

OSTEOSARKOMDA TELOMERAZ VE Ki-67 EKSPRESYONU (35 VAKADA KLİNİKOPATOLOJİK İNCELEME)

Dr. Bilge BİLGİÇ

ÖZET: Osteosarkom, osteoid yapımı ile karakterize yüksek gradlı bir sarkomdur. Kemik tümörleri içinde, çocukluk çağı ve genç erişkinlerde en sık görülen malign kemik tümörüdür. Medikal onkolojideki ilerlemelerle 5 yıllık sağkalım %70'lerdedir. Osteosarkomlarda patogeneze ve prognoza ışık tutmak amacıyla birçok çalışma yapılmaktadır. Süpresör gen, onkogen, adhezyon molekülleri, ilaç direnci ile ilgili çalışmalar bunlardan bazılarıdır. Bu çalışmada, prognostik bilgileri ve parafin blokları çalışmaya uygun 35 vaka seçilmiştir. Bunların 19'u kadın, 16'sı erkektir. Ortalama yaş 19'dur. En sık yerleşim yeri distal femurdur. Vakaların 20'sinde akciğer metastazı bulunmuştur. Akciğer metastazı bulunan vakalarda sağkalım anlamlı şekilde azalmaktadır. İmmünohistokimyasal inceleme ilk tanı için gönderilen, dekalsifikasyon uygulanmamış materyalde yapılmıştır. Ki-67 proliferasyon hızı ortalama %17.5 bulunmuştur. Ki-67 indeksi ve sağkalım ilişkisi anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca kemoterapi sonrası nekroz ve sağkalım ilişkisi de yine istatistiksel olarak anlamlı değildir. Telomeraz aktivitesi 10 vakada negatif ve tüm vakalarda ortalama %7.23'dür. Ancak bu değerler de Ki-67'de olduğu gibi oldukça geniş bir spektrumda dağılım göstermektedir. Telomeraz aktivitesi ve sağkalım ilişkisi anlamlı bulunmamıştır. Nekroz ve sağkalımı etkileyen birçok faktör bulunması, tek başına Ki-67 ve telomeraz ekspresyonlarının anlamlı olmamasını açıklayabilir. Telomeraz ekspresyonunun 10 vakada saptanmaması olası teknik nedenleri de akla getirmelidir.

ANAHTAR KELİMELEER: Osteosarkom, telomeraz, Ki-67, nekroz, prognoz

SUMMARY: TELOMERASE ACTIVITY AND Ki-67 EXPRESSION IN OSTEOSARCOMA (CLINICOPATHOLOGICAL ANALYSIS IN 35 CASES)

Osteosarcoma is defined as a high grade sarcoma with osteoid production. It is the most common sarcoma arising from bone in children and young adults. Five year survival of osteosarcoma is about 70% thanks to the improvements in medical oncology. Many studies were performed, about the role of suppressor genes, oncogenes, adhesion molecules, multi-drug resistance genes on prognosis and pathogenesis of osteosarcoma. This study includes 35 patients, having prognostic data and adequate material for the immunohistochemical analysis. Nineteen patients were female. The mean age was 19. The most affected site was distal femur. In 20 patients lung metastases developed. The survival was lower in metastatic cases, significantly. For the immunohistochemical method, primary tru-cut or incisional biopsies without decalcification were used. Mean Ki-67 index was 17.5%. There was no significant relation between the survival and the proliferation index, the relation between the histologic response and survival was also insignificant. Telomerase activity was absent in 10 cases and the mean activity in remaining cases was 7.23%, showing a wide range as in Ki-67. There was no significant correlation between survival and telomerase activity. Many factors may have influence on necrosis and prognosis. According to our results telomerase activity and Ki-67 don't seem to have a primary role on the survival. The absence of telomerase activity in 10 cases, let us think about possible technical problems in demonstrating this enzymatic activity immunohistochemically.

KEY WORDS: Osteosarcoma, telomerase, Ki-67, necrosis, prognosis

GİRİŞ

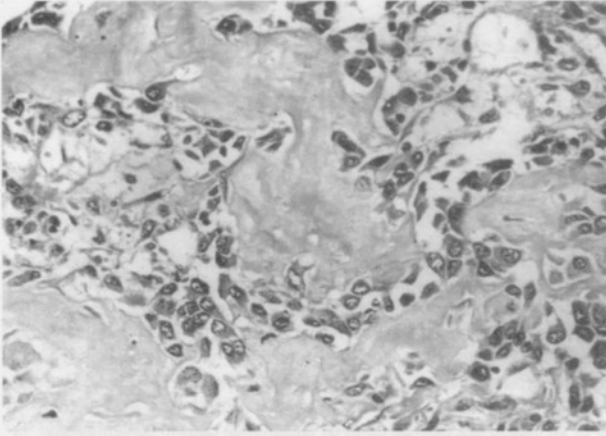
Osteosarkom, osteoid yapımı ile karakterize yüksek gradlı bir sarkomdur. Geniş serilerde, plazma hücreli myelom dışında en sık görülen malign kemik tümörüdür. Osteosarkomda etyoloji bilinmemekle birlikte, her ikisi de birer süpresör gen olan retinoblastom geni ve p53 genindeki mutasyonlarla ilişkili olduğu düşünülmektedir (1). Uzun kemik metafiz bölgesi, klasik yerleşim yeridir. En sık diz bölgesinde yer alır. Sekonder olarak Paget kemik hastalığında veya radyasyon sonrasında görülebilir. Çok nadir olarak yumuşak dokudan da çıkabilir (1,3). Osteosarkomda tanı genellikle tru-cut biyopsi ile konur. Rezeksiyon öncesi 3 kür, rezeksiyonu takiben yine 3 kür kemoterapi uygulanır. Rezeksiyon piyesindeki nekroz oranının %90'dan fazla olması iyi prognostik faktörler arasında sayılmaktadır. Nekrozun daha az olması halinde kemoterapi ajanları değiştirilebilir. Osteosarkomda 5 yıllık sağkalım 1967'de %20'lerden, 2000'li yılların başında %65-70'lere ulaşmıştır (1,4). Osteosarkomda patogeneze ve prognoza yönelik birçok çalışma yapılmaktadır. Süpresör ve onkogenler, adhezyon molekülleri, p-glikoprotein ekspresyonlarının araştırılması bu araştırmalara örnek gösterilebilir. P-glikoprotein ekspresyonu nüks ve kötü sağkalım ile (5), CD44 overekspresyonu artmış metastaz ile (6), c-myc ve c-fos onkogenlerinin birlikte ekspresyonları metastatik potansiyelin artması (7), p53 ile kemoterapiye di-

renç (8), c-erbB2 ekspresyonu histolojik kötü cevap ile ilişkili bulunmuştur (9). Ki-67, 395 kilodalton ağırlığında non-histon bir proteindir. Ki-67 proteininin hücre bölünmesi sırasında, ribozom sentezinde gerekli bir faktör olduğuna inanılmaktadır. Ki-67 çoğalan hücrelerde bulunan, dinlenme halindeki hücrelerde görülmeyen nükleer bir antijen ile etkileşime girer. G0 dışında tüm dönemlerde bulunur. Birçok tümör tipinde Ki-67 ekspresyonu ile büyüme oranları ve bazı tümörlerde prognoz ile ilişkili bulunmuştur (10). Telomerler, ökaryotik hücre kromozom kollarının son kısımlarındaki spesifik DNA protein kompleksleridir. Telomeraz ise, DNA replikasyonunun her seferinde ortaya çıkan kaybı kompanse etmek için altılı nükleotid tekrarlarını ekleyen bir enzimdir. Genel olarak nonneoplastik dokuda telomeraz aktivitesi yok veya düşük düzeyde, malign tümörde yüksektir (11,12).

Bu çalışmada, 8 yıllık bir dönemde Anabilim Dalı'mıza ulaşan, klinik ve takip bilgileri elimizde olan 35 hasta da yaş, yerleşim, histolojik tip, nekroz ve metastaz özellikleri bildirilmiş, ayrıca Ki-67 proliferasyon indeksi ve telomeraz aktivitesi immünohistokimyasal yöntemle araştırılmış ve bu değerlerin prognozla ilişkisi değerlendirilmiştir.

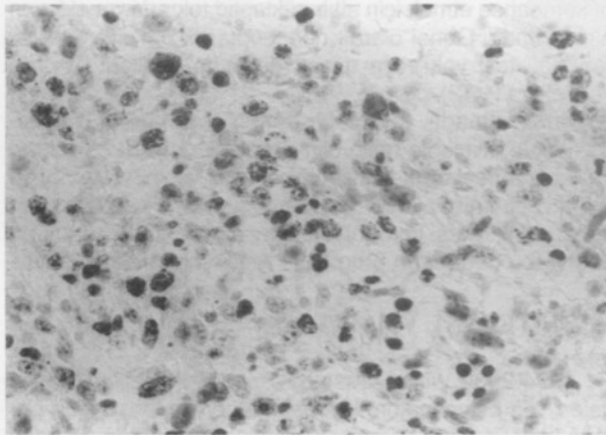
MATERYAL VE METOD

1994-2002 yılları arasında Patoloji Anabilim Dalı'na gelen 155 osteosarkom biyopsi materyalinden, uygun parafin blok ve klinik/ prognoz bilgisine sahip olan 35 vaka çalışma kapsamına alınmıştır. Parosteal osteosarkom tedavi ve prognoz açısından farklı bir grupta yer almakta-

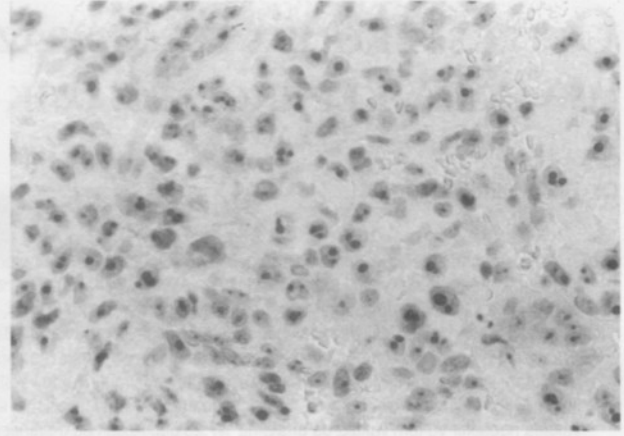


Resim 1: Osteoblastik tipte osteosarkomda osteoid yapımı ve tümöral hücreler (HE x 310)

dır; çalışmaya alınan 1 hastada ilk tanı parosteal osteosarkomdur, ancak nükleer dediferansiyasyon sonucu klasik osteosarkoma dönüşüm mevcut olduğundan, bu çalışma grubuna alınmıştır. Kemoterapi preoperatif 3 kür, postoperatif 3 kür şeklinde verilmiştir. Çocukluk çağındaki hastalarda sisplatin, ifosfamid, epirubisin; erişkinlerde adriablastin/ sisplatin, adriablastin/ifosfamid veya metotreksat kullanılmıştır. Her vakaya ait preparatlar tekrar değerlendirilmiş, kemoterapi öncesi biyopsilerden uygun olan bloklar seçilmiştir. Biyopsi örnekleri %10 formalin veya Holland fiksatifinde fiks edilmiştir. İmmünohistokimyasal çalışmayı etkileyebileceği düşünülerek dekalsifiye edilmemiş materyal kullanılmıştır. Hazırlanan parafin kesitlere, deparafinizasyonu takiben antijen retrieval işlemi sitrat tamponunda basınç uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Endojen peroksidaz aktivitesi %3'lük hidrojen peroksit çözeltisi ile bloke edilmiştir. Nonspesifik bağlanmaları engellemek için 15 dakika blokaj (Lab Vision corp, Ultra V block, Fremont CA, USA) uygulanmıştır. Primer antikolar: monoklonal mouse anti- Ki-67 antikor (klon: MB67; Neomarkers, cat no: MS-1006-A1, Fremont, CA, USA); dilüsyon oranı: 1/100; inkübasyon süresi: 60 dakika monoklonal mouse anti-Telomerase (catalitic unit, clon: 44F12, Novocastra, cat no: NCL-h-TERT, Newcastle,



Resim 2: Yüksek Ki-67 oranını gösteren nükleer boyanma (Ki-67 x 310)



Resim 3: Yüksek telomerez aktivitesi ve nükleer noktasal boyanma paterni (Telomerez x 500)

UK; dilüsyon:1/25, inkübasyon süresi: 120 dakika. Sekonder antikor olarak "Biotinylated Goat anti-mouse 20 dakika süreyle (Lab Vision, cat no: TM-125BN, Fremont, CA, USA) kullanılmıştır. Label olarak streptavidin-HRP çözeltisi (Lab Vision, cat no: TS-125-HR), AEC kromojen sistemi (Lab Vision, cat no: TA-125-HA) kullanılmıştır. Mayer-hematoksilen ile 10 dakika zıt boya yapılmıştır. Ki-67 indeksi ve telomerez aktivitesi için eşik değeri %10 kabul edilmiştir. Her iki antijen için de nükleer boyanma pozitif kabul edilmiştir. Pozitif kontrol olarak meme kanserine kullanılmıştır.

İstatistiksel değerlendirme için SPSS 7.5 (Standard package) ve Fischer'in ki-kare testi kullanılmıştır; $p < 0.05$ alınmıştır.

BULGULAR

Çalışma grubunu oluşturan hasta sayısı 35'dir. Bunların 19'u kadın, 16'sı erkektir. Ortalama yaş 19.51, medyan yaş 17'dir. Hasta grubunda en küçük yaş 10, en büyük yaş 60'dır. En sık yerleşim yeri, 15 hastada distal femurdur. Tibia proksimali 11 hasta ile bunu izlemektedir. Bu iki bölge vakaların %74'ünü oluşturmaktadır. Daha az sayıda tutulan diğer bölgeler humerus (5), pelvis (2), fibula(1) ve kostadır. Histolojik alt tip 23 vakada osteoblastik (Resim 1), 8'inde fibroblastik, 2'sinde kondroblastik, birer vakada telenjektatik ve parosteal osteosarkomdur. Parosteal osteosarkom vakasının dediferansiyasyon gösterdikten sonraki tümör dokusu çalışmaya alınmıştır. On dokuz vakada nekroz %90 ve üstüdür. Ortalama nekroz oranı %70.53, medyan %77.50'dir. Yirmi vakada akciğer metastazı saptanmıştır. Tanı sırasında metastaz iki hastada vardır. Hastaların 16'sı tanıdan 8-56 ay, metastazdan 7-33 ay arasında değişen süreler sonunda ile kaybedilmiştir. Hastalar 1-6 yıl değişen sürelerle izlenmiştir. Sağkalım en düşük 8, en yüksek 88 aydır. Bir hasta tanıdan 8 ay sonra kemoterapinin komplikasyonları sonucu, diğer bir hasta da 1.5 yıl sonra sekonder malignite (AML-M4) gelişimi nedeniyle kaybedilmiştir.

Ki-67 indeksi ortalama %17.5, medyan %15'dir. Ki-67 değerleri oldukça geniş bir aralıkta yer almaktadır (%2-50) (Resim 2). Telomerez aktivitesi ortalama %7.23, medyan değer %3'dür; dağılım yine geniş bir aralıkta yer almaktadır.

dır (0-50) (Resim 3). On vakada telomeraz aktivitesi saptanmamıştır. İstatistiksel analizde, metastazın olması sağkalımın kısılması ile anlamlı derecede ilişkili bulunmuştur ($p=0.027$). Nekroz ve sağkalım arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0.99$). Ki-67 indeksi arttıkça, sağkalımda da artma eğilimi görülse de, bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.34$). Telomeraz aktivitesi ve sağkalım ilişkisi anlamsız bulunmuştur ($p=0.76$).

TARTIŞMA

Osteosarkom, genç yaş grubunda sık görülen, myelom dışında kemik maligniteleri içinde birinci sırada yer alan yüksek gradlı bir sarkomdur. Erkeklerde 1.5 kat daha fazla görülmektedir. En sık 10-20 yaşlar arasındadır. Karakteristik yerleşim yeri uzun kemik metafiz bölgesi olup, vakaların %60-70'i diz bölgesindedir (1,3). Vakalarımızda kadın hastaların oranı %54.3'dür. Ortalama yaş 19.51'dir. Serimizde femur alt uç ve tibia üst uç, literatürle de uyumlu olarak %74 ile en sık tutulan bölgedir. Osteosarkomlarda en sık görülen histolojik alt tip osteoblastik tiptir (2,13). Otuz beş vakanın %65'i osteoblastik, %22'si fibroblastik tip, %8'i kondroblastik tiptir. Bir vaka telenjektatik tip olarak sınıflandırılmıştır. Bir vaka ise başlangıçta parosteal osteosarkomdur; ancak nüks sonrası dediferansiyasyon olarak klasik osteosarkoma dönüşmüştür ve çalışma grubuna alınmıştır. Histolojik alt tip ve prognoz ilişkisi hakkında farklı sonuçlar vardır. Son çalışmalardan birisinde kondroblastik osteosarkomda cevabın kötü olduğu, telenjektatik ve fibroblastik tipte daha iyi nekroz cevabı olduğu bildirilmektedir (13). Hauben ve ark. osteoblastik tipte orta derecede cevap, kondroblastik tipte kötü cevap bulmakla birlikte, histolojik alt tip ve prognozu ilişkisiz bulmuşlardır (14). Osteosarkomlarda prognoz için çeşitli faktörler kullanılmaktadır. Bu konuda yeni arayışlar devam etmektedir. Kemoterapi sonrası görülen nekroz oranının %90'dan fazla olması iyi prognostik faktör olarak belirtilse de, prognoz ve nekrozun ilişkisiz olduğunu bulan araştırmacılar da mevcuttur (13). Bielack ve ark., histolojik iyi cevap olduğunda sağkalımı %73.4, kötü cevapta %47.2 bulmuşlardır (15). Başka bir çalışmada ise, hastalıklı sağkalım, yaş, cins, histolojik tip, yer ve çap kemoterapiye cevap ile ilişkisiz bulunmuştur (16). Vakalarımızda nekroz ortalaması %70.53 (median 77.50); %90'ın üzeri iyi cevap %42, %100 tam cevap %5 oranında bulunmuştur. Nekroz ve sağkalım ilişkisi değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.99$). Scotlandi ve ark. preoperatif kemoterapiye cevap ve hastalıklı sağkalım arasında ilişki saptamamışlardır (17). Aynı şekilde Ulaner ve ark da nekroz sağkalım ilişkisini anlamlı bulmamışlardır (18). Nekroz oranı birçok faktöre bağlı olabilir. İlaç rezistansı gibi tümöre ait moleküler mekanizmalar veya hastalara çeşitli nedenlerle istenilen dozun verilemeyeşi bunların başında yer alır. Ulaşılmak istenen doz sosyal, ekonomik veya ilaca bağlı komplikasyonlar nedeniyle verilemeyebilmekte ve tedavi standart gibi gözükse de bazı hastalarda farklı dozlar uygulanabilmektedir. Buna bağlı olarak da istenilen yarar sağlanamamaktadır. Nekroz oranlarımızın kaynaklara göre biraz daha düşük olması buna bağlanabilir. Nekroz ve sağkalım ilişkisi de kısmen bununla, kısmen de hasta grubunun heterojen olması ile açıklanabilir.

Osteosarkomda metastaz genellikle hematogen yolla olur ve en sık akciğerde görülür. Daha nadir olarak beyin ve lenf ganglionu metastazı görülebilir. İlk gelişte metastaz 2 vakamızda mevcuttur. Vakalarımızın 20'sinde (%57) akciğer metastazı gelişmiştir. Bir seride metastaz oranı %47.4'dür (19). Osteosarkomda lokal kontrol vakalarımızda olduğu gibi sağlanabilmekte, ancak uzak metastaz vakaların yaklaşık yarısında görülmektedir. Akciğer metastazlarının tedavisi esas olarak metastazektomidir. Tanı sırasında metastaz olduğunda prognoz daha kötüdür. Kager ve ark'nın çalışmasında ilk tanı sırasında metastaz varsa 5 yıllık sağkalım %29, 10 yıllık sağkalım %24 bulunmuştur (20). Başka bir çalışmada pulmoner metastazların çıkarılmasından sonra 3 yıllık sağkalım %30.4, 5 yıllık sağkalım %12.2 bulunmuştur (21). Vakalarımızda metastaz ve prognoz ilişkisi araştırıldığında, metastazın prognozu olumsuz yönde anlamlı olarak etkilediği bulunmuştur ($p=0.027$). İki vakamızda akciğer metastazına ek olarak hastalığın son dönemlerinde paraözefageal ve pankreas metastazı saptanmış, her iki hasta da bir süre sonra kaybedilmiştir.

Osteosarkomda değişik prognostik faktör arayışı devam etmektedir; bu konuda klinik, immünohistokimyasal ve moleküler birçok çalışma yapılmaktadır. Ki-67, G0 dışındaki tüm aşamalarda proliferasyon hücreleri gösteren bir belirleyicidir. Birçok tümörde malign/benign tümör ayırımında yol gösterici, santral sinir sistemi tümörlerinde de rutin olarak kullanılan bir immünohistokimyasal yöntemdir. Ki-67 indeksi osteosarkomu kapsayan birçok seride araştırılmıştır. Altmış yedi vakalık bir osteosarkom grubunda ortalama Ki-67 indeksi %35.5 bulunmuş, rekürren osteosarkomlarda primere göre çok daha yüksek oran saptanmış ve Ki-67 oranının artmasının büyüme ve lokal invazyon ile ilişkili olduğu bulunmuştur (6). Diğer bir çalışmada 38 osteosarkom vakası içinde, Ki-67 indeksi yüksek olan 17 vakanın 15'inde akciğer metastazı saptanmıştır (19). Daha hızlı proliferasyon olan hücrelerin kemoterapiye de duyarlılığı daha fazla olur düşüncesinden hareketle, Ki-67 indeksi ve nekroz arasında ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. Goto ve ark. bu iki parametre arasında anlamlı bir ilişki bulamamışlardır (22). Lidang ve ark. %24'den az Ki-67 indeksine sahip olan vakaların daha uzun sağkalıma sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir; bu çalışmada Ki-67 ile histolojik alt tip, tümör çapı, p53 ve prognoz arasında ilişki saptanmamıştır (23). Stenzel ve ark. malign kemik tümörlerindeki proliferasyon indeksini, benign tümörlerden belirgin olarak farklı bulmuşlar, ayrıca ilginç olarak benign reaktif bir olay olan myozitis ossifikansın da osteosarkoma yakın proliferasyona sahip olduğunu belirtmişlerdir (24). Park ve ark. 34 osteosarkomun 22'sinde Ki-67 oranını %10'un altında bulmuş ve Ki-67 indeksinin diğer klinik ve patolojik parametrelerle korele olmadığını saptamışlardır (25). Görüldüğü gibi, Ki-67 indeksi osteosarkomları kapsayan çeşitli çalışmalarda farklı oranlarda (%10-35) bulunmuştur. van Oijen proliferasyonu in vitro koşullarda durdurulmuş hücrelerde de Ki-67 varlığını saptamış ve p53 ve p21 overekspresyonu gösteren hücrelerde Ki-67 pozitivitesinin doğruyu yansıtmayabileceğini ileri sürmüştür (26). Ki-67 indeksindeki farklılıklar çeşitli moleküler mekanizmalar, fiksasyon veya laboratuvar koşullarına bağlı olabilir. Oda ve ark.'nın çalışmasında, prostaglandin derived growth factor (+) osteosarkomlarda Ki-67 oranı % 20, negatif olanlarda ise orta-

lama %6.5 bulunmuştur (27). Vakalarımızda Ki-67 oranı ortalama %17.21 (median %15) bulunmuştur. Değerler oldukça geniş bir spektrumda yer almaktadır (2-50). Vaka serisinin çok geniş olmayışı bu gibi uç değerleri ortalama ya yansıtmaktadır. Bazı dokuların çok küçük tru-cut materyali olması, kısmen nekrotik ve hücreden fakir matriks alanları içermesi, Ki-67'nin düşük çıkmasına neden olmuş olabilir. Vakalarımızda Ki-67 yükseldikçe sağkalım düşme eğiliminde olmakla birlikte, bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.34$). Bu sonuca göre, Ki-67 indeksi sağkalımı primer olarak etkileyen bir faktör değildir.

Telomer/telomerase aktivitesi son zamanlarda kanser araştırmalarında sıklıkla yer alan bir konudur. Telomerase aktivitesinin somatik hücrelerde bulunmayışı, sadece germ hücrelerinde ve kök hücrelerinde saptanması, proliferasyonun devamını sağlamak açısından malign tümörlerde de yüksek telomerase aktivitesi olabileceğini düşündürmüştür. Gerçekten de birçok organa ait normal doku, tümör ve tümör dışı patolojilerde telomerase aktivitesi araştırıldığında malign dokularda en yüksek oranlarda saptanmıştır (11,12,28,30). Bir seride 26 osteosarkomdan 22'sinde aktivite gösterilmiştir (11). İskelet sisteminin primer malign tümörlerini kapsayan bir çalışmada ise osteosarkomda telomerase aktivitesi saptanmamıştır (31). Vakalarımızın 10'unda telomerase aktivitesi negatiftir. Gelen dokular genellikle tru-cut materyali olup, hemen fikse edilmişlerdir. Fiksasyon için formalin veya Holland solüsyonları kullanılmıştır. Negatif sonucun fiksasyon ile ilişkili olmadığı düşünülmektedir; negatif vakaların fiksasyonunda her iki fiksatif de kullanılmıştır. Tüm vakalarda aynı gün ve koşullarda immünohistokimyasal yöntem uygulanmıştır. Eldeki verilerle bu negatifliği açıklamak mümkün olmamıştır. Telomerase aktivitesi ortalama %7.23 bulunmuştur. Negatif saptanan 10 vakanın bu ortalama düşürdüğü ve sağkalımla ilişkisi de etkilediği açıktır. Telomerase aktivitesi ve sağkalımla anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0.76$).

Sonuç olarak yaş ortalaması, yerleşim, metastaz ve nekroz oranları açısından kaynaklarla genellikle uyumlu 35 vakalık bir osteosarkom serisi sunulmaktadır. Metastaz cerrahi olarak çıkarılsa da, prognozu anlamlı olarak kötü etkilemektedir. Ki-67 oranındaki yükselme ve ölüm oranındaki artış paralellik göstermekle birlikte, istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmamıştır. Telomerase aktivitesi, oldukça güncel bir konu olup, henüz birçok karanlık nokta içermektedir ve bu konuda geniş standart serilere ve diğer yöntemlerle immünohistokimyasal yöntemlerin birlikte uygulanmasına ihtiyaç vardır. Telomerase aktivitesinin, gelişiminde etkili olduğu bilinen tümörlerin tedavisinde telomerase inhibisyonu araştırılan bir sonraki aşama olacaktır.

KAYNAKLAR

- Vigorita VJ. Orthopaedic Pathology, Chapter 9, Bone Tumors, Lippincott Williams and Wilkins 1999; 326-346.
- Unni KK. Dahlin's Bone Tumors, Chapter 11, Osteosarcoma, Lippincott Raven, fifth ed. 1996; 143-183.
- Fechner RE, Mills SE. Atlas of Tumor Pathology, Third Series, Fascicle 8 ed. J Rosai, AFIP Washington DC, 1992; 38-77.
- Smeland S, Müller C, Alvegard TA, Wiklund T, Wiebe T, Björk O, et al. Scandinavian Sarcoma Group Osteosarcoma Study SSGVIII. Prognostic factors for outcome and the role of replacement salvage chemotherapy for poor histological responders. Eur J Cancer 2002; 39(4): 488-494.

- Serra M, Scotlandi K, Reverter-Branchat G, Ferrari S, Manara MC, et al. Value of p-glycoprotein and clinicopathologic factors as the basis for new treatment strategies in high-grade osteosarcoma of the extremities. J Clin Oncol 2003; 21(3): 536-542.
- Peng TS, Qui JS, Wu HX, Liang HZ, Luo CQ. Expressions of CD44, MMP-9, Ki-67: possible association with invasion, metastasis, and recurrence of osteosarcoma. Ai Zheng 2002, 21(7):745-50.
- Gamberi G, Benassi MS, Bohling T, Ragazzini B, Molendini L, Solla MR et al. C-myc and c-fos in osteosarcoma, prognostic value of mRNA and protein expression. Oncology 1998; 55(6): 556-563.
- Papai Z, Feja CN, Hanna EN, Sztan M, Olah E, Szendroi M. P 53 overexpression as an indicator of overall survival and response to treatment in osteosarcomas. Pathol Oncol Res 1997; 3(1): 15-19.
- Gorlick R, Huvoos AG, Helles G, Aledo A, Beardsley GP, Healey JH et al. Expression of HER2/erbB-2 correlates with survival in osteosarcoma. J Clin Oncol 1999; 17(9): 2781-2788.
- Brown DC, Gatter KC. Ki-67 protein: the immaculate deception?. Histopathology 2002, 40: 2-11.
- Dhaene K, van Marck E, Parwaresch R. Telomeres, telomerase and cancer: an up-date. Virchows Archiv 2000; 437(1): 1-16.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science 1994; 266: 2011-2016.
- Bacci G, Berton F, Longhi A, Ferrari S, Forni C, Biagini R. Neoadjuvant chemotherapy for high grade osteosarcoma of the extremity. Histologic response to preoperative chemotherapy. Cancer 2003; 97(12): 3068-3075.
- Hauben EI, Weeden S, Pringle J, van Marck EA, Hogendoorn PCW. Does the histological subtype of high-grade central osteosarcoma influence the response to treatment with chemotherapy and does it affect overall survival? A study on 570 patients of two consecutive trials of the European Osteosarcoma Intergroup. Eur J Cancer 2002; 38: 1218-1225.
- Bielack SS, Bielack BK, Delling G, Exner U, Flege S, Helmke K, et al. Prognostic factors in high grade osteosarcoma of the extremities or trunk: An analysis of 1702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. J Clin Oncol 2002; 20(3): 776-790.
- Bacci G, Ferrari S, Longhi A, Forni C, Giacomini S, Lari S, et al. Relationship between dose-intensity of treatment and outcome for patients with osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy. Oncol Rep 2001; 8(4): 883-888.
- Scotlandi K, Serra M, Manara MC, Maurici D, Benini S, Nini M, et al. Clinical relevance of Ki-67 expression in bone tumors. Cancer 1995, 75(3): 806-14.
- Ulaner GA, Huang HY, Otero J, Zhao Z, Ben-Porat L, Sadagopan JM, Gorlick R, et al. Absence of a telomerase maintenance mechanism as a favorable prognostic factor in patients with osteosarcoma. Cancer Res. 2003, 63(8): 1759-63.
- Hernandez-Rodriguez NA, Correa E, Sotelo R, Contreras-Paredes A, Gomez-Ruiz C, et al. Ki-67: a proliferative marker that may predict pulmonary metastases and mortality of primary osteosarcoma. Cancer Detect Prev 2001, 25(2): 210-5.
- Kager L, Zoubek A, Potschger U, Kastner U, Flege S, Kempf-Bielack B. Primary metastatic osteosarcoma: presentation and outcome of patients treated on neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group protocols. J Clin Oncol 2003; 21(10): 2011-2018.
- Inoue K, Yamamoto R, Nishiyama N, Hori T, Miyamoto Y, Takehara S. Examination of prognostic factors after resection of pulmonary metastasis of osteosarcoma by multivariate analysis. Osaka City Med J. 1998; 44(1): 35-42.
- Goto A, Kanda H, Ishikawa Y, Matsumoto S, Kawaguchi N, Machinami R, et al. Association of loss of heterozygosity at the p53 locus with chemoresistance in osteosarcomas. Jpn J Cancer Res 1998; 89(5): 539-547.
- Lidang Jensen M, Schumacher B, Sleen Nielsen O, Keller J. Extraskeletal osteosarcomas: a clinicopathologic study of 25 cases. Am J Surg Pathol 1998; 22(5): 588-594.
- Stenzel I, Posl M, Ritzel H, Hentz M, Werner M, Delling G. Cell proliferation in bone tumors. Immunohistologic study of Ki-67 expression. Pathologie 1996; 17(1): 56-62.
- Park HR, Park YK. Expression of p53 protein, PCNA, and Ki-67 in osteosarcomas of bone. J Korean Med Sci 1995, 10(5): 360-367.
- van Oijen MG, Medema RH, Slootweg PJ, Rijkse G. Positivity of the proliferation marker Ki-67 in noncycling cells. Am J Clin Pathol 1998, 110(1): 24-31.
- Oda Y, Wehrmann B, Radig K, Walter H, Rose I, Neumann W, Roessner A. Expression of growth factors and their receptors in human osteosarcomas. Immunohistochemical detection of epidermal growth factor, platelet-derived growth factor and their receptors: its correlation with proliferating activities and p53 expression. Gen Diagn Pathol

