



T.C.

ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**DERECE 1 KONDROSARKOM VE ENKONDROM AYIRICI TANISINDA
PERİOSTİN VE PEG10 BİYOBELİRTEÇLERİNİN YERİ**

Dr. FATMA KUTSAL

TIPTA UZMANLIK TEZİ

SAMSUN-2023



T.C.

ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**DERECE 1 KONDROSARKOM VE ENKONDROM AYIRICI TANISINDA
PERİOSTİN VE PEG10 BİYOBELİRTEÇLERİNİN YERİ**

Dr. Fatma KUTSAL

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI:

Prof. Dr. Yakup Sancar BARIŞ

SAMSUN-2023

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sürecinde emeği geçen herkese teşekkür ederim.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Fatma KUTSAL Doğum Tarihi ve Yeri: 30.01.1989- Antalya		
Derece	Okul	Yıl
İlk/Orta	Burdur/Bucak Cumhuriyet İlk Öğretim Okulu	1997-2003
Lise	Burdur Anadolu Öğretmen Lisesi	2003-2007
Lisans/Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi	2008-2015
Görevler:		
Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Pratisyen Doktor	Şanlıurfa Balıklı Göl Devlet Hastanesi	2015-2016
Araştırma Görevlisi	Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı	2016-2016
Araştırma Görevlisi	Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı	2018-Halen

BEYAN

‘Derece 1 kondrosarkom ve enkondrom ayırıcı tanısında periostin ve PEG10 biyobelirteçlerinin yeri’ başlıklı tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, başka bir çalışmadan kopya edilmediğini, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.



ÖZET

DERECE 1 KONDROSARKOM VE ENKONDROM AYIRICI TANISINDA PERİOSTİN VE PEG10 BİYOBELİRTEÇLERİNİN YERİ

Giriş ve Amaç: Kondrosarkom (KS), primer malign kemik tümörleri arasında osteosarkomdan sonra en sık görülen tümördür. Klasik, berrak hücreli, periosteal, mezenkimal ve dediferansiye olmak üzere beş alt gruba ayrılır. Bunlar arasında klasik KS %90 oranında görülür. Klasik KS histolojik olarak üç dereceye ayrılır. Histomorfolojik olarak derece 2 ve 3'ü tanımak nispeten daha kolayken derece 1 KS'nin enkondromdan tek başına histopatolojik olarak ayrımı genellikle zor ve bazen de imkânsızdır.

Enkondrom, kemiğin benign bir tümörü olup tedavisi genellikle takip iken, derece 1 KS'nin tedavisi güvenli cerrahi sınırlar ile eksizyondur. Tedavi ve prognozları farklı olan iki tümörün literatürde güven ile ayrımını sağlayacak immünohistokimyasal bir belirteç mevcut değildir.

Biz bu çalışma ile bölümümüzde son 16 yıl içinde derece 1 KS ve enkondrom tanısı almış olguların ayrımında periostin ve PEG10 immünohistokimyasal belirteçlerinin ayırıcı tanıdaki yeri değerlendirildi.

Gereç ve Yöntem: 2005-2021 yılları arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda enkondrom ve derece 1 KS tanısı almış tüm olgular çalışmaya dahil edildi. Olgulara ait hematoksilen-eozin kesitler yeniden değerlendirilerek tanılar teyit edildi. Değerlendirmede 2020 DSÖ sınıflaması esas alındı. Tamponlanmış nötral formalinde tespit edilmiş ve parafinde bloklanmış dokulardan 4 mikron kalınlığındaki kesitler pozitif şarjlı lamlara (Menzel, Superfrost Plus Slides) alındı. Deparafinize edilen kesitlere anti-periostin antikor (ABCAM/ab215199) ve anti-PEG 10 antikorları (ABCAM/ab215035) ile otomatik boyama cihazında (Ventana Benchmark LT) immünohistokimyasal boyama yapıldı. İstatistiksel değerlendirmeler bilgisayar ortamında SPSS programı ile yapıldı. Elde edilen veriler, literatür ile karşılaştırıldı.

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen 91 enkondrom olgusunun 50'si kadın ve 41'i erkek; 27 derece 1 KS olgusunun 10'u kadın ve 17'si erkek idi. Enkondromda en sık yerleşim yeri el-falanks, derece 1 KS'de ise humerus idi. Takibi yapılan 34 enkondrom

olgusunun sadece 1 tanesinde; 14 derece 1 KS olgusunun 4'ünde nüks izlendi. PEG10 ve periostin ile 91 adet enkonrom ve 27 adet derece 1 KS olgusuna yapılan immünohistokimyasal çalışmada boyanma izlenmedi.

Sonuç: Preanalitik aşamada olabilecek teknik sorunların minimize edilmesine ve analitik aşamada antijen kazanımı adına başvurulmuş çeşitli teknikler kullanılmasına rağmen immünohistokimyasal çalışmalarda enkonrom ya da derece 1 KS olgularında periostin ya da PEG10 ile boyanma izlenmedi. Bu aşamada en azından çalışmamızda kullanılan klonlar ile, periostin ve PEG10 antikorlarının enkonrom ve KS ayırımında yararlı olmadığı sonucuna varıldı.

Anahtar sözcükler: Kondrosarkom, enkonrom, PEG 10, periostin

ABSTRACT

THE ROLE OF PERIOSTIN AND PEG10 BIOMARKERS IN THE DIAGNOSIS OF DEGREE 1 CHONDROSARCOMA AND ENCHONDROMA

Introduction and Aim: Chondrosarcoma (CS) is the most common primary malignant bone tumor after osteosarcoma. It is divided into five subgroups as classic, clear cells, periosteal, mesenchymal and dedifferentiate. These include a conventional CS at a rate of 90 %. Conventional CS is divided into three degrees. Histomorphologically, it is relatively easier to discern degree 2 and 3, while histopathological distinction of between degree 1 CS solely from the enchondroma is often difficult and sometimes impossible.

Enchondroma is a benign tumor of the bone and its treatment is usually followed, whereas the treatment of grade 1 CS is excision with safe surgical margins. There is no immunohistochemical marker to safely distinguish between these two tumors with different treatment and prognosis.

With this study, in the last 16 years, we have examined the place of periostin and PEG10 immunohistochemical markers in the distinction between cases diagnosed with degree 1 CS and enchondroma.

Materials and Methods: All cases diagnosed with enchondroma and grade 1 CS in the Pathology Department of Ondokuz Mayıs University Faculty of Medicine between 2005 and 2021 were included in the study. Hematoxylin-eosin sections of the cases were re-evaluated and the diagnoses were confirmed. The evaluation was based on the 2020 WHO classification. Buffered neutral formalin fixed tissues were processed to obtain paraffin blocks and sections of 4 micron thickness were taken on positively charged slides (Menzel, Superfrost Plus Slides); sections were deparaffinized, then anti-Periostin antibody (ABCAM/ab215199) and anti-PEG10 antibody (ABCAM/ab215035) with immunohistochemical staining was performed on a LT Ventana Benchmark device. Statistical evaluations were made with SPSS software.

Results: 50 of the 91enchondroma cases included in the study are women and 41 are males; 27 degrees 1 CS cases are women and 17 are males. The most common location in enchondroma was hand-phalanx and for degree 1 CS humerus. Of the cases with

follow up information recurrence was observed in 1 of 34 enchondromas and 4 of 14 degree 1 CS cases. No staining was observed with either periostin nor PEG10 in any of the 91 enchondromas and 27 degree 1 CSs.

Discussion and Conclusion: Despite controlling any pre-analytic technical problems and using different antigen retrieval protocols at the analytical stage, staining with periostin or PEG10 was not observed. At this stage, it was concluded that periostin and PEG10 antibodies were not beneficial in the distinction between enchondroma and CS, at least with the clones used.

Key words: Chondrosarcoma, enchondroma, PEG 10, periostin

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZGEÇMİŞ.....	ii
BEYAN	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	vi
KISALTMALAR	ix
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Kondrosarkom	7
2.2. Enkondrom	10
2.3. İmmünohistokimyasal Belirteçler.....	12
2.3.1. S100	12
2.3.2. SOX9.....	12
2.3.3. Periostin	13
2.3.4. PEG10	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1. Olgu Seçimi	16
3.2. İmmünohistokimya Boyama Yöntemi ve Değerlendirilmesi	16
3.3 İstatistiksel Yöntemler	18
4. BULGULAR	19
5. TARTIŞMA.....	30
6. SONUÇLAR	34
7. KAYNAKLAR.....	35
8- EKLER.....	46
8. 1. Ek 1.....	46
8. 2. Ek 2.....	48

KISALTMALAR

ABC: Avidin-Biotin Complex

BT: Bilgisayarlı Tomografi

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

EXT: Exostosin glycosyltransferase

IDH: İsocitrate Dehydrogenase

KS: Kondrosarkom

LSAB: Labeled Streptavidin–Biotin

MRG: Manyetik Rezonans Görüntüleme

PEG 10: Paternally Expressed Gen 10

PTH: Parathormon

SOX9: SRY-box transcription factor 9

TGF-B: Transforming Growth Factor- B

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

TABLÖLER LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1: Kemik tümörleri DSÖ 2020 sınıflaması.....	2
Tablo 2: Enkondrom ve derece 1 kondrosarkom olgularının cinsiyete göre dağılımı	19
Tablo 3: Enkondrom ve derece 1 kondrosarkom olgularının cinsiyete göre yaş ortalamaları.....	19
Tablo 4: Enkondrom ve derece 1 kondrosarkom olgularının anatomik lokalizasyona göre dağılımı.....	20
Tablo 5: Enkondrom ve derece 1 kondrosarkom olgularının tedavi sonrası nüks oranı.....	20

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1: Periostin kontrol doku boyaması (mide mukozası).....	21
Şekil 2: PEG10 kontrol doku boyaması (plasenta).....	21
Şekil 3A-B: Protokol 1 ile derece 1 kondrosarkom ve enkondrom olgularında PEG10 immünohistokimya boyası.....	22
Şekil 4A-B: Protokol 2 ile derece 1 kondrosarkom ve enkondrom olgularında periostin immünohistokimya boyası.....	22
Şekil 5A-D: Protokol 3 ile derece 1 kondrosarkom ve enkondrom olgularında periostin ve PEG10 immünohistokimya boyaları.....	23
Şekil 6A-D: Protokol 4 ile derece 1 kondrosarkom ve enkondrom olgularında periostin ve PEG10 immünohistokimya boyaları.....	24
Şekil 7A-D: Protokol 5 ile derece 1 kondrosarkom ve enkondrom olgularında periostin ve PEG10 immünohistokimya boyaları.....	25
Şekil 8A-D: Protokol 6 ile derece 1 kondrosarkom ve enkondrom olgularında periostin ve PEG10 immünohistokimya boyaları.....	26
Şekil 9A-D: Protokol 7 ile derece 1 kondrosarkom ve enkondrom olgularında periostin ve PEG10 immünohistokimya boyaları.....	27
Şekil 10A-D: Protokol 8 ile derece 1 kondrosarkom ve enkondrom olgularında periostin ve PEG10 immünohistokimya boyaları.....	28
Şekil 11A-B: Protokol 9 ile derece 1 kondrosarkom ve enkondrom olgularında periostin immünohistokimya boyası.....	29

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya sağlık örgütü sınıflamasına (DSÖ) göre kondrosarkom (KS), kemiğin osteosarkomdan sonra en sık görülen pimer malign tümörüdür (1,2). KS histolojik olarak klasik, berrak hücreli, mezenkimal, periosteal ve dediferansiye olmak üzere beş alt gruba ayrılmaktadır (1,3). Klasik KS %90 oran ile KS'lerin en sık karşılaşılan alt tipidir (2,4). Klasik KS histopatolojik olarak sellülarite, nükleer atipi, miksoid matriks değişikliği ve mitoz özelliklerine göre üç dereceye ayrılır. Derece 1 KS/atipik kartilajinöz tümör, nükslerle giden lokal agresif davranışa sahiptir. KS derecede 2 ve 3'te daha sık nüks ve metastaz görülür. Radyoterapi ve kematerapiye duyarlı olmayan KS'ler için cerrahi ilk tedavi seçeneğidir. Cerrahi uygulama derece 1 KS'lerde lokal eksizyon; derece 2/3 KS'lerde ise geniş rezeksiyon şeklindedir (5).

Derece 2-3 KS'lerin eksizyon materyallerinde histopatolojik olarak tanınması hasta yaşı, kliniği ve radyolojik veriler eşliğinde değerlendirildiğinde derece 1 KS'ye göre nispeten kolaydır. Derece 1 KS'lerin sıklıkla ayırıcı tanısında ele alınan enkondromdan ayrımı hem örtüşen histomorfolojik özellikler hem de yardımcı immünohistokimyasal ve moleküler belirteç olmaması nedeni ile klinik ve radyolojik veriler ile de değerlendirildiğinde tanı vermek oldukça zordur (6).

Enkondrom kemiğin kırıkta daki matriks üreten benign bir tümörüdür ve tedavisinde asemptomatik hastalarda takip, semptomatik hastalarda küretaj yapılır. Tedavi sonrası rekürrens ya da malign dönüşüm görülmez (1,3,7). Derece 1 KS lokal agresif bir tümör olduğu için rekürrens ve derece 2 ya da 3 bir KS'ye ilerleme ve dediferansiyasyon riski vardır. Bu iki hastalığın prognozları ve tedavilerinin farklı olması nedeni ile ayrımları oldukça önemlidir.

Bu çalışmada tedavi ve prognozları farklı olan derece 1 KS ve enkondrom ayırıcı tanısında yardımcı olabilecek periostin ve PEG10 biyobelirteçlerinin kullanılarak iki tümörün immünohistokimyasal olarak ayrımının sağlanması ve her iki tümör de etkin ve doğru tedavi şansının elde edilmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Primer kemik tümörleri nadir görülmekte ve tüm neoplazilerin %1'inden azını oluşturmaktadır (8). İskelet sisteminde metastazlar primer kemik tümörlerinden daha fazla sıklıkta izlenmektedir (9). Kemik tümörlerinin sınıflandırılmasında dünya sağlık örgütü (DSÖ) 2020 sınıflaması kullanılmakta ve bu sınıflandırma tümörün köken aldığı doku veya matriks özelliğine göre yapılmaktadır (Tablo 1) (1).

Tablo 1. Kemik tümörleri DSÖ 2020 sınıflaması.

Kondrojenik tümörler

- *Benign*
 - Subungual ekzositoz
 - Bizar parosteal osteokondromatöz proliferasyon
 - Periosteal kondrom
 - Enkondrom
 - Osteokondrom
 - Kondroblastom NOS
 - Kondromiksoid miksom
 - Osteokondromiksom
- *Intermedier (lokal agresif)*
 - Kondomatozis NOS
 - Atipik kartilajinöz tümör
- *Malign*
 - Kondrosarkom, derece 1
 - Kondrosarkom, derece 2
 - Kondrosarkom, derece 3
 - Berrak hücreli kondrosarkom
 - Mezenkimal kondrosarkom
 - Dediferansiye kondrosarkom

Osteojenik tümörler

- *Benign*
 - Osteom NOS
 - Osteoid osteom NOS
- *Intermedier (lokal agresif)*
 - Osteoblastom NOS
- *Malign*
 - Düşük dereceli santral osteosarkom
 - Osteosarkom, NOS
 - Konvansiyonel osteosarkom
 - Telenjektatik osteosarkom
 - Küçük hücreli osteosarkom
 - Parosteal osteosarkom
 - Periosteal osteosarkom
 - Yüksek dereceli yüzeysel osteosarkom
 - Sekonder osteosarkom

Fibrojenik tümörler

- *Intermedier (lokal agresif)*
 - Dezmoplastik fibrom
- *Malign*
 - Fibrosarkom NOS

Vasküler tümörler

- *Benign*
 - Hemanjiom NOS
- *Intermedier (lokal agresif)*
 - Epiteloid hemanjiom
- *Malign*
 - Epiteloid hemanjiendoendotelyoma NOS
 - Anjiosarkom

Ostoklastik dev hücreden zengin tümörler

- *Benign*
 - Anevrizmal kemik kisti
 - Non-ossifiye fibrom
- *Intermedier (lokal agresif, nadir metastatik)*
 - Kemiğin dev hücreli tümörü NOS
- *Malign*
 - Kemiğin dev hücreli tümörü, malign

Notokordal tümörler

- *Benign*
 - Benign notokordal tümör
- *Malign*
 - Kordoma NOS
 - Kondoid kordoma
 - Az diferansiye kordoma

- Dediferansiye kordoma

Kemiğin diğerk mezenkimal tümörleri

- *Benign*
 - Göğüs duvarının kondromezenkimal tümörü
 - Basit kemik kisti
 - Fibröz displazi
 - Osteofibröz displazi
 - Lipom NOS
 - Hibernom
- *Intermedier (lokal agresif)*
 - Osteofibröz displazi benzeri adamantinoma
 - Mezenkimoma NOS
- *Malign*
 - Uzun kemiğin adamantinoması
 - Dediferansiye adamantinoma
 - Leomiyosarkom NOS
 - Andiferansiye pleomorfik sarkom
 - Kemik metastazları

Kemiğin hematopoietik neoplazmları

- Kemik plazmasitomu
- Malign lenfoma, non-Hodgkin, NOS
- Hodgkin lenfoma NOS
- Diffüz büyük B hücreli lenfoma NOS
- Foliküler lenfoma

- Marjinal zone lenfoma NOS
- T hücreli lenfoma NOS
- Anaplastik büyük hücreli lenfoma, NOS
- Lenfoblastik lenfoma NOS
- Burkitt lenfoma NOS
- Langerhans hücreli histiositozis NOS
- Langerhans hücreli histiositozis, dissemine
- Erdheim-Chester hastalığı
- Rosai-Dorfman hastalığı

Kemik ve yumuşak dokunun andiferansiye küçük yuvarlak hücreli tümörleri

- Ewign sarkom
- ESWR non-ETS yuvarlak hücreli sarkom
- *CIC* rearranged sarkom
- BCOR genetik alterasyonu içeren sarkom

Osteosarkomlar primer kemik tümörleri arasında en sık karşılaşılan malign tümördür. Bunu KS'ler ve Ewing sarkomu izlemekle birlikte sıklık sırası yaşa bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (1,3,8).

Kemik tümörleri tıpkı yumuşak doku tümörleri gibi biyolojik davranış özelliklerine göre dört gruba ayrılmaktadır: Benign, intermedier (lokal agresif), intermedier (nadir metastatik) ve malign (1).

Benign: Sınırlı lokal rekürrens yapabilen, tedavisi küretaj veya lokal eksizyon olan grubu kapsar.

İntermedier (lokal agresif): Bu grup, lokal nüksü sık olan, infiltratif ve lokal destrüktif büyüme paternine sahip tümörleri içine almaktadır. Metastaz potansiyeli

yok kabul edilir. Tedavi negatif cerrahi sınırlar ile tümörün geniş eksizyonu ve/veya lokal adjuvan tedavidir.

İntermedier (nadir metastatik): Lokal nüks ve metastaz potansiyeli (<%2) olan tümör grubunu kapsar.

Malign: Lokal destrüktif, nüks ve uzak metastaz (>%20) özelliklerine sahip tümör grubunu kapsar. Genel tedavi yaklaşımı güvenli cerrahi sınırlar ile *en bloc* rezeksiyondur.

2.1. Kondrosarkom

Kemik tümörleri sınıflamasında kıkırdak matriks üreten alt grupta yer alan KS, malign kemik tümörlerinin %20'sini oluşturmaktadır. Genellikle erişkin yaşlarda ve erkekler de hafifçe daha fazla görülmekte, sıklıkla aksiyal iskelet (pelvis, kostalar, skapula, sternum) daha az oranda el ve ayaklar da ortaya çıkmaktadır (2,4). Klinik olarak etkilenen yerde şişme, ağrı, patolojik kırık olabilir (6).

Radyolojik olarak, kalsifikasyon gösteren intramedüller kitle, kortikal düzensizlik ve kalınlaşmalar, kortikal destrüksiyon ve yumuşak doku komponenti görülebilir. Kitle içi kalsifikasyon tümör derecesi arttıkça belirsiz hale gelebilir. Kortekste endosteal yüzde erozyonlar, kortikal yeniklik (*scalloping* görünümü) malignite bulgusudur. Olguların yaklaşık yarısında, BT ve MRG'de yumuşak doku kitlesi görülür (10–14).

Primer KS'ler genellikle *de novo* gelişirken sekonder KS'ler osteokondrom veya enkondrom gibi bir öncül lezyon üzerinden gelişir. Tümör gelişim yerine göre santral (medüller), periosteal (periost-korteks arası) ve periferik olmak üzere üçe ayrılır. Tüm *de novo* KS'ler intramedüllerdir (1,15).

KS'lerde karakteristik genomik değişiklik bulunmamakla birlikte, çeşitli mutasyonlar veya kromozomal aberasyonlar gözlenmiştir. En sık izlenen mutasyon %50 oran ile IDH-1 ve IDH-2 genlerindedir; bunu %20-50 oran ile konvansiyonel ve dediferansiye KS'lerde izlenen TP53 mutasyonu izler. CDK4, MDM2, CDKN2A, cMYC, COL2A1, EXT1, EXT2 genleri ile ilgili değişikliklerde tanımlanmıştır (1,16–20).

IDH-1 ve IDH-2 somatik mutasyonu taşıyan enkondromatozisli hastalarda KS'ye progresyon riski mevcuttur. Bu risk tüm enkondrom vakalarında %40 civarındadır. El-ayak lokalizasyonlu enkondromatozis vakalarında risk %15 ve el, ayak yanı sıra tübüler/yassı kemik yerleşimli enkondromatozis vakalarında %46 civarındadır. Özellikle pelvik yerleşimli enkondrom hastalarında bu risk artmış olarak izlenmektedir (14,16,18,19,21,22).

EXT-1 ve EXT-2 germ hattı mutasyonu taşıyan çoklu osteokondromlu hastalarda sekonder periferik KS gelişme riski soliter osteokondromlara göre daha fazladır. Soliter osteokondromlu hastalarda bu oran %1 civarında iken çoklu osteokondromlu hastalarda %5 civarındadır (1,21,23,24)

Makroskopik olarak santral yerleşimli olan KS'lerde kemik medullasında, periosteal olanlarda korteks devamında izlenen kitlede, kıkırdak dokusuna benzer parlak gri-mavi renk, miksoid görünüm, lobülasyon ve kistik alanlar en belirgin özelliklerdir. Tümörü histolojik derecesine göre miksoid alanlarda belirginleşme ve nekroz dikkat çekici olabilir. Nekrotik alanlarda kalsifikasyon görülebilir (3,25).

Mikroskopik olarak farklı alt tipleri olan KS'nin yaklaşık %90'ı klasik KS'dir. Klasik KS histolojik olarak üç dereceye ayrılır: Derece 1 (intermedier, lokal agresif), derece 2 (nadir metastatik) ve derece 3 (malign). Derece 1 ve derece 2-3'ün tedavi ve prognozlarında farklılıklar vardır (1,26,27).

Kondrosarkom, derece 1:

Histomorfolojik olarak, çeşitli çaplarda ve yaygın hiyalin matriks içeren irregüler lobüllerden oluşur. Lobüller arasında içinde küçük vasküler yapılar bulunduran fibröz bantlar olabilir. Sellülarite normal kıkırdağa ve enkondroma göre hafif daha fazladır. Nükleus küçük, kondanse, hiperkromatik, monoton görünümündedir. Nükleuslarda yer yer belli belirsiz nükleolus, gevşek kromatin paterni ve binükleasyon izlenebilir. Mitoz gözlenmez. Matriks baskın hiyalin yer yerde mukoid ve miksoid karakterde olabilir. Nekroz görülebilir. Enkondral tipte ossifikasyon enkondroma göre daha az oranda izlenir. Tümörde tipik olarak endosteal erozyon, lameller kemik trabekülleri arasına sızma şeklinde yayılım ve en az üç tarafı tümöral kıkırdakla çevrilmiş lameller kemik olarak tanımlanan tuzaklanmış kemik ile karakterli infiltratif büyüme paterni izlenir (3,26,27).

Kondrosarkom, derece 2-3:

Histomorfolojik olarak lobüler tarzda düzenlenen, büyük oranda miksoid değişiklik gösteren hiyalen kartilajinöz matriks ile karakterlidir. Derece 1 KS'ye göre oldukça sellülerdir. Tümör hücreleri büyüklük farklılıkları göze çarpan, bir kısmı açık kromatinli nükleuslar içerir. Mitoz izlenir. İnfiltratif davranış daha belirgindir (3,21,27).

Derece 2 KS, derece 1 KS'den daha sellüler olması, nükleer atipinin varlığı, hiperkromazi, miksoid değişiklik ve mitoz varlığı ile ayrılır. Derece 3 KS çok daha sellüler ve daha pleomorfik hücreler içerir, matriks çok daha miksoittir. Mitoz kolaylıkla görülür. Hücreler periferde daha miksoid olan matriks içinde iğsi karakterde ve daha az diferansiyedir. Tümör sıklıkla korteksi destrükte eder (21,25–27).

Ayrıca tanıda derece 1 KS için enkondrom, yaygın kartilajinöz diferansiyasyon gösteren fibröz displazi, kırık kallusu, sinoviyal kondromatozis; derece 2-3 KS'ler için kondroblastik osteosarkom ve yerleşim yeri kafa tabanı olanlarda kordoma öncelikli olarak akla gelmelidir (3,28–30).

Histopatolojik olarak derece 1 KS'nin enkondrom ile ayrımında sellülaritenin hafif daha fazla olması, trabeküler mesafeye infiltrasyon şekli ve tuzaklanmış kemikleri görmek yardımcı olsa da, el-ayak lokalizasyonlu tümörlerde yerleşim alanı dar olduğu için sellülaritenin beklenilene oranla fazla olması, yalancı kemik tuzaklanmaları ve infiltratif görünüm yanıltıcı olabilir (3,25,27). Radyolojik olarak da yine benzer şekilde bu lokalizasyonlarda kortikal inceltme ve yeniklik izlenebilmektedir (14,31). Ayrıca sınırlı eksizyon materyellerinde yeterli histolojik bilgi elde edilemeyeceği için ayırım yapmak imkânsız olabilir.

Literatürde immünohistokimyasal olarak bu iki tümörü güvenle ayırmanın sağlayacak biyobelirteç mevcut değildir. Sonuç olarak günümüzde iki tümörün ayırımı klinik, radyolojik ve patolojik olarak multidisipliner bir yaklaşım ile verilmektedir (1).

Kondroblastik osteosarkom, histopatolojik olarak kartilajinöz özellikler içermesi nedeni ile santral derece 3 KS ile ayırıcı tanıya girmekte ancak hasta yaşı, tümörün yerleşim yeri ve periost reaksiyonu gibi klinik ve radyolojik bulgular eşliğinde ayırım yapılabilir (3).

Kafa tabanı yerleşimli KS'lerde, kordomanın kondroid alt tipinin ayırıcı tanıda akla gelmesi ve iki tümörün ayrımının yapılması gerekir. *Brachury* ile yapılan immünohistokimya çalışmasında tümör hücrelerinde boyanma olması, kordoma olmaması, KS lehinedir.

Halen kemoterapi ve radyoterapiye dirençli olduğu bilenen klasik KS'lerde tek tedavi seçeneği cerrahidir. Cerrahi prosedürün şekli tümörün histolojik derecesi ve anatomik yerleşimine göre değişir. Derece 1 KS'lerde tedavi güvenli cerrahi sınırlar ile eksizyon ve/veya lokal adjuvan tedavidir. Derece 2-3 KS'ler de ise güvenli cerrahi sınırlar ile geniş rezeksiyon yapılır (5,30,32).

KS'lerde 10 yıllık yaşam beklentisi derece 1 için %89-95, derece 2 için %58-86, derece 3 için %0-55'dir (33).

Derece 1 KS'lerde tedavi sonrası rekürrens oranı %1,4-13,3; metastaz oranı ise %0,7'dir. Derece 2 KS'lerde lokal rekürrens oranı %19, metastaz oranı %10-30; derece 3 KS'lerde lokal rekürrens oranı %26, metastaz oranı %32-71'dir (2,33).

KS'lerde prognozu en çok etkileyen histolojik derece ve pelvik yerleşimdir (2).

2.2. Enkondrom

Benign ve kıkırdak matriks üreten enkondrom, kemik tümörlerinin %10-25'ini kapsamaktadır. Genellikle asemptomatik olduğu için başka nedenlerden dolayı radyolojik inceleme yapılan hastalarda insidental farkedilmekte ve bu nedenle gerçek insidansı tam bilinmemektedir (1,28). Medüller yerleşim gösteren tümör, genellikle el ve ayaklarda daha az sıklıkta da uzun tübüler kemiklerde ve nadiren de yassı kemiklerde izlenmektedir (1,3,25). Büyüme plağındaki kondrositlerin yer değişikliği, düzensiz proliferasyonu ve terminal farklılaşmasındaki kusurlar, enkondromun oluşumuna rol almaktadır (34). Çoğunlukla soliter olmakla birlikte sendromlara (Ollier ve Maffucci sendromları vs.) eşlik eden çoklu odaklar halinde de görülebilmektedir. Klinik olarak genellikle asemptomatiktir ve insidental olarak fark edilir. Semptomatik vakalar da şişlik ve/veya patolojik kırık izlenebilir. Herhangi bir yaşta görülebilmekle birlikte 30-40 yaş aralığında sıklığı daha fazladır (7,13). Görüntülemelerde genellikle 5 cm'den küçük, metafiz ve/veya metafizodiafizer yerleşimli, iyi sınırlı, litik değişiklikler ve kalsifikasyon gösteren, lobüler büyüme

paternine sahip, kortekste incelmeye neden olan görünüme sahiptir. Radyolojik olarak derece 1 KS ile örtüşen özellikler gözlenebilir ve ayırt etmek oldukça güçtür (35–37).

Enkondromatozisin birkaç farklı alt tipi mevcut olup Ollier ve Maffucci sendromları en yaygın olanlarıdır. Metakondromatozis, genokondromatozis, spondiloenkondrodisplazi, dispondiloenkondromatozis ve keirospondiloenkondromatozis ise daha nadirdir. Çoğu kalıtsal değilken bazıları otozomal dominant veya otozomal resesif olarak ortaya çıkar. Olgular çocukluk döneminde tanı alır. KS'ye progresyon soliter enkondroma göre daha erken yaşta gelişmekte ve risk soliter enkondromda %4,2, çoklu enkondromlu vakalarda %6,6-50 arasındadır. Özellikle hemanjiomların da eşlik ettiği Maffucci sendromunda bu oran daha da fazladır. Histopatolojik olarak değerlendirilirken sellülarite ve atipinin soliter enkondroma göre daha fazla olabileceği akılda tutulmalıdır (28,38,39).

Soliter enkondromlu vakaların %50'sinde, enkondromatozisli vakaların %92'sinde IDH1-2 geninde heterozigot somatik mutasyon izlenmiştir (21,38).

Mikroskopik olarak, intramedüller mesafede, lobüler tarzda düzenlenim gösteren, yaygın hiyalen matrikse sahip bir stromada, eozinofilik sitoplazmalı monomorfik lenfosit benzeri hiperkromatik hücrelerden oluşan, hücreden fakir tümöral gelişim izlenir. Sitolojik atipi ve mitoz gözlenmez. Lobüller arasında içinde küçük çaplı vasküler yapılar içeren fibröz septalar izlenebilir. Tümör lobülleri arasında yerel kemik izlenebilir ancak tümör infiltratif ve kemiği yıkıcı yayılım göstermez. Kıkırdak lobüllerinde periferik/enkondral ossifikasyon sık izlenir (3,25).

Ayrıcı tanıya derece 1 KS girmektedir. Özellikle el ve ayak yerleşimli tümörlerde mikroskopik olarak derece 1 KS ile birbiri ile örtüşen (sellülarite, yalancı permeatif infiltrasyon, miksoid değişiklik vs.) özellikler olması nedeni ile birçok vakada ayırım yapılamaz. Nihai karar klinik, radyolojik ve histomorfolojik yaklaşım ile multidisipliner olarak verilir (6,28,40).

Tedavi asemptomatik vakalarda izlem, semptomatik vakalarda eksizyondur. Lokal rekkürrens beklenen bir durum olmayıp malign dönüşüm (özellikle uzun tübüler kemik yerleşimlilerde) nadirde olsa izlenebilmektedir (38,39,41–43).

2.3. İmmünohistokimyasal Belirteçler

Günlük uygulamada, ayırt edici morfolojik özelliklerin varlığı kondroid neoplazmların bir kısmının teşhisi için yeterli olmakta ve immünohistokimya kullanımını ortadan kaldırmakta; bununla birlikte, bazı durumlarda KS ile diğer neoplazmaları ayırt etmek için ayırıcı tanı araçlarını kullanma ihtiyacı olmaktadır.

Yüksek dereceli klasik KS, dediferansiye KS, mezenkimal KS, berrak hücreli KS gibi kondroid matriksin sınırlı ya da diferansiyasyonun az olduğu tümörlerde kondroid orjini belirlemede S100 ve SOX9 (*SRY-box transcription factor 9*), antikoru ile yapılan immünohistokimyasal çalışma faydalı olmaktadır (1,3).

2.3.1. S100

S100 intrastioplazmik kalsiyum bağlayıcı proteindir. İmmünohistokimyasal olarak sitoplazmik-nükleer boyanma sergileyen bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Normal dokuda nöronları, schwann hücrelerini, melanositleri, glial hücreleri, miyoepitelyal hücreleri, adipositleri, langerhans hücreleri, dendritik hücreleri, kondrositleri ve notokordal hücreleri boyar. Histopatolojik olarak sinir kılıfı tümörleri, melanom, notokordal tümörler, kondrojenik tümörlerde S100 ile boyanma izlenir (44,45).

2.3.2. SOX9

Bir transkripsiyon faktörü olan SOX9, kemik, kıkırdak, testis, kalp, akciğer, pankreas, bağırsak ve sinir sistemi dahil olmak üzere birçok organın gelişimi için gereklidir. Kıkırdak farklılaşmasında hassas bir belirteçtir (46,47).

İmmünohistokimyasal çalışmada nükleer boyanma göstermektedir. Normal dokuda beyin, kolon, mide, safra kesesi, prostat, tükürük bezi, tiroid, testis ve kıkırdak hücrelerinde boyanma izlenmektedir. Histopatolojik olarak kondroid tümörlerin bir kısmı, Ewing sarkomu ve sinoviyal sarkomda SOX9 ile boyanma izlenir (45,48,49).

Hem S100 hemde SOX9 enkondrom ve derece 1 KS de pozitifdir. Bu iki tümörün ayrımında fayda sağlayacak biyobelirteç araştırmaları yapılmaktadır. Literatürde bu yönde IDH-1/-2, AMACR, *leptin/adiponektin*, *Vascular endothelial growth factor -C (VEGF-C)*, *transforming growth factor-beta (TGF-β)* ve *bone morphogenetic proteins (BMPs)*, *sirtuin-1*, *survivin*, *sphingosine-1-phosphate*, *hotair*

ile çalışmalar yapılmış ancak iki tümörün ayrımını sağlayacak yönde anlamlı sonuç elde edilememiştir (50–52).

2.3.3. Periostin

İlk defa *osteoblastic specific factor-2* adı ile osteoblast hücrelerinde keşfedilen, bir ekstraselüler matriks proteini olan periostin, 90 kDa ağırlığında ve 896 aminoasitten oluşmaktadır (53). Adını kemik periostiumundan alsada kemik yanı sıra aort, mide, alt gastrointestinal sistem, plasenta, uterus, tiroid dokusu ve meme gibi organlarda da yüksek oranda üretilmektedir (54–56).

Fizyolojik olarak özellikle ontogenez sırasında ve erişkinde mekanik stimülasyon varlığında (kalp kapakçıklarında, deride, periodontal ligamentlerde, kemiklerde) eksprese edilmektedir. Osteosit ve periostiumda yüksek miktarda üretilen periostin, kemik homeostazında yer alan hormonlar, büyüme faktörleri (TGF- β , BMP2) ve sitokinler (TNF- α , IL-4, IL-13, PDGF) tarafından kontrol edilmektedir (57–59).

Periostinin iki önemli görevi matrikste fibrilogenезis ve hücre hareketidir. Fibrogenезisi direkt olarak tip I kollajen, fibronektin, Noct 1, tenascin-C ve BMP-1 etkileşimi ile yapar. İntegrin aracılı yol ile de aktin/miyozin kasılmasını aktive ederek hücre adezyon ve hareketini sağlar (57,60).

Periostin, meme, akciğer, baş-boyun ve kolon kansinomları gibi birçok tümörde *cancer-associated fibroblasts* (CAF) olarak bilinen, tümörde salgıladığı birçok faktör ile tümör büyümesini sağlayan, ancak kendisi bir tümör hücresi olmayan bu hücreler tarafından salgılanmaktadır. Periostinin tümör mikroçevresinde eksprese edildiği ve bunun özellikle kansinomlarda çok iyi tanımlandığı bilinmekte tümörde hücre proliferasyonu, anjiogenезis, invazyon ve metastazda rol almaktadır (42,61–64). Tümör hücrelerindeki bu rolünü integrin reseptörleri (α V β 3 ve α V β 5 reseptörleri) aracılığı ile yapmaktadır.(53) Uyarılan hücrede: a) Tirozin kinaz reseptörleri (EGFR, VGEF) ile etkileşime, b) Bir taraftan AKT/PKB ve FAK ilişkili sinyal yollarını aktivasyonu diğer yandan PİP3 ve/veya AKT aracılığı ile GSK3 β -WNT β katenin yolağı ana inhibitörü- inhibisyonuna, c) PTEN- β katenin degradasyon aktivatörü- blokajı ile β katenin degradasyonunun azalmasına ve d) AKT fosforilasyonu aracılığı ile mTOR sinyalini aktifleşmesine neden olur. Tüm bu etkileşimin sonuncunda

hücrede apoptoz, diferansiyasyon, migrasyon ve yaşam siklusu kontrol edilir (57,61,65–67).

Periostin aynı zaman da klinik evresine göre miktarı değişen oranda KS’lerde de salgılanmaktadır (68). Jeong J. ve arkadaşlarının periostinin KS’lerdeki rolünü değerlendirmeye yönelik yaptığı çalışmada, periostinin KS hücrelerinde proliferasyonu, hareketi ve yapının korunmasına pozitif yönde etki ettiği yanı sıra lenfatik endotel hücrelerinde proliferasyon ve harekete yardımcı olduğunu bulmuşlardır (69).

2.3.4. PEG10

Paternally expressed gen 10 (PEG10) ilk defa 2001 yılında Ono R. ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir (70). Retrotranspozan ailesinden olan PEG10, 7. kromozom (7q21.3) üzerinde lokalize ve paternal eksprese olan imprinted gendir. Transkripsiyon faktörü olarak görev yapmaktadır (70). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada PEG10’nun plasenta oluşumunda ve adiposit diferansiyasyonunda rol aldığı, yokluğunda embriyoda ölüme neden olduğu gözlenmiştir (71–73). PEG10 plasenta, over, testis, beyin, böbrek ve akciğerde önemli düzeyde eksprese edilmektedir (70,71). Ekspresyonundaki bozukluklar hücre proliferasyonu, apoptozis ve malignensi gelişimi ile ilişkili sorunlara neden olmaktadır (70,74).

PEG10’nun birçok tümör çeşitinde eksprese edildiği bulunmuştur. Bu kanserlerden bazıları hepatoselüler karsinom, meme kanseri, pankreas karsinomu, prostat nöroendokrin karsinomu, safra kesesi karsinomu, kolon karsinomu, B hücreli akut lenfoblastik lösemi, kondrosarkomdur (75–82).

Yapılan birçok çalışmada PEG10’nun tümörlü hastalarda prognoz ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Li X. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada meme kanserinde PEG10’nun önemli ölçüde eksprese edildiği hücre proliferasyonuna, klon formasyonuna, hücre siklusuna, hücre hareketine ve invazyonuna pozitif yönde etki ettiği görülmüştür (81).

Ge H. ve arkadaşlarının Asya kıtasında PEG10’nun solid tümörler ile ilişkisini göstermeye yönelik yaptığı 1014 vakayı içine alan meta analizinde, PEG10 aşırı ekspresyonunun kanser riski, diferansiyasyon, lenf nodu metastazı ve TNM evresi ile korele olduğu sonucuna varılmıştır (83).

Xie T. ve arkadaşlarının PEG10 tümörler üzerindeki rolü ile alakalı yaptığı bir derlemede tümör hücrelerinde proliferasyonun artışı, hücre apoptozunun engellenmesi ve metastaz da PEG10'nun etkisi olduğu ve bu fonksiyonları tümörden tümöre değişen yolaklar ile yaptığı ayrıntılı olarak izah edilmiştir (74).

Yahiro Y. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, PEG10, KS hücrelerinde hücre büyümesi ve proliferasyonu üzerine inhibitör ve hücre hareketi üzerine aktivatör etkisi olan TGF B sinyal yolağını, bu yolak üzerinden kullandığı reseptörler ile tersine çevirdiği gösterilmiştir (84).

Benzer konu üzerine Shinohara N. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada PEG10 ekspresyonunun encondromlarda belirgin, KS'lerde ise derece yükseldikçe azaldığı tespit edilmiştir (79).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olgu Seçimi

Çalışmamızda 2005-2021 yıllarına ait Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda rapor edilmiş enkondrom ve derece 1 KS tanısı almış hastaların tamamı çalışmaya dahil edildi. Hastalar, *Nucleus* sistemi içinde, patoloji raporlarına yönelik özel bir istatistik programı ile taratıldı.

Çalışmaya başlamadan önce Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurul onayı alındı (15.11.2021- ve B.30.2.ODM.0.20.08/639-685sayılı).

Bu çalışma için Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından PYO.TIP.1904.22.005 proje kodu ile finansal destek alındı.

Seçilen hastalara ait preparatlar tekrar değerlendirildi ve immünohistokimyasal çalışma için uygun preparatlar tespit edildi. Seçilen preparatların blokları, blok arşivimizden çıkartılıp mikrotom cihazları kullanılarak 4 mikronluk kesitler alındı. Alınan kesitlere immünohistokimyasal boyama cihazı kullanılarak periostin ve PEG10 ile immünohistokimyasal çalışma yapıldı.

Boyama sonuçları iki patolog tarafından (Prof. Dr. Yakup Sancar Barış ve Arş. Gr. Dr. Fatma Kutsal) ışık mikroskobunda çift kör olarak boyanma varlığı/yokluğu, şiddeti ve yüzdesi göz önüne alınarak semikantitatif olarak değerlendirildi.

3.2. İmmünohistokimya Boyama Yöntemi ve Değerlendirilmesi

Seçilen 118 adet olguya ait dokuların tümü önce tamponlanmış %10'luk nötral formalin solüsyonunda uygun sürede tespit edildi. Sonra %20'lik formik asitte 12-18 saat dekalsifiye edilerek parafinde bloklandı. Çalışılan olguların en iyi histomorfolojiyi temsil etmesine ve seçilen blokların kesit alındığında dokunun bitmeyecek şekilde yeterli olmasına dikkat edildi.

Seçilen bloklardan 4 mikron kalınlığında kesitler alındı. Etüvde 60°C'de 40 dakika deparifinize edildi. Ardından otomatik boyama cihazında periostin (EPR20986, ab215199, abcam), PEG10 (EPR20051, ab215035, abcam) primer antikorları ve kromojen olarak DAB (Roche, ultraView Universal detection kit) kullanarak laboratuvarımız da bulunan otomatik immunohistokimya cihazında (Ventana, BenchMark, Ultra) boyama yapıldı.

Boyanmayı sağlamak ve daha anlamlı boyanma elde edebilmek için antijen açığa çıkarma prosedürleri (tampon solüsyonu, kaynatma süresi, kaynatma sıcaklığı ve antikor boyanılabilirliği (inkübasyon süresi, dilüsyon oranı) prosedürlerinde değişiklikler yapılarak farklı kombinasyonlarda protokoller uygulandı. Bunlar:

Protokol 1. Tampon: EDTA, retrieval aşaması kaynatma süresi: 64 dakika, sıcaklık: 95 °C, antikor inkübasyon süresi: 1 saat, dilüsyon 1/500, PEG10 (Şekil 3)

Protokol 2. Tampon: EDTA, retrieval aşaması kaynatma süresi: 64 dakika, sıcaklık: 95 °C, antikor inkübasyon süresi: 2 saat, dilüsyon 1/500 PEG10 (Şekil 4)

Protokol 3. Tampon: EDTA, retrieval aşaması kaynatma süresi: 76 dakika, sıcaklık: 95 °C, antikor inkübasyon süresi: 2 saat, dilüsyon 1/1000 (periostin), 1/500 (PEG10) (Şekil 5)

Protokol 4. Tampon: EDTA, retrieval aşaması kaynatma süresi: 72 dakika, sıcaklık: 97 °C, antikor inkübasyon süresi: 1 saat 56 dakika, dilüsyon 1/1000 (periostin), 1/500 (PEG10) (Şekil 6)

Protokol 5. Tampon: Sitrat, retrieval aşaması kaynatma süresi: 44 dakika, sıcaklık: 95 °C, antikor inkübasyon süresi: 2 saat, dilüsyon 1/1000 (periostin), 1/500 (PEG10) (Şekil 7)

Protokol 6. Tampon: Sitrat, retrieval aşaması kaynatma süresi: 44 dakika, sıcaklık: 99 °C, antikor inkübasyon süresi: 2 saat, dilüsyon 1/1000 (periostin), 1/500 (PEG10) (Şekil 8)

Protokol 7. Tampon: Sitrat, retrieval aşaması kaynatma süresi: 44 dakika, sıcaklık: 95 C, antikor inkübasyon süresi: 2 saat, endojen proteaz, dilüsyon 1/1000 (periostin), 1/500 (PEG10) (Şekil 9)

Protokol 8. Tampon: EDTA, retrieval aşaması kaynatma süresi: 64 dakika, sıcaklık: 95 °C, antikor inkübasyon süresi: 1 saat, dilüsyon 1/500 (periostin), 1/250 (PEG10) (Şekil 10)

Protokol 9. Tampon: Sitrat, retrieval aşaması kaynatma süresi: 10 dakika (düdüklü tencere ile), antikor inkübasyon süresi: 1 saat, dilüsyon 1/1000 (Bu ptorokol tamamen elde boyama ile gerçekleştirilmiştir) (Şekil 11)

Sonuçlar Olympus BX51 (Olympus, USA, 1999) ışık mikroskobu ile değerlendirildi.

İmmünohistokimyasal çalışma yapılan tüm kesitler iki gözlemci tarafından değerlendirildi.

Periostin için mide dokusu, PEG 10 için insan plasenta dokusu pozitif kontrol olarak kullanıldı. Negatif kontrol çalışmasında primer antikor yerine non-immün serum kullanıldı.

İmmünohistokimyasal değerlendirme pozitif olarak boyanmış hücrelerin yüzdesi (0: %0, 1: %1–24, 2: %25–49, 3: %50–74 ve 4: %75–100 pozitif) ve boyanma yoğunluğu (0: Negatif, 1: Zayıf, 2: Orta ve 3: Güçlü yoğunluk) incelendi. Yüzdenin toplam puanı ve pozitif boyama yoğunluğu istatistiksel olarak analiz edildi.

3.3 İstatistiksel Yöntemler

İstatistiksel değerlendirmeler bilgisayar ortamında ‘SPSS 15.0 for Windows’ yazılımı ile yapıldı. Boyanma frekanslarının gruplar arasındaki farkı çapraz tablo istatistikleri ile değerlendirildi.

4. BULGULAR

91 tane enkondrom ve 27 tane derece 1 KS tanısı almış toplam 118 adet vaka çalışmaya dahil edildi.

Çalışmaya dahil edilen 91enkondrom vakasının 50'si kadın ve 4'ü erkek; 27 derece 1 KS vakasının 10'u kadın ve 17'si erkektir (Tablo 2).

Tablo 2. Enkondrom ve derece1 kondrosarkom olgularının cinsiyete göre dağılımı.

	Kadın	Erkek	Toplam
Enkondrom	50	41	91
Derece 1 kondrosarkom	10	17	27

Tüm enkondrom vakalarında yaş ortalaması 45,5 olup bunların cinsiyete göre ortalaması kadınlarda 45, erkeklerde 46'dır. Tüm derece1 KS vakalarında yaş ortalaması 52,5 olup bunların cinsiyetlere göre ortalaması kadınlarda 50, erkeklerde 55'tir (Tablo 3).

Tablo 3. Enkondrom ve derece1 kondrosarkom olgularının genele ve cinsiyete göre yaş ortalamaları

	Kadın	Erkek	Ortalama
Enkondrom	45	46	45,5
Derece 1 kondrosarkom	50	55	52,5

Enkondrom vakalarının 46'sı el-falanks, 6'sı metakarpal, 1'i radius-ulna, 11'i humerus, 3'ü ayak-falanks, 20'si femur, 3'ü tibia-fibula ve 1'i vertebra yerleşimlidir. Derece-1 KS, vakalarının 5'i el-falanks, 1'i metakarpal, 6'sı humerus, 1'i ayak-falanks, 2'si femur, 5'i kosta, 4'ü vertebra, 1'i acetebulum ve 1'i sternum yerleşimlidir (Tablo 4).

Tablo 4. Enkondrom ve derece 1 kondrosarkom olgularının anatomik lokalizasyona göre dağılımı

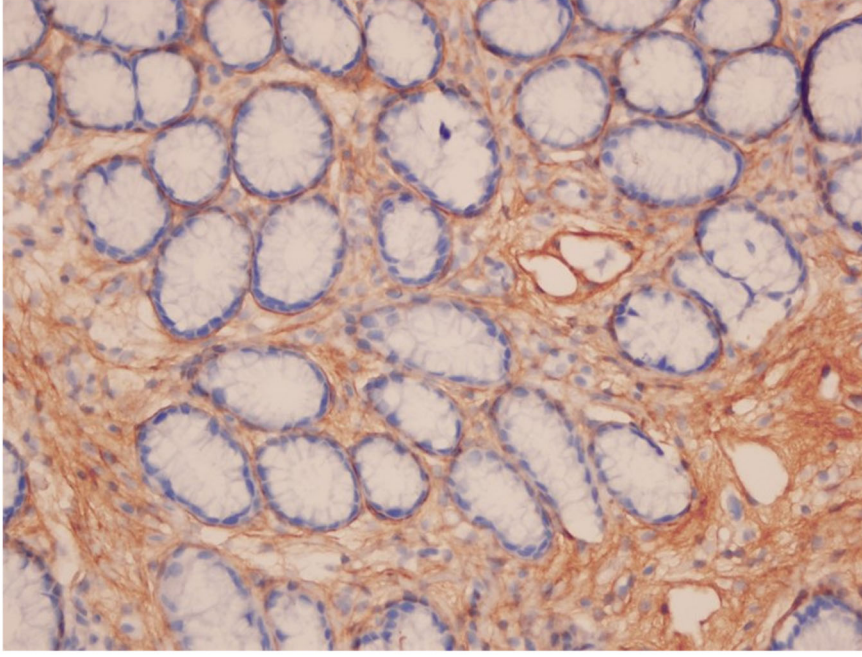
	El-flanks	Meta-karpal	Radius-ulna	Humerus	Ayak-falanks	Femur	Tibia-fibula	Kosta	Vertebra	Aceta-bulum	Sternum	Toplam
Enkondrom	46	6	1	11	3	20	3	0	1	0	0	91
Derece-1 kondrosarkom	5	1	0	6	1	2	1	5	4	1	2	27

91 enkondrom vakasında takibi yapılabilen 34 vakadan sadece 1 tanesinde nüks izlenmiştir. 27 derece 1 KS vakasında takibi yapılabilen 14 vakanın 4'ünde nüks izlendi (Tablo 5).

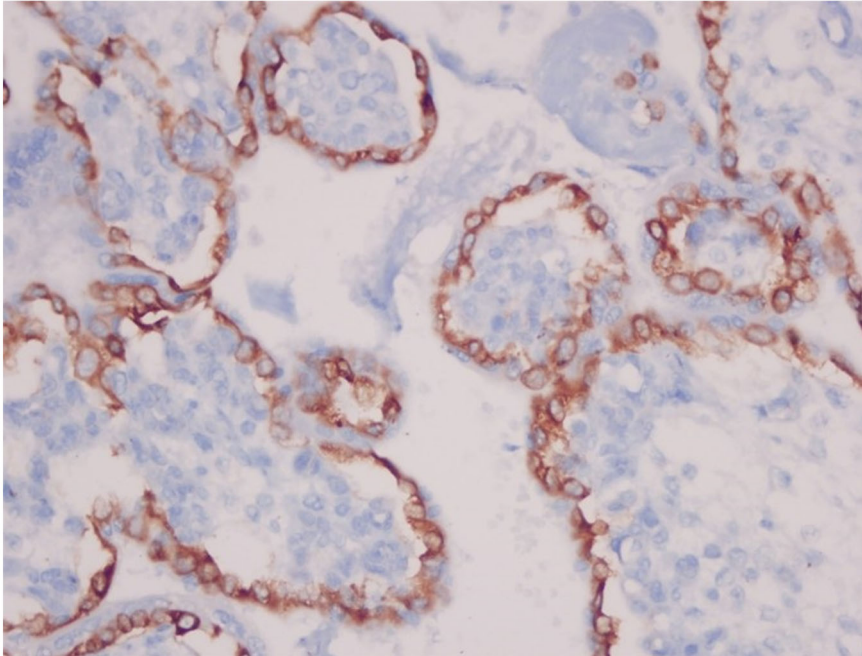
Tablo 5. Enkondrom ve derece1 kondrosarkom olgularının tedavi sonrası nüks oranı

			Vaka sayısı	Vaka yüzdesi
Nüks	Var	Enkondrom	1	2,9
		Derece 1 kondrosarkom	4	28,5
	Yok	Enkondrom	33	97,3
		Derece 1 kondrosarkom	10	71,5

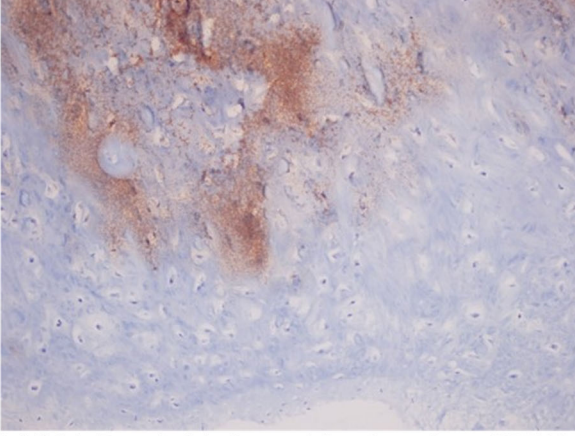
Periostin antikoru için mide mukozası ve PEG 10 antikoru için plasenta ile yapılan kontrol çalışmasında anlamlı/pozitif boyanma elde edildi (Şekil 1-2). Daha sonra enkondrom ve KS vakaları otomatik boyama cihazında boyamaya alındı. Değerlendirilen tüm vakalarda kıkırdak matriks ve yumuşak dokuya sınırlı artifisyonel spesifik olmayan boyanmalar gözlemlendi. Hücre bazında anlamlı boyanma izlenmedi (Şekil 3-12).



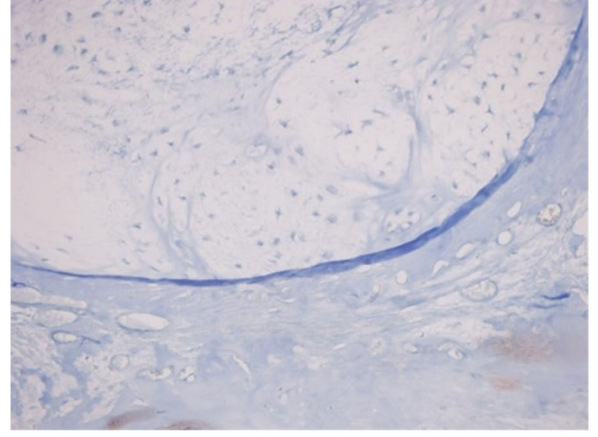
Şekil 1. Kontrol doku (mide mukozası), periostin antikoru, DAB, x200



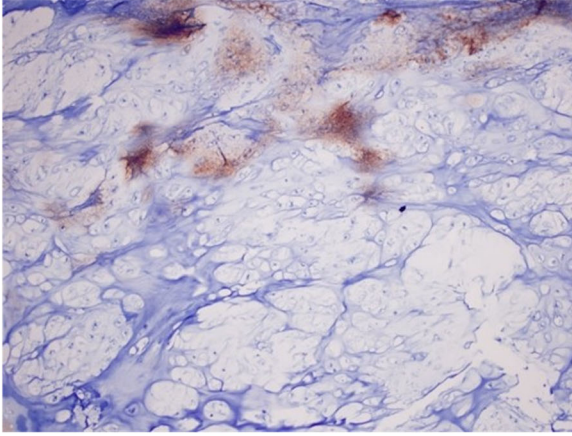
Şekil 2. Kontrol doku (plasenta), PEG10 antikoru, DAB, x400



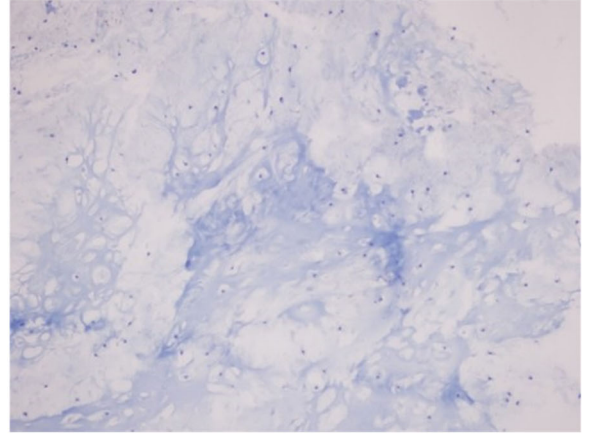
Şekil 3A. Protokol 1, derece 1 kondrosarkom, PEG10 antikor, DAB, x200



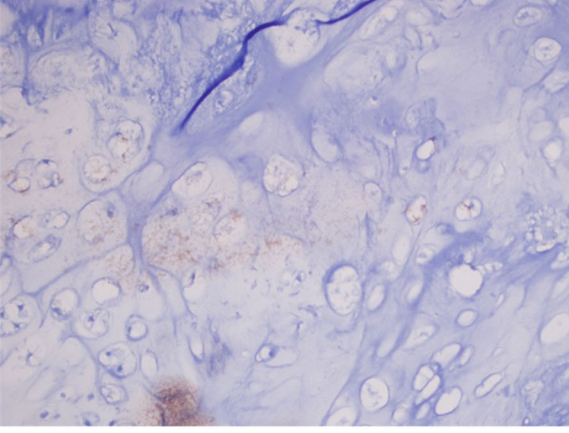
Şekil 3B. Protokol 1, enkondrom, PEG10 antikor, DAB, x200



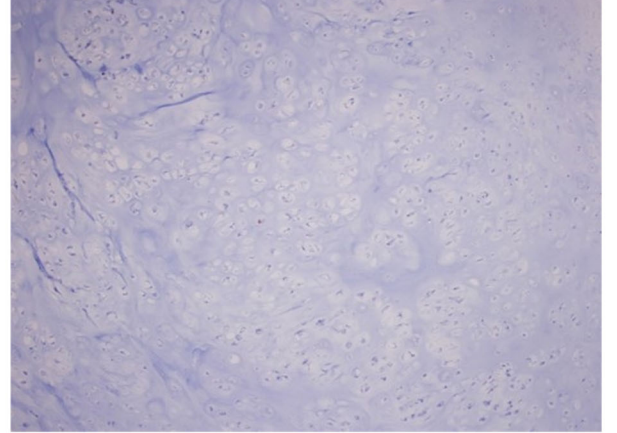
Şekil 4A. Protokol 1, derece 1 kondrosarkom, periostin antikor, DAB, x200



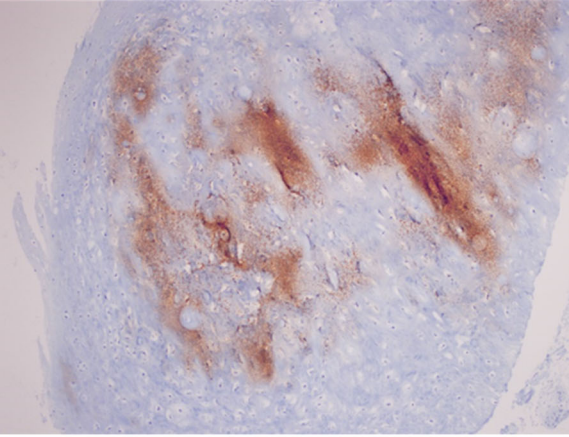
Şekil 4B. Protokol 1, enkondrom, periostin antikor, DAB, x200



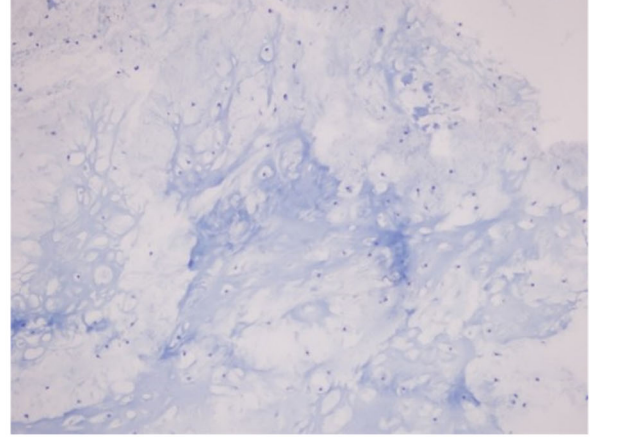
Şekil 5A. Protokol 3, derece 1 kondrosarkom, periostin antikoru, DAB, x200



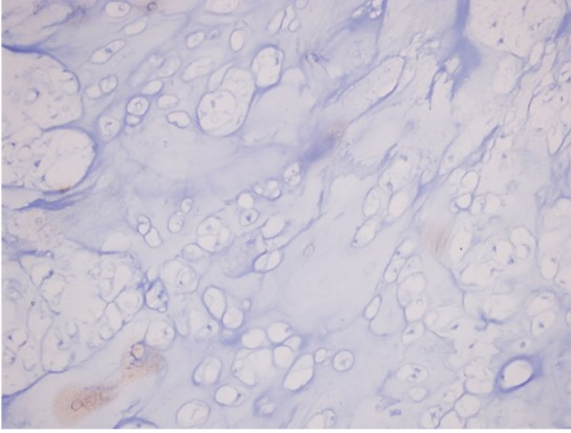
Şekil 5B. Protokol 3, enkondrom, periostin antikoru, DAB, x200



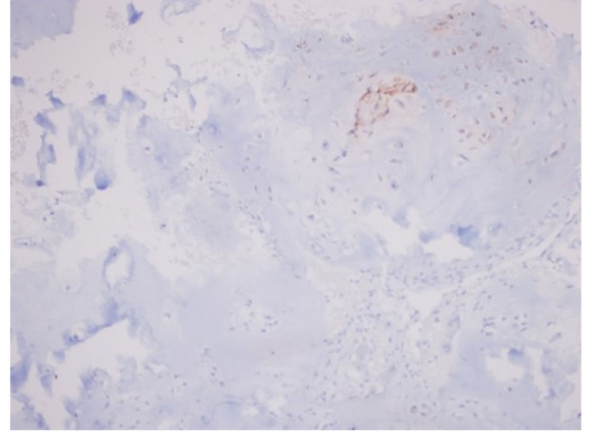
Şekil 5C. Protokol 3, derece 1 kondrosarkom, PEG10 antikoru, DAB, x100



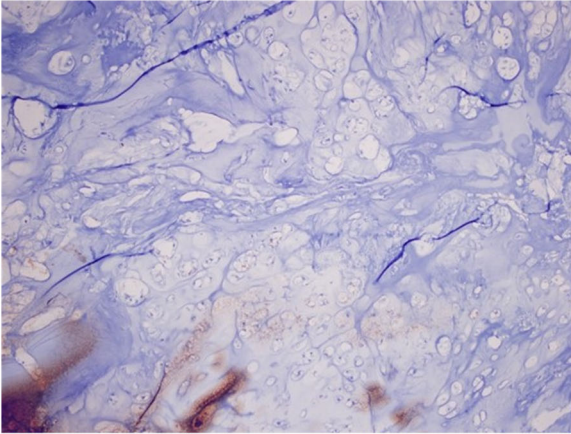
Şekil 5D. Protokol 3, enkondrom, PEG10 antikoru, DAB, x200



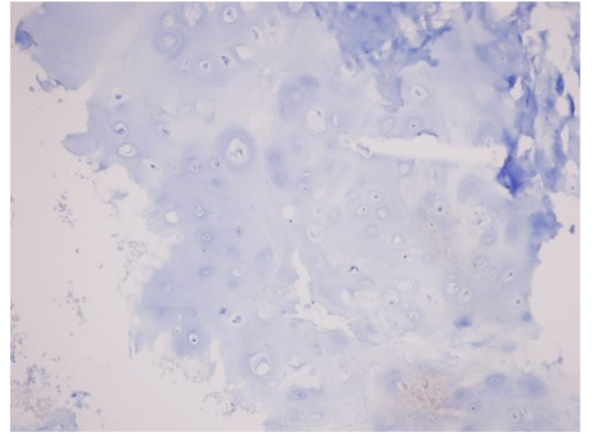
Şekil 6A. Protokol 4, derece 1 kondrosarkom, periostin antikor, DAB, x200



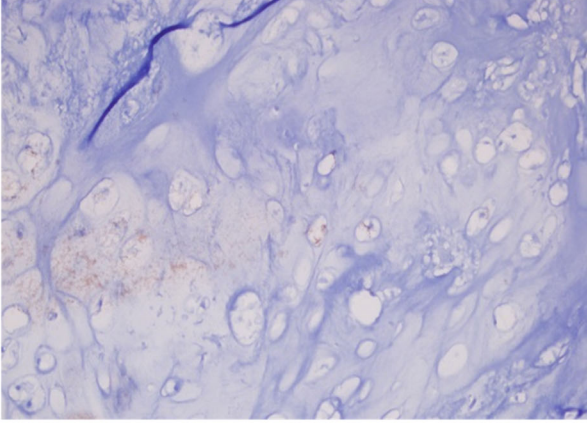
Şekil 6B. Protokol 4, enkondrom, periostin antikor, DAB, x200



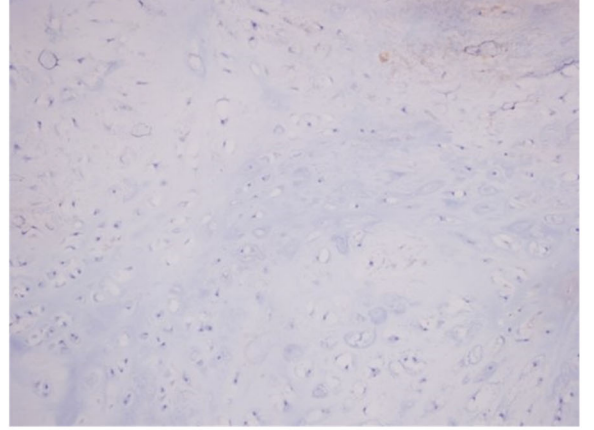
Şekil 6C. Protokol 4, derece 1 kondrosarkom, PEG10 antikor, DAB, x200



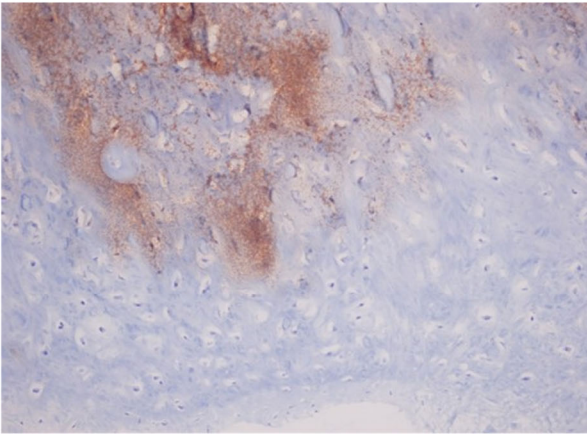
Şekil 6D. Protokol 4, enkondrom, PEG10 antikor, DAB, x200



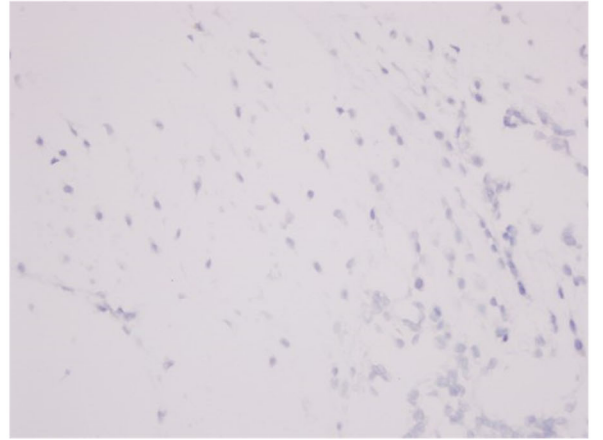
Şekil 7A. Protokol 5, derece 1 kondrosarkom, periostin antikorü, DAB, x200



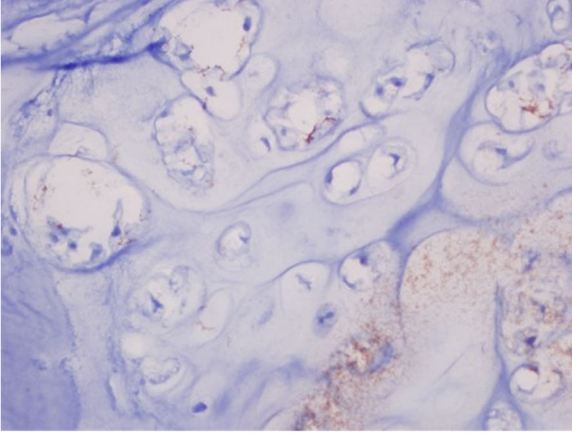
Şekil 7B. Protokol 5, encondrom, periostin antikorü, DAB, x200



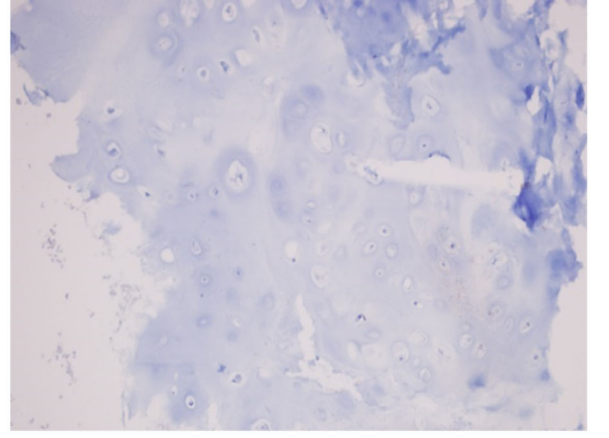
Şekil 7C. Protokol 5, derece 1 kondrosarkom, PEG10 antikorü, DAB, x200



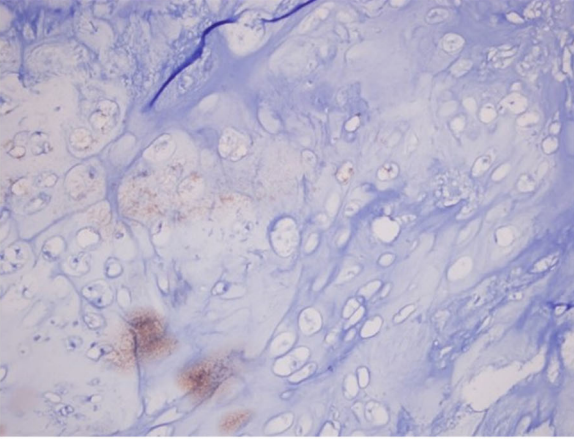
Şekil 7D. Protokol 5, encondrom, PEG10 antikorü, DAB, x200



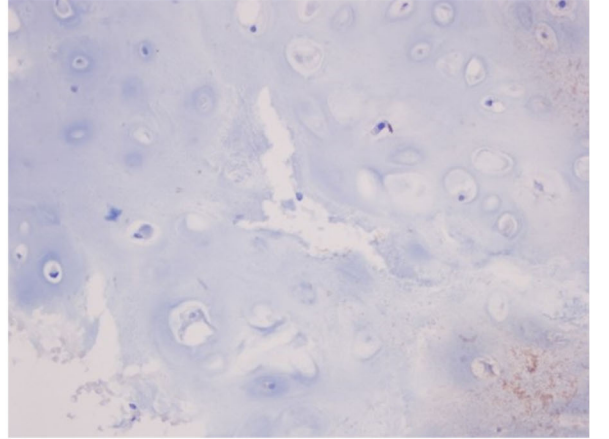
Şekil 8A. Protokol 6, derece 1 kondrosarkom, periostin antikorü, DAB, x400



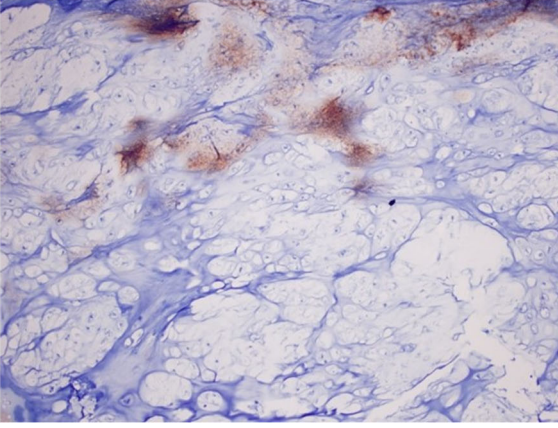
Şekil 8B. Protokol 6, enkondrom, periostin antikorü, DAB, x200



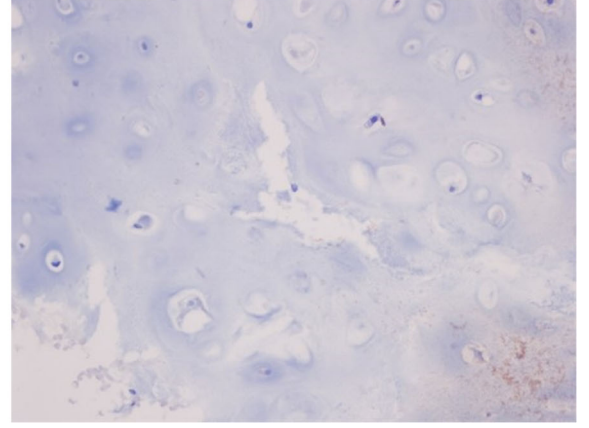
Şekil 8C. Protokol 6, derece 1 kondrosarkom, PEG10 antikorü, DAB, x200



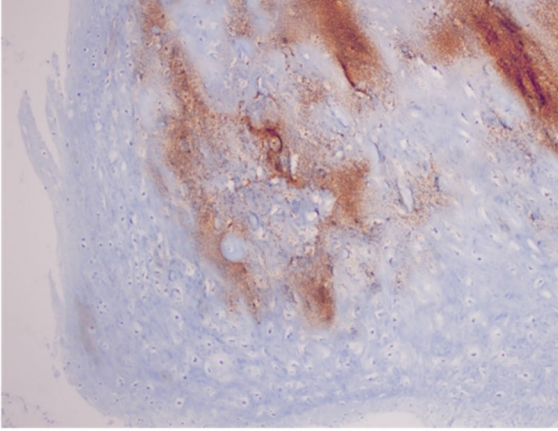
Şekil 8D. Protokol 8, enkondrom, PEG10 antikorü, DAB, x400



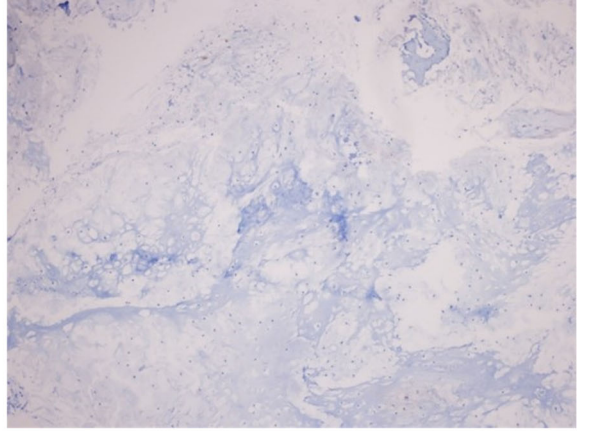
Şekil 9A. Protokol 7, derece 1 kondrosarkom, periostin antikoruna, DAB, x200



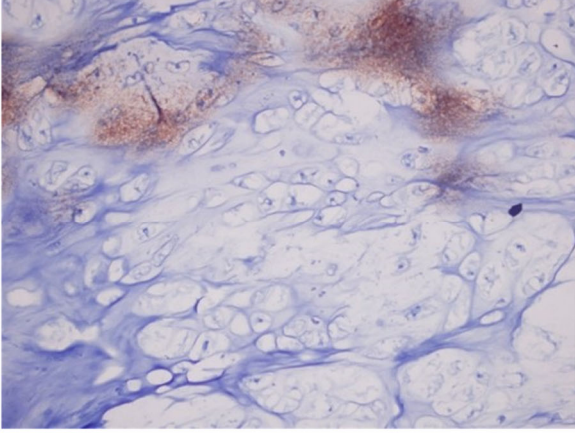
Şekil 9B. Protokol 6 enkondrom, periostin antikoruna, DAB, x400



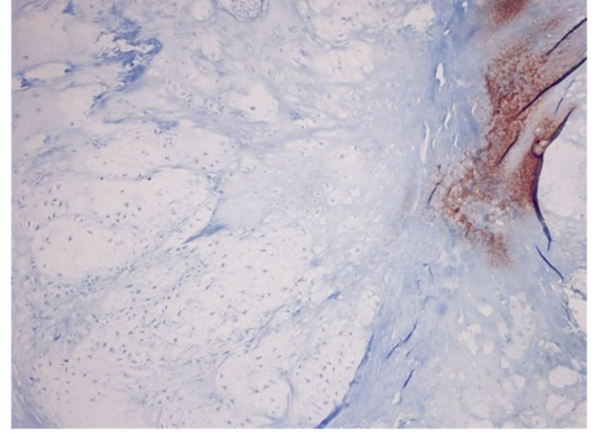
Şekil 9C. Protokol 7, derece 1 kondrosarkom, PEG10 antikoruna, DAB, x200



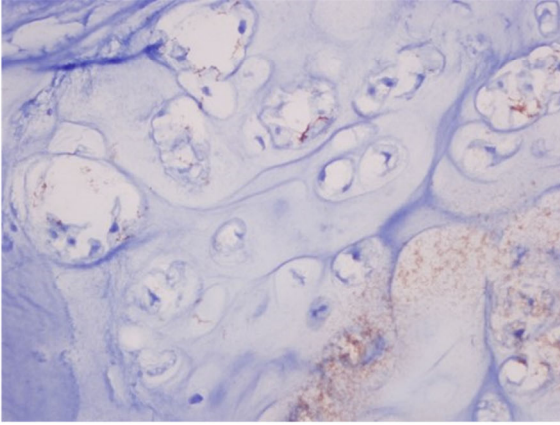
Şekil 9D. Protokol 7, enkondrom, PEG10 antikoruna, DAB, x200



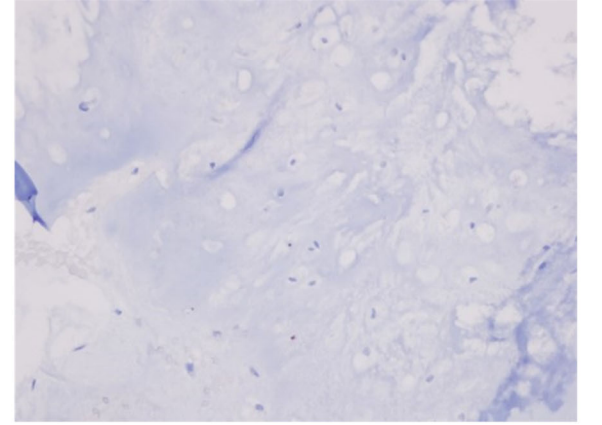
Şekil 10A. Protokol 8, derece 1 kondrosarkom, periostin antikor, DAB, x200



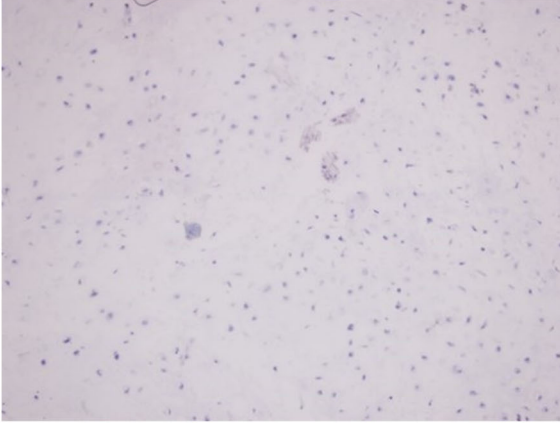
Şekil 10B. Protokol 8, derece 1 enkondrom, periostin antikor, DAB, x200



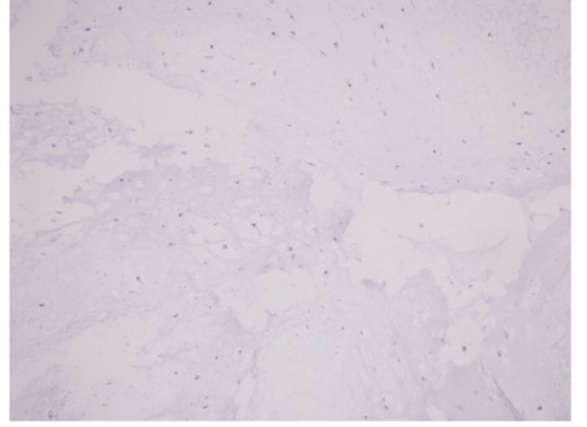
Şekil 10C. Protokol 8, derece 1 kondrosarkom, PEG10 antikor, DAB, x400



Şekil 10D. Protokol 8, enkondrom, periostin antikor, DAB, x200



Şekil 11A. Protokol 9, derece 1 kondrosarkom, periostin antikor, x200



Şekil 11B. Protokol 9, enkondrom, periostin antikor, x200

Otomatik boyama cihazında antijen kazanımı ve primer antikor boyama basamaklarında yapılan değişiklikler ile farklı kombinasyonlar oluşturularak farklı protokoller denendi. Denenen tüm protokollerde yine ilk yapılan uygulamalarda izlenen non-spesifik boyanmalar dışında anlamlı sonuç elde edilemedi.

Son olarak bilinen eski bir teknik olan yüksek basınç ve sıcaklık esasına dayanarak antijen açığa çıkarma yöntemi olan ev tipi düdüklü tence ‘pressure cooker’ tekniği ile elde boyama metodu denendi. Ancak yine anlamlı boyanma elde edilemedi.

PEG10 için antikor kiti için düdüklü tence metodu hariç diğer tüm protokoller periostin ile aynı şekilde uygulanmış ve benzer spesifik olmayan boyanmalar elde edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Derece 1 KS ve enkondrom, kemiğin kıkırdak matriks üreten iki tümörüdür. Derece 1 KS malign, enkondrom ise benigndir ve klinik, radyolojik ve histopatolojik olarak birbirinden ayrımı oldukça zordur (1,3,25).

Derece 1 KS geniş eksizyon veya rezeksiyon ile tedavi edilirken, enkondrom küretaj ile tedavi edilmekte ya da takip edilmektedir (32,43). Derece 1 KS'lerde progresyon ve dediferansiyasyon beklenirken enkondromlar da rekürrens ya da malign dönüşüm ihtimali oldukça düşüktür (7,33). Tedavi ve prognozları farklı olması nedeni ile bu iki tümörün ayrımı önemlidir. Birçok neoplazinin ayrımında immünohistokimyasal belirteçler kullanılabilmekteyken enkondrom ve derece 1 KS ayrımında kullanılabilecek bir biyobelirteç mevcut değildir. Bu çalışmada literatürde birkaç makalede de vurgulanmış olan periostin ve PEG10 biyobelirteçlerinin derece 1 KS ve enkondrom ayrımındaki yararı değerlendirilmiştir.

Enkondrom erkek ve kadınlarda eşit sıklıkta görülmekte, 3-4. dekatlarda ve en sık el-ayak kemiklerinde izlenmektedir. Çalışmamızda 91 enkondrom olgusunun 50'si kadın ve 41'i erkektir (1,3,25). Olguların genel yaş ortalaması 45,5 olup bu ortalama kadınlarda 45, erkeklerde 46'dır. En sık yerleşim yeri el-falankstır. Olgularımızdaki kadın baskınlığı dışındaki bulgular literatür ile uyumludur.

Derece 1 KS erkeklerde daha sık görülür. Geniş bir yaş aralığında [21-75] izlenmekte ve sıklıkla apendiküler kemiklerde yerleşim göstermektedir (1,3,25). Çalışmamızda 27 derece 1 KS olgusunun 10'u kadın ve 17'si erkektir. Genel yaş ortalaması 52,5 olup bu ortalama kadınlarda 50, erkeklerde 55'tir. En sık yerleşim yeri humerustur. Bulgular literatür ile uyumludur.

Enkondromda 1 olguda (%2,9), derece 1 KS da 4 olguda (%28,5) nüks izlenmiştir. Takibi yapılabilen olgu sayısı az olduğu için her iki tümörde oransal olarak yüksek çıkan nüksün geneli yansıtmadığı düşünülmüştür (2,30).

Yapılan çalışmada 27 derece 1 KS ve 91 enkondromun hiçbirinde gerek periostin gerekse de PEG10 ile boyanma olmamıştır; buna karşın kontrol dokuları tüm seferlerde boyanmıştır.

Literatürde periostinin enkondrom ve derece 1 KS ayırımında yararını araştıran iki çalışma mevcuttur. *Lai X.* ve arkadaşları periostin ile yaptıkları çalışmada 31 enkondrom olgusunun 4'ünde, 23 derece 1 KS olgusunun 14'ünde ekstraselüler matrikste boyanma elde etmişler ve derece 1 KS için periostinin %70 sensitivite ve %83 spesivite gösterdiğini bildirmişlerdir (68). *Kim D.* ve arkadaşlarının yaptığı diğer çalışmada 28 enkondrom olgusunun 27'sinde sitoplazmada birinde de sitoplazma ve ekstraselüler matrikste boyanma; 33 derece 1 KS olgusunun 31'inde sitoplazma ve ekstraselüler matrikste, ikisinde sadece sitoplazmada boyanma elde etmişler ve derece 1 KS için periostinin spesivitesini %97, sensitivitesini ise %96.4 olarak bildirmişlerdir (85).

Bu iki tümörün ayırımına yönelik literatürde PEG10 ile yapılmış tek çalışma mevcuttur. *Shinohara N.* ve arkadaşlarının yaptığı, 24 KS (10'u derece 1, 14'ü derece 2/3), 5 enkondrom ve 5 osteokondrom olgusu içeren çalışmada değerlendirme tümör hücrelerinde boyanma oranı (0: 0%, 1: 1–24%, 2: 25–49%, 3: 50–74% ve 4: 75–100% pozitif) ve şiddetin (0: Negatif, 1: Zayıf, 2: Orta ve 3: Güçlü) birlikte değerlendirildiği skorelama sistemi ile yapılmıştır. Hem enkondrom hem de kondrosarkomda boyanma elde edilmiş ancak enkondrom olgularında skor >6, derece 1 KS'lerde skor 4, derece 2 KS'lerde skor 3 olarak hesaplamıştır; skorun enkondromlarda daha yüksek, KS'lerde ise artan histolojik derece ile azaldığını göstermişlerdir (79).

Literatürde belirtilenden farklı olarak, çalışmamızda enkondrom ve KS 'lerde boyanma elde edilememiş olmasının olası nedenleri şunlardır: a) preanalitik evre problemleri (yalancı negatiflik); b) analitik evre problemleri (yalancı negatiflik); c) KS ve enkondromların bu iki belirteç için negatif olması (gerçek negatiflik).

Literatürde immünohistokimya çalışmalarında kontrol dokuda pozitifken çalışılan dokuda boyanma elde edilememesi şeklinde karşılaşılan sorunlarda buna neden olabilecek sebepler, uygunsuz tespit (uzun ya da kısa süre, solüsyon seçimi), doku takibi sırasında antijenik epitopun hasar görmesi, antijen kazanım yönteminin uygun olmaması, antijenin düşük konsantrasyonda olması veya tespit sırasında maskelenmiş olması, antikorun fazla dilüe olması şeklinde belirtilmiştir (45,86–88).

Çalışmamızda kıkırdağın boyanmama nedenine yönelik bu olası problemler değerlendirilip çalışmanın tüm aşamaları tekrar gözden geçirildi. Bölümümüzde tespit,

tamponlanmış %10'luk nötral formalin solüsyonu, dekalsifikasyon ise %10 ya da 20'lik Gooding-Steward solüsyonu ile yapılmaktadır. Doku takibinde dehidratasyon, şeffaflaştırma ve parafinizasyon Leica ASP300S otomatik cihazı ile yapılmaktadır. Kontrol dokularının pozitif boyanmış olması uygunsuz tespit ya da epitop hasarı olasılığını dışlamaktadır. Bu sonucu güvenilir kılmak ve doku takip aşamasında yaşanacak problemleri en aza indirmiş olmak adına çalışma sürecinde bölümümüze kabul edilen bir yeni tanı enkondrom vakası, numune kabul aşamasından blok haline getirilinceye kadar özenle takip edildi. Bu aşamada tespit solüsyonunda 24 saat süre ile tespit edildi. Materyal içindeki kortikal kemik ayrılarak kalan tümörlü doku dekalsifikasyon işlemi yapılmadan örneklenerek otomatik takip cihazına alındı. Olası antijenik kaybı engellemek için kesit alma ve boyama öncesi deparafinizasyon aşamalarında sıcaklık kontrolü usulüne uygun şekilde yapıldı. Bu aşamada yeni tanı KS olgusu kabul edilmediği için sistem verileri dikkatli şekilde analiz edilerek dekalsifikasyon işlemine tabi tutulmamış olduğundan emin olunan bir tane derece 1 KS olgusu seçildi. Her iki vakada da benzer şeklide kontrol doku pozitif olduğu halde benzer şekilde boyanma elde edilemedi. Tüm bu çalışmaların sonucunda enkondrom ve derece 1 KS'lerde PEG10 ve periostin ile boyanma elde edilemeyeşinin dokuların tespit, dekalsifikasyon ya da takibinden kaynaklanmadığı olasılığı söylenebilir.

İmmünohistokimya kalibrasyonu için antikorların temin edildiği tedarikçi firma bu konu ile araştırma yapan yazarlar ve benzer problemler ile karşılaşmış olup bize yol gösterebilecek kemik ve yumuşak doku alanında uzman kişiler ile iletişime geçildi (Ek 1). Tedarikçi firma öncelikle antijen açığa çıkarma; primer antikor dilüsyonu ve inkübasyon aşaması, sekonder antikor amplifikasyonu ve saptaması ile ilgili yapılabilecek değişiklikler önerdi. Bu aşamada antijen açığa çıkarma yöntemi olarak yüksek sıcaklık ve basınç esasına dayanan düdüklü tencere modeli, farklı pH'larda (pH 6 ve 8) tampon solüsyonları (EDTA, sitrat) ve antijen konsantrasyonu ve inkübasyonu sürelerinde değişiklikler uygulandı; ancak boyanma elde edilemedi. Yapılan değişikliklere rağmen olumlu sonucun elde edilememesi üzerine firma ile yeniden görüşüldü. Tedarikçi firma tarafından bu aşamada doku hazırlanması ve boyama prosedürü ile ilgili daha farklı bir önerilerinin olmadığını, ancak ellerinde bu antijenler için başka poliklonal ve monoklonal antikor klonları olduğunu bildirildi. Bu alanda çalışan uzmanlar ise daha farklı bir öneri ve daha ileri bir yorumda

bulunmadılar. Son olarak benzer çalışmaları olan yazarlara e-posta yolu ile ulaşmaya çalışıldı; ancak mesajlara yanıt alınamadı.

Analitik aşama problemleri olarak antikor klonları ve kaynakları ile sekonder antikor saptaması ve amplifikasyonunda kullanılan yöntemlerin (ABC, LSAB ve polimer temelli metodlar gibi) farklı olmasının olası problemlere neden olabileceği düşünüldü (89,90). Bahsedilen her iki antikor için mevcut makalelerde sekonder antikor saptama ve amplifikasyon yöntemleri ile ilgili detaylı açıklama bulunmamaktadır.

Bu çalışmada ABCAM firmasına ait periostin için ab215199, PEG10 için ab215035 etiketli kitler kullanılmıştır. Firma ile iletişime geçilerek klon bilgisi hakkında bilgi istenmiş ancak bu bilginin gizli olduğu gerekçesi ile klon hakkında spesifik bilgi verilmemiştir (Ek 2). Her iki antikor için sekonder antikor saptama da avidin-biotin kompleks (ABC) yöntemi kullanılmıştır. Kontrol dokularında boyanma elde edilmiş olması sekonder kit kaynaklı bir problem olmadığını göstermektedir.

Lai X. ve arkadaşlarının periostin ile yaptığı çalışmada monoklonal fare antikoru (TA804575, *OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD, USA*); Kim D. ve arkadaşları ise monoklonal tavşan antikoru kullanmışlardır. Çalışmamızda ikinci çalışmada olduğu gibi monoklonal tavşan antikoru kullanıldı. Bahsi geçen ikinci çalışmada kullanılan ve çalışmamızda kullanılan antikorların üretici firmaları aynıdır. Ancak aynı firmanın periostin için monoklonal kategoride farklı klonları bulunmakta olup sözü geçen ikinci çalışmada kullanılan periostin antikorunun spesifik klon bilgisine ulaşılamadı.

PEG 10 ile yapılan tek çalışmada Shinohara N. ve arkadaşları monoklonal fare antikoru (1:200, 4C10A7, LSBio), çalışmamızda ise monoklonal tavşan antikoru kullanılmış olup tedarikçi firmalar farklıdır.

Gerek literatürde yayınlanmış çalışmaların bir kısmında gerekse mevcut çalışmada kullanılan monoklonal periostin ve PEG10 antikorlarının klonlarının bilinmiyor olması nedeni ile çalışmamızda literatürden farklı olarak bu iki belirteç için boyanma gösterilimemesi farklı primer klonlarının kullanılmasına bağlı olabilir.

6. SONUÇLAR

Bu çalışmada periostin ve PEG10 biyobelirteçlerinin enkondrom ve derece 1 KS ayrımındaki yararı araştırıldı. Preanalitik aşamada olabilecek teknik sorunların minimize edilmesi yanı sıra analitik aşamada antijen kazanımı adına başvurulmuş çeşitli teknikler ve bu tekniklerin farklı kombinasyonları ile yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda enkondrom ya da derece 1 KS'lerde boyanma izlenmedi. Bu aşamada en azından çalışmamızda kullanılan klonlar ile, periostin ve PEG10 antikorlarının enkondrom ve KS ayrımında yararlı olmadığı sonucuna varıldı.

Literatür ile farklılıklar göz önüne alındığında, periostin ve PEG10'un kıkırdak tümörlerindeki tanısal yararının kesin belirlenmesi, özgül boyama, ayrımı sağlayabilecek klonların ya da poliklonal antikorların denenip yayınlanması ile sağlanabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Bovee J, Bloem J, Flanagan A, Nielsen G, Yoshida A. Enchondroma, chondrosarcoma. In: Lokuhetty D, White VA CI, editor. WHO Classification Of Tumours: Soft Tissue And Bone Tumours. 5th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2020. p. 353–90.
2. Amer KM. Survival and Prognosis of Chondrosarcoma Subtypes : SEER Database Analysis. J Orthop Res [Internet]. 2020;38(2):311–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jor.24463>
3. Czerniak B, editor. Benign cartilage tumors, malignant cartilage tumors. In: Dorfman and Czerniak's Bone Tumors. 2nd ed. Philadelphia: Saunder Elsevier Inc.; 2016. p. 356–569.
4. Angela B, Giuffrida Y, Burgueno JE, Koniaris LG, Gutierrez JC, Duncan R, et al. Chondrosarcoma in the United States Cases from the SEER Database. 2009;1063–72.
5. Weinschenk RC, Wang WL, Lewis VO. Chondrosarcoma. J Am Acad Orthop Surg. 2021;29(13):553–62.
6. Eefting D, Schrage YM, Geirnaerd MJA, Le Cessie S, Taminiau AHM, Bovée JVMG, et al. Assessment of interobserver variability and histologic parameters to improve reliability in classification and grading of central cartilaginous tumors. Am J Surg Pathol. 2009;33(1):50–7.
7. De Salvo S, Pavone V, Coco S, Dell'agli E, Blatti C, Testa G. Benign Bone Tumors: An Overview of What We Know Today. J Clin Med. 2022;11(3).
8. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. CA Cancer J Clin. 2018;68(1):7–30.
9. Li S, Peng Y, Weinhandl ED, Blaes AH, Cetin K, Chia VM, et al. Estimated number of prevalent cases of metastatic bone disease in the US adult population. Clin Epidemiol. 2012;4(1):87–93.
10. Masciocchi C, Sparvoli L, Barile A. Diagnostic imaging of malignant cartilage tumors. Eur J Radiol. 1998;27:86–90.

11. Osborne RL. The differential radiologic diagnosis of bone tumors. *CA Cancer Journalfor Clin.* 1974;24(4):194–211.
12. Sharif B, Lindsay D, Saifuddin A. The role of imaging in differentiating low-grade and high-grade central chondral tumours. *Eur J Radiol* [Internet]. 2021;137(September 2020):109579. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2021.109579>
13. Garcia RA, Inwards CY, Unni KK. Benign bone tumors-recent developments. *Semin Diagn Pathol* [Internet]. 2011;28(1):73–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.semdp.2011.02.013>
14. Jungmann PM. Chondrogenic Bone Tumors : The Importance of Imaging Characteristics Chondrogene Knochentumoren : Bildgebung als Wegweiser ? Authors Benign chondrogenic tumors. 2021;
15. Benassi MS. Biology of Central and Peripheral Chondrosarcoma. *Atlas Musculoskelet Tumors Tumorlike Lesions* [Internet]. 2014 [cited 2023 Jan 20];141–3. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-01748-8_32
16. Polychronidou G, Karavasilis V, Pollack SM, Huang PH, Lee A, Jones RL. Novel therapeutic approaches in chondrosarcoma. *Futur Oncol* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2023 Jan 20];13(7):637–48. Available from: www.futuremedicine.com
17. Kohlmeyer JL, Gordon DJ, Tanas MR, Monga V, Dodd RD, Quelle DE. CDKs in Sarcoma: Mediators of Disease and Emerging Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci* 2020, Vol 21, Page 3018 [Internet]. 2020 Apr 24 [cited 2023 Jan 20];21(8):3018. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/8/3018/htm>
18. Cleven AHG, Suijker J, Agrogiannis G, Briaire-de Bruijn IH, Frizzell N, Hoekstra AS, et al. IDH1 or -2 mutations do not predict outcome and do not cause loss of 5-hydroxymethylcytosine or altered histone modifications in central chondrosarcomas. *Clin Sarcoma Res.* 2017;7(1):1–10.

19. Amary MF, Bacsı K, Maggiani F, Damato S, Halai D, Berisha F, et al. IDH1 and IDH2 mutations are frequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours. *J Pathol.* 2011;224(3):334–43.
20. Speetjens FM, De Jong Y, Gelderblom H, Boveé JVMG. Molecular oncogenesis of chondrosarcoma: Impact for targeted treatment. *Curr Opin Oncol.* 2016;28(4):314–22.
21. de Andrea CE, San-Julian M, Boveé JVMG. Integrating Morphology and Genetics in the Diagnosis of Cartilage Tumors. *Surg Pathol Clin [Internet].* 2017;10(3):537–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.path.2017.04.005>
22. Saiji E, Pause FG, Lascombes P, Cerato Biderbost C, Marq NL, Berczy M, et al. IDH1 immunohistochemistry reactivity and mosaic IDH1 or IDH2 somatic mutations in pediatric sporadic enchondroma and enchondromatosis. *Virchows Arch.* 2019;475(5):625–36.
23. Boveé JVMG, Cleton-Jansen AM, Wuyts W, Caethoven G, Taminiau AHM, Bakker E, et al. EXT-Mutation Analysis and Loss of Heterozygosity in Sporadic and Hereditary Osteochondromas and Secondary Chondrosarcomas. *Am J Hum Genet.* 1999 Sep 1;65(3):689–98.
24. De Andrea CE, Reijnders CMA, Kroon HM, De Jong D, Hogendoorn PCW, Szuhai K, et al. Secondary peripheral chondrosarcoma evolving from osteochondroma as a result of outgrowth of cells with functional EXT. *Oncogene.* 2012;31(9):1095–104.
25. Dervisoglu Sergulen, editor. Kondrojenik tümörler. In: Kemik ve Eklem Patolojisi Multidisipliner Yaklaşım. 1st ed. Ankara: Kongre kitapevi; 2018. p. 187–226.
26. Evans L, Romsdahl M. PROGNOSTIC FACTORS IN CHONDROSARCOMA. 1974;818–31.
27. Susuki Y, Yamada Y, Ito Y, Kawaguchi K, Furukawa H. Pathology -

Research and Practice A new scoring system for the grading of conventional chondrosarcoma : Its clinicopathological significance. *Pathol - Res Pract* [Internet]. 2022;238(September):154125. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.prp.2022.154125>

28. Suster D, Hung YP, Nielsen GP. Differential diagnosis of cartilaginous lesions of bone. *Arch Pathol Lab Med*. 2020;144(1):71–82.
29. Boeuf S, Bovée JVMG, Lehner B, van den Akker B, van Ruler M, Cleton-Jansen AM, et al. BMP and TGFbeta pathways in human central chondrosarcoma: enhanced endoglin and Smad 1 signaling in high grade tumors. *BMC Cancer*. 2012;12:1–10.
30. Wells ME, Eckhoff MD, Kafchinski LA, Polfer EM, Potter BK. Conventional Cartilaginous Tumors: Evaluation and Treatment. *JBJS Rev*. 2021;9(5):1–10.
31. Maartje G, Jo H, Johan BL, Herman KM, Thomas PL, Anthonie THM, et al. Usefulness of Radiography in Differentiating Enchondroma from Central Grade 1 Chondrosarcoma. 1997;(October):1097–104.
32. Shemesh SS, Acevedo-Nieves JD, Pretell-Mazzini J. Treatment strategies for central low-grade chondrosarcoma of long bones: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Musculoskelet Surg*. 2018;102(2):95–109.
33. Nota SPFT, Braun Y, Schwab JH, Van Dijk CN, Bramer JAM. The identification of prognostic factors and survival statistics of conventional central chondrosarcoma. *Sarcoma*. 2015;2015.
34. Zhang H, Alman BA. Enchondromatosis and Growth Plate Development. *Curr Osteoporos Rep*. 2021;19(1):40–9.
35. Douis H, Parry M, Vaiyapuri S, Davies AM. What are the differentiating clinical and MRI-features of enchondromas from low-grade chondrosarcomas? *Eur Radiol*. 2018;28(1):398–409.
36. Murphey MD, Flemming DJ, Boyea SR, Bojescul JA, Sweet DE, Temple HT. From the Archives of the AFIP. Enchondroma versus Chondrosarcoma in the Appendicular Skeleton: Differentiating Features. *Radiographics*.

1998;18(5):1213–37.

37. Afonso PD, Isaac A, Villagrán JM. Chondroid Tumors as Incidental Findings and Differential Diagnosis between Enchondromas and Low-grade Chondrosarcomas. *Semin Musculoskelet Radiol.* 2019;23(1):3–18.
38. Herget W, Strohm P, Rottenburger C, Kontny U, Krauss T, Bohm J, et al. Insights into Enchondroma, Enchondromatosis and the risk of secondary Chondrosarcoma. Review of the literature with an emphasis on the clinical behaviour, radiology, malignant transformation and the follow up. *Neoplasma.* 2013;61(4):365–76.
39. Jurik AG, Hansen BH, Weber K. Solitary enchondromas—diagnosis and surveillance: Danish guidelines. *Radiologe.* 2020;60(C):26–32.
40. Jurik AG, Hansen BH, Weber K. Solitary enchondromas—diagnosis and surveillance: Danish guidelines. *Radiologe.* 2020;60(April):26–32.
41. Tang C, Chan M, Fok M, Fung B. Current management of hand enchondroma: a review. *Hand Surg.* 2015;20(1):191–5.
42. Sullivan CW, Kazley JM, Murtaza H, Cooley M, Jones D, Dicaprio MR. Team Approach: Evaluation and Management of Low-Grade Cartilaginous Lesions. *JBJS Rev.* 2020;8(1):1–9.
43. Deckers C, de Leijer EM, Flucke U, de Rooy JWJ, Schreuder HWB, Dierselhuis EF, et al. Curettage and cryosurgery for enchondroma and atypical cartilaginous tumors of the long bones: Oncological results of a large series. *J Surg Oncol.* 2021;123(8):1821–7.
44. Karamchandani JR, Nielsen TO, Van De Rijn M, West RB. Sox10 and s100 in the diagnosis of soft-tissue neoplasms. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2012;20(5):445–50.
45. Lin F, Shi J. Standardization of Diagnostic Immunohistochemistry. In: Lin F, Jeffrey P, editors. *Handbook of Practical Immunohistochemistry.* 2nd ed. New York: Springer; 2015. p. 17–30.

46. Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, De Crombrughe B. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet.* 1999;22(1):85–9.
47. Ming Z, Vining B, Bagheri-Fam S, Harley V. SOX9 in organogenesis: shared and unique transcriptional functions. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2022;79(10):1–25. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04543-4>
48. Wehrli BM, Huang W, De Crombrughe B, Ayala AG, Czerniak B. Sox9, a master regulator of chondrogenesis, distinguishes mesenchymal chondrosarcoma from other small blue round cell tumors. *Hum Pathol.* 2003;34(3):263–9.
49. Cajaiba MM, Jianhua Luo, Goodman MA, Fuhrer KA, Rao UNM. Sox9 expression is not limited to chondroid neoplasms: Variable occurrence in other soft tissue and bone tumors with frequent expression by synovial sarcomas. *Int J Surg Pathol.* 2010;18(5):319–23.
50. Jeong W, Kim HJ. Biomarkers of chondrosarcoma. *J Clin Pathol.* 2018;579–83.
51. Kouvaras E, Christoni Z, Siasios I, Malizos K, Koukoulis GK, Ioannou M. Hypoxia-inducible factor 1-alpha and vascular endothelial growth factor in cartilage tumors. *Biotech Histochem* [Internet]. 2019;94(4):283–9. Available from: <https://doi.org/10.1080/10520295.2018.1556806>
52. Aviel-Ronen S, Zadok O, Vituri A, Nass D, Schwartz I, Avivi C, et al. α -methylacyl-CoA racemase (AMACR) expression in chordomas differentiates them from chondrosarcomas. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(January):4–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep21277>
53. Takeshita S, Kikuno R, Tezuka -i. K, Amann E. Osteoblast-specific factor 2: Cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. *Biochem J.* 1993;294(1):271–8.
54. Norris RA, Kern CB, Wessels A, Moralez EI, Markwald RR, Mjaatvedt CH. Identification and Detection of the Periostin Gene in Cardiac Development.

- Anat Rec - Part A Discov Mol Cell Evol Biol. 2004;281(2):1227–33.
55. Kruzynska-Frejtag A, Machnicki M, Rogers R, Markwald RR, Conway SJ. Periostin (an osteoblast-specific factor) is expressed within the embryonic mouse heart during valve formation. *Mech Dev*. 2001;103(1–2):183–8.
 56. Hiroi H, Momoeda M, Nakazawa F, Koizumi M, Tsutsumi R, Hosokawa Y, et al. Expression and regulation of periostin/OSF-2 gene in rat uterus and human endometrium. *Endocr J*. 2008;55(1):183–9.
 57. Bonnet N, Garnero P, Ferrari S. Periostin action in bone. *Mol Cell Endocrinol*. 2016;432:75–82.
 58. Brown JM, Mantoku A, Sabokbar A, Oppermann U, Hassan AB, Kudo A, et al. Periostin expression in neoplastic and non-neoplastic diseases of bone and joint. *Clin Sarcoma Res* [Internet]. 2018;8(1):1–8. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13569-018-0105-y>
 59. Bonnet N, Conway SJ, Ferrari SL. Regulation of beta catenin signaling and parathyroid hormone anabolic effects in bone by the matricellular protein periostin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(37):15048–53.
 60. Norris R a, Damon B, Mironov V, Kasyanov V, Moreno-rodriguez R, Trusk T, et al. Periostin Regulates Collagen Fibrillogenesis. 2007;101(3):695–711.
 61. Liu Y, Huang Z, Cui D, Ouyang G. The Multiaspect Functions of Periostin in Tumor Progression. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1132:125–36.
 62. Shao R, Bao S, Bai X, Blanchette C, Anderson RM, Dang T, et al. Acquired Expression of Periostin by Human Breast Cancers Promotes Tumor Angiogenesis through Up-Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Expression. *Mol Cell Biol*. 2004;24(9):3992–4003.
 63. Bao S, Ouyang G, Bai X, Huang Z, Ma C, Liu M, et al. Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway. *Cancer Cell*. 2004;5(4):329–39.
 64. Sasaki H, Auclair D, Fukai I, Kiriya M, Yamakawa Y, Fujii Y, et al.

Expression of Periostin, Homologous with an Insect Cell Adhesion Molecule, as a Prognostic Marker in Non-small Cell Lung Cancers. *Cancer*. 2001;92(4):843–8.

65. Cui D, Huang Z, Liu Y, Ouyang G. The multifaceted role of periostin in priming the tumor microenvironments for tumor progression. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(23):4287–91.
66. Morra L, Moch H. Periostin expression and epithelial-mesenchymal transition in cancer: a review and an update. *Virchows Arch [Internet]*. 2011 Nov [cited 2023 Jan 23];459(5):465. Available from: /pmc/articles/PMC3205268/
67. Ratajczak-Wielgomas K, Dziegiel P. The role of periostin in neoplastic processes. *Folia Histochem Cytobiol*. 2015;53(2):120–32.
68. Lai X, Chen S. Identification of novel biomarker candidates for immunohistochemical diagnosis to distinguish low-grade chondrosarcoma from enchondroma. *Proteomics*. 2015;15(13):2358–68.
69. Jeong JY, Jeong W, Kim HJ. Promotion of chondrosarcoma cell survival, migration and lymphangiogenesis by periostin. *Anticancer Res*. 2020;40(10):5463–9.
70. Ono R, Kobayashi S, Wagatsuma H, Aisaka K, Kohda T, Kaneko-Ishino T, et al. A retrotransposon-derived gene, PEG10, is a novel imprinted gene located on human chromosome 7q21. *Genomics*. 2001;73(2):232–7.
71. Lux H, Flammann H, Hafner M, Lux A. Genetic and molecular analyses of PEG10 reveal new aspects of genomic organization, transcription and translation. *PLoS One*. 2010;5(1).
72. Ono R, Nakamura K, Inoue K, Naruse M, Usami T, Wakisaka-Saito N, et al. Deletion of Peg10, an imprinted gene acquired from a retrotransposon, causes early embryonic lethality. *Nat Genet*. 2006;38(1):101–6.
73. Hishida T, Naito K, Osada S, Nishizuka M, Imagawa M. Peg10, an Imprinted Gene, Plays a Crucial Role in Adipocyte Differentiation. *FEBS Lett*. 2007;581(22):4272–8.

74. Xie T, Pan S, Zheng H, Luo Z, Tembo KM, Jamal M, et al. PEG10 as an oncogene: Expression regulatory mechanisms and role in tumor progression. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2018;18(1):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12935-018-0610-3>
75. Tsou AP, Chuang YC, Su JY, Yang CW, Liao YL, Liu WK, et al. Overexpression of a novel imprinted gene, PEG10, in human hepatocellular carcinoma and in regenerating mouse livers. *J Biomed Sci*. 2003;10(6):625–35.
76. Liu DC, Yang ZL, Jiang S. Identification of PEG10 and TSG101 as carcinogenesis, progression, and poor-prognosis related biomarkers for gallbladder adenocarcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2011;17(4):859–66.
77. Peng YP, Zhu Y, Yin L Di, Zhang JJ, Wei JS, Liu X, et al. PEG10 overexpression induced by E2F-1 promotes cell proliferation, migration, and invasion in pancreatic cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2017;36(1):1–12.
78. Kainz B, Shehata M, Bilban M, Kienle D, Heintel D, Krömer-Holzinger E, et al. Overexpression of the paternally expressed gene 10 (PEG10) from the imprinted locus on chromosome 7q21 in high-risk B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer*. 2007;121(9):1984–93.
79. Shinohara N, Maeda S, Yahiro Y, Sakuma D, Matsuyama K, Imamura K, et al. TGF- β signalling and PEG10 are mutually exclusive and inhibitory in chondrosarcoma cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–12.
80. Akamatsu S, Wyatt AW, Lin D, Lysakowski S, Zhang F, Kim S, et al. The placental gene PEG10 promotes progression of neuroendocrine prostate cancer. *Cell Rep* [Internet]. 2015;12(6):922–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.012>
81. Li X, Xiao R, Tembo K, Hao L, Xiong M, Pan S, et al. PEG10 promotes human breast cancer cell proliferation, migration and invasion. *Int J Oncol*. 2016;48(5):1933–42.
82. Li B, Shi C, Li B, Zhao JM, Wang L. The effects of Curcumin on HCT-116

- cells proliferation and apoptosis via the miR-491/PEG10 pathway. *J Cell Biochem*. 2018;119(4):3091–8.
83. Ge H, Yan Y, Wu D, Huang Y, Tian F. Prognostic value of PEG10 in Asian solid tumors: A meta-analysis. *Clin Chim Acta*. 2018;483(April):197–203.
 84. Yahiro Y, Maeda S, Shinohara N, Jokoji G, Sakuma D, Setoguchi T, et al. PEG10 counteracts signaling pathways of TGF- β and BMP to regulate growth, motility and invasion of SW1353 chondrosarcoma cells. *J Bone Miner Metab* [Internet]. 2019;37(3):441–54. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00774-018-0946-8>
 85. Kim D, Jeong JY, Han MH, Chae J, Park I, Yoon J, et al. Periostin is a novel histological biomarker for the diagnosis of chondroid tumor. *Transl Cancer Res*. 2021;10(1):434–44.
 86. Puyan, Öz F. İmmünohistokimyasal Yöntemler. In: Usta F, editor. *Patoloji Laboratuvar Teknikleri ve Laboratuvar Yönetimi*. 1st ed. Türkiye: Kongre Kitabevi; 2019. p. 249–77.
 87. Taylor, R C, Shi S-R, Barr, J. N. Techniques of Immunohistochemistry: Principles, Pitfalls, and Standardization. In: Dabbs D, editor. *Diagnostic Immunohistochemistry* [Internet]. 3rd ed. China: Elsevier; 2010. p. 1–39. Available from: <https://www.ptonline.com/articles/how-to-get-better-mfi-results>
 88. Miller RT. Avoiding pitfalls in diagnostic immunohistochemistry—important technical aspects that every pathologist should know. *Semin Diagn Pathol* [Internet]. 2019;36(5):312–35. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2019.05.002>
 89. Vassallo J, Pinto GA, Alvarenga M, Zeferino LC, Chagas CA, Metze K. Comparison of immunoexpression of 2 antibodies for estrogen receptors (1D5 and 6F11) in breast carcinomas using different antigen retrieval and detection methods. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2004;12(2):177–82.
 90. Røge R, Nielsen S, Riber-Hansen R, Vyberg M. Impact of Primary Antibody

Clone, Format, and Stainer Platform on Ki67 Proliferation Indices in Breast Carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2019;27(10):732–9.



8- EKLER

8. 1. Ek 1. Tedarikçi firma ile antikor ile yaşanan problemlerin çözümüne yönelik yazışmalar

Your query By E-mail Thursday, Sep 08, 2022 - 09:30

Hello, I am Dr. Fatma from the Department of Pathology, Faculty of Medicine, 19 Mayıs University Turkey Sacred. About 2 months ago, I obtained PEG10 (EPR2005, ab215035) and periostin (EPR20806, ab215199) antibodies from you. The antibody control tissues are working, but my tumors representing enchondroma and chondrosarcoma have not worked. Both antibodies have the same problem. There is an appearance that is not in the form of staining, as if it was thrown in a heap. My tissues are acidic textures, but is there anything you can do about it or a suggestion? Thank you in advance for your help.

Have a nice day..

Our reply By E-mail Friday, Sep 09, 2022 - 17:31

Dear Fatma,

Thank you for getting in touch.

I am glad to hear the PEG10 and Periostin antibodies are working well in your control tissues. Regarding your issue with the enchondroma and chondrosarcoma tissue, can you send me some additional protocol details so I can offer suggestions? Thanks!

- Sample fixation, antigen retrieval, permeabilization
- Blocking conditions
- Primary antibody conditions (diluent/dilution, incubation time/temperature)
- Secondary antibody conditions (diluent/dilution, incubation time/temperature)
- Wash steps
- Detection method and amplification steps (if any)

Thank you in advance. I look forward to hearing from you.

Best,

Heather

Heather Allen

Scientific Support Specialist

www.abcam.com



888.772.2226

Your query By E-mail Sunday, Oct 02, 2022 - 20:08

Hello again,

All of the tissues entered the acid follow-up. We worked the dyes with the ventana device. Our working procedure is attached for each paint.

I look forward to your help.

Our reply By E-mail Monday, Oct 03, 2022 - 15:25

Hi Fatma,

You could try optimizing the antigen retrieval times to see if shorter or longer may give more specific staining. Also the retrieval solution-sometimes Tris/EDTA pH9 works better for some tissues/antibodies, sometimes citrate pH6. If your results don't improve, then perhaps different antibodies to your targets would bind better in these tissues-we do have other clones available validated for IHC.

Best regards,
Heather

Heather Allen

Scientific Support Specialist

www.abcam.com



888.772.2226

8. 2. Ek 2. Tedarikçi firma ile periostin ve PEG10 klon bilgilerine yönelik yazışmalar

Your query By E-mail Thursday, Feb 23, 2023 - 19:13

Hello,

I want to learn about ab215199 (periostin, EPR20806,) and ab215035 (peg10, EPR20051) antibody's clone ID.

Please answer me immediatly.

Thank you.

Windows için [Posta](#) ile gönderildi

abcam

Inquiry reference # 230224-000139

- Date created: Thursday, Feb 23, 2023 - 19:13
- Date last updated: Monday, Feb 27, 2023 - 11:30

Subject urgency

Our reply By E-mail Monday, Feb 27, 2023 - 11:30

Dear Fatma,

Thanks for reaching out to our team again.

The amino acid sequence used to raise these antibody is proprietary, so, unfortunately, we cannot share this information.

I can share that the Recombinant Anti-Periostin antibody [EPR20806] ([ab215199](#)) targets the FAS1 and FAS2 domain according to Uniprot [Q15063](#). The Recombinant Anti-PEG10/EDR antibody [EPR20051] ([ab215035](#)) targets the Disordered domain closest to the C-terminus according to Uniprot [Q86TG7](#). If you need me to check is these antibodies recognize a specific amino acid sequence please provide it and I can check for you.

I am happy to help with any further questions you have.

Kind regards,

Stefanie

Stefanie Hauck, PhD

Scientific Support Specialist

www.abcam.com

