



T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ- CERRAHPAŞA

CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ

PATOLOJİ ANA BİLİM DALI

Başkan: Prof. Dr. BÜGE ÖZ

**YUVARLAK HÜCRELİ SARKOMLARDA GÜNCEL  
KLİNİKOPATOLOJİK SINIFLAMA VE PROGNOZİK ÖNEMİ**

(UZMANLIK TEZİ)

**Dr. Gamze GÖKTÜRK ÖZCAN**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nil ÇOMUNOĞLU**

**İstanbul – 2019**



Bu çalışma İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri  
Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje ID: 32186

## ÖNSÖZ

*Asistanlık eğitimim boyunca her konuda bana destek olan, eğitimim için özverili bir şekilde emek veren, başta Ana Bilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Büge Öz olmak üzere tüm Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı hocalarıma;*

*Eğitim hayatımda ve tez sürecinde her konuda bana destek olan, bu zorlu süreci atlatmamda bilgi, tecrübe, hoşgörü, sabır ve desteğiyle bana yol gösteren tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Nil Çomunoğlu'na;*

*Uzmanlık eğitimim boyunca beraber yol aldığım, tüm zorlukları ve mutlulukları paylaştığım tüm asistan arkadaşlarıma;*

*Bugünlere gelmemde büyük emek ve özverileri olan aileme;*

*Tanıdığım ilk günden beri hiçbir zaman elimi bırakmayan, her zaman yol göstericim, en büyük desteğim ve yardımcım olan eşim Kerem'e;*

*sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.*

*Dr. Gamze Göktürk Özcan*

# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	iii
TABLO LİSTESİ .....	vi
RESİM LİSTESİ .....	viii
GRAFİK LİSTESİ .....	x
KISALTMALAR .....	xi
ÖZET .....	xiii
ABSTRACT .....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. EWİNG/PNET AİLESİ SARKOM.....	3
2.1.1. TANIM.....	3
2.1.2. TARİHÇE .....	3
2.1.3. EPİDEMİYOLOJİ .....	4
2.1.4. ETYOLOJİ.....	4
2.1.5. KLİNİK ÖZELLİKLER.....	5
2.1.6. RADYOLOJİK BULGULAR.....	5
2.1.7. MAKROSKOPİ .....	5
2.1.8. HİSTOPATOLOJİ VE SINIFLANDIRMA.....	6
2.1.9. EWİNG/PNET AİLESİ SARKOMU .....	6
2.1.10. SİTOPATOLOJİ .....	8
2.1.11. İMMÜNFENOTİP.....	8
2.1.12. GENETİK.....	10
2.1.13. PROGNOZ.....	11
2.1.14. TANI .....	12
2.2. CIC REARANJMANI GÖSTEREN SARKOMLAR .....	12
2.2.1. TANIM.....	12
2.2.2. TARİHÇE.....	12
2.2.3. EPİDEMİYOLOJİ .....	13
2.2.4. ETYOLOJİ.....	13
2.2.5. HİSTOPATOLOJİ .....	13
2.2.6. İMMÜNFENOTİP .....	14
2.2.7. GENETİK.....	15
2.2.8. PROGNOZ .....	15
2.2.9. TANI .....	15
2.3. BCOR REARANJMANI GÖSTEREN SARKOMLAR.....	16
2.3.1. TANIM.....	16
2.3.2. TARİHÇE.....	16

2.3.3. EPİDEMİYOLOJİ .....	16
2.3.4. ETYOLOJİ.....	17
2.3.5. HİSTOPATOLOJİ .....	17
2.3.6. İMMÜNFENOTİP.....	17
2.3.7. GENETİK.....	18
2.3.8. PROGNOZ .....	18
2.3.9. TANI .....	19
<b>3. MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>20</b>
3.1. VAKA SEÇİMİ VE VAKALARIN ANALİZİ.....	20
3.1.1. VAKA SEÇİMİ.....	20
3.1.2. KLİNİK ÖZELLİKLER.....	20
3.1.3. MİKROSKOBİK DEĞERLENDİRME .....	20
3.1.4. İMMÜNHİSTOKİMYA UYGULAMA VE DEĞERLENDİRME .....	21
3.2. İSTATİSTİKSEL ANALİZ YÖNTEMLERİ .....	22
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>24</b>
4.1. KLİNİK VE PATOLOJİK BULGULAR.....	24
4.2. İMMÜNHİSTOKİMYASAL BULGULAR .....	31
4.3. EWİNG/PNET AİLESİ SARKOM YÖNÜNDE YORUMLANAN VAKALAR.....	32
4.4. CIC REARANJMANI GÖSTEREN SARKOM YÖNÜNDE YORUMLANAN VAKALAR.....	34
4.5. BCOR REARANJMANI GÖSTEREN SARKOM YÖNÜNDE YORUMLANAN VAKALAR.....	35
4.6. SINIFLANDIRILAMAYAN VAKALAR .....	36
4.7. KLİNİK PARAMETRELERİN PROGNOZA VE SAĞKALIMA ETKİLERİ.....	39
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>50</b>
<b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>60</b>
<b>7. RESİMLER .....</b>	<b>62</b>
<b>8. KAYNAKLAR .....</b>	<b>71</b>

## TABLO LİSTESİ

Tablo 1. EAS ve EBS’de görülen translokasyonlar .....	11
Tablo 2. Kemik yerleşimli vakaların dağılımı .....	27
Tablo 3: Yumuşak doku yerleşimli vakaların anatomik bölgelere göre dağılımı .....	27
Tablo 4. Viseral yerleşimli vakaların dağılımı .....	28
Tablo 5. EAS yönünde yorumlanan vakaların tümör lokalizasyonları .....	32
Tablo 6. EAS yönünde yorumlanan vakaların immünohistokimyasal boyanma özellikleri.....	33
Tablo 7. CRS yönünde yorumlanan vakaların immünohistokimyasal analizi .....	35
Tablo 8. BRS yönünde yorumlanan vakaların immünohistokimyasal analizi .....	36
Tablo 9. Sınıflandırılmayan vakaların tümör lokalizasyonları .....	36
Tablo 10. Tümör subgruplarının demografik ve klinik özellikleri.....	38
Tablo 11. Tümör subgruplarının morfolojik özellikleri .....	38
Tablo 12. Genel sağkalım.....	39
Tablo 13. Ortalama genel sağkalım (gün) .....	40
Tablo 14. Cinsiyete göre genel sağkalım .....	41
Tablo 15. Cinsiyete göre ortalama genel sağkalım (gün).....	41
Tablo 16. Cinsiyete göre ortalama genel sağkalım; Ki-Kare analizi .....	41
Tablo 17. Yaşa göre genel sağkalım .....	43
Tablo 18. Yaşa göre ortalama genel sağkalım (gün).....	43
Tablo 19. Yaşa göre ortalama genel sağkalım; Ki-Kare analizi.....	43
Tablo 20. Tümör boyutuna göre genel sağkalım.....	44
Tablo 21. Tümör boyutuna göre ortalama sağkalım (gün).....	45
Tablo 22. Tümör boyutuna göre ortalama genel sağkalım; Ki-Kare analizi.....	45
Tablo 23. Tümör yerleşimine göre genel sağkalım.....	46
Tablo 24. Tümör yerleşimine göre ortalama genel sağkalım (gün) .....	47
Tablo 25. Tümör lokalizasyonuna göre ortalama genel sağkalım; Ki-Kare analizi.....	47

Tablo 26. Tümör subgrubuna göre genel sağkalım.....	48
Tablo 27. Tümör subgrubuna göre ortalama genel sağkalım (gün).....	49
Tablo 28. Tümör subgrubuna göre ortalama genel sağkalım; Ki-Kare analizi.....	49



## RESİM LİSTESİ

Resim 1: EAS'lerin iskelet sisteminde görülme yüzdeleri.....	62
Resim 2. EAS makroskopisi. Uzun kemik kesitinde diafizer intramedüller yerleşimli, düzensiz sınırlı permeatif lezyon izlenmektedir.....	62
Resim 3. EAS. Küçük, monoton, üniform yapıda hücrelerden oluşan, stromanın izlenmediği sellüler tümör (H-Ex400) .....	63
Resim 4. Atipik EAS. Küçük-orta boyutta, monoton, düzensiz, yer yer angüstasyon gösteren nükleuslu, seçilebilir sitoplazmalı, arada mitotik figürlerin sık olarak izlendiği tümör dokusu (H-Ex400).....	63
Resim 5. EAS, adamantinoma benzeri varyant. Küçük büyütmede belirgin nest paterni, periferik palizatlanma ve desmoplazi görülmektedir (18).....	64
Resim 6. NKX2.2 için pozitif kontrol olarak kullanılan pankreas dokusundaki adacık hücrelerinde kuvvetli nükleer boyanma (x200) .....	64
Resim 7. WT1 için pozitif kontrol olarak kullanılan over seröz karsinom dokusunda kuvvetli nükleer boyanma (x100).....	65
Resim 8. ETV 4 için pozitif kontrol dokusu olarak kullanılan beyin dokusunda nöral hücrelerde kuvvetli nükleer, glial hücrelerde orta yoğunlukta nükleer boyanma (x200) .....	65
Resim 9. CCNB3 için pozitif kontrol olarak kullanılan testis dokusunda germ hücrelerinde orta-kuvvetli nükleer boyanma (x200).....	66
Resim 10. BCOR için pozitif kontrol olarak kullanılan testis dokusunda spermatogoniumlarda kuvvetli, spermatositlerde orta, sertoli hücrelerinde zayıf boyanma (x400).....	66
Resim 11. BCOR için negatif kontrol olarak karaciğer dokusunda nükleuslarda negatiflik (x200) .....	67
Resim 12. Vakalarımızda immünohistokimyasal olarak NKX2.2 boyanma özellikleri: A. Negatiflik gösteren tümör dokusu (x200) B. Tümör dokusunda 1+ orta yoğunlukta boyanma (x400) C. Tümör dokusunda 2+, kuvvetli boyanma (x200) D. 3+ orta-kuvvetli boyanma gösteren tümör dokusu (x200) E. Tümörde yaygın kuvvetli pozitif boyanma (4+) (x200).....	67
Resim 13. WT1 antikoru ile boyanma özellikleri: A. Tümör hücrelerinde negatiflik, B. Tümör hücrelerinde 2+ nükleer+sitoplazmik boyanma (x400), C. Tümör hücrelerinde	



nükleer+sitoplazmik difüz (4+) kuvvetli boyanma (x200), D. Tümör hücrelerinde difüz kuvvetli nükleer boyanma (x400) .....	68
Resim 14. ETV4 antikoru ile vakalarımızdan bazılarında boyanma özellikleri: A. Tümörde negatif boyanma (x200), B. Tümörde fokal olarak değerlendirilen (2+) pozitif boyanma, C. Beyne metastaz yapmış CRS olgusunda, beyin dokusuyla benzer nitelikte difüz boyanma (x100), D. 4+ olarak değerlendirilen boyanma paterni .....	68
Resim 15. CCNB3 antikoruyla boyanma özellikleri: A. Negatif boyanma (x200), B ve C. Fokal nükleer boyanma (1+ ve 2+), D. 3+ olarak değerlendirilen difüz boyanma .....	69
Resim 16. BCOR ile immunhistokimyasal incelemede: A. Fokal ancak kuvvetli reaktivite, B. Fokal, kuvvetli boyanma, C. Difüz ancak zayıf-orta şiddette boyanma, D. Difüz kuvvetli boyanma .....	69
Resim 17. BCOR ile karşılaşılan artefaktlar. A. Sıvanma tarzında boyanma ve eşlik eden seyrek nükleer pozitiflik. B. Nükleusların seçilebildiği yoğun zemin ve sitoplazma boyanması.....	70
Resim 18. EAS ile benzer morfolojik özellikler gösteren, BRS yönünde değerlendirilen vaka (H-Ex400).....	70
Resim 19. Küçük, yuvarlak monoton hücrelerden oluşan, seyrek olarak psödorozet yapıları da izlenen, CRS yönünde değerlendirilen vaka (H-Ex400).....	71

## GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1. Vakaların cinsiyete göre dağılımı .....	24
Grafik 2: Vakaların dekatlara göre dağılımları .....	24
Grafik 3: Pediatrik (0-18 yaş) ve erişkin ( $\geq 18$ yaş) hastaların dağılımı .....	25
Grafik 4. Vakaların klinik başvuru nedenlerine göre dağılımı.....	25
Grafik 5. Vakaların yerleşim yerine göre dağılımı.....	26
Grafik 6. Vakaların patolojik tanılarına göre sınıflandırılması .....	29
Grafik 7. Çalışmaya alınan materyallerin cinsi .....	30
Grafik 8. Çalışmaya alınan materyallerin alınma şekline göre sınıflandırılması .....	30
Grafik 9. Tümör tiplerine göre tümör lokalizasyonları .....	39
Grafik 10. Vakaların toplam genel sağkalım eğrisi (gün) .....	40
Grafik 11. Cinsiyete bağlı kümülatif sağkalım süresi (gün) .....	42
Grafik 12. Yaşa bağlı kümülatif sağkalım süresi (gün) .....	43
Grafik 13. Tümör çapına bağlı ( $\leq 7$ cm ve $>7$ cm) kümülatif sağkalım süresi (gün) .....	45
Grafik 14. Tümör lokalizasyonuna bağlı kümülatif sağkalım süresi (gün).....	47
Grafik 15. Tümör subgrubuna bağlı kümülatif sağkalım süresi (gün).....	49

## KISALTMALAR

- EAS: Ewing/PNET ailesi sarkomu  
ES: Ewing sarkomu  
PNET: Primitif nöroektodermal tümör  
EWSR1: Ewing sarcoma breakpoint region 1  
ETS: E26 transformation-specific  
CIC: Capicua transcriptional repressor  
DUX4: Double homeobox 4  
FOXO4: Forkhead box O4  
BCOR: BCL6 corepressor  
CCNB3: Cyclin B3  
WT1: Wilms' tumor suppressor gene  
NKX2.2: NK2 homeobox 2  
ETV4: ETS variant 4  
ETV5: ETS variant 5  
ETV1: ETS variant 1  
CRS: CIC rearanjmanı gösteren sarkom  
BRS: BCOR rearanjmanı gösteren sarkom  
CD99: Cluster of differentiation 99  
TET: Tet methylcytosine dioxygenase  
PAS: Periodic acid–Schiff  
FLI1: Friend leukemia virus integration 1  
İİA: İnce iğne aspirasyonu  
NHL: Non Hodgkin Lenfoma  
EBS: Ewing benzeri sarkom  
ERG: ETS related gene  
RNA: Ribo nükleik asit  
FEV: Fifth Ewing variant  
FUS: Fused in sarcoma  
TLS: Translocated in liposarcoma  
TAF15: TATA box binding protein (TBP)-associated factor  
POU5F1: POU class 5 homeobox 1

SMARCA: SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1

SP3: Sp3 transcription factor

ZNF278: Zinc finger protein 278

NFATC2: Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2

TP53: Tumor protein p53

RT: Radyoterapi

KT: Kemoterapi

FISH: Fluorescence in situ hybridization

PCR: Polymerase chain reaction

RT-PCR: Reverse transcriptase polymerase chain reaction

DKYHT: Desmoplastik küçük yuvarlak hücreli tümör

## ÖZET

# YUVARLAK HÜCRELİ SARKOMLARDA GÜNCEL KLİNİKOPATOLOJİK SINIFLAMA VE PROGNOSTİK ÖNEMİ

### AMAÇ

Küçük yuvarlak hücreli sarkomlar; tabakalar oluşturan, küçük, mavi, yuvarlak nükleuslu ve dar sitoplazmalı, az diferansiye tümör hücreleriyle karakterize heterojen bir grup olup, olguların çoğunu Ewing/PNET ailesi sarkomu (EAS) oluşturmaktadır. Ewing/PNET ailesi sarkomu, *EWSR1* geninin, ETS gen ailesinden bir transkripsiyon faktörüyle spesifik translokasyonu ve füzyonunu içerir. Son yıllarda daha önce Ewing/PNET ailesi sarkomu grubunda tanı alan fakat, *EWSR1* rearanjmanı göstermeyen indiferansiye yuvarlak hücreli sarkomlarda *CIC* ve *BCOR* rearanjmanı bildirilmiştir. Bu tümörlerde *CIC-DUX4/CIC-FOXO4* ve *BCOR-CCNB3* füzyonu saptanmış ve yeni antiteler olarak kabul edilmişlerdir. Çalışmamızda daha önce bölümümüzde Ewing/PNET ailesi sarkomu (EAS), atipik Ewing sarkomu, primitif nöroektodermal tümör (PNET), Askin tümörü, indiferansiye yuvarlak hücreli sarkom ve yuvarlak hücreli malign mezenkimal tümör tanısı alan vakaların morfolojik özelliklerini ayrıntılı olarak tanımlamayı, immunhistokimyasal yöntemle NKX2.2, WT1, ETV4, CCNB3 ve BCOR ile boyanma özelliklerine göre güncel bilgiler ışığında tekrar sınıflamayı ve bu sınıflamanın prognostik önemini göstermeyi amaçladık.

### MATERYAL VE METOT

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2000-2018 yılları arasında Ewing/PNET ailesi sarkomu, atipik Ewing sarkomu, PNET, Askin tümörü, indiferansiye yuvarlak hücreli sarkom ve yuvarlak hücreli malign mezenkimal tümör tanısı alan 134 vakanın morfolojik özellikleri tekrar değerlendirildi. İmmunhistokimyasal yöntemle NKX2.2, WT1, ETV4, CCNB3 ve BCOR çalışılarak, boyanma özelliklerine göre, güncel bilgiler ışığında tekrar sınıflandırıldı.

### BULGULAR

134 vakanın 59'u kadın (%44), 75'i erkekti (%56). Kadın/erkek oranı 1/1,27'ydi. Yaş ortalaması 19,8'di (0-56). 134 vakanın 88'i EAS, 9'u atipik Ewing sarkomu, 7'si PNET, 2'si Askin tümörü, 16'sı indiferansiye yuvarlak hücreli sarkom, 12'si yuvarlak hücreli malign

mezenkimal tümör olarak tanı almıştı. NKX2.2 ile 133 vakanın 103'ünde (%77,5) nükleer boyanma mevcuttu. WT1 ile 132 vakanın 4'ünde (%3) nükleer, 16'sında (%12,1) sitoplazmik boyanma izlendi. ETV4 ile 127 vakanın 37'sinde (%29,1); CCNB3 ile 125 vakanın 22'sinde (%17,6) nükleer boyanma mevcuttu. CCNB3 reaktivitesi gösteren vakaların 6'sında BCOR ile de pozitiflik saptandı.

Bu bulgularla NKX2.2 için nükleer boyanma gösteren 90 vaka EAS olarak yorumlandı.

NKX2.2 ile negatif olan veya fokal boyanma gösteren vakalar içinde; WT1 ve ETV4 ile nükleer boyanma gösteren 7 vaka CRS yönünde, BCOR ve CCNB3 ile nükleer boyanma gösteren 6 vaka BRS yönünde yorumlandı. NKX2.2 ile negatif olan veya fokal boyanan, EAS, CRS veya BRS için spesifik olabilecek boyanma göstermeyen 31 vaka mevcut immunhistokimya sonuçlarına göre sınıflandırılmadı.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Yuvarlak hücreli sarkomların uygun sınıflandırmasında, tümöre özgü genetik değişikliğin moleküler yöntemlerle gösterilmesi altın standarttır. İmmünohistokimyasal incelemenin tam sınıflamaya katkısı sınırlı olsa da, moleküler testler için referans edilecek hastaların seçiminde oldukça faydalıdır. NKX2.2 EAS tanısında, özellikle diğer antikorlarla birlikte kullanıldığında, sensitivite ve spesifitesi oldukça yüksek bir belirteçtir. ETV4 ile WT1 ve CCNB3 ile BCOR; EAS için sensitivitesi yüksek belirteçlerin veya *EWSR1* 'in negatif olduğu durumlarda, sırasıyla, *CIC* rearanjmanı gösteren sarkom (CRS) ve *BCOR* rearanjmanı gösteren sarkom (BRS) için sensitif bulunmuşlardır.

**Anahtar kelimeler:** küçük yuvarlak hücreli sarkomlar, Ewing sarkomu, *CIC*, *BCOR*, immunhistokimya

## ABSTRACT

### CONTEMPORARY CLINICOPATHOLOGICAL CLASSIFICATION OF ROUND CELL SARCOMA AND ITS PROGNOSTIC SIGNIFICANCE

#### OBJECTIVE:

Small round cell tumors are a heterogenous group, characterized by poorly differentiated tumor cells with small, round, blue nucleus and scant cytoplasm. Ewing sarcoma family of tumors (ESFT) constitutes the majority in this group. *EWSR1* gene rearrangement is characteristic for ESFT. Some tumors, formerly classified as ESFT, showing no rearrangement for *EWSR1* are found to have *CIC* and *BCOR* rearrangements and are accepted as new entities.

The aim of this study is to re-classify round cell sarcomas which were diagnosed as ESFT, atypical Ewing sarcoma, primitive neuroectodermal tumor, Askin tumor, undifferentiated small round cell sarcoma and round cell malignant mesenchymal tumor in our department, based on morphological and immunohistochemical staining patterns with NKX2.2, WT1, ETV4, CCNB3 and BCOR.

#### MATERIALS AND METHODS

134 cases, which were diagnosed as ESFT, atypical Ewing sarcoma, primitive neuroectodermal tumor, Askin tumor, undifferentiated small round cell sarcoma and round cell malignant mesenchymal tumor in our department between 2000-2018 were examined; both morphologically and immunohistochemically. The re-classification was made based on contemporary literature.

#### RESULTS AND CONCLUSIONS

134 cases are re-classified as; ESFT: 90 cases, *CIC* rearranged sarcoma: 7 cases, *BCOR* rearranged sarcoma: 6 cases and unclassified 31 cases. The utility of NKX2.2, WT1, ETV4, CCNB3 and BCOR immunohistochemistry is found to be highly effective.

**Keywords:** small round cell sarcomas, Ewing sarcoma, *CIC*, *BCOR*, immunohistochemistry

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Küçük yuvarlak hücreli sarkomlar; tabakalar oluşturan, küçük, mavi, yuvarlak nükleuslu ve dar sitoplazmalı, az diferansiye tümör hücreleriyle karakterize heterojen bir grup olup, olguların çoğunu Ewing/PNET ailesi sarkomu oluşturmaktadır. Ewing/PNET ailesi sarkomunda *EWSRI* ve *ETS* gen ailesinden bir transkripsiyon faktörünün translokasyonu sonucu oluşan *EWSRI* gen rearanjmanı tanımlanmıştır. EAS ile klinik ve histomorfolojik örtüşmeler gösterdiğinden EAS tanısı alan, ancak *EWSRI* rearanjmanı göstermeyen bir grup küçük yuvarlak hücreli sarkomda yakın zamanda yapılan moleküler çalışmalarda, bu grup içerisinde *CIC* rearanjmanı gösteren sarkomlar ve *BCOR* rearanjmanı gösteren sarkomlar tanımlanmıştır. Bu iki yeni antite, Ewing sarkomu ile yaş, yerleşim yeri benzerlikleri yanı sıra radyolojik ve histomorfolojik özellikler bakımından da örtüşmeler göstermektedir. Bu sebeple Ewing benzeri sarkom (EBS) olarak gruplandırılmışlardır. Yeni tanımlanan bu antitelerden *CIC* rearanjmanı gösteren sarkomlar, gruptaki *EWSRI* negatif tümörlerin 2/3'ünü oluşturur. Özellikle genç erişkinlerde görülen, yumuşak dokuya afinite gösteren bu tümörler; patolojik incelemede belirgin sitoplazmalı, hafif atipi gösteren, belirgin nükleollü tümöral hücrelerden oluşurlar. Miksoid ve desmoplastik stroma da içerebilirler. *BCOR* rearanjmanı gösteren sarkomlar ise yine bu gruptaki *EWSRI* negatif tümörlerin %4-12'sini oluştururlar. Sıklıkla kemikten kaynaklanırlar ve genç adölesan erkeklerde görülürler. Bu grup tümörlerin az bir kısmı gövde ve ekstremitelerdeki yumuşak dokulardan kaynaklanırlar. Monoton yuvarlak hücreli morfolojiye ek olarak işsi hücreli alanlar ve miksoid zemin de izlenebilir (1).

EAS'nin immunhistokimyasal olarak CD99 ile kuvvetli membranöz, NKX2.2 ve FLI1 ile kuvvetli nükleer; CRS'lerin WT1 ve ETV4 ile yaygın ve kuvvetli nükleer, CD99 ile fokalden difüze değişen oranlarda boyanma gösterdiği bildirilmiştir. NKX2.2 ekspresyonu da CRS'lerin %5'inde tanımlanmıştır. BRS'lerin ise BCOR ve CCNB3 ile difüz kuvvetli nükleer, CD99 ile değişen oranlarda boyanma gösterdiği, NKX2.2, ETV4 ve WT1 için ekspresyon göstermediği bildirilmiştir (1).

Her üç tümör benzer protokollerle tedavi edilseler de eskiden Ewing ailesi sarkomu olarak sınıflandırılan bu yeni antitelerin, Ewing ailesi sarkomu tedavi protokolüne dirençli olduğu görülmüştür. Bu sebeple küçük yuvarlak hücreli sarkomlara uygun sınıflandırma yapılması ve hedefe yönelik yeni tedavi modalitelerinin geliştirilmesi önemlidir.

Çalışmamızda İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2000-2018 yılları arasında küçük yuvarlak hücreli sarkom (EAS, PNET,



atipik Ewing sarkomu, Askin tümörü, indiferansiye yuvarlak hücreli sarkom, yuvarlak hücreli malign mezenkimal tümör) tanısı alan hastalara ait preparatları yeniden değerlendirerek morfolojik özelliklerini ayrıntılı olarak tanımlamayı, immunhistokimyasal yöntemle NKX2.2, ETV4, WT1, CCNB3 ve BCOR boyanma özelliklerine göre güncel bilgiler ışığında tekrar sınıflamayı ve bu sınıflamanın prognostik önemini göstermeyi amaçladık.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. EWİNG/PNET AİLESİ SARKOM

#### 2.1.1. TANIM

Ewing/PNET ailesi sarkom; Ewing sarkomu (ES), primitif nöroektodermal tümör (PNET) ve Askin tümörü gibi benzer morfolojik ve moleküler özellikleri taşıyan gruba verilen isimdir.

#### 2.1.2. TARİHÇE

Bu grubun en iyi bilinen üyesi olan Ewing sarkomu 1921 yılında, Dr. James Ewing tarafından “kemiğin difüz endotelyoması” adıyla ilk defa tanımlanmıştır. Mikroskopik incelemede geniş tabakalar yapan, soluk, belli belirsiz sitoplazmalı, hiperkromatik nükleuslu, küçük polihedral tümör hücreleriyle karakterize, osteojenik sarkom veya bilinen herhangi bir myelom tipini andırmayan 7 vakalık bir seri yayınlamıştır (2).

Aynı dönemde 1918 yılında Dr. Arthur Purdy Stout tarafından 42 yaşında erkek hastada ulnar sinirde rozet yapan, indiferansiye yuvarlak hücrelerden oluşan benzer bir tümör tanımlanmıştır (3). Daha sonra 1975 yılında Seemayer ve arkadaşları “periferik nöroektodermal tümör” adıyla yumuşak dokudan köken alan ve sinir sistemiyle ilişkisi olmayan yeni bir antite tanımlamışlardır (4).

1975 yılında Enzinger ve arkadaşları 39 vakalık ekstraskletal yerleşimli Ewing benzeri sarkom serisini yayınlamış ve o güne kadar kemik dışı yerleşimli Ewing sarkomu tanımlanmadığını bildirmişlerdir; ancak bu tümörlerin Ewing sarkomu ile aynı kökenden olduğunu veya aksini morfolojik, strüktürel veya ultrastrüktürel olarak kanıtlayamamışlardır (5). 1984 yılında Jaffe ve arkadaşları da Ewing sarkomu tanısı alan 4 olguluk seride rozet formasyonu oluşturan benzer tümörleri, kemik yerleşimli nöroektodermal tümörler olarak tanımlamışlardır (6).

1979 yılında Askin, torakopulmoner bölge yerleşimli, morfolojik olarak Ewing sarkomunu andıran, benzer özellikteki tümörlerin, çocuklarda ve genç adölesanlarda kendine özgü klinik özellikleri olması nedeniyle farklı bir antite olabileceğini öne sürmüştür (7).

Tarihsel süreçte; histomorfolojik olarak benzer şekilde küçük yuvarlak hücrelerden oluşan ve yer yer rozet formasyonu oluşturan bu tümörlerin hem yumuşak doku, hem kemik

lokalisasyonlarının tanımlanmasıyla farklı antiteler oldukları yönündeki düşünce gittikçe zayıflamıştır.

Yapılan sitogenetik çalışmalarda t(11;22)(q24;q12) translokasyonunun Ewing sarkomunda ve daha sonra PNET'te gösterilmesiyle bu tümörlerin altta yatan genetik özelliklerinin aynı olduğu anlaşılmıştır (8–10). 1991 yılında Ambros ve arkadaşlarının çalışmasında, CD99 antikoruyla hem Ewing sarkomunda hem PNET'te kuvvetli immunreaktivite saptanması ve bu olgularda moleküler olarak t(11;22)'nin de gösterilmesiyle, bu tümörlerin ortak genetik yolaktan geliştiği kanıtlanmış ve “Ewing tümörü” ortak terminolojisinin kullanılması önerilmiştir (11).

### 2.1.3. EPİDEMİYOLOJİ

EAS, primer malign kemik tümörlerinin yaklaşık %6 ile %8'ini oluşturmaktadır. Osteosarkom ve kondrosarkomdan sonra en sık görülen primer kemik sarkomu olması yanı sıra, çocuklarda ve genç erişkinlerde, yine osteosarkomdan sonra ikinci en sık görülen primer malign kemik tümörüdür. Vakaların yaklaşık %80'i 20 yaşın altındadır. 30 yaşından sonra görülme ihtimali oldukça düşüktür. Hafif erkek predominansı gösterilmiştir. Erkek/kadın oranı 1.4/1'dir. En sık yerleşim yeri, uzun kemiklerin diyafizi veya metafiz-diyafiz geçiştir. İskelet sisteminde en sık tutulan kemikler; uzun kemikler, bunların arasında ise sırasıyla femur, tibia, fibula ve humerustur. Ayrıca pelvis kemikleri, kostalar, kafatası, vertebra ve skapula gibi yassı kemiklerde de görülebildiği; %10-20 kadar vakanın ise ekstraskletal olduğu bildirilmiştir (Resim 1) (12).

Ekstraosseöz yerleşimli EAS hemen tüm lokalizasyonlarda görülebilmekle birlikte, sıklıkla ekstremitelerin derin yumuşak dokularından köken alır. Ekstremiteler içinde en sık uyluk bölgesi ve kalça yerleşimli olup, bunu kol ve omuz izler. Daha az görüldüğü yerler paravertebral yumuşak dokular ve göğüs duvarıdır (13).

### 2.1.4. ETYOLOJİ

TET gen ailesinden *EWSR1* ve ETS gen ailesinden bir transkripsiyon faktörünün translokasyonu sonucu oluşan *EWSR1* gen rearanjmanı tümörögenezi başlatan ana faktördür. *EWSR1-ETS* gen füzyonu sonucu kromatin remodeling ile oluşan protein ürünlerin sebep olduğu; hücre döngüsünde bozulma, apoptoz işlevlerinin bozulması gibi faktörlerin tümör oluşumuna yol açtığı öne sürülmektedir (14).

Ailesel yatkınlık veya çevresel faktörlerle ilişkisi tanımlanmamıştır. Sebebi bilinmemekle birlikte beyazlarda, özellikle de Kafkas ırkına ait bireylerde daha sık görülmektedir (13).

### **2.1.5. KLİNİK ÖZELLİKLER**

Uykudan uyandıran şiddette ağrı %96 ile en sık görülen semptomdur. Bunu şişlik, kitle oluşumu takip eder. Daha az sıklıkla görülen diğer semptomlar ateş ve anemidir. Patolojik kırık da ilk başvuru nedeni olabilmektedir. Periferik sinir veya spinal kord tutulumu varsa progresif sensörinöral nöropati izlenebilir. Katekolamin seviyeleri nöroblastomların aksine normal sınırlardadır. Ağrı, ateş gibi semptomların yanı sıra laboratuvar incelemede sedimentasyon hızı artışı da görülebilir ve bu durum; osteomyelit ile ayırıcı tanı gerektirir.

### **2.1.6. RADYOLOJİK BULGULAR**

Radyolojik bulgular EAS için nonspesifik, fakat tipiktir. Sıklıkla uzun kemiklerin diyafizinde, intramedüller yerleşimli, düzensiz sınırlı, permeatif lezyon karakteristiktir. Lezyonların çoğu litiktir; fokal sklerotik alanlar eşlik edebilir. Sıklıkla soğan zarı tarzında periost reaksiyonu ve yumuşak dokuda tutulum eşlik eder. Tümörün subperiosteal alanda ve yumuşak dokuda lezyon oluşturup korteksin dış yüzüne baskı yapmasıyla bu alanda konkav bir lezyon meydana gelir ki buna “sauzerization” denmektedir. Komşu kortikal kemikte difüz skleroz ve kalınlaşma görülmektedir (13).

### **2.1.7. MAKROSKOPİ**

İntraosseöz Ewing/PNET ailesi sarkomları sıklıkla intramedüller yerleşimli, gri-beyaz renkli, infiltratif sınırlıdır. Tümörde hemorajik alanlar yanı sıra sarı renkli nekrotik alanlar da görülebilir. Medüller kavite yerleşimli büyük lezyonlarda dahi kortikal permeasyon, sadece fokal alanlarda izlenebilir. Erken dönemde eşlik eden yumuşak doku tutulumu çoğu EAS’de görülen bir bulgudur. Sıklıkla ekstraosseöz komponentin çapının intraosseöz komponentin çapını aştığı da görülmüştür (13).

Ekstraosseöz yerleşimli Ewing sarkomları genellikle multilobüle, yumuşak kıvamlı kitlelerle karakterizedir. Kesit yüzü gri-sarı renkli olup, geniş nekroz alanları, kanama ve kistik değişiklikler görülebilmektedir. Kalsifikasyon nadirdir. Nadiren yumuşak doku kaynaklı tümörlerde büyük periferik sinirlerle ilişki gösterilebilir (Resim 2) (15).

### **2.1.8. HİSTOPATOLOJİ VE SINIFLANDIRMA**

Daha önceden farklı antiteler olarak kabul edilen ES, PNET ve Askin tümöründe ortak sitogenetik anomalinin gösterilmesinden sonra bu tümörler, aynı tümör ailesinin farklı histolojik ve klinik spektrumları olarak kabul görmeye başlamış ve bu tümör ailesi 'Ewing/PNET ailesi sarkomu' olarak isimlendirilmiştir.

### **2.1.9. EWİNG/PNET AİLESİ SARKOMU**

Klasik Ewing sarkomu, indiferansiye mezenkimal hücrelerin homojen, monoton proliferasyonu sonucu gelişir. Histomorfolojik olarak solid, sıkı tabakalar oluşturan ve nest büyüme paterni gösteren; küçük, yuvarlak, monoton görünümlü tümör hücreleriyle karakterizedir. Bu hücreler yuvarlak veya oval, santral yerleşimli nükleus içerirler. Nükleer membran belirgindir. Nükleer kromatin ince granüler nitelikte olup bir veya iki belli belirsiz nükleol görülebilir. Sitoplazma belirsizdir veya nükleus çevresinde soluk, ince rim halinde görülebilir. Çoğu vakada sitoplazma intrasellüler glikojen depozitlerine bağlı olarak irregüler, vakuollü veya berrak görünümde olabilir. Glikojen vakuolleri çekirdeği kenara itebilir veya çetikli görünmesine yol açabilir. Histokimyasal Periodic asit-Schiff (PAS) boyasıyla intrasitoplazmik glikojen birikiminin gösterilmesi tanı için yardımcıdır (Resim 3) (13).

Bu tümörlerde bifazik patern olarak tanımlanan iki farklı hücre tipinin varlığı sık görülen bir bulgudur. Bunlar koyu hücreler ve açık hücreler olarak tarif edilen, iki hücre popülasyonunun değişen oranlarda bulunması olarak tarif edilmektedir. Koyu hücreler; koyu, kondanse nükleusları olan, apoptoza giden hücrelerdir ve canlı hücrelerle nekroz alanı arasında yer alırlar. Açık hücreler ise, kromatin yapısı açık olan canlı hücreleri temsil etmektedir (13).

Tümör hücreleri rozet yapıları oluşturabilir. Bu yapılar sıklıkla, tümörün %20'sinden azını oluşturur. Bazı yazarlar, histomorfolojik incelemede, %20'den fazla rozet yapısı görülürse PNET tanısının verilmesi gerektiğini erken dönem sınıflamasında öne sürmüşlerdir (13).

Tümöre eşlik eden fokal iğsi hücreli alanların varlığı da beklenen bir bulgudur. Genel olarak solid ve nest büyüme paterni gösteren bu tümörlerde, kordoid veya trabeküler büyüme paternleri de görülebilir.

Nekroz sık görülen bir bulgudur. Fokal olabileceği gibi, geniş geografik nekroz alanları şeklinde de görülebilir. Yaygın nekroz alanları içinde perivasküler alanda korunmuş tümör hücrelerinin varlığı da bir diğer bulgudur (15).

Mitoz sayısı oldukça değişkendir. Klasik ES’de genelde seyrek mitoz görülmekle birlikte, mitozun belirgin olduğu vakalar da mevcuttur.

Ewing sarkomunun bir diğer bulgusu da enflamatuvar hücre infiltrasyonunun bulunmayışı ve stromal elemanların azlığıdır. Vasküler yapılar genellikle belirgin değildir ve yarık benzeri ince duvarlı kapillerler şeklindedir.

İntraosseöz yerleşimli vakalarda tümör hücreleri, medüller-intertrabeküler mesafeyi doldurarak normal kemik iliğinin yerini alırlar. Daha sonra kortekste permeatif yayılım yaparak subperiosteal mesafeye ulaşırlar. Periostun zarar görmesiyle bu alanda, radyolojik olarak soğan zarı görünümüne sebep olan tabakalı yeni kemik yapımı başlar. Yeni kemik yapımı olan alanlarda tümör hücreleri yanı sıra reaktif osteoblastlar, multinükleer osteoklast benzeri dev hücreler ve kondroid metaplazi alanları bulunabilir. Tümör; yumuşak dokuya çıktığında ise çizgili kas, kollajen lifler ve stromal elemanlar arasında yine infiltratif, ancak dağınık bir büyüme paterni gösterir (13).

Ekstraosseöz tümörlerde sıklıkla solid ve lobüler büyüme paterni hakimdir. Nadiren ayrışmalara veya hemorajiye sekonder psödoalveoler veya psödovasküler patern görülebilmektedir. Bu da anjiosarkom veya alveolar rabdomyosarkom yanığına yol açabilir (15).

Morfolojik olarak klasik Ewing sarkomunda görülen küçük, monoton, yuvarlak hücrelerden farklı olarak; daha büyük, düzensiz nükleer konturlu, veziküler kromatinli, belirgin nükleollü, yer yer epitelooid görünümde hücrelerden oluşan diğer bir varyant “atipik Ewing sarkomu” veya bazı yayınlarda “büyük hücreli varyant Ewing sarkomu” adıyla; ilk olarak Lombart-Bosch ve arkadaşları tarafından 1978 yılında tanımlanmıştır (16–18). Tümöral hücreler sitoplazmalarında değişen oranda glikojen içerebilir ve tümör içinde iğsi hücreli alanlar bulunabilir (Resim 4).

Literatürde 415 genetik olarak konfirme EAS vakasında histolojik tiplendirme amaçlı yapılan bir çalışmada atipik ES sıklığı yaklaşık %8 oranında saptanmıştır (17).

Adamantinoma benzeri varyant, EAS içerisindeki histolojik varyantlardan kabul edilmektedir. Belirgin nest yapısı ve epitelooid büyüme paternine eşlik eden belirgin desmoplazi, bu varyantı Ewing ailesi sarkomunun diğer histolojik varyantlarından ayıran en belirgin özelliğidir. Nest yapılarını oluşturan tümör hücreleri büyük büyütmede incelendiğinde belirgin periferik palizatlanma gösterirler. Tümör hücreleri arasında desmozom görülebilir. Arada

büyük, poligonal, hiperkromatik nükleuslu hücrelerle, nadiren, skuamöz inciler de tümöre eşlik edebilir (Resim 5).

Adamantinoma benzeri alanlar içeren EAS vakaları çeşitli yayınlarda tarif edilmekle birlikte, bu varyantta *EWS-FLII* füzyonunun varlığı ilk kez Bridge ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (19). Folpe ve arkadaşlarının, genetik olarak konfirme 66 EAS vakasında histolojik tiplendirme amaçlı yaptıkları bir çalışmada adamantinoma benzeri EAS sıklığı yaklaşık %5 oranında saptanmıştır (18).

İğsi hücre baskınlığıyla karakterize iğsi hücreli sarkom benzeri-EAS ve yaygın hyalinize eozinofilik matriks içeren sklerozan EAS gibi nadir histolojik varyantlar da tarif edilmiştir (18).

EAS içerisinde, özellikle son 15 yılda yapılan çalışmalar göstermiştir ki Ewing sarkomu ve periferik PNET aynı spektrumdaki neoplazilerdir. Klasik ve tarihsel tanımlamalarda ES ile PNET ayrımı, psödorozet yapılarının varlığı ve ultrastrüktürel veya immünohistokimyasal olarak nöroektodermal özelliklerin gösterilmesi ile yapılmıştı. Ancak her iki tümörün de aynı genetik temele sahip olduğunun gösterilmesi ve doku kültüründe her iki tümörün de nöroektodermal farklılaşma gösterdiğinin ispatlanması üzerine bu ayrım terkedildi (13).

Askin tümörü de EAS ile aynı morfolojik ve genetik özellikleri gösterir. Günümüzde Ewing ailesi sarkomlarının torakopulmoner bölge yerleşimli bir varyantı olarak kabul edilmektedirler.

#### **2.1.10. SİTOPATOLOJİ**

İlk tanı için ince iğne aspirasyonu (İİA) oldukça yardımcıdır. İİA'nın başta kromatin detayı olmak üzere hücresel özelliklerin tanınmasına olanak vermesi sebebiyle, çoğu klinisyen tarafından küçük biyopsilerden daha çok tercih edilmektedir. Sitopatolojik incelemede yaymalar oldukça sellüler olup, dağınık halde bulunan, monoton görümlü küçük yuvarlak hücrelerden oluşmaktadır. Santral yerleşimli, ince granüler kromatinli nükleusları ve yer yer seçilebilen ince rim şeklinde sitoplazmaları bulunmaktadır. Yaymalarda yer yer rozet benzeri yapılar da görülebilmektedir (13).

#### **2.1.11. İMMÜNFENOTİP**

EAS tanısı uzun yıllar boyunca çeşitli immünohistokimyasal belirteçlere dayanılarak verilen bir dışlama tanısı idi. Daha sonra *MIC2* gen ürünlerinin bu tümörlerde pozitif bulunmasıyla kullanımı gittikçe yaygınlaştı ve tanı için kilit rol oynamaya başladı (20). *MIC2*, X ve Y kromozomlarının kısa kolunda yer alan psödo-otozomal bir gendir. *MIC2* geni 30-

kD'luk hücre adezyon-membran glikoproteinini (CD99) kodlamaktadır. CD99, T hücre adezyonundaki göreviyle de bilinmektedir. EAS'de yaklaşık %90 oranında pozitiflik mevcuttur. EAS için oldukça spesifik olduğu düşünülen bu immunhistokimyasal belirtecin, zamanla diğer pek çok küçük yuvarlak hücreli tümörde de değişen oranlarda reaktivite gösterdiği görüldü. Lenfoblastik lenfomaların %90'ından fazlasında, az diferansiye sinoviyal sarkomların %75'inden fazlasında, mezenkimal kondrosarkomların %50'sinde, rabdomyosarkomların %20-25'inde, küçük hücreli osteosarkomlarda ve desmoplastik küçük yuvarlak hücreli tümörde de nadir olarak pozitiflik göstermektedir. Bunun dışında soliter fibröz tümörde, mezotelyomada, leiomyosarkomda ve indiferansiye pleomorfik sarkomda da pozitiflik bildirilmiştir (15).

EAS'lerin çoğu immunhistokimyasal incelemede nöron spesifik enolaz, CD57, S100 protein, sinaptofizin ve PGP9.5 gibi nöral belirteçlerle de pozitif reaktivite göstermektedir. Bu belirteçlerle PNET morfolojisinde tümörlerin ES'ye oranla daha yüksek oranda pozitiflik göstermesi beklenen bir bulgudur (15).

Sitokeratin ekspresyonları da EAS'de gösterilmiştir. Daha çok AE1/AE3 ile fokal, dot-like boyanma paterni görülmektedir. Adamantinoma benzeri varyant EAS'de ise, klasik varyant ES'nin aksine, AE1/AE3 ile kuvvetli difüz boyanma ve HMWCK ile fokal boyanma görülmektedir (18).

Ayrıca vimentin ile yüksek oranda sitoplazmik pozitif boyanma da bu ailenin bir diğer özelliğidir.

EAS'ye spesifik t(11;22) translokasyonu sonucu oluşan *EWSR1-FLI1* gen füzyonu ve bu füzyonun uzantısı olarak FLI1 proteini overekspresyonu vakaların çoğunda görülmektedir. Buradan hareketle, FLI1 antikoru EAS tanısında kullanılmaya başlanmıştır (21). Sensitivitesi CD99'a göre daha düşük olan bu antikorun da ayırıcı tanıda güçlük yaratan diğer küçük yuvarlak hücreli tümörlerde pozitif boyanabildiği gösterilmiştir. Non-Hodgkin lenfomada %80, olfaktör nöroblastomda ve desmoplastik küçük yuvarlak hücreli tümörde %66, az diferansiye sinoviyal sarkomda %50, rabdomyosarkomda %7, akciğerin küçük hücreli karsinomunda %6 oranında boyanma bildirilmiştir (22,23).

Yakın zamanda EAS tanısında yardımcı olacak yeni bir immunhistokimyasal belirteç; NKX2.2 tanımlanmıştır. NKX2.2, nöronal gelişim ve glial/nöroendokrin diferansiyasyonda rol alan bir transkripsiyon faktörüdür (24,25). *NKX2.2* geninin, *EWSR1-FLI1* füzyon proteininin hedef geni olduğu ve EAS'deki ekspresyonuna rağmen diğer sarkomlarda negatif olduğu



saptanmıştır (26). NKX2.2 proteininin de EAS tümörögenezinde önemli rolü olduğu gösterilmiştir (26). Bunun üzerine NKX2.2'nin diyagnostik yararlılığını saptamaya yönelik yapılan ilk çalışmada Yoshida ve arkadaşları, 30 adet genetik olarak konfirme EAS'de %93 oranında difüz, nükleer, orta-kuvvetli yoğunlukta pozitif boyanma saptamıştır. Bununla birlikte EAS ile ayırıcı tanıda zorluk yaratan 130 adet küçük yuvarlak hücreli tümör vakasında %89 oranında negatiflik saptamıştır ve CD99, FLI1 gibi diğer immunhistokimyasal belirteçlerle birlikte kullanıldığında sensitivite ve spesifitesini oldukça yüksek bulmuştur (27). Hung ve arkadaşları klasik ES yanı sıra; atipik Ewing sarkomları, CRS ve BRS'de NKX2.2 ekspresyonunu araştırmışlar; 40 EAS vakasında Yoshida'nın çalışmasına benzer şekilde %93 oranında pozitiflik saptamışlardır. 20 CRS olgusunda bu belirteç ile reaktivite oranı %5 iken, 5 BRS olgusunun hiçbirinde boyanma saptamamışlardır. Bu çalışma sonucunda NKX2.2'nin; özellikle EAS'nin, CRS ve BRS'den ayırımında spesifitesi oldukça yüksek bir immünhistokimyasal belirteç olduğunu öne sürmüşlerdir (1). NKX2.2'nin literatürde sensitivitesi %80, spesifitesi %84 olarak bildirilmekle birlikte, CD99'la beraber kullanıldığında spesifitesi %98'e ulaşmaktadır (28).

EAS ile ayırıcı tanıda güçlük yaratan diğer yuvarlak hücreli sarkomlar ve *EWSR1* rearanjmanı gösteren sarkomlarda NKX2.2 ile yüksek oranlarda negatiflik saptanırken, olfaktör nöroblastom, mezenkimal kondrosarkom ve küçük hücreli karsinom vakalarının bir kısmında zayıf-orta yoğunlukta pozitiflik saptanmıştır (1,27).

### **2.1.12. GENETİK**

Moleküler düzeyde yapılan incelemelerde Ewing sarkomunun patogenezinde en sık *EWSR1* olmak üzere, TET ailesinden bir gen ile; en sık *FLI1* olmak üzere ETS ailesinden başka bir genin füzyonunun olduğu gösterilmiştir. 22q12.2 kromozomunda yer alan *EWSR1* geni ile 11q24.3'te yer alan *FLI1* geninin füzyonu sonucu oluşan ve t(11;22)(q24,q12) translokasyonu ile sonuçlanan *EWSR1* gen rearanjmanı vakaların yaklaşık %85'inde mevcuttur (29).

ETS transkripsiyon faktörleri hücre siklusunda ve tümör gelişiminde önemli role sahiptir. Bu gen ailesinin en iyi bilinen üyeleri *FLI1*, *ERG*, *ETV1* ve *ETV4*'tür. ETS ailesinden en sık görülen transkripsiyon partneri *FLI1*'dir (9,30,31). *EWSR1* proteini RNA bağlayan proteindir. Transkripsiyonun başlatılmasında önemli rol oynar. *EWSR1-FLI1* füzyon proteini nöral krest gelişimi ve EAS'de tümörögenezden sorumludur (32,33).

*FLII*'den sonra ikinci sıklıkla görülen ETS ailesi translokasyon partneri *ERG*'dir. Vakaların yaklaşık %10'unda görülür. t(21;22)(q22;q12) sonucu *EWSR1-ERG* füzyonu oluşur (34,35). *ERG* geni; hücre fizyolojisinde, embriyolojik gelişimin düzenlenmesinde, hücre proliferasyonunda, diferansiyasyonunda, angiogenezde, inflamasyonda ve apoptozda önemli rol oynar. EAS gelişimindeki etkisi ise *FLII* ile benzerdir. Bunun dışında çok sayıda ETS ailesi translokasyon partneri de tanımlanmıştır: *EWSR1* ile *ETV1*, *ETV4*, *FEV* (36–39).

Ayrıca *FUS-ERG*, *FUS-FEV* translokasyonları da gösterilmiştir (40,41). *FUS* geni; *TLS*, *EWSR1* ve *TAF15* genlerini de içeren TET gen ailesinin bir üyesi olup, *EWSR1* ile benzer aminoasit dizisine sahiptir.

Yakın zamanda *EWSR1* ile ETS ailesi dışı genlerle olan translokasyonlar da tanımlanmıştır. *EWSR1* ile *POU5F1*, *ZGS*, *SMARCA*, *SP3*, *ZNF278*, *NFATC2* literatürde tanımlanan örneklerdir (42–46). Henüz tartışmalı bir konu olmakla birlikte bu translokasyonların görüldüğü tümörler Ewing-benzeri sarkomlar olarak kabul edilmektedir.

EAS ve EBS'de görülen translokasyonların listesi Tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 1. EAS ve EBS'de görülen translokasyonlar (47)**

EAS'de sık görülen translokasyonlar		EBS'de sık görülen translokasyonlar	
<i>EWSR1-FLI1</i>	t(11;22)(q24;q12)	<i>EWSR1-NFATC2</i>	t(20;22)(q13;q12)
<i>EWSR1-ERG</i>	t(21;22)(q22;q12)	<i>EWSR1-POU5F1</i>	t(6;22)(p21;q12)
<i>EWSR1-ETV1</i>	t(7;22)(p22;q12)	<i>EWSR1-SMARCA5</i>	t(4;22)(q31;q12)
<i>EWSR1-ETV4</i>	t(17;22)(q21;q12)	<i>EWSR1-PATZ</i>	t(1;22)(p36.1;q12)
<i>EWSR1-FEV</i>	t(2;22)(q35;q12)	<i>EWSR1-SP3</i>	t(2;22)(q31;q12)
<i>FUS-ERG</i>	t(16;21)(p11;q22)	<i>CIC-DUX</i>	t(4;19)(q35;q13)
<i>FUS-FEV</i>	t(2;16)(q35;p11)	<i>BCOR-CCNB3</i>	inv(X)(p11.4p11.22)

Translokasyonlara ilaveten sekonder sitogenetik anomaliler de görülebilmektedir: Trizomi 8, trizomi 12, t(1;16) sonucu 1q kazanımı, 16q kaybı en iyi bilinen örneklerdir. Sensitivitesi ve spesifitesi düşük olmakla birlikte prognostik önemi olduğu vurgulanmaktadır (48,49).

*TP53* ve *P16/P14ARF* alterasyonları da EAS vakalarının %25'inden fazlasında saptanmış olup; agresif klinik seyir ve terapiye dirençle ilişkilendirilmiştir (50).

### 2.1.13. PROGNOZ

EAS grubu tümörler oldukça agresif tümörlerdir. Lokal nüks ve uzak metastaz riskleri yüksektir. Tedavide kemoterapinin yer almadığı dönemde 5 yıllık sağkalım oranı %20'den

düşükken, lokalize hastalık durumunda; cerrahi, radyoterapi ve kemoterapiyi içeren güncel tedavi planlarıyla bu oran %70'e ulaşmıştır. Tanı anında yaygın hastalık varlığı durumunda ise oran %30'a düşmektedir (13). Tanı anında metastaz olması, büyük tümör çapı, geniş nekroz alanlarının bulunması, santral yerleşimli tümörler ve kemoterapiye kötü yanıt vermesi ana prognostik faktörlerdir (15). Kemoterapi sonrası tümör nekrozu oranı da prognostik öneme sahiptir. Çeşitli moleküler özelliklerin de prognostik önemi olduğu gösterilmiştir. Trizomi 8, trizomi 12, t(1;16), TP53 ve P16/P14ARF alterasyonları bunlara örnektir (48–50).

#### **2.1.14. TANI**

Tanı için altın standart; histomorfolojik inceleme ve immünohistokimyasal çalışmaların yanısıra, FISH ve PCR ile spesifik translokasyonların gösterilmesidir. Ancak genetik yöntemlerin ulaşılabilirliği zor ve maliyeti yüksek olduğu için tanıya varmada yardımcı yöntemlerden en sık immünohistokimyasal çalışmalar kullanılmaktadır. Bu nedenle sensitivite ve spesifitesi yüksek belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır.

### **2.2. CIC REARANJMANI GÖSTEREN SARKOMLAR**

#### **2.2.1. TANIM**

Küçük yuvarlak hücreli sarkomların bir grubunun *EWSR1* gen rearanjmanı içermediği görülmüş, bunun üzerine bu grubun sitogenetik özelliklerini tanımlamak için yapılan çalışmalarda t(4;19)(q35;q13) veya t(10;19)(q26;q13) sonucu oluşan *CIC-DUX4* veya t(X;19)(q13;q13.3) sonucu oluşan *CIC-FOXO4* füzyonu gösterilmiştir (51–54). *CIC* rearanjmanı gösteren sarkomlar, EAS ile benzer morfolojik ve klinik özellikler gösterirler. Bu nedenle; *EWSR1* dışı rearanjman gösteren EAS grubunda kabul edilmeleri veya yeni bir antite olup olmadıkları konusu tartışmalıdır. Ayrı bir antite olarak kabul edilmesi gerektiğini savunan yayınlar olduğu gibi, 2013 yılında yayınlanan son kemik ve yumuşak doku WHO klasifikasyonunda, indifferansiye/sınıflandırılmayan sarkomlar başlığı altında ele alınmaktadır (55).

#### **2.2.2. TARİHÇE**

1996 yılında Richkind ve arkadaşları, 12 yaşında erkek çocuğunda alt ekstremitte yumuşak doku yerleşimli, morfolojik ve immünohistokimyasal inceleme sonucu herhangi bir yöne diferansiyasyon göstermeyen tümörde t(4;19) translokasyonunu göstermiştir (56). Daha sonra 2006 yılında Kawamura-Saito ve arkadaşları, omuz ve pelvik bölgede, yumuşak doku yerleşimli, t(4;19) translokasyonu gösteren iki Ewing-benzeri sarkom vakası yayınlamıştır (52).

2012 yılında Italiano ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *EWSR1* negatif küçük yuvarlak hücreli sarkom morfolojisinde 22 adet vakaya genetik analiz (FISH ve PCR) yapılmıştır. Çalışma sonucunda 22 vakanın 15'inde (%68) *CIC* rearanjmanı saptanmıştır. Aynı çalışmada  $t(4;19)$  ile birlikte  $t(10;19)$  translokasyonu da *CIC-DUX* füzyonuyla ilişkilendirilmiştir (51). Benzer şekilde, Specht ve arkadaşlarının çalışmasında 33 *EWSR1* negatif küçük yuvarlak hücreli sarkom vakasında FISH yöntemiyle 21 vakada (%64) *CIC* rearanjmanı saptanmıştır (57).

### 2.2.3. EPİDEMİYOLOJİ

*CIC* rearanjmanı gösteren sarkomlar, *EWSR1* negatif tümörlerin 2/3'ünü oluşturmaktadırlar. Vakaların ortalama yaşı, farklı çalışmalarda, 24 ile 32 arasında değişmektedir. Çoğunlukla hafif erkek baskınlığından bahsedilmekle birlikte, kadınların daha sık etkilendiği seriler de bildirilmiştir. Özellikle gövde ve ekstremitelerde olmak üzere yumuşak doku en sık yerleşim yeridir (51,57,58). Daha az sıklıkla baş-boyun, retroperiton, pelvik ve intraabdominal yerleşim de bildirilmiştir (58).

### 2.2.4. ETYOLOJİ

$t(4;19)(q35;q13)$  veya  $t(10;19)(q26;q13)$  sonucu oluşan *CIC-DUX4* füzyonu ve bunun sonucunda oluşan *CIC* rearanjmanı etyolojiden sorumludur (51–53).

### 2.2.5. HİSTOPATOLOJİ

Morfolojik incelemede, difüz infiltratif veya belli belirsiz nodülerite/lobülasyon gösteren tümöral infiltrasyon mevcuttur. Nodüleritenin izlendiği alanlarda, yer yer nodüllerin periferinde ve nodülleri çevreleyen desmoplastik stroma dikkati çekmektedir. Tümörü oluşturan hücreler küçük-orta boyutlu, yuvarlak veya oval hücrelerle karakterizedir. Fokal ancak belirgin pleomorfizm de görülebilir. %5'ten %20'ye değişen oranlarda iğsi hücreli alanlar izlenebilir. Plazmasitoid-rabdoid morfoloji de eşlik edebilmektedir. Nadiren rozet benzeri morfoloji bildirilmiştir. Miksoid, ödematöz stromal değişiklikler ve mikrokistik alanlar da eşlik eden diğer bulgulardır (51,57–59)

Sitoplazma, çoğu vakada izlenmemekle birlikte seçilebilen vakalarda amfofilik, soluk veya berraktır. Nükleer özellikler değişkendir. Kromatin ince, hiperkromatik veya veziküler olabilir. Nükleol görülebilir. Geniş serilerde vakaların çoğunda monoton morfoloji tarif edilmiştir. Geografik nekrozlar, arada görülen apoptotik hücrelerle karakterize yıldızlı gökyüzü manzarası veya arada dağılmış piknotik koyu hücreler görülmesi yaygın bir özelliktir. Mitoz sıklıkla yüksektir (57,58).

## 2.2.6. İMMÜNFENOTİP

Yakın zamanda CRS'de yapılan gen ekspresyon profili çalışmalarında *WT1* ve *ETV4*, *ETV5*, *ETV1* up-regülasyonu saptanmıştır (51,57). *ETV4* (ETS varyant 4), ETS transkripsiyon faktör ailesinin bir üyesi olup, erken embriyogenezin düzenlenmesinde rolü vardır (60). *WT1*, 11. kromozomda yer alan tümör supresör genidir ve ürogenital sistemin gelişiminde önemlidir. Hung ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 40 CRS'de; immünohistokimyasal incelemede *ETV4*, vakaların %90'ında difüz kuvvetli-orta yoğunlukta, *WT1* ise %95'inde kuvvetli nükleer boyanma göstermiştir. Çalışmanın sonucunda *ETV4*'ün sensitivitesi %90, spesifisitesi %95 saptanırken; *WT1*'in sensitivitesi %95, spesifisitesi %81 saptanmıştır (60). Antonescu ve arkadaşlarının yaptığı 115 vakalık seride 65 vakanın 48'inde (%74) difüz nükleer *WT1* ekspresyonu görülürken 12'sinde (%18) fokal/multifokal pozitiflik görülmüştür (58)

*CIC*, santral sinir sisteminin normal gelişiminde rol alan bir gen olup; *CIC-DUX4*'ün anormal füzyonu bu genin aktivitesinde artma ile sonuçlanır. Bu genle ilgili normal dışı davranış paterni, medülloblastomda da bildirilmiştir (14).

*DUX4* geni double-homeobox transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır. *DUX4* proteini fetal iskelet kası gelişiminde rol alır, ayrıca normal testis dokusunda bulunur. Siegele ve arkadaşlarının 5 vakalık genetik olarak konfirme CRS serisinde, vakaların tümünde *DUX4* ile kuvvetli nükleer boyanma görülmüş, EAS'de ve diğer yuvarlak hücreli tümörlerde boyanma saptanmamıştır. Sensitivitesi ve spesifisitesi %100 olarak belirtilmiştir (61).

CD99 ile bu tümörlerde değişen oranlarda pozitiflik bildirilmiştir: Çeşitli serilerde vakaların %65'inde difüz, %35'inde zayıf yamalı (51), %86'sında fokal yamalı (57), fokal heterojen (59) gibi değişen yoğunluk ve oranlarda boyanmalar tarif edilmektedir. Yine Antonescu ve arkadaşlarının yaptığı 115 vakalık seride CD99 reaktivitesi vakaların %84'ünde görülmekle birlikte, yalnızca %23'ünde difüz boyanma görülmüştür. Diğer vakalarda ise fokal/multifokal boyanmalar görülmüştür (58).

FLI1 ile bir çalışmada vakaların hepsinde (n: 9) kuvvetli nükleer boyanma görülmüştür (57).

NKX2.2 ile 20 vakalık bir seride 1 vakada (%5) orta yoğunlukta boyanma belirtilmiş, 9 vakalık bir seride ise vakaların hiçbirinde boyanma görülmemiştir (1,62).

### 2.2.7. GENETİK

t(4;19)(q35;q13) veya t(10;19)(q26;q13) sonucu oluşan *CIC-DUX4* füzyonu veya t(X;19)(q13;q13.3) tanımlanmıştır (51–53).

Yapılan gen ekspresyon profili çalışmalarında en sık up-regülasyonu görülen genler olarak *CRF* ve *VGF* saptanmıştır. İkinci sıklıkla da *WT1* ve *ETV4*, *ETV5*, *ETV1* up-regülasyonu saptanmıştır (51,57). Gen ekspresyon profilinin EAS ile farklılık gösterdiği de belirtilmiştir (57).

### 2.2.8. PROGNOZ

CRS vakalarının prognoz verileri değerlendirildiğinde; Antonescu ve arkadaşlarının serisinde 115 CRS'nin 52'sinde tedavi bilgisine ulaşılabilmiş ve bu hastaların %90'ından fazlasının standart EAS kemoterapi rejimi gördüğü ifade edilmiştir. Bu hastaların sağkalımı, lokal hastalık olarak kabul edilen hastalarda, benzer yaş ve evredeki EAS hastalarıyla kıyaslandığında, ortalama sağkalım CRS hastalarında anlamlı derecede düşük bulunmuştur. EAS hastalarında 2 yıllık sağkalım %82, 5 yıllık sağkalım %76 iken; CRS hastalarında 2 yıllık sağkalım %59, 5 yıllık sağkalım %49 bildirilmiştir. Ayrıca hastaların metastaz oranının oldukça yüksek (%53) olduğunu ve EAS tanıli hastalarla aynı rejimi alan hastaların %70 gibi büyük çoğunluğunda standart kemoterapiye kötü patolojik yanıt verdiğini göstermişlerdir (58). Yoshida ve arkadaşlarının 20 vakalık serilerinde de EAS'nin ortalama sağkalımının CRS'ye oranla daha yüksek olduğu, CRS vakalarının EAS tedavi rejimine kötü yanıt verdikleri ve tanı anında metastaz oranlarının daha yüksek olduğu gösterilmiştir (59).

Owosho ve arkadaşlarının yaptığı baş-boyun yerleşimli EAS ve CRS'leri kıyaslayan bir çalışmada EAS ve CRS'lerin 2 yıllık sağkalımları sırayla %100 ve %78 olarak bildirilmiştir. Fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Hem EAS hem CRS'lerde baş-boyun yerleşimli olanların, diğer anatomik lokalizasyonlara göre daha iyi gidişli olduğu da saptanmıştır (63).

CRS'ler günümüzde EAS ile benzer protokolle tedavi edilmekte olsalar da bu tedavi protokollerine kötü yanıt vermekte ve agresif gidiş göstermektedirler.

### 2.2.9. TANI

CRS, EAS ile örtüşen morfolojik ve klinik özelliklerin yanı sıra, yeni tanımlanan bir antite olması sebebiyle yuvarlak hücreli sarkomların ayırıcı tanısında güçlük yaratmaktadır. *EWSR1* rearanjmanının negatif olduğu durumlarda, ayırıcı tanıya alınması gereken önemli bir antitedir.

Ancak moleküler incelemenin çoğu merkez için hala ulaşılabilir olmaktan uzak olması, bu nadir ve farkındalık gerektiren antitenin tanısı için önemli engellerdendir. Tanı için uygun klinik, radyolojik, patolojik korelasyon kilit noktalardan olsa da altın standart EAS'de olduğu gibi sitogenetik özelliklerin gösterilmesidir.

### **2.3. BCOR REARANJMANI GÖSTEREN SARKOMLAR**

#### **2.3.1. TANIM**

Morfolojik olarak Ewing sarkomuna benzeyen, fakat *EWSRI* rearanjmanı göstermeyen bir diğer küçük yuvarlak hücreli sarkom grubunda, X kromozomunun inversiyonundan kaynaklanan *BCOR-CCNB3* füzyonu tanımlanmıştır (64). BRS'ler de, CRS'ler gibi, güncel WHO sınıflamasında indiferansiye yuvarlak hücreli sarkomlar grubu altında değerlendirilmektedir (55).

#### **2.3.2. TARİHÇE**

2012 yılında Pierron ve arkadaşları, küçük yuvarlak hücreli sarkomlarda yeni gen füzyonlarını araştırmak amaçlı yaptıkları çalışmada, Ewing sarkom morfolojisinde fakat *EWSRI* rearanjmanı göstermeyen 4 vakaya RNA sekanslama uygulamışlardır. Çalışma sonucunda vakaların 1'inde *BCOR-CCNB3* füzyonunu göstermişlerdir. Daha sonra bu füzyonun sıklığını saptamak amaçlı, spesifik translokasyonu göstermeyen 594 adet sarkomda füzyon spesifik RT-PCR çalışmışlar ve 24 vakada daha bu füzyonun varlığını göstermişlerdir (64). Takip eden süreçte 2014 yılında Puls ve arkadaşları 10 vakalık; Peters ve arkadaşları 6 vakalık serilerle bu sarkomların genetik, klinik ve morfolojik özelliklerini daha ayrıntılı bir biçimde tanımlamışlardır (65,66).

#### **2.3.3. EPİDEMİYOLOJİ**

Oldukça nadir görülen bu tümörlerin görülme sıklığı, Pierron ve arkadaşlarının çalışmasında yuvarlak hücreli sarkomlar için 24/594 (%4) oranındadır (64). EAS'ye göre görülme sıklıkları ise Puls ve arkadaşlarının çalışmasında 1/27 oranında saptanmıştır (65). Erkeklerde siktir. Hastaların çoğu 2. dekatta olup yaş aralığı 6-22'dir (64-66). Pierron ve Puls tarafından yayınlanan serilerde kemik yerleşimi daha sık görülmüştür, ancak Peters tarafından yayınlanan 6 vakalık seride yumuşak doku yerleşimi daha sık olarak saptanmıştır (5/6) (64-66). En sık görüldüğu yerler femur, sakrum, pelvik kemikler ve vertebra olarak bildirilmiştir.

Yumuşak doku için göğüs duvarı, paravertebral bölge, pelvik bölge, boyun, abdomen duvarı başlıca görüldüğü yerlerdir (64,66).

#### **2.3.4. ETYOLOJİ**

Etyolojide ana faktör olarak, X kromozomunun parasentrik inversiyonundan kaynaklanan *BCOR-CCNB3* füzyonu ve bu inversiyon sonucunda *BCOR* geninin, *CCNB3* geninin son 8 ekzonuna füzyonu; bu füzyon sonucunda hibrit transkriptlerin ve onkojenik kimerik bir proteinin oluşumu gösterilmiştir (64).

#### **2.3.5. HİSTOPATOLOJİ**

BRS'lerde monoton, küçük yuvarlak hücreli, ince kromatinli EAS benzeri morfolojiden; işsi hücreli, nükleer özellikleri atipik ES'ye benzer şekilde, düzensiz, angüle ve veziküler kromatinli morfolojiye kadar geniş bir spektrum görülebilir (67,68). Puls ve arkadaşlarının 10 vakalık serisinde; vakaların 7'si atipik ES benzeri morfoloji sergilerken, 3 vakada kısa işsi hücreli morfoloji hakimdir (65). Peters ve arkadaşlarının serisinde ise vakaların hepsi işsi hücreli morfoloji göstermektedir. Arada fokal veya kısmen baskın, dağınık, yuvarlak/oval hücreli morfoloji de tarif edilmiştir (66). Kao ve arkadaşlarının 25 vakalık serisinde ise üniform yuvarlak hücreli, ince kromatinli morfoloji hakimdir, eşlik eden fokal işsi hücreli alanlar, selüler fibröz septa ve rozet formasyonu da tarif edilen diğer bulgulardır (68).

Apoptotik cisimler çok, mitoz sayısı değişkendir; vakaların çoğunda küçük nekroz alanları mevcuttur.

Stromada özellikle işsi hücreli alanlarda görülen fokal veya yaygın miksoid zemin dikkat çekici bir özellik olarak belirtilmektedir. Miksoid zeminde tek tek dağılmış işsi tümör hücreleri veya miksoid madde ile dolu küçük psödokistik boşluklar görülebilmektedir.

#### **2.3.6. İMMÜN FENOTİP**

CCNB3, normal hücre siklusunda hücre bölünmesini siklin bağımlı kinazlarla kontrol eden bir proteindir ve ekspresyonu testisle sınırlıdır. Yine Pierron ve arkadaşlarının çalışmasında BRS'lerde, CCNB3 ekspresyonunun oldukça arttığı görülmüş ve immunhistokimyasal olarak 18 BRS ve 25 diğer yuvarlak hücreli sarkom vakasında (EAS, desmoplastik küçük yuvarlak hücreli tümör, rabdomyosarkom ve sinoviyal sarkom) CCNB3 boyanması değerlendirilmiştir. Sonucunda da BRS vakalarının tümü kuvvetli nükleer boyanma gösterirken, diğer sarkomların hiçbirinde boyanma saptanmayarak CCNB3'ün tanı koymada faydalı bir belirteç olabileceği öne sürülmüştür (64). BRS vakalarında CCNB3



immünohistokimyasının değerlendirildiği Puls ve arkadaşlarının çalışmasında 10 vakanın tamamında, Peters ve arkadaşlarının çalışmasında ise 5 vakanın 4'ünde difüz kuvvetli nükleer boyanma görülmüş; 1'inde ise yamalı boyanma görülmüştür (65,66).

BCOR (BCL6 korepresör) proteini transkripsiyon represörü olarak fonksiyon görür, germinal merkez formasyonu ve apoptoz üzerinde etkisi vardır. Ayrıca mezenkimal kök hücre fonksiyonlarını da düzenler (64). BRS vakalarında BCOR ekspresyonunu gösteren bir çalışmada, 25 vakanın 22'sinde kuvvetli ve difüz, 2'sinde orta yoğunlukta yamalı boyanma görülürken, 1 vakada boyanma görülmemiştir. Aynı çalışmada 8 böbreğin berrak hücreli sarkomunda, 10 indifferansiye yuvarlak hücreli sarkomun 2'sinde ve 74 sinoviyal sarkomun 36'sında orta-yoğun BCOR immunreaktivitesi saptanmıştır. EAS, CRS ve diğer sarkom tiplerinde boyanma saptanmamıştır (68).

Matsuyama ve arkadaşlarının BRS'lerde hem CCNB3 hem BCOR ekspresyonunu analiz eden çalışmasında; CCNB3 ile 11 vakanın 9'unda, vakaların tamamında BCOR ile difüz kuvvetli boyanma saptanmıştır. CD99 ile vakaların çoğunda pozitiflik görülürken; NKX2.2 ve WT1 ile hiçbirinde boyanma görülmemiştir. Aynı zamanda 412 adet çeşitli işçi ve yuvarlak hücreli sarkom vakasına da immünohistokimyasal CCNB3 ve BCOR uygulanmış; BCOR ile %4,4'ünde, CCNB3 ile %1,5'inde boyanma görülmüştür. Bu çalışma neticesinde BCOR'un CCNB3'e göre spesifitesi düşük ancak sensitivitesi yüksek olarak değerlendirilmiştir. (67).

### **2.3.7. GENETİK**

X kromozomunun parasentrik inversiyonundan kaynaklanan inv(X)(p11.4p11.22) sonucu *BCOR-CCNB3* füzyonu bu sarkomların karakteristik özelliğidir (64). Ortaya çıkan füzyon proteini BRS gelişimine yol açmaktadır. Her ne kadar ortak morfolojik ve klinik özellikler gösterebilir de bu sarkomlar genetik özellikleri açısından EAS'dan oldukça farklıdır. Pierron ve arkadaşlarının çalışmasında EAS'de eksprese olan ve tümörögenezden sorumlu olan genlerin hiçbirinin BRS'lerde eksprese olmadığı gösterilmiştir. İlâveten aynı çalışmada EAS'de sık görülen kromozom kopya sayısı anomalileri de BRS'lerde saptanmamıştır (64).

### **2.3.8. PROGNOZ**

Literatürde küçük ve sınırlı vaka serileri olması nedeniyle klinik seyir ile ilgili henüz yeterince veri yoktur. Puls ve arkadaşlarının EAS ile BRS'yi kıyasladığı 10 vakalık serisinde 5 yıllık sağkalım EAS ve BRS'de sırasıyla %54 ve %75 olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Her iki antite için de ekstremitelerde aksiyal iskelet ve yumuşak doku

yerleşimine göre ortalama sağkalımın değiştiği görülmüştür. Ayrıca ekstremiteler yerleşimine bakıldığında, BRS'nin, EAS'ye nazaran daha uzun sağkalım gösterdiği görülmüştür (65).

Tanı anında metastaz bulunma yüzdesi benzer iken, EAS'de tanı anında metastaz bulunması sağkalımı kısaltmıştır, BRS'de ikisi arasında bir ilişki saptanmamıştır (65).

Kao ve arkadaşlarının serisinde EAS, BRS ve CRS için 5 yıllık sağkalım sırası ile %79, %72 ve %43'tür (68). Vakaların çoğu EAS için tercih edilen konvansiyonel kemoterapi rejimine iyi yanıt vermiştir. Fakat kemoterapiye yanıt vermeyen az sayıda vaka da mevcuttur (68). Her ne kadar CRS'ye nazaran daha iyi sağkalım görülse de BRS'ler de oldukça agresif tümörlerdir. Yine de yeni tanımlanan bir antite olması sebebiyle biyolojik davranışını belirlemek için daha geniş serilerde çalışmalar yapılması gereklidir.

### **2.3.9. TANI**

Altın standart EAS ve CRS'de olduğu gibi sitogenetik özelliklerinin gösterilmesine dayanmaktadır. *EWSR1* rearanjmanının negatif olduğu tümörlerde ayırıcı tanıya alınması gereken yeni ve önemli bir antitedir.

### **3. MATERYAL VE METOT**

#### **3.1. VAKA SEÇİMİ VE VAKALARIN ANALİZİ**

##### **3.1.1. VAKA SEÇİMİ**

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2000-2018 yılları arasında küçük yuvarlak hücreli sarkom tanısı alan 134 vaka çalışma kapsamına alındı. Ewing ailesi sarkomu, Ewing sarkomu, atipik Ewing sarkomu, PNET, Askin tümörü, indifferansiye yuvarlak hücreli sarkom ve ayırıcı tanıları içinde Ewing sarkomu bulunan yuvarlak hücreli malign mezenkimal tümörler çalışmaya dahil edildi. 134 adet vakaya ait 115 adet ilk tanı, 6 adet nüks, 13 adet metastaz dokusu çalışmaya alındı. Vakalara ait seçilen parafin blokların 35'i kesici iğne biyopsisine, 23'ü insizyonel biyopsiye, 52'si eksizyonel biyopsiye, 24'ü rezeksiyon materyaline aitti. İİA materyalleri ve kemik iliği biyopsileri çalışmaya alınmadı. Vakalara ait bölümümüz moleküler laboratuvarında ve dış merkezde FISH yöntemi ile EWSR1 rearanjmanı bakılan hastaların çalışma sonuçları da kaydedildi.

##### **3.1.2. KLİNİK ÖZELLİKLER**

Her vakanın tanı anındaki yaşı, cinsiyeti, tümör yerleşim yeri ve bildirilen vakalarda klinik bulgular, tümör çapı, cerrahi tedavi şekline ait bilgiler bölümümüz patoloji raporlarından kaydedildi. Küçük yuvarlak hücreli sarkom tanısı alan hastalardan tedavisi ve takibi fakültemizde yapılanların dosyalarına medikal ve pediatrik onkoloji bilim dallarından dosyalarına ulaşıldı. Erişkin yaş grubundaki 65 hastanın 15'inin ve pediatrik yaş grubundaki 69 hastanın 20'sinin takip dosyalarına ulaşıldı. Vakaların tedavi şekli, kemoterapi rejimi ve kür sayısı, tanı anında metastaz varlığı, nüks ve takip sürelerine ilişkin bilgiler kaydedildi.

##### **3.1.3. MİKROSKOBİK DEĞERLENDİRME**

Vakaların bölümümüzde incelenen materyallerine ait lam ve parafin blokları ana bilim dalımız arşivinden temin edildi. Vakaların morfolojik özellikleri hematoksilen-eozin boyalı lamlardan, ışık mikroskobu altında tekrar değerlendirildi. Hücre morfolojisi, nükleer ve sitoplazmik özellikleri, nükleol varlığı, kromatin yapısı, stromanın özelliği, damar çatısı, büyüme paterni, tümör sınırları ve nekroz varlığına bakıldı. Daha önce tanısal amaçlı çalışılan immunhistokimyasal boyamalardan ulaşılabilenler tekrar değerlendirildi. Ulaşılamayan veya değerlendirmeye elverişli olmayan vakalarda orijinal patoloji raporlarından, eğer çalışılmışsa, CD99 ve Ki67 sonuçları kaydedildi.

### 3.1.4. İMMÜNOHİSTOKİMYA UYGULAMA VE DEĞERLENDİRME

Vakalara ait H-E boyalı lamlar ışık mikroskopu altında değerlendirildikten sonra, yeterli tümör dokusu bulunan, immunhistokimyasal çalışma için uygun nitelikte her vakadan 1'er adet parafin blok seçildi. Vakalarda ETV4, WT1, NKX2.2, BCOR ve CCNB3 immunhistokimyasal boyanma özelliklerinin saptanması için, seçilen parafin bloklardan 2 mikronluk kesitler 5'er adet pozitif şarjlı lama alındı.

Pozitif şarjlı lam üzerine alınmış 2 mikronluk kesitler 2 saat 56 derece ayarlı etüvde bekletildi.

İmmunhistokimyasal analiz için otomatik preparat boyama cihazı (Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ, USA) ve indirekt biotin free sistem ile tespit yöntemi kullanıldı. Otomatik boyama cihazı içerisinde kesitler önce deparafinize edildikten sonra azalan oranlarda alkol solüsyonları ve en sonunda da distile su kullanılarak yeniden hidrate edildi. NKX2.2, WT1, ETV4, CCNB3 için antijeni geri alma (retrieval) işleminde 10mmol/L'lik EDTA çözeltisi kullanıldı ve 60 dakika boyunca 37 derecede bekletildi. BCOR için antijeni geri alma işlemi yapılmadı, proteazla 12 dakika muamele edildi.

Kesitler immunhistokimyasal ETV4 boyanması için tavşan anti-ETV4 poliklonal antikoru (1:30 dilüsyon, 60 dakika inkübasyon, poliklonal; Thermo Fisher Scientific, IL, USA), WT1 boyanması için fare anti-WT1 monoklonal antikoru (1:200 dilüsyon, 120 dakika inkübasyon, klon 6F-H2; Cell Marque, CA, USA), NKX2.2 boyanması için tavşan anti-NKX2.2 monoklonal antikoru (1:500 dilüsyon, 60 dakika inkübasyon, klon EP336; Cell Marque, CA, USA), BCOR boyanması için tavşan anti-BCOR poliklonal antikoru (1:50 dilüsyon, 120 dakika inkübasyon, poliklonal; Thermo Fisher Scientific, IL, USA) ve CCNB3 boyanması için tavşan anti-Cyclin B3 poliklonal antikoru (1:200 dilüsyon, 60 dakika inkübasyon, poliklonal; Thermo Fisher Scientific, IL, USA) ile 1 saat boyunca boyandı.

WT1 için over seröz karsinomu, NKX2.2 için normal pankreas dokusu, ETV4 için normal beyin dokusu, BCOR ve CCNB3 için normal testis dokusu pozitif kontrol dokusu olarak kullanıldı. Yıkama sonrası zayıf (%0,1) hematoksilen ile karşıt boyama yapılmasıyla otomatik preparat boyama cihazı içindeki işlemler tamamlandı.

Dehidrasyon ve temizleme işleminden sonra lamlar kapama solüsyonu ile manuel olarak kapatılarak ışık mikroskopu altında incelemeye hazır hale getirildi.

Daha sonra vakaların ışık mikroskop altında immunhistokimyasal boyanma özellikleri değerlendirildi.

NKX2.2 için pozitif kontrol olarak kullanılan pankreas dokusundaki adacık hücreleriyle benzer yoğunlukta boyanan hücreler, boyanma yoğunluğuna göre vizüel olarak orta veya kuvvetli olarak değerlendirildi. Negatif olarak değerlendirilen vakalarda kontrol dokusunda mevcut olan pankreasın egzokrin hücrelerin boyanma özellikleri baz alındı (Resim 6).

WT1 için pozitif kontrol olarak kullanılan over seröz karsinom dokusuyla karşılaştırılarak boyanma özellikleri kaydedildi (Resim 7).

ETV 4 için pozitif kontrol dokusu olarak beyin dokusu kullanıldı. Nöral hücrelerle benzer yoğunlukta boyanan hücreler kuvvetli pozitif, glial hücrelerle benzer yoğunlukta boyanan hücreler orta yoğunlukta veya zayıf boyanma olarak değerlendirildi (Resim 8).

CCNB3 için pozitif kontrol olarak testis dokusunda germ hücreleriyle benzer yoğunlukta boyanan hücreler boyanma yoğunluğuna göre orta-kuvvetli olarak kabul edildi (Resim 9).

BCOR için pozitif kontrol olarak testis, negatif kontrol olarak karaciğer dokuları kullanıldı. Testiste boyanma yoğunluğu; spermatogonium ile benzer ise kuvvetli, spermatosit ile benzer ise orta, sertoli hücreleriyle benzerse zayıf kabul edildi. Çalışma öncesi kontrol dokularında yapılan denemelerde optimale yakın boyanma görülmekle birlikte çalışma vakalarının %46'sında difüz kuvvetli nükleer ve sitoplazmik boyanma meydana geldi. Bu nedenle bu vakalara ait BCOR immunhistokimya boyanma sonuçları, diğer verilerle korelasyonu dikkate alınarak nonspesifik olarak değerlendirildi (Resim 10, 11).

NKX2.2, WT1, ETV4, CCNB3 ve BCOR için boyanma yaygınlığına göre %5-%25 arası 1+, %25-%50 arası 2+, %50-%75 arası 3+, %75-%100 4+ olarak değerlendirildi. %5'in altında olan boyanmalar ise negatif olarak kabul edildi. Boyanma şiddetine göre zayıf, orta yoğunlukta ve kuvvetli olmak üzere 3 gruba ayrıldı (Resim 12, 13, 14, 15, 16, 17)

### **3.2. İSTATİSTİKSEL ANALİZ YÖNTEMLERİ**

134 hastanın 94'ünün nüfus kayıtlarından sağkalım bilgilerine ulaşıldı. Buna göre 51 hastanın öldüğü (%54,3), 43 hastanın ise sağ olduğu (%45,7) öğrenildi. İstatistik paket programı kullanılarak bu hastaların cinsiyet, yaş, tümör tipi, tümör lokalizasyonu ile sürvi analizi yapıldı. Bu faktörlerin sağkalımı nasıl etkiledikleri incelenirken Kaplan-Meier analizi, bu faktörler ile sağkalım arasında anlamlı bir korelasyon olup olmadığının incelenmesi aşamasında da Ki-Kare (Mantel-Cox) analizi kullanıldı.

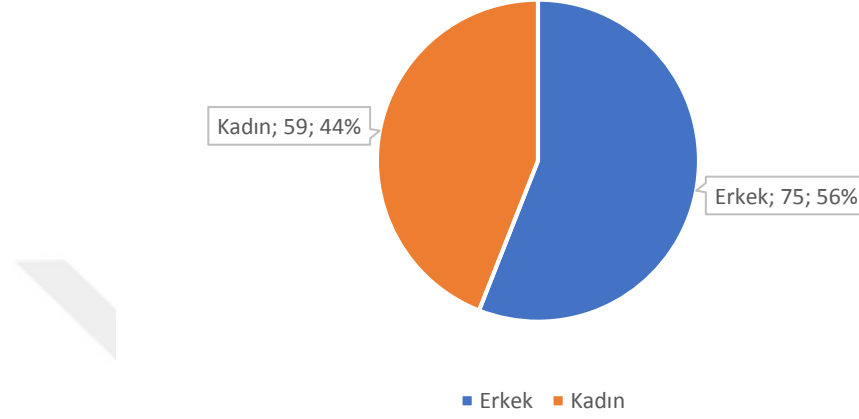
Ayrıca 134 hastanın 73'ünün tümör boyutları; radyolojik görüntülemelerden veya patoloji raporlarındaki makroskopik spesimen incelemesine ait bilgilerden edinildi. İstatistik paket programı kullanılarak tümör boyutu bilinen bu 73 hastanın tümör boyutu ile sürvi analizi yapıldı. Bu faktörlerin sağkalımı nasıl etkiledikleri incelenirken Kaplan-Meier analizi, bu faktörler ile sağkalım arasında anlamlı bir korelasyon olup olmadığının incelenmesi aşamasında da Ki-Kare (Mantel-Cox) analizi kullanıldı.



## 4. BULGULAR

### 4.1. KLİNİK VE PATOLOJİK BULGULAR

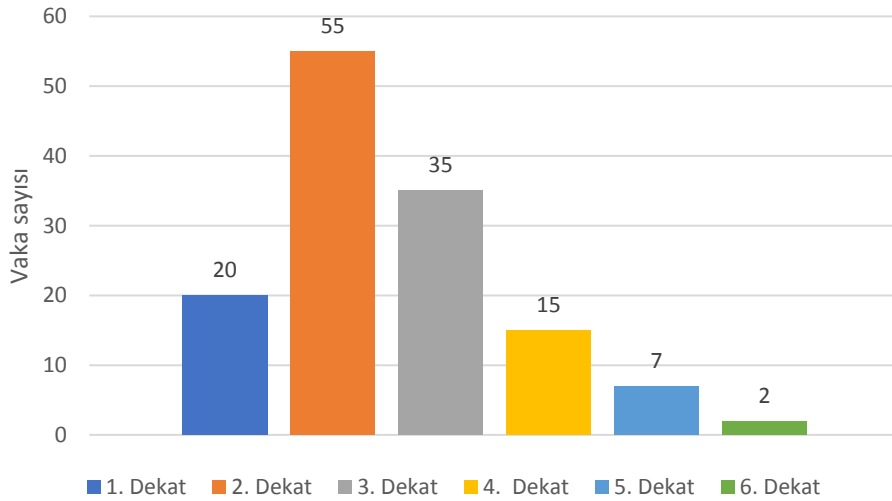
Vakaların 75'i erkek (%56), 59'u kadındı (%44). Erkek/kadın oranı 1.27/1'di.



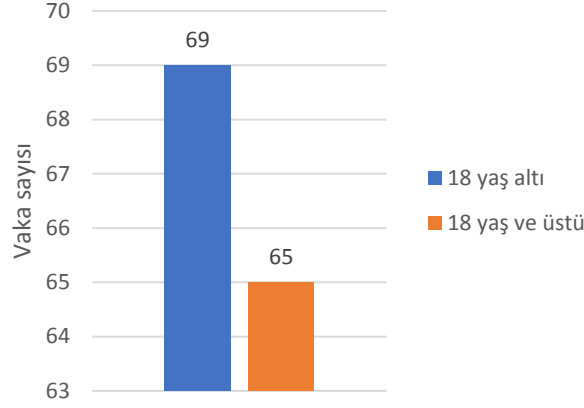
**Grafik 1. Vakaların cinsiyete göre dağılımı**

Vakaların yaş dağılımı 0 ile 56 arasında olup ortalama yaş 19,8, medyan yaş 17'ydi. Vakaların 69'u (%51) 18 yaş altında, 65'i (%49) 18 yaş ve üstünde tanı almıştı.

Vakaların yaşa göre dağılımı Grafik 2 ve Grafik 3'te verilmiştir.

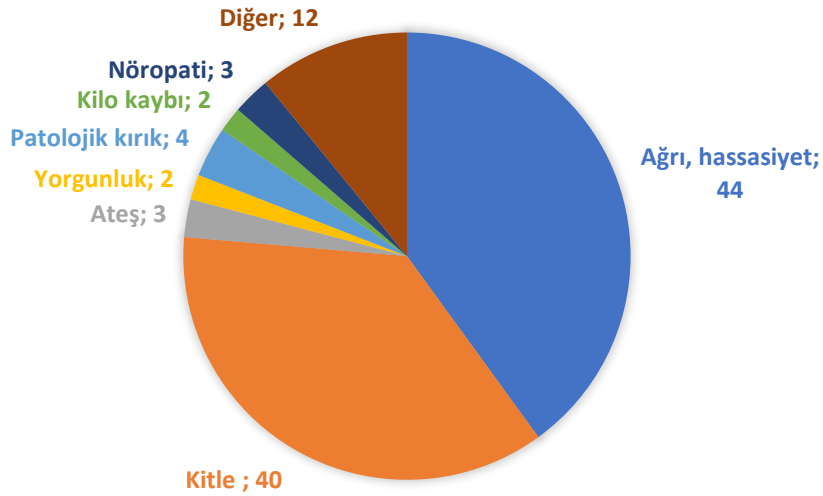


**Grafik 2: Vakaların dekatlara göre dağılımları**



**Grafik 3: Pediatrik (0-18 yaş) ve erişkin ( $\geq 18$  yaş) hastaların dağılımı**

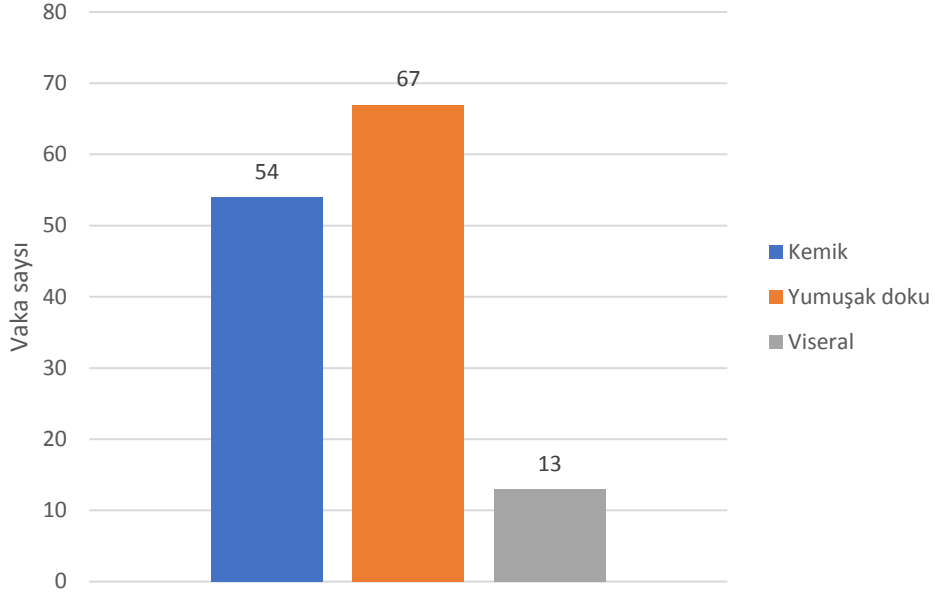
Çalışmamıza alınan 134 hastanın 50'sine ait klinik başvuru şikayeti bildirilmemişti. Kliniği bildirilen 84 hastanın başvuru şikayetleri analiz edildiğinde bazı hastaların birden çok semptomla başvurduğu görüldü. Sık görülen klinik başvuru şikayetleri sırasıyla ağrı veya hassasiyet, kitle, patolojik kırık, ateş, nöropati, kilo kaybı ve yorgunluktu. Diğer başvuru nedenleri arasında kutanöz metastazın sebep olduğu deride sert mavi nodüller, karın ağrısı, toraks yerleşimli vakalarda dispne, göğüs ağrısı, kafa içi yerleşimli vakalarda kafa içi basınç artışı (KİBAS) ve retroorbital yerleşimli vakada propitozis yer almaktadır. 50 vakada klinik bildirilmemişti. Başvuru semptomlarına ait veriler grafik 4'te özetlenmiştir.



**Grafik 4. Vakaların klinik başvuru nedenlerine göre dağılımı**



Tümörlerin yerleşim yerlerine bakıldığında; vakaların 54'ü kemik (%40), 67'si yumuşak doku (%50), 13'ü viseral (%10) yerleşimliydi.



**Grafik 5. Vakaların yerleşim yerine göre dağılımı**

Kemik yerleşimli vakaların 34'ü uzun, 17'si yassı, 2'si irregüler, 1'i kısa kemik kaynaklıydı. Femur (n: 21), pelvik kemikler (n: 11), fibula (n: 7), humerus (n: 3) en sık görülen kemik yerleşimleri idi. Radius, skapula, tibia, vertebra, kalkaneus, metatars, kot ve mandibula diğer görülen kemik yerleşimleri idi. Kemik yerleşimli tümörlerin dağılımı Tablo 2'de verilmektedir.

**Tablo 2. Kemik yerleşimli vakaların dağılımı**

		Toplam vaka sayısı
<b>Uzun kemik</b>	<b>Femur</b>	<b>21</b>
	<i>*Diafizer</i>	9
	<i>*Metafizodiafizer</i>	7
	<i>*Metafizer</i>	1
	<i>*Bildirilmemiş</i>	4
	<b>Fibula</b>	<b>7</b>
	<i>*Diafizer</i>	2
	<i>*Metafizodiafizer</i>	4
	<i>*Bildirilmemiş</i>	1
	<b>Humerus</b>	<b>3</b>
	<i>*Diafizer</i>	1
	<i>*Metafizodiafizer</i>	2
	<b>Radius</b>	<b>1</b>
	<i>*Metafizodiafizer</i>	1
	<b>Tibia</b>	<b>1</b>
	<i>*Bildirilmemiş</i>	1
	<b>Metatars</b>	<b>1</b>
<b>Yassı kemik</b>	<b>Pelvik</b>	<b>11</b>
	<b>Kot</b>	<b>5</b>
	<b>Skapula</b>	<b>1</b>
<b>Kısa kemik</b>	<b>Kalkaneus</b>	<b>1</b>
<b>İrregüler Kemik</b>	<b>Vertebra</b>	<b>1</b>
	<b>Mandibula</b>	<b>1</b>

Yumuşak doku yerleşimli 67 vakada anatomik dağılıma bakıldığında en sık gövde (n: 34) yerleşimi görülmekte, bunu baş-boyun (n: 9), alt ekstremitte (n: 8), pelvis-perine (n: 8), üst ekstremitte (n: 4) ve retroperiton (n: 3) izlemekteydi. Yumuşak doku yerleşimli olduğu bilinen bir vakanın ise yerleşim yeri bildirilmemişti. Yumuşak doku yerleşimli vakaların anatomik bölgelere göre dağılımı Tablo 3'te verilmiştir.

**Tablo 3: Yumuşak doku yerleşimli vakaların anatomik bölgelere göre dağılımı**

Toplam vaka sayısı	
<b>Gövde</b>	<b>34</b>
<b>Baş-boyun</b>	<b>9</b>
<b>Alt ekstremitte</b>	<b>8</b>
<b>Pelvis-perine</b>	<b>8</b>
<b>Üst ekstremitte</b>	<b>4</b>
<b>Retroperiton</b>	<b>3</b>
<b>Bildirilmeyen</b>	<b>1</b>

Viseral yerleşimli 13 vakanın dağılımı şöyleydi: akciğer (n: 6), böbrek (n: 3), beyin (n: 2), omentum (n: 1), ve medulla spinalis (n: 1). Viseral yerleşimli vakaların 9'u primer tümörün metastazına aitti: Akciğer (n: 6), beyin (n: 2), omentum (n: 1). Böbrek yerleşimli 3 vaka ve medulla spinalis yerleşimli 1 vaka, primer tümöre aitti. Viseral yerleşimli vakaların dağılımı Tablo 4'te verilmiştir.

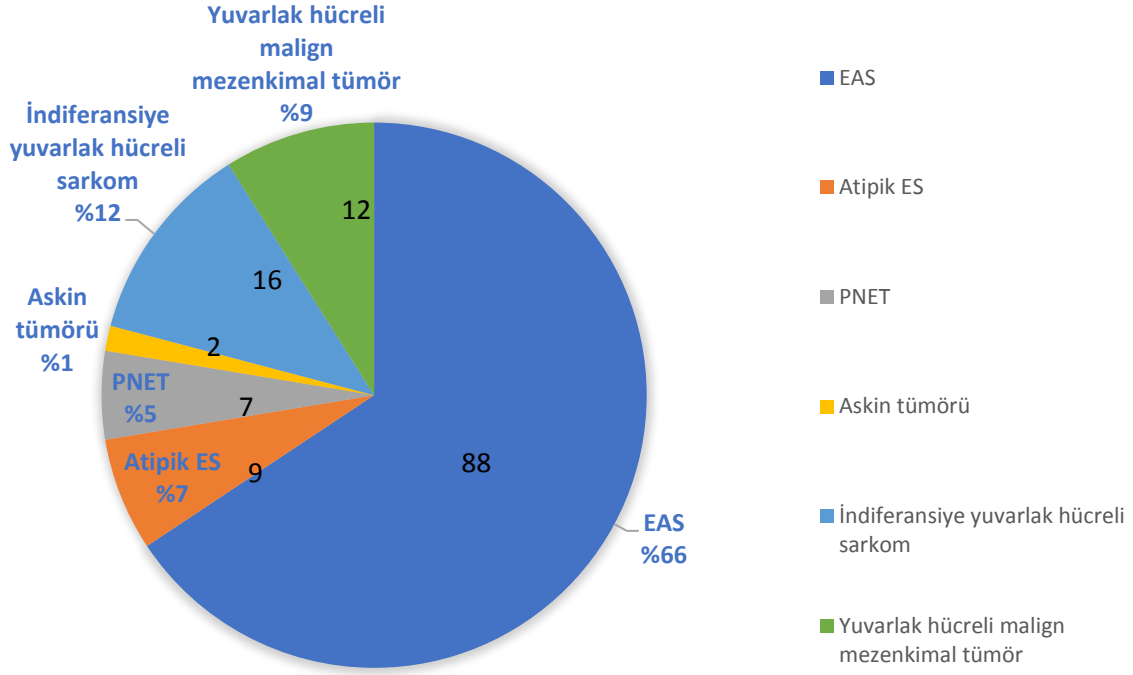
**Tablo 4. Viseral yerleşimli vakaların dağılımı**

	Toplam vaka sayısı
<b>Akciğer</b>	<b>6</b>
<b>Böbrek</b>	<b>3</b>
<b>Beyin</b>	<b>2</b>
<b>Medulla spinalis</b>	<b>1</b>
<b>Omentum</b>	<b>1</b>

Çalışmaya alınan 134 vakanın tanı anındaki patolojik tanıları şöyleydi: EAS (n: 88), atipik ES (n: 9), PNET (n: 7), Askin tümörü (n: 2), yuvarlak hücreli malign mezenkimal tümör (n: 12), indifferansiye yuvarlak hücreli sarkom (n: 16). 134 vakanın patolojik tanılarına göre sınıflandırılması, Grafik 6'da verilmiştir.

Yuvarlak hücreli malign mezenkimal tümör tanısı alan 12 vakanın 6'sı ön planda EAS, 1'i atipik ES, 2'si Ewing benzeri yuvarlak hücreli sarkom yönünde yorumlanmıştı. 3'ünde ise az diferansiye sinoviyal sarkom ile EAS ayırıcı tanıları arasında kalınmıştı.

İndifferansiye yuvarlak hücreli sarkom tanısı alan 16 vakanın 4'ünde EAS (n: 4), 2'sinde atipik ES ön planda düşünülmüştü. Kalan 10 vakada diğer küçük yuvarlak hücreli tümörlerle (nöroblastom, rabdomyosarkom, az diferansiye sinoviyal sarkom, nöroendokrin karsinom, küçük hücreli karsinom, desmoplastik küçük yuvarlak hücreli tümör, Merkel hücreli karsinom, tendon kılıfının berrak hücreli sarkomu, küçük hücreli melanom, lenfoma, bifenotipik sarkom) ayırıcı tanı için çeşitli immunhistokimyasal belirteçler uygulanmıştı.



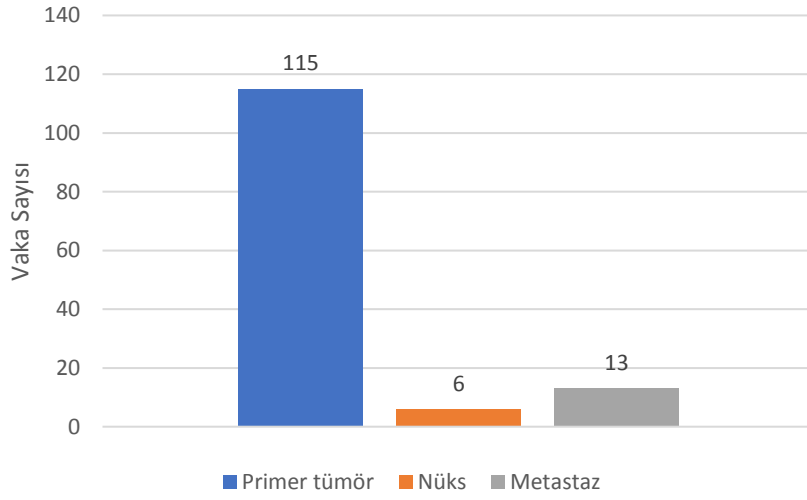
**Grafik 6. Vakaların patolojik tanılarına göre sınıflandırılması**

21 vakada anabilim dalımız moleküler laboratuvarında veya dış merkezde FISH yöntemi ile *EWSR1* rearanjmanı varlığına bakılmıştı. Bunların 11'inde *EWSR1* rearanjmanı pozitif bulunurken, 4'ünde negatif bulunmuştu. Kalan 6 vakada ise tekrar edilen çalışmalara rağmen sinyal elde edilememişti. Pozitif vakaların tamamı EAS olarak sınıflandırılmıştı.

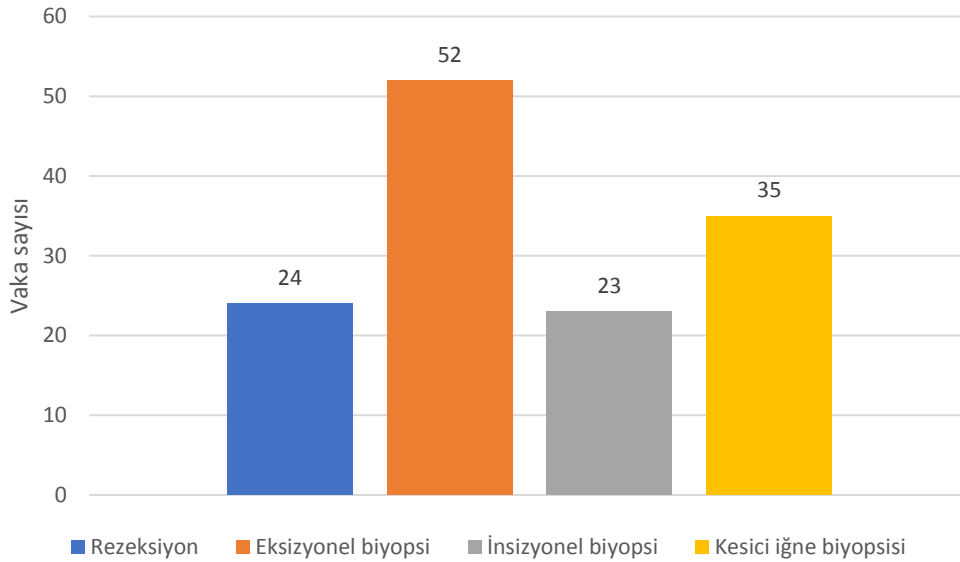
Erişkin hastaların 15'ine ve pediatrik hastaların 20'sine ait klinik takip ve tedaviye ait dosyalara ulaşıldı. Vakaların ortalama takip süresi 30 ay olmakla birlikte, takip süresi 1 ile 111 ay arasındaydı. 10 vakada tanı anında metastaz mevcuttu. En sık metastaz yeri akciğerdi (n: 5). 14 vakada nüks mevcuttu. 24 vakaya cerrahi rezeksiyon, 6 vakaya da cerrahi eksizyon uygulanmıştı. 31 vaka, ortalama 12 kür olmak üzere, kemoterapi almıştı. 31 vakanın 12'sine kesici iğne biyopsisi veya İİA materyalinden tanı aldıktan sonra neoadjuvan kemoterapi uygulanmıştı. Neoadjuvan tedavi sonrası rezeksiyon yapılan bu hastaların 3'ünde mikroskopik canlı tümör hücresi görülmemiş ve patolojik tam yanıt olarak değerlendirilmişti. Kalan 9 vakanın mikroskopik incelemesinde, rezeksiyon spesimeninde canlı tümör oranı %5-95 arasında bulunmuştu.

Çalışmaya alınan 134 vakanın 115'i primer tümör materyaline, 6'sı nüks materyaline, 13'ü ise primer tümörün metastazına aitti. Metastatik bölgelerin dağılımı şöyleydi: Akciğer (n:

6), yumuşak doku (n: 3), beyin (n: 2), dura (n: 1), omentum (n: 1). İncelenen vakaların 24'ü rezeksiyon, 52'si eksizyonel biyopsi, 23'ü insizyonel biyopsi ve 35'i kesici iğne biyopsisi materyallerine aitti. Çalışmaya alınan vakaların primer, nüks veya metastaz durumuna ait bilgiler ve alınma şekillerine göre dağılımları Grafik 7 ve 8'de verilmiştir.



**Grafik 7. Çalışmaya alınan materyallerin cinsi**



**Grafik 8. Çalışmaya alınan materyallerin alınma şekline göre sınıflandırılması**

Radyolojik ölçülen çap veya eksizyon/rezeksiyon materyaline ait spesimen üzerinden ölçülen tümör çapı, erişilebilen vakalarda, 1,4 cm ile 21 cm arasında değişmekte olup, ortalama tümör çapı 7,78 cm idi.

## 4.2. İMMÜNHİSTOKİMYASAL BULGULAR

İmmünhistokimyasal incelemede NKX2.2 ile 133 vakanın 98'inde (%73,6) nükleer boyanma mevcuttu. Bunların 54'ünde 4+, 24'inde 3+, 12'sinde 2+ ve 8'inde 1+ boyanma saptandı. Boyanma şiddetine göre 58 vakada kuvvetli, 34 vakada orta yoğunlukta ve 6 vakada zayıf boyanma görüldü. 35 vaka (%26,4) NKX2.2 ile negatifti. 1 vaka çalışma sonrası inceleme için uygun nitelikte değildi.

WT1 ile 132 vakanın 4'ünde (%3) nükleer, 16'sında (%12) sitoplazmik boyanma mevcuttu. Nükleer boyanan vakaların 2'sinde 4+, 2'sinde 3+ boyanma saptandı. 3 vakada kuvvetli, 1 vakada orta yoğunlukta boyanma mevcuttu. 112 vaka (%85) ise WT1 ile negatifti. 2 vaka çalışma sonrası inceleme için uygun nitelikte değildi.

ETV4 ile 127 vakanın 33'ünde (%25,9) nükleer boyanma mevcuttu. Bunların 4'ü 4+, 10'u 3+, 12'si 2+ ve 7'si 1+ olarak değerlendirildi. Boyanma şiddetine göre 3 vakada kuvvetli, 23 vakada orta yoğunlukta, 7 vakada zayıf boyanma görüldü. 9 vakada sitoplazmik boyanma mevcuttu, bunlar negatif olarak değerlendirildi. 85 vakada sitoplazmik veya nükleer herhangi bir reaktivite görülmedi. 7 vaka ise çalışma sonrası inceleme için uygun nitelikte değildi.

CCNB3 ile 125 vakanın 22'sinde (%17,6) nükleer boyanma mevcuttu. Bunların 7'si 3+, 5'i 2+ ve 10'u 1+'ti. Boyanma şiddetine göre; 3 vakada kuvvetli, 9 vakada orta yoğunlukta, 10 vakada zayıf boyanma görüldü. 28 vakada sitoplazmik noktasal boyanma mevcuttu, bunlar negatif olarak değerlendirildi. 75 vakada boyanma görülmedi. 9 vaka ise çalışma sonrası inceleme için uygun nitelikte değildi.

BCOR ile, denenen farklı yöntemlere rağmen, immunhistokimyasal çalışma ile suboptimal sonuç alındı. Vakaların 39'unda (%29) anlamlı kabul edilebilecek nükleer boyanma mevcuttu. 46 vakada (%34) nonspesifik boyanma vardı. 31 vakada sadece sitoplazmik boyanma mevcuttu, bunlar negatif kabul edildi. 18 vakada boyanma görülmedi.

Mevcut immunhistokimyasal değerlendirme sonuçlarına göre NKX2.2 için nükleer boyanma gösteren 89 vaka (%66,4) EAS olarak yorumlandı. Bu vakaların 81'inde immünhistokimyasal olarak CD99 da pozitif bulunmuştu. İnceleme için uygun nitelikte olmayan 1 vakada (%0,7), CD99'un difüz pozitif olması ve moleküler yöntemlerle *EWSR1* rearanjmanının gösterilmesi sebebiyle EAS olarak kabul edildi.

NKX2.2 ile negatif olan veya fokal boyanma (1+ veya 2+) gösteren vakalar içinde; WT1 ve ETV4 ile boyanma gösteren 7 vaka (%5,2) CRS olabileceği, BCOR ve CCNB3 ile boyanma gösteren 6 vaka BRS olabileceği yönünde yorumlandı.

NKX2.2 ile negatif olan veya fokal boyanan, CRS veya BRS için spesifik olabilecek boyanma göstermeyen 31 vaka (%23,1) mevcut immunhistokimya sonuçlarına göre sınıflandırılmadı.

### 4.3. EAS YÖNÜNDE YORUMLANAN VAKALAR

EAS olarak yorumlanan 90 vakanın yaş ortalaması 18,9'du (0-49). Erkek/kadın oranı 1,19'du (49/41). 43'ü yumuşak doku, 37'si kemik, 10'u viseral yerleşimliydi. Tümör lokalizasyonları Tablo 5'te verilmiştir.

**Tablo 5. EAS yönünde yorumlanan vakaların tümör lokalizasyonları**

Lokalizasyon			Vaka sayısı
<b>Kemik</b>	n=37	-Uzun kemik	18
		-Yassı kemik	14
		-Bildirilmeyen	5
<b>Yumuşak doku</b>	n=43	-Baş-boyun	7
		-Gövde	23
		-Pelvis	4
		-Retroperiton	2
		-Üst ekstremit	2
		-Alt ekstremit	4
		-Bildirilmeyen	1

Tümör çapı 1,4 ile 18,5 cm arasında değişmekteydi. Ortalama tümör çapı 7,7 cm'ydi.

Vakaların tamamında yuvarlak hücre morfolojisi hakimdi. Fokal işsi hücreli alanlar (n: 12), düzensiz angüle hücreler (n: 8) ve epiteloid hücreli alanlar (n: 2) eşlik eden diğer bulgular. Vakaların büyük kısmında sitoplazma seçilemiyordu veya çok dar alanda izlendi. 23 vakada berrak sitoplazma, 2 vakada da fokal eozinofilik sitoplazma dikkati çekti. Vakaların büyük kısmında nükleer konturlar düzgün, kromatin yapısı inceydi. Bazı vakalarda seçilebilir nükleol da mevcuttu. Düzensiz angüle hücrelerin izlendiği vakalarda veziküler kromatin yapısı da dikkati çekmekteydi. Bu gruptaki tümörlerde genel olarak solid büyüme paterni hakimdi;

diğer görülen büyüme paternleri nest (n: 3), trabeküler (n: 5), psödoalveoler (n: 4) ve psödokistik (n: 1) paterndi. Tümörlerin büyük çoğunluğunda ince fibröz stroma ve eşlik eden ince kapiller damarlar mevcuttu. Kalın fibröz bantlar (n: 8), fokal hyalinize (n: 17) ve fokal miksoid (n: 3) alanlar da izlenmişti. Vakaların %50'sinde nekroz mevcuttu. Kemik yerleşimli vakalarda rezeksiyon ve eksizyonel biyopsi materyallerinde tümör çevreyle infiltratif; yumuşak doku yerleşimli vakalarda ise lobüle ve infiltratif sınır oluşturmaktaydı.

İmmünohistokimyasal çalışmada 90 vakanın 89'u NKX2.2 ile nükleer boyanma göstermekteydi. Boyanma yaygınlığına göre 54'ü 4+, 24'ü 3+, 9'u 2+, 2'si 1+'ti. Boyanma şiddetine göre 56 vaka kuvvetli, 30 vaka orta yoğunlukta, 3 vaka zayıf boyanmıştı.

90 vakanın 3'ünde WT1 ile sitoplazmik boyanma, 21'inde ETV4 ile nükleer boyanma (3 vaka; 4+, 7 vaka; 3+, 8 vaka; 2+, 3 vaka; 1+), 10'unda CCNB3 ile nükleer (4 vaka; 3+, 6 vaka; 1+) 24'ünde sitoplazmik boyanma kaydedildi. BCOR immünohistokimyasının, genel ve bu gruptaki *EWSR1* pozitif vakalardaki çalışma performansı da göz önünde bulundurularak, fokal ancak zayıf-kuvvetli şiddette boyandığı 19 vaka; diğer belirteçlerle veya uygulanmış olan moleküler testlerle korelasyonu sağlanamadığından non-spesifik boyanma olarak kabul edildi. EAS yönünde yorumlanan vakaların immünohistokimyasal boyanma özellikleri Tablo 6'da verilmiştir.

**Tablo 6. EAS yönünde yorumlanan vakaların immünohistokimyasal boyanma özellikleri**

	Nükleer			Sitoplazmik
	Toplam vaka sayısı	4+ ve 3+	2+ ve 1+	
<b>Boyanma yaygınlığı</b>				
<b>NKX2.2</b>	89 (%100)	78	11	-
<b>WT1</b>	0	0	0	3
<b>ETV4</b>	21 (%23)	10	11	-
<b>CCNB3</b>	10 (%11)	4	6	24
<b>BCOR</b>	19 (%14)	1	18	19

Ki67 proliferatif indeks 19 vakada çalışılmıştı. Ortalaması %40'tı.

16 vakaya *EWSR1* rearanjmanı FISH yöntemiyle çalışılmış; 11'inde pozitif saptanmış, 5'inde sinyal alınamamıştı.



Bu grubun özellikleri kendi içinde değerlendirildiğinde; 21 vakada NKX2.2 boyanmasına eşlik eden ETV4 pozitifliği mevcuttu. Bu vakaların 15'inde ETV4 ve NKX2.2 harici diğer antikorlarla reaktivite görülmedi. ETV4'ün pozitiflik gösterdiği vakaların 7'si difüz (3+ veya 4+), 8'i fokal (1+ veya 2+) boyanma göstermişti. Bu vakaların tümünde CD99, 2'sinde *EWSR1* rearanjmanı pozitif. 6 vakada ise hem ETV4 hem CCNB3 ile fokal ve difüz nükleer boyanma vardı. Bu vakalarda geriye dönük CD99 da pozitif saptanmıştı. Bu vakaların 3'ünde *EWSR1* pozitif. Dolayısıyla ETV4 reaktivitesi gözlenen bu 21 vaka, diğer antikorlarla ve moleküler testlerle korelasyonu sağlanamadığından EAS olarak kabul edildi.

Fokal zayıf-kuvvetli BCOR reaktivitesi görülen 19 vakanın 3'ünde *EWSR1* rearanjmanı saptanmıştı. 16 vakada hem CD99 hem NKX2.2 yaygın kuvvetli pozitif (3+ veya 4+). Kalan 3 vakanın 2'sinde CD99 negatif, NKX2.2, 3+ iken 1 vakada zayıf NKX2.2 reaktivitesine yaygın membranöz CD99 reaktivitesi eşlik etmekteydi. Bu nedenle bu vakalar EAS grubunda kabul edildi.

#### 4.4. CRS YÖNÜNDE YORUMLANAN VAKALAR

CRS olabileceği yönünde yorumlanan 7 vakanın yaş ortalaması 18,7'yd (11-39). Erkek/kadın oranı 1,3'tü (4/3). 5'i yumuşak doku (baş-boyun, gövde, pelvis/perine, alt ekstremit, üst ekstremit), 2'si beyin olmak üzere viseral yerleşimliyd.

Tümör çapı 2,6 cm ile 8 cm arasında değişmekte olup ortalama tümör çapı 6,02 cm'yd.

Morfolojik özelliklerine bakıldığında 7 vakada da solid büyüme paterni gösteren yuvarlak hücre morfolojisi hakimdi. Nükleer konturlar düzenli, kromatin inceydi; nükleol izlenmemişti. Stroma ince fibröz septa ve ince kapiller damarlardan oluşmaktaydı. 4 vakada nekroz mevcuttu (Resim19).

İmmünohistokimyasal çalışmada 7 vaka NKX2.2 ile negatifti. WT1 ile 4 vaka nükleer, 3 vaka ise difüz sitoplazmik boyanma göstermişti. Nükleer boyanan vakaların 2'si 4+, 2'si 3+ yaygınlıktaydı. ETV4 ile 7 vaka nükleer boyanma göstermişti. Boyanma yaygınlığına göre; 4+: 1 vaka, 3+: 1 vaka, 2+: 3 vaka ve 1+: 2 vaka mevcuttu. CCNB3 ve BCOR ile 1'er vakada fokal zayıf nükleer boyanma saptandı.

Geriye dönük bu vakaların 3'ü CD99 ile negatif, 3'ü zayıf fokal pozitif, 1'i ise difüz pozitif. Ki67 proliferatif indeks 4 vakada çalışılmıştı, ortalaması %85,75'ti. CRS yönünde yorumlanan vakaların immünohistokimyasal analiz sonuçları Tablo 7'de özetlenmiştir.

Vakaların 1'ine FISH yöntemiyle *EWSR1* rearanjmanı çalışılmış, negatif saptanmıştı.

**Tablo 7. CRS yönünde yorumlanan vakaların immünohistokimyasal analizi**

	CD99	NKX2.2	WT1	ETV4	CCNB3
<b>Vaka 1</b>	fokal	0	0	1+	0
<b>Vaka 2</b>	fokal	0	4+	1+	0
<b>Vaka 3</b>	0	0	0	2+	0
<b>Vaka 4</b>	0	0	3+	2+	0
<b>Vaka 5</b>	0	0	4+	3+	0
<b>Vaka 6</b>	difüz	0	0	4+	0
<b>Vaka 7</b>	fokal	0	4+	2+	1+

#### **4.5. BRS YÖNÜNDE YORUMLANAN VAKALAR**

BRS olabileceği yönünde yorumlanan 6 vakanın yaş ortalaması 22,3'tü (12-39). Erkek/kadın oranı 5'ti (5/1). 4'ü kemik (2 uzun kemik, 2 yassı kemik), 2'si yumuşak doku yerleşimliydi (gövde ve baş-boyun). Tümör çapı ortalaması 10 cm olup 2 cm ile 21 cm arasında değişmekteydi.

Morfolojik özelliklerine bakıldığında 6 vakada da yuvarlak hücre morfolojisi hakimdi. 1 vakada fokal düzensiz angüle hücreler, 1 vakada da fokal epiteloid alan mevcuttu. 2 vakada berrak sitoplazma, 1 vakada fokal eozinofilik sitoplazma seçiliyordu. Nükleer konturlar düzenli olup yer yer nükleol seçilebiliyordu. Kromatin yapısı genel olarak inceydi; 1 vakada veziküler kromatin vardı. Solid büyüme paterni hakim olup 2 vakada psödoalveoler patern de izlenmişti. Stroma ince fibröz septa ve ince kapiller damarlardan oluşmaktaydı. Vakaların tamamında nekroz mevcuttu (Resim 18).

İmmünohistokimyasal çalışmada 2 vaka NKX2.2 ile negatifti. 4 vaka 1+ nükleer boyanma göstermişti. Vakaların hepsi CCNB3 ile nükleer pozitif. Boyanma yaygınlığına göre 2 vaka 3+, 2 vaka 2+, 2 vaka 1+ boyanmıştı. BCOR ile vakaların hepsinde nükleer boyanma mevcuttu. Boyanma yaygınlığına göre 2 vaka 4+, 1 vaka 3+, 3 vaka 2'ti. WT1 ile vakaların hiçbirinde boyanma görülmedi, ETV4 ile ise 2 vakada fokal nükleer boyanma vardı.

Geriye dönük CD99 ile boyanma özelliklerine bakıldığında 1 vaka negatifti, kalan 5 vaka pozitif olmakla birlikte boyanma özelliği bildirilmemişti ve CD99 boyalı lamalar, değerlendirme için elverişsizdi. Ki67 proliferatif indeks 1 vakada değerlendirilmiş olup %80'di. BRS yönünde değerlendirilen vakaların immünohistokimyasal analizi Tablo 8'de özetlenmiştir.

**Tablo 8. BRS yönünde yorumlanan vakaların immünohistokimyasal analizi**

BRS	CD99	NKX2.2	WT1	ETV4	CCNB3	BCOR
Vaka 1	+	1+	0	0	2+	4+
Vaka 2	+	1+	0	0	2+	3+
Vaka 3	-	0	0	0	1+	2+
Vaka 4	+	1+	0	2+	1+	4+
Vaka 5	+	1+	0	1+	3+	2+
Vaka 6	+	0	0	0	3+	2+

#### 4.6. SINIFLANDIRILAMAYAN VAKALAR

NKX2.2 ile negatif olan veya fokal boyanan, CRS veya BRS için spesifik olabilecek boyanma göstermeyen 31 vaka (%23,1) mevcut immünohistokimya sonuçlarına göre sınıflandırılmadı.

Vakaların yaş ortalaması 22,4'tü (1-56). Erkek/kadın oranı 1,21'di (17/14). 17 vaka yumuşak doku, 13 vaka kemik, 1 vaka viseral yerleşimliydi. Tümör yerleşim yeri özellikleri Tablo 9'de verilmiştir.

**Tablo 9. Sınıflandırılmayan vakaların tümör lokalizasyonları**

Lokalizasyon		Vaka sayısı	
Kemik	n: 13	-Uzun kemik	7
		-Yassı kemik	4
		-Bildirilmeyen	2
Yumuşak doku	n: 17	-Gövde	9
		-Pelvis/perine	3
		-Retroperiton	1
		-Üst ekstremité	1
		-Alt ekstremité	3
Viseral	n: 1	-Akciğer	1

Tümör çapı ortalaması 7,6 cm'ydi (2,7-18 cm).

Vakaların büyük kısmında yuvarlak hücre morfolojisi hakimdi. 1 vakada yuvarlak ve işsi morfoloji, 1 vakada ise düzensiz pleomorfik hücrelerden baskın morfoloji izlenmişti. Fokal işsi (n: 7) veya epitelooid (n: 1) hücreli alanlar da sınırlı sayıda vakada mevcuttu. 7 vakada berrak, 1

vakada eozinofilik sitoplazma izlenmişti. Vakaların %65'inde (n: 20) yuvarlak nükleus ve ince kromatin izlenirken, %35'inde (n: 11) sıklıkla düzensiz, angüle nükleus, bir veya birkaç nükleol ve veziküler kromatin vardı. Solid büyüme paterni hakimdi. Eşlik eden psödoalveoler (n: 3), trabeküler (n: 2), psödokistik (n: 2) ve nest (n: 1) patern de mevcuttu. Stroma sıklıkla ince fibröz septa ve ince kapiller damarlar içermekteydi. 5 vakada fokal miksoid stroma dikkati çekmişti. 27 vakada nekroz mevcuttu. Çevreyle yumuşak doku yerleşimli vakalarda lobüle infiltratif, kemik yerleşimli vakalarda infiltratif sınır özelliği izlenmekteydi.

İmmunhistokimyasal çalışmada 26 vaka NKX2.2 ile negatifti. 4 vaka 1+, 1 vaka ise 2+ olmak üzere gruptaki vakalar fokal reaktivite göstermişti. WT1 ile vakaların hiçbirinde nükleer boyanma görülmedi. ETV4 ile 3 vakada nükleer boyanma mevcuttu (3+: 2 vaka, 1+: 1 vaka). 25 vaka ETV4 ile negatifti. CCNB3 ile 5 vakada nükleer boyanma mevcuttu (4'ü 2+, 1'i 1+). 24 vakada boyanma yoktu. CCNB3'e eşlik eden anlamlı değerlendirilebilecek BCOR reaktivitesi izlenmedi.

Geriye dönük CD99 boyanma özellikleri incelendiğinde 21 vaka pozitif, 10 vaka negatif olarak neticelendirilmişti. 21 pozitif vakanın da 13'ü difüz, 2'si fokal boyanmıştı. 6 vakada boyanma yaygınlığı bilinmiyordu. Ki67 proliferatif indeks değerlendirilen 5 vakanın ortalaması %48'di.

3 vakaya FISH yöntemiyle *EWSR1* rearanjmanı çalışılmış, tamamında negatif saptanmıştı.

Bu sonuçlar neticesinde 18 vakada (%58) NKX2.2, WT1, ETV4 ve CCNB3 negatifti. 3 vakada değerlendirilebilen tüm antikorlar negatifti. 4 vakada tek başına fokal NKX2.2, 1 vakada tek başına fokal ETV4, 2 vakada tek başına fokal CCNB3 boyanması vardı. 1 vakada NKX2.2 ve CCNB3 ile fokal, 2 vakada da ETV4 ve CCNB3 ile fokal boyanma mevcuttu.

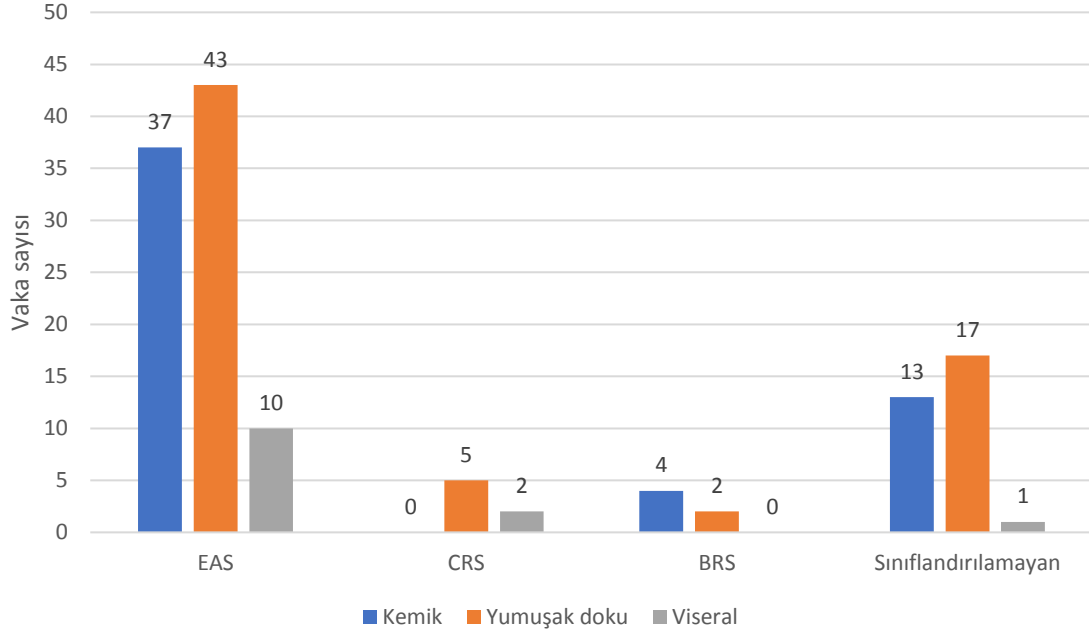
Tümör subgrupların demografik ve klinik özellikleri Tablo 10'da; morfolojik özellikleri Tablo 11'de verilmiştir. Tümör tiplerine göre yerleşim özellikleri Grafik 9'da verilmiştir

**Tablo 10. Tümör subgruplarının demografik ve klinik özellikleri**

	<b>EAS</b>	<b>CRS</b>	<b>BRS</b>	<b>Sınıflandırılmayan</b>
<b>Vaka sayısı</b>	90	7	6	31
<b>Yaş aralığı</b>	0-49 ort 18,9	11-39 ort 18,7	12-39 ort 22,3	1-56 ort 22,4
<b>Erkek/kadın</b>	49/41	4/3	5/1	17/14
<b>Lokalizasyon</b>				
-Kemik	37	0	4	13
-Yumuşak doku	43	5	2	17
-Viseral	10	2	0	1
<b>Tümör boyutu</b>	1,4-18,5 cm ort 7,7 cm Bildirilmeyen: 21	2,6-8 cm ort 6,02 cm Bildirilmeyen: 2	2-21 cm ort 10 cm Bildirilmeyen: 1	2,7-18cm ort 7,6cm Bildirilmeyen: 7

**Tablo 11. Tümör subgruplarının morfolojik özellikleri**

	<b>EAS</b>	<b>CRS</b>	<b>BRS</b>	<b>Sınıflandırılmayan</b>
<b>Hücre özellikleri</b>	yuvarlak: 90 *iğsi: 12 *düzensiz, angule: 8 *epiteloid: 2 *berrak sit: 22 *eozinofilik sit: 2	yuvarlak: 7	yuvarlak: 6 *düzensiz, angule: 1 *epiteloid: 1 *berrak sit: 2 *eozinofilik sit: 1	yuvarlak: 28 yuvarlak+iğsi: 1 düzensiz:1 *iğsi: 7 *epiteloid: 1 *berrak sit: 7 *eozinofilik sit: 1
<b>İnce kromatin</b>	82	7	5	20
<b>Veziküler kromatin</b>	8	0	1	11
<b>Büyüme paterni</b>	solid: 90 *trabeküler: 5 *psödoalveoler: 4 *nest: 3 *psödokistik:1	solid:7	solid: 4 *psödoalveoler: 2	solid: 31 *psödoalveoler: 3 *trabeküler: 2 *psödokistik: 2 *nest: 1
<b>Stroma</b>	ince fibröz: 82 kalın fibröz: 8 *fokal hyalinize: 17 *fokal miksoid: 3	ince fibröz:6 kalın fibröz:1	ince fibröz: 5 kalın fibröz: 1	ince fibröz: 25 kalın fibröz: 6 *fokal miksoid: 5
<b>Nekroz</b>				
*var	45	4	6	27
*yok	45	3	0	4



**Grafik 9. Tümör tiplerine göre tümör lokalizasyonları**

#### 4.7. KLİNİK PARAMETRELERİN PROGNOZA VE SAĞKALIMA ETKİLERİ

Nüfus kayıtlarından sağkalım bilgilerine ulaşılabilen 94 hasta genel olarak incelendiğinde, 51 hastanın öldüğü (%54,3), 43 hastanın ise sağ olduğu (%45,7) Kaplan-Meier analizi sonucu tespit edildi (Tablo 12).

Tüm hastalar için analiz uygulandığında; ortalama sağkalım süresinin 2576 ( $\pm$ 257) gün olduğu bulundu. %95 güven aralığı için yaşam süresi; 2071-3082 gün arası olarak hesaplandı (Tablo 13).

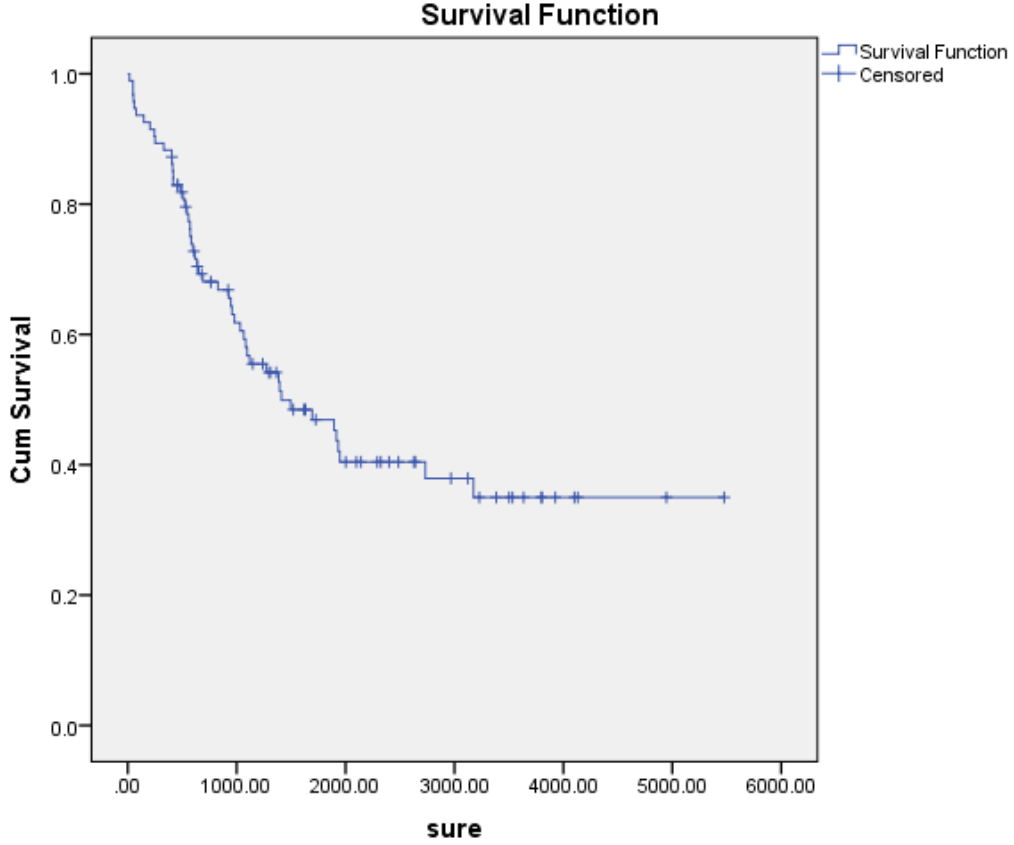
İncelenen hastaların yaklaşık %60'ında 1000 gün ve üzerinde sağkalım süreleri hesaplanmakla birlikte, yaklaşık %35'inde 3000 gün ve üzerinde sağkalım süreleri tespit edildi (Grafik 10).

**Tablo 12. Genel sağkalım**

Toplam sayı	Ölen hasta sayısı	Censored	
		N	Yüzde
94	51	43	%45,7

**Tablo 13. Ortalama genel sağkalım (gün)**

Ortalama sağkalım süresi				Median sağkalım süresi			
Gün	Standart hata	%95 Güven aralığı		Gün	Standart hata	%95 Güven aralığı	
		Alt limit	Üst limit			Alt limit	Üst limit
2576,986	257,961	2071,382	3082,589	1411,000	373,102	679,720	2142,280



**Grafik 10. Vakaların toplam genel sağkalım eğrisi (gün)**

Nüfus kayıtlarından sağkalım bilgilerine ulaşılabilen 94 hastanın cinsiyeti ile sürvi analizi yapıldığında (0=erkek, 1=kadın), 52 erkek hastanın 30'unun öldüğü (%57,7), 22'sinin sağ olduğu (%42,3); 42 kadın hastanın ise 21'inin öldüğü (%50), 21'inin sağ olduğu (%50) Kaplan-Meier analizi sonucu tespit edildi (Tablo 14).

Bu hastalar için analiz uygulandığında; erkek hastalar için ortalama sağkalım süresinin 2174 ( $\pm 303$ ) gün olduğu bulundu. %95 güven aralığı için yaşam süresi; 1580-2769 gün arası olarak hesaplandı. Kadın hastalar için ise ortalama sağkalım süresi 2870 ( $\pm 385$ ) gün iken; %95

güven aralığı için yaşam süresi 2114-3626 gündü. Tüm hastalar için ortalama sağkalım süresi 2576 ( $\pm 257$ ) gün ve %95 güven aralığı için yaşam süresi 2071-3082 gün arasındır (Tablo 15).

Hasta cinsiyeti ile sağkalım süresi arasında korelasyon durumu incelendiğinde, bu faktörün sağkalım süresini etkilemediği tespit edildi (sig.= 0.273) (Tablo 16).

Erkek hastaların yaklaşık %60'ında 1000 gün ve üzerinde sağkalım süreleri hesaplanmakla birlikte, 2000 gün civarında sağkalımda dramatik bir düşüş gözlemlendi. Kadın hastalarda ise yaklaşık %60'ında 1500 gün ve üzerinde sağkalım süreleri hesaplandı. Sağkalım süresi olarak yine kadınların daha uzun yaşadıkları tespit edildi (Grafik 11).

**Tablo 14. Cinsiyete göre genel sağkalım**

Cins	Toplam sayı	Ölen hasta sayısı	Censored	
			N	Yüzde
Erkek	52	30	22	%42,3
Kadın	42	21	21	%50,0
Toplam	94	51	43	%45,7

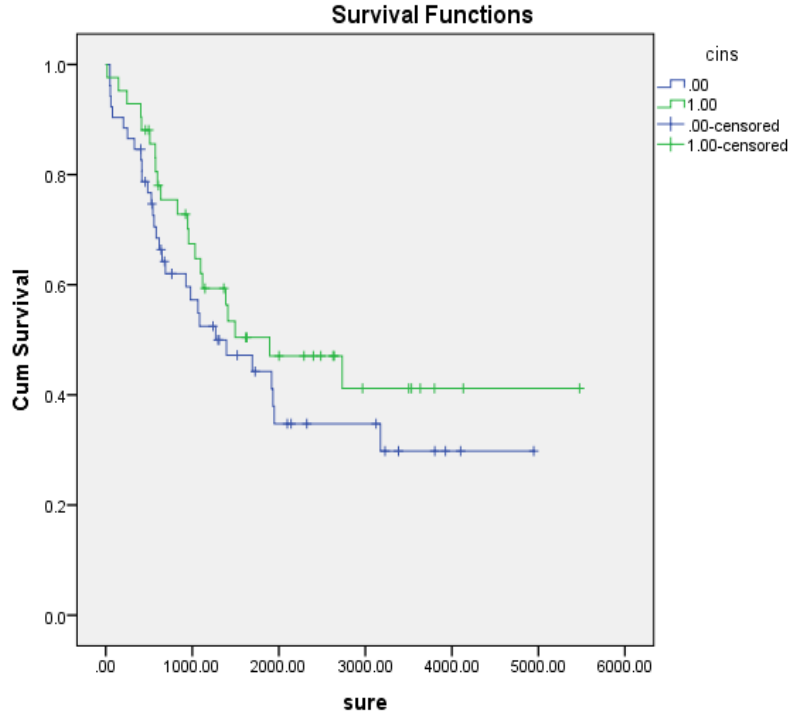
**Tablo 15. Cinsiyete göre ortalama genel sağkalım (gün)**

Cinsiyet	Ortalama sağkalım süresi				Median sağkalım süresi			
	Gün	Standart Hata	%95 Güven aralığı		Gün	Standart Hata	%95 Güven aralığı	
			Alt limit	Üst limit			Alt limit	Üst limit
Erkek	2174,761	303,294	1580,305	2769,218	1271,000	404,649	477,888	2064,112
Kadın	2870,479	385,884	2114,146	3626,812	1895,000	738,300	447,932	3342,068
Toplam	2576,986	257,961	2071,382	3082,589	1411,000	373,102	679,720	2142,280

**Tablo 16. Cinsiyete göre ortalama genel sağkalım; Ki-Kare analizi**

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1,203	1	,273





**Grafik 11. Cinsiyete bağlı kümülatif sağkalım süresi (gün)**

Nüfus kayıtlarından sağkalım bilgilerine ulaşılabilen 94 hastanın yaşı ile sürvi analizi yapıldığında (0-17 yaş – 18 ve üzeri yaş), 51 pediatrik hastanın 25'inin öldüğü (%49), 26'sının sağ olduğu (%51); 43 erişkin hastanın ise 26'sının öldüğü (%60,5), 17'sinin sağ olduğu (%39,5) Kaplan-Meier analizi sonucu tespit edildi (Tablo 17).

Bu hastalar için analiz uygulandığında; pediatrik hastalar için ortalama sağkalım süresinin 2907 ( $\pm 347$ ) gün olduğu bulundu. %95 güven aralığı için yaşam süresi; 2226-3588 gün arası olarak hesaplandı. Erişkin hastalar için ise ortalama sağkalım süresi 2037 ( $\pm 330$ ) gün iken; %95 güven aralığı için yaşam süresi 1389-2685 gündü (Tablo 18).

Hasta yaşı ile sağkalım süresi arasında korelasyon durumu incelendiğinde, bu faktörün %90 güven aralığı için sağkalım süresini etkilediği tespit edildi (sig.= 0.100) (Tablo 19). Pediatrik yaş grubundaki hastaların daha uzun sağkalım süresine sahip olduğu istatistik olarak anlamlı bulunmuştur.

Pediatrik hastaların yaklaşık %60'ında 1500 gün ve üzerinde sağkalım süreleri hesaplanmakla birlikte, yetişkin hastalarda ise yaklaşık %60'ında 1000 gün ve üzerinde sağkalım süreleri hesaplandı. Sağkalım süresi olarak yine pediatrik hastaların daha uzun yaşadıkları tespit edildi (Grafik 12).

**Tablo 17. Yaşa göre genel sağkalım**

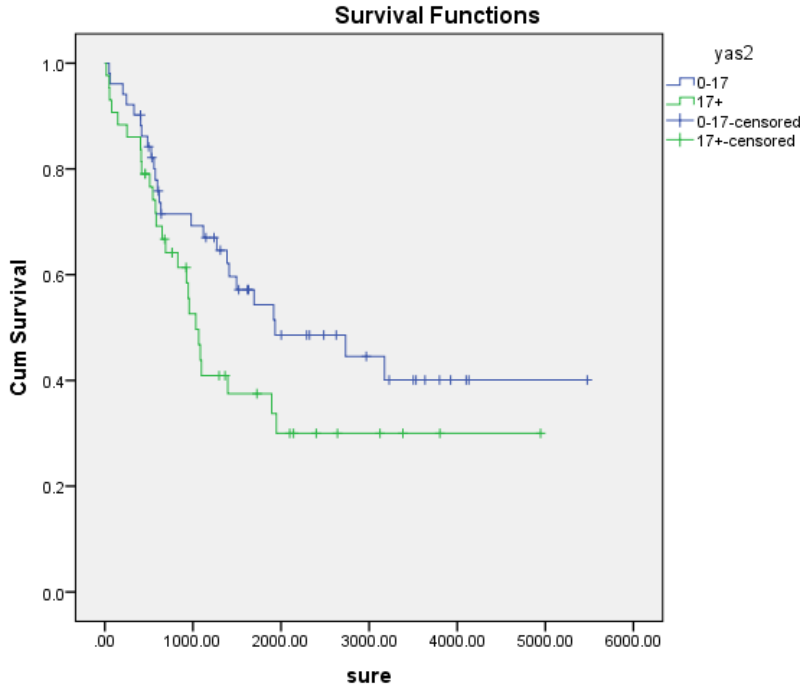
Yaş	Toplam sayı	Ölen hasta sayısı	Censored	
			N	Yüzde
0-17	51	25	26	%51,0
17+	43	26	17	%39,5
Toplam	94	51	43	%45,7

**Tablo 18. Yaşa göre ortalama genel sağkalım (gün)**

Yaş	Ortalama sağkalım süresi				Median sağkalım süresi			
	Gün	Standart Hata	%95 Güven aralığı		Gün	Standart Hata	%95 Güven Aralığı	
			Lower Bound	Upper Bound			Alt limit	Üst limit
0-17	2907,415	347,244	2226,816	3588,014	1932,000	758,852	444,650	3419,350
17+	2037,297	330,666	1389,190	2685,403	1033,000	94,379	848,017	1217,983
Toplam	2576,986	257,961	2071,382	3082,589	1411,000	373,102	679,720	2142,280

**Tablo 19. Yaşa göre ortalama genel sağkalım; Ki-Kare analizi**

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	2,706	1	,100



**Grafik 12. Yaşa bağlı kümülatif sağkalım süresi (gün)**

Nüfus kayıtlarından sağkalım bilgilerine ulaşılabilen ve tümör çapı bilinen 73 hastanın tümör boyutu ile sürvi analizi yapıldığında, başvuran hastaların tümör büyüklüklerinin ortalaması 7,15 cm bulundu. Bu sebeple analizde kırılım noktası 7 cm olarak ele alındı (1=  $\leq 7$  cm, 2=  $>7$  cm). Tümör büyüklüğü  $\leq 7$  cm olan 39 hastanın 21'inin öldüğü (%53,8), 18'inin sağ olduğu (%46,2); tümör büyüklüğü  $>7$  cm olan 34 hastanın ise 20'sinin öldüğü (%58,8), 14'ünün sağ olduğu (%41,2) Kaplan-Meier analizi sonucu tespit edildi (Tablo 20).

Bu hastalar için analiz uygulandığında; tümör büyüklüğü  $\leq 7$  cm olan hastalar için ortalama sağkalım süresinin 2435 ( $\pm 338$ ) gün olduğu bulundu. %95 güven aralığı için yaşam süresi; 1772-3099 gün arası olarak hesaplandı. Tümör büyüklüğü  $>7$  cm olan hastalar için ise ortalama sağkalım süresi 1786 ( $\pm 311$ ) gün iken; %95 güven aralığı için yaşam süresi 1176-2396 gündü. Tüm hastalar için ortalama sağkalım süresi 2223 ( $\pm 255$ ) gün ve %95 güven aralığı için yaşam süresi 1723-2724 gün arasındadır (Tablo 21).

Hasta tümör boyutu ( $\leq 7$  cm ve  $>7$  cm olmak üzere) ile sağkalım süresi arasında korelasyon durumu incelendiğinde, bu faktörün sağkalım süresini etkilemediği tespit edildi (sig.= 0.288) (Tablo 22).

Tümör büyüklüğü  $\leq 7$  cm olan hastaların yaklaşık %60'ında 1500 gün ve üzerinde sağkalım süreleri hesaplanmakla birlikte, 2000 gün civarında sağkalımda dramatik bir düşüş gözlemlendi. Tümör büyüklüğü  $>7$  cm olan hastalarda ise yaklaşık %60'ında 800 gün ve üzerinde sağkalım süreleri hesaplandı. Sağkalım süresi olarak tümör büyüklüğü  $\leq 7$  cm olan hastaların daha uzun yaşadıkları tespit edildi (Grafik 13).

**Tablo 20. Tümör boyutuna göre genel sağkalım**

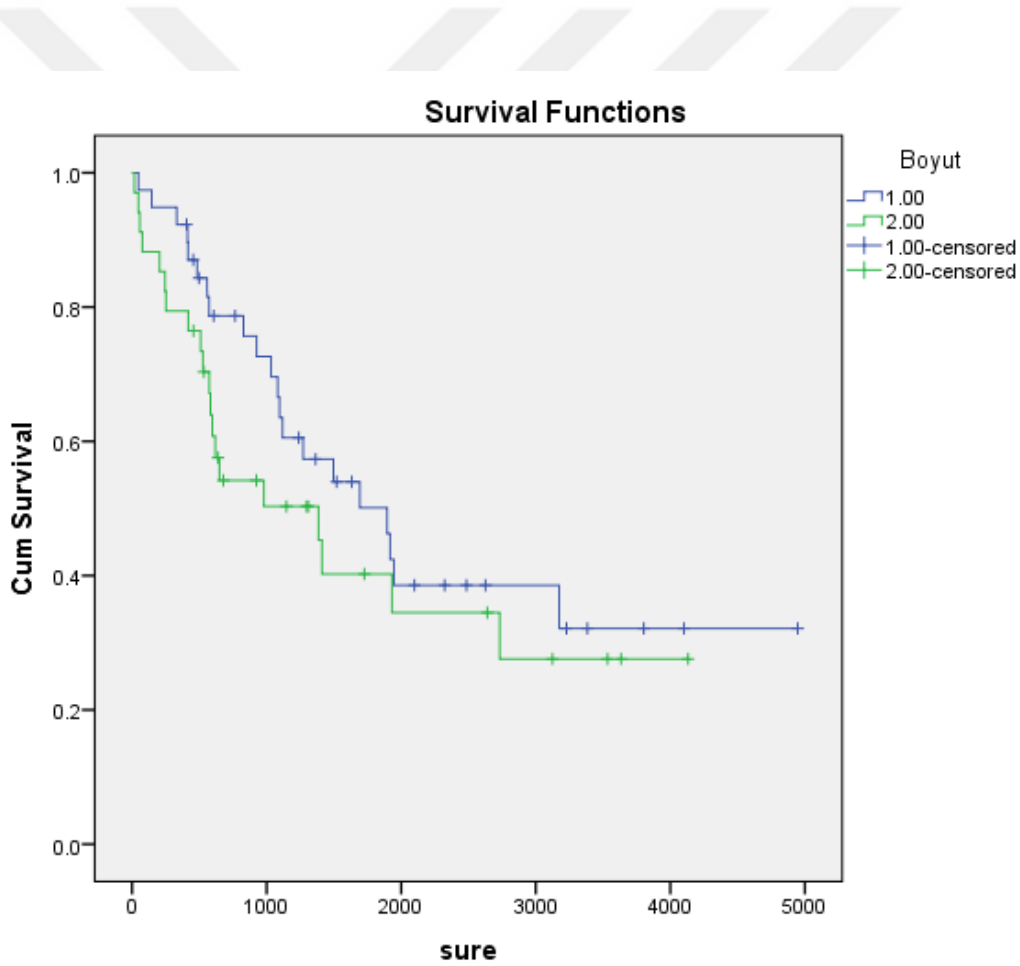
Boyut	Toplam sayı	Ölen hasta sayısı	Censored	
			N	Yüzde
Tümör $\leq 7$ cm	39	21	18	%46,2
Tümör $>7$ cm	34	20	14	%41,2
Toplam	73	41	32	%43,8

**Tablo 21. Tümör boyutuna göre ortalama sağkalım (gün)**

Boyut	Ortalama sağkalım süresi				Median sağkalım süresi			
	Gün	Standart Hata	%95 Güven aralığı		Gün	Standart Hata	%95 Güven aralığı	
			Alt limit	Üst limit			Alt limit	Üst limit
Tümör≤7cm	2435,981	338,304	1772,905	3099,057	1895,000	386,369	1137,716	2652,284
Tümör>7cm	1786,844	311,221	1176,850	2396,838	1386,000	429,488	544,204	2227,796
Toplam	2223,839	255,312	1723,428	2724,250	1411,000	404,911	617,375	2204,625

**Tablo 22. Tümör boyutuna göre ortalama genel sağkalım; Ki-Kare analizi**

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1,130	1	,288



**Grafik 13. Tümör çapına bağlı (≤7cm ve >7cm) kümülatif sağkalım süresi (gün)**

Nüfus kayıtlarından sağkalım bilgilerine ulaşılabilen 94 hastada tümörün lokalizasyonu ile sürvi analizi yapıldığında (1=Yumuşak doku, 2=Kemik, 3=Visseral), lokalizasyonu yumuşak doku olan 48 hastanın 26'sının öldüğü (%54,2), 22'sinin sağ olduğu (%45,8); lokalizasyonu kemik olan 36 hastanın 18'inin öldüğü (%50), 18'inin sağ olduğu (%50); lokalizasyonu visseral olan 10 hastanın ise 7'sinin öldüğü (%70), 3'ünün sağ olduğu (%30) Kaplan-Meier analizi sonucu tespit edildi (Tablo 23).

Bu hastalar için analiz uygulandığında; lokalizasyonu yumuşak doku olan hastalar için ortalama sağkalım süresinin 2471 ( $\pm$ 317) gün olduğu bulundu. %95 güven aralığı için yaşam süresi; 1849-3094 gün arası olarak hesaplandı. Lokalizasyonu kemik olan hastalar için ise ortalama sağkalım süresi 2714 ( $\pm$ 413) gün iken; %95 güven aralığı için yaşam süresi 1903-3525 gündü. Lokalizasyonu visseral olan hastaların da ortalama sağkalım süreleri 1094 ( $\pm$ 315) gün ve %95 güven aralığı için yaşam süresi 475-1713 gün olarak bulundu. Tüm hastalar için ortalama sağkalım süresi 2576 ( $\pm$ 257) gün ve %95 güven aralığı için yaşam süresi 2071-3082 gün arasındır (Tablo 24).

Tümörün lokalizasyonu ile sağkalım süresi arasında korelasyon durumu incelendiğinde, bu faktörün sağkalım süresini etkilemediği tespit edildi (sig.= 0.413) (Tablo 25).

Lokalizasyonu yumuşak doku olan hastaların yaklaşık %60'ında 1000 gün ve üzerinde sağkalım süreleri hesaplanmakla birlikte, 2000 gün civarında sağkalımda dramatik bir düşüş gözlemlendi. Lokalizasyonu kemik olan hastaların yaklaşık %60'ında 1500 gün ve üzerinde sağkalım süreleri hesaplandı. Lokalizasyonu visseral olan hastaların ise yaklaşık %60'ında 500 gün ve üzerinde sağkalım süreleri hesaplanmakla birlikte, 1000 gün civarında sağkalımda dramatik bir düşüş gözlemlendi. Sağkalım süresi olarak tümörün lokalizasyonu kemik olan hastaların daha uzun yaşadıkları tespit edildi (Grafik 14).

**Tablo 23. Tümör yerleşimine göre genel sağkalım**

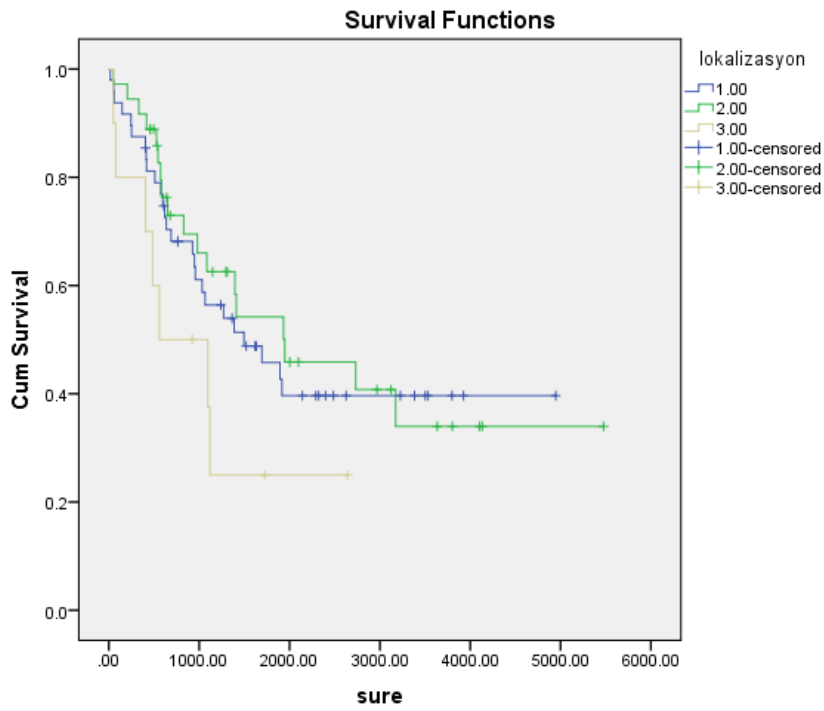
lokalizasyon	Toplam sayı	Ölen hasta sayısı	Censored	
			N	Yüzde
Yumuşak doku	48	26	22	%45,8
Kemik	36	18	18	%50,0
Visseral	10	7	3	%30,0
Toplam	94	51	43	%45,7

**Tablo 24. Tümör yerleşimine göre ortalama genel sağkalım (gün)**

Lokalizasyon	Ortalama sağkalım süresi				Median sağkalım süresi			
	Gün	Standart Hata	%95 Güven aralığı		Gün	Standart Hata	%95 Güven aralığı	
			Alt limit	Üst limit			Alt limit	Üst limit
Yumuşak doku	2471,514	317,598	1849,022	3094,005	1496,000	459,808	594,777	2397,223
Kemik	2714,154	413,819	1903,068	3525,239	1947,000	726,935	522,208	3371,792
Viseral	1094,400	315,895	475,246	1713,554	558,000	430,070	0,000	1400,937
Toplam	2576,986	257,961	2071,382	3082,589	1411,000	373,102	679,720	2142,280

**Tablo 25. Tümör lokalizasyonuna göre ortalama genel sağkalım; Ki-Kare analizi**

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,669	1	,413



**Grafik 14. Tümör lokalizasyonuna bağlı kümülatif sağkalım süresi (gün)**

Nüfus kayıtlarından sağkalım bilgilerine ulaşılabilen ve tümör çapı bilinen 94 hastanın tümör subgrubu ile sürvi analizi yapıldığında (1= EAS, 2= BRS, 3= CRS, 4= Sınıflandırılmayan); morfolojik ve immünohistokimya sonuçlarıyla tekrar değerlendirildiğinde EAS tanısı verdiğimiz 62 hastanın 31'inin öldüğü (%50), 31'inin sağ olduğu (%50); BRS tanısı verdiğimiz 3 hastanın 2'sinin öldüğü (%66,7), 1'inin sağ olduğu (%33,3); CRS tanısı verdiğimiz 5 hastanın 2'sinin öldüğü (%40), 3'ünün sağ olduğu (%60) ve başka türlü sınıflandırılmayan tanısı verdiğimiz 24 hastanın 16'sının öldüğü (%66,7), 8'inin sağ olduğu (%33,3) Kaplan-Meier analizi sonucu tespit edildi (Tablo 26).

Bu hastalar için analiz uygulandığında; EAS tanılı hastalar için ortalama sağkalım süresinin 2213 ( $\pm$ 259) gün olduğu bulundu. %95 güven aralığı için yaşam süresi; 1704-2722 gün arası olarak hesaplandı. BRS tanılı hastalar için ise ortalama sağkalım süresi 1830 ( $\pm$ 1278) gün iken; %95 güven aralığı için yaşam süresi 0-4335 gündü. CRS subgruplu hastaların ortalama sağkalım süresi 1767 ( $\pm$ 701) gün ve %95 güven aralığı için yaşam süresi 391 gün ile 3143 gün arasındadır. Sınıflandırılmayan tümör tipine sahip hastaların ortalama sağkalım süresi ise 1297 ( $\pm$ 235) gündür. Bu hastaların %95 güven aralığı için yaşam süresi 835-1759 gün arası olarak hesaplandı. Tüm hastalar için ortalama sağkalım süresi 2223 ( $\pm$ 255) gün ve %95 güven aralığı için yaşam süresi 1723-2724 gün arasındadır (Tablo 27).

Tümör subgrubu ile sağkalım süresi arasında korelasyon durumu incelendiğinde, bu faktörün sağkalım süresini etkilemediği tespit edildi (sig.= 0.226) (Tablo 28).

EAS tanılı hastaların yaklaşık %60'ının 1500 gün ve üzerinde; BRS tanılı hastaların yaklaşık %60'ının 800 gün ve üzerinde; CRS tanılı hastaların yaklaşık %70'inin 2500 gün ve üzerinde; sınıflandırılmayan tümör tipine sahip hastaların ise yaklaşık %60'ının 1200 gün ve üzerinde sağkalım süreleri hesaplandı. Sağkalım süresi olarak BRS subgruplu hastaların %95 güven aralığı için daha uzun yaşayabildikleri tespit edildi (Grafik 15).

**Tablo 26. Tümör sub grubuna göre genel sağkalım**

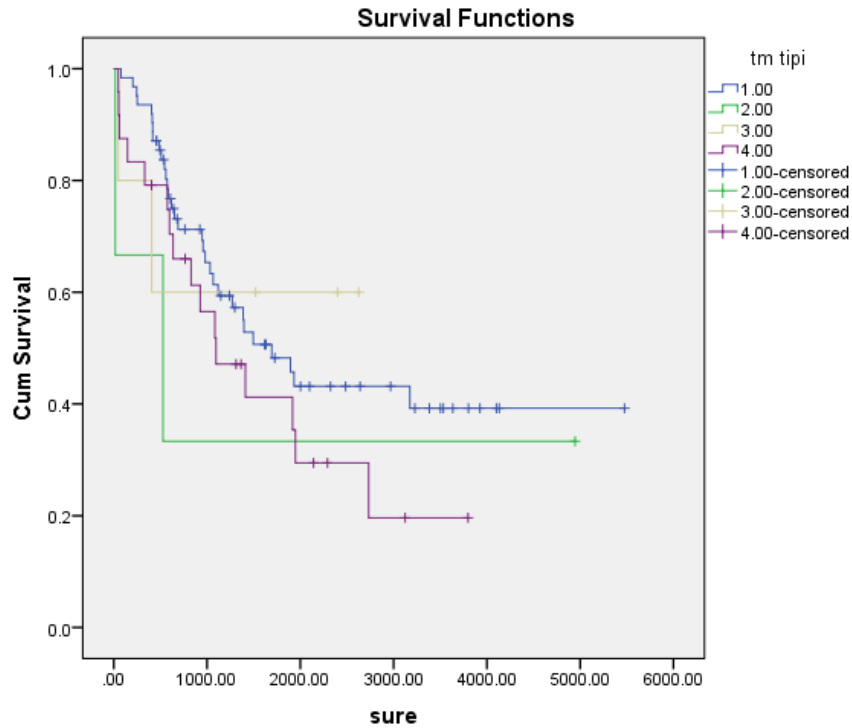
Tümör subgrup	Toplam sayı	Ölen hasta sayısı	Censored	
			N	Yüzde
EAS	62	31	31	%50,0
BRS	3	2	1	%33,3
CRS	5	2	3	%60,0
Sınıflandırılmayan	24	16	8	%33,3
Toplam	94	51	43	%45,7

**Tablo 27. Tümör sub grubuna göre ortalama genel sağkalım (gün)**

Tümör subgrup	Ortalama sağkalım süresi				Median sağkalım süresi			
	Gün	Standart Hata	%95 Güven aralığı		Gün	Standart Hata	%95 Güven aralığı	
			Alt limit	Üst limit			Alt limit	Üst limit
EAS	2784,119	320,398	2156,139	3412,098	1693,000	322,292	1061,308	2324,692
BRS	1830,000	1278,197	0,000	4335,267	527,000	417,230	0,000	1344,770
CRS	1667,200	528,150	632,026	2702,374				
Sınıflandırılmayan	1616,242	293,083	1041,799	2190,685	1096,000	335,844	437,746	1754,254
Toplam	2576,986	257,961	2071,382	3082,589	1411,000	373,102	679,720	2142,280

**Tablo 28. Tümör sub grubuna göre ortalama genel sağkalım; Ki-Kare analizi**

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1,465	1	,226



**Grafik 15. Tümör sub grubuna bağlı kümülatif sağkalım süresi (gün)**



## 5. TARTIŞMA

Küçük yuvarlak hücreli sarkomlar, klinik olarak agresif gidişli, heterojen bir grup olup, sıklıkla çocuk ve adölesanlarda görülmektedir. Bu grubun büyük çoğunluğunu Ewing/PNET ailesi sarkomlar oluşturmaktadır.

Histomorfolojik incelemede küçük, yuvarlak, mavi nükleuslu, belli belirsiz sitoplazmalı benzer spektrumda dağılan tümöral hücrelerden oluşmaları sebebiyle, kendi aralarında ayırıcı tanıda güçlük oluştururlar. Tedavi süreçlerinin ve prognostik farklılıkların olması nedeniyle yuvarlak hücreli sarkomlara doğru tanı verilmesi önemlidir.

Bu grupta yer alan sarkomlarda, moleküler çalışmaların yoğunlaşması ve gelişmesi ile birlikte, tümör tipine özgü spesifik translokasyonlar tanımlanmaya başlanmıştır. Tanıda altın standart, bu tümörlere ait genetik değişikliklerin, moleküler testlerle gösterilmesidir. Ancak moleküler testlere erişim kısıtlı ve bu testlerin maliyeti yüksek olduğundan; moleküler testlerle korelasyonu olan, spesifitesi ve sensitivitesi yüksek, rutinde daha kolay erişilebilecek yeni immunhistokimyasal belirteçlerin bulunması ihtiyacı doğmuştur.

Yuvarlak hücreli sarkomların büyük kısmını Ewing/PNET ailesi sarkomlar oluşturmaktadır. Yıllarca kullanılan Ewing sarkomu, PNET, Askin tümörü gibi adlandırmalar, bu tümörlerin ortak olarak *EWSR1* rearanjmanı gösterdiğinin saptanmasıyla terk edilmiş ve Ewing/PNET ailesi sarkomlar olarak tanımlanmışlardır.

Yuvarlak hücreli sarkomlar içerisinde, yakın zamana kadar EAS olarak değerlendirilen bazı tümörlerin *EWSR1* gen rearanjmanı içermediği görülmüştür. Bu gruba yapılan moleküler çalışmalar sonucunda bu tümörlerin, *CIC* veya *BCOR* rearanjmanı gösterdiği saptanmış ve Ewing-benzeri sarkom olarak gruplandırılmışlardır. *CIC/DUX4* veya *CIC/FOXO4* gen füzyonu sonucu oluşan *CIC* rearanjmanı CRS'nin; *BCOR/CCNB3*, *BCOR/MAML3*, *BCOR/ZC3H7B* gen füzyonu sonucu oluşan *BCOR* rearanjmanı BRS'nin tanımlayıcı genetik özelliğidir (54,56,64,69). Bu füzyonların protein ürünlerine karşı immunhistokimyasal belirteç bulunmasıyla ilgili yapılan çalışmalarda, *CIC* rearanjmanı gösteren sarkomlar için; ETV4, WT1, DUX4 gibi belirteçler, *BCOR* rearanjmanı gösteren sarkomlar için; CCNB3, BCOR gibi belirteçler kullanıma sunulmuştur. Hem Ewing benzeri sarkom grubunun çok nadir olması hem de ilgili antikörlerin nispeten yakın tarihte kullanıma sunulmuş olmaları sebebiyle immunhistokimyasal incelemenin, moleküler testlerle korelasyonu açısından yapılan çalışma sayısı kısıtlıdır.

EAS sıklıkla 2. dekatta görülmektedir. Vakaların yaklaşık %80'i, 20 yaşın altındadır. Erkek/kadın oranı 1.4/1'dir. Çalışmamızda tanı yaşı literatüre göre yüksek olup, yaş ortalaması 18,9'dur (0-49). Vakaların yaklaşık %58'i 20 yaşın altındadır. E/K oranı 1.19'du (Tablo 9). Kadın hasta oranı literatüre göre hafif yüksektir.

En sık yerleşim yeri uzun kemiklerin diyafizi veya metafiz-diyafiz geçiştir. En sık tutulan kemikler femur, tibia ve humerustur (12). Ekstraosseöz yerleşimli EAS'ler sıklıkla ekstremitelerin derin yumuşak dokularından köken alır. Daha az görüldüğü yerler paravertebral yumuşak doku ve göğüs duvarıdır (13). Çalışmamızda yumuşak doku yerleşimi baskındır (%48). Kemik yerleşimli tümörlerde, literatürle uyumlu olarak, en sık yerleşim yeri femur olup, yumuşak doku yerleşimli vakalarda gövde yerleşimi en sık olarak izlenmiştir. Serimizde ortalama tümör çapı, EAS'ler için, 7,7 cm olup 1,4 cm ile 18,5 cm arasında değişmektedir. (Tablo 10).

Vakaların çoğu morfolojik olarak; üniform, küçük-orta boyutta, yuvarlak tümöral hücrelerden oluşur. Tümöral hücrelerin nükleusları yuvarlak, kromatin yapısı genelde incedir. Sitoplazma sıklıkla belli belirsiz olmakla birlikte berrak veya eozinofilik de olabilir. Solid büyüme paterni ve stromanın yokluğu diğer önemli özelliklerindedir. Serimizde vakaların tamamında histomorfolojik olarak EAS morfolojik özellikleri görüldü (Tablo 11).

EAS'ler immunhistokimyasal incelemede; CD99 ile yaygın membranöz, FLI1 ile yaygın nükleer reaktivite göstermektedir (11,21). Fakat CD99 ve FLI1 belirteçlerinin zamanla diğer pek çok küçük yuvarlak hücreli tümörde de değişen oranlarda reaktivite gösterdiği görüldü (15,22,23). Yakın zamanda tanımlanan NKX2.2 belirteciyle Yoshida ve arkadaşları, 30 adet genetik olarak konfirme EAS'de %93 oranında difüz, nükleer, orta-kuvvetli yoğunlukta pozitif boyanma saptamıştır. CD99, FLI1 gibi diğer immunhistokimyasal belirteçlerle birlikte kullanıldığında sensitivite ve spesifitesini oldukça yüksek bulmuştur (27). Hung ve arkadaşları 40 EAS vakasında Yoshida'nın çalışmasına benzer şekilde %93 oranında pozitiflik saptamışlardır (1). NKX2.2'nin literatürde sensitivitesi %80, spesifitesi %84 olarak bildirilmekle birlikte, CD99'la beraber kullanıldığında spesifitesi %98'e ulaşmaktadır (28).

Çalışmamızda 90 vaka EAS yönünde değerlendirildi. Bu 90 vakanın 89'unda NKX2.2 ile pozitiflik saptandı. Bizim vakalarımızda da NKX2.2 sensitivitesi literatürle uyumlu olarak yüksekti. 1 vaka teknik başarısızlık sebebiyle değerlendirilemedi; ancak moleküler olarak bölümümüzde çalışılan *EWSR1* rearanjmanının pozitif olması ve bu vakada membranöz, kuvvetli CD99 ekspresyonu görülmesi sebebiyle EAS grubunda kabul edildi. Değerlendirmeye elverişli 89 vaka baz alındığında; NKX2.2 ile 78 vakada difüz (3+, 4+), 11 vakada fokal

boyanma (1+, 2+) görüldü (Tablo 5). CD99 ile 90 vakanın 86'sı değerlendirmeye elverişli olup; 83 vakada (%96,5) membranöz pozitiflik saptandı. NKX2.2 ile fokal boyanan vakaların 10'u CD99 ile kuvvetli pozitif. CD99'un negatif olduğu veya fokal boyandığı 7 vakanın tümü NKX2.2 için difüz pozitif.

EAS grubunda değerlendirilen 90 vakada WT1 ile negatiflik izlendi. ETV4 ile 21 vakada pozitiflik görüldü. ETV4 boyanması sebebiyle CRS'nin ayırıcı tanıya alınmasını gerektiren 21 vakanın hiçbirinde WT1 ile pozitiflik izlenmedi. NKX2.2'nin bu vakaların, teknik başarısızlık sebebiyle değerlendirilemeyen 1 vaka hariç, tümünde pozitif olması, 1 vaka hariç eşlik eden difüz CD99 reaktivitesi sebebiyle ayırıcı tanıda göz önünde bulundurulmuş CRS'den uzaklaştırıldı. ETV4 pozitifliği görülen bu vakaların 5'inde *EWSR1* rearanjmanı da saptanmıştı. Hem NKX2.2 hem ETV4'te görülen bu pozitifliğin, literatürde %1'den az vakada bildirilen *EWSR1-ETV4* füzyonu ile ilişkili olabileceği düşünülse de ileri moleküler inceleme yapılamadı ve bununla ilgili literatür desteği de bulunamadı.

Hung ve arkadaşlarının çalışmasında, 40 EAS vakasının 12'sinde (%30) fokal ETV4 pozitifliği bildirilmekle birlikte bunların hiçbirinde eşlik eden WT1 boyanması izlenmemiştir (60). Guellec ve arkadaşlarının çalışmasında ise 43 EAS vakasının 4'ünde (%9.3) ETV4 ile immünohistokimyasal olarak fokal reaktivite görülmüştü (70). Bizim serimizde de ETV4 ile boyanma oranı literatürle paralellik göstermektedir (%23,3).

Çalışmamızda CCNB3 reaktivitesi gösteren 10, BCOR reaktivitesi gösteren 19 EAS vakası incelendiğinde; bunların sadece 3'ünde her iki antikor için nükleer reaktivite görülmüştür. CCNB3 reaktivitesi gösteren kalan 7 vakada BCOR boyanması non-spesifik (sitoplazmik boyanma). BCOR boyanmasının izlendiği kalan 16 vakada ise CCNB3 negatif. BCOR ve CCNB3'ün birlikte pozitif olduğu 3 vakanın tamamında CD99 ve NKX2.2 kuvvetli pozitif. Ayrıca bu vakaların ikisinde *EWSR1* rearanjmanı saptanmıştı. BCOR pozitifliği gösteren 19 vakanın tümünde NKX2.2; 2'si hariç tümünde CD99 pozitif. Bu bilgiler ışığında BRS tanısından uzaklaştırıldı.

Literatürde Matsuyama ve arkadaşlarının çalışmasında 18 EAS vakasından 1'inde hem CCNB3 hem de BCOR'la boyanma bildirilmiştir. Ayrıca 1 vakada sadece BCOR ile reaktivite izlenmiştir (67). Kao ve arkadaşlarının serisinde de 8 EAS vakasından 1'inde yamalı BCOR pozitifliği mevcuttur (68). Serimizdeki 90 vakanın sadece 3'ünde BCOR ve CCNB3'ün birlikte reaktivitesi görüldü; literatürle uyumlu olarak değerlendirildi.

134 vakanın morfolojik ve immünohistokimyasal boyanma özelliklerine göre yaptığımız sınıflama sonucunda 7 vaka CRS olabileceği yönünde değerlendirilmiştir.

CRS'lerde yapılan çalışmalarda yaş ortalaması 24-32 arasında değişmektedir. En sık gövde ve ekstremitelerde olmak üzere yumuşak doku yerleşimi siktir. CRS olabileceği yönünde yorumladığımız 7 vakanın yaş ortalaması 18,7 olarak bulundu (Tablo 10). Vakaların çoğunluğu, literatürle uyumlu olarak, yumuşak doku yerleşimliydi (%71,4). Vakalarımızda hafif erkek baskınlığı görüldü (E: 4, K: 3). Bu özellik de literatürle uyumlu olarak saptandı.

CRS'lerde klinik özellikler EAS ile benzerdir. WHO sınıflandırmasında indifferansiye yuvarlak hücreli sarkomlar grubunda kabul edilmektedir. Morfolojik özellikleri de EAS ile benzerdir. Yine benzer şekilde geniş serilerde yapılan çalışmalarda baskın hücre tipi yuvarlak-ovoid, büyüme paterni soliddir. Fokal işsi hücreli alanlar ve stromada miksoid değişiklikler literatürde bildirilmiştir (51,57–59). Çalışmamızda CRS olabileceği yönünde yorumlanan tüm vakalarda yuvarlak hücre morfolojisi ve solid büyüme paterni mevcuttur. Kalın kollajenöz septanın dikkat çektiği seriler mevcut olup vakalarımızın sadece birinde bu özellik izlendi. Bizim vakalarımızda işsi hücreli morfoloji ve stromada miksoid değişiklikler gözlenmedi (Tablo 11). Vakalarımızın 3'ü kesici iğne biyopsisine, 3'ü insizyonel biyopsiye ait olduğu için, farklı morfolojilerin biyopsi materyalinde temsil edilmemiş olabileceği düşünüldü.

Çalışmamızda CRS yönünde yorumladığımız 7 vakanın tamamında NKX2.2 negatif, CD99 reaktivitesi; negatiften difüz pozitif kadar bir spektrumda dağılmaktaydı. Literatürde CRS vakalarında, NKX2.2 ile %5'e varan oranlarda boyanma olduğu gözlenmiştir (1). CD99 ile de fokalden difüze kadar değişen bir spektrumda reaktivite gösterdiği bildirilmiştir (1,51,57–59).

CRS vakalarında literatürde immünohistokimyasal olarak WT1 ve ETV4 ile yaygın ve kuvvetli nükleer boyanma gösterilmiştir. Bizim vakalarımızın tümünde ETV4 ile 1+ ile 4+ arasında değişen pozitiflik vardı. Bunların 4'ünde nükleer, 3'ünde sitoplazmik WT1 reaktivitesi de eşlik etmekteydi. Specht ve arkadaşlarının 21 vakalık CRS serisinde; ETV4 boyanmasına eşlik eden WT1 boyanması sıklıkla nükleer ve sitoplazmikti; ancak bir vakada WT1 ile sadece sitoplazmik boyanma da bildirilmiştir (57). Serimizdeki sitoplazmik boyanmalar da dikkate alındığında WT1 ve ETV4'ün reaktivitesi literatürle uyumludur. Ancak sitoplazmik boyanma ile ilgili literatürde veri oldukça sınırlıdır.

Hung ve arkadaşları, WT1'in CRS'lerde sensitivitesini %95, spesifitesini %81; ETV4'ün sensitivitesini %90, spesifitesini %95 olarak bildirmişti (58,60). DUX4 belirtecini

de bu tümörler için sensitivite ve spesifitesinin yüksek olduğu bildirilmiştir (61). BCOR ve CCNB3 ile bu sarkomlarda boyanma görülmemiştir (62,68).

Her ne kadar BCOR ve CCNB3'ün bu tümörlerde boyanmadığı bildirilmiş olsa da çalışmamızda 1 vakada izole BCOR, başka bir vakada izole CCNB3'ün fokal ve zayıf pozitifliği görülmüştür.

BRS'ler de CRS'ler gibi WHO sınıflamasında indiferansiye yuvarlak hücreli sarkomlar grubunda yer alır. Nadir görülen tümörlerdir. Erkeklerde ve ikinci dekatta sık görülür. Bazı çalışmalarda en sık yerleşim yeri olarak kemik, diğerlerinde yumuşak doku bildirilmiştir. Çalışmamızda BRS olabileceği yönünde yorumlanan 6 vakanın en sık görüldüğü dekat, literatürden farklı olarak 3. dekattı. Literatürle uyumlu olarak erkek hasta (n: 5) ve kemik yerleşimi (n: 4) sıklığı (Tablo 10).

BRS'lerde sıklıkla EAS gibi monoton, küçük, yuvarlak hücreli morfoloji hakim olmakla birlikte, işsi hücreli, düzensiz, angüle nükleuslu, veziküler kromatinli morfoloji de görülebilir. Bu grupta da mikroid stroma eşlik edebilir (65,67,68). Çalışmamızdaki vakaların tümü yuvarlak hücre morfolojisinde olup; 1 vakada düzensiz, angüle çekirdek yapısı, 1 vakada epiteloid hücre görünümü dikkati çekti. 1 vakada kromatin veziküler, diğerlerinde ince olarak izlendi (Tablo 11).

BRS'lerin çalışmalarda immunhistokimyasal olarak CCNB3 ve BCOR belirteçleri ile difüz kuvvetli nükleer boyanma gösterdiği saptanmıştır (64–68). CCNB3 belirtecinin sensitivite ve spesifitesinin yüksek olduğu bildirilmiştir (64). Benzer şekilde, BCOR belirtecinin de *BCOR* rearanjmanı gösteren sarkomlar için oldukça sensitif olduğu öne sürülmüştür (68). Fakat, yuvarlak hücreli sarkomlarda ayırıcı tanıda yer alan, özellikle az diferansiye sinoviyal sarkomlarda olmak üzere, sinoviyal sarkomlarda da orta-yoğun BCOR immunreaktivitesi bildirilmiştir (68). Ancak literatürde yakın zamana kadar bildirilen, genetik olarak konfirme çok az sayıda BRS vardır ve bunlarla ilgili immunhistokimyasal özelliklerin analizinin yapıldığı seriler de kısıtlıdır. BRS'lerde, az sayıda seride yapılan çalışmalarda NKX2.2, ETV4 ve WT1 ile boyanma görülmemiştir. CD99 ile vakaların yarısından fazlasında negatiflik bildirilmekle birlikte, fokalden difüze değişen oranda boyanmalar da tariflenmiştir (60,67). Kuvvetli membranöz pozitifliğin görülebildiği vakaların yanı sıra bu tümörler için genel boyanma paterninin; yamalı, sitoplazmik ve fokal olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda, BRS olabileceği yönünde değerlendirdiğimiz 6 vakanın tümünde 2+ ile 4+ arası değişen yaygınlıkta, kuvvetli BCOR reaktivitesi görüldü. Bu vakaların tümüne 1+ ile

3+ arasında değişen yoğunluklarda CCNB3 pozitifliği eşlik etmekteydi. Serimizin immünohistokimyasal olarak BCOR ve CCNB3 antikorlarıyla boyanma özelliği, literatür ile uyumlu olarak değerlendirildi.

BRS yönünde değerlendirdiğimiz vakaların CD99 ile immünohistokimyasal boyanma özellikleri şöyleydi; negatif: 1 vaka, fokal pozitif: 2 vaka, difüz pozitif: 3 vaka. Vakaların 4'üne zayıf ve seyrek (1+) NKX2.2 reaktivitesi eşlik etmekteydi. NKX2.2, 2 vakada negatifti. CD99 antikorunun boyanma özelliği literatür ile uyumlu olarak değerlendirildi.

NKX2.2 ile zayıf ve seyrek pozitiflik görülen 4 vakanın morfolojik özellikleri, hastaya ait özellikler ve kuvvetli CCNB3 ve BCOR reaktivitesi sebebiyle; bu vakalar BRS yönünde değerlendirildi. Bu dört vakanın biri CD99 negatifti, diğerlerinde fokal pozitiflik mevcuttu. NKX2.2'nin bu tümörlerde negatif olduğu bildirilmiştir, ancak genetik olarak konfirme BRS'lerde NKX2.2 antikoruyla ilgili çok kısıtlı veri vardır ve vakalarla sınırlıdır. Çalışmamızın zayıf yanı olarak BRS yönünde değerlendirdiğimiz vakalara genetik test uygulanamadı ve sadece immünohistokimyasal incelemenin sınıflandırmaya katkısı araştırıldı. Dolayısıyla morfolojik ve immünohistokimyasal incelemeye, uygun klinikopatolojik senaryo eşlik ediyorsa çalışmamıza aldığımız vakalar BRS yönünde değerlendirildi. NKX2.2 antikoruyla literatür ve çalışmamız arasındaki farkın; literatürde az sayıda genetik olarak konfirme BRS vakasında NKX2.2 çalışılması veya çalışmamıza aldığımız vakaların moleküler konfirmasyonunun olmaması ile ilişkili olabileceği düşünöldü.

WT1 tüm vakalarda negatifti. ETV4 bir vakada 1+, bir vakada 2+ olarak değerlendirildi; diğer vakalarda negatifti. WT1 antikoruyla boyanma bulguları, literatürle uyumlu olarak bulundu. ETV4'ün iki vakada pozitiflik göstermesi, literatüre göre yüksek bulundu. Ancak WT1'in eşlik etmemesi sebebiyle nonspesifik olarak değerlendirildi.

Işık mikroskopu, elektron mikroskopu, immünohistokimya, FISH, PCR vb. gibi mevcut imkanlarla incelendiğinde herhangi bir yöne diferansiyasyon göstermeyen sarkomlar; güncel WHO sınıflamasında; indiferansiye/sınıflandırılmayan sarkomlar olarak sınıflandırılmışlardır. Bu grubun, morfolojik özelliklere göre, yuvarlak hücreli, iğsi hücreli, pleomorfik ve epitelooid olmak üzere 4 alt grubu vardır. Bu gruplara yapılan genetik çalışmalar sonucu yeni subgruplar ortaya çıkmaktadır. Örneğin indiferansiye/sınıflandırılmayan yuvarlak hücreli sarkomlara yapılan moleküler çalışmalar sonucunda CRS ve BRS gibi 2 yeni antite ortaya çıkmıştır. Tüm sarkomların yaklaşık %20'sini oluştururlar (47).

Çalışmamıza aldığımız 134 vakanın 31'i mevcut klinik, morfolojik ve immünohistokimyasal özelliklere göre sınıflandırılmadı. Bu vakaların 3'ünde *EWSR1* rearanjmanı çalışılmış ve negatif bulunmuştu. 31 vakanın bir kısmında CD99 pozitifliği mevcuttu. CD99 antikoruna ile çok sayıda yuvarlak hücreli sarkomun reaktivite gösterebilmesi ve NKX2.2 ile CD99 boyanmasını destekleyecek özellik görülmemesi sebebiyle 31 vaka sınıflandırılmayan gruba dahil edildi. Bu vakaların sınıflandırılabilmesi için immünohistokimyanın yetersiz kaldığı; FISH, PCR, elektron mikroskopisi gibi yöntemler ile ileri incelemelere gerek duyulduğu düşünüldü.

EAS'lerde yapılan muhtelif çalışmalarda sürviye etki eden faktörler detaylı olarak çalışılmıştır. Geniş kohortlarda yapılan 11 çalışmanın 6'sında ileri yaş, kötü genel sağkalımla ilişkilendirilmiştir. Bu ilişkinin kurulduğu altı yayının üçü 18 yaş (71–73), biri 14 yaş (74) eşik değeri olarak kabul etmiştir. Diğer iki çalışmada artan yaş, kötü genel sağkalımla ilişkilendirilmiştir (75,76). 5 çalışmada ise yaş ile genel sağkalım arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Artan yaş, bu çalışmalar göz önünde bulundurularak, kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir, ancak farklı çalışmalarda eşik değeri olarak farklı yaşların kullanılması sebebiyle tutarlı ve istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Bizim çalışmamızda 18 yaş (<18 ve ≥18) eşik değeri olarak kabul edildi. Hasta yaşı ile sağkalım süresi arası korelasyon durumu incelendiğinde, bu faktörün %90 güven aralığı için sağkalım süresini etkilediği tespit edildi (sig.=0.100). 18 yaş altı hastalarda prognoz daha iyi bulundu.

Sürviye etkisi geniş serilerde çalışılan bir diğer faktör cinsiyettir. Prognoza ve sürviye etkisi 14 geniş seride araştırılmış, sadece 2 seride anlamlı bulunmuştur (72,77). Hemen tüm serilerde kadın cinsiyetin daha iyi prognozla ve genel sağkalımla ilişkili olduğu ifade edilmiştir. SEER verilerine göre de kadın cinsiyet daha iyi prognoz ve sürviye ile ilişkilendirilmiştir. Ancak bu çalışmalarda ve SEER verilerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilememiştir. Bizim çalışmamızda da sağkalım bilgisine ulaşabildiğimiz 94 hastada, cinsiyetin sağkalım faktörünü etkilemediği görüldü (sig.=0.273). Yine de literatürdeki çalışmaların büyük çoğunluğuyla uyumlu olarak kadın hastaların daha uzun genel sağkalım süresi gösterdikleri tespit edildi.

Tümör çapının genel sağkalımla ilişkisinin araştırıldığı 7 geniş serinin 6'sında, eşik değeri 8 cm, 1'inde 10 cm olarak kabul edilmiş; genel sağkalım ile istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmuştur (72,78–83). Büyük tümör çapı, kötü sağkalımla ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte tümör çapı için eşik değeri olarak 5 cm ve 8 cm'yi kabul eden iki çalışmada; tümör çapı ile genel sağkalım arasında anlamlı fark bulunmamıştır (84,85). Çalışmamızda tümör çapı için

eşik değer 7 cm ( $\leq 7$  ve  $>7$ ) alındı. Tümör boyutu ile sağkalım süresi arasında korelasyon durumu incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (sig.=0.288); ancak tümör büyüklüğü  $\leq 7$  cm olan hastaların daha uzun yaşadıkları tespit edildi.

Tümör lokalizasyonuna göre genel sağkalımın araştırıldığı çalışmalarda kemik veya yumuşak doku yerleşimi arasında anlamlı fark bulunmamıştı (76,82,84). Çalışmamızda kemik ve yumuşak doku yerleşimine ek olarak viseral yerleşimli olgular da istatistiksel olarak çalışıldı. Bu üç yerleşim yeri ile sağkalım süresi arasında korelasyon durumu incelendiğinde, bu faktörün sağkalım süresini etkilemediği görüldü (sig.=0.413). Ancak tümörü kemik orijinli olan hastaların en uzun, viseral yerleşimli hastaların en kısa sağkalım süresi gösterdiği görüldü. Literatürde, tanı anında metastaz varlığı en önemli prognostik veri olarak kabul edilmektedir. Çalışmamızda yer alan viseral yerleşimli 10 vakanın 7'si metastaza aittir. İstatistiksel olarak anlamlı çıkmamış olsa da bu yerleşimin daha kısa sağkalım süresine sahip olması beklenen bir sonuçtur.

EAS, BRS, CRS ve sınıflandırılmayan gruptaki vakalarda, sağkalım bilgisine ulaşılabilen 94 hastanın, tümör tipi ile genel sağkalım süresi arasında, BRS ve CRS tanılu vaka sayısı oldukça az olduğundan, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (sig.=0.226). Ancak istatistiksel veriler analiz edildiğinde, literatürle uyumlu olarak en kötü sağkalım süresi CRS'lerde, en iyi sağkalım süresi EAS'lerde saptandı. BRS'lerin sağkalım süresi de literatürle uyumlu olarak, EAS'lerinkine benzerdi.

Yuvarlak hücreli sarkomların güncel veriler ışığında sınıflandırılmasına katkısını araştırmak üzere yaptığımız çalışmada NKX2.2, WT1, ETV4 ve CCNB3 ile optimal; BCOR ile optimale yakın sonuç alındı.

NKX2.2, sensitivitesi, literatürle uyumlu olarak, ileri derecede yüksek olarak bulundu. EAS yönünde değerlendirilmiş tüm vakalarda değişen oranlarda pozitiflik saptandı. Serimizde *EWSR1* rearanjmanı saptanmış 11 vakanın 10'unda kuvvetli reaktivite görüldü; 1 vakada ise teknik nedenlerden ötürü değerlendirilemedi. *EWSR1* negatif 4 adet vakanın 3'ünde negatif, 1'inde fokal zayıf pozitif bulundu. Uygun koşullarda çalışıldığında, özellikle diğer belirteçlerle korelasyonu sağlandığında, EAS için oldukça sensitif bir belirteç olduğu dşnld.

Çalışmamızda WT1 ile optimal sonuçlar elde edildi. *CIC* rearanjmanı gösteren sarkom yönünde düşündüren vakaların tümünde pozitiflik mevcuttu. 4 vakada sadece nükleer, 3 vakada sadece sitoplazmik reaktivite görüldü. Nükleer pozitiflik durumunda ön planda CRS'nin ayırıcı tanıya alınmasının gerektiği dşnld; zira EAS, BRS veya sınıflandırılmayan gruptaki



hiçbir vakada nükleer WT1 reaktivitesi görülmedi. Ayrıca serimizdeki *EWSR1* pozitif 11 vakanın tamamında negatifti. Specht ve arkadaşlarının serisinde, genetik olarak konfirme 1 CRS vakasında sitoplazmik WT1 boyanması bildirilmişti. Serimizdeki EAS'lerin 3'ünde, sınıflandırılmayan gruptaki vakaların 4'ünde sitoplazmik WT1 pozitifliği görüldü. BRS yönünde değerlendirilen hiçbir vakada boyanma görülmedi. Sitoplazmik WT1 boyanması durumunda, uygun klinikopatolojik senaryonun da varlığında ETV4 ile beraber değerlendirildiğinde CRS'ye işaret edebileceği düşünüldü. Bununla ilgili genetik olarak CRS olduğu konfirme olan vakalarda ve daha geniş serilerde çalışma yapılması gerekmektedir.

ETV4 immünohistokimyası ile de optimal sonuçlar alındı. CRS yönünde yorumlanan vakaların tamamında pozitiflik saptandı. ETV4 ile; EAS grubunda değerlendirilen 90 vakanın 21'inde ETV4 reaktivitesi görüldü. Bu literatürle uyumlu bir bulguydu. *EWSR1* pozitif 11 vakanın 5'inde de ETV4 reaktivitesi görüldü. EAS'lerde de pozitiflik oranının yüksek olması sebebiyle, WT1 ile kombine edilerek veya *EWSR1* negatif tümörlerde kullanılması gerektiği düşünüldü.

CCNB3 antikoru serimizde BRS yönünde düşündürülen tüm vakalarda pozitif saptandı. EAS grubunda değerlendirilen 90 vakanın 10'unda, CRS yönünde değerlendirilen 7 vakanın 1'inde ve sınıflandırılmayan gruptaki 31 vakanın 5'inde reaktivite görüldü. Ayrıca *EWSR1* pozitif 11 vakanın 3'ünde boyanma görüldü. Bu antikorun da, ETV4 ile benzer şekilde, BRS dışı grupta sık boyandığı, dolayısıyla ek bir immünohistokimyasal belirteçle kombine kullanılması gerektiği düşünüldü.

Çalışmamızda BCOR antikoruyla, teknik nedenlerden ötürü, suboptimal sonuç elde edildi. Pozitif ve negatif kontrollerde efektif çalışmasına rağmen vakalarımızda teknik artefaktlar sık olarak gözlemlendi. Mikroskopi aşamasında, teknik artefaktlar nedeniyle zor değerlendirilen vakalarda, diğer immünohistokimyasal belirteçlerle korelasyonu da göz önünde bulunduruldu. EAS vakalarının 21'inde, sınıflandırılmayan vakaların 13'ünde ve CRS yönünde değerlendirilen vakaların 1'inde sitoplazmik ve nükleer, genelde sıvanma tarzında, reaktivite görüldü. *EWSR1* pozitif 11 vakanın 3'ünde boyanma mevcuttu. Bu antikorun da diğer belirteçlerle kombine edilerek kullanılması gerektiği düşünüldü. Ayrıca çalışmamızda kullandığımız klon, geniş serilerin çoğunda kullanılan klondan farklıydı. BRS'nin yeni bir antite olması ve vaka sayısının ileri derecede az olması sebebiyle uygun ticari klonun geliştirilmesi için ek çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünüldü.

İmmünohistokimyasal olarak NKX2.2, WT1, ETV4, CCNB3 ve BCOR antikolarını çalıştığımız serimizde tanısı değiştirilen vakalar şu şekildeydi: ilk tanısı EAS olan 6 vaka BRS;

ilk tanısı EAS olan 2 vaka, yuvarlak hücreli malign mezenkimal tümör olan 3 vaka, indiferansiye yuvarlak hücreli sarkom olan 2 vaka CRS olarak revize edildi. Ayrıca daha önceden indiferansiye yuvarlak hücreli sarkom grubunda tanı verilen 7 vaka; NKX2.2'nin kuvvetli pozitifliği ile EAS olarak değerlendirildi.

Yuvarlak hücreli sarkomlarda tanı için altın standart moleküler yöntemlerle, tümöre ait genetik değişikliklerin gösterilmesidir. Ancak bu testlere erişim zordur ve bu testlerin maliyetleri yüksektir. Dolayısıyla immünohistokimyasal incelemenin tam sınıflamaya katkısı sınırlı olsa da, moleküler test gerektirecek hastaların seçiminde son derece faydalıdır. Özellikle kombine edilerek kullanıldığında spesifisite ve sensitiviteyi yükselmekte, moleküler testlere ihtiyacı azaltmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız NKX2.2, WT1, ETV4, CCNB3 ve BCOR bu ayrımı sağlamada oldukça etkili bulunmuştur.



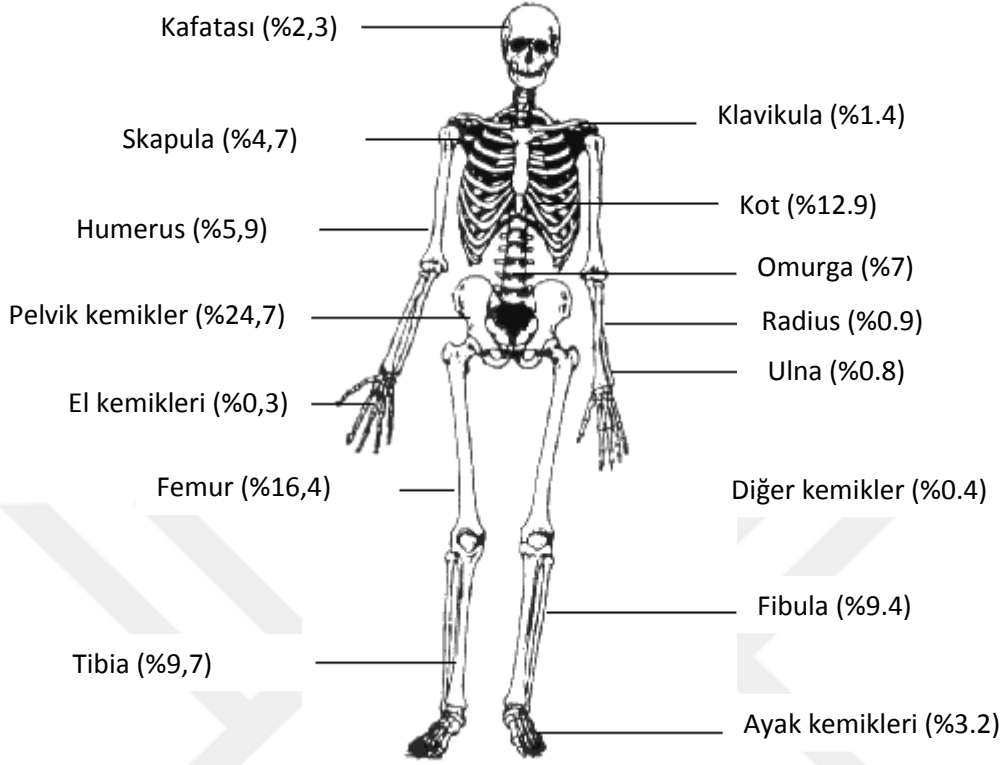
## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- Çalışmamıza aldığımız 134 vakanın 90'ı EAS, 7'si CRS, 6'sı BRS, 31'i sınıflandırılmayan grupta tanımlandı.
- Klinik başvuru şikayetlerine erişilebilen vakalarda, en sık semptom ağrı ve hassasiyettir. Literatürden farklı olarak serimizde en sık yerleşim yeri yumuşak dokudur (%50).
- Kemik yerleşimli tümörlerde (%40), literatürle uyumlu olarak en sık yerleşim yeri uzun kemik ve bunlar arasında femurdur.
- Tüm vakalarda yuvarlak hücre morfolojisi ve solid büyüme paterni baskındı. Bu özellikler literatür ile uyumludur; fakat literatürde tariflenen EAS dışı tümörlerde sık görüldüğü bildirilen fokal iğsi hücreli morfoloji ve stromada miksoid değişiklikler vakalarımızda görülmedi.
- Yuvarlak hücreli sarkomların sınıflandırılmasında immunhistokimyasal NKX2.2, WT1, ETV4 ve CCNB3 ile optimal; BCOR ile optimale yakın sonuç alındı.
- NKX2.2, sensitivitesi, literatürle uyumlu olarak, ileri derecede yüksek olarak bulundu. EAS için CD99 ile birlikte değerlendirildiğinde oldukça sensitif bir belirteç olduğu düşünüldü.
- Nükleer WT1 reaktivitesinin hiçbir EAS, BRS veya sınıflandırılmayan tümörde görülmemesi dikkate alınarak; EAS yönünde düşündürecek belirteçlerin negatifliği veya *EWSR1* gen rearanjmanının saptanmadığı durumlarda ekspresyonunun, ETV4 ile kombine edildiğinde CRS'ye işaret edebileceği düşünüldü.
- CCNB3 ve BCOR birlikte kullanıldığında nükleer reaktivitenin BRS tanısında yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda BCOR antikoruyla teknik nedenlerden ötürü suboptimal sonuç elde edildi. Pozitif ve negatif kontrollerde uygun çalışmasına rağmen, vakalarımızda teknik artefaktlar sık olarak izlendi. Bunun, çalışmamızda kullandığımız klonun literatürde çoğunlukla kullanılan klondan farklı olması ile ilişkili olabileceği düşünüldü.
- Sınıflandırılmayan grupta yer alan tümörlerin tanısında morfoloji ve immünhistokimya yetersiz kalmaktadır. FISH, PCR, elektron mikroskopisi gibi yöntemler ile ileri incelemelerin, tanı için gerekli olduğu düşünüldü.
- Çalışmamızda 94 hastanın sağkalım bilgilerine ulaşılabildi. Mortalite oranı %54,2'dir.
- 18 yaş altı gruptaki hastalarda (%54,2), kadınlarda daha iyi sağkalım görüldü. İstatistiksel olarak 18 yaş altı hastalarda genel sağkalım anlamlı bulundu.
- Viseral yerleşimli vakalarda ise en kısa sağkalım süresi görüldü.
- Literatürde artan tümör çapı, kötü sağkalımla ilişkilendirilmiştir. Çalışmamızda da artan tümör çapı ile sağkalım süresi azalmıştır.
- Yuvarlak hücreli sarkomlarda tanı için altın standart moleküler yöntemlerle genetik değişikliklerin gösterilmesidir, fakat moleküler testlere erişim zordur ve bu testlerin maliyetleri yüksektir.
- İmmünhistokimyasal incelemenin tam sınıflamaya katkısı sınırlı olsa da, moleküler test gerektirecek hastaların seçiminde son derece faydalıdır. Özellikle kombine edilerek kullanıldığında spesifisite ve sensitiviteyi yükseltmekte, moleküler testlere ihtiyacı azaltmaktadır.

- Çalışmamızda kullandığımız NKX2.2, WT1, ETV4, CCNB3 ve BCOR bu ayırım için oldukça faydalı bulunmuştur.



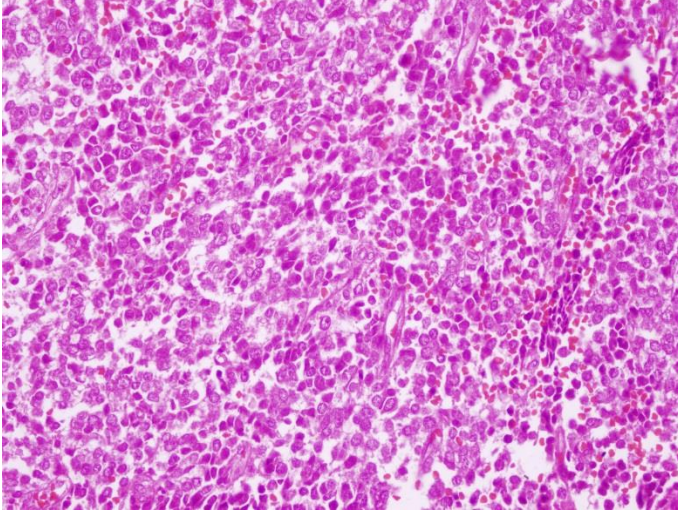
## 7. RESİMLER



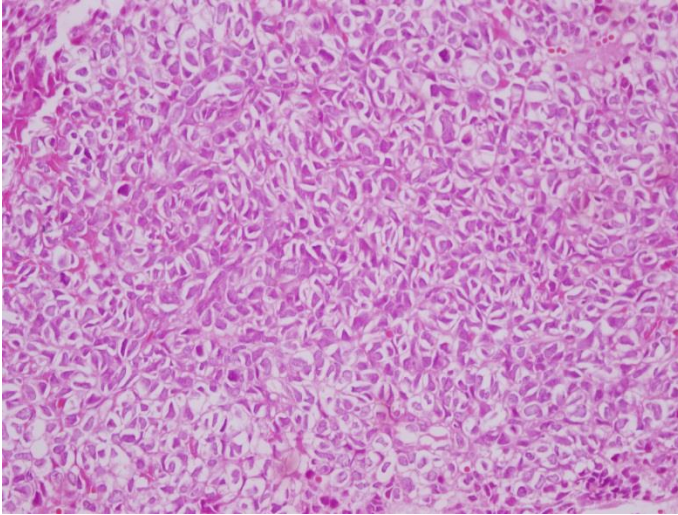
**Resim 1. Kemik yerleşimli Ewing Sarkom olgularının yerleşim yeri ve sıklığına göre dağılımı.**



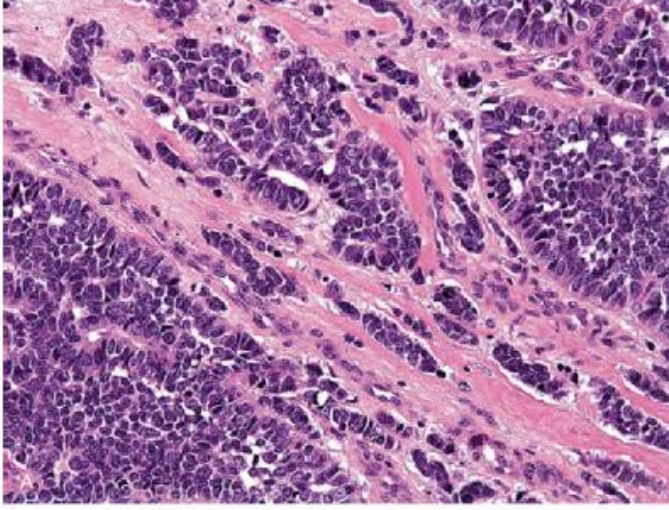
**Resim 2. EAS makroskopisi. Uzun kemik kesitinde diafizer intramedüller yerleşimli, düzensiz sınırlı permatif lezyon izlenmektedir.**



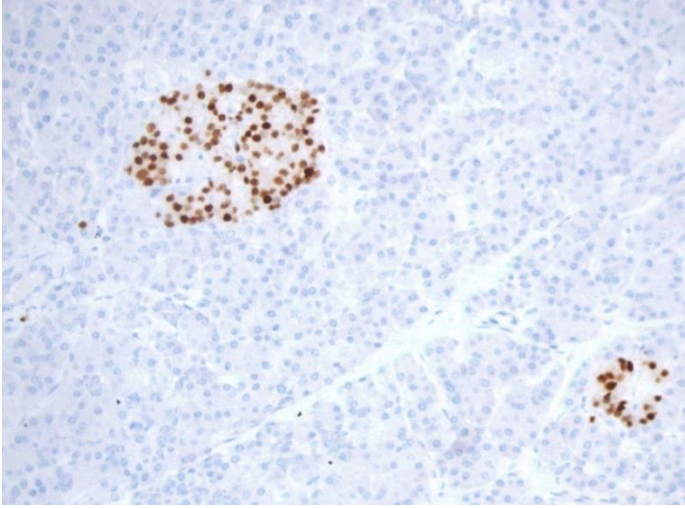
**Resim 3. EAS. Küçük, monoton, üniform yapıda hücrelerden oluşan, stromanın izlenmediği sellüler tümör (H-Ex400)**



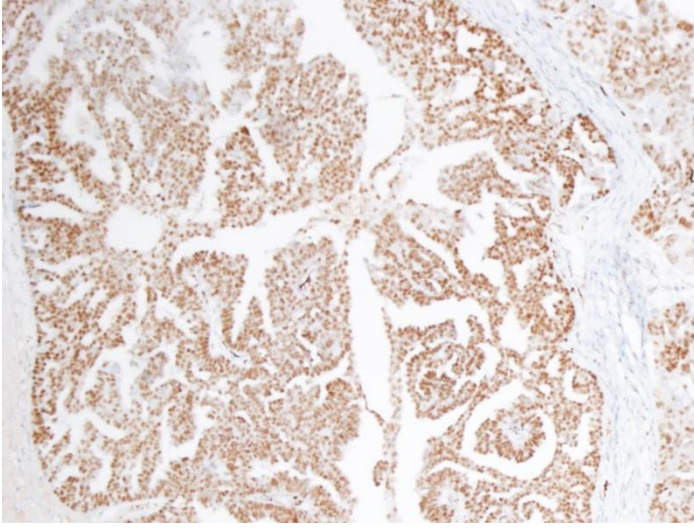
**Resim 4. Atipik EAS. Küçük-orta boyutta, monoton, düzensiz, yer yer angülasyon gösteren nükleuslu, seçilebilir sitoplazmalı, arada mitotik figürlerin sık olarak izlendiği tümör dokusu (H-Ex400)**



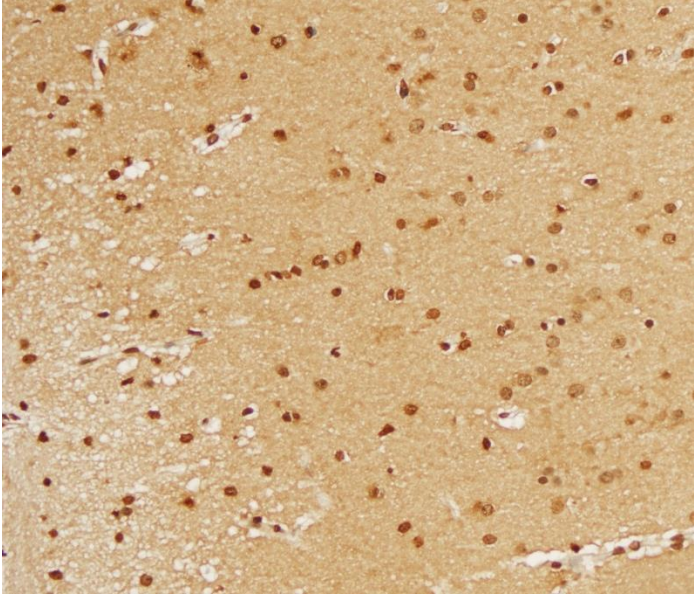
**Resim 5. EAS, adamantinoma benzeri varyant. Küçük büyütmede belirgin nest paterni, periferel palizatlanma ve desmoplazi görülmektedir (18).**



**Resim 6. NKX2.2 için pozitif kontrol olarak kullanılan pankreas dokusundaki adacık hücrelerinde kuvvetli nükleer boyanma (x200).**

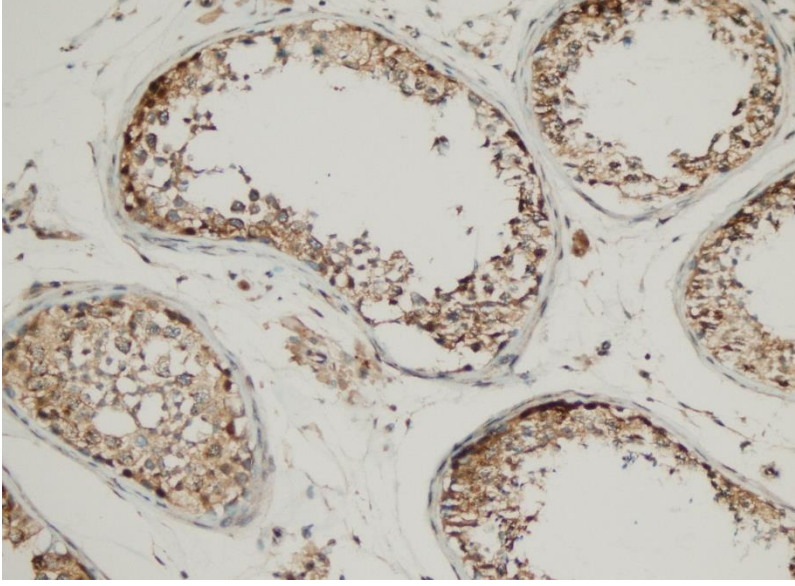


**Resim 7. WT1 için pozitif kontrol olarak kullanılan over seröz karsinom dokusunda kuvvetli nükleer boyanma (x100).**

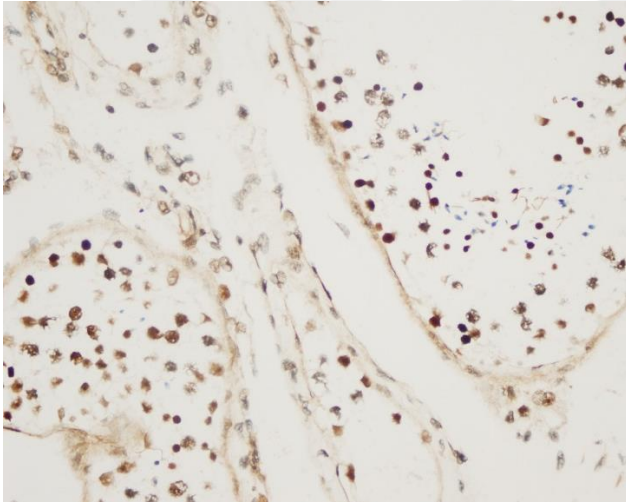


**Resim 8. ETV 4 için pozitif kontrol dokusu olarak kullanılan beyin dokusunda nöral hücrelerde kuvvetli nükleer, glial hücrelerde orta yoğunlukta nükleer boyanma (x200).**

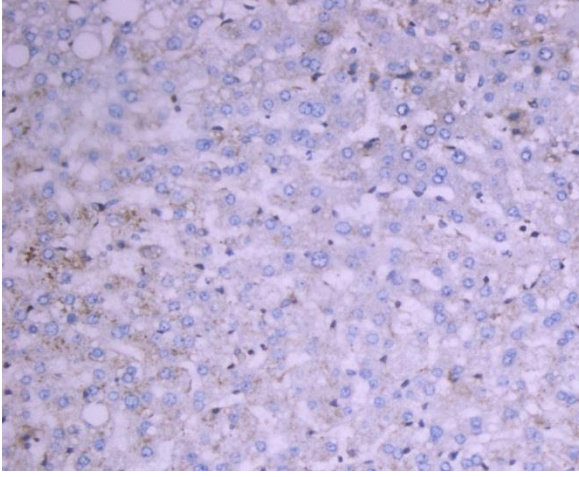




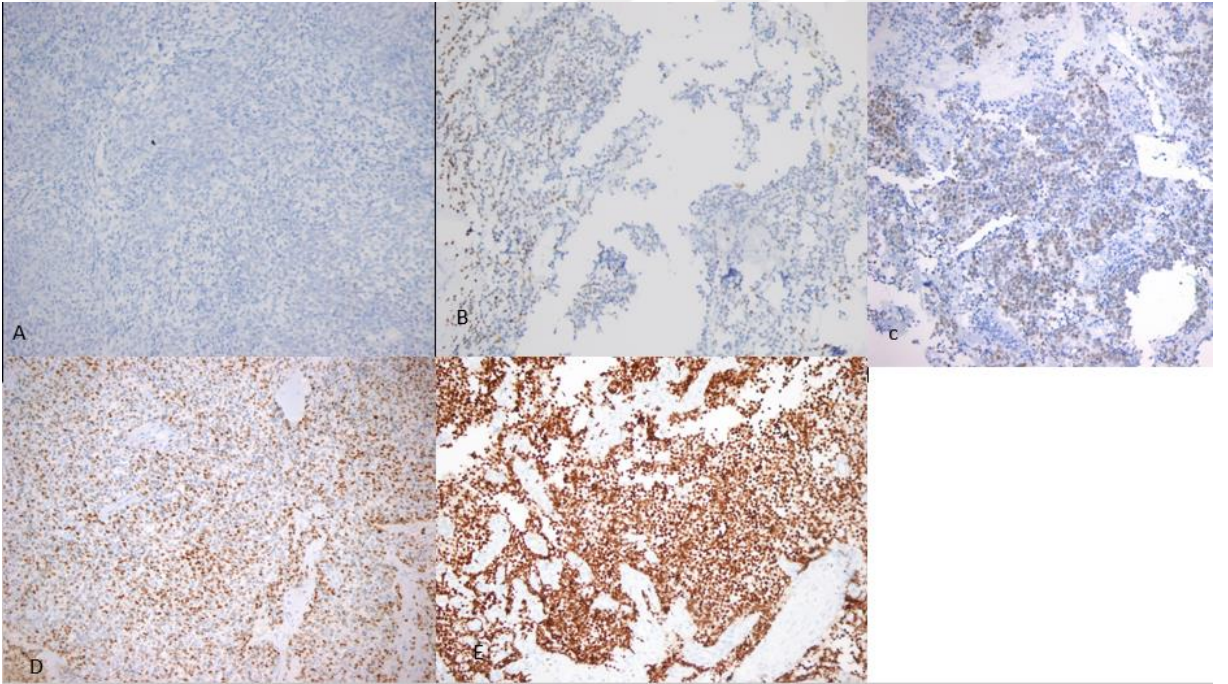
**Resim 9. CcNB3 için pozitif kontrol olarak kullanılan testis dokusunda germ hücrelerinde orta-kuvvetli nükleer boyanma (x200).**



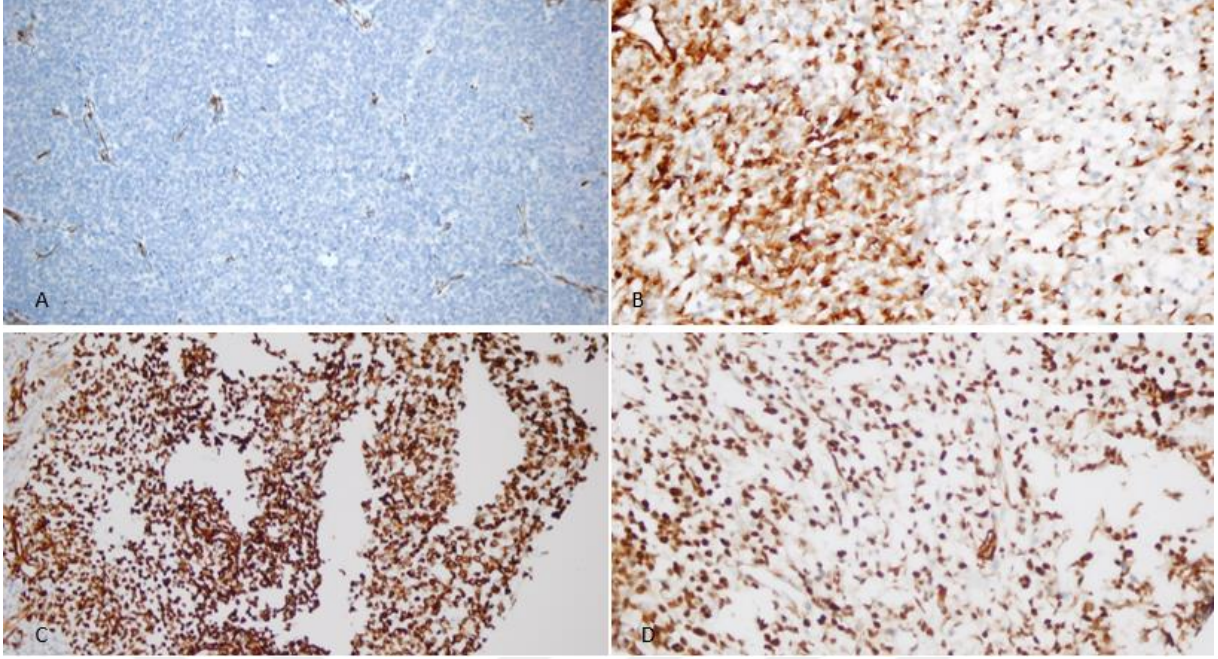
**Resim 10. BCOR için pozitif kontrol olarak kullanılan testis dokusunda spermatogoniumlarda kuvvetli, spermatositlerde orta, sertoli hücrelerinde zayıf boyanma (x400).**



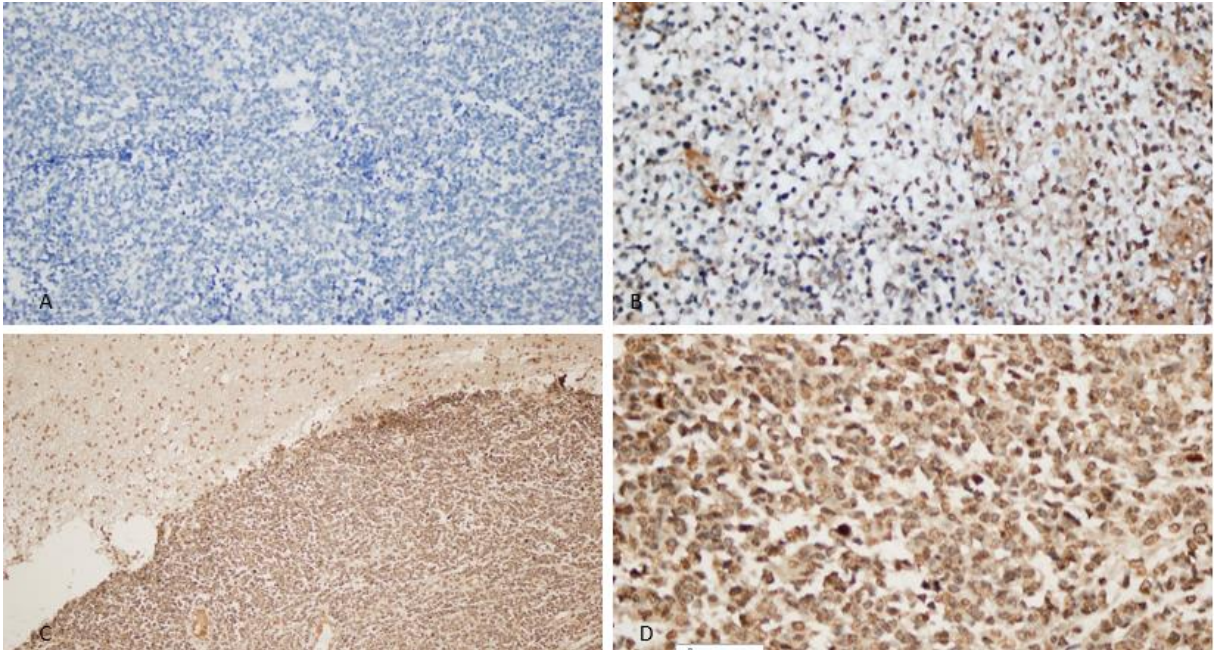
**Resim 11. BCOR için negatif kontrol olarak karaciğer dokusunda nükleuslarda negatiflik (x200).**



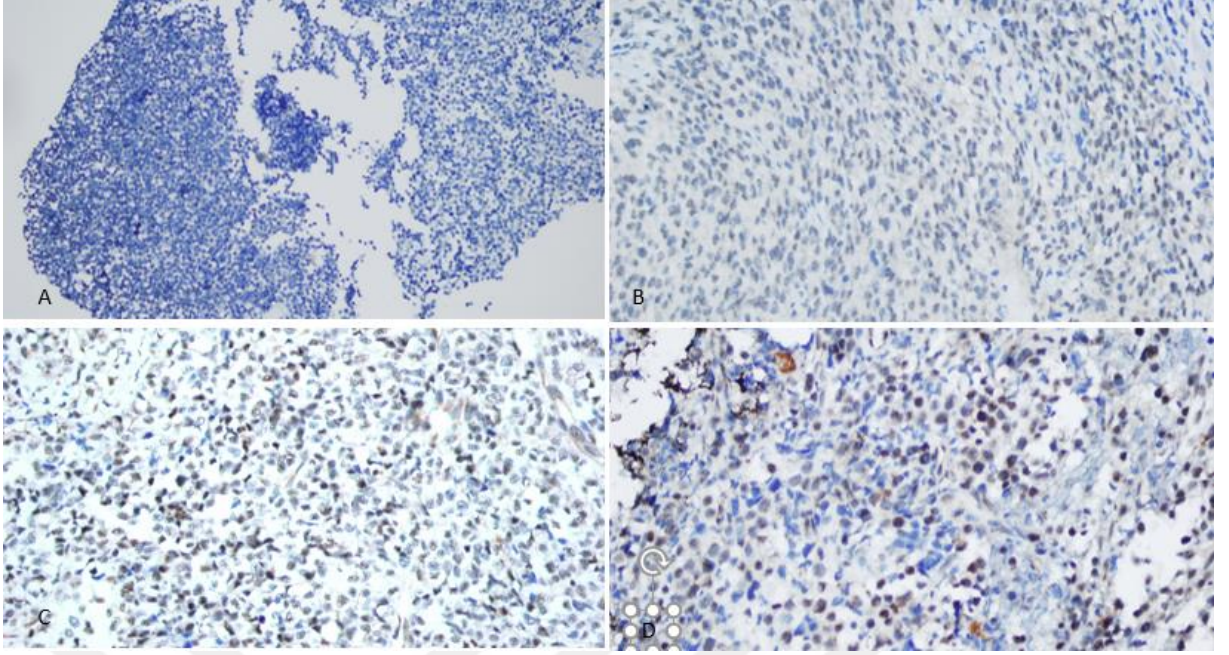
**Resim 12. Vakalarımızda immünohistokimyasal olarak NKX2.2 boyanma özellikleri: A. Negatiflik gösteren tümör dokusu (x200) B. Tümör dokusunda 1+ orta yoğunlukta boyanma (x400) C. Tümör dokusunda 2+, kuvvetli boyanma (x200) D. 3+ orta-kuvvetli boyanma gösteren tümör dokusu (x200) E. Tümörde yaygın kuvvetli pozitif boyanma (4+) (x200)**



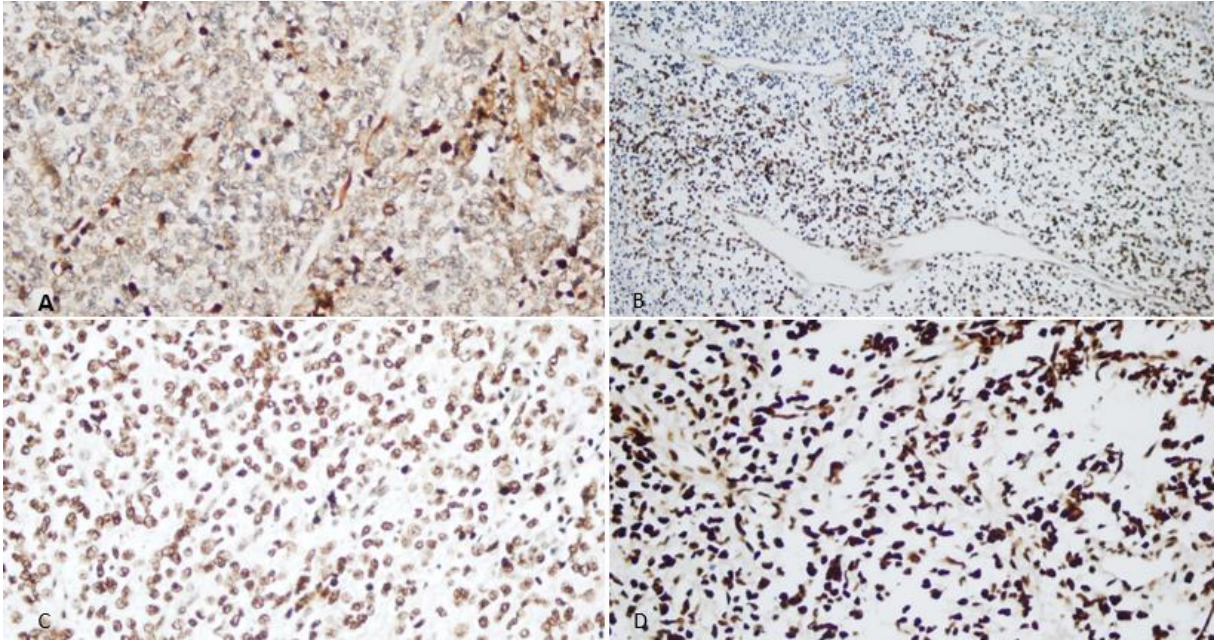
**Resim 13. WT1 antikoruna boyanma özellikleri: A. Tümör hücrelerinde negatiflik, B. Tümör hücrelerinde 2+ nükleer+sitoplazmik boyanma (x400), C. Tümör hücrelerinde nükleer+sitoplazmik difüz (4+) kuvvetli boyanma (x200), D. Tümör hücrelerinde difüz kuvvetli nükleer boyanma (x400).**



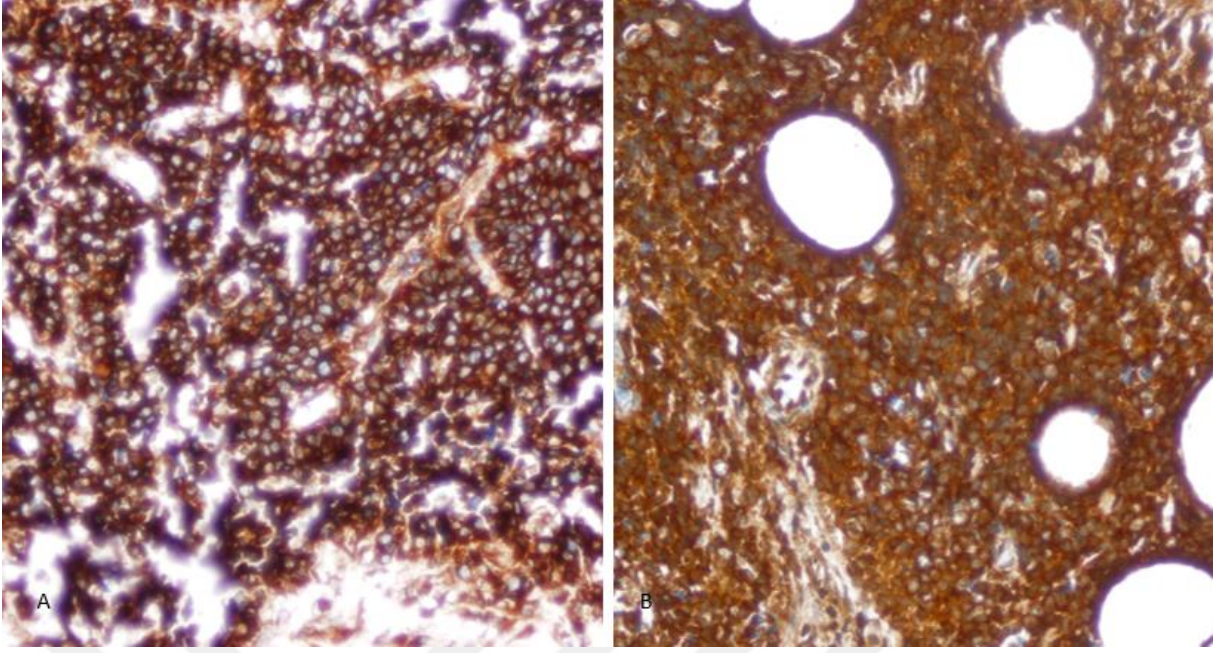
**Resim 14. ETV4 antikoruna boyanma özellikleri: A. Tümörde negatif boyanma (x200), B. Tümörde fokal olarak değerlendirilen (2+) pozitif boyanma, C. Beyne metastaz yapmış CRS olgusunda, beyin dokusuyla benzer nitelikte difüz boyanma (x100), D. 4+ olarak değerlendirilen boyanma paterni.**



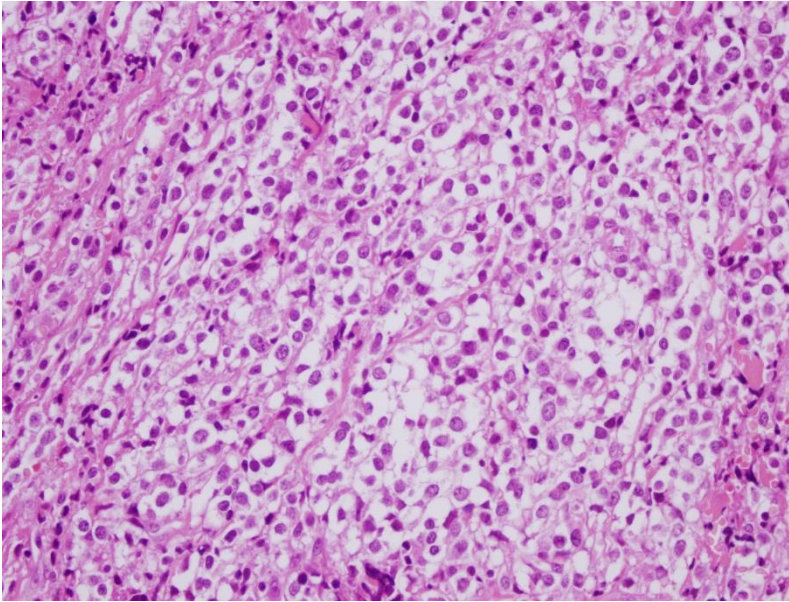
**Resim 15. CCNB3 antikoruyla boyanma özellikleri: A. Negatif boyanma (x200), B ve C. Fokal nükleer boyanma (1+ ve 2+), D. 3+ olarak değerlendirilen difüz boyanma.**



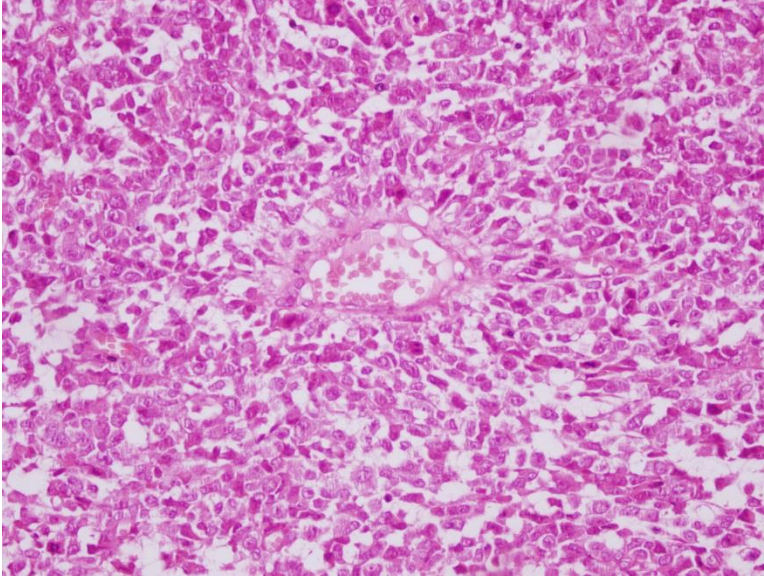
**Resim 16. BCOR ile immunhistokimyasal incelemede: A. Fokal ancak kuvvetli reaktivite, B. Fokal, kuvvetli boyanma, C. Difüz ancak zayıf-orta şiddette boyanma, D. Difüz kuvvetli boyanma.**



**Resim 17. BCOR ile karşılaşılan artefaktlar. A. Sıvanma tarzında boyanma ve eşlik eden seyrek nükleer pozitiflik. B. Nükleusların seçilebildiği yoğun zemin ve sitoplazma boyanması.**



**Resim 18. EAS ile benzer morfolojik özellikler gösteren, BRS yönünde değerlendirilen vaka (H-Ex400)**



**Resim 19. Küçük, yuvarlak monoton hücrelerden oluşan, seyrek olarak psödorozet yapıları da izlenen, CRS yönünde değerlendirilen vaka (H-Ex400)**

## 8. KAYNAKLAR

1. Hung YP, Fletcher CDM, Hornick JL. Evaluation of NKX2-2 expression in round cell sarcomas and other tumors with EWSR1 rearrangement: Imperfect specificity for Ewing sarcoma. *Mod Pathol* [Internet]. 2016;29(4):370–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2016.31>
2. Ewing J. Diffuse Endothelioma of Bone. *Proc N Y Pathol Soc.* 1921;21:17–24.
3. Stout A. A tumor of the ulnar nerve. *Proc NY Pathol Soc.* 1918;12:2-12.
4. Seemayer T. Peripheral neuroectodermal tumors. *Perspect Pediatr Pathol.* 1975;2:151-72.
5. Angervall L, Enzinger FM. Extraskeletal neoplasm resembling Ewing's sarcoma. *Cancer.* 1975;36(1):240–51.
6. Jaffe R. The neuroectodermal tumor of bone. *Am J Surg Pathol.* 1984;Dec;8(12):
7. Bourque MD, Di Lorenzo M, Collin PP, Russo P, Laberge JM, Moir C. Malignant small-cell tumor of the thoracopulmonary region: “Askin tumor.” *J Pediatr Surg.* 1989;24(10):1079–83.
8. Aurias A, Rimbaut C, Buffe D, Zucker JM, Mazabraud A. Translocation involving chromosome 22 in Ewing's Sarcoma. A cytogenetic study of four fresh tumors. *Cancer Genet Cytogenet.* 1984;12(1):21–5.
9. Turc-Carel C, Philip I, Berger MP, Philip T, Lenoir GM. Chromosome study of Ewing's Sarcoma (ES) cell lines. Consistency of a reciprocal translocation t(11;22)(q24;q12). *Cancer Genet Cytogenet.* 1984;12(1):1–19.
10. Whang-Peng J, Triche TJ, Knutsen T, Miser J, Douglass EC, Israel MA. Chromosome translocation in peripheral neuroepithelioma. *N Engl J Med.* 1984 Aug;311(9):584–5.
11. Ambros IM, Ambros PF, Strehl S, Kovar H, Gadner H, Salzer-Kuntschik M. MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. Evidence for a common histogenesis of Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors from MIC2 expression and specific chromosome aberration. *Cancer* [Internet]. 1991 Apr 1;67(7):1886–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1848471>
12. Fletcher C, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer.

- WHO classification of tumours of soft tissue and bone. WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. 2013.
13. Czerniak B. Dorfman and Czerniak's Bone Tumors. In: Dorfman and Czerniak's Bone Tumors. 2016.
  14. Vasef M, Auerbach A, editors. Diagnostic Pathology. Molecular Oncology. 1st ed. Philadelphia: Elsevier; 2016.
  15. Hoda SA. Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors, 6th Edition. Adv Anat Pathol. 2014;
  16. Llombart-Bosch A, Blache R, Peydro-Olaya A. Ultrastructural study of 28 cases of Ewing's sarcoma: Typical and atypical forms. Cancer. 1978;
  17. Llombart-Bosch A, Machado I, Navarro S, Bertoni F, Bacchini P, Alberghini M, et al. Histological heterogeneity of Ewing's sarcoma/PNET: An immunohistochemical analysis of 415 genetically confirmed cases with clinical support. Virchows Arch. 2009;455(5):397–411.
  18. Folpe AL, Goldblum JR, Rubin BP, Shehata BM, Liu W, Dei Tos AP, et al. Morphologic and immunophenotypic diversity in Ewing family tumors: a study of 66 genetically confirmed cases. Am J Surg Pathol [Internet]. 2005;29(8):1025–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16006796>
  19. Bridge JA, Fidler ME, Neff JR, Degenhardt J, Wang M, Walker C, et al. Adamantinoma-like Ewing's sarcoma: Genomic confirmation, phenotypic drift. Am J Surg Pathol. 1999;
  20. Tumors N, Ambros IM, Ambros PF, Strehl S. Is a Specific Marker for Ewing's Sarcoma and Peripheral Primitive Neuroectodermal Tumors. 1886;1886–93.
  21. Folpe AL, Hill CE, Parham DM, O'Shea PA, Weiss SW. Immunohistochemical detection of FLI-1 protein expression: A study of 132 round cell tumors with emphasis on CD99-positive mimics of Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor. Am J Surg Pathol. 2000;24(12):1657–62.
  22. Mhaweche-Fauceglia P, Herrmann FR, Bshara W, Odunsi K, Terracciano L, Sauter G, et al. Friend leukaemia integration-1 expression in malignant and benign tumours: A multiple tumour tissue microarray analysis using polyclonal antibody. J Clin Pathol. 2007;60(6):694–700.



23. Llombart-Bosch A, Navarro S. Immunohistochemical detection of EWS and FLI-1 proteins in ewing sarcoma and primitive neuroectodermal tumors: Comparative analysis with CD99 (MIC-2) expression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2001;
24. U JB, Ericson J. The specification of neuronal identity by graded sonic hedgehog signalling. *Cell Dev Biol*. 1999;10(3):353–62.
25. Wang YC, Gallego-Arteche E, Iezza G, Yuan X, Matli MR, Choo SP, et al. Homeodomain transcription factor NKX2.2 functions in immature cells to control enteroendocrine differentiation and is expressed in gastrointestinal neuroendocrine tumors. *Endocr Relat Cancer*. 2009;16(1):267–79.
26. Smith R, Owen LA, Trem DJ, Wong JS, Whangbo JS, Golub TR, et al. Expression profiling of EWS/FLI identifies NKX2.2 as a critical target gene in Ewing's sarcoma. *Cancer Cell*. 2006;9(5):405–16.
27. Yoshida A, Sekine S, Tsuta K. NKX2 . 2 is a Useful Immunohistochemical Marker. 2012;36(7):993–9.
28. Shibuya R, Matsuyama A, Nakamoto M, Shiba E, Kasai T, Hisaoka M. The combination of CD99 and NKX2.2, a transcriptional target of EWSR1-FLI1, is highly specific for the diagnosis of Ewing sarcoma. *Virchows Arch*. 2014;465(5):599–605.
29. Turc-carel C, Aurias A, Mugneret F, Lizard S, Sidaner I, Volk C, et al. T(11;22)(Q24;Q12). *Cancer Genet Cytogenet*. 1988;32(2):229–38.
30. Sandberg AA, Bridge JA. Updates on cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: Ewing sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Genet Cytogenet*. 2000;
31. Whang-Peng J, Triche TJ, Knutsen T, Miser J, Kao-Shan S, Tsai S, et al. Cytogenetic characterization of selected small round cell tumors of childhood. *Cancer Genet Cytogenet*. 1986;
32. Hu-Lieskovan S, Zhang J, Wu L, Shimada H, Schofield DE, Triche TJ. EWS-FLI1 fusion protein up-regulates critical genes in neural crest development and is responsible for the observed phenotype of Ewing's family of tumors. *Cancer Res*. 2005;
33. Spahn L, Siligan C, Bachmaier R, Schmid JA, Aryee DNT, Kovar H. Homotypic and heterotypic interactions of EWS, FLI1 and their oncogenic fusion protein. *Oncogene*. 2003;

34. Dunn T, Praissman L, Hagag N, Viola M V. ERG gene is translocated in an Ewing's sarcoma cell line. *Cancer Genet Cytogenet.* 1994;
35. Sorensen PHB, Lessnick SL, Lopez-Terrada D, Liu XF, Triche TJ, Denny CT. A second ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG. *Nat Genet.* 1994;6(2):146–51.
36. Jeon I, Davis J, Braun B, Sublett J. A variant Ewing's sarcoma translocation (7; 22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1. *Oncogene.* 1995;
37. Kaneko Y, Yoshida K, Masafumi H, Toyoda Y, Nishihira H, Tanaka Y. Fusion of an ETS-Family Gene , EIAF , to EWS by t ( 17 ; 22 ) ( q 12 ; q 12 ) Chromosome Translocation in an Undifferentiated Sarcoma of Infancy. 1996;121:115–21.
38. Peter M, Couturier J, Pacquement H, Michon J, Thomas G, Magdelenat H, et al. A new member of the ETS family fused to EWS in Ewing tumors. *Oncogene.* 1997;14(10):1159–64.
39. Urano F, Umezawa A, Hong W, Kikuchi H, Hata JI. A novel chimera gene between EWS and E1A-F, encoding the adenovirus E1A enhancer-binding protein, in extraosseous Ewing's sarcoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;
40. Ng TL, O'Sullivan MJ, Pallen CJ, Hayes M, Clarkson PW, Winstanley M, et al. Ewing sarcoma with novel translocation t(2;16) producing an in-frame fusion of FUS and FEV. *J Mol Diagnostics.* 2007;
41. Shing DC, McMullan DJ, Roberts P, Smith K, Chin SF, Nicholson J, et al. FUS/ERG gene fusions in Ewing's tumors. *Cancer Res.* 2003;
42. Deng FM, Galvan K, de la Roza G, Zhang S, Souid AK, Stein CK. Molecular characterization of an EWSR1-POU5F1 fusion associated with a t(6;22) in an undifferentiated soft tissue sarcoma. *Cancer Genet.* 2011;
43. Sadri N, Barroeta J, Pack SD, Abdullaev Z, Chatterjee B, Puthiyaveetil R, et al. Malignant round cell tumor of bone with EWSR1-NFATC2 gene fusion. *Virchows Arch.* 2014;
44. Sumegi J, Nishio J, Nelson M, Frayer RW, Perry D, Bridge JA. A novel t(4;22)(q31;q12) produces an EWSR1-SMARCA5 fusion in extraskeletal Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor. *Mod Pathol.* 2011;

45. Szuhai K, Ijszenga M, De Jong D, Karseladze A, Tanke HJ, Hogendoorn PCW. The NFATc2 Gene is involved in a novel cloned translocation in a ewing sarcoma variant that couples its function in immunology to oncology. *Clin Cancer Res.* 2009;
46. Wang L, Bhargava R, Zheng T, Wexler L, Collins MH, Roulston D, et al. Undifferentiated Small Round Cell Sarcomas with Rare EWS Gene Fusions. *J Mol Diagnostics.* 2007;
47. Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F. WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. fourth edi. IARC, editor. Lyon, France; 2013.
48. Ozaki T, Schaefer KL, Wai D, Buerger H, Flege S, Lindner N, et al. Genetic imbalances revealed by comparative genomic hybridization in osteosarcomas. *Int J Cancer.* 2002;
49. Hattinger CM, Pötschger U, Tarkkanen M, Squire J, Zielenska M, Kiuru-Kuhlefelt S, et al. Prognostic impact of chromosomal aberrations in Ewing tumours. *Br J Cancer.* 2002;
50. Mertens F, Antonescu CR, Hohenberger P, Ladanyi M, Modena P, D’Incalci M, et al. Translocation-Related Sarcomas. *Semin Oncol.* 2009;
51. Italiano A, Sung YS, Zhang L, Singer S, Maki RG, Coindre JM, et al. High prevalence of CIC fusion with double-homeobox (DUX4) transcription factors in EWSR1-negative undifferentiated small blue round cell sarcomas. *Genes Chromosom Cancer.* 2012;
52. Kawamura-Saito M, Yamazaki Y, Kaneko K, Kawaguchi N, Kanda H, Mukai H, et al. Fusion between CIC and DUX4 up-regulates PEA3 family genes in Ewing-like sarcomas with t(4;19)(q35;q13) translocation. *Hum Mol Genet.* 2006;15(13):2125–37.
53. Yoshimoto M, Graham C, Chilton-MacNeill S, Lee E, Shago M, Squire J, et al. Detailed cytogenetic and array analysis of pediatric primitive sarcomas reveals a recurrent CIC-DUX4 fusion gene event. *Cancer Genet Cytogenet.* 2009;
54. Sugita S, Arai Y, Tonooka A, Hama N, Totoki Y, Fujii T, et al. A Novel CIC-FOXO4 Gene Fusion in Undifferentiated Small Round Cell Sarcoma. *Am J Surg Pathol.* 2014;
55. Jo VY, Fletcher CDM. WHO classification of soft tissue tumours: An update based on the 2013 (4th) edition. *Pathology.* 2014;46(2):95–104.
56. Richkind KE, Romansky SG, Finklestein JZ. t(4;19)(q35;q13.1): A recurrent change in primitive mesenchymal tumors? *Cancer Genet Cytogenet.* 1996;87(1):71–4.
57. Specht K, Sung YS, Zhang L, Richter GHS, Fletcher CD, Antonescu CR. Distinct

- transcriptional signature and immunoprofile of CIC-DUX4 fusion-positive round cell tumors compared to EWSR1-rearranged ewing sarcomas: Further evidence toward distinct pathologic entities. *Genes Chromosom Cancer*. 2014;53(7):622–33.
58. Antonescu CR, Owosho AA, Zhang L, Chen S, Deniz K, Huryn JM, et al. Sarcomas With CIC-rearrangements are a Distinct Pathologic Entity With Aggressive Outcome: A Clinicopathologic and Molecular Study of 115 Cases. *Am J Surg Pathol*. 2017;00(00):1–9.
  59. Yoshida A, Goto K, Kodaira M, Kobayashi E, Kawamoto H, Mori T, et al. CIC-rearranged sarcomas: A study of 20 cases and comparisons with Ewing sarcomas. *Am J Surg Pathol*. 2016;
  60. Hung YP, Fletcher CDM, Hornick JL. Evaluation of ETV4 and WT1 expression in CIC-rearranged sarcomas and histologic mimics. *Mod Pathol* [Internet]. 2016;29(11):1324–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2016.140>
  61. Siegele B, Roberts J, Black JO, Rudzinski E, Vargas SO, Galambos C. DUX4 Immunohistochemistry Is a Highly Sensitive and Specific Marker for CIC-DUX4 Fusion-positive Round Cell Tumor. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2017 Mar;41(3):423–9. Available from: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00000478-201703000-00015>
  62. Yamada Y, Kuda M, Kohashi K, Yamamoto H, Takemoto J, Ishii T, et al. Histological and immunohistochemical characteristics of undifferentiated small round cell sarcomas associated with CIC-DUX4 and BCOR-CCNB3 fusion genes. *Virchows Arch*. 2017;
  63. Owosho AA, Estilo CL, Huryn JM, Zhang L, Fletcher CDM, Antonescu CR. Head and Neck Round Cell Sarcomas: A Comparative Clinicopathologic Analysis of 2 Molecular Subsets: Ewing and CIC-Rearranged Sarcomas. *Head Neck Pathol*. 2017;11(4):450–9.
  64. Pierron G, Tirode F, Lucchesi C, Reynaud S, Ballet S, Cohen-Gogo S, et al. A new subtype of bone sarcoma defined by BCOR-CCNB3 gene fusion. *Nat Genet* [Internet]. 2012;44(4):461–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.1107>
  65. Puls F, Niblett A, Marland G, Gaston CLL, Douis H, Mangham DC, et al. BCOR-CCNB3 (Ewing-like) sarcoma: A clinicopathologic analysis of 10 cases, in comparison with conventional Ewing sarcoma. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(10):1307–18.
  66. Peters TL, Kumar V, Polikepahad S, Lin FY, Sarabia SF, Liang Y, et al. BCOR-CCNB3 fusions are frequent in undifferentiated sarcomas of male children. *Mod Pathol*.

- 2015;28(4):575–86.
67. Matsuyama A, Shiba E, Umekita Y, Nosaka K, Kamio T, Yanai H, et al. Clinicopathologic Diversity of Undifferentiated Sarcoma with BCOR-CCNB3 Fusion. *Am J Surg Pathol*. 2017;41(12):1713–21.
  68. Kao YC, Sung YS, Zhang L, Jungbluth AA, Huang SC, Argani P, et al. BCOR overexpression is a highly sensitive marker in round cell sarcomas with BCOR genetic abnormalities. *Am J Surg Pathol*. 2016;
  69. Specht K, Zhang L, Sung YS, Nucci M, Dry S, Vaiyapuri S, et al. Novel BCOR-MAML3 and ZC3H7B-BCOR gene fusions in undifferentiated small blue round cell sarcomas. *Am J Surg Pathol*. 2016;
  70. Le Guellec S, Velasco V, Pérot G, Watson S, Tirode F, Coindre JM. ETV4 is a useful marker for the diagnosis of CIC-rearranged undifferentiated round-cell sarcomas: A study of 127 cases including mimicking lesions. *Mod Pathol*. 2016;29(12):1523–31.
  71. Lee J, Hoang BH, Ziogas A, Zell JA. Analysis of prognostic factors in Ewing sarcoma using a population-based cancer registry. *Cancer*. 2010;
  72. Miller BJ, Gao Y, Duchman KR. Does surgery or radiation provide the best overall survival in Ewing’s sarcoma? A review of the National Cancer Data Base. *J Surg Oncol*. 2017;
  73. Verma V, Denniston KA, Lin CJ, Lin C. A Comparison of Pediatric vs. Adult Patients with the Ewing Sarcoma Family of Tumors. *Front Oncol*. 2017;
  74. Jenkin RD, Al-Fawaz I, Al-Shabanah M, Allam A, Ayas M, Khafaga Y, et al. Localised Ewing sarcoma/PNET of bone: prognostic factors and international data comparison. *Med Pediatr Oncol* [Internet]. 2002 Dec;39(6):586–93. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/mpo.10212>
  75. Koohbanani B, Han G, Reed D, Zhao Q, Yi D, Henderson-Jackson E, et al. Ethnicity and age disparities in Ewing sarcoma outcome. *Fetal Pediatr Pathol* [Internet]. 2013 Jul 10;32(4):246–52. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/15513815.2012.721480>
  76. Friedman DN, Chastain K, Chou JF, Moskowitz CS, Adsuar R, Wexler LH, et al. Morbidity and mortality after treatment of Ewing sarcoma: A single-institution experience. *Pediatr Blood Cancer* [Internet]. 2017 Nov;64(11):e26562. Available from:

<http://doi.wiley.com/10.1002/pbc.26562>

77. Verma V, Denniston KA, Lin CJ, Lin C. A Comparison of Pediatric vs. Adult Patients with the Ewing Sarcoma Family of Tumors. *Front Oncol* [Internet]. 2017 May 8;7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2017.00082/full>
78. Fizazi K, Dohollou N, Blay JY, Guérin S, Le Cesne A, André F, et al. Ewing's family of tumors in adults: multivariate analysis of survival and long-term results of multimodality therapy in 182 patients. *J Clin Oncol* [Internet]. 1998 Dec;16(12):3736–43. Available from: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.1998.16.12.3736>
79. Rodríguez-Galindo C, Liu T, Krasin MJ, Wu J, Billups CA, Daw NC, et al. Analysis of prognostic factors in ewing sarcoma family of tumors. *Cancer* [Internet]. 2007 Jul 15;110(2):375–84. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.22821>
80. Lee J, Hoang BH, Ziogas A, Zell JA. Analysis of prognostic factors in Ewing sarcoma using a population-based cancer registry. *Cancer* [Internet]. 2010 Apr 15;116(8):1964–73. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.24937>
81. Arpaci E, Yetisyigit T, Seker M, Uncu D, Uyeturk U, Oksuzoglu B, et al. Prognostic factors and clinical outcome of patients with Ewing's sarcoma family of tumors in adults: multicentric study of the Anatolian Society of Medical Oncology. *Med Oncol* [Internet]. 2013 Mar 24;30(1):469. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12032-013-0469-z>
82. Biswas B, Rastogi S, Khan SA, Shukla NK, Deo SVS, Agarwala S, et al. Developing a prognostic model for localized Ewing sarcoma family of tumors: A single institutional experience of 224 cases treated with uniform chemotherapy protocol. *J Surg Oncol* [Internet]. 2015 May;111(6):683–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jso.23861>
83. Albergo JI, Gaston CL, Laitinen M, Darbyshire A, Jeys LM, Sumathi V, et al. Ewing's sarcoma. *Bone Joint J* [Internet]. 2016 Aug;98-B(8):1138–44. Available from: <http://online.boneandjoint.org.uk/doi/10.1302/0301-620X.98B8.37346>
84. Yang Y, Zhen T, Zhang F, Dai S, Kang L, Liang Y, et al. p53 and hepatoma-derived growth factor expression and their clinicopathological association with Ewing family tumour. *J Clin Pathol* [Internet]. 2014 Mar;67(3):235–42. Available from: <http://jcp.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jclinpath-2013-201705>

85. Brunetto AL, Castillo LA, Petrilli AS, Macedo CD, Boldrini E, Costa C, et al. Carboplatin in the treatment of Ewing sarcoma: Results of the first Brazilian Collaborative Study Group for Ewing Sarcoma Family Tumors-EWING1. *Pediatr Blood Cancer* [Internet]. 2015 Oct;62(10):1747–53. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pbc.25562>

