

RASTLANTISAL İNGUİNAL LEİYOMİYOSARKOM: FLORESAN İN SİTU HİBRİDİZASYON (FISH) TEKNİĞİ İLE KROMOZOMAL ABERASYONLARININ SAPTANMASI: OLGU SUNUMU

INCIDENTAL INGUINAL LEIOMYOSARCOMA: DETERMINING CHROMOSOMAL ABERRATIONS USING FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION (FISH) TECHNIQUE

Ali AYYILDIZ*, Ersagun KARAGÜZEL*, Firdevs ŞAHİN**, Ahmet KARAGÜZEL***, Barış NUHOĞLU*, Cankon GERMİYANOĞLU*

* S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2. Üroloji Kliniği, ANKARA

** S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Kliniği, ANKARA

*** Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik Bölümü, TRABZON

ABSTRACT

Leiomyosarcomas are located in deep soft tissues and generally originate from vessel smooth muscle. The genetics variations in solid tumors include all the chromosome or specific parts of the chromosome. FISH (Fluorescence in situ hybridization) is used for making quantitative analysis of chromosomes and genes. Chromosome 1 short arm deletion finding rate in leiomyosarcomas is 75%. In this article we investigated chromosomal aberrations of leiomyosarcoma using FISH technique and reviewed through the literature information. In our case we found normal results in leiomyosarcoma specimens with 1, 7, 8, 17 and 22 numbered α -satellite DNA probes using FISH technique. But we found monosomy in 9 and 18 chromosomes. Investigation of different chromosomal aberrations and gene expressions should make way for clinicians in diagnosis, treatment, determining prognosis and tumor behavior.

Key words: Leiomyosarcoma, fluorescences in situ hybridization (FISH), malign fibrous histiocytoma

ÖZET

Leiomyosarkomlar derin yumuşak dokuda lokalizedirler ve genellikle damar düz kasından köken alırlar. Solid tümörlerdeki genetik değişiklikler ya tüm kromozomları ya da kromozomların belirli bölümlerini etkilerler. FISH kromozomların ve genlerin kantitatif analizleri için kullanılan bir tekniktir. Leiomyosarkomada kromozom 1'in kısa kolunda %75 oranında delesyon bulunmaktadır. Bu yazıda, leiomyosarkomanın FISH tekniği ile kromozomal aberasyonları incelenmiş olup literatür bilgileri gözden geçirilmiştir. FISH tekniğinde 1, 7, 8, 9, 17, 18 ve 22 numaralı kromozomlara ait α -satellit DNA problemleri kullanıldı. Çalışmamızda 9 ve 18. kromozomlar monozomik bulunmuştur. Kromozomal aberasyonların ve gen ekspresyonlarının varlığının araştırılması, belki de teşhis ve tedavinin geleceği, nüksün ve prognoz tayini, tümörün davranışının belirlenmesinde klinisyenlere yol gösterici olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Leiomyosarkoma, floresan in situ hibridizasyon (FISH), malin fibröz histiositoma

GİRİŞ

Leiomyosarkoma (LMS)'lar malin düz kas tümörlerinden olup yumuşak doku sarkomlarının %5-10'unu oluştururlar¹. Genellikle 40-70 yaş aralığında görülürler. Etiyolojisinde, travma bir büyüme uyarısı olarak ileri sürülmektedir². Ürogenital sistemde böbrek, uterus, mesane, üreter, skrotum, inguinal kanal, epididim, spermatik korda tanımlanmıştır³⁻⁷.

Bazı kritik genlerin fonksiyonunu ve ekspresyonunu etkileyen genetik değişikliklerin, malin transformasyonu ve kanser progresyonunu arttırdığı düşünülmektedir^{8,9}. Solid tümörlerdeki

genetik değişiklikler, ya tüm kromozomları ya da kromozomların spesifik bölgelerini içerirler¹⁰.

FISH (Floresan in situ hibridizasyon) kromozomların ve genlerin kantitatif analizleri için kullanılan bir tekniktir. Taze ve fiske edilmiş dokulardan, arşiv materyallerinden, histolojik doku bölümlerinden izole edilebilen değişik spesimenerle uygulanabilir¹¹.

Bu yazıda sağ skrotal fibroma ile başvuran ve insidental olarak sağ inguinal bölgede leiomyosarkoma saptanan olgu ele alınmış, leiomyosarkomanın FISH tekniği ile kromozomal aberasyonları incelenmiş olup literatür bilgileri gözden geçirilmiştir.

OLGU

54 yaşında erkek hasta 1,5 yıldır devam eden sağ skrotumda şişlik yakınmasıyla kliniğimize başvurdu. Hastanın özgeçmişinde herhangi bir travma öyküsü mevcut değildi. Fizik muayene; sağ skrotumda 10x15 cm'lik düzenli konturlu, hassas ve mobil olmayan kitlesi mevcuttu. Sol testis normaldi. Sağ inguinal bölgede derin palpasyonda skrotal kitleden bağımsız ikinci bir kitle tespit edildi. Hemogram, rutin biyokimya, tam idrar analizi ve tümör belirleyicileri normaldi. Sedimentasyon 100 mm/saat olarak bulundu. Skrotal ve inguinal USG' de sol testis normaldi, sağda ileri derecede olmak üzere iki taraflı skrotal sıvı artışı izlendi. Sağ inguinal bölgede 6x5 cm boyutlarında heterojen eko yapısında, içerisinde kistik alanlar içeren kitle ve sağ skrotumda 10x15 cm'lik heterojen kitle izlendi. Tomografi (CT)'de sağ rektus kası inferior kesiminden başlayıp inguinal kanala uzanım gösteren yer yer irregüler konturlu, orta kesimde hipodens alan içeren 6x5 cm, sağ skrotum içinde de 10x15 cm boyutlarında kitle izlendi (Resim 1 ve 2). Lenfadenopati (LAP) izlenmedi. İnguinoskrotal insizyonla skrotal kitle eksize edildikten sonra, sağ inguinal bölgedeki kitle, boupart bağı, a. iliaca ve v. iliaca externaya komşuluğu mevcut olduğundan kısmi eksizyon yapılabilirdi. Histopatolojik tanı skrotal fibroma ve yüksek grade'li LMS idi (Resim 3 ve 4). Damar cerrahisi olan bir merkeze gönderilen hastaya rezidüel kitle nedeniyle ikinci bir operasyon yapılarak rezidüel kitle tamamen eksize edildi. Histopatolojik tanı malin fibröz histiositoma (MFH) olarak değerlendirildi (Resim 5). Hastaya 3 kür, her kürde, beşer gün boyunca adrioblastin, ifosfamid ve kortikosteroid, daha sonra da başka bir merkezde Co-60 ile ilk fazda 2 gray/gün toplam 30 gray, ikinci fazda 2 gray/gün toplam 20 gray, üçüncü fazda da 2 gray/gün toplam 20 gray olmak üzere 70 gray radyoterapi verildi. 6 ay sonraki kontrol CT'de rekürrens ve nüks mevcut değildi.

Histopatolojik inceleme: Hematoksilen-eozin (H&E) ve trikrom boyama ile ışık mikroskopisinde yapıldı. İlâveten desmin, aktin, vimentin, CD68, CD34, S100, SYN, α -1 antitripsin (AT) ile immünohistokimyasal boyama ile çalışıldı.

FISH tekniği: Tümör dokusundan -parafin bloktan- tek hücre süspansiyonunun hazırlanma-

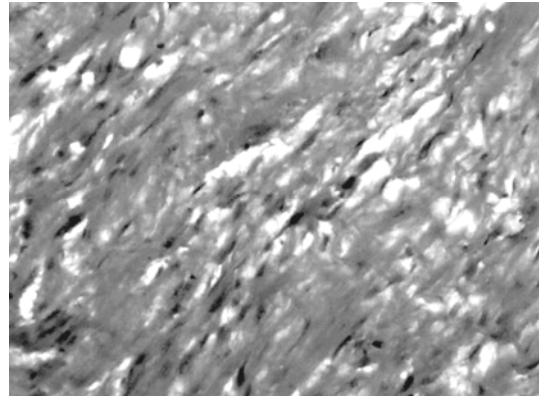
sı: Histopatolojik olarak tanı almış arşiv materyalleri olan her bir parafin doku örneğinden 40 μ m'lik 4-5 kesit alındı. Tüpe alınan doku örnekleri ksilol ile deparafinizasyondan sonra alkol serilerinden geçirilerek redidre edildi ve bistürü ile ince ince kesilen dokular %0.5'lik pepsin enzim muamelesi ile iyice suspanse edildi. Fiksatif (3:1 Carnoy fikzatif) ile fikse edilip -20°C'de kullanıncaya kadar bekletildi^{1,11,12}.



Resim 1. CT: Sağ skrotumda fibroma



Resim 2. CT: Sağ inguinal kanalda leiomyosarkoma



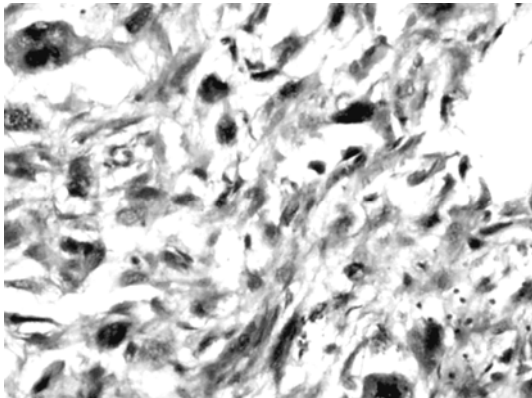
Resim 3. Skrotal fibroma, H&E x10

Çalışmada kromozom 1, 7, 8, 9, 17, 18 ve 22 numaralı kromozomlara ait α -satellit DNA problemleri (Cytocell marker) kullanıldı. Lam üzerine hücre süspansiyonundan 1-2 damla damlatıldı, havada kurutuldu. Problemler FITC veya Cy3 ile işaretilendi ve kitle uygun hibridizasyon şartlarında denatüre edildi, hedef DNA ve prob DNA'sı hibridize edildikten sonra hibridizasyon sonrası yıkamalardan geçirildi. Diamidino-2-phenylindole (DAPI) veya propidium iodide (PI) ile boyandı. Epiforesan Nikon E800'de uygun filtrelerle tek bir prob için en az 100 hücre sayıldı. Trisomi ve monozomi oranları elde edildi. Resimler 400 ASA'lık renkli filme çekildi^{1,11,12}.

BULGULAR

Histopatoloji:

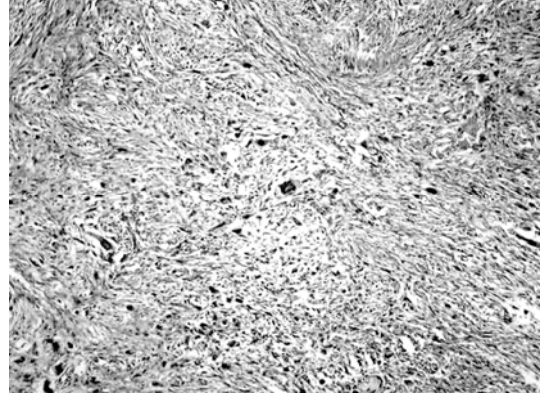
1) İnguinal bölgedeki lezyonun histopatolojisi birbiriyle çaprazlaşan, düzensiz, atipik düz kas hücreleri izlenmekte olup tümör hücrelerinde pleomorfizm, nükleol belirginliği, artmış mitotik aktivite dikkati çekti. Arada nekroz ve kanama alanları ile birkaç alanda osteoz metaplazi alanları mevcuttu. Tümör hücrelerinde desmin, aktin, vimentin, CD68, CD34, S100 ile yapılan çalışmada desmin, aktin, vimentinle pozitif boyanma görüldü. Skrotal bölgedeki materyalin histopatolojik incelemesinde çevre dokudan düzgün fibröz kapsülle ayrılan, lobüle görünümde lezyon izlendi. Lezyon spindle, fuziform uzantıları olan fibroblastlardan ve arada multinükleer dev hücrelerden oluşmakta olup trikrom ile yapılan boyamada bağ dokusu natüründe boyandı (Resim 4).



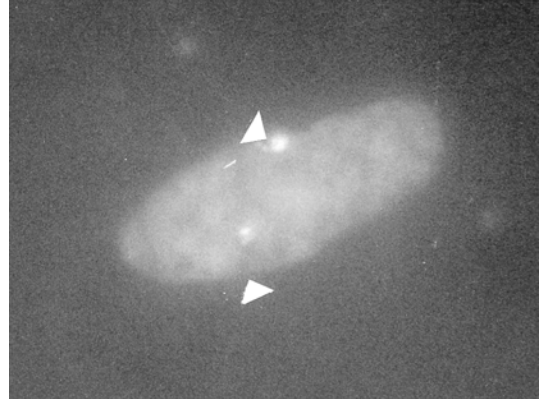
Resim 4. Leiyomiyosarkoma H&E x10

2) Rezidüel kitlenin histopatolojik incelenmesinde; yağ dokusuna infiltrasyon, yer yer ince

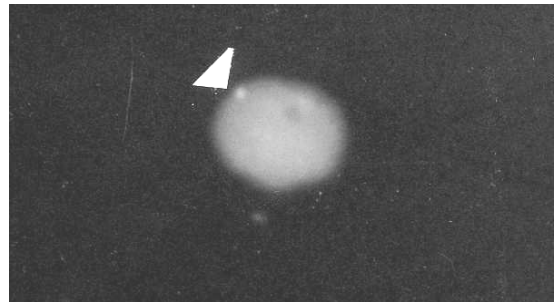
kapsülle çevrili, demetler yapan belirgin pleomorfizm gösteren içsi nükleuslu, uzantılı sitoplazmalı ve poligonal hücrelerden oluşan, yaygın nekroz alanları ve kanama odakları ve bir alanda kolesterol yarıkları olan, ayrıca bol köpüksü hücre ve dev hücreler görülmüştü. Tümör hücreleri ve histiositler CD68 ile, tümör hücreleri ayrıca α -1AT, vimentin ile diffüz boyanma göstermişlerdir (Resim 5).



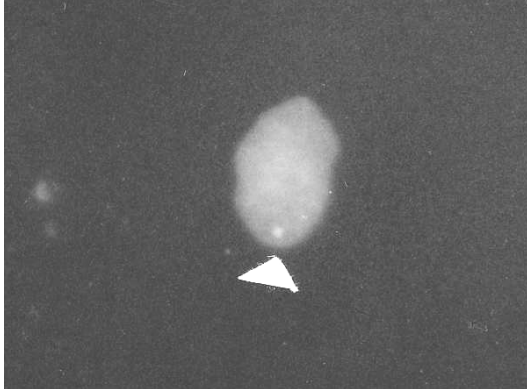
Resim 5. Malin fibröz histiositoma, H&E x40



Resim 6. 8 numaralı kromozoma ait normal (çift sinyalli) FISH görünümü



Resim 7. Monozomi, 9 numaralı kromozoma ait (tek sinyalli) FISH görünümü



Resim 8. Monozomi, 18 numaralı kromozoma ait (tek sinyalli) FISH görünümü

FISH tekniği: Olgumuzda, leiomyosarkoma spesimenlerinde 1, 7, 8, 17 ve 22 numaralı prob- lar için normal sonuç elde edilmiş olup, 9 ve 18 monozomik olarak bulundu (Resim 6, 7 ve 8).

TARTIŞMA

Leiomyosarkomlar arasındaki ayırım, sar- komatöz neoplazmalardaki mitoz artışına dayanır. Nükleer pleomorfizm ve multinükleasyon sıklıkla mevcuttur^{1,13,14}. LMS bazen derinin için- de bulunan nadir düz kas tümörüdür, fakat genel- likle daha derin yumuşak dokuda yer almaktadırlar. Daha derindeki tümörlerin çoğu damar düz kasından orijin almaktadır. Olgumuzda anatomik lokalizasyon inguinal bölgedeydi, fakat köken aldığı organ hakkında netlik yoktu. Ancak, Farchid G ve arkadaşları retrospektif bir analizde LMS' ların büyük çoğunluğunun vasküler orijinli olduğunu göstermişlerdir¹³. Makroskobik olarak LMS enkapsüle görülürler ve bunları enükle etmekten kaçınılmalıdır¹⁴. LMS'nin leiomyomadan tek farkı belirgin mitotik aktivitenin varlığının bulunmasıdır¹⁴.

Leiomyosarkomalar heterojen kromozom aberasyonları içerirler, fakat %75 oranında, kromozom 1'in kısa kolunda delesyon bulgusu vardır. Bu delesyonlar belki de tanı için faydalı değildir, çünkü benzer delesyonlar malin fibröz histiositoma, rhabdomyosarkoma ve malin periferik sinir kılıf tümörlerinde de nadiren görülmektedir. LMS'in çoğu multiple klonal kromozom aberasyonlu çok komplike karyotip içerirler ve bu kompleks yapı düşük grade'li spesimenlerde daha kuvvetli olabilir¹⁵⁻¹⁷. LMS'lar düz kas farklılaşmasıyla beraber olan bir grup malin yumuşak

doku tümörlerini de içerebilirler¹⁷. Buna karşın çoğu LMS'lar, sitogenetik çalışmalarda, normal yada basit sitogenetik aberasyonlar içermektedirler¹⁸. Bu aberasyonlar LMS için karakteristik değildir ve leiomyosarkomadaki sitogenetik aberasyonlar kanser riskinin artmasıyla birlikte görülmezler¹¹.

FISH metafaz ve interfazdaki hücreleri görüntülemek için kullanılır ve hemen hemen tüm doku tiplerine uygulanabilir. Fakat tümör hücrelerinin düşük mitotik aktivitesinin varlığı ve neoplastik olmayan hücrelerin aşırı büyümesi gibi kanser hücre kültürlerindeki zorluklar da mevcuttur. FISH tekniğinde kullanılan floresan DNA prob- larla, kromozomların belirli bölgelerinin spesifik boyanmalarına göre, kromozomlar α -satellit (alfoidler) ve belirli lokus-spesifik bölge (kosmidler) olarak görülmektedir. FISH solid tümörlerin karyotipi, kromozomların sayısal varlığı veya kromozomların yapısal defektleri, kromozomal aberasyonlar hakkında bilgi vermektedir¹¹.

Leiomyosarkomlar için FISH yöntemi ile yapılan çalışmalarda Wang ve ark. 1, 5 ve 20. kromozomlarda, Ottano-Joos ve ark. 5, 8, 10, 13, 15, 17 ve X kromozomlarında, Riva ve ark. 19. kromozomda, Han ve ark. ise 1, 6 ve 8. kromozomlarda, Derre ve ark. da 1, 12, 17, 22, 15, 16, 19, 20 ve X kromozomlarında, uzun ve kısa kollarında, translokasyon ve delesyonlar bildirmişlerdir^{17,19-22}. Ayrıca yine Riva ve arkadaşları 19 ve 22. kromozomlarda monozomi, Han ve ark. ise 8. kromozomunun ekstra kopyasını bildirmişlerdir^{20,21}. Ottano-Jones ve ark. LMS'larda bir grup karakteristik kromozomal dengesizlik oluştuğunu ve LMS'ların genomunda bulunan aktif potansiyel onkojenler ve tümör süpresör genlerin lokalizasyonuna ait kanıtlar sağladığını ifade etmişlerdir¹⁷. Riva ve ark. da analiz ettikleri LMS'ların tümör hücre alt gruplarında 19p delesyon rekürrensleri gördüklerini, bu yapısal aberasyonların LMS'ların gelişiminde önemli olduğunu vurgulamışlardır²⁰. Han ve ark. ise LMS'ların bir çok hücreyi etkileyen çok sayıda kromozom aberasyonu ile karakterize olduğunu göstermişlerdir²¹.

Hirakawa ve ark. LMS'larda bcl-2 proteini- nin aşırı salgılanmasını değerlendirmişler ve (-) olduğunu göstermişlerdir²³. Skubitz de LMS'lar- da cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, diapha-

nous doublecortin, calpain 6, interleukin- 17B ve proteolipid 1 genlerinde aşırı salgılanma saptamışlardır²⁴. Ayrıca Jenson ve ark. Epstein-Barr virüsü (EBV)'nün bir seri latent ve proliferatif viral ürün oluşturarak düz kas hücrelerinin litik enfeksiyonunu oluşturma kapasitesine sahip olduğunu göstermişler ve düz kas hücrelerinin EBV enfeksiyonunun LMS'ların onkogenezisine katkıda bulunabileceğini ifade etmişlerdir²⁵.

Leiomyosarkomlar klinik davranışları ve histopatolojik görünüm spektrumlarıyla değişiklik gösteren ve diğer sarkom tiplerine, özellikle malin fibröz histiositoma farklılaşabilen ve çeşitli varyasyonlara değişebilen malin bir tümördür^{22,26,27}. Ayrıca, LMS'da teşhis anında; kitlenin geniş, bölgesel ve çeşitli klonal heterojenitelerinden dolayı, tümör içi ve tümörler arası normal dokudaki gen ekspresyonları farklı olabilir. Yapılan bir çalışmada tümör içi gen ekspresyonlarının, tümörler arası gen ekspresyonlarından daha fazla bulunduğu gösterilmiştir²⁶.

Olgumuzdaki patolojik örneklerle FISH metoduyla kromozomal analiz uygulandı. FISH metodu ile inguinal bölgedeki LMS'da 1, 7, 8, 17 ve 22 numaralı problemler için normal sonuç elde edilirken 9 ve 18'de monozomik kromozomlar bulunmuştur. FISH analizi nükleusun metafaz ve interfaz parafin blok örneklerine uygulanmaktadır. Kromozomların sayısal aberasyonlarının teşhis edilmesinde en kuvvetli yöntemlerden biri olduğu bilinmektedir. Bilgilerimize göre ülkemizde leiomyosarkomayla ilgili yapılmış olan bu çalışma bir ilktir. Hastalığın seyrinin daha sonra malin fibröz histiositomaya dönmesi değişik gen ekspresyonları ve kromozomal aberasyonlardan kaynaklanıyor gibi görünmektedir^{11,17,22,24,26,27}.

Sonuç olarak, LMS'lar olgumuzda olduğu gibi klinik davranışları ve histopatolojik görünüm spektrumlarıyla değişiklikler gösteren ve diğer sarkoma türlerine dönüşebilen, çalışmamızda olduğu gibi kromozomlarda aberasyonlar saptadığımız, çok değişik sayıda kromozomal aberasyonlar içeren malin yumuşak doku tümörüdür. Ülkemizdeki tümöral olguların tümüne rutin olarak yapılabilirliği umuduyla değişik kromozomal aberasyonların ve gen ekspresyonlarının varlığının araştırılması, belki de teşhis ve tedavinin geleceği, prognozunu tayini, nüks olup olmayacağı

ve tümörün davranışının belirlenmesinde klinisyenlere yol gösterici olacaktır.

KAYNAKLAR

- 1- **Jonathan AF:** Cytogenetic analysis of soft tissue tumors. In Franz ME, Sharon WW: Soft tissue tumors, Third ed, Newyork, pp 105-118, 1995.
- 2- **Lawrence FG, Reda FS, William HS:** Spermatic cord sarcoma. Leiomyosarcoma and retroperitoneal lymph node dissection. Urol 32: 28-31, 1986.
- 3- **Marcio AF, Anthony LZ, Alex FA, et al:** The management of spermatic cord sarcoma. Cancer 77: 1873-1876, 1996.
- 4- **Moazzam M, Ather M, Hussainy AS:** Leiomyosarcoma presenting as a spontaneously ruptured renal tumor-case report. BMC Urol 19, 2(1): 11, 2002.
- 5- **Kolhartkar RK, Kulkarni SH, Phansopkar MA, et al:** Leiomyosarcoma of ureter presenting as acute renal failure. Br J Urol 51 (4): 326, 1979.
- 6- **Johnson S, Rundell M, Platt W:** Leiomyosarcoma of the scrotum: A case report with electron microscopy. Cancer 41 (5): 1830-5, 1978.
- 7- **Gowing NF, Morgan AD:** Paratesticular tumors of connective tissue and muscle. Br J Urol 36: 78, 1964.
- 8- **Kallioniemi OP, Visakorpi T:** Genetic basis and clonal evaluation of human prostate cancer. Adv Cancer Res 68: 225-55, 1996.
- 9- **Nupponen NN, Visakorpi T:** Molecular cytogenetics of prostate cancer. Microsc Res Tech 51: 456-63, 2000.
- 10- **Forozan F, Karhu R, Kanonen J, et al:** Genome screening by comparative genomic hybridization. Trends Genet 13: 405-9, 1997.
- 11- **Celep F, Karagüzel A, Özgür GK, et al:** Detection of chromosomal aberrations in prostate cancer by fluorescence in situ hybridization (FISH). Eur Urol 44 (6): 666-671, 2003.
- 12- **Trask B:** FISH: Applications in cytogenetics and gene mapping. Tech Focus 7: 149-54, 1991.
- 13- **Farshid G, Fradhan M, Goldblum J, et al:** Leiomyosarcoma of somatic soft tissues: A tumor of vascular origin with multivariate analysis of outcome in 42 cases. Am J Surg Pathol 26 (1): 14-24, 2002.
- 14- **Peter GC:** Soft tissue tumors and nonneoplastic conditions simulating bone tumors. In Crenscham AH(ed): Campbell's operative orthopaedics, 8th ed., st. Louis, pp: 291-314, 1992.
- 15- **Boghossian L, Dal CP, Turc CC, et al:** Three possible cytogenetic subgroups of leiomyosarcoma. Cancer Genet Cytogene 43:39, 1989.

- 16- **Sreekantaiah C, Davis JR, Sandberg AA:** Chromosomal abnormalities in leiomyosarcoma. *Am J Pathol* 142: 293, 1993.
- 17- **Otano-Joos M, Mechttersheimer G, Ohl S, et al:** Detection of chromosomal imbalances in leiomyosarcoma by comparative genomic hybridization and interphase cytogenetics. *Cytogenet Cell Genet* 90 (1-2): 86-92, 2000.
- 18- **Rein MS, Friedman AJ, Barbieri RL, et al:** Cytogenetic abnormalities in uterine leiomyomata. *Obstet Gynecol* 77: 923, 1991.
- 19- **Wang R, Lu YJ, Fisher C, et al:** Characterization of chromosome aberrations associated with soft tissue leiomyosarcomas by twenty-four-color karyotyping and comparative genomic hybridization analysis. *Genes Chromosomes Cancer* 31 (1): 54-64, 2001.
- 20- **Riva P, Dalpr L, Gualandri V et al:** 19p deletion in recurring leiomyosarcoma lesions from the same patient. *Cancer Genet Cytogenet* 119 (2): 102-8, 2000.
- 21- **Han K, Lee W, Haris CP, et al:** Comparison of chromosome aberrations in leiomyoma and leiomyosarcoma using FISH on archival tissues. *Cancer Genet Cytogenet* 74 (1): 19-24, 1994.
- 22- **Dere J, Lagace R, Nicolas A, et al:** Leiomyosarcomas and most malignant fibrous histiocytomas share very similar comparative genomic hybridization imbalances: an analysis of series of 27 leiomyosarcomas. *Lab Invest* 81 (2): 211-5, 2001.
- 23- **Hirakawa N, Naka T, Yamamoto I, et al:** Overexpression of bcl-2 protein in synovial sarcoma: A comparative study of other soft tissue spindle cell sarcomas and an additional analysis by fluorescence in situ hybridization. *Hum Pathol* 27 (10): 1060-5, 1996.
- 24- **Skubitz KM, Skubitz AP:** Differential gene expression in leiomyosarcoma. *Cancer* 98 (5): 1029-38, 2003.
- 25- **Jenson HB, Montalvo EA, McClain KL, et al:** Characterization of natural Epstein-Barr virus infection and replication in smooth muscle cells from a leiomyosarcoma. *J Med Virol* 57 (1): 36-46, 1999.
- 26- **Shmulevich I, Hunt K, El-Naggar A, et al:** Tumor specific gene expression profiles in human leiomyosarcoma: An evaluation of intratumor heterogeneity. *Cancer* 94 (7): 2069-75, 2002.
- 27- **Hasegawa T, Hasegawa F, Hirose T, et al:** Expression of smooth muscle markers in so called malignant fibrous histiocytomas. *J Clin Pathol* 56 (9): 666-71, 2003.