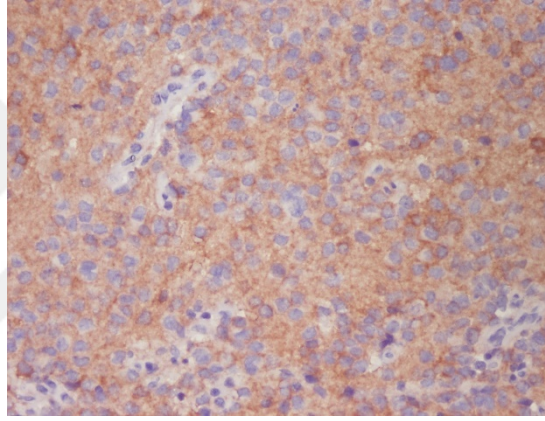
Şekil 14. Ganglionörom, matürleşen tip (H&E x 100)



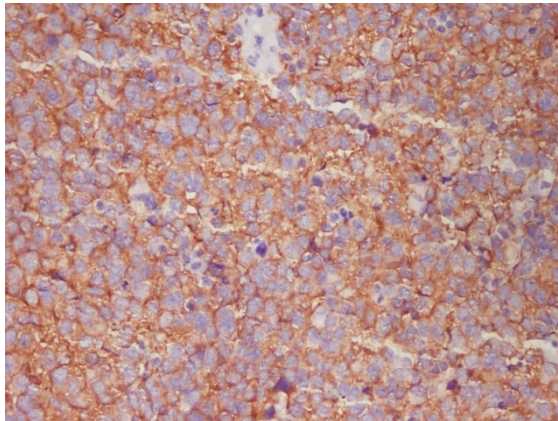
Şekil 15. Ganglionörom, matür tip (H&E x 100)



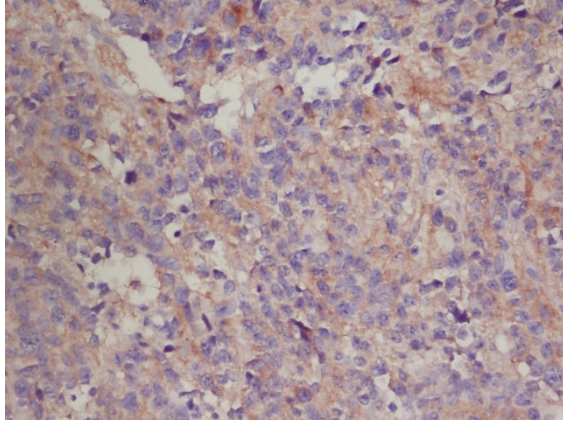
Şekil 16. NB;ALK: kuvvetli yoğunluk(+3) sitoplazmik ve membranöz boyanma



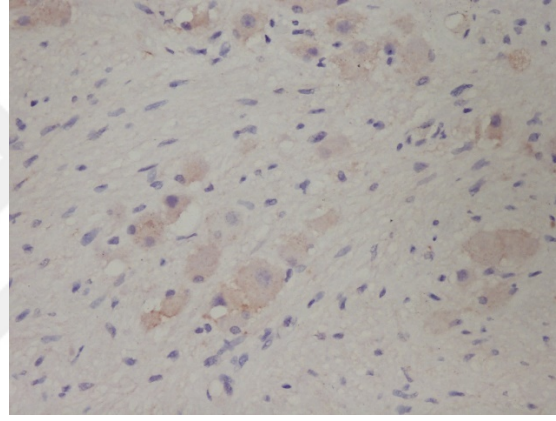
Şekil 17. NB; ALK orta kuvvette yoğunluk (+2) sitoplazmik boyanma



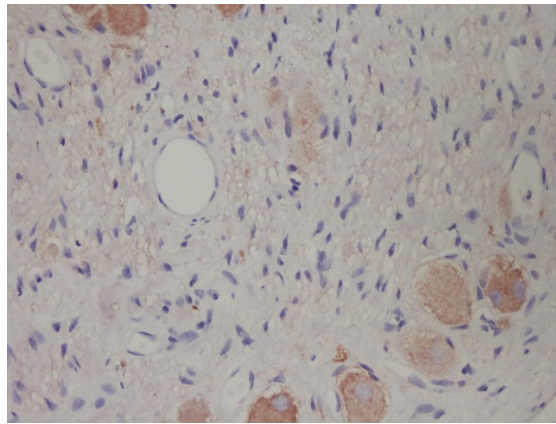
Şekil 18. NB; Pan-TRK: kuvvetli yoğunluk(+3) sitoplazmik ve membranöz boyanma



Şekil 19. NB; Pan-TRK zayıf yoğunluk (+1) sitoplazmik boyanma



Şekil 20. GN; Pan-TRK: zayıf yoğunluk(+1) sitoplazmik boyanma



Şekil 21. GN; ALK : zayıf yoğunluk(+1) sitoplazmik boyanma

6. TARTIŞMA

Nöroblastom, klinik olarak belirgin biyolojik heterojenite sergileyen bir tümördür. Bazı ileri evre tümörler (evre IVS) spontan olarak gerilerken, bazı erken evre tümörler kötü prognoz gösterebilir. Lokalize hastalığı olan (evre I-III) olgularda, adjuvan kemoterapi sonrası cerrahi rezeksiyon yapıldığında 10 yıllık sağ kalım oranı %80'e ulaşırken, metastatik hastalığı olan (evre IV) hastalarda agresif kemoterapiye rağmen 10 yıllık sağ kalım oranı %20'nin üzerine çıkamamaktadır. Histolojik bulgular ve biyokimyasal sonuçlar, bu farklı biyolojik davranışları tek başına açıklayamamaktadır. Bu nedenle, moleküler belirleyicilerle kötü prognozun nedenleri araştırılmaktadır. Tedaviyi yönlendirebilecek ve olası klinik gidiş farklılıklarını açıklayabilecek yeni parametrelere ihtiyaç duyulmaktadır (39).

NB'ın klinik davranışı, hastalığın evresi kadar tümör hücrelerinin karakteristik özelliklerine de bağlıdır. Bu değişken klinik davranışların nedenlerini anlamak için NB'lara özgü genetik değişikliklerin araştırılması önemlidir. NB'larda en sık rastlanan genetik anormallikler arasında MYCN amplifikasyonu ve kromozom 1'in kısa kolunun delesyonu yer almaktadır. MYCN amplifikasyonunun kötü prognozla ilişkisi belirlenmiş olsa da, MYCN amplifikasyonu olmayan NB'lar da her zaman iyi prognoz göstermemektedir. Bu gen değişimleri dışında özellikle hiperdiploidi, bebeklik çağında ortaya çıkan NB'larda iyi prognostik özellik ile ilişkilidir. Ayrıca Trk-A, NGF (sinir büyüme faktörü) reseptörü de, NB hastalarında iyi prognozla ilişkili olarak saptanan genetik değişikliklerdir (40).

Bir tirozin kinaz reseptörü olan ALK'nın genetik yapısı ve onkogenik aktivitesi hakkında literatürde birçok güncel çalışma mevcuttur. Bu pediatrik çalışmalar, ALK'nın NB patofizyolojisinde önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur. ALK ekspresyonunun varlığı, tümöre daha malign bir karakter kazandırmaktadır. Ayrıca, ALK üzerinden etkinlik gösteren krizotinib gibi tirozin kinaz inhibitörleri, başta akciğer kanseri olmak üzere birçok kanserde umut vadeden tedavi alternatifleri olarak değerlendirilmektedir. Ancak, ALK'nın immunhistokimyasal olarak saptanan pozitifliğinin klinik değeri hakkında yapılan çalışmalar sınırlıdır (41).

Bazı tümörlerde tespit edilen moleküler değişiklikler, ilaç seçeneğini gündeme getirmiştir. Bu grupta yer alan en önemli inhibitörler tirozin kinazlardır. Yakın

zamanda nörotrofik tirozin reseptör kinaz genlerinin üçünde (NTRK1, NTRK2, NTRK3) saptanan füzyonlar, TRK inhibitörleriyle tedavi edilebilmektedir. Moleküler yöntemlerin pahalı, zahmetli ve zaman alıcı olması nedeniyle, tipik olarak tümörlerin farklılaşma çizgisini tanımlayan daha eski İHK belirteçleri yerine, tümöre özgü genetik anormallikleri doğrudan veya dolaylı olarak tespit eden daha yeni belirteçlerin kullanıma girmesi sayesinde, pan-TRK İHK boyasının füzyon izlenebilecek tümör gruplarında moleküler analiz yapılmadan önce tarama amaçlı kullanılması gündeme gelmiştir (42).

Bu çalışmada, NB, GNB ve GN tanısı alan hastalarda ALK ve Pan-TRK ekspresyonlarının insidansı ve prognostik değeri araştırılmıştır. Elde edilen veriler, bu tümör tiplerinde ALK ve Pan-TRK ekspresyonlarının farklı dağılımlar gösterdiğini ve bu belirteçlerin prognostik anlamda önemli olabileceğini ortaya koymaktadır. Bulgularımız, ALK ve Pan-TRK ekspresyonlarının, tedaviye dirençli vakalarda hedefe yönelik tedavi seçeneklerinin belirlenmesinde kullanılabileceğini göstermektedir. Bu durum, nöroblastik tümörlerde bireyselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından değerli bilgiler sunmaktadır.

2019 yılında Chang ve arkadaşları NB tanılı hastalarda ALK ve MYCN mutasyonlarını ve ekspresyonların klinik seyir ile ilişkisini araştırmışlardır. 61 adet NB hastasına ait tümör örneklerinin ALK ve MYCN İHK boyanması ile yapılan çalışmada 61 hastanın 25'inde (%41) yoğun ALK boyanması, 24'ünde (%39.3) yoğun MYCN boyanması saptanmıştır. Yoğun boyanmaya sahip hastaların çoğunun az diferansiye veya andiferansiye tiplerde olduğu görülmüştür. Veriler analiz edildiğinde Yüksek ALK ve MYCN ekspresyonunun bağımsız olumsuz prognostik faktör olduğu ve COG'a göre yüksek riskli olmayan grupta bulunan hastalarda kötü sağ kalımla ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca yüksek ALK ve MYCN ekspresyonun kendi aralarında korele olduğu da saptanmıştır. Bu çalışma, ALK ve MYCN protein ekspresyonlarına birlikte bakılan ilk rapordur (43). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde ALK immünohistokimyasal ekspresyonunun prognozla ilişkisi araştırıldı. Çalışmamızda MYCN immünohistokimyası çalışılmadı. Fakat genetik olarak MYCN mutasyonu bakılan NB olgularımızdan 3'ünde MYCN amplifiye olup bu hastalarda ALK ekspresyon yoğunluğu veya yüzdesi yüksek görülmemiştir. Çalışmamızda sağ kalım ile ALK ekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Ancak risk grubu

yükseldikçe ALK protein ekspresyon yoğunluğu ve yüzdesi de anlamlı olarak artmaktadır (sırasıyla $p=0.033$, 0.018). Ayrıca araştırmamızda az diferansiye tipteki NB hastalarında ALK boyanma yüzdesi anlamlı olarak fazla bulunmuştur ki bu da Chang ve arkadaşlarının çalışması ile örtüşmektedir (43).

Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 88 NB, 52 GNB ve 6 GN örneğinde FISH yöntemiyle MYCN ve ALK mutasyon durumuna, ALK proteinin İHK boyanma durumuna ve bunların prognoz ile ilişkisine bakılmıştır. ALK İHK pozitifliğinin FISH ile saptanan MYCN/ALK gen kopya sayısı artışı ile anlamlı şekilde ilişkili olduğunu saptamışlardır. Bu durum ALK İHK'sal boyanmasının ALK mutasyonu taramada anlamlı olabileceğini ortaya koymaktadır. NB'daki ALK pozitifliğinin sıklığı (%50.5), GNB'dan (%22.6) ve GN'dan (%0.0) önemli ölçüde daha yüksek ($P<0,05$) bulunmuştur ki bizim çalışmamızda da NB hastalarında ALK pozitifliği istatistiksel olarak diğer tanı gruplarındaki (GNB ve GN) ALK pozitifliğine göre anlamlı olarak saptandı ($p=0.004$). Ayrıca 24 NB hastasında ALK protein ekspresyonu %100 pozitifken, 6 GNB'da %100, 9 GN hastasında %66 pozitif. Bu durum ALK'nın NB grubundaki duyarlılığını da vurgulamaktadır. Wang ve arkadaşları çalışmalarında ayrıca MYCN/ALK amplifikasyonunun NB'da genel sağkalımın azalmasıyla ilişkili ve ALK pozitifliğinin de NB'da düşük sağ kalımla anlamlı şekilde ilişkili olduğunu göstermiştir ($P=0,044$). Çalışmamızda sağ kalımla ALK ekspresyonunun ilişkisi olmasa da, yüksek risk grubundaki hastalarda görülen ekspresyon artışı kötü prognostik verilerle örtüşebilir niteliktedir (22).

ALK ekspresyon pozitifliğinin NB'larda, GNB ve GN'lara göre daha sık olmasını destekleyen diğer bir araştırma da Duijkers ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. 71 NB, 12 GNB ve 20 GN örneğinde PCR dizilimi ile ALK pozitifliğinin İHK pozitifliği ve prognoz ile ilişkisini araştırdıkları bu çalışmada, tüm NB örneklerinin yarısı, tümör hücrelerinin çoğunda ($>50\%$) ALK pozitifliği gösterirken, GNB'nin yarısı, tümör hücrelerinin $<20\%$ 'sinde boyanma göstermişti. Çoğu GN örneğinde, tümör hücrelerinin düşük bir yüzdesi, çoğunlukla ganglion hücrelerini içeren ALK için pozitif boyanmaktaydı. Bu bulgular çalışmamızda ortaya çıkan NB'daki ALK pozitifliğinin GNB ve GN'lardakinden anlamlı şekilde fazla olmasıyla örtüşmektedir. Duijkers ve arkadaşlarının prognoz ve ALK ekspresyonuyla ilgili

buldukları sonuçlar, Chang, Wang ve arkadaşlarının çalışmalarındaki sonuçlarla aynı doğrultudadır (44).

Mazzocco ve arkadaşları çalışmalarında ergen ve genç erişkin 34 adet NB ve GNB hastasını incelemişlerdir. Çalışmalarında tümörlerin 30/34'ü NB, 4/34'ü nodüler GNB olarak sınıflandırılmış olup 29 tümörde (%85) Segmental Kromozom Sapmaları (SCA)'lar gözlemişlerdir. 1p dengesizliği (%58), 17q kazancı (%52), 9p kaybı (%32), 11q kaybı (%30) en çok görülenlerdir. MYCN amplifikasyonu ve MYCN kazancı sırasıyla 3 (%10) ve 2 (%7) vakada tespit etmişlerdir. Bu kohorttaki mevcut vakalar üzerinde yapılan ALK gen mutasyonu çalışması, 4/25 (%16) mutasyona uğramış vakayı ortaya çıkarmıştır (45) Bu çalışma ergenlik çağında ve genç erişkin olan NB hastalarındaki MYCN amplifikasyonunun düşük insidansını vurgulamıştır. Bizim çalışmamızda ise yaş arttıkça ALK ekspresyon yoğunluğu ve yüzdesi azalmaktaydı ancak MYCN amplifiye hasta sayımız az olduğundan bununla ilgili anlamlı bir veriye ulaşamadık. Ayrıca Mazzocco ve arkadaşları çalışmalarında hastalığın evresinden bağımsız olarak yüksek sıklıkta 17q kazanımı ve 9p ve 11q kaybı gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda ise, 11q23 kaybı olan 5 hastanın 4(%80)'ünde ALK yoğunluğu %50'nin üzerinde olup bu vakalar orta-çok yoğun olarak boyanmıştır. 11q23 kaybı olan en büyük hasta tanı anında 8 yaşındadır. ALK ekspresyonları ile bakılan diğer mutasyonlar (MYCN, 1P36, 17q25 mutasyonları, DNA ploidi durumu) arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Mazzocco ve arkadaşları ALK inhibitörleri ile hedef bazlı bir tedavinin ALK pozitif ergen ve genç erişkin dönemden olan hasta alt grubu için etkili olabileceğini belirtmişlerdir. Bizim hasta grubumuzda ise erken aylarda ALK yoğunluğu ve yüzdesi daha fazla olduğundan ALK inhibitörleri ile tedavinin bebeklik döneminde de etkin olabileceğini savunmaktayız (45).

ALK ile ilgili yapılmış daha güncel çalışmalara gelecek olursak; 1/01/2018 ile 12/31/2021 tarihleri arasında Ho Chi Minh City, Vietnam Tıp ve Eczacılık Üniversitesi Patoloji Bölümü'nde 90 NB vakası, ALK antikoru ile İHK'sal olarak boyanarak ALK ekspresyonu ve bazı klinik ve histopatolojik özellikler ile ilişkileri araştırılmıştır. NB'da ALK ekspresyonu oranı %91,1 olarak saptanmıştır. MYCN amplifikasyonu olan NB hastalarının tümünde ALK İHK pozitifliği olup çoğu vakada yüksek ALK protein ekspresyonu gözlemişlerdir. Bu çalışmada, NB'nin andiferansiye alt tipi, az diferansiye ve diferansiye alt tipten daha düşük bir ALK pozitif oranına sahiptir. ALK

pozitifliği yüzdeleri, daha diferansiye histolojik NB tiplerinde anlamlı derecede yüksektir ($p = 0,024$). ALK ekspresyonu ile yaş grubu, cinsiyet, primer tümörün yerleşim yeri, tümör evresi, MYCN durumu, klinik risk, MKİ, prognostik grup, nekroz ve kalsifikasyon arasında ilişki saptanamamışlardır (46). Bahsedilen parametreler ile ALK ekspresyonu çalışmamızda da ilişkisiz bulunmuştur. Vaka kohortumuzda NB'da ALK ekspresyon oranı %100, orta ve güçlü ALK yoğunluğu sırasıyla %58.3, %29.2; düşük ALK yoğunluğu %12.5 olup, vakaların yarısı %75-100 boyanmanın görüldüğü 4. gruptadır. Bu açıdan alıntılanan çalışma ile sonuçlarımız uyumludur. Ancak çalışmamızda ALK ekspresyonu az diferansiye grupta daha fazla yüzdeye sahipti. Ayrıca olumlu ve olumsuz histoloji grubundaki ALK ekspresyonları arasında anlamlı fark olmasa da olumlu histoloji grubundaki hastaların tamamı (11 hasta) %50'nin üzerinde boyanma gösterirken olumsuz histoloji grubundaki hastaların (13 hasta) 9'u %50 yoğunluğunun üzerinde, 4'ü ise %50'nin altında boyanma gösterdi. Bu da ALK ekspresyonun olumlu gruptaki hastalarda fazla olduğunu belirten iyi prognostik bir göstergedir. Ayrıca bahsedilen çalışmanın aksine MYCN amplifikasyonu olan 4 hasta ALK ekspresyonu yüksek yoğunlukta değildi (46).

ALK ve prognoz ilişkisine bakan bir diğer yakın zamanlı çalışma 2023 yılında Bhardwaj ve arkadaşları tarafından yapılmış olup 54 NB vakası, İHK ile ALK protein ekspresyonu ve NGS ile ALK gen mutasyonu açısından değerlendirilmiştir. FISH ile MYCN amplifikasyonuna bakılıp, INRG evrelemesi ve risk ataması yapılarak hastalar buna göre yönetilmiştir. Tüm parametreler genel sağkalım ile korele olarak bildirilmiştir. Bu yayında ALK proteinin vakaların %65'inde sitoplazmik ekspresyon gösterdiği ve MYCN amplifikasyonu, INRG grupları ve genel sağkalım ile korelasyon göstermediği ve ALK pozitif, az diferansiye nöroblastom daha iyi prognoz gösterdiği saptanmıştır. Bu çalışma diğerlerinden farklı olarak ALK'yı boyanma yoğunluğu ve yüzdesi yanı sıra paterni (sitoplazmik-membranöz) ile de değerlendirmesi açısından bizim çalışmamızla benzeşmektedir. Çalışmamızda sitoplazmik, membranöz ve hem sitoplazmik hem membranöz boyanan hastaların boyanma özelliklerinin prognostik açıdan anlamlı farklılık göstermediğini saptadık. Ayrıca INRG grubu yüksek risk olan hastaların sağ kalımlarının düşük olduğu bulduk. Ancak ALK ekspresyonu ile sağ kalım arasında ilişki bulunmadı. Bununla beraber ALK ekspresyonu yüzdesi az diferansiye olan grupta yüksekti (47).

Kyung kim ve arkadaşları, 2017 yılında çalışmalarında ALK gen kopya sayısı durumu, ALK protein ekspresyonu ve klinikopatolojik parametreler arasındaki korelasyonun değerlendirmişlerdir. Retrospektif olarak az diferansiye 30 NB vakasını FISH analizleri ile değerlendirmiş ve üç farklı antikor (ALK1, D5F3 ve 5A4 klonları) kullanılarak ALK İHK testi yapmışlardır. ALK amplifikasyonu ve kopya sayısı artışı kohortun sırasıyla %10'unda (3/30) ve %53,3'ünde (16/30) gözlemişlerdir. ALK kopya sayısı ile ALK1 ve 5A4 antikorlarında İHK pozitiflik oranı arasında pozitif korelasyon (sırasıyla $P < 0,001$ ve $P = 0,019$) saptamışlardır. ALK1, D5F3 ve 5A4 antikorları, ALK amplifikasyonunun saptanmasında eşit olarak %100 hassasiyet göstermiştir. Ancak kopya sayısı kazanımını tespit etme hassasiyeti üç antikor arasında farklılık göstermiş olup D5F3'te %75 hassasiyet ve ALK1'de %0 hassasiyet izlemişlerdir. ALK İHK pozitifliği INSS evre IV ve yüksek risk grubundaki hastalarda sıklıkla gözlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışma, ALK kopya sayısındaki artışın, az diferansiye NB'de sık görülen bir genetik değişiklik olduğunu tespit etmiştir. ALK kopya sayısı kazanımının tespit performansının antikora bağımlı olduğu ve D5F3 antikorunun en iyi hassasiyeti gösterdiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da D5F3 antikoru kullanılmış olup, ALK İHK ekspresyonunun pozitifliği ile risk grubunun yüksek olması korele saptanmıştır (48).

Yakın zamanda ülkemizde yapılan bir diğer çalışma, Aktaş ve arkadaşlarının NB hastalarında NGS yöntemiyle ALK mutasyonlarını inceledikleri çalışmadır. F1174 ve R1275Q ile ilişkili ALK mutasyonlarının NB'daki en yaygın patojenik mutasyonlar olduğunu buldukları çalışmada mutasyonlar orta veya yüksek riskli gruplarla ilişkili olarak saptanmıştır (49) Bizim çalışmamızda risk grubu evresini iki grup olarak ele aldığımızda (çok düşük- düşük vs orta-yüksek) ALK protein ekspresyonu yoğunluğu ($p=0.026$) yüzdesi ($p=0.009$) evre arttıkça anlamlı olarak arttığını saptadık. Ayrıca ALK negatif olan 3 hasta çok düşük risk grubundaydı.

Çalışmalarda ortaya konulanlara göre ALK değişiklikleri (aktive edici mutasyonlar, amplifikasyonlar ve füzyonlar/yeniden düzenlemeler) kanserlerin yaklaşık %3,3'ünde görülmektedir. ALK füzyonları/yeniden düzenlemeler, IMT'ler ve anaplastik büyük hücreli lenfomaların %50'sinden fazlasında izlenmektedir. NSCLC dışındaki diğer kanserlerde ALK füzyonları/yeniden düzenlemeler yaklaşık %0.2 oranında görülür, bu oran büyük ölçekli tedavi denemeleri için yetersiz olabilir. FDA,

beş ALK inhibitörünü (alektinib, brigatinib, seritinib, krizotinib ve lorlatinib) ALK-aberran NSCLC'ler için onaylamıştır. Krizotinib ayrıca ALK-aberran IMT'ler ve ALCL için de onaylanmıştır. ALK füzyonları/yeniden düzenlemeleri taşıyan kanserlerde ALK inhibitörleri, yaklaşık %50-85'lik yanıt oranlarına sahiptir. ALK füzyonları/yeniden düzenlemeleri taşıyan çoklu solid ve hematolojik tümörlerde (histiyositoz, leiomyosarkom, lenfoma, miyelom, kolorektal, nöroendokrin, over, pankreas, renal ve tiroid kanseri) ALK inhibitörlerinin aktivitesine dair çok sayıda rapor bulunmaktadır. Krizotinib ve alektinib başta olmak üzere, onaylı tüm ALK inhibitörleri bu tümörlerde aktivite göstermiştir. ALK mutasyonları taşıyan NB'da ALK inhibitör aktivitesi gözlemlenmiş, ancak yanıt oranları daha düşük olmuştur (~%10-20). ALK inhibitörleri, ALK füzyonları/yeniden düzenlemeleri taşıyan neoplazmalarda dokudan bağımsız olarak etkinlik göstermektedir. Bu bulgular, ALK değişikliklerinin farmakolojik olarak izlenebilirliğinin ve tedaviye yanıt oranlarının çeşitli kanser türlerinde farklılık gösterebileceğini ortaya koymaktadır (50).

2023 yılında yayınlanmış Bergaggio ve arkadaşlarının yayınladığı bir diğer çalışmada düşük ALK yoğunluklu NB'larda kombine tedavilerin göz önüne alınabileceği vurgulanmaktadır. Çalışmalarında mekanik olarak, ALK inhibitörlerinin tümör büyümesini bozup ve ALK ekspresyonunu upregüle etmesinden, böylece ALK CAR-T hücrelerinin nöroblastomalara karşı aktivitesini kolaylaştırmasından yola çıkarak düşük ALK yoğunluklu nöroblastomada ALK inhibitörleri veya ALK CAR-T hücrelerinin monoterapi olarak yeterli olma olasılığı düşük olsa da, bunların kombinasyonunun spesifik olarak terapötik etkinliği artırdığı ortaya konulmaktadır (51).

Çalışmamızda hastaların tanı anındaki biyopsilerindeki ALK İHK ekspresyonu ile tedaviden sonra alınan örneklerdeki ALK İHK ekspresyonunu kıyasladık. Tedavi öncesi ve sonrası ekspresyonlarda fark saptamadık. Bunun sebebinin hastalara uygulanan tedavilerde ALK inhibitörlerinin kullanılmamasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Klasik kemoterapi protokollerinin ALK inhibitörleri ile kombine edildiği tedavilerin ALK ekspresyonu yoğun olan gruplarda -ALK ekspresyonu yoğunluğunun az diferansiye alt türlerde arttığı da düşünülecek olursa- prognozu iyi yönde etkileyebileceği görüşündeyiz.

Şhimada ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları çalışmalarında toplam 265 PNT'den TrkA ekspresyon düzeyleri Genescan yazılımı ile kantitatif PCR analizi ile belirlemişlerdir. Sonuçları histopatolojiye (Uluslararası Nöroblastoma Patoloji Sınıflandırmasına göre olumlu histoloji ve olumsuz histoloji ve MYCN tümör durumuna (amplifikasyonlu ve amplifikasyonsuz)) göre hastaların klinik evresi ve sonuçlarıyla birlikte analiz ederek 265 hasta arasında TrkA ekspresyonu, hayatta ve iyi durumda olan hastaların tümörlerinde, ilerleyen veya ölen hastaların tümörlerine kıyasla önemli ölçüde daha yüksek olarak saptamışlardır. TrkA ekspresyonunda ayrıca, hayatta olan hastaların tümörleri ve ölen hastaların tümörleri arasında da önemli bir fark saptamışlardır (52). Çalışmamızda sağ kalan hastalarda boyanma yoğunluğu ve yüzdesi eksitus olanlara göre anlamlı olarak daha fazlaydı. Boyanma paterni ile eksitus olan-olmayanlar arasında anlamlı bir ilişki mevcuttu. Sağ kalan NB hastalarında hem sitoplazmik hem membranöz boyanmanın birlikte görüldüğü boyanma paterni eksitus olanlara göre anlamlı olarak daha fazlaydı. Pan-TRK yoğunluğuna az ve orta-çok yoğun olarak bakıldığında az boyananların istatistiksel olarak genel sağkalım süresinin düştüğünü; Pan-TRK boyanma yüzdesi arttıkça sağkalım süresinin de istatistiksel olarak arttığını saptadık. Pan-TRK boyanma yüzdesi %50'nin altında ve üstünde olarak iki grup şeklinde ayrıldığında %50'nin üzerinde boyananların genel sağkalımları anlamlı olarak daha yüksekti. Pan-TRK yoğunluğu az ve orta-çok olarak iki grup halinde ele alındığında boyanma yoğunluğu arttıkça progresyonsuz sağkalım anlamlı olarak daha yüksekti. Pan-TRK boyanma paternine bakıldığında aynı anda her iki paternde boyananlar sitoplazmik boyananlara göre anlamlı olarak daha yüksek genel sağkalım süresine sahipti.

Shimada ve arkadaşlarının çalışmalarında, NB kategorisinde olumlu histoloji grubundaki/amplifiye edilmemiş MYCN alt kümesindeki tümörlerin daha yüksek seviyelerde TRKA ifade ettiğini ve yaşa bağlı nöroblastik farklılaşma gösterdiğini bildirmişleridir. Bunlar ya az diferansiye alt tipe (tüm hastaların tanı anındaki yaşı < 1,5 yıl) ya da diferansiye alt tipe (hastaların %57'si 1.5-5.0 yıl) dahil edilmiş olup olumsuz histoloji grubundaki/amplifiye edilmiş MYCN alt kümesindeki tümörler önemli ölçüde daha düşük seviyelerde TRKA ifade ettiği ve çok sınırlı nöroblastik diferansiyasyon gösterdiği saptanmıştır. Olumlu histoloji grubu/amplifiye edilmiş MYCN alt kümesindeki tümörler çok nadir olup daha yüksek seviyelerde TRKA ifade

ettiği gözlenmiştir. Olumsuz histoloji grubu/amplifiye edilmemiş MYCN alt grubundaki tümörler geniş bir aralıkta TRKA seviyelerine sahip olup sınırlı nöroblastik diferansiyasyon göstermektedir. Çalışmalarının sonucunda NB kategorisindeki tümörlerin moleküler özellikleri (TRKA ekspresyonu ve MYCN durumu) ve histopatolojik özellikleri arasında biyolojik olarak önemli bir korelasyon olduğunu vurgulamışlardır (52) Çalışmamızda olumlu–olumsuz histoloji grubundaki vakalar ile Pan-TRK protein ekspresyon durumuna bakıldığında Pan-TRK ekspresyonu her iki gruptaki vakaların tümünde pozitif. Ancak anlamlı olarak Pan-TRK yoğunluğu ve yüzdesi, olumlu histoloji grubundaki vakalarda olumsuz histoloji grubundaki vakalara göre daha fazlaydı. Pan-TRK ekspresyon durumu ile mutasyon pozitifliği arasındaki ilişkiye bakıldığında, Pan-TRK İHK, MYCN mutasyonu pozitif olan ve olmayan tüm hastalarda pozitif ekspresyon izledik. Ancak Pan-TRK, MYCN mutasyonu pozitif olan 4 olgumuzun 3 (%75)’ünde %50’nin üzerinde ve orta-çok yoğun ekspresyon mevcuttu. Ayrıca Pan-TRK İHK, 11q23 mutasyonu pozitif olan 5 hastanın 4(%80)’inde Pan-TRK yoğunluğu %50’nin üzerinde olup bu vakalarda orta-çok yoğun olarak boyandı. Çalışmamızda yoğunluk, boyanma paterni ile NB alt tipleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı. Ancak, az diferansiye grubun boyanma yüzdesinin %50’nin üzerinde olması diğer gruptakilere göre anlamlı olarak daha yüksekti.

Shimada ve arkadaşlarının çalışması andiferansiye/az diferansiye alt tiplerdeki tümörler ile diferansiye alt tipteki tümörler arasında TrkA ekspresyonunda anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir (52). Bizim çalışmamızda ise yoğunluk, boyanma paterni ile NB alt tipleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamış olmakla birlikte az diferansiye grubun boyanma yüzdesinin %50’nin üzerinde olması diğer gruptakilere göre anlamlı olarak daha yüksekti.

Shimada ve arkadaşlarının çalışmasında Yüksek MKI'ye sahip tümörler, düşük veya orta MKI'ye sahip tümörlerle karşılaştırıldığında anlamlı derecede daha düşük TRkA ifade ederken, bu seride yüksek MKI'ye sahip tümörlerin çoğunluğunun MYCN durumunun yükseldiğini kaydetmişlerdir (52). Bizim çalışmamızda MKI ile Pan-TRK boyanması arasında anlamlı ilişki bulunmadı.

Çalışmamızda klinik evre arttıkça Pan-TRK protein ekspresyon yoğunluğu anlamlı olarak azalmaktadır. Evreyi iki grup olarak ele aldığımızda (L1+L2 vs.

M+MS) Pan-TRK protein ekspresyonu yoğunluğu evre arttıkça (yani ileri evre hastalarda) anlamlı olarak azalmıştır. Evre arttıkça yüzde ve boyanma paterni anlamlı olarak değişmemektedir. Shimada ve arkadaşlarının çalışmasında daha yüksek TrkA kopya sayıları daha iyi bir prognozla bağlantılı olarak bulunmuştur. Tümörlerin TRKA ekspresyonu ayrıca ileri evre hastalığı (Evre III ve IV) ve serideki Evre IVS hastalığı olan hastalar için iyi ve kötü prognozları ayırt etmiştir (52).

Görüldüğü üzere çalışmamızdaki sonuçlar bahsedilen çalışmayla büyük ölçüde örtüşmektedir. Ancak Pan-TRK mutasyonunu İHK yöntemiyle ortaya koymamız NTRK 1,2,3 genlerinin hastalıktaki biyolojik rollerinin etkilerini ayırtırmadan görmemize sebep olmuş olabilir. Bu da literatürdeki çalışmalarla çalışmamızda ortaya çıkan farklılıkları açıklar nitelikte bir yaklaşımdır.

Bu noktada İHK yönteminin mutasyonları ne ölçüde saptayabildiği konusuna değinmemiz gerekirse 2020 yılında Conde ve arkadaşlarının birincil literatür taraması ile kişisel tanı ve araştırma deneyimlerini birleştirerek yaptığı çalışma göz önüne alınabilir (53). Çalışma sonuçlarına göre *NTRK* füzyonları; İHK, FISH, PCR veya NGS ile tespit edilebilir. NGS tüm ileri malign tümörlerde rutin olarak gerçekleştirilmiyorsa, önerilen algoritmaların çoğu tarama yöntemi olarak İHK'yi kullanır ve ardından tüm pozitif İHK vakalarının ortogonal doğrulanmasını (esas olarak FISH veya NGS kullanarak) izler. *NTRK* füzyonları yetişkin tümörlerin %0,31'inde ve pediatrik tümörlerin %0,34'ünde gözlemlenmiştir. Klinik serilerde en yaygın partnerler *NTRK1* ve *NTRK3* olmuştur. En sık görülen füzyon ETV6-*NTRK3*'tür. Gliomalar hariç, *NTRK2* füzyonları sarkomların veya akciğer adenokarsinomlarının izole örnekleriyle sınırlı görünmektedir. Pan-TRK İHK'nin partner ve kanser türüne göre pozitif ve negatif öngörücü değeri hakkında kesin sonuçlara varmak için henüz çok erken olsa da, bugüne kadarki en geniş seri %87,9 genel duyarlılık ve %81,1 özgüllük gösterdiği bildirilmiştir (54). İHK bir tarama yöntemi olarak kabul edildiğinden, en yüksek hassasiyetli testler kullanılmalıdır. Bu, *NTRK* füzyonlarının düşük yaygınlığı nedeniyle bu ortamda özellikle önemlidir. Negatif İHK sonucu olan hastaların bu biyobelirteç için tekrar test edilme olasılığı düşüktür. Bu nedenle, İHK için evrensel preanalitik öneriler burada da geçerlidir. Heterojen boyamadan kaçınmak için uygun şekilde sabitlenmiş bir doku bloğu

seçilmelidir. TRK proteininin (TRKA, TRKB ve TRKC) ekspresyonu, bir pan-TRK antikoru kullanılarak aynı anda tanımlanmalıdır. EPR17341 klonu en sık kullanılan ve iyi karakterize edilenidir(55) Analitik fazın düzgün çalışmasını sağlamak ve yanlış negatif sonuç riskini en aza indirmek için tüm slaytlara pozitif bir kontrol eklenmelidir. Tek güvenilir pan-TRK İHK in situ pozitif kontrolleri periferik sinirlerdir. Pan-TRK IHC, NTRK füzyonları için tamamen spesifik değildir. Bu nedenle pozitif pan-TRK İHK'yi her zaman ikinci bir test izlemelidir. NTRK füzyonları özellikle pediatrik tümörlerde yaygın olduğundan, NTRK füzyonu negatif nöroektodermal tümörlerin (örn. Ewing sarkomları veya nöroblastomlar) sık ve yoğun pan-TRK İHK pozitifliği, patologları NGS sonuçlarını beklerken aşırı beklentilere karşı uyarmalıdır (53) Çalışmamızda yukarıda bahsedilen EPR17341 antikoru kullanılmıştır. Her kesite nöral doku içeren iç kontroller sağlanmıştır. Boyanma durumları 3 ayrı parametreye (yoğunluk, yüzde, patern) göre skorlama sistemine tabi tutularak iki patolog tarafından incelendiğinden çalışmamızda literatürde bulunan doğruluk önlemlerini karşılamaktayız.

Pan-TRK İHK kullanımına yönelik bir diğer güncel çalışma Vingiani ve arkadaşlarının 2023 yılında yaptığı çalışmadır. Pan-TRK testinin (Ventana) analitik geçerliliğini değerlendirmeyi ve NTRK1-3 de dahil olmak üzere 13 gendeki önemli füzyonları tespit etmek üzere tasarlanmış Archer FusionPlex Lung Panel (ArcherDX) ile İHK arasında birebir karşılaştırma yapmayı amaçladıkları çalışmada Pan-TRK İHK ve NGS analizi, 124 kanser hastasından oluşan retrospektif/prospektif bir kohortta gerçekleştirilmiştir (karsinomlar, 93 vaka; yumuşak doku sarkomları, 19 vaka; primer merkezi sinir sistemi tümörleri, 10 vaka; ve nöroblastomlar, 2 vaka). 117 vakada İHK ve NGS sonuçları arasında bir karşılaştırma yapılmıştır: 30 pan-TRK pozitif vaka arasında, NGS ile NTRK yeniden düzenlenmesi 11'inde (%37) bulunurken, 87 pan-TRK negatif vakadan birinde (%1,1) (bir NSCLC vakası) NGS ile TPM3-NRTK1 yeniden düzenlenmesi görülmüştür. Buna göre, İHK'nın NTRK durumunu tahmin etmedeki duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %91,7 ve %81,9 iken, negatif (NPV) ve pozitif öngörü değeri (PPV) sırasıyla %98,8 ve %36,7 olarak bildirilmiştir. Bu verilerle, VENTANA pan-TRK antikoru ile yapılan İHK'nın, NTRK füzyonlu tümörleri taşıma potansiyeli olan hastaların tanımlanması için güvenilir bir tarama aracı olabileceğine dikkat çekmişlerdir (56).

Yakın zamanda Karataş ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 2015 ile 2020 yılları arasında teşhis edilen toplam 36 örnek içerisinde, ETV6-NTRK3 (n = 8) ve TPM4-NTRK3 (n = 1) füzyonları doğrulanmıştır. ETV6-NTRK3 füzyon pozitif vakalar pan-TRK İHK ile sitoplazmik ve nükleer boyanma göstermiştir. Genel olarak, Pan-TRK İHK sonuçları ile referans laboratuvarı arasında doğrulama çalışması için %89 (32/36) uyum izlenmiş olup buna karşılaştırma olarak kullanılan pan-TRK İHK, NTRK FISH ve RNA tabanlı NTRK 1–3 NGS füzyon analizi sonuçları da dahildir (57). Karataş ve arkadaşlarının kurumlarında izlenen yöntemde klinik olarak ilerlemiş veya metastatik vakalar genellikle hedefli tedavi veya klinik denemeye dahil olma için çeşitli değişiklikleri test etmek üzere RNA NGS'e gönderilirken, pan-TRK İHK sınırlı bir moleküler panelin ilk analizini tamamlamaya yaramaktadır (57).

Çalışmamızda ortaya çıkardığımız bir diğer önemli bulgu tedavi öncesi ve sonrasında Pan-TRK İHK ekspresyon yoğunluğunda gözlenen anlamlı azalmaydı. Tedavi sonrasında ALK ekspresyonlarında değişiklik olmamasına rağmen pan-TRK ekspresyon yoğunluğunun azalması, bize uygulanan klasik kemoterapi yöntemlerinin NTRK genlerinin etki mekanizmalarına bir dereceye kadar etki etmiş olabileceğini düşündürdü. Bu durumda eğer, seçilmiş hasta gruplarında NTRK inhibitörleri ile klasik kemoterapi kürlerinin kombinasyon tedavisi uygulanırsa klinik seyrin olumlu yönde etkilenebileceği söz konusu olmaktadır. Bu minvalde Carolina Sgarioni Camargo Vince ve arkadaşlarının 2024 yılında yaptıkları çalışmadan söz edebiliriz. Larotrectinib ile tedavi edilen 17 pediatrik vakadan (11 yumuşak doku sarkomu, beş beyin tümörü ve bir nöroblastom) alınan klinik veriler ve 14 hastanın radyolojik görüntüleri merkezi olarak incelenmiştir. Gen füzyonlarının test edilmesi; tedaviye zayıf yanıt, tümörün ilerlemesi veya agresif seyirli olması nedeniyle gerçekleştirilmiştir. Hasta kohortu içindeki NB tanısı konan primer tümörü mediastende olan, MIBG sintigrafisi ile deri ve kemiklere metastazı olan, tümörün MYCN durumu kesin olmayan 8 aylık bir kız çocuğuna başlangıçta yüksek riskli NB için konvansiyonel kemoterapi uygulandığı, 1 yıllık tedaviden sonra, metastatik lezyonlar MIBG sintigrafisinde gerilemesine rağmen, mediastinal tutulum lezyonu devam ettiği, ikinci kez ameliyat (parsiyel rezeksiyon) yapıldığı ve patolojik değerlendirme sonucu mediastende kalan az diferansiye bir NB örneğinin doğruladığı bildirilmiştir. Bu olguda NGS analizi ile bir SCAPER-NTRK3 füzyonu gösterilmiş

olup hastaya larotrekatinib başlanmıştır. İlaç tedavisine başladıktan 3 ay sonra, MR ile yapılan yeniden değerlendirme stabilleşen hastalığı gösterilmiştir. Yeni yapılan biyopsi sonucunda tamamen matür bir NB dokusu (ganglionörom) izlenmiş olup hastanın 13 ay boyunca larotrekatinib almaya devam ettiği ve yeni MIBG sintigrafisinde primer lezyonda veya metastatik bölgelerde tutulum görülmediği bildirilmiştir (27).

Pan-TRK inhibitörleri Entrectinib ve Larotrectinib yakın zamanda NTRK1-2-3 yeniden düzenlenmiş hastalarda tümör agnostik tedaviler olarak onaylanmıştır ve bu nedenle gerçek dünya pratiğinde NTRK füzyonlarını yakalamak için güvenilir ve erişilebilir biyobelirteçleri belirlemeye acil ihtiyaç vardır (56). Çalışmamız bu anlamda literatüre anlamlı bir katkı sağlamayı amaçlamaktadır.

7. SONUÇ

Bu çalışmada, nöroblastom, ganglionöroblastom ve ganglionörom hastalarında ALK ve Pan-TRK ekspresyonlarının insidansı ve prognostik değerleri incelenmiştir. Bulgular, ALK ve Pan-TRK ekspresyonlarının bu tümör tiplerinde farklı dağılımlar gösterdiğini ortaya koymaktadır. ALK ekspresyonunun yüksek risk grubundaki hastalarda daha sık ve yoğun olduğu, Pan-TRK ekspresyonunun ise düşük risk grubundaki hastalarda daha fazla olduğu saptanmıştır.

Araştırmamızda, ALK ekspresyonunun nöroblastomlarda daha yaygın olduğu bulunmuştur. ALK pozitifliği, genellikle kötü prognoz ile ilişkilidir ve bu durum tedaviye dirençli vakalarda hedefe yönelik tedavi seçeneklerinin belirlenmesinde önemlidir. Ayrıca, Pan-TRK ekspresyonunun yoğunluğunun tedavi sonrası azaldığı gözlemlenmiştir, bu da kemoterapinin NTRK genleri üzerindeki etkisinin olabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak, ALK ve Pan-TRK ekspresyonlarının prognostik değerleri, bu belirteçlerin bireyselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarında kullanılabileceğini göstermektedir. Bu bulgular, nöroblastik tümörlerde daha etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilir. Gelecekte yapılacak daha geniş çaplı çalışmalar, bu belirteçlerin prognostik ve terapötik değerlerini daha net ortaya koyacaktır.

8. KAYNAKÇA

1. Turkel SB, Itabashi HH. The natural history of neuroblastic cells in the fetal adrenal gland. *Am J Pathol.* 1974 Aug;76(2):225–44.
2. Schleiermacher G, Janoueix-Lerosey I, Delattre O. Recent insights into the biology of neuroblastoma. Vol. 135, *International Journal of Cancer.* Wiley-Liss Inc.; 2014. p. 2249–61.
3. Park JR, Bagatell R, London WB, Maris JM, Cohn SL, Mattay KK, et al. Children’s Oncology Group’s 2013 blueprint for research: neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer.* 2013 Jun;60(6):985–93.
4. Choi JH, Ro JY. Mediastinal neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, and ganglioneuroma: Pathology review and diagnostic approach. *Semin Diagn Pathol.* 2022 Mar;39(2):120–30.
5. Gupta DK, Sharma S, Carachi R. *Pediatric Oncology: Surgical & Medical Aspects*; 2007
6. edited by Ricardo V. Llyold RYOGKJR. who classification of tumours of endocrin organs, neuroblastic tumours of the adrenal gland. 5 th. 2018. 196–196 p.
7. Swift CC, Eklund MJ, Kravcka JM, Alazraki AL. Updates in Diagnosis, Management, and Treatment of Neuroblastoma. *RadioGraphics.* 2018 Mar;38(2):566–80.
8. *Pediatric Oncology in Turkey* [Internet]. 2012. Available from: www.jp-pho-online.com
9. Parodi S, Merlo DF, Ranucci A, Miligi L, Benvenuti A, Rondelli R, et al. Risk of neuroblastoma, maternal characteristics and perinatal exposures: The SETIL study. *Cancer Epidemiol.* 2014 Dec 1;38(6):686–94.
10. Familial neuroblastoma: Report of a kindred with a high incidence of infantile tumors. M.D. Pat C. Hardy, M.D. Mark E. Nesbit Jr.
11. Tumors of the Adrenal Glands and Extraadrenal Paraganglia - Volume 8 (Afip Atlas of Tumor Pathology Series 4) Hardcover – January 1, 2007 by Ernest E. Lack
12. From the Archives of the AFIP Neuroblastoma, Ganglioneuroblastoma, and Ganglioneuroma: Radiologic-Pathologic Correlation
13. Robbins and Cotran, *Pathologic Basis of Disease.* 10th Edition Elsevier Health Sciences; 2021
14. Dubois SG, London WB, Zhang Y, Matthay KK, Monclair T, Ambros PF, et al. Lung metastases in neuroblastoma at initial diagnosis: A report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) project. *Pediatr Blood Cancer.* 2008 Nov;51(5):589–92.
15. Heide S, Masliah-Planchon J, Isidor B, Guimier A, Bodet D, Coze C, et al. Oncologic Phenotype of Peripheral Neuroblastic Tumors Associated With PHOX2B Non-Polyalanine Repeat Expansion Mutations. *Pediatr Blood Cancer.* 2016 Jan;63(1):71–7.
16. Lonergan GJ, Schwab CM, Suarez ES, Carlson CL. Neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, and ganglioneuroma: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics.* 2002;22(4):911–34.
17. Nur H, Dokuz O, Üniversitesi E, Enstitüsü O, Onkoloji Ç, et al. “TPOG-NB-2020.” Sayfa:29-37.

18. Joshi V V, Cantor AB, Altshuler G, Larkin EW, Neill JS, Shuster JJ, et al. Age-linked prognostic categorization based on a new histologic grading system of neuroblastomas. A clinicopathologic study of 211 cases from the Pediatric Oncology Group. *Cancer*. 1992 Apr 15;69(8):2197–211.
19. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J ichi, Joshi V V., Roald B. Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors. *Cancer*. 1999 Jul 15;86(2):349–63.
20. Mills E. Stacey. Sternberg's diagnostic surgical pathology. 6th ed. Vol. 1. 2016. 630–642 p.
21. Bielle F, Fréneaux P, Jeanne-Pasquier C, Maran-Gonzalez A, Rousseau A, Lamant L, et al. PHOX2B immunolabeling: a novel tool for the diagnosis of undifferentiated neuroblastomas among childhood small round blue-cell tumors. *Am J Surg Pathol*. 2012 Aug;36(8):1141–9.
22. Wang LL, Teshiba R, Ikegaki N, Tang XX, Naranjo A, London WB, et al. Augmented expression of MYC and/or MYCN protein defines highly aggressive MYC-driven neuroblastoma: a Children's Oncology Group study. *Br J Cancer*. 2015 Jun 30;113(1):57–63.
23. Jiang M, Stanke J, Lahti JM. The connections between neural crest development and neuroblastoma. *Curr Top Dev Biol*. 2011;94:77–127.
24. Kumar Abbas Aster. Robbins basic pathology. 9th ed. Elsevier 2013. 177-190 p.
25. Kobayashi C, Monforte-Munoz HL, Gerbing RB, Stram DO, Matthay KK, Lukens JN, et al. Enlarged and prominent nucleoli may be indicative of MYCN amplification: A study of neuroblastoma (Schwannian stroma-poor), undifferentiated/poorly differentiated subtype with high mitosis-karyorrhexis index. *Cancer*. 2005 Jan 1;103(1):174–80.
26. Brčić I, Godschachner TM, Bergovec M, Igrec J, Till H, Lackner H, et al. Broadening the spectrum of NTRK rearranged mesenchymal tumors and usefulness of pan-TRK immunohistochemistry for identification of NTRK fusions. *Mod Pathol*. 2021 Feb;34(2):396–407.
27. Vince CSC, Brassesco MS, Mançano BM, Gregianin LJ, Carbone EK, do Amaral E Castro A, et al. Beyond Clinical Trials: Understanding Neurotrophic Tropomyosin Receptor Kinase Inhibitor Challenges and Efficacy in Real-World Pediatric Oncology. *JCO Precis Oncol*. 2024 May;8:e2300713.
28. Brodeur GM, Minturn JE, Ho R, Simpson AM, Iyer R, Varela CR, et al. Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas. Vol. 15, *Clinical Cancer Research*. 2009. p. 3244–50.
29. Shreenivas A, Janku F, Gouda MA, Chen HZ, George B, Kato S, et al. ALK fusions in the pan-cancer setting: another tumor-agnostic target? *NPJ Precis Oncol*. 2023 Sep 29;7(1):101.
30. Dalianis T, Lukoseviciute M, Holzhauser S, Kostopoulou ON. New Approaches Towards Targeted Therapy for Childhood Neuroblastoma. *Anticancer Res*. 2023 Sep;43(9):3829–39.
31. Shimada H, Chatten J, Newton WA, Sachs N, Hamoudi AB, Chiba T, et al. Histopathologic Prognostic Factors in Neuroblastic Tumors: Definition of Subtypes of Ganglioneuroblastoma and an Age-Linked Classification of Neuroblastomas. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1984 Aug 1;73(2):405–16.
32. Nakazawa A. Biological categories of neuroblastoma based on the international neuroblastoma pathology classification for treatment stratification. Vol. 71, *Pathology International*. Blackwell Publishing; 2021. p. 232–44.

33. Joshi V V. Peripheral neuroblastic tumors: pathologic classification based on recommendations of international neuroblastoma pathology committee (Modification of shimada classification). *Pediatr Dev Pathol.* 2000;3(2):184–99.
34. Shimada H, Umehara S, Monobe Y, Hachitanda Y, Nakagawa A, Goto S, et al. International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer.* 2001 Nov 1;92(9):2451–61.
35. Cohn SL, Pearson ADJ, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol.* 2009 Jan 10;27(2):289–97.
36. Cohn SL, Pearson ADJ, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol.* 2009 Jan 10;27(2):289–97.
37. Ikegaki N, Shimada H, International Neuroblastoma Pathology Committee. Subgrouping of Unfavorable Histology Neuroblastomas With Immunohistochemistry Toward Precision Prognosis and Therapy Stratification. *JCO Precis Oncol.* 2019;3.
38. Zhou J, Du H, Cai W. Narrative review: precision medicine applications in neuroblastoma-current status and future prospects. *Transl Pediatr.* 2024 Jan 29;13(1):164–77.
39. Poremba C, Willenbring H, Hero B, Christiansen H, Schäfer KL, Brinkschmidt C, et al. Telomerase activity distinguishes between neuroblastomas with good and poor prognosis. *Ann Oncol.* 1999 Jun;10(6):715–21.
40. Hiyama E, Hiyama K, Ohtsu K, Yamaoka H, Ichikawa T, Shay JW, et al. Telomerase activity in neuroblastoma: is it a prognostic indicator of clinical behaviour? *Eur J Cancer.* 1997 Oct;33(12):1932–6.
41. Minoo P, Wang HY. ALK-immunoreactive neoplasms. *Int J Clin Exp Pathol.* 2012;5(5):397–410.
42. Siozopoulou V, Smits E, De Winne K, Marcq E, Pauwels P. NTRK Fusions in Sarcomas: Diagnostic Challenges and Clinical Aspects. *Diagnostics (Basel).* 2021 Mar 9;11(3).
43. Chang HH, Lu MY, Yang YL, Chou SW, Lin DT, Lin KH, et al. The prognostic roles of and correlation between ALK and MYCN protein expression in neuroblastoma. *J Clin Pathol.* 2020 Mar;73(3):154–61.
44. Duijkers FAM, Gaal J, Meijerink JPP, Admiraal P, Pieters R, de Krijger RR, et al. High anaplastic lymphoma kinase immunohistochemical staining in neuroblastoma and ganglioneuroblastoma is an independent predictor of poor outcome. *Am J Pathol.* 2012 Mar;180(3):1223–31.
45. Mazzocco K, Defferrari R, Sementa AR, Garaventa A, Longo L, De Mariano M, et al. Genetic abnormalities in adolescents and young adults with neuroblastoma: A report from the Italian Neuroblastoma group. *Pediatr Blood Cancer.* 2015 Oct;62(10):1725–32.
46. Phan TDA, Nguyen TQ, To NT, Thanh TL, Ngo DQ. Immunohistochemical expression of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma and its relations with some clinical and histopathological features. *J Pathol Transl Med.* 2024 Jan;58(1):29–34.

47. Bhardwaj N, Rohilla M, Gautam U, Trehan A, Bansal D, Kakkar N, et al. ALK Gene Mutation and ALK Protein Expression in Advanced Neuroblastoma and the Potential Value in Risk Stratification in Fine-Needle Aspiration Biopsy Samples. *Am J Clin Pathol*. 2023 Apr 4;159(4):407–15.
48. Kim EK, Kim S. ALK gene copy number gain and immunohistochemical expression status using three antibodies in neuroblastoma. *Pediatric and Developmental Pathology*. 2017 Apr 1;20(2):133–41.
49. Aktaş TÇ, Kızmaçoğlu D, Aktaş S, Gökbayrak ÖE, Serinan E, Erol A, et al. Identification of ALK Mutation in Neuroblastoma on the Point of Molecular Heterogeneity. *Technol Cancer Res Treat*. 2023;22:15330338231211138.
50. Shreenivas A, Janku F, Gouda MA, Chen HZ, George B, Kato S, et al. ALK fusions in the pan-cancer setting: another tumor-agnostic target? *NPJ Precis Oncol*. 2023 Sep 29;7(1):101.
51. Bergaggio E, Tai WT, Aroldi A, Mecca C, Landoni E, Nüesch M, et al. ALK inhibitors increase ALK expression and sensitize neuroblastoma cells to ALK.CAR-T cells. *Cancer Cell*. 2023 Dec 11;41(12):2100-2116.e10.
52. Shimada H, Nakagawa A, Peters J, Wang H, Wakamatsu PK, Lukens JN, et al. TrkA expression in peripheral neuroblastic tumors: prognostic significance and biological relevance. *Cancer*. 2004 Oct 15;101(8):1873–81.
53. Conde E, Hernandez S, Sanchez E, Regojo RM, Camacho C, Alonso M, et al. Pan-TRK Immunohistochemistry: An Example-Based Practical Approach to Efficiently Identify Patients With NTRK Fusion Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2021 Aug 1;145(8):1031–40.
54. Solomon JP, Linkov I, Rosado A, Mullaney K, Rosen EY, Frosina D, et al. NTRK fusion detection across multiple assays and 33,997 cases: diagnostic implications and pitfalls. *Mod Pathol*. 2020 Jan;33(1):38–46.
55. Hechtman JF, Benayed R, Hyman DM, Drilon A, Zehir A, Frosina D, et al. Pan-Trk Immunohistochemistry Is an Efficient and Reliable Screen for the Detection of NTRK Fusions. *American Journal of Surgical Pathology*. 2017 Nov;41(11):1547–51.
56. Vingiani A, Lorenzini D, Conca E, Volpi CC, Trupia DV, Gloghini A, et al. Pan-TRK immunohistochemistry as screening tool for NTRK fusions: A diagnostic workflow for the identification of positive patients in clinical practice. *Cancer Biomark*. 2023;38(3):301–9.
57. Karakas C, Giampoli EJ, Love T, Hicks DG, Velez MJ. Validation and interpretation of Pan-TRK immunohistochemistry: a practical approach and challenges with interpretation. *Diagn Pathol*. 2024 Jan 10;19(1):10.