

**T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**NÖROBLASTOMLARDA TELOMERAZ,
MATRİKS METALLOPROTEİNAZ VE DOKU
MATRİKS METALLOPROTEİNAZ İNHİBİTÖR
AKTİVİTESİ**

DR.İZGİ ÜÇER

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2009

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**NÖROBLASTOMLARDA TELOMERAZ,
MATRİKS METALLOPROTEİNAZ VE DOKU
MATRİKS METALLOPROTEİNAZ İNHİBİTÖR
AKTİVİTESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR.İZGİ ÜÇER

İÇİNDEKİLER

Tablo Listesi	i
Şekil Listesi	ii
Grafik Listesi.....	iii
Kısaltmalar	iv
Teşekkür	v
Türkçe Özet	1-2
İngilizce Özet	3-4
Genel Bilgiler	5-24
Gereç ve Yöntem	27-30
Bulgular	31-42
Tartışma	43-52
Sonuçlar	53
Kaynaklar	54-59

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Shimada sınıflaması.....	10
Tablo 2. İnternasyonal Nöroblastoma Evreleme Sistemi (INSS).....	15
Tablo 3. Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG) tarafından belirlenen risk kriterleri...16	
Tablo 4. Çalışmada kullanılan antikorların özellikleri.....	28
Tablo 5. Olguların cinsiyet dağılımı ve genetik durumları.....	32
Tablo 6. Olguların evre, metastaz ve son durum dağılımları	32
Tablo 7. İmmunhistokimyasal boyama sonuçları ile prognostik ve genetik bulguların karşılaştırılması.....	39

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Periferal nöroblastomatöz tümörlerde yaş dağılımı.....	5
Şekil 2a. Shimada klasifikasyonuna göre andifferansiye nöroblastomun histolojik görüntüsü. Hücrel differansiyasyon ve nöropil izlenmemektedir (H&E, x100).....	11
Şekil 2b. Shimada klasifikasyonuna göre az differansiye nöroblastomun histolojik görüntüsü. Hücrel differansiyasyon ve nöropil %5'ten az oranda izlenmektedir (H&E, x100).....	12
Şekil 2c. Shimada klasifikasyonuna göre differansiye nöroblastomun histolojik görüntüsü. Hücrel differansiyasyon ve nöropil %5'ten fazla oranda izlenmektedir (H&E, x100).....	13
Şekil 3. Histolojik kesitlerde tümör hücrelerinde yüksek mitotik karyotik indeks izlenmektedir (H&E, x100).....	14
Şekil 4. MYCN amplifikasyonu olan olguda FISH görüntüsü.....	35
Şekil 5. 1p delesyonu olan olguda FISH görüntüsü.....	35
Şekil 6. İmmunohistokimyasal olarak tümör stomasında MMP-2 antikor pozitifliği (x40).....	36
Şekil 7. İmmunohistokimyasal olarak tümör stomasında MMP-2 antikor negatifliği (x40).....	36
Şekil 8. İmmunohistokimyasal olarak tümör hücrelerinde ve stromada TIMP-3 antikor pozitifliği (x40).....	37
Şekil 9. İmmunohistokimyasal olarak tümör hücrelerinde ve stromada TIMP-3 antikor pozitifliği (x100).....	37
Şekil 10. İmmunohistokimyasal olarak tümörde yüksek telomeraz aktivitesi (x100).....	38

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1. MMP-2 ekspresyonu ile differansiyasyon arasındaki ilişki.....	34
Grafik 2. MMP-2 ekspresyonu ile Shimada sınıflaması arasındaki ilişki	34
Grafik 3. MMP-2 ekspresyonu ile metastaz arasındaki ilişki	35
Grafik 4. MMP-2 ekspresyonu ile evre arasındaki ilişki.....	35
Grafik 5. Telomeraz ekspresyonu ile MKİ arasındaki ilişki.....	37
Grafik 6. Telomeraz ekspresyonu ile evre arasındaki ilişki.....	37

KISALTMALAR

BBA: Büyük büyütme alanı

D.E.Ü.T.F: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

DI: DNA ploidi

GN: Ganglionörom

GNB: Ganglionöroblastom

H&E: Hematoksilen & Eosin

INPC: Uluslararası Nöroblastom Patoloji Komitesi

INSS: İnternasyonal Nöroblastoma Evreleme Sistemi

NB: Nöroblastom

NGF: Sinir büyüme faktörü

MKI: Mitotik karyotik indeks

MKH: Mitotik karyotik hücre

MMP: Matriks metalloproteinazlar

PSA: Prostat spesifik antijen

PNT: Periferik Nöroblastik tümörler

TIMP: Doku metalloproteinaz inhibitörleri

TPOG: Türk Pediatrik Onkoloji Grubu

TRAP: Telomerik tekrarlarının amplifikasyonu protokolü

TEŞEKKÜR

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda almış olduğum Tıpta Uzmanlık Eğitimi sırasında, bana emek veren tüm Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ve Öğretim Elemanları'na, yürüttüğüm Tıpta Uzmanlık Tezi'nin her aşamasında bana büyük katkı ve destek sağlayan Danışman Öğretim Üyesi Prof.Dr.Erdener Özer'e, eğitimim sırasında bana yol gösteren tüm Uzman meslekdaşlarıma, güzellikleri ve zorlukları her daim birlikte paylaştığımız Tıpta Uzmanlık Öğrencisi arkadaşlarıma, tezin hazırlanışı ve eğitimim süresince destekleri olan başta Ayşen Çayan ve Salih Öztürk olmak üzere tüm laboratuvar çalışanlarına ve ayrıca Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanlığı'na teşekkür ederim. Son olarak beni daima destekleyen sevgili eşim Volkan'a ve sabırla bekleyen bitanecik oğlum Doruk'a da sonsuz teşekkürler.

Dr.İzgi Üçer
İzmir, Nisan 2009

Nöroblastomlarda telomeraz, matriks metalloproteinaz ve doku matriks metalloproteinaz inhibitör aktivitesi

Dr. İzgi ÜÇER

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

izgi.kanat@deu.edu.tr

Amaç: Nöroblastomların farklı klinik davranış ve prognoz göstermelerinin altında yatan mekanizmalar henüz net olarak ortaya konmamıştır. Çalışmamızda bu biyolojik farklılıkta rol oynayan anlamlı parametreleri ortaya koymak amacıyla, nöroblastomlarda matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2), doku matriks metalloproteinaz inhibitörü-3 (TIMP-3) ekspresyonları yanısıra, telomeraz aktivitesini araştırdık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya dahil edilen, Türk Pediatrik Onkoloji Grubu Ulusal Tedavi Protokolü ile tedavi alan, 50 primer tümör dokusundan hazırlanan Hematoksilen & Eosin (H&E) boyalı kesitlerde, hücresel differansiyasyon ve mitotik karyotik indeks (MKİ) değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme ile birlikte, hasta yaşı ve NMYC amplifikasyon durumu da göz önünde tutularak, tüm olgularda Shimada sınıflandırmasına göre risk kategorizasyonu yapılmıştır. Olgulara ait kayıtlardan ulaşılabildiği ölçüde 1p delesyonu, evre, sağ kalım, metastaz ve nüks durumları belirlenmiştir. Daha sonra tümör dokularından hazırlanan kesitlere, immunohistokimyasal olarak MMP-2, TIMP-3 ve telomeraz antikörleri uygulanmış ve skorlama yapılmıştır. İmmunohistokimyasal bulgular ile diğer parametreler arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Bulgular: Çalışma kapsamına alınan olguların tanı anındaki yaş ortanca değeri 48 aydır (Aralık: 40 gün-16 yıl). Olguların 21'i (%42'si) kız, 29'u (%58'i) ise erkektir. Histolojik olarak değerlendirilen olguların 19'u (%38) andifferansiye, 14'ü (%28) az differansiye ve 17'si (%34) differansiye nöroblastom olarak saptanmıştır. Olguların 23'ü (%46) düşük, 13'ü (%26) orta, 14'ü (%28) yüksek mitotik karyotik indekse sahiptir. Tüm hastalar arasında 25 olgu (%50) 18 aydan küçük, 16 olgu (%32) 18 ay- beş yaş arası ve dokuz olgu (%18) beş yaş üzeri olarak saptanmıştır. Bu bulgulara göre yapılan Shimada klasifikasyonunda 34 olgu (%68) kötü histoloji ve 16 olgu (%32) iyi histolojili gruba dahil olmuştur. 16 olguda (%32) MYCN amplifikasyonu (>10 kopya) saptanmış, 34 olguda (%68) ise amplifikasyon

bulunmamıştır. 1p delesyonu dört olguda teknik nedenlerle değerlendirilememiş, 16 olguda (% 34.7) pozitif olarak saptanmıştır. Kalan olgularda ise 1p delesyonuna rastlanmamıştır. Tüm parametreler değerlendirildikten sonra, standart takip edilen olgularda risk sınıflamasına göre 12 olgu (%41,3) düşük riskli, üç olgu (%10,3) orta riskli ve 14 olgu (%48,4) yüksek riskli grupta yer almıştır. MMP-2 antikoruna ile olguların 22'sinde (%44) ise tümör stromasında pozitif immüreaktivite var iken, 28'inde (%56) boyanma olmamıştır. MMP-2 aktivitesi ile hücrel differansiyasyonda azalma, kötü histoloji grubu, ileri tümör evresi ve metastatik hastalık arasında anlamlı ilişki bulunmuştur ($p<0.05$). Buna karşın diğer parametreler ile arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. TIMP-3 ile 46 (%92) olguda tümör stroması ve hücrelerde pozitif immüreaktivite gözlenmiş, geri kalan dört (%8) tanesinde boyanma olmamıştır. TIMP-3 aktivitesi ile hiçbir parametre arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Tüm olguların 31'inde (%62) yüksek telomeraz aktivitesi (% 90'ın üzerinde tümör hücresi pozitif), geri kalan 19'unda (%38) düşük telomeraz aktivitesi saptanmıştır. Telomeraz aktivitesi ile artmış MKİ ve ileri hastalık evresi arasında da anlamlı ilişki bulunmuş, diğer parametreler ile arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır.

Sonuç: Nöroblastomlarda MMP-2 aktivitesinin andifferansiye tümörlerde artmış olması, kötü histoloji ile arasında olan ilişkiyi, olası anjiogenik rolü ise ileri tümör evresi ve metastatik hastalık riskini açıklamaktadır. Ayrıca çalışmamızda ileri evre nöroblastomlarda telomeraz aktivitesinin anlamlı olarak arttığı bulunmuştur. Bu nedenle MMP-2 ve telomeraz aktivitesinin, nöroblastomlarda önemli bir kötü prognostik gösterge olabileceğini düşünmekteyiz. Buna karşın çalışmamızda, TIMP-3 aktivitesinin nöroblastomlardaki biyolojik davranış üzerine etkisi konusunda, herhangi bir anlamlı sonuç bulunmamıştır.

Anahtar kelimeler: Doku matriks metalloproteinaz inhibitörü, matriks metalloproteinaz, MMP-2, nöroblastom, telomeraz, TIMP-3

Telomerase, Matrix Metalloproteinases and Their Tissue Inhibitory Proteins Activities in Neuroblastoma

Background & Aim: The mechanisms underlying biological and prognostic heterogeneity of neuroblastomas still remain unknown. To investigate the significance of parameters which may play a role in this heterogeneity, we studied telomerase activity, matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and tissue inhibitory matrix metalloproteinase 3 (TIMP-3) expressions in neuroblastoma.

Material and Method: The study included 50 primary neuroblastoma cases treated under standard protocol. Hematoxylen & Eosin stained tumor sections were reviewed to determine neuroblastic differentiation and mitotic-karyorexis index (MKI) and to categorize Shimada histological groups combining with age and NMYC status. 1 p deletion status, stage, survival, metastasis and recurrence were obtained from patients' records. Tumor sections were stained with MMP-2, TIMP-3 and telomerase antibodies to analyze the statistical relation between these protein expressions and established prognostic factors for neuroblastoma.

Results: The median age was 48 months (range: 40 days-16 years). Of 50 cases, 29 (58%) were boy. Histologically, 19 (38%) cases were undifferentiated, 14 (28%) poor differentiated and 17 (34%) well differentiated. MKI was low in 23 (46%) cases, moderate in 13 (26%) and high in 14 (28%). Sixteen (32%) cases showed MYCN amplification (>10 copies). Based on Shimada classification, 34 (68%) cases were of poor histology group. Of 46 cases, 16 (34.7%) showed 1 p deletion. Twelve (41.3%) of overall 29 cases with standard clinical follow-up were in low risk category, three (10.3%) in moderate risk and 14 (48.4%) in high risk. Of 50 cases, 22 (44%) cases showed MMP-2 immunopositivity in tumor stroma, whereas both tumor cells and the stroma were positive in 46 (92%) cases for TIMP-3 antibody. Strong MMP-2 immunopositivity was significantly related with undifferentiation, poor histology, advanced tumor stage and metastatic disease ($p>0.05$). However, none of morphological, genetical and clinical parameters showed significant relation with TIMP-3 immunostaining. Thirty-one (62%) cases showed higher telomerase activity (positivity in >90% tumor cells) with statistical relation to high MKI and advanced stage.

Conclusion: We think that significant relation between strong MMP-2 expression and neuroblastic undifferentiation can explain why these cases were of poor histology group. The established role of MMP-2 in tumor invasion and angiogenesis is in concordance with advanced tumor stage and metastatic risk. In addition, telomerase activity is significantly increased in advanced stage neuroblastoma. Thus it may be an indicator of poor prognosis in neuroblastoma. However, based on our findings, TIMP-3 does not appear a prognosticator for this tumor.

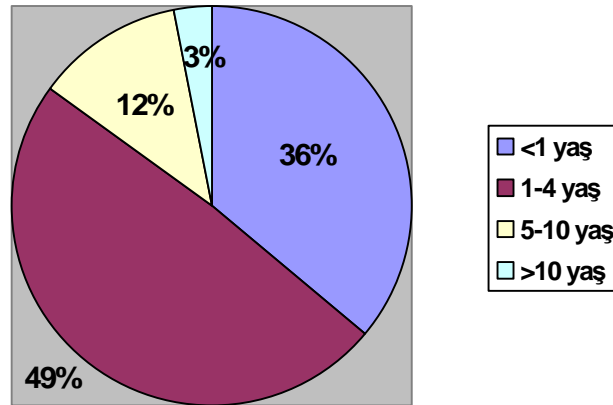
Keywords: matrix metalloproteinase - MMP-2 – neuroblastoma- telomerase - TIMP-3 - tissue inhibitory matrix metalloproteinase

GENEL BİLGİLER

I. PERİFERAL NÖROBLASTİK TÜMÖRLER

Periferal nöroblastik tümörler (PNT), çocukluk çağı ve bebeklik döneminde görülen en sık ekstrakraniyal solid tümörlerdir. İlk dört yaşta görülen tüm neoplazilerin yaklaşık %15'ini oluşturmaktadırlar (1). PNT'de tanı anındaki median yaş 22 aydır ve olguların %95'i 10 yaşından önce tanı almaktadır (2) (Şekil 1). Kız ve erkek cinsiyet arasında görülme sıklığı bakımından belirgin bir fark bulunmamaktadır (3). PNT beynin santral nöroblastik tümörlerinin aksine, sempatik sinir sisteminden gelişirler. Bu nedenle adrenal medulla, servikal, torasik, abdominal ve pelvik bölgedeki sempatik ganglionlar, Zuckerkandl organı, sakral ve koksigeal küçük sempatik ganglionlar başlıca lokalizasyonudur (4). Bunlar arasında en sıklıkla (%40) adrenal medullada görülürler. Bunu abdominal (%25), torasik (%15), servikal (%5) ve pelvik sempatik ganglionlardaki (%5) yerleşimi takip eder (3).

Klinik olarak spontan regresyon ya da maturasyondan, agresif progresyona kadar değişik durumlar gösterebilmektedir (1). Prognoz tanı anındaki yaşa ve hastalığın dağılımına, histolojik alttıpe ve tümör dokusundaki genetik değişikliklere göre farklılık göstermektedir (2). Hastalar en sık ele gelen abdominal kitle, hepatomegali, torasik kitle ile başvururlar. Torakoabdominal olanlar spinal kord basısına neden olabilirler. Servikal sempatik sinirlerin tutulumuna bağlı olarak Horner Sendromu, vasoaktif intestinal polipeptid salgınımına olarak diyare, orbital kitlesel etkiye bağlı olarak proptosis ve kutanöz nodüller görülebilir. Aynı zamanda opsoklonus sendromu da sıklıkla görülür. PNT sıklıkla kalsifikasyon içerir ve bu nedenle radyografilerde ya da diğer görüntüleme yöntemlerinde saptanırlar (3).



Şekil 1. Periferal nöroblastomatöz tümörlerde yaş dağılımı

PNT, histolojik olarak differansiyasyonun (maturasyonun) çeşitli evrelerinde olan nöroblastlar, nöropilden oluşan nöroblastomatöz komponent yanısıra, ganglion hücreleri, Schwann hücreleri ve nöritik uzantılarından oluşan Schwannian stromayı değişik oranda içerirler. Bu komponentler arasında Schwannian stromanın çevre normal dokudan kaynaklanan neoplastik olmayan bir komponent olduğu öne sürülmektedir (4).

PNT için prognostik sınıflandırma önemli bir konudur. Shimada ve ark. 1984 yılında PNT’i yaşa bağımlı bir histolojik sınıflandırma sistemi ile 4 kategoriye ayırmışlardır (5):

- I. Nöroblastom (Schwannian stromadan fakir)
- II. Ganglionöroblastom, intermikst (Schwannian stromadan zengin)
- III. Ganglionöroblastom, nodüler
- IV. Ganglionörom (Schwannian stroma baskın)

Daha sonraki yıllarda bu sınıflandırmayı geliştiren Uluslararası Nöroblastom Patoloji Komitesi (INPC), PNT’in terminolojisi ve sınıflandırılmasında bazı kriterler belirlemiştir (4). PNT için terminoloji tümörün makroskopik özelliklerine ve temel histolojik komponentlerin bir veya birkaçının bulunmasına ya da bulunmamasına dayanır. Bu temel histolojik komponentler şunlardır:

i. Nöroblastomatöz komponent: Andifferansiye nöroblastlar ya da ganglion hücrelerine differansiye olma eğiliminde nöroblastlar ile nöropil denen matriksi içerirler.

ii. Ganglionöromatöz komponent: Ganglion hücreleri, Schwann hücrelerinden kaynaklanan nöritik uzantılar ve matür fibröz dokudan oluşur. Schwannian stroma olarak isimlendirilen bu komponent fasiküler bir patern oluşturur.

iii. İntermediyet komponent: Differansiye olmakta olan nöroblastlar, ganglion hücreleri, yer yer nöropil yer yer ise Schwannian stromadan oluşan bir komponenttir.

INPC, PNT alttiplerini belirlemek için, içerdikleri histolojik komponentlere göre bazı kriterler belirlemiştir. Bu kriterler esas olarak primer tümörün tamamı ya da büyük bir kısmı rezeke edildiğinde değerlendirilebilir. Ancak çoğu PNT klinik olarak saptandığında metastaz yapmış olabilir ya da rezeke edilemez durumda olabilir. Bundan dolayı primer tümörden yeterli büyüklükte bir insizyonel biyopsi, metastatik lenf nodu eksizyonu ya da karaciğer kama biyopsisi tümör tipini, PNT ve alttiplerini belirlemek ve prognostik sınıflandırma yapmak için kullanılabilir. Bununla birlikte iğne biyopsisi yapılacak ise çok sayıda örnek almak uygundur. Eğer biyopsi spesmeni örneği histolojik tiplendirme için yetersizse, ‘Nöroblastom, NOS’ veya ‘Ganglionöroblastom, NOS’ gibi tanılar kullanmak doğrudur. Bu

bölümde ganglionöroblastom ve ganglionörom kriterlerinden bahsedilecek, Nöroblastom konusu ise diğer bölümde tartışılacaktır.

i) Ganglionöroblastom (GNB)

1) *GNB (prototip)*: Ganglionöromatöz ve nöroblastomatöz komponentin karışımından oluşur. İntermediyet komponent de bulunabilir. Genelde ganglionöromatöz komponent tümörün %50'sinden fazlasını oluşturur.

2) *GNB, nodüler (klasik)*: Makroskopik olarak ganglionöromatöz komponentin oluşturduğu alan ile çevrili nöroblastomatöz komponentin oluşturduğu kanamalı nodül yapısı izlenir. Mikroskopide nöroblastomatöz nodül ile bunu çevreleyen ganglionöromatöz komponent arasında keskin bir sınır izlenir. Nadiren fokal olarak olarak nöroblastomatöz komponentin nodül dışına uzanımı görülebilir.

3) *GNB, nodüler (atipik)*: Ganglionöromatöz komponent, daha fazla oranda bulunan nöroblastomatöz komponentin çevresinde ya da bu komponentin septalarının içerisinde kordonsal tabaka olarak bulunur. Makroskopik ya da mikroskopik olarak nodül izlenmez. Metastazi nöroblastom özelliğinde olan GNB da bu kategoride değerlendirilir.

4) *GNB, intermikst*: Tümör ağırlıklı olarak ganglionöromatöz komponentten oluşur. Arada küçük nöroblastomatöz odaklar vardır.

GNB için histolojik değerlendirmede dikkat edilmesi gereken durumlar bulunmaktadır. İğne biyopsi ya da küçük insizyonel biyopsilerde izlenen nöroblastomatöz komponent, klasik nodüler GNB'un nodülünü temsil ediyor olabilir. Diğer bir yandan sadece ganglionöromatöz komponent görülüyorsa, klasik nodüler GNB'un nöroblastomatöz nodülü atlanmış olabilir. Bu yanlışlıkların önüne geçebilmek için görüntüleme yöntemlerinden ve katekolaminlerin üriner atılımlarının düzeyinden yararlanılabilir. Nodüler GNB'larda bazen görüntüleme yöntemleri ile nodüller saptanabilmektedir. Aynı zamanda bu tümörlerde katekolaminlerin üriner atılımları intermikst GNB veya matürleşmekte olan ganglionöroma göre daha fazla olmaktadır. Ancak yine de bu gibi olgularda 'Nöroblastik tümör, sınıflandırılmayan' tanısı vermek en uygunu olabilir.

Çok nadiren matürleşmekte olan ganglionörom veya intermikst GNB olarak tanımlanan bazı olgularda yaygın kalsifikasyon, nöroblastomatöz nodülün tamamını görünmez kılabilir. Bu şekilde yaygın kalsifikasyon içeren tümörlerde GNB, NOS en uygun tanı olacaktır (4).

ii) Ganglionörom (GN)

1) *GN (prototip)* : Tümör tamamıyla ya da %100'e yakın oranda ganglionöromatöz komponentten oluşur.

2) *GN, matürleşmekte olan*: Ganglionöromatöz tümörde az sayıda serpiştirilmiş, differansiye olan nöroblastlardan oluşan belirsiz odaklar, 'çıplak' nöropil ve matürleşmekte olan ganglion hücreleri görülür.

3) *GN, matür*: Tümör %100'e yakın oranda ganglionöromatöz komponent içerir. Hücresel elemanlarda immatürite ya da atipi izlenmez.

II. NÖROBLASTOM

Nöroblastom (NB), diğer PNT gibi sempatikoadrenal sistemin nöral krest hücrelerinden köken alır. Bundan dolayı tümörler sempatik sinir sisteminin bulunduğu herhangi bir yerde gelişebilirler. Primer tümörlerin çoğu (% 65) abdomende görülür, bunların da en az yarısı adrenal medullada lokalizedir. Sık görülen diğer bölgeler boyun, göğüs boşluğu ve pelvistir (6). En sık uzak metastaz bölgesel lenf nodları, karaciğer, kemik iliği ve kemikleredir (7). Klinik bulgu ve semptomlar primer tümörün bulunduğu bölgeye, metastatik hastalık veya paraneoplastik sendrom gelişimine bağlı olarak çok çeşitlilik gösterir. Nöroblastom 15 yaşından küçük hastalarda görülen malignitelerin yaklaşık %7'sini oluşturur ve tüm pediatrik kansere bağlı ölümlerin yaklaşık % 15'inden sorumludur (6).

i) INPC Sınıflandırması

1) *NB, prototip*: Tümör %50'den fazla oranda nöroblastomatöz komponentten oluşmuştur. Daha az oranda küçük, sınırları belirsiz ganglionöromatöz odak ya da odaklar bulunabilir.

2) *NB, andifferansiye*: Rutin ışık mikroskopisinde differansiyasyon bulguları göstermeyen ya da nöropil içermeyen küçük, orta veya büyük yuvarlak nöroblastlardan oluşur.

3) *NB, pleomorfik subtip*: Nöroblastlar iri, pleomorfik nükleuslu, belirgin nükleollü, geniş sitoplazmalıdır. Bazı hücrelerde rabdoid özellikler belirgindir. Nöropil izlenmez. NB, andifferansiye alttipinin bir varyantı olarak kabul edilir.

4) *NB, az differansiye*: Nöroblast populasyonunun %5'inden azında ganglion hücrelerine doğru senkron differansiyasyon görülür.

5) NB, differansiye: Nöroblast populasyonunun %5'i ya da daha fazlasında ganglion hücrelerine doğru sekron differansiyasyon görülür (4).

ii) Shimada Sınıflandırması

PNT'in prognostik önem gösteren temel morfolojik bulgusu ganglion hücrelerine doğru differansiyasyonun (maturasyonun) derecesidir (1). PNT'lerin klinikopatolojik değerlendirilmesi için yıllar içerisinde çok sayıda metodoloji oluşturulmuş, bunlar arasında Shimada sınıflandırması uluslararası ilgi ve kabul görmüştür (Tablo 1). Shimada ve ark. bu sınıflandırmalarında yaşa bağlı bir yaklaşım öne sürmüştür. Bu sınıflamada NB, Schwannian stromadan zengin ve Schwannian stromadan fakir olarak iki gruba bölünmüştür. Ayrıca Shimada ve ark. bu sınıflamada öne sürdükleri prognostik göstergelerden biri olarak, "mitotik-karyotik indeks (MKİ)" kavramını ortaya koymuşlardır. Bu indekste sadece mitoz sayısı değil mitotik karyotik hücrelerin sayısı da kullanılmaktadır (8).

Shimada sınıflamasına göre NB, INPC sınıflandırmasında belirtildiği gibi differansiyasyon derecesine göre üç gruba ayrılmıştır: Differansiye, az differansiye ve andifferansiye NB (Şekil 2a-c). Eğer tümör hücreleri nükleer vezikülasyon, nükleol belirginliği, eozinofilik/amfofilik sitoplazmik genişleme gibi differansiyasyon göstergesi olan sitolojik bulgular ve nöropil içermiyorlarsa andifferansiye NB olarak sınıflandırılmışlardır. Eğer %5'den az tümör hücresi daha differansiye görünümde ya da ganglion hücresi özelliğindeyse az differansiye, bu özellikler %5 ve daha fazla tümör hücresinde görülüyorsa differansiye NB olarak sınıflandırılmıştır (5). Az differansiye nöroblastomu andifferansiye nöroblastomdan ayıran özellik, az differansiye NB'un nöropil içermesidir. Nöropil içeriği ve miktarı, az differansiye NB'u differansiye NB'dan ayırma bir kriter değildir (4).

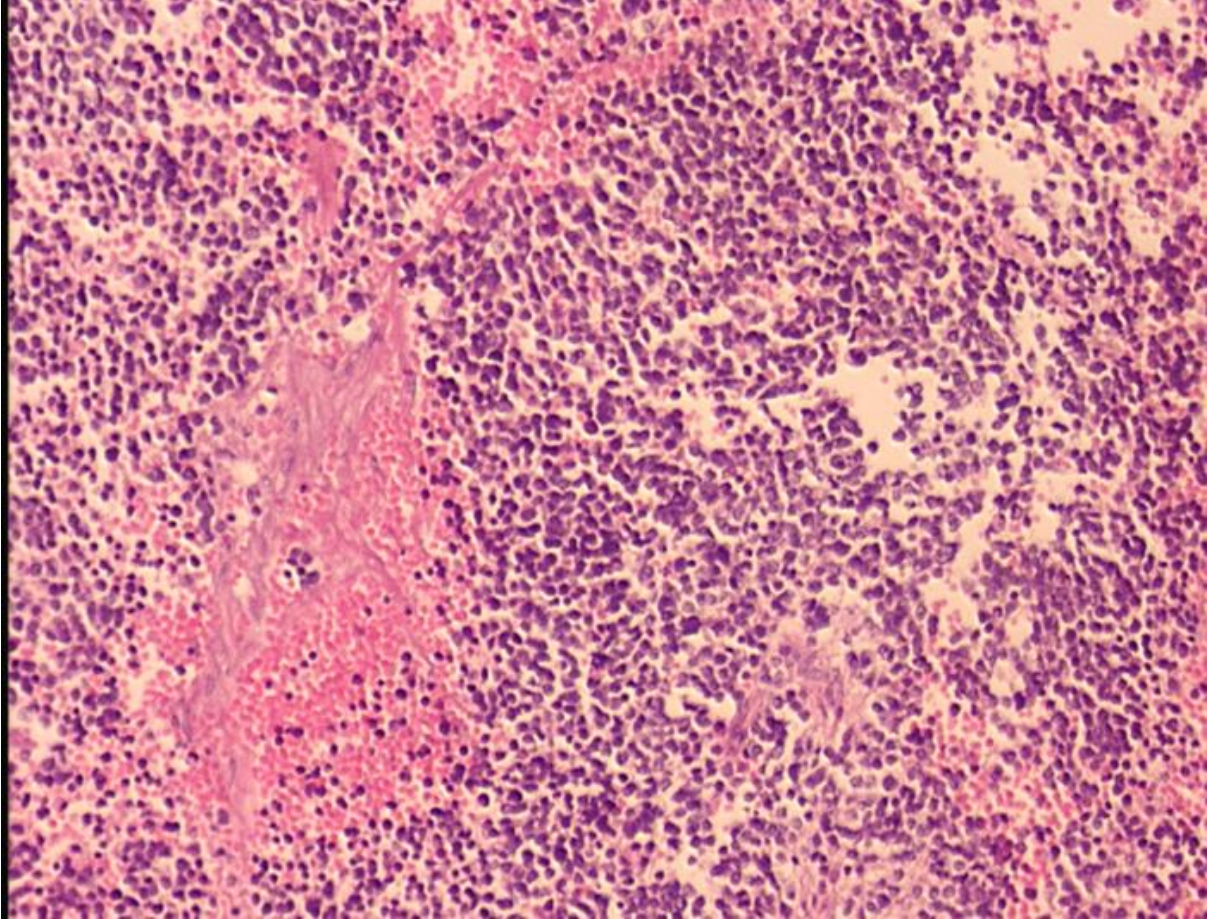
Shimada sınıflamasına göre MKİ'i belirlemede, mitoz ve karyoreksis gösteren tümör hücreleri sayılmaktadır. Mitoz ve karyoreksis gösteren hücreler, hücre yoğunluğuna bağlı olarak 10 veya daha fazla büyük büyütme alanında (BBA) sayılır. Sayılan hücre sayısının 5000 olması idealdir. Nekroz, hemoraji, otoliz ve sıkışma artefaktı gösteren alanlar göz ardı edilmelidir. Tümör hücrelerinde %2 den az mitotik karyotik hücre varlığı "*düşük MKİ*", %2-4 mitotik karyotik hücre varlığı "*orta MKİ*" ve %4 den fazla mitotik karyotik hücre varlığı "*yüksek MKİ*" olarak değerlendirilmektedir (Şekil 3) (9).

Shimada sınıflamasında prognozu belirlemede bir sonraki basamak ise hastanın yaşıdır. Differansiyasyon derecesi, MKİ ve hastanın yaşı göz önüne alındığında iki ana prognostik

kategori ortaya çıkmaktadır: İyi histolojili ve kötü histolojili. Buna göre birbuçuk yaşın altındaki az differansiye nöroblastik tümörlere sahip hastalar ve beş yaşın altı differansiye nöroblastik tümörlü hastalar iyi histolojili grup olarak kabul görmektedir. Herhangi bir yaşta andifferansiye tümöre sahip hastalar ve birbuçuk yaşından daha büyük az differansiye tümöre sahip olgular ise kötü histolojili grup olarak isimlendirilirler. MKİ parametresi de hasta yaşları ile birlikte göz önüne alındığında belirgin prognostik farklılıklar izlenmektedir. Beş yaş altı düşük MKİ'e sahip hastalar ve birbuçuk yaş altı orta MKİ'e sahip hastalar iyi histolojili gruba girerken, beş yaş üzeri düşük MKİ'e sahip ve herhangi bir yaşta yüksek MKİ'e sahip olgular kötü histolojili grup olarak kabul görmektedirler (9).

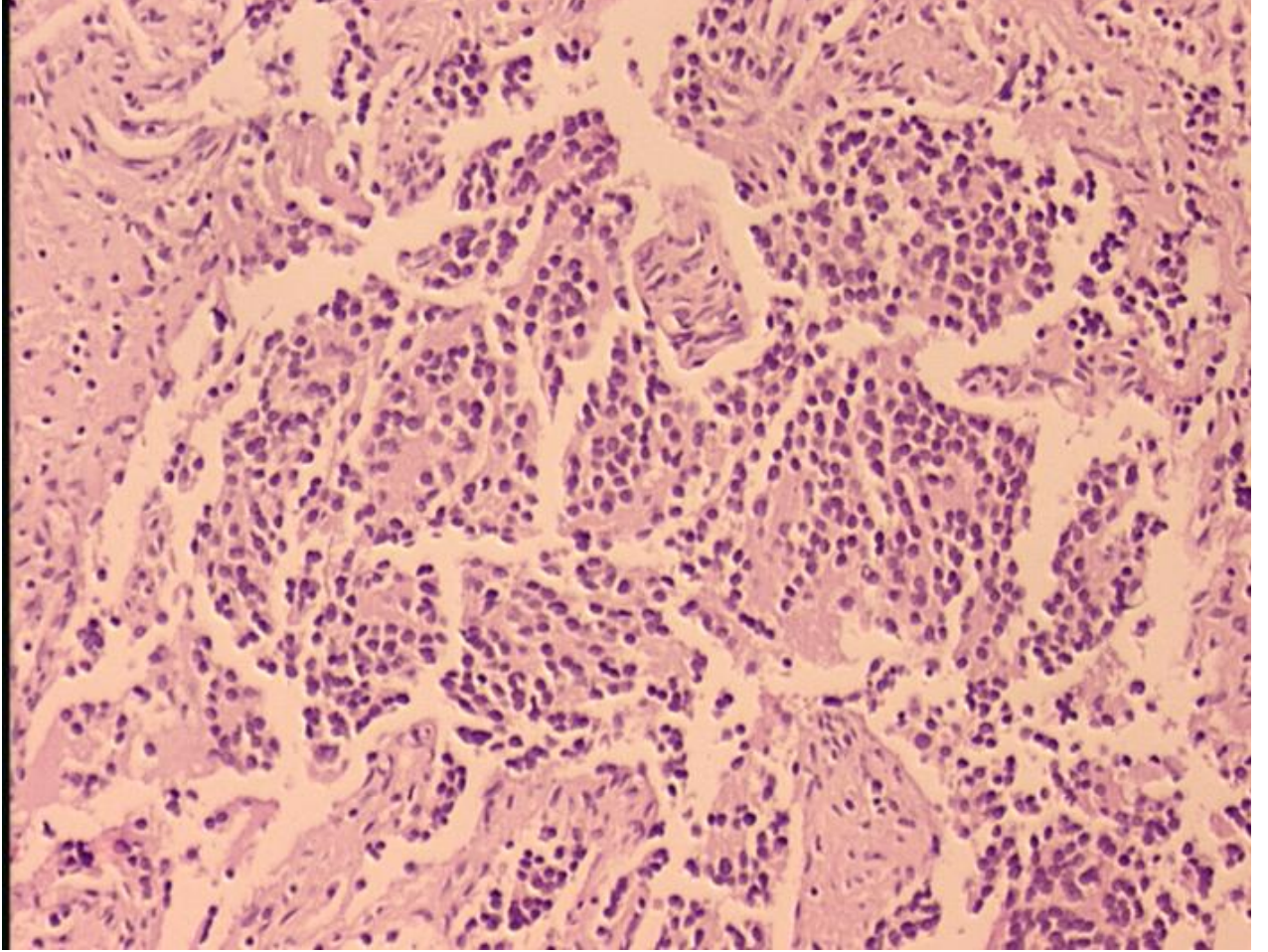
Tablo 1. Shimada sınıflaması

Yaş	Differansiyasyon	MKİ	Shimada sınıflaması
<1,5	Andifferansiye	Herhangi	Kötü histoloji
<1,5	Azdifferansiye/Differansiye	Düşük/orta	İyi histoloji
<1,5	Herhangi	Yüksek	Kötü histoloji
1,5-5	Andifferansiye/Azdifferansiye	Herhangi	Kötü histoloji
1,5-5	Differansiye	Düşük	İyi histoloji
1,5-5	Differansiye	Orta/yüksek	Kötü histoloji
>5	Herhangi	Herhangi	Kötü histoloji



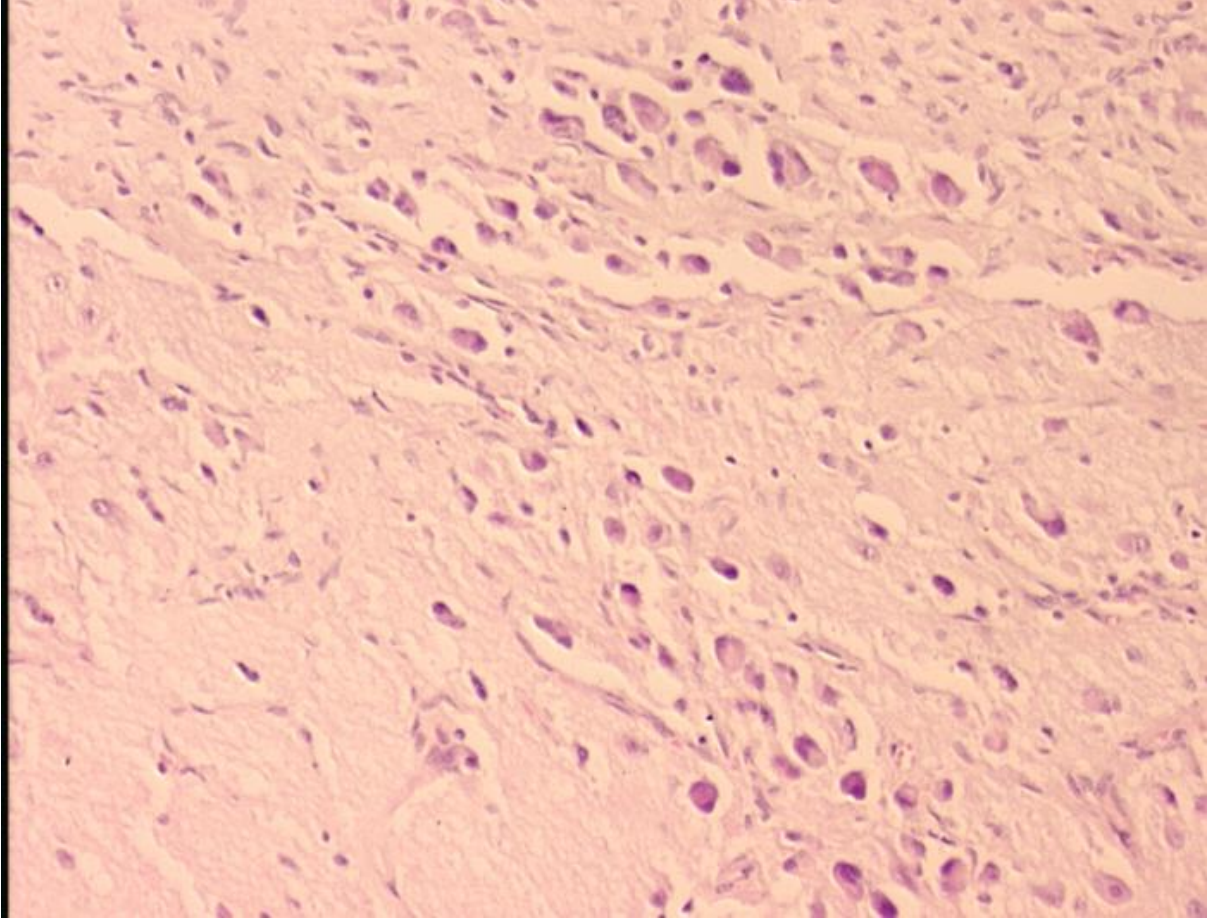
Şekil 2a. Shimada klasifikasyonuna göre andifferansiye nöroblastomun histolojik görüntüsü.

Hücrel differansiyasyon ve nöropil izlenmemektedir (H&E, x100)



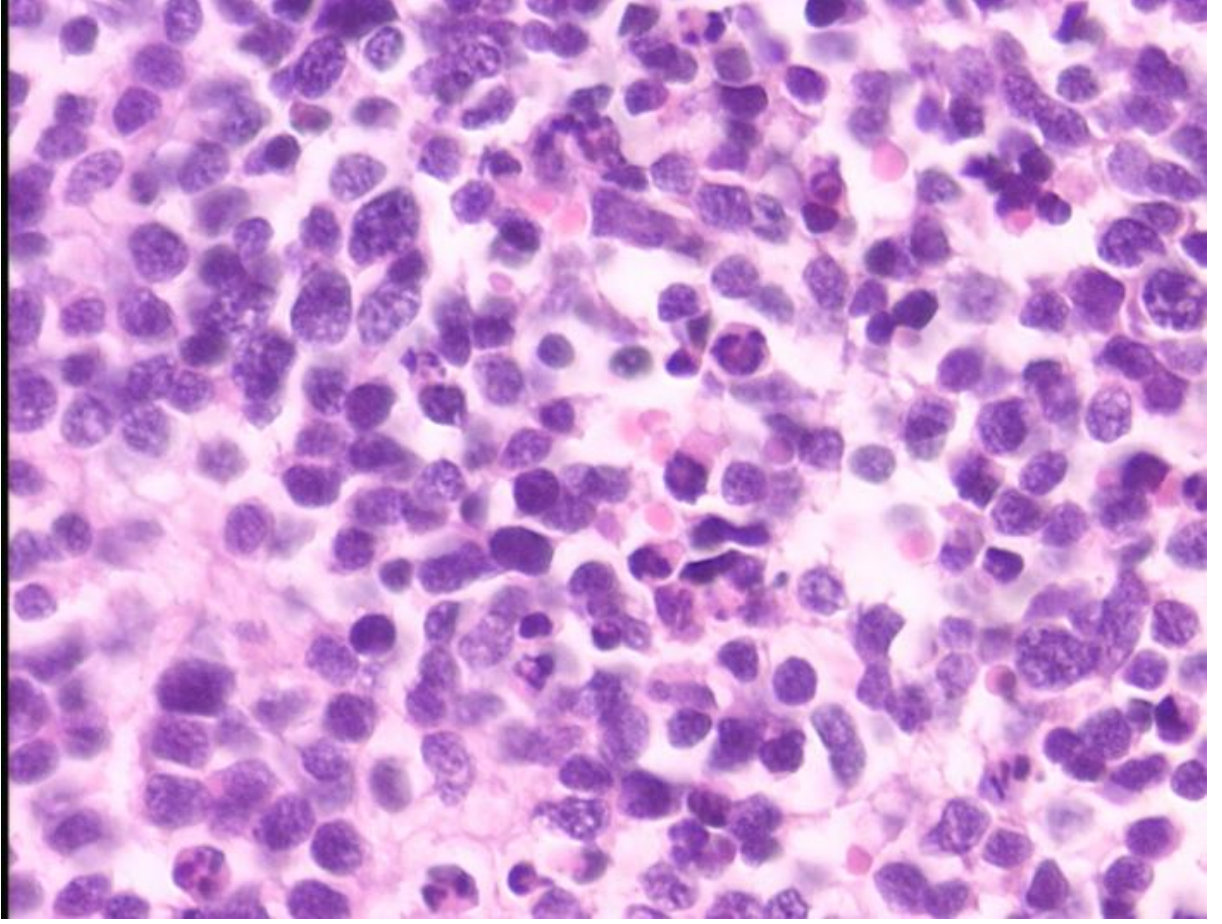
Şekil 2b. Shimada klasifikasyonuna göre az differansiye nöroblastomun histolojik görüntüsü.

Hücresel differansiyasyon ve nöropil %5'ten az oranda izlenmektedir (H&E, x100)



Şekil 2c. Shimada klasifikasyonuna göre differansiye nöroblastomun histolojik görüntüsü.

Hücresel differansiyasyon ve nöropil %5'ten fazla oranda izlenmektedir (H&E, x100)



Şekil 3. Histolojik kesitlerde tümör hücrelerinde yüksek mitotik karyotik indeks izlenmektedir (H&E, x100)

iii) Klinik Evreleme

Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG)'nun Ulusal Nöroblastom Tedavi Protokolü'nde kabul ettiği sistem Evans sınıflandırmasının geliştirilmiş ve özgüleştirilmiş şekli olan “İnternasyonal Evreleme Sistemi”dir (Tablo 2).

Tablo 2. İnternasyonal Nöroblastoma Evreleme Sistemi (INSS)

Evre	Özellikler
Evre 1	Tümör köken aldığı organa sınırlı, makroskopik tam rezeksiyon. Mikroskopik tümör artığı olabilir ya da olmayabilir. İpsi ve kontrlateral lenf nodu tutulumu yok.
Evre 2a	Unilateral tümör, tam olmayan makroskopik rezeksiyon. İpsi ve kontrlateral lenf nodu tutulumu yok.
Evre 2b	Unilateral tümör, makroskopik tam veya tam olmayan rezeksiyon. İpsilateral bölgesel lenf nodu tutulumu var, kontrlateral tutulum yok.
Evre 3	Orta hattı aşan tümör ve bölgesel lenf nodu tutulumu var. - Unilateral tümör ve kontrlateral lenf nodu tutulumu var - Orta hat tümör ve bilateral lenf nodu tutulumu var.
Evre 4	Yaygın hastalık, uzak metastazlar (uzak lenf nodu, kemik iliği, kemik, karaciğer vb).
Evre 4-S	Evre 1 ve 2 gibi lokalize primer tümör. Sadece karaciğer, cilt ve/veya kemik iliği yayılımı var. Yaş < 365 gün olmalıdır.

Evre 3 orta hat tümörü total çıkarıldıysa ve lenf nodu tutulumu yoksa Evre 1 olarak kabul edilir. Zuckerkandl ganglionu ya da pelvisteki sempatik ganglionlardan köken alan tümörler orta hat tümörü olarak kabul edilir. Adrenal, toraks ve abdomendeki sempatik ganglionlardan köken alan tümörler, orta hat tümörü olarak kabul edilmezler.

iv) Klinik Risk Grupları

Nöroblastomda tedavi, risk gruplarına göre düzenlenmektedir. Risk grupları ülkemizde, son yıllarda hasta yaşı, INSS evrelemesi, tümörün histopatolojik ve genetik özelliklerini göz önüne alarak, TPOG tarafından hazırlanan risk sınıflandırmasına dayanarak belirlenmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. TPOG tarafından belirlenen risk kriterleri

-
- 1) Evre (INSS sınıflandırması)
 - 2) Yaş (< 1 yaş, ≥1 yaş)
 - 3) MYCN amplifikasyonu [Kopya sayısı < 10 : MYCN amplifikasyonu (-), >10 : MYCN amplifikasyonu (+)]
 - 4) Shimada'ya göre prognostik kategori (İyi histoloji, kötü histoloji)
 - 5) DNA ploidi (DI) [Diploid (DI =1), Hiperdiploid (DI >1)]
-

1. Düşük Risk Grubu: Bu grup, erken evre ve kötü biyolojik özelliklere sahip olmayan hasta grubunu içermektedir. Bu grup hastalarda sadece cerrahi tedavi ile %90'larda kür oranı bildirilmektedir. Bu gruba giren hastalar şunlardır:

- Tüm Evre 1 hastalar
- Evre 2a ve 2b, bir yaşından küçük tüm hastalar (diğer risk faktörlerine bakmaksızın)
- Evre 2a ve 2b, bir yaşından büyük , MYCN amplifikasyonu olmayan hastalar (ploidi ve histopatolojiye bakmaksızın)
- Evre 2a ve 2b, bir yaşından büyük, MYCN amplifikasyonu olan ancak iyi histolojili hastalar
- Evre 4S, MYCN amplifikasyonu olmayan, iyi histolojili ve DI>1 (hiperdiploid veya triploid) olan hastalar

2. *Orta risk grubu:* Bu grup genellikle bir yaş altında ve MYCN amplifikasyonu olmayan Evre 3 ve 4 hasta popülasyonunu içermektedir. Heterojen özellikleri nedeniyle orta risk grubu, histoloji ve DNA indeksine göre iki alt gruba ayrılmış ve tedavi buna göre planlanmıştır:

İyi Prognostik Grup

- Evre 3, bir yaşından küçük, MYCN amplifikasyonu olmayan, iyi histolojili ve $DI > 1$ olan hastalar
- Evre 3, bir yaşından büyük, MYCN amplifikasyonu olmayan, iyi histolojili hastalar
- Evre 4, bir yaşından küçük, MYCN amplifikasyonu olmayan, iyi histolojili ve $DI > 1$ olan hastalar

Kötü Prognostik Grup

- Evre 3 veya 4, bir yaşından küçük, MYCN amplifikasyonu olmayan, iyi histolojili ve $DI = 1$ olan hastalar
- Evre 3 veya 4, bir yaşından küçük, MYCN amplifikasyonu olmayan, kötü histolojili ve $DI > 1$ olan hastalar
- Evre 4S, MYCN amplifikasyonu olmayan, kötü histolojili hastalar
- Evre 4S, MYCN amplifikasyonu olmayan, iyi histolojili, $DI = 1$ olan hastalar

3) *Yüksek risk grubu*

- Evre 2a-2b, bir yaşından büyük, MYCN (+) ve kötü histolojili hastalar
- Evre 3, bir yaşından büyük, kötü histolojili hastalar diğer risk faktörleri göz önüne alınmaksızın yüksek riskli kabul edilirler.
- Evre 4, bir yaşından büyük tüm hastalar diğer risk faktörlerine bakmaksızın yüksek riskli kabul edilirler.
- Evre 3 , 4 veya 4S, MYCN (+) tüm hastalar yaş ve diğer risk faktörlerine bakmaksızın yüksek riskli kabul edilirler.

v) Nöroblastomlardaki Genetik Değişiklikler

Tümörün biyolojik davranışını belirlemek ve nöroblastomlu hastaların prognozunu tayin etmek için çok sayıda parametre belirlenmiş durumdadır. Nöroblastomun biyolojik davranışı ile belirgin korelasyon gösteren bu parametreler MYCN amplifikasyonu, 1p delesyonu, Trk-A ekspresyonu, Ha-ras p21 ekspresyonu ve hücresel DNA içeriğidir. Ancak bu parametrelerin hiçbiri hastanın prognozunu ortaya koymada tek başına yeterli değildir (10).

Nöroblastom hücreleri genellikle ploidi kayması, kazanımı ya da kromozom bölgelerinin kaybı ve onkogenlerin aktivasyonu gibi kompleks genetik değişiklikler gösterirler. Bunlardan bir kısmı bağımsız prognostik belirteçlerdir. Kromozomal araştırma ve moleküler analizler MYCN kopya sayısında artış ve kromozom 1'in kısa kolundaki alterasyonların sık olduğunu göstermiştir (10).

Nörotropin reseptörleri (Trk-A, Trk-B ve Trk-C) ve bunları kodlayan genler (NTRK1, NTRK2, ve NTRK3) ve bunların ligandları (NGF, BDNF ve nörotropin-3) nöral hücrelerin gelişimi ve differansiyasyonunda önemli düzenleyicilerdir. Yapılan çalışmalarda yüksek Trk-A seviyeleri iyi prognoz gösteren nöroblastomlarla ilişkili bulunurken, Trk-B'in genellikle kötü prognozlu olgularda eksprese edildiği saptanmıştır (5).

Nöroblastomların genetik değişiklikleri üzerine yapılan çok sayıda araştırmada tümörlerin belirgin genetik değişikliklerinin klinik davranışları ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir. En sık kullanılan sınıflandırma MYCN kopya sayısı, kromozom 1 in kısa kolundaki anormallikler ve DNA içeriğine dayalı ploidi düzeyidir (5).

1) MYCN Amplifikasyonu

MYCN nükleoproteini 2. kromozomda, 2p24.1 lokasyonunda bulunan gen tarafından kodlanır bulunur ve embriyogenez sırasında sinir gelişiminde gereklidir. Ancak bu protein, nöroblastom, retinoblastom, Wilms tümörü, küçük hücreli akciğer karsinomu, beyin tümörleri ve bazı primitif tümörler dışında, normalde erişkin insanlarda saptanmaz. MYC ailesi proteinleri (MYCN ve diğerleri) proteinleri transkripsiyon düzenleyici proteinlerdir ve hücresel proliferasyon, differansiyasyon ve apoptozu düzenlemede önemli bir role sahiptirler (11).

MYCN amplifikasyonu nöroblastomların yaklaşık %20'sinde görülmektedir ve agresif klinik davranışı öngören bir moleküler göstergedir (12). Nöroblastomlardaki histopatolojik

bulgularla MYCN amplifikasyonu arasında, prognostik ve biyolojik olarak anlamlı ilişki bildirilmiştir (13). Amplifikasyon DNA instabilitesine neden olur ve nöroblastom hücrelerinde yüksek oranlarda MYCN protein üretimi ile sonuçlanır (9). MYCN amplifikasyonu gösteren tümörlerdeki nöroblastik hücreler sınırlı differansiasyon gösterme ya da hücrel differansiyasyon göstermeme, mitotik ve karyotik aktivitede artış gibi karakteristik özellikler göstermektedir (9). Bir çok yüksek riskli nöroblastom olgusu, MYCN amplifikasyonu göstermektedir. Ancak bu tümörlerin %60 dan fazlasında da amplifikasyon saptanamamaktadır. Bu da yüksek riskli nöroblastom gelişiminde başka genetik yollar olabileceği sonucunu doğurmaktadır (12).

Tümör hücre nükleuslarında myc-max protein heterodimerinin oluşumu hücrel differansiyasyonu önler, hücrel proliferasyonu artırır (mitoz), ve DNA instabilitesine bağlı hücrel ölümü (karyoreksis) uyarır (9). MYCN'nin yüksek seviyedeki kopya sayısındaki artış (>10), ileri evre hastalık ve kötü klinik gidiş ile ilişkili olduğu gibi daha düşük evredeki hastalarda ise hızlı tümör progresyonu ve kötü prognoz göstergesidir (5).

2)Kromozom 1p ve 11q Delesyonları

Kromozom 1p ve 11q nun kollarındaki heterozigosite kaybı ve kromozom 1p36 delesyonu nöroblastomlarda görülen diğer genetik değişikliklerdendir. Yapılan çalışmalarda 1p36 ve 11q23 kromozomlarındaki heterozigosite kaybı ile yüksek riskli nöroblastom arasında anlamlı ilişki bulunmuştur (12). 1p36 heterozigosite kaybı genellikle MYCN amplifikasyonuna eşlik ederken, 11q23'deki heterozigosite kaybı nadiren MYCN amplifikasyonuna eşlik etmektedir. Bundan dolayı 11q23 heterozigosite kaybı özellikle MYCN amplifikasyonu göstermeyen, ancak agresif seyreden olgularda kullanılabilir bir prognostik faktör olabilir çünkü 11q heterozigosite kaybı primer nöroblastomların yaklaşık %17'sinde görülmektedir ve bunların da çoğunluğu MYCN amplifikasyonu göstermeyen olgulardır. Bu genetik değişikliğin nöroblastomda sağ kalımı kısalttığı saptanmıştır (12).

1p36 delesyonu primer nöroblastomların yaklaşık %23'ünde görülmektedir ve kötü prognozla yüksek ilişkili bulunmuştur (12). Özellikle düşük-orta riskli hastaların kötü gidişatının bağımsız göstergesi olarak değerlendirilebilir. Andifferansiye nöroblastomlardaki 1p36 delesyonlarının yüksek görülme insidansı, bu bölgede normal nöral gelişim için gerekli bir ya da daha fazla gen olması gerektiğini ve bu genlerin kaybının nöroblastom hücrelerinde differansiyasyonu baskıladığını düşündürmektedir (5).

III-TELOMERAZ AKTİVİTESİ VE TELOMERLER

Telomerler, ökaryotik kromozomların uçlarında yerleşmiş özel yapılardır. Kromozomların korunmasında ve DNA replikasyonunda önemli rolleri olduğu düşünülmektedir (10). Telomerler hegzamerik DNA tekrarlarından (5-TTAGGG-3) oluşurlar (14). Telomer başına düşen tekrar sayıları oldukça değişkendir. İnsanlarda 5000 ile 15 000 çift arasında değişmektedir (15). Somatik hücrelerde her hücre bölünmesinde telomerler kısalır (14). Görevleri DNA replikasyonu esnasında kromozom uçlarını ekzonükleaz ve ligazlara karşı korumak, böylece genomik DNA kaybını önlemek ve kromozomları stabilize etmektir (10,15). Hücre bölünmesi esnasında telomerlerin kısalması, genetik bir saat gibi fonksiyon görür. Normal hücreler böylece bölünmelerini sayarlar ve tekrar bölünmeye ya da apoptoza doğru kendilerini yönlendirirler (14).

Telomeraz, bir ribonükleoprotein enzimi olup DNA polimeraz özelliğindedir (10). Görevi olarak telomerlerin replikasyonu (uzatılması) için kendisine ait kısa RNA iplikçiklerini kullanır (16). Telomeraz geni bir tümör süpresör genidir ve 10p15.1 lokasyonunda bulunduğu dair veriler bulunmaktadır. Telomeraz, germ hücreleri ve embriyonik hücreler yanı sıra, hematopoetik hücreler, lenfositler, deri keratinositleri, intestinal kript hücreleri gibi somatik hücrelerde eksprese edilir (17). Diğer somatik dokular telomerlerini uzatmak için gerekli mekanizmadan yoksundurlar ve hücre replikasyonunun olamayacağı bir instabilite noktasına gelmeden kısalmakta olan telomerlerini kaybederler. Telomeraz aktivitesine sahip olmayan hücrelerin her hücre bölünmesinde telomerik tekrarları hızla kısalır, çünkü kromozom uçlarındaki DNA sentezi tamamlanamaz ve buna 'uç replikasyon problemi' denir (18). Uç replikasyon problemine bağlı olarak hücre bölünmesi sonucu telomer sayısında belirgin düşüş meydana gelir ve ancak hücrelerde telomeraz varsa bu kompanze edilir (10). Telomerlerin kısalması genetik instabiliteye zemin hazırlar ve bu da p53 ve Retinablastom genleri gibi tümör baskılayıcı genlerin düzenlediği hücre yaşlanması için primer sinyali oluşturabilir. Bu kontrol mekanizmasını geçen hücrelerdeki telomeraz aktivitesinin indüksiyonu, telomerik DNA kaybının önlenmesi ile klonal immortaliteye neden olur ve telomer uzunluğu sabitlenir (18).

Telomeraz aktivitesinin kanser gelişiminde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Kanserlerin yaklaşık %90'ında telomeraz aktivitesi gösterilmişken, normal dokularda ve benign tümörlerde telomeraz sadece düşük oranda bulunmuştur (15). Malign hücrelerde telomeraz aktivitesi yeniden ortaya çıkar ve bu durum malign hücrelerin ölümsüzleşmesindeki

kritik basamağı oluşturur (19,20,21). Telomeraz aktivitesi hücre proliferasyonu ile korele olarak artış gösterir (14). Birçok malignitede telomeraz aktivitesi saptanmıştır (21,22,23,24). Bu bilgi kanserlerin erken tanınmasında, benign, premalign ve malign ayrımının yapılmasında yararlı olabilir (25). Telomeraz aktivitesi nöroblastom dışında meme, prostat, tiroid ve adrenal bezin malign tümörlerinde de yüksek olarak saptanmıştır ve benign-malign tümör ayrımında önemli olabilecekleri düşünülmektedir (15). Ayrıca meningiomların klinik davranışını belirlemede de kullanılmaktadır (26). Yüksek telomeraz aktivitesi birçok endometriyal kanserde de saptanmış durumdadır (14).

IV- MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR

Matriks metalloproteinazlar (MMP) doku remodelasyonunda, normal yara iyileşmesinde ve tümör progresyonunda ekstrasellüler matriksin degradasyonundan sorumludur (27). Tümör progresyonu ve metastazı için en önemli basamak, ekstrasellüler matriksin proteolitik degradasyonu sonucu oluşan bazal membran invazyonudur. Ekstrasellüler proteolizin düzenlenmesinde MMP dahil çok sayıda molekül görev alır. MMP en az 26 endopeptidazdan oluşan Zn^{+2} bağımlı geniş bir nötral endopeptidaz ailesidir (7). MMP, ekstrasellüler matriksin bir çok komponenti için proteolitik aktivite içermektedir. MMP'ler dokuda inaktif proform protein olarak üretilirler. Proformda proteinin cys kalıntısı çinkonun proteine bağlanmasını dolayısı ile aktifleşmesini engeller. Bu kalıntının eliminasyonu MMP'lerin aktifleşmesine neden olur (7)

MMP'ler yapılarına ve substrat spesifitelerine göre 4 ana gruba ayrılırlar: Birinci grup fibriler kollajeni yıkan üç interstisyel kollajenazdan oluşur: MMP-1, MMP-8 ve MMP-13. İkinci grupta ise bazal membran kollajenlerini, jelatin ve elastini yıkan iki jelatinaz bulunmaktadır: MMP-2 (jelatinaz A) ve MMP-9 (jelatinaz B). Üçüncü grup stromelisin-1, stromelisin-2, stromelisin-3 (MMP-3, MMP-10 ve MMP-11) den oluşur ve bunlar da proteoglikanlar, fibronektin, laminin, jelatin ve tip IV kollajenin globüler kısımlarına spesifiktir. Dördüncü grup dört tane MT-MMP içerir: MT1-MMP ya da MMP-14, MMP-15, MMP-16 ve MMP-17 (7).

MMP'ler, çeşitli malignite dışı hastalıklarda örneğin romatoid artrit ve osteoartritler gibi eklem ve kemik destrüksiyonu ile giden hastalıkların gelişiminde anahtar role sahiptirler. Özellikle MMP-3 romatoid artritli hastaların kanlarında oldukça yüksek düzeylerde saptanmıştır. Osteoartritli hastalarda ise MMP-1 daha yüksek oranda bulunmuştur (28).

MMP-9 osteoklastlarda üretilir ve kemik kollajenlerini degrade etme potansiyeline sahiptir. Bu özelliği ile normal kemik remodelasyonu ve patolojik kemik resorpsiyonunda rol oynar (29). MMP-8'in bronşektazilerde, MMP-2 ve MMP-7'nin ise amfizem patogenezinde rol aldığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (30). Crohn hastalığında inflamatuvar hücreler MMP-9 içerirken, düz kas hücre proliferasyonu ve mukozal degradasyon alanlarında, MMP-3 ekstrasellüler alanda saptanmıştır. Bir başka inflamatuvar barsak hastalığı olan ülseratif kolitte ise, MMP-3 lamina propriada mukozal kayıp alanlarında lokalize olarak bulunmuştur (31). Ayrıca MMP-2'nin hem latent hem de aktif formları, ratlardaki deneysel karaciğer siroz modellerinde artmış olarak saptanmıştır. Ayrıca kronik hepatitlerin tetiklediği hepatik fibroziste de rol oynamaktadırlar (32). Abdominal aort anevrizmasında damar duvarındaki elastin ve diğer matriks proteinlerinin disorganizasyonu ve yıkımından sorumlu olarak MMP-1, MMP-3 ve MMP-9'un latent ve aktif formları saptanmıştır (33).

Prostat, akciğer, meme, kolon, mide, beyin ve hepatosellüler tümörler gibi birçok kanser hücreleri, artmış MMP üretimi yeteneğine sahiptir. Bu tümörlerde MMP düzeyleri, invaziv ve metastatik davranış ile ilişkilidirler. Aynı zamanda MMP, tümör progresyonunun birçok basamağında da rol almaktadırlar (27). MMP-2 ve MMP-9, normalde fibroblastlar, adipositler ve endotel hücrelerinde üretilirler ve özellikle kolorektal karsinomlar, meme kanserleri ve küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında tümör progresyonu ile ilişkili bulunmuşlardır. Yapılan son çalışmalarda tümör yayılımı ile tümördeki MMP-2 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. MMP-9 ve MMP-2'nin doku inhibitörleri ile olan dengesi, servikal kanserlerin agresif davranışında önemli bir faktör olarak bulunmuştur. Bazı çalışmalarda metastatik tümörü bulunan hastaların plazmalarındaki total MMP seviyelerinin ölçülerek hastalık progresyonunun ve tedaviye cevabın değerlendirilebileceği üzerinde durulmaktadır (34).

Çoğu kanserde neoplastik hücrelerden çok, stromal hücreler MMP'nin kaynağıdır. Özellikle MMP-9 ve MMP-13 ün stromal hücreler tarafından salgılandığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bazı olgularda stromal hücrelerdeki bu MMP ekspresyonlarının neoplastik hücrelerden eksprese edilen bazı faktörlerle de stimüle edildiği bilinmektedir (34). MMP ek olarak tümör hücre proliferasyonuna zemin hazırlayan vasküler stroma yapımına da katkıda bulunurlar. Tümör metastazında göç eden endotel hücreleri MMP üretirler ve bunlar da bazal membranların ve ekstrasellüler matriksin yıkımından sorumludurlar (34). Özellikle MMP-2 ve MMP-9 mikrovasküler endotelial hücrelerin ekstrasellüler matrikse invazyonunu

sağlayarak ve vasküler endotelial büyüme faktörünün biyoyararlanımını arttırarak anjiogenezi aktive etmektedirler (35).

V- DOKU METALLOPROTEİNAZ İNHİBİTÖRLERİ (TIMP)

MMP aktiviteleri, TIMP (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 ve TIMP-4) olarak bilinen spesifik inhibitörler ailesiyle kontrol edilir. TIMP molekülleri dokularda değişik hücreler tarafından eksprese edilirler (36). TIMP latent ve aktive MMP ile kompleksler oluşturarak, MMP'in enzimatik aktivitesini inhibe ederler. Böylece ekstrasellüler matriksin degradasyonunu engelleyerek pek çok olayı, örneğin tümör progresyonunu inhibe ederler. Bu inhibitörler MMP aktivitesini iki basamakta kontrol ederler: MMP'lerin aktif domaini ile stabil kompleksler oluşturarak ve daha sonra MMP aktivasyon sürecini kontrol ederek. Dört farklı tip TIMP arasında birinci basamak kontrolde belirgin bir fark izlenmezken, ikinci basamak kontrol daha spesifik olarak regüle edilmektedir (37).

1) TIMP-1

TIMP-1 28,5 kDa'luk bir glikoproteindir (34) ve pro-MMP-9'un C terminaline bağlanarak aktif forma dönüşmesini inhibe ederek etki gösterdiği bulunmuştur (38). Preklinik çalışmalarda in vitro olarak invazyon ve metastazı inhibe ettiği saptanmıştır. İn vivo anjiogenez çalışmalarında tümörün indüklediği anjiogenezi inhibe ettiği ve anjiogenik faktörlere endotel hücrelerinin cevabını engellediği görülmüştür (34).

TIMP-1 akciğerlere hemotojen tümör yayılımını engellemekte (39) ve hayvansal deneylerde subkutanöz tümör gelişimini inhibe etmektedir(40). TIMP-1 ve TIMP-2 mesane karsinomlu hastalarda ilginç olarak hastalarda yüksek invazyon ve metastazlarla ilişkili bulunmuştur (41). Ayrıca prostat karsinomlu hastalarda yüksek kollajenaz seviyeleri ile birlikte serum TIMP-1 seviyeleri yüksek bulunmuş ve bunun metastatik hastalığı göstermede PSA (prostat spesifik antijen) kadar duyarlı olduğu gösterilmiştir (42).

2) TIMP-2

TIMP-2, TIMP-1 ile %40 oranında aynı sekansları içerir, ancak TIMP-2 glikozile değildir. MMP-1, MMP-2, MMP-9'un belirgin olarak inhibe eder. MMP'ler ve TIMP-2 arasındaki dengenin TIMP-2 lehine bozulması ekstrasellüler proteolizin azalması yanı sıra ekstrasellüler matrikse hücre tutunmasını ve matriks komponentleri arasında hücrenin hareket

etmesini de kısıtlar (34). TIMP-2 meme kanseri, mesane kanseri, gastrik kanser ve akciğer skuamöz hücreli karsinomlarında diğer bazı MMPler ile birlikte tümör progresyonu ile ilişkili olarak saptanmıştır (27).

3) *TIMP-3*

TIMP-3 yapısal olarak TIMP-1 ve TIMP-2'ye belirgin olarak benzerlik gösterir (34) ancak TIMP-3'ün hangi yollarla işlev gördüğü veya bağlanma bölgeleri hakkında yeterli bilgi henüz yoktur (38). Ateroskleroz, neoplazi ve inflamatuvar durumlarda ekstrasellüler matrikste buldukları gösterilmiştir (43). Ayrıca yüksek TIMP-3 seviyeleri kartilajda, epitelde, kas hücrelerinde, sitotrofoblastlarda ve ayrıca meme karsinomu gibi bazı tümörlerde stroma içerisinde de saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda TIMP-3 ün seçilmiş hücre serilerinde apoptozu indüklediği ve MMP aktivitesini direkt inhibe ederek tümör hücrelerinin invazyon yeteneğini azalttığı bulunmuştur (38). Ayrıca TIMP-3 endotelial hücre aktivitesini ve anjiogenezi de inhibe ederek tümör büyümesini baskılamaktadır ve bu etkisini normal kapiller morfogenezi inhibe ederek gerçekleştirmektedir (36).

AMAC

Nöroblastomlar, çocukluk çağı ve bebeklik çağında sık görülen solid tümörlerdir. Bu tümörler davranış olarak belirgin biyolojik heterojenite göstermektedir (10). İnvolusyon ya da spontan regresyon, ganglionöroblastom ya da ganglionöromaya matürasyon, ve multimodal terapiye rağmen agresif progresyon bu farklı davranışlardan birkaçıdır (44). Nöroblastomdaki morfolojik bulgularla olası klinik gidiş Shimada sınıflandırması ile belirlenmeye çalışılsa da, bu farklı klinik davranışları açıklayacak farklı parametrelere günümüzde hala ihtiyaç vardır. Son yıllarda biyolojik davranışları iyi tanımlanmış çoğu hastalıkta, prognoz belirleme ve sağ kalım açısından ilerleme kaydedilirken yüksek riskli nöroblastomlu çocuklarda olumsuz prognoz, gelişmiş protokollere rağmen, az oranda iyileştirilebilmiş olup uzun dönem sağkalım hala %40'ların altındadır (6). Bu nedenle nöroblastomların prognozunda etkili olan yeni faktörleri belirlemek ve yeni tedavi modelleri ortaya çıkarmak amacıyla yapılan yeni araştırmalara ihtiyaç vardır.

Son araştırmalarda telomeraz aktivitesinin nöroblastom için de bir prognostik faktör olabileceği, tümör progresyonu ve prognostik faktörlerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (10,45). Telomeraz aktivitesi nöroblastomların büyük kısmında saptanmış, ileri evre ve kötü prognozla ilişkili bulunmuştur (45). Düşük telomeraz aktivitesi ise iyi prognostik faktörler, iyi klinik gidiş ile birlikteliği gösterilmiş olup, evre IV-S gibi spontan regrese olabilen nöroblastomlarda saptanmıştır (46). Ayrıca kemoterapi sonrası nöroblastomlarda telomeraz aktivitesinin ölçümünün kullanışlı bir prognostik gösterge olabileceği bildirilmiştir (16).

Son yıllarda nöroblastomların invazyon ve metastaz yapma yapma özelliğinde rol alan biyolojik faktörlerden, ekstrasellüler matriksi degrade eden proteazlar üzerinde de durulmaktadır. MMP-2 düzeyinin nöroblastomlarda artmış olarak bulunduğu saptanmıştır. Nöroblastomlarda MMP-2 hem stromal hem de neoplastik hücrelerden salgılanmaktadır. MMP-9 ise büyük oranda stromal hücrelerce eksprese edilmektedir (7). MMP-2 ekstrasellüler matriks ve bazal membran yanı sıra büyüme faktörlerini, sitokinleri ve büyüme faktörü bağlayan proteinleri de degrade etmektedirler. Yani bu protein sadece hücre invazyon ve metastazında rol oynamaz, aynı zamanda tümör mikroçevresini de düzenler.

Nöroblastomlarda genellikle TIMP-2'nin prognostik önemi araştırılmış olup, TIMP-3 ile ilgili yeterli çalışma yapılmamıştır. Bu açıdan çalışmamız, TIMP ailesi içerisinde biyolojik önemi daha az bilinen TIMP-3'ün, nöroblastomlardaki biyolojik önemi üzerine yoğunlaşmıştır.

Günümüze kadar yapılan nöroblastomlar ile ilgili pekçok araştırmada MYCN amplifikasyonu ve 1p delesyonu gibi bazı genetik parametreler yanısıra, Shimada sınıflandırması gibi morfolojik bulguların biyolojik önemi net olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmadaki amaç nöroblastomlarda biyolojik önemi kesin olarak bilinmeyen telomeraz, MMP-2 ve TIMP-3 aktivitelerinin bilinen prognostik faktörler ile korelasyonunu değerlendirmek ve prognostik önemini ortaya koymaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (D.E.Ü.T.F.) Patoloji Anabilim Dalı'nda doku bloklarından hazırlanan kesitleri histolojik olarak değerlendirilmiş, primer nöroblastom tanılı 50 olgu dahil edilmiştir. Hastalara ait dosyalardan olguların yaş ve cinsiyetleri yanı sıra; genetik inceleme sonuçları, risk grubu, klinik evresi, metastatik durumu ve prognoza ilişkin bilgi edinilmiştir.

I- Histopatolojik İnceleme ve Shimada Sınıflandırması

Primer tümör dokularından hazırlanan, arşivlenmiş parafin bloklardan elde edilen, 4µm kalınlıkta Hematoksilin & Eosin (H&E) boyalı kesitler, iki patolog (İKÜ ve EÖ) tarafından tekrar gözden geçirilmiş, en az 10 BBA'da tümör dokusunda differansiyasyon ve mitotik karyotik indeks (MKİ) değerlendirilmiştir. Tüm olgularda hasta yaşı ve NMYC amplifikasyon durumu da göz önünde tutularak, Shimada sınıflandırması yapılmıştır.

Tümör hücreleri; nükleer vezikülasyon, nükleol belirginliği, eozinofilik/amfofilik sitoplazmik genişleme gibi differansiyasyon göstergesi olan sitolojik bulgular içermiyorsa andifferansiye olarak kabul edilmiştir. Eğer %5'den daha az tümör hücresi, bu kriterleri gösteriyorsa az differansiye, daha fazla ise olgular tümör differansiye nöroblastom olarak sınıflandırılmıştır.

Tümör hücrelerinde %2 den az mitotik karyotik hücre (MKH) oranı varsa düşük MKİ, %2-4 arası MKH orta MKİ ve %4 den fazla MKH varsa yüksek MKİ olarak olgular değerlendirilmiştir. MKH'ler nöroblastomun hücre yoğunluğuna bağlı olarak, 5000 hücreye 10 veya daha fazla BBA da sayılmıştır. Nekroz, hemoraji, otoliz ve sıkışma artefaktı gösteren alanlar göz ardı edilmiştir.

II-İmmunohistokimyasal yöntem

İmmunohistokimyasal inceleme için H&E boyalı kesitlerden tümörü en iyi örnekleyen parafin bloklar seçilmiştir. Bu bloklardan hazırlanan 4µm kalınlıktaki kesitler, poli-L-lizini lamlara alınarak, oda ısısında en az 24 saat bekletilmiştir. MMP-2, TIMP-3 ve telomerase antikoları, immunohistokimyasal yöntem için kullanılmıştır (Tablo 4). MMP-2 ve TIMP-3 için pozitifliği bilinen plasental dokular, telomerase için ise pozitifliği bilinen kolon karsinomu kontrol olarak kullanılmıştır.

Tablo 4. Çalışmada kullanılan antikörlerin özellikleri

Antijen	Antikor Tipi	Dilüsyon	Üretici Firma
MMP-2 Ab-1	Mouse monoklonal	1/50	Neomarkers, ABD
TIMP-3 Ab-1	Rabbit poliklonal	1/50	Neomarkers, ABD
Telomeraz	Rabbit poliklonal	1/50	Neomarkers, ABD

İmmunhistokimyasal boyama işleminde, kesitler, 30 dakika, 70° C sıcaklıktaki etüvde bekletildikten sonra, ksilolde 20 dakika bekletilerek deparafinize edilmiştir. Daha sonra inen alkol serilerinden (%96, %90, %80, %70) geçirilerek rehidrate edilmiştir. Bu aşamalardan sonra MMP-2 ve TIMP-3 antikörleri için kullanılan kesitler TRİS EDTA (Sigma) tampon solüsyonu içinde mikrodalga fırında 15 dakika, telomeraz antikoru için ise, kesitler 20 dakika kaynatılarak antijenik epitopun açığa çıkması sağlanmıştır. Daha sonra oda ısısında bekletilen kesitler pH 7.2 fosfat tuzu tamponunda (PBS) 5 dakika yıkanmıştır. Bu aşamadan sonra immunboyama otomatik immunhistokimya boyama cihazı (Labvision Autostainer 360) ile tamamlanmıştır. Buradaki yöntem:

- 1- Kesitlerin üzerine % 3'lük hidrojen peroksit damlatılarak endojen peroksidaz aktivitesi bloke edilmiştir.
- 2- Kesitler üzerine MMP-2, TIMP-3 ve telomeraz primer antikörleri damlatılarak, 60 dakika bekletilmiştir.
- 3- Kesitler PBS de 5 dakika yıkanmış ve bağlanmamış antikörler uzaklaştırılmıştır.
- 4- Kesitlere bağlayıcı biotinize sekonder antikor damlatılmış ve 10 dakika beklenmiştir.
- 5- Kesitler 5 dakika PBS'de yıkanmış ve bağlanmış antikörler uzaklaştırılmıştır.
- 6- Streptavidin peroksidaz solüsyonu kesitler üzerine damlatılarak, 5 dakika beklenmiştir.
- 7- Peroksidaz aktivitesini göstermek için, kromojen olarak 3,3'diaminobenzidinetetraklorür (Neomarkers) solüsyonu kesitler üzerine damlatılmış, 20 dakika beklenmiştir.
- 8- Kesitler daha sonra çeşme suyunda yıkanmıştır.
- 9- Tüm kesitlerde zıt boyanma sağlamak için, Mayer'in hematoksilen boyası (Bio-optica) kullanılmıştır.

10- Kesitler çeşme suyunda yıkandıktan sonra,sırasıyla % 70'lik etil alkolden % 96'lık etil alkole kadar çıkan alkol serilerinden, izopropilen-ksilol solüsyonu ve ksilolden geçirilerek şeffaflanması sağlanmıştır.

11- Kesitler üzerine entellan (Merck) damlatılarak, lamelle kapatılmıştır.

III- İmmunhistokimyasal değerlendirme

Tüm olgularda immunhistokimyasal değerlendirme, tümörü temsil eden en az 10 BBA'da, iki patolog (İKÜ ve EÖ) tarafından, olgulara ait klinik ve morfolojik bulgular bilinmeden yapılmıştır.

i. MMP-2 immunboyaması

Kesitlerde hem tümör hücrelerinde, hem de tümör stromasında immunpozitivite değerlendirilmiştir ve sadece tümör stromasında boyanma elde edilmiştir. Buna göre olgular; hiç boyanma olmamışsa ya da < %50 zayıf boyanma varsa 'negatif'; fokal kuvvetli (< %50 kuvvetli boyanma) ya da diffüz zayıf (> %50 zayıf boyanma) boyanma varsa ya da diffüz kuvvetli (> %50 kuvvetli boyanma) boyanma varsa, 'pozitif' olarak değerlendirilmiştir (ref 7a).

ii. TIMP-3 immunboyaması

Kesitlerde hem tümör hücrelerinde, hem de tümör stromasında immunpozitivite değerlendirilmiştir. İmmunpozitif hücrelerin ve stromal pozitivitenin yüzdesi ve hücrelerin boyanma şiddetinin kombine edilmesi ile bir skala oluşturulmuştur (ref:7a). Buna göre olgular; hiç boyanma olmamışsa ya da < %50 zayıf boyanma varsa 'negatif'; fokal kuvvetli (< %50 kuvvetli boyanma) ya da diffüz zayıf (> %50 zayıf boyanma) boyanma varsa ya da diffüz kuvvetli (> %50 kuvvetli boyanma) boyanma varsa, 'pozitif' olarak değerlendirilmiştir.

iii. Telomeraz immunboyaması

Boyanma şiddetleri arasındaki farklılıklar göz önüne alınmadan, pozitif kontrol olarak kullanılan dokudaki boyanmaya benzer nitelikteki tümör hücrelerindeki boyanmalar pozitif olarak kabul edilmiştir. Bu değerlendirme sonrasında olgular sonuçların dağılımı göz önünde tutularak iki grupta sınıflanmıştır: Boyanmanın tüm tümör hücrelerinin %90'ından azında

görülenler (yüksek boyanma indeksi) ve tüm tümör hücrelerinin % 90'ından fazlasında boyanması olanlar (düşük boyanma indeksi).

IV- İstatistiksel Değerlendirme

İki patolog tarafından yapılan immüskorlama ve histolojik inceleme sonuçlarında gözlemciler arası uyum değerlendirilmiş, sonuçlar arasında anlamlı fark bulunmamıştır ('paired samples' t-testi). İmmunboyanma sonuçları ile morfolojik, genetik ve klinik parametreler arasındaki istatistiksel ilişki ki-kare testi ile karşılaştırılmış ve p değeri < 0.05 ise anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

1. Klinik Özellikler

Çalışma kapsamına alınan 50 olgunun tanı anındaki yaşları 40 gün ile 16 yıl arasında değişmekte olup, ortanca değeri 48 aydır. Olguların 21'i (%42'si) kız, 29'u (%58'i) ise erkektir (tablo 5). Olguların tümü TPOG Ulusal Nöroblastom Protokolü'ne alınmış, ancak sadece 29'unun (%58'i) prognostik özellikleri ve izlem sonuçları sağlıklı olarak değerlendirilmiştir. Bu 29 olgunun beşi (%17,2) Evre I, sekizi (%27,5) Evre II, altısı (%20,6) Evre III ve 10'u (%34,7) Evre IV olarak belirlenmiştir. Evre I ve II düşük evre, evre III ve IV ise ileri evre olarak kabul edilmiştir. Olguların 17'sinde (%58,6) metastaz ortaya çıkmıştır. Olguların üçü (%10,3) ölmüştür, beşi (%17,2) hastalıklı olarak yaşamaktadır, 21'i (%72,5) ise sağlıklı olarak yaşamaya devam etmektedir (Tablo 6).

2. Shimada Sınıflandırması

Histolojik olarak değerlendirilen olguların 19'u (%38) andifferansiye, 14'ü (%28) az differansiye ve 17'si (%34) differansiye nöroblastom olarak saptanmıştır. Olguların 23'ü (%46) düşük, 13'ü (%26) orta, 14'ü (%28) yüksek mitotik karyotik indekse sahiptir. Tüm hastalar arasında 25 olgu (%50) 18 aydan küçük, 16 olgu (%32) 18 ay- beş yaş arası ve dokuz olgu (%18) beş yaş üzeri olarak saptanmıştır. Bu bulgulara göre yapılan Shimada klasifikasyonunda 34 olgu (%68) kötü histolojili, 16 olgu (%32) iyi histolojili gruba dahil olmuştur.

3. Genetik Değişiklikler ve Risk Kategorizasyonu

Shimada sınıflandırması yanı sıra, risk grubu belirlerken gerekli parametreler belirlendiğinde, D.E.Ü.T.F Tıbbi Biyoloji ve Genetik Bölümünde değerlendirilen 16 olguda (%32) MYCN amplifikasyonu (>10 kopya) saptanmış (Şekil 4), 34 olguda (%68) ise amplifikasyon bulunamamıştır (Tablo 5). Tüm parametreler değerlendirildikten sonra risk sınıflamasına göre 12 olgu (%41,3) düşük riskli, üç olgu (%10,3) orta riskli ve 14 olgu (%48,4) yüksek riskli grupta yer almıştır. 1p delesyonu dört olguda (%8) teknik nedenlerle değerlendirilememiş, 16 olguda (%32) pozitif olarak saptanmıştır (Şekil 5). 30 olguda (%60) ise 1p delesyonuna rastlanmamıştır (Tablo 5).

Tablo 5. Olguların cinsiyet dağılımı ve genetik durumları (50 olgu üzerinden)

Olgu özellikleri	Olgu sayısı (n)	Yüzdesi (%)
Kız	21	42
Erkek	29	58
MYCN amplifikasyonu		
Var	16	32
Yok	34	68
1p delesyonu		
Var	16	32
Yok	30	60

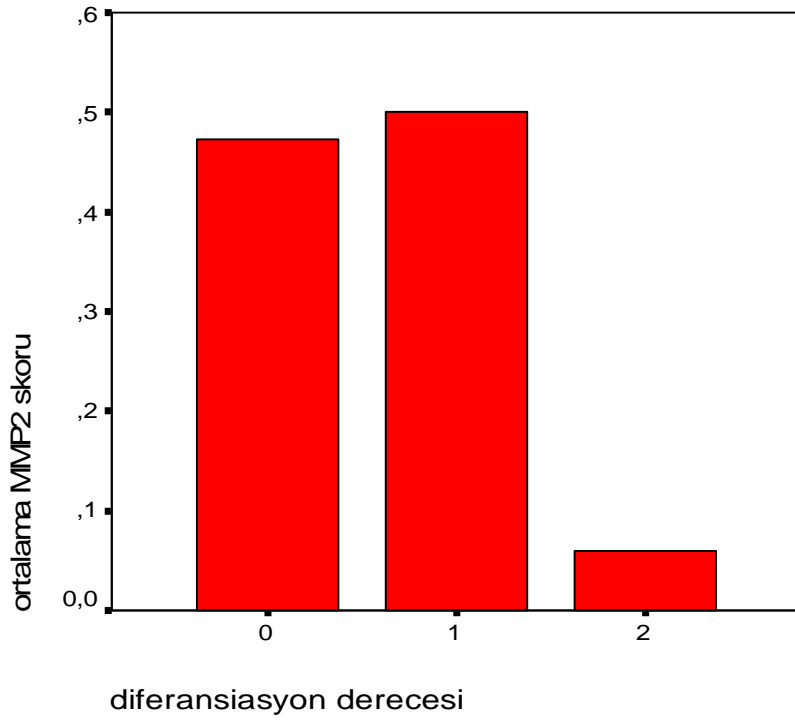
Tablo 6. Olguların evre, metastaz ve son durum dağılımları (29 olgu üzerinden)

Klinik özellikler	Olgu sayısı (n)	Yüzdesi(%)
Evre		
Evre I	5	17,2
Evre II	8	27,5
Evre III	6	20,6
Evre IV	10	34,7
Metastaz		
Var	17	58,6
Yok	12	41,4
Son durum		
Sağlıklı yaşam	21	72,5
Hastalıklı yaşam	5	17,2
Ölüm	3	10,3

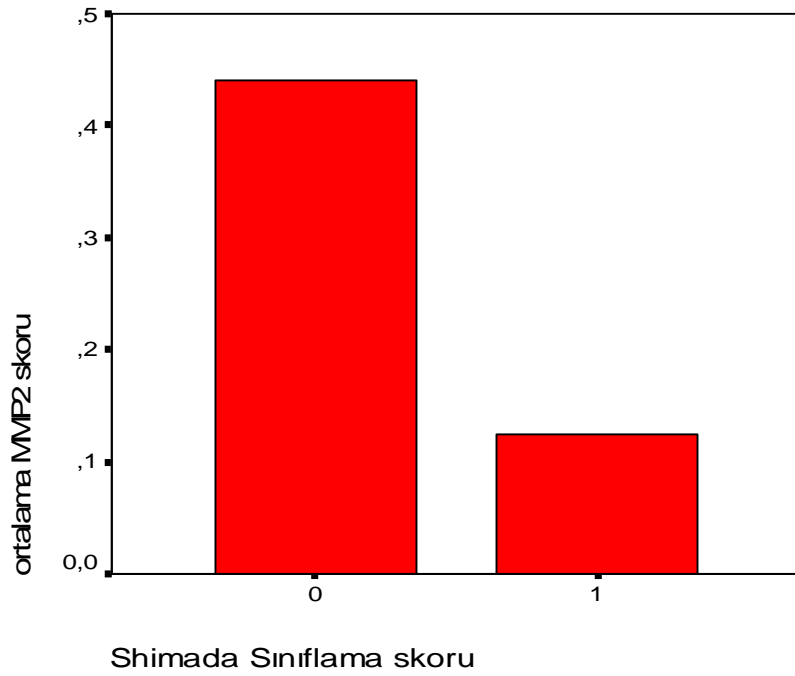
4. İmmunhistokimyasal Analiz (Tablo 7)

i. *MMP-2 immunboyaması:* MMP-2 antikoruna uygulanan olgulardan tamamı değerlendirilme kapsamına alınmış, sadece peritümöral stromal alanda olumlu boyanma elde edilmiştir. Olguların 28'inde (%56) boyanma olmamış, 22'sinde (%44) ise pozitif immüreaktivite gözlenmiştir (Şekil 6).

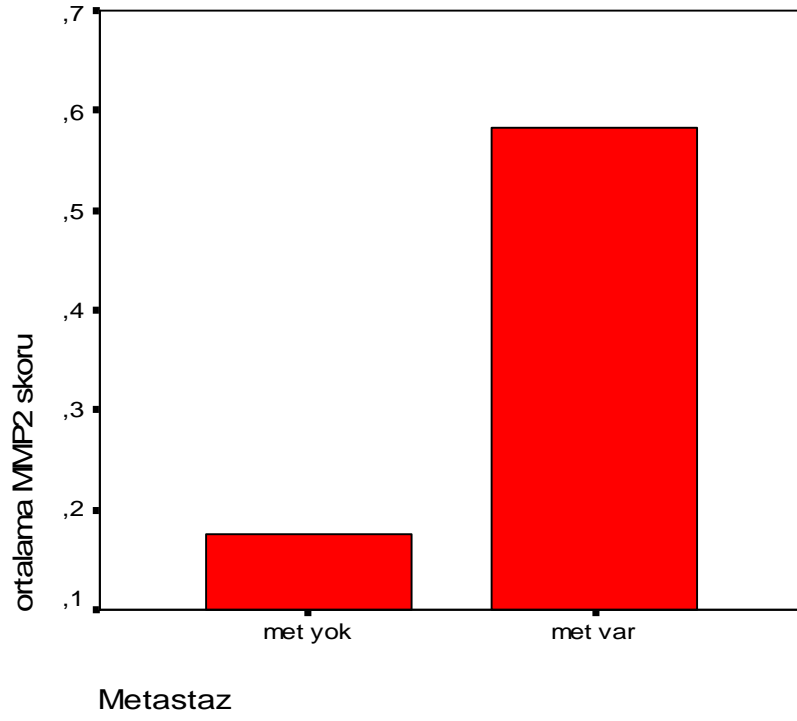
MMP-2 aktivitesi ile differansiyasyon arasında anlamlı ilişki bulunmuştur ($p=0,01$). MMP-2 ile olumlu boyanan 17 olgudan dokuzu (%52,9) andifferansiye iken, sadece biri (%5,8) differansiye nöroblastomdur (Grafik 1). MMP-2 ile Shimada sınıflamasına göre iyi ve kötü histolojik kategoriye ayrılan olgular arasında da anlamlı ilişki bulunmuştur ($p=0,02$). MMP-2 ile olumlu boyanan 17 olgudan 15'i (%88,2) kötü prognostik gruptayken, sadece ikisi (%11,8) iyi prognostik grupta yer almıştır (Grafik 2). MMP-2 aktivitesi ile tümör evresi arasında anlamlı ilişki vardır ($p=0,006$). Değerlendirilen 29 olgudan 10'u (%34,4) MMP-2 antikoruna ile olumlu boyanmıştır. Bu olgulardan dokuzu (%90) ileri evre iken, sadece biri (%10) düşük evre olarak saptanmıştır (Grafik 4). MMP-2 aktivitesi ile metastatik hastalık arasında da anlamlı ilişki bulunmuştur ($p=0,02$). MMP-2 antikoruna ile olumlu boyanan 10 olgudan yedisinde (%70) metastaz izlenirken, üç olguda (%30) metastaz görülmemiştir (Grafik 3). Buna karşın MKİ, yaş, MYCN amplifikasyonu, 1p delesyonu, risk grubu ve sağ kalım ile MMP-2 immunboyaması arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p<0,05$).



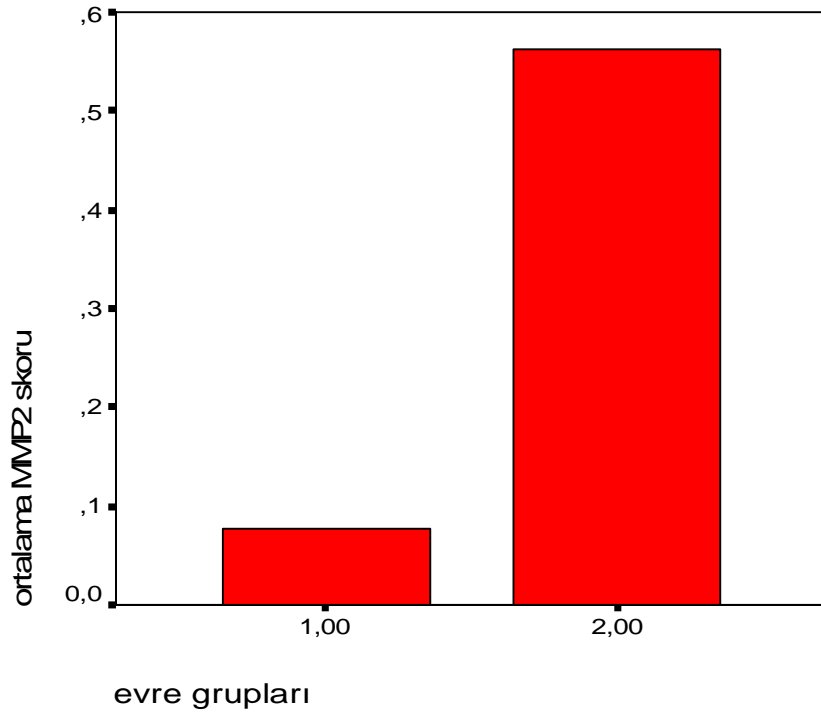
Grafik 1. MMP-2 ekspresyonu ile differansiyasyon arasındaki ilişki



Grafik 2. MMP-2 ekspresyonu ile Shimada sınıflaması arasındaki ilişki



Grafik 3. MMP-2 ekspresyonu ile metastaz arasındaki ilişki

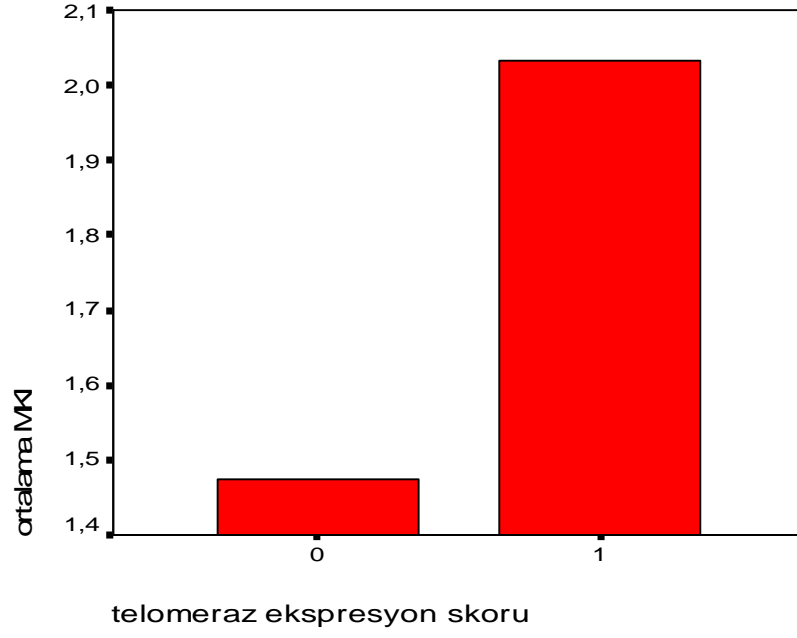


Grafik 4. MMP-2 ekspresyonu ile evre arasındaki ilişki

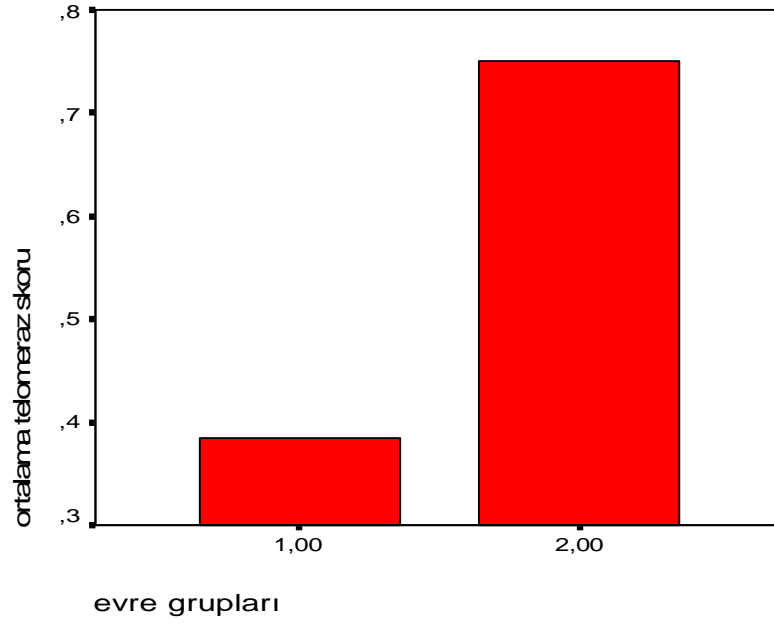
ii. TIMP-3 immunboyaması: TIMP-3 antikoruna uygulanan olgulardan tamamı değerlendirilme kapsamına alınmış, tümör hücrelerinde ve peritümöral stromal alanda olumlu boyanma elde edilmiştir. Olguların sadece dört tanesinde (%8) boyanma olmamış, geri kalan 46 olguda (%92) pozitif immunreaktivite saptanmıştır (Şekil 7). TIMP-3 aktivitesi ile differansiyasyon, MKİ, yaş, Shimada sınıflandırması, MYCN amplifikasyonu, 1p delesyonu, evre, metastaz, risk grubu ve sağ kalım arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p<0,05$).

iii. Telomerez immunboyaması: Telomerez antikoruna uygulanan olgulardan tamamı değerlendirilme kapsamına alınmış, olguların 19'unda (%38), %90'ın altında tümör hücresinde immunreaktivite (düşük telomerez aktivitesi) gözlenmiş, 31 olguda (%62) ise %90'ın üzerinde tümör hücresinde pozitif immunreaktivite (yüksek telomerez aktivitesi) saptanmıştır (Şekil 8).

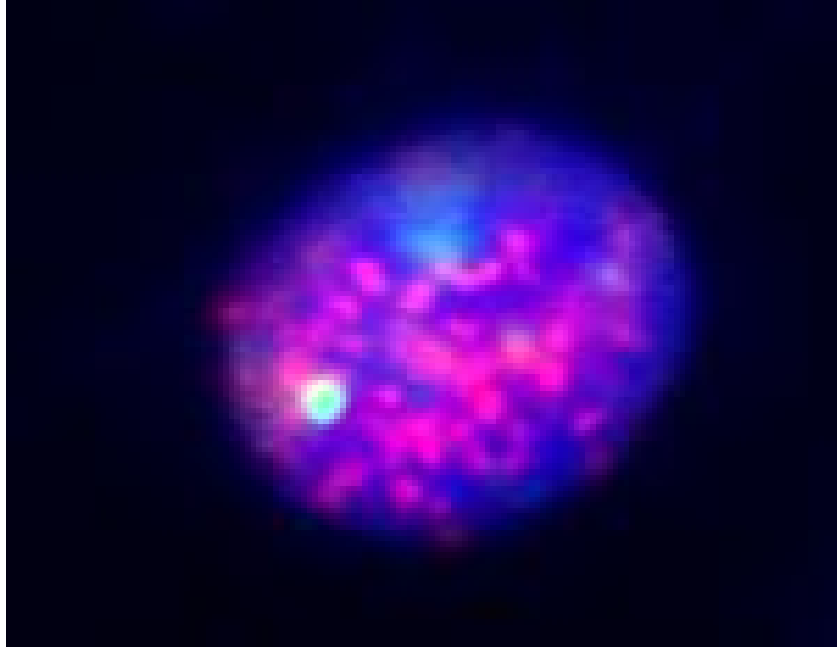
Telomerez aktivitesi ile MKİ arasında anlamlı istatistiksel ilişki bulunmuştur ($p=0,045$). Düşük telomerez indeksi olan 19 olgudan 13'ü (%68,4) düşük, 3'ü (%15,8) orta ve 3'ü (%15,8) yüksek MKİ göstermektedir (Grafik 5). Telomerez ekspresyonu ile hastalık evresi arasında da anlamlı ilişki vardır ($p=0,04$). Yüksek telomerez indeksi gösteren 17 olgunun beşi (%29,5) düşük hastalık evresinde iken, 12'i (%70,5) ise ileri evredir (Grafik 6). Diğer parametreler ile telomerez aktivitesi arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p<0,05$).



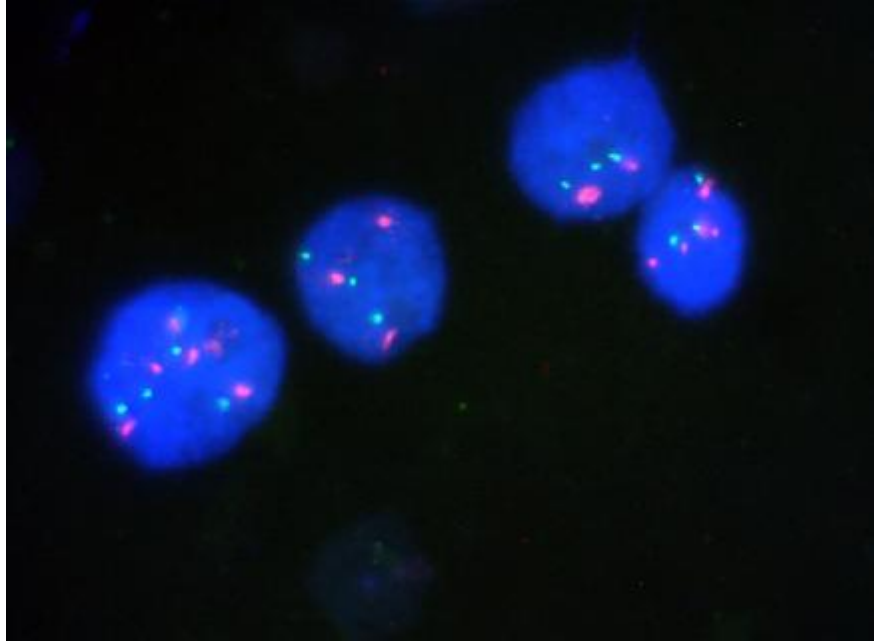
Grafik 5. Telomeraz ekspresyonu ile MKİ arasındaki ilişki



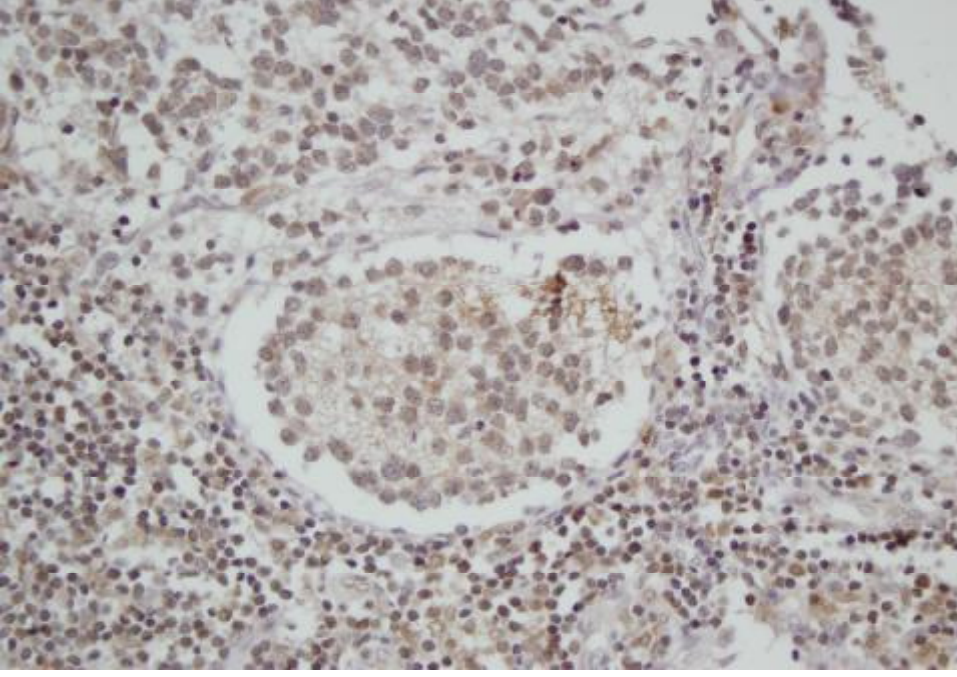
Grafik 6. Telomeraz ekspresyonu ile evre arasındaki ilişki



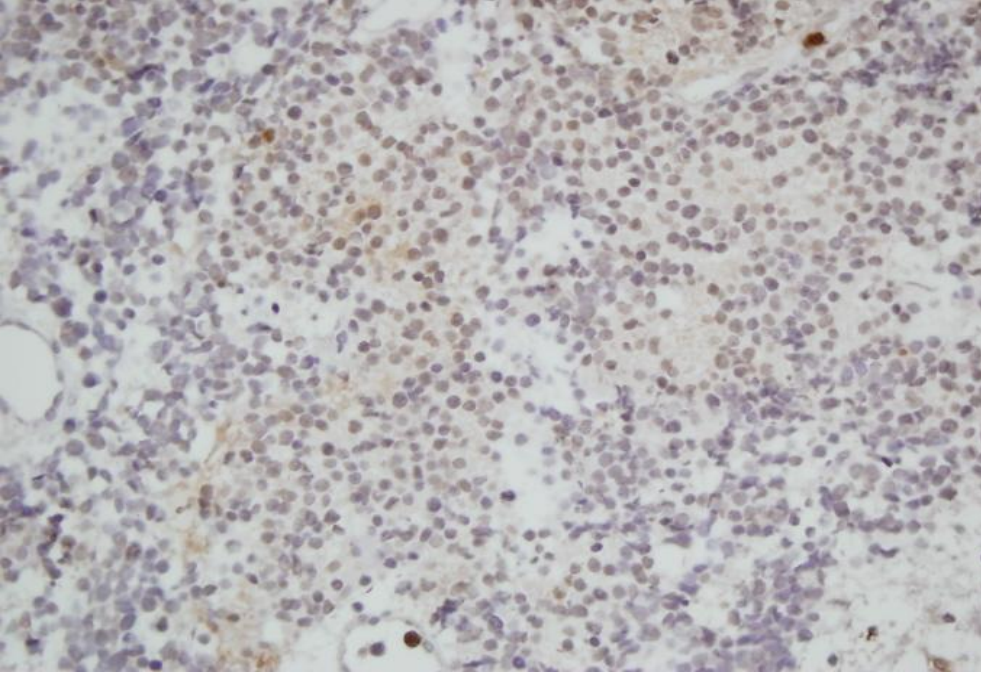
Şekil 4. MYCN amplifikasyonu (yüksek kopya sayısı) olan olguda FISH görüntüsü.
(Yüksek kopya sayısı çok sayıda hücrede kırmızı renkte florasanlar verme ile karakterizedir.)



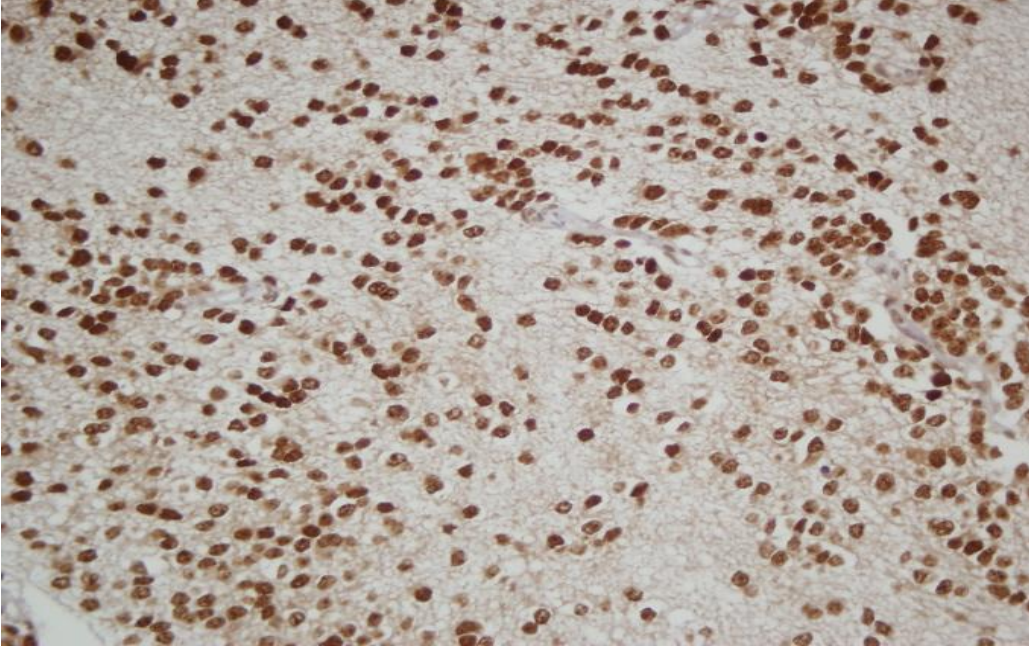
Şekil 5. 1p delesyonu olan olguda FISH görüntüsü. Hücrelerde florasanla işaretli 1. kromozomun p kolunda delesyon izlenmektedir.



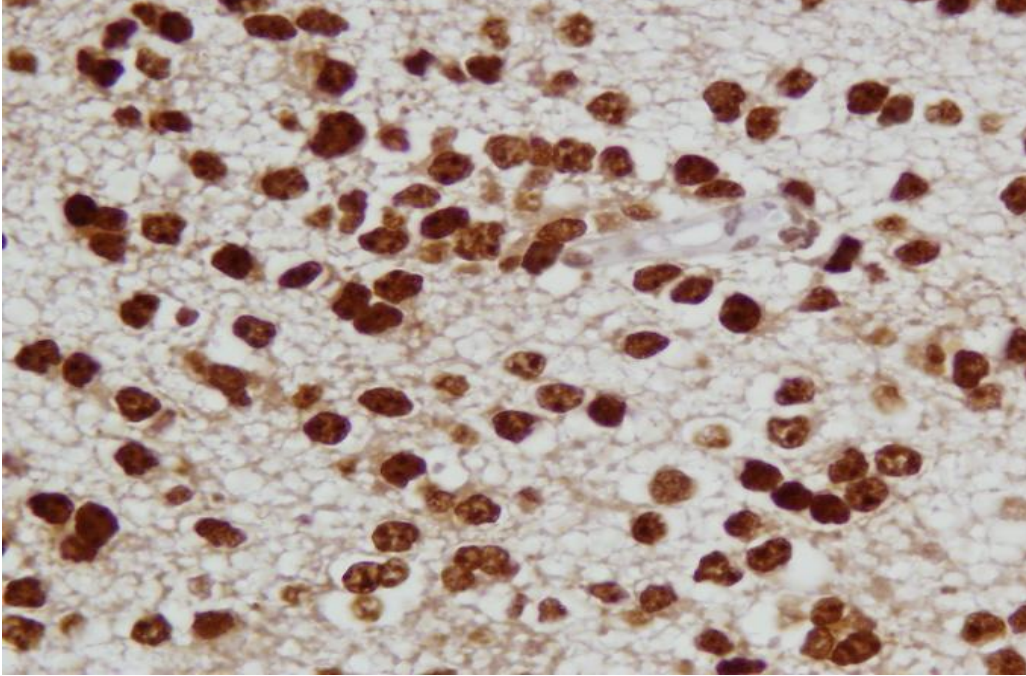
Şekil 6. İmmunohistokimyasal olarak tümör stromasında MMP-2 antikor pozitifliği (x40)



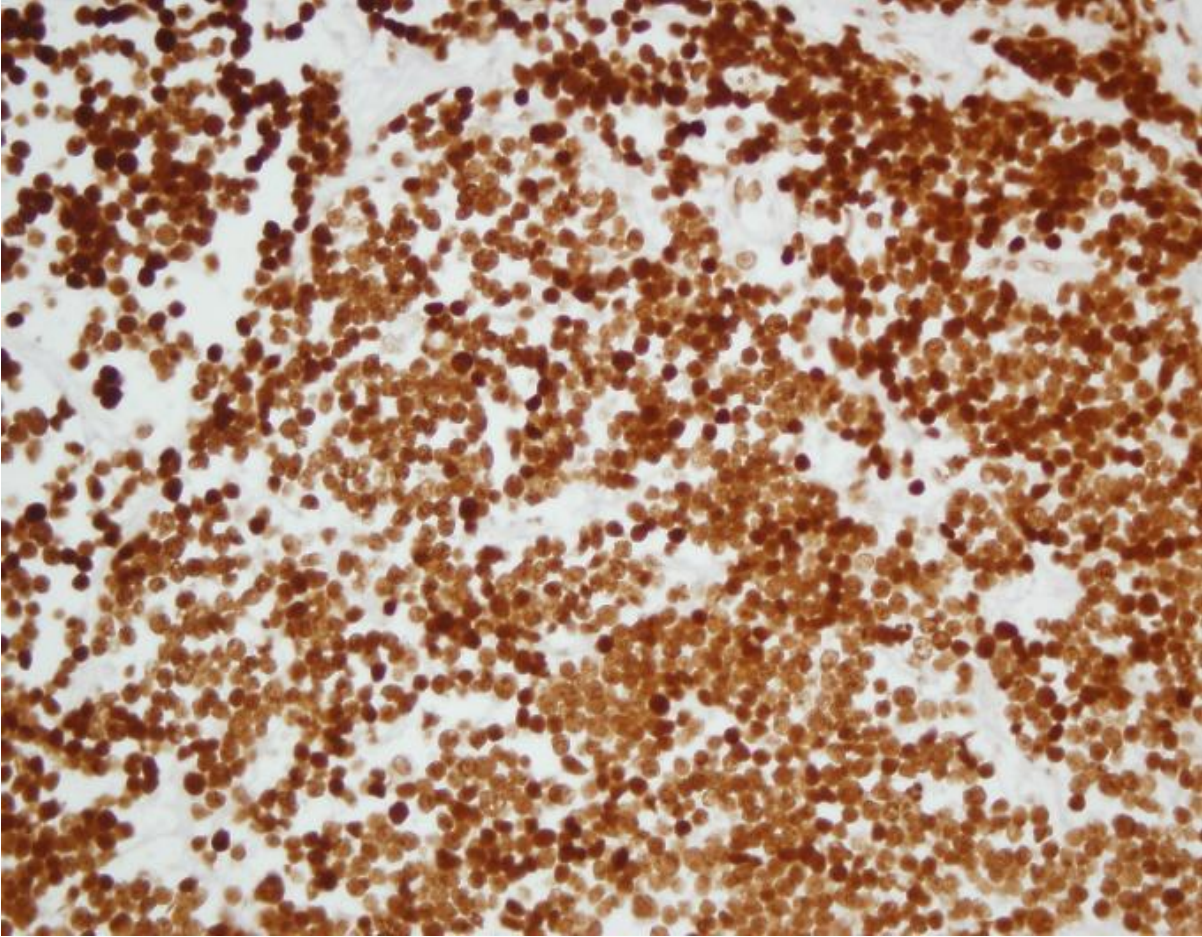
Şekil 7. İmmunohistokimyasal olarak tümör stromasında MMP-2 antikor negatifliği (x40)



Şekil 8. İmmunohistokimyasal olarak tümör hücrelerinde ve stromada TIMP-3 antikor pozitifliği (x40)



Şekil 9. İmmunohistokimyasal olarak tümör hücrelerinde ve stromada TIMP-3 antikor pozitifliği (x100)



Şekil 10. İmmunohistokimyasal olarak tümörde yüksek telomeraz aktivitesi (x40)

Tablo 7. İmmunhistokimyasal boyama sonuçları ile prognostik ve genetik bulguların karşılaştırılması

Parametre (n)	Telomeraz		MMP-2		TIMP-3	
	Yüksek	Düşük	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
Differansiyasyon						
<i>Yok (19)</i>	13	6	9	10	19	0
<i>Az (14)</i>	10	4	7	7	13	1
<i>İyi (17)</i>	8	9	1	16	14	3
MKI						
<i>Düşük (23)</i>	10	13	7	16	21	2
<i>Orta (13)</i>	10	3	5	8	12	1
<i>Yüksek (14)</i>	11	3	5	9	13	1
MYCN Amplifikasyonu						
<i>Var (16)</i>	11	5	8	8	15	1
<i>Yok (34)</i>	20	14	9	25	31	3
1 p delesyonu						
<i>Var (16)</i>	11	5	7	9	15	1
<i>Yok (30)</i>	17	13	9	21	28	2
Shimada Sınıflaması						
<i>İyi prognoz (16)</i>	7	9	2	14	14	2
<i>Kötü prognoz(34)</i>	24	10	15	19	32	2
Metastaz						
<i>Var (12)</i>	8	4	7	5	11	1
<i>Yok (17)</i>	9	8	3	14	16	1
Evre						
<i>Düşük (13)</i>	5	8	1	12	12	1
<i>İleri (16)</i>	12	4	9	7	15	1
Son Durum						
<i>Ölüm (3)</i>	2	1	1	2	3	0
<i>Hastalıklı Sağ (5)</i>	2	3	0	5	4	1
<i>Hastaliksız Sağ (21)</i>	13	8	9	12	20	1

Not: İstatistiksel olarak anlamlı bulgular çerçeve içine alınmıştır.

TARTIŞMA

Nöroblastom, klinik olarak belirgin biyolojik heterojenite gösteren bir tümördür. Bazı yaygın, ileri evre tümörler (evre IVS) regrese olurken, bazı erken evre tümörler kötü prognoz gösterebilmektedir (10). Lokalize hastalıklı (evre I-III) olgularda, adjuvan kemoterapi sonrası cerrahi rezeksiyon yapıldığında, 10 yıllık yaşam oranı %80'i bulurken, metastatik hastalığı bulunan (evre IV) hastalarda, agresif kemoterapiye rağmen 10 yıllık yaşam oranı %20'yi geçmemektedir. Histolojik bulgular ve biyokimyasal sonuçlar, bu farklı biyolojik davranışları tek başına açıklayamamakta, moleküler belirleyiciler ile bu kötü prognozun nedeni ortaya konmaya çalışılmaktadır (18). Olgularda olası klinik gidiş, Shimada sınıflandırması ile belirlenmeye çalışılsa da, bu farklı klinik davranışları açıklayacak farklı parametrelere günümüzde hala ihtiyaç vardır.

Nöroblastomların klinik davranışı, hastalığın evresi kadar tümör hücrelerinin karakteristik özelliklerine de dayanmaktadır. Bu denli değişken klinik davranışların nedenini anlayabilmek için nöroblastomlara ait genetik değişiklikleri araştırma yönüne gidilmiştir. Nöroblastomda en sık görülen genetik anormallik MYCN amplifikasyonu ve kromozom 1'in kısa kolunun delesyonudur (10). MYCN amplifikasyonu kötü prognozla ilişkisi belirlenmiş olsa da, MYCN amplifikasyonu göstermeyen nöroblastomlar da her zaman iyi prognoz göstermemektedirler (47). Bu gen değişimleri dışında anöploidi, özellikle hiperdiploidi, bebeklik çağında ortaya çıkan nöroblastomlarda iyi prognostik özellik ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca Trk-A, NGF (sinir büyüme faktörü) reseptör ve Ha-ras p21 de, nöroblastom hastalarında iyi prognozla ilişkili olarak saptanan genetik değişikliklerdir (10). Ancak tüm bu genetik bulgular nöroblastomların farklı klinik davranışlarını net olarak açıklamamış, araştırmacıları başka parametreleri araştırmaya yönlendirmiştir.

Bu çalışmada, nöroblastomların farklı biyolojik davranışlarını açıklamaya yönelik ortaya çıkan ihtiyaçtan dolayı telomeraz aktivitesi ile MMP ve TIMP proteinlerinin biyolojik önemi araştırılmıştır. Telomeraz aktivitesi MKİ ve tümör evresi ile ilişkili bulunurken, MMP-2 ekspresyon artışı tümörün differansiyasyonu, Shimada sınıflaması, tümör evresi ve metastatik hastalık ile ilişkili saptanmıştır. Buna karşın TIMP-3 ile nöroblastomlarda bilinen hiçbir prognostik faktör ile ilişki saptanmamıştır.

I- Telomeraz Aktivitesi ve Nöroblastom

Telomeraz kromozomal telomerlerin korunması için gereklidir ve somatik hücrelerin büyük kısmında eksprese edilmezken, çoğu tümörde 'reaktive' olmuş gibi görünmektedir (46). Telomeraz aktivitesi birçok malignitede saptanmış durumdadır ve son yayınlar enzim aktivitesinin bulunuşunun ya da yokluğunun tümörün varlığını ya da prognozunu saptamada kullanışlı bir metod olabileceği üzerinde durmaktadır (16). Telomeraz aktivitesinin diğer birçok malign tümörde olduğu gibi nöroblastom için de bir prognostik faktör olabileceği, tümör aktivitesi, klinik gidiş ve diğer prognostik faktörlerle ilişkisi bulunabileceği düşünülmektedir (10,45).

Hiyama ve ark. (18) nöroblastomun tümorogenezinde iki farklı yolağın bulunduğunu saptamışlardır. Bunlardan biri embriyonik gelişim esnasında telomeraz aktivitesinin baskılanmasında sorun olması, diğeri de erişkin kanserlerindeki benzer şekilde telomerazın genetik alterasyonlarla tekrar aktive olmasıdır. Nöroblastomlarda iyi ve kötü klinik davranışın bu iki değişik yoldan kaynaklandığı düşünülmektedir (45,48). Düşük telomeraz aktivasyonu gösteren nöroblastomlar daha çok birinci gruba girmekte, yüksek telomeraz aktivitesi gösterenler ise, daha çok ikinci grupta yer almaktadır (18). Yüksek telomeraz aktivitesi gösteren tümörlerde, telomer uzunlukları değişik boydaki kromozom bölgelerinde sabit uzunlukta iken, telomeraz aktivitesi düşük olan ya da saptanamayan tümörlerde bu durum gözlenmemiş ve telomer uzunlukları normal dokular ile aynı ya da daha kısa olarak saptanmıştır. Böylece yüksek telomeraz aktivitesine sahip tümörlerin, hücre çoğalması ile ilgili çok sayıda genetik değişiklikler göstermesi sonucu, ölümsüzlük kazandığı yönünde düşünceler ortaya çıkmıştır (10).

Nöroblastomlarda telomeraz aktivitesi üzerine yapılan son çalışmalarda, düşük ya da saptanamayan telomeraz aktivitesinin sıklıkla, kötü prognostik faktörü bulunmayan küçük yaştaki hastalarda, yüksek aktivitenin ise kötü prognostik faktörleri bulunan yaş daha büyük çocuklarda olduğu öne sürülmektedir (16). Nöroblastomlarda telomer uzunluğunun analizi ve telomeraz aktivitesinin semikantitatif analizinde, hem agresif hem de regresif tümörlerde telomerlerin kısa olduğu, regresif tümörlerde telomeraz aktivitesinin oldukça düşük olduğu ya da saptanamadığı bulunmuştur. Buna göre telomeraz aktivitesinin nöroblastomların klinik davranışı belirlemede kullanışlı bir yöntem olabileceği düşünülmüştür (10).

Hiyama ve ark. (10) 79 hastalık bir seride, TRAP (Telomerik tekrarlarının amplifikasyonu protokolü) yöntemi ile nöroblastomların %94'ünde telomeraz aktivitesi

saptamışlardır. Bunlardan yaklaşık %20'sinde aktivite yüksek düzeyde olup, bu olgularda aynı zamanda MYCN amplifikasyonu, yüksek evre kötü prognostik faktörler de bulunmuştur. Düşük ya da negatif telomeraz aktivitesi gösteren olguların hiçbirinde MYCN amplifikasyonu belirlenmemiştir. Aynı araştırmacıların yer aldığı başka bir çalışmada (49), yüksek telomeraz aktivitesi kötü prognozla belirgin olarak korele bulunmuştur. MYCN amplifikasyonu gösteren tümörlerin tümünde yüksek telomeraz aktivitesi kötü prognoz görülür iken, MYCN amplifikasyonu göstermeyen, ancak yüksek telomeraz aktivitesi bulunan olgular da kötü prognoz göstermiştir. Bu da yüksek telomeraz aktivitesinin, MYCN amplifikasyonundan bağımsız olarak kötü prognozu öngören bir faktör olabileceğini düşündürmüştür (49).

Literatürde nöroblastomlar ile ilgili, TRAP yöntemi ile ortaya konan farklı sonuçlar bulunmaktadır. Örneğin Poremba ve ark. (18), 67 nöroblastom ve iki ganglionörom olgusundan oluşan bir seride TRAP yöntemi ile telomeraz aktivitesini araştırmış, 69 olgudan sadece 14'ünde (%20) pozitiflik saptamışlardır. Bu pozitifliklerden üçü (%21,4) evre IV-S, sekizi (%57,1) evre IV, biri (%7,1) evre III, biri (%7,1) evre II, ve biri (%7,1) evre I tümörlerde bulunmuştur. Bu çalışmada ortaya çıkan farklı sonuç, yöntemsel farklılıklardan ortaya çıkmış olabilir. Yazarlar yanlış negatif sonuçlara neden olabilecek ortamdaki polimeraz inhibitörlerini modifiye TRAP yöntemi ile engelleyerek hatalı sonuçları önlediklerini düşünmektedirler (18). Bu çalışmada yazarlar, ayrıca telomeraz aktivitesini, klinik evre gibi bağımsız bir prognostik faktör olarak saptamışlardır ve MYCN durumu bağımsız prognostik faktör olarak belirlenmemiştir. Ayrıca ileri evre hastalarda telomeraz aktivitesinin prognostik öneminin, klinik davranışın önemli bir göstergesi olarak kabul edilen MYCN kopya sayısı kadar anlamlı olduğu düşünülmüştür. Bu bulgular telomeraz aktivitesinin nöroblastomda güvenilir bir prognostik araç olabileceğini göstermektedir.

Aynı araştırmacıların yaptığı başka bir çalışmada (50), telomeraz aktivitesi ile klinik davranış arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Bundan dolayı tüm nöroblastom olgularında tanı sırasında diğer klinik incelemelere telomeraz aktivitesi analizinin de eklenmesi önerilmektedir. Yüksek telomeraz aktivitesinin hastalığın ilerleyişine ve kötü prognoza yakınlığı göstermesinden dolayı, bu aktivitenin saptanması MYCN durumunu, kromozom 1 p alterasyonlarını, DNA içeriğini ya da değişik nörotropin reseptör ekspresyonlarını belirlemek ile aynı öneme sahiptir (50).

Bizim çalışmamızda 50 olgunun tamamında telomeraz aktivitesi saptanmıştır. Bu olgulardan yaklaşık beşte üçü yüksek telomeraz aktivitesi, kalan olgular düşük telomeraz

aktivitesi göstermektedir. Yüksek telomeraz immureaktivitesi gösteren olguların %70'i ileri evredir. İstatistiksel analiz sonucunda telomeraz ekspresyonu ile evre arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Sonuç olarak çalışmamızda, literatürdeki diğer çalışmalara benzer şekilde, ileri evre nöroblastomlarda telomeraz aktivitesinin anlamlı olarak arttığını düşünmekteyiz.

Benzer bir çalışmada, Streutker ve ark. (16) yüksek telomeraz aktivitesi ile hastanın bir yaşından büyük oluşu, MYCN amplifikasyonu, 1p delesyonları, düşük Trk-A ekspresyonu, yüksek evre ve kötü klinik davranış ve ölüm arasında anlamlı ilişki göstermişlerdir. DNA ploidi ile telomeraz aktivitesi arasında ilişki saptanmamıştır. Ayrıca daha önce yapılan çalışmalarda, telomeraz negatif tümörlerin hiçbirinde MYCN amplifikasyonu saptanmazken, bu çalışmada telomeraz negatif iki olguda MYCN amplifikasyonu saptanmıştır. Shimada sınıflaması ile telomeraz aktivitesi arasında da ilişki bulunmamıştır. Bu çalışmada ayrıca telomeraz aktivitesindeki kemoterapi öncesi ve sonrası değişiklikler araştırılmıştır. Buna göre tedavi öncesi ve sonrası telomeraz aktivitesi düşük ya da yok ise, klinik gidiş mükemmeldir. Eğer bu hastalarda tedavi öncesi var olan enzim aktivitesi tedavi sonrası yok olmuş ise, prognoz daha da iyi olarak saptanmıştır (16).

Telomeraz aktivitesi, MYCN amplifikasyonu göstermeyen "iyi histolojili" gruba dahil hastalarda da, iyi ve kötü klinik davranışı saptamaya katkıda bulunmaktadır (50). Bir çalışmada rezeksiyon öncesi sitotoksik tedavi almayan 86 nöroblastom olgusunda MYCN kopyası ≤ 3 olanlarda, genel sağkalım oranı yaklaşık %87, hastalısız sağkalım oranı yaklaşık %80 olarak bulunmuştur. Bu olgulardan telomeraz aktivitesi gösteren olgularda genel sağkalım oranı yaklaşık %40'a, hastalısız sağkalım oranı yaklaşık %31'e düşmüştür (50).

Nöroblastomlarda telomeraz aktivitesi ile trk-A, Ha-ras p21 ekspresyonu arasındaki ilişkiye bakıldığında, düşük ya da saptanamayan telomeraz aktivitesine sahip tümörlerin çoğunun yüksek trk-A ve Ha-ras p21 ekspresyonuna sahip olduğu görülmüştür (10). Trk-A, nöroblastların differansiyasyonunu ya da programlı hücre ölümünü düzenleyen NGF'nin salımını kontrol eder. Ha-ras p21 de NGF sinyal transdüksiyonu ve hücre sel yanıtta rol alan proteinlerden biridir. Düşük ya da saptanamayan telomeraz aktivitesi içeren nöroblastomlarda, telomeraz aktivitesinin baskılanması ile eşzamanlı olarak, regresyon ya da maturasyona öncülük eden nörotrofik faktörlere cevap potansiyeli kazanılmaktadır (10).

Anöploidi, özellikle hiperdiploidinin nöroblastomlarda iyi prognozla ilişkili olarak bildirilmektedir (51). Hiyama ve ark. (10) infant döneminde ortaya çıkan olgular arasında anöploid olanların büyük kısmının düşük telomeraz aktivitesi gösterdiğini saptamış, bunu da

anöploidi ile nöroblast büyümesi arasındaki ilişkiye bağlamışlardır. Ancak daha geç yaşlarda görülen bazı anöploidi gösteren nöroblastomlarda da, yüksek telomeraz aktivitesi ve genetik alterasyonlar saptanmıştır. Düşük telomeraz aktivitesi gösteren tümörlerin yaklaşık yarısında, telomeraz aktivitesi saptanmayan az sayıda regrese tümörde ve ganglionöromların tümünde diploidi bulunmuştur (10). Sonuçta anöploidinin kesin bir prognoz belirleyici olmadığı düşünülmektedir.

Telomeraz aktivitesinin önemli bir prognostik faktör olarak kullanılabilirliğini sorgulayan bir başka yaklaşım da, bu parametrenin klinik veya biyolojik olarak “iyi prognozlu” gruba dahil edilen hastalardaki iyi veya kötü davranışı ayırt edip edemeyeceğidir. Yapılan çalışmada (52) bir yaş altı 63 hastada genel sağ kalım yaklaşık %90, hastaliksız sağ kalım yaklaşık %80 olarak saptanmıştır. Ancak telomeraz aktivitesi pozitif olarak saptanan bu hastaların %16’sında genel sağkalım yaklaşık %50’ye, hastaliksız sağkalım ise yaklaşık %30’a düşmüştür. Telomeraz aktivitesi gösteren olgular arasından iyi prognoz gösterenler ise, minimal aktivite gösteren konjenital olgulardır. Bu olgularda görülen telomeraz aktivitesi, nöroblastların fetal düzeyde telomeraz aktivitesini devam ettirmesi ile açıklanabilir (52). Ayrıca Evre IV-S nöroblastomların çoğunda telomeraz aktivitesi telomer uzunluğunu devam ettirmek için yetersizdir ve nöroblastlar telomerazın tamamen baskılanmasıyla çoğalmayı durdururlar (45).

Bizim çalışmamızda yüksek telomeraz aktivitesi gösteren olguların yaklaşık üçte birinde MYCN amplifikasyonu saptanmış ancak iki parametre arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır. Ayrıca çalışmamızda 1p delesyonu saptanan olguların yaklaşık %60’ında yüksek telomeraz aktivitesi saptanmıştır ve bunların da yaklaşık %40’ında 1p delesyonu bulunmuştur. Bununla beraber 1p delesyonu ile yüksek telomeraz aktivitesi arasında da istatistiksel anlamlı ilişki görülmemektedir. Bu sonuçlar bize yüksek telomeraz aktivitesinin MYCN amplifikasyonu ve 1p delesyonu ile korole olmayan bir parametre olduğunu, farklı genetik mekanizmaların rol oynadığını ortaya koymaktadır.

Nöroblastomlarda telomeraz aktivitesi ve Shimada sınıflaması arasındaki ilişkiye bakıldığında, çalışmamızda yüksek telomeraz aktivitesi gösteren olgulardan çoğunun (yaklaşık dörtte üçü) kötü histolojili gruba dahil olduğu dikkat çekicidir. Ancak bu bulgumuz istatistiksel olarak anlamlı değildir. Öyleyse kötü histolojili grubu belirlemede kullanılan parametreleri ayrı ayrı değerlendirmekte fayda vardır.

Nöroblastomlarda dissemine hastalıkta telomeraz aktivitesinin yüksek bulunması kötü prognozla belirgin olarak ilişkilidir ve sağkalım oranlarını %20'in altına çekmektedir. Telomeraz aktivitesi bulunmayan yüksek evreli tümörlerde ise aynı evreli tümörlere göre sağkalım oranları belirgin olarak artmaktadır (18). Alman Pediatrik Onkoloji ve Hemotoloji Grubu'nun nöroblastom çalışmasında, 5 yıllık sağkalım oranı %21-25 olarak belirlenmiştir (18). Poremba ve ark. (18) çalışmalarında telomeraz aktivitesi olmayan evre IV nöroblastomların sağkalım oranlarını incelemiş ve 5 yıllık hastaliksız sağkalım oranı yaklaşık %50 iken tüm evreler birleştirildiğinde bu oran %80 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda telomeraz aktivitesi gösteren olgulardan azında kötü prognoz görülmüştür ve çoğu hasta hastaliksız olarak yaşamına devam etmektedir. Bu nedenle çalışmamızda yüksek telomeraz aktivitesi ölüm ve nüks oranları ile korele bulunmamıştır. Ayrıca çalışmamızda nöroblastomlarda Shimada sınıflamasının prognostik olarak daha belirleyici olduğu göze çapmaktadır. Bununla beraber MYCN amplifikasyonu ölen hastaların çoğunda saptanmış olup, bu genetik değişikliğin kötü prognostik faktör olduğu konusundaki genel kanı desteklenmektedir.

II- Nöroblastomlarda MMP ve TIMP Aktiviteleri

Malign hücrelerin karakteristik özelliği çevre dokulara invaze olma ve uzak organlarda metastatik tümörler oluşturma yeteneğidir. Kanserin yaşamı tehdit eden esas özelliği, metastaz ve invazyon özellikleridir. Bundan dolayı kanser araştırmaları tümör hücreleri kadar, tümör progresyonunda başrolü oynayan bu özellikleri ve tümör stroma etkileşimlerine odaklanmaktadır. Malign transformasyondan sonra tümör hücreleri, çevre stromada MMP ve ürokinaz plazminojen aktivatörleri gibi çeşitli büyüme faktörlerinin ve proteolitik enzimlerin üretimini başlatmaktadır. Büyüme faktörleri ve proteolitik enzimler, tümör gelişimi için gerekli matriks yıkımı ve anjiogenezi indüklemektedirler (53).

Son çalışmalarda birçok kanser hücresinin MMP üretme yeteneğine sahip olduğu ve bunların aktivitelerinin de tümör hücrelerinin yayılımı ile anlamlı ilişki gösterdiği saptanmıştır (27). Bazı kolon ve meme kanserlerinde MMP üretiminde stromal hücrelerin oldukça etkin olduğu gösterilmiştir (54,55). Buna karşın TIMP, çoğunlukla tümör hücreleri ve stromal hücreler tarafından üretilen inhibitör proteinlerdir ve hem aktive, hem de latent MMP ile kompleks oluşturma yeteneğine sahiptirler. Bunlar MMP'nin enzimatik aktivitesini inhibe ederek ekstrasellüler matriksin degradasyonunu önleyen ve tümör progresyonunu engelleyen

proteinlerdir (37). Tümör progresyonu esnasında dokularda MMP ve TIMP'in gen ekspresyonlarında değişiklikler olmaktadır. Genellikle bu değişiklikler MMP üretiminde artma ve TIMP üretiminde azalma ile sonuçlanmakta ve stromanın proteolize uğraması, MMP ve TIMP arasındaki denge ile ilişkilidir (56).

MMP'nin ekstrasellüler matriksin yıkımı yanı sıra, tümör anjiogenezinde de rol oynayarak tümör invazyonuna zemin hazırladığı bilinmektedir. Bu etkisini, yeni damar oluşumu için ekstrasellüler matriksi yıkarak, endotelial hücre bağlantılarını düzenleyerek ve ekstrasellüler matrikte depolanan anjiogenik sitokinlerin salınımını sağlayarak göstermektedir (57). TIMP, özellikle de TIMP -3 endotelial hücre aktivitesini ve anjiogenezini de inhibe ederek tümör büyümesini baskılamaktadır ve bu etkisini normal kapiller morfogenezini inhibe ederek gerçekleştirmektedir (36).

Nöroblastomlarda tümöre bağlı ölümlerin çoğu, metastazlara bağlı olarak görülmektedir (27). Bundan dolayı diğer birçok malign tümörün olduğu gibi, nöroblastomun invazyon ve metastazında da etkin rol oynadığı düşünülen MMP ve TIMP, son yıllarda araştırmacıların ilgi odağı haline gelmiştir. Ancak bu konuda daha aydınlığa kavuşmamış pek çok nokta bulunmaktadır. Nöroblastomlarda en çok MMP-2, MMP-9 ve TIMP-2 proteinleri üzerine çalışmalar yapılmıştır. Ara ve ark. (27) MMP-2, MMP-9 ve bunların spesifik inhibitörü TIMP-2'nin immunhistokimyasal ekspresyonlarının, metastaz riski yüksek nöroblastom hastalarını belirlemede değerli birer kriter olup olamayacağını araştırmışlardır. Bu çalışmada tümör hücrelerinde ve çevre stromal dokuda bu proteinlerin varlığı, immunohistokimyasal yöntem ile değerlendirilmiştir. Buna göre MMP-2 antikoru ile tümör hücrelerinde immunreaktivite gözlenmez iken, %80 olguda stromal boyanma izlenmiştir. MMP-9 ise %71 olguda pozitif olarak saptanmıştır. TIMP-2 çoğunlukla neoplastik hücrelerin sitoplazmasında, stromal dokuda ve endotel hücrelerinde olmak üzere %58 oranında pozitif bulunmuştur.

MMP ve TIMP'in immunohistokimyasal yöntemle belirlenen varlıkları bu proteinlerin nerede sentez edildiklerini göstermemektedir. Stromal boyanma sadece ekstrasellüler matrikste yer aldıklarını göstermektedir. Ancak bu proteinlerin hangi hücreler tarafından sentezlendiğini kesin olarak söylemek mümkün değildir (27). Kolorektal karsinom, meme karsinomu ve bazı deri kanserlerinde yapılan çalışmalarda MMP-2, MMP-9 ve TIMP-2'nin lokalizasyonları açısından, immunohistokimyasal ve in situ hibridizasyon yöntemleri kullanımı sonrası elde edilen sonuçlar arasında farklılıklar bulunmuştur (54,55,58,59). Bu proteinlerin nereden eksprese edildikleri konusunda belirsizliklerin nedeni bilinmemektedir ve

kullanılan antikörlara ya da farklı epitoplara bağlı olabileceği düşünölmektedir. Ayrıca MMP ve TIMP-2 ekspresyonlarının değerlendirildiği bir hücre költürü çalışmasında, nöroblastom ve fibrosarkom hücre dizilerinde yüksek MMP-2 ekspresyonu görölmüştür (60). Nöroblastom ya da herhangi bir tümörde MMP ve TIMP-2'nin farklı alanlarda ekspresyonu, tümör stroma arasındaki karmaşık etkileşimin sonucu olabilir (27). Bizim çalışmamızda da MMP-2 antikoru ile yapılan immunohistokimyasal boyamada tümör hücrelerinde immunreaktivite izlenmemiş, sadece peritümöral stromal boyanma görölmüştür. MMP-2, olguların %44'ünde pozitif olarak saptanmıştır. TIMP-3 ise %92 oranda, tümör hücrelerinde ve peritümöral stromada pozitif bulunmuştur.

Ara ve ark.'nın (27) nöroblastomlu hastalarda immunhistokimyasal yöntemle MMP-2, MMP-9 ve TIMP-2 ekspresyonlarını araştırdıkları çalışmada, nöroblastomlarda önemli bir prognostik faktör olan hasta yaşları ile ekspresyon paternleri arasında bir ilişki saptanmamıştır. Evre III ve IV hastalarda MMP-2 ekspresyonu artmış olarak bulunmuştur. Klinik olarak kötü gidişat gösteren olgularda belirgin stromal MMP-2 immunboyanmasının bulunmasının tümörün invazyon yeteneği ile ilişkili olabileceği ve adjuvan kemoterapi alacak hastalar için, ek dikkat gerektirecek bir nöroblastom altgrubunu yansıtıyor olabileceği kanısına varılmıştır.

Aynı çalışmada MMP-2'nin tersine, TIMP-2 seviyeleri erken evrelerde yüksek bulunmuştur. TIMP-2 ekspresyonunun yüksek olduğu olgularda sağkalımın daha iyi olması TIMP-2'nin MMP aktivitelerini ve tümör invazyonunu inhibe ettiğinin bir kanıtı olabileceğini düşöndürmüştür (37). MMP-9 immunreaktivitesinin ise klinik parametrelerle ilişkisi saptanmamıştır. Yazarlar, nöroblastom olgularında MMP-2 ve TIMP-2 ekspresyonlarına hastalığın erken dönemlerinde bakılmasının hastalığın agresif gidişini gösterebileceğini ve adjuvan kemoterapi alacak hastaların belirlenmesinde önemli rol oynayabileceğini belirtmektedir (27).

Ara ve ark. (56) başka bir çalışmada 25 nöroblastom hastasında MMP-2, MMP-9 ve TIMP-2'yi kodlayan genlerin ekspresyon düzeylerini PCR ile değerlendirmişlerdir. Tüm olgularda MMP-2, MMP-9, ve TIMP-2 mRNA'ları belirlenmiştir. İmmunhistokimyasal olarak saptandığı gibi bu yöntem ile de, MMP-2 ileri evre ve klinik olarak kötü gidişatlı hastalarda belirgin olarak yüksek bulunmuştur. MMP-9 ile klinik evre ve klinik gidişat arasında ilişki saptanmamıştır. TIMP-2 düzeyleri erken evre hastalarda hafif yüksek de olsa , anlamlı bulunmamıştır (56). MMP-2 nin TIMP-2'ye göre yüksek ekspresyonu, nöroblastomda

bir prognostik gösterge olarak kabul edilebilir. Benzer şekilde MMP-2'nin TIMP-2 ile orantısız ekspresyonu, başka kanserlerde, örneğin üretelial karsinomda tümör invazyonu, rekürrens ve metastazla (61) ve serviks karsinomunda kötü prognozla (62) ilişkili bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda artmış MMP-2 ekspresyonu ile ileri evre arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır. MMP-2 ekspresyonu gösteren olguların %90'ı ileri evre nöroblastom hastalarıdır. Ayrıca yüksek MMP-2 ekspresyonu ile olguların metastatik tümör varlığı arasında da istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur. Metastaz görülmeyen grupta olgulardan %80'inden fazlası MMP-2 ekspresyonu göstermemektedir. Sonuçta MMP-2, ileri evre nöroblastomlarda literatürle uyumlu olarak yüksek oranda eksprese edilmektedir. Bu nedenle MMP-2 aktivitesinin, nöroblastomlarda kullanılabilecek önemli bir kötü prognostik gösterge olabileceği düşüncesindeyiz.

Sugiura ve ark. (7) nöroblastomda MMP-2 yanısıra MMP-9 ekspresyonlarını araştırmışlardır. Bu çalışmada MMP-2, tümör hücreleri ve peritümöral stromada büyük oranda inaktif proformda, MMP-9 ise sadece peritümöral alanda hem aktif formda, hem de inaktif proformda saptanmıştır. MMP-2'nin büyük oranda inaktif formda saptanması, nöroblastomlarda MT1- MMP ekspresyonunun yokluğuna ve yüksek TIMP-2 seviyelerine bağlanmıştır ve ileri evre tümörler dışında bu proteinin metastazda çok da önemli bir rolü olmayabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca bu çalışmada MMP-2 ve MMP-9 ekspresyon düzeyleri evre IV nöroblastomlarda diğer evrelere göre daha yüksek oranda bulunmuştur. Buna karşın histopatolojik fenotip ya da MYCN amplifikasyonu ile ilişki saptanmamıştır. Bizim çalışmamızda da MKİ, yaş, MYCN amplifikasyonu, 1p delesyonu, risk grubu ve sağ kalım ile MMP-2 ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Ancak bu bulgulara karşın sadece bir çalışmada N-Myc ve bcl-2 koekspresyonlarının, nöroblastom hücrelerinde MMP-2 sekresyon ve aktivasyonunu arttırdığına ilişkin veriler vardır (63).

Ara ve ark.'nın (56) çalışmasında, MMP-2 mRNA ekspresyonları Shimada sınıflamasına göre "kötü histolojili" grupta daha yüksek seviyelerde bulunmuştur. Ayrıca stromadan zengin tümörlerde MMP-2 ekspresyonu, stromadan fakir tümörlere göre daha yüksek seviyelerde saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da, yüksek MMP-2 ekspresyonu ile "kötü histolojili" kategori arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. MMP-2 ile olumlu boyanan olgulardan çoğu (%88) kötü histolojili gruptayken, sadece iki olgu iyi histolojili grupta yer almıştır. Ayrıca MMP-2 ile differansiyasyon arasında da anlamlı ilişki bulunmuştur. MMP-2 ile olumlu boyanan olgulardan sadece biri (%5,8) differansiye nöroblastomdur. Olguların

differentiasyon derecesi arttıkça MMP-2 ekspresyonu azalmıştır. Literatürde benzer iki çalışmada da MMP-2 ekspresyonu kötü prognostik ve stromadan fakir nöroblastomlarda daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar yüksek MMP-2 ekspresyonunun klinik kötü gidişin bir göstergesi olabileceğini düşündürmektedir.

Tümörlerde TIMP-3 aktivitesi ile ilgili literatürde çok az sayıda çalışma vardır. Bunların da sadece biri nöroblastomlar ile ilgilidir (36). Bu çalışmada TIMP-3'ün nöroblastomdaki tümör büyümesine etkisi deneysel bir model üzerinde araştırılmıştır. Bu çalışmada TIMP-3'ün endotelial hücre aktivitesini ve anjiogenezi de inhibe ederek tümör büyümesini baskılayabileceği ve bu etkisini normal kapiller morfogenezini inhibe ederek gerçekleştirmiş olabileceği bulunmuştur. Yazarlar nöroblastomlarda, özellikle eksize edilemeyen lokalize tümörlerin tedavisinde kullanılabileceğini düşünmüşlerdir (36). Yapılan bir başka çalışmada, larinks karsinomunda TIMP-3 ekspresyonu klinik evre ile korele bulunmuş, başka bir çalışmada ise düşük TIMP-3 protein ekspresyonu özefagial skuamöz hücreli karsinomda kötü klinik gidişat ile ilişkili saptanmıştır (64). Görüldüğü gibi TIMP-3 ekspresyonu bir tümörde yüksek evre ile ilişkili iken diğerinde iyi prognostik faktör gibi gözükmemektedir. Ancak bahsettiğimiz gibi, bu konuda yapılan araştırmalar çok sınırlıdır. Bizim çalışmamızda da TIMP-3 olguların büyük kısmında (%90'ın üzerinde) pozitif saptanmasına karşın, hiçbir morfolojik ve genetik parametreyle anlamlı ilişki göstermemektedir. Sonuçta TIMP-3'ün nöroblastom ve diğer tümörler üzerindeki etkisini ortaya koymak için daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır.

MMP-2, MMP-9 ve TIMP-2'nin nöroblastomlardaki koekspresyonu, bunlar arasında karmaşık bir ilişki olduğunu düşündürmektedir. Tümör invazyonu esnasındaki ekstrasellüler matriks degradasyonunda, bu proteinlerin ekspresyonları arasında nasıl bir etkileşim olmaktadır sorusuna cevap verebilmek henüz net olarak mümkün değildir. Bu konuda daha fazla sayıda araştırmaya ihtiyaç vardır (56).

SONUÇLAR

- 1- Çalışmaya yaşları 40 gün ile 16 yıl arasında değişen 50 nöroblastomlu olgu dahil edilmiştir.
- 2- Histolojik olarak değerlendirilen olguların 19'u andifferansiye, 14'ü az differansiye ve 17'si differansiye nöroblastom olarak saptanmıştır.
- 3- Olgular Shimada sınıflamasına göre gruplandırılmışlardır. Sınıflamaya göre 16 olgu iyi histolojili, 34 olgu kötü histolojili grupta yer almıştır.
- 4- Çalışmamızda Shimada sınıflamasının nöroblastomlarda prognostik belirleyici olduğu göze çapmaktadır. Bununla beraber MYCN amplifikasyonu ölen hastaların çoğunda saptanmış olup, bu genetik değişikliğin kötü prognostik faktör olduğu konusundaki genel kanı desteklenmektedir.
- 5- MMP-2, 22 olguda tümör dokusunda stromal olarak eksprese edilmiştir. Kalan 28 olguda immunreaktivite saptanmamıştır. MMP-2 aktivitesi ile andifferansiyasyon, kötü histoloji, ileri tümör evresi ve metastatik hastalık arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Bu nedenle MMP-2 aktivitesinin, nöroblastomlarda kullanılacak önemli bir prognostik gösterge olabileceği düşünülmektedir.
- 6- TIMP-3 antikoru ile, 46 olguda tümör hücrelerinde ve tümör dokusunda pozitif immunreaktivite saptanmıştır. TIMP-3 aktivitesi ile değerlendirilen hiçbir parametre arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır.
- 7- Olguların 31'inde ise yüksek telomeraz aktivitesi bulunmuştur. Telomeraz aktivitesi ile yüksek MKİ ve ileri hastalık evresi arasında anlamlı ilişki saptanmış, diğer parametrelerle anlamlı ilişki bulunmamıştır. Bu nedenle yüksek telomeraz aktivitesinin kötü prognostik faktör olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP. The international neuroblastoma pathology classification (The Shimada System). *Cancer* 1999; 86:364-72
2. Schroeder H, Wachter J, Larsson H. Unchanged incidence and increased survival in children with neuroblastoma in Denmark 1981-2000: a population based study. *Br J Cancer* 2009;100:853-7
3. Schwab M, Shimada H, Joshi V, Brodeur M. Neuroblastic tumors at adrenal gland and sympathetic nervous system. WHO classification of tumors of the nervous system. Lyon: IARC; 2000
4. Joshi V. Peripheral neuroblastic tumors: pathologic classification based on recommendations of International Neuroblastoma Pathology Committee (modification of Shimada Classification). *Pediatr Dev Pathol* 2000; 3:189-199
5. Altungoz O, Aygun N, Tumer S et al. Correlation of modified Shimada classification with MYCN and 1p36 status detected by fluorescence in situ hybridization in neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2007; 172:113-9
6. Maris J, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet* 2007;369:2106-2120
7. Sugiura Y, Shimada H, Seeger RC et al. Matrix metalloproteinases -2 and -9 are expressed in human neuroblastoma: contribution of stromal cells to their production and correlation with metastasis. *Cancer Research* 1998; 58:2209-2216
8. Ambros IM, Hata J, Joshi V et al. Morphologic features of neuroblastoma (schwannian stroma- poor tumors) in clinically favorable and unfavorable groups. *Cancer* 2002; 94:1574-83
9. Goto S, Umehara S, Gerbing R et al. Histopathology (International Neuroblastoma Pathology Classification) and MYCN status in patients with peripheral neuroblastic tumors. *Cancer* 2001; 92:2699-708
10. Hiyama E, Hiyama K, Ohtsu K H et al. Telomerase activity in neuroblastoma : is it a prognostic indicator of clinical behaviour? *Eur J Cancer* 1997; 33:1932-36
11. Chan H, Gallie B, Deboer G et al. MYCN protein expression as a predictor of neuroblastoma prognosis. *Clinical Cancer Research* 1997; 3:1699-1706
12. Attiyeh E, London W, Mosse Y et al. Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *N Engl J Med* 2005; 353:2243-53

13. Kobayashi C, Monfarte-Munoz H, Gerbing R et al. Enlarged and prominent nucleoli may be indicative of MYCN amplification. *Cancer* 2005; 103:174-80
14. Hapangama D, Turner M, Drury J et al. Endometriosis is associated with aberrant endometrial expression of telomerase and increased telomere length. *Hum Rep* 2008; 23:1511-1519
15. Orlando C, Gelmini S. Telomerase in endocrine and endocrine-dependent tumors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001; 78:201-214
16. Streutker CJ, Thorner P, Fabricius N et al. Telomerase activity as a prognostic factor in neuroblastomas. *Pediatr Dev Pathol* 2001; 4:62-67
17. Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE et al. Telomerase activity in human germline and embryonal tissues and cells. *Dev Genet* 1996; 18:173-179.
18. Poremba C, Willenbring H, Hero B et al. Telomerase activity distinguishes between neuroblastomas with good and poor prognosis. *Ann Oncol* 1999; 10:715-721
19. Shay JW. Telomerase in human development and cancer. *J Cell Physiol* 1997;173:266-270
20. Shay JW, Wright WE. The reactivation of telomerase activity in cancer progression. *Trends Genet* 1996; 12:129-131
21. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266:2011-2015
22. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33:787-791
23. Shay JW, Gazdar AF. Telomerase in the early detection of cancer. *J Clin Pathol* 1997; 50:106-109
24. Shay JW, Werbin H, Wright WE. Telomerase assays in the diagnosis and prognosis of cancer. *CIBA Found Symp* 1997; 211:148-159
25. Kyo S, Takakura M, Tanaka M et al. Quantitative differences in telomerase activity among malignant, premalignant and benign ovarian lesions. *Clin Cancer Res* 1998; 4:399-405
26. Langford LA, Piatyszek MA, Xu R et al. Telomerase activity in ordinary meningiomas predicts outcome. *Hum Pathol* 1997; 28:416-420

27. Ara T, Fukuzawa M, Kusafuka T et al. Immunohistochemical expression of MMP-2, MMP-9, and TIMP-2 in neuroblastoma : association with tumor progression and clinical outcome. *J Pediatr Surg* 1998; 33:1272-1278
28. Manicourt DH, Fujimato N, Obata K et al. Serum levels of collagenase, stromelysin-1, and TIMP-1. Age and sex-related differences in normal subjects and relationship to the extent of joint involvement and serum levels of antigenic keratan sulfate in patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1994; 37:1774–17783
29. Koolwijk P, Miltenburg AM, van Erck MG et al. Activated gelatinase-B (MMP-9) and urokinase-type plasminogen activator in synovial fluids of patients with arthritis. Correlation with clinical and experimental variables of inflammation. *J Rheumatol* 1995; 22:385–393
30. Shapiro SD. Elastolytic metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Potential roles in destructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150:160–164
31. Bailey CJ, Hembry RM, Alexander A et al. Distribution of the matrix metalloproteinases stromelysin, gelatinases A and B, and collagenase in Crohn's disease and normal intestine. *J Clin Pathol* 1994; 47:113–116
32. Milani S, Herbst H, Schuppan D et al. Differential expression of matrix metalloproteinase-1 and -2 genes in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol* 1994; 144:528–537
33. Newman KM, Malon AM, Shin RD et al. Matrix metalloproteinases in abdominal aortic aneurysm: characterization, purification, and their possible sources. *Connect Tissue Res* 1994; 30:265–276
34. Wojtowicz-Praga SM, Dickson RB, Hawkins MJ. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Invest New Drugs* 1997; 15:61-75
35. Chantrain CF, Shimada H, Jodele S et al. Stromal matrix metalloproteinase-9 regulates the vascular architecture in neuroblastoma by promoting pericyte recruitment. *Cancer Research* 2004; 64:1675-86
36. Spurbeck WW, YC Ng C, Vanin EF, Davidoff AM. Retroviral vector-producer cell-mediated in vivo gene transfer of TIMP-3 restricts angiogenesis and neuroblastoma growth in mice. *Cancer Gene Ther* 2003; 10:161-167

37. Yves A, Clerck D, Shimada H. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor progression. *Ann N Y Acad of Sci* 1993; 732:222-231
38. Baker AH, George SJ, Murphy G, Newby AC. Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3. *Br J Cancer* 1999; 79:1347-1355
39. Alvarez OA, Carmichael DF, DeClerck YA. Inhibition of collagenolytic activity and metastasis of tumour cells by a recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82:589–595
40. DeClerck YA, Perez N, Shimada H et al. Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases. *Cancer Res* 1992; 52:701–708
41. Naruo S, Kanayama H, Takigawa H et al. Serum levels of a tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in bladder cancer patients. *Int J Urol*, 1994; 1:228–231
42. Baker T, Tickle S, Wasan H, Docherty A et al. Serum metalloproteinases and their inhibitors: markers for malignant potential. *Br J Cancer* 1994; 70:506–512
43. Macgregor AM, Eberhart CG, Fraig M et al. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3 levels in the extracellular matrix of lung, kidney and eye increase with age. *J Histochem Cytochem* 2009; 57:207-13
44. Sano H, Bonadio J, Gerbing RB et al. International neuroblastoma pathology classification adds independent prognostic information beyond the prognostic contribution of age. *Eur J Cancer* 2006; 42:1113-1119
45. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T et al. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med* 1995; 1:249-255
46. Reynolds CP, Zuo JJ, Kim NW et al. Telomerase expression in primary neuroblastomas. *Eur J Cancer*, 1997; 33:1929-1931
47. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Ishii T. Immunohistochemical analysis of N-myc protein expression in neuroblastoma: Correlation with prognosis of patients. *J Pediatr Surg* 1991; 26:838-843
48. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T et al. Length of telomeric repeats in neuroblastoma: correlation with prognosis and other biological characteristics. *Jpn J Cancer Res* 1992; 83:159-164

49. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T et al. Rapid detection of MYCN gene amplification and telomerase expression in neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5:601-609
50. Poremba C, Hero B, Heine B et al. Telomerase is a strong indicator for assessing the prones to progression in neuroblastomas. *Med Pediatr Oncol* 2000; 35:651-655
51. Tanaka T, Hayes FA, Nitschke R et al. Cellular DNA content as predictor of response to chemoteraphy in infants with unresectable neuroblastoma. *N Engl J Med* 1984; 311:231-235
52. Brodeur GM, Ambros PF. Biological aspects of neuroblastoma screening. *Med Pediatr Oncol* 1998; 31:394-400
53. Rabbani SA. Metalloproteases and urokinase in angiogenesis and tumor progression. *In Vivo* 1998; 12:135-142
54. Zeng ZS, Guillem JG. Colocalisation of matrix metalloproteinases-9 mRNA and protein in human colorectal cancer stromal cells. *Br J Cancer* 1994; 74:1164-1167
55. Visscher DW, Hoyhtya M et al Enhanced expression of tissue inhibitors of metalloproteinase-2 (TIMP-2) in stroma of breast carcinomas correlates with tumor recurrence. *Int J Cancer* 1994; 59:339-344
56. Ara T, Kusafuka T, Inoue M et al. Determination of imbalance between MMP-2 and TIMP-2 in human neuroblastoma by reverse transcription polymerase chain reaction and its correlation with tumor progression. *J Pediatr Surg* 2000; 35:432-437
57. Ribatti D, Surico G, Vacca A et al. Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 correlate with progression in human neuroblastoma. *Life Sci* 2001; 68:1161-68
58. Poulosom R, Pignatelli M, Stevenson WG. Stromal expression of 72 kDa type IV collagenase (MMP-2) and TIMP-2 mRNAs in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 1992; 141:389-395
59. Pyce C, Ralfkiaer E, Huntala P. Localization of messenger RNA for Mr 72000 and 92000 type IV collagenases in human skin cancer by in situ hybridization. *Cancer Res* 1992; 52:1336-1342
60. Veas RGD, Schweigerer L, Medina MA. Matrix metalloproteinases-2 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 expression in pediatric tumour cells. Effect of

- tumour cell proliferation modulators on gelatinolytic activity. *J Cancer Res Clin Oncol* 1995; 121:275-278
61. Gohji K, Fujimoto N, Ohkawa J. Imbalance between serum matrix metalloproteinase-2 its inhibitor as a predictor of recurrence of urothelial cancer. *Br J Cancer* 1998; 74:650-655
 62. Nuovo GJ, MacConnell PB, Simsir A. Correlation of the in situ detection of polymerase chain reaction-amplified metalloproteinase complementary DNAs and their inhibitors with prognosis in cervical carcinoma. *Cancer Res* 1995; 55:267-275
 63. Noujaim D, Golen CM, Golen KL et al. N-Myc and bcl-2 coexpression induces MMP-2 secretion and activation in human neuroblastoma cells. *Oncogene* 2002; 21:4549-4557
 64. Pietruszewska W, Kobos J, Gryczynski M, Bojanowska K. Analysis of TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 expression as a prognostic factor of laryngeal cancer progression. *Otolaryngol Pol* 2008; 62:380-7