

Sinovyal sarkom: 82 olguda klinikopatolojik değerlendirme

Synovial sarcoma: Clinicopathologic evaluation of 82 cases

Taner AKALIN, Yeşim ERTAN, Gürdeniz SERİN, Gülşen KANDİLOĞLU

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, İZMİR

ÖZET

Bu retrospektif çalışmada 21 yıllık periodda bir merkezde değerlendirilmiş, her yaş grubundan ve nispeten geniş sinovyal sarkom hasta grubu çalışılmıştır.

Yaşları 13 ile 75 arasında değişen (ortalama 34 yaş), 42'si kadın, 40'ı erkek hasta değerlendirildi. Tümörlerin en geniş çapları 1,5 ile 24 cm arasında değişiyordu (ortalama 8,5 cm). Tümör yerleşimleri şu şekilde idi; alt ekstremitelerde (53 olgu), üst ekstremitelerde (16 olgu), gövde (7 olgu) ve baş boyun (3 olgu).

Seksen iki olguya ait 136 materyel histolojik olarak değerlendirildi. Bu olguların 58'i monofazik fibröz tip, 18'i bifazik tip ve 6'sı kötü diferansiye tip sinovyal sarkom idi.

İmmünohistokimyasal olarak monofazik fibröz tip ve kötü diferansiye tip sinovyal sarkom olguları (64 olgu) EMA veya sitokeratin ile pozitif idi. Bu olguların 14'ü EMA pozitif sitokeratin negatif iken, altısı sitokeratin pozitif EMA negatif idi.

Kırk üç hastanın ortalama 47 aylık süre ile takibine ulaşıldı. Bu 43 hastanın 12'sinde hastalığa bağlı ölüm, dokuzunda metastatik hastalık, dokuzunda lokal rekürrens gelişti ve 13'ünde (%30) hastalık bulgusu yoktu.

Sonuç olarak sinovyal sarkom agresif bir tümördür ve radyokemoterapiden değişen oranlarda etkilenmektedir. Sinovyal sarkom olgularının çoğu morfolojik ve immünohistokimyasal bulguların (EMA ve sitokeratinin ikisini de uygulayarak) yardımı ile tanımlanabilirler.

Anahtar sözcükler: Sinovyal sarkom, immünohistokimya, prognoz

SUMMARY

The current retrospective study examined a relatively large group of synovial sarcoma patients of all ages who were evaluated at a single institution over a 21 year period.

There were 42 females and 40 males, whose age ranged from 13 to 75 (median 34 years). The neoplasms measured from 1,5 to 24 cm in greatest diameter (median 8,5 cm). Tumor locations were as follows; lower extremities (53 cases), upper extremities (16 cases), trunk (7 cases) and head-neck (3 cases).

One hundred thirty six material belonging to 82 cases were evaluated histologically. Of these cases, 58 were monophasic fibrous type, 18 were biphasic type and 6 were poorly differentiated type synovial sarcoma. Immunohistochemically, monophasic fibrous type and poorly differentiated type synovial sarcoma cases (64 cases) were positive for EMA or cytokeratin. Of these cases, 14 were EMA positive but cytokeratin negative, however six were cytokeratin positive but EMA negative.

Follow up was available for 43 patients with a duration of median 47 months. Of the 43 patients, 12 died of disease, nine had metastatic disease, nine had local recurrence and 13 (30%) had no evidence of disease.

In conclusion, synovial sarcoma is an aggressive neoplasm and is affected from radiochemotherapy in varying proportions. Most of the synovial sarcoma cases can be diagnosed by the help of morphology and immunohistochemistry (by applying both EMA and cytokeratin).

Key words: Synovial sarcoma, immunohistochemistry, prognosis

GİRİŞ

Sinovyal sarkom klinik ve morfolojik olarak iyi tanımlanmış bir antitedir ve yumuşak do-

ku sarkomların %5-10'luk bölümünü oluşturur (1). Tipik olarak adolesan-genç erişkin dönemde, uyluk-diz ve ayak yerleşiminde görülür.

Histolojik olarak monofazik fibröz, bifazik ve kötü diferansiye formları vardır. En sık görülen monofazik fibröz tipin tanısı için sitokeratin veya EMA pozitifliği önemlidir. Kaynaklarda sinovyal sarkom olgu grubunu oluştururken, morfolojik epitelyal diferansiyasyonu veya immünohistokimyasal olarak sitokeratin veya EMA pozitifliğini gerekli koşul olarak kullanan çalışmaların yanısıra morfolojik bulguları yeterli bulunan çalışmalar vardır (2-4). Son yıllarda sinovyal sarkom için spesifik olan t(X;18)(p11;q11) translokasyonunu göstermek en güvenilir tanı yöntemi olarak ortaya konmuştur (5-6). Moleküler yöntemlerin sinovyal sarkom tanısı için güvenilir olduğu, ancak olguların tümünde mutlaka uygulanması gerekmeyeceği ve tipik olgular da immünohistokimyanın yardımı ile sinovyal sarkom tanısının güvenle konabileceği belirtilmiştir (7).

Bu çalışmada homojen grup oluşturabilmek için sitokeratin veya EMA pozitifliği saptanan sinovyal sarkom olguları ele alındı. Erişkin ve çocuk olguların birlikte değerlendirildiği bir merkeze son 21 yılda gelen sinovyal sarkom olgularının genel klinikopatolojik bulguları tartışıldı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Patoloji Anabilim Dalı'mızda Ocak 1986 - Aralık 2006 tarihleri arasında sinovyal sarkom tanısı almış veya lehine yorum yapılmış olgular retrospektif olarak incelendi. İmmünohistokimyanın uygulanmadığı eski yıllara ait olgulara sitokeratin ve epitelyal membran antijen (EMA) uygulandı. Bifazik sinovyal sarkom olguları yanı sıra sitokeratin veya EMA pozitifliği saptanan monofazik fibröz tip ve kötü diferansiye tip sinovyal sarkom olguları değerlendirmeye alındı.

Çepeçevre normal doku içermeyen olguların tümü marginal eksizyon kabul edildi. Ne-

oadjuvan radyokemoterapi sonrası geniş eksizyon uygulanan olguların tümörlerinden bir dilimin tamamı takibe alınarak nekroz oranları değerlendirildi. İmmünohistokimyasal belirleyicilerden sitokeratin için klon: AE1/AE3 (Dako veya Neomarker), EMA için klon: E29 (Dako), S-100 için klon: 4C4.9 (Neomarker), bcl-2 için klon: bcl-2/100/D5 (Novacastra) kullanıldı.

BULGULAR

Hastalara ait klinikopatolojik bulgular Tablo 1'de verilmiştir. Seksen iki olguya ait 136 materyel değerlendirmeye alındı. Olguların 42'si kadın, 40'ı erkek idi. Yaş ortalaması 34 (13-75) olarak saptandı. Tümör boyutları 1,5 ile

Tablo 1. Olguların klinikopatolojik özellikleri.

Özellikler	Olgu sayısı
Materyel sayısı	136
Hasta sayısı	82
Çalışma periyodu	1986-2006
Cinsiyet	
Kadın	42
Erkek	40
Yaş	
Aralık	13-75
Ortalama	34
Tümör boyutu (cm)	
Aralık	1,5-24
Ortalama	8,5
Histolojik tip	
Monofazik fibröz	58
Bifazik	18
Kötü diferansiye	6
İmmünohistokimya	
EMA veya sitokeratin +	64*
EMA +, sitokeratin -	14
EMA -, sitokeratin +	6
Yerleşim yeri	
Alt ekstremité	53
Üst ekstremité	16
Gövde	7
Baş boyun	3
Neoadjuvan RT-KT**	20
Nekroz oranı %50-90	13
Nekroz oranı < %50	6
Nekroz oranı > %90	1
Takibi olan olgu sayısı	43
Takip süresi (ortalama ay olarak)	47
Hastalığa bağlı ölüm	12
Metastatik hastalık	9
Lokal rektürens	9
Hastalık bulgusu yok	13

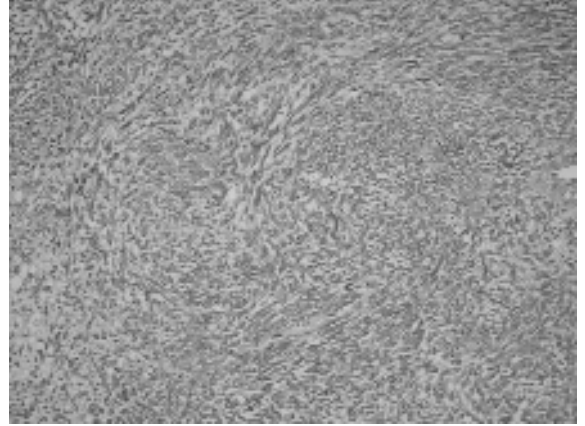
* Monofazik fibröz ve kötü diferansiye sinovyal sarkom olgularının tümü

** RT: radyoterapi, KT: kemoterapi

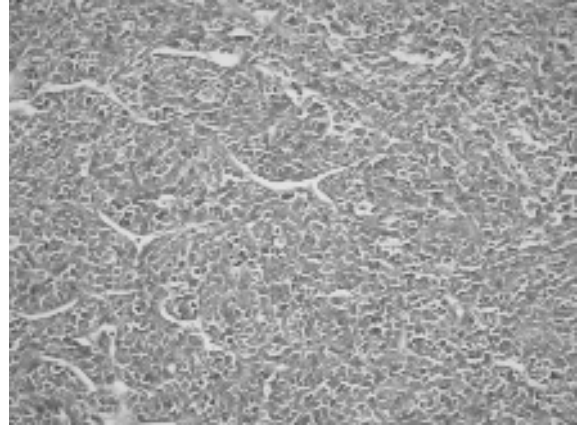
24 cm arasında değişiyordu ve ortalaması 8,5 cm olarak saptandı. Tümör yerleşimi bilinen 79 olgunun 53'ü (%67) alt ekstremitte, 16'sı (%20) üst ekstremitte, yedisi gövde (ikisi mediasten), üçü baş-boyun yerleşimli idi. Alt ekstremitte yerleşimli 53 olgunun 24'ü uyluk-diz (ikisi intraartiküler), 13'ü ayak, 11'i bacak, üçü inguinal ve ikisi de gluteus yerleşimli idi.

Olgulara ait örneklerin 19'u marginal eksizyon, 19'u konsültasyon, 11'i amputasyon, dokuzu geniş eksizyon, dördü biyopsi materyeli idi ve yirmi olguya ise kalın iğne biyopsisi veya açık biopsiyi takiben neoadjuvan radyoterapi veya kemoradyoterapi uygulandı ve daha sonra uygulanan geniş eksizyon materyelleri değerlendirildi. On dokuz marginal eksizyonun on ikisinde çevre normal doku kısmen izlenebilirken yedisinde çevre normal doku görülmedi. On bir amputasyon materyelinin dördü dizaltı, üçü dizüstü, biri hemipelvektomi, üçü kol amputasyonu idi.

Elli sekiz olgu monofazik fibröz tip, 18 olgu bifazik tip (iki olgu epitelyal baskın tip), altı olgu kötü diferansiye sinovyal sarkom idi. Monofazik fibröz tip sinovyal sarkom olgularının histolojik incelemesinde nispeten dar sitoplazmalı oval nukleuslu, tombul-iğsi hücrelerin oluşturduğu kısa düzensiz demet yapıları, değişen oranlarda kollagen, kalsifikasyon ve mast hücreleri izlendi (Resim 1). Monofazik fibröz tip sinovyal sarkom olgularının dördünde tümörün geniş alanlarında klasik sinovyal sarkom hücrelerine göre daha iri-geniş hücrelerin oluşturduğu demetler, epiteloïd görünümlü alanlar ve geniş nekroz alanları yanısıra yüksek mitotik aktivite görüldü ve bu olgular kötü diferansiye sinovyal sarkom olarak değerlendirildi (Resim 2). Kötü diferansiye sinovyal sarkom olarak değerlendirilen diğer iki olgunun birisinin primer eksizyondan yirmi yıl sonraki nüks materyelinden alınan biyopside (ilk tanısı bifazik sinovyal sarkom idi), diğer olgunun ise neoadjuvan radyokemoterapi öncesinde alınan biyopsisinde tümör, tamamen küçük yuvarlak hücrelerin oluşturduğu PNET/Ewing sarkomu görüntüsünde



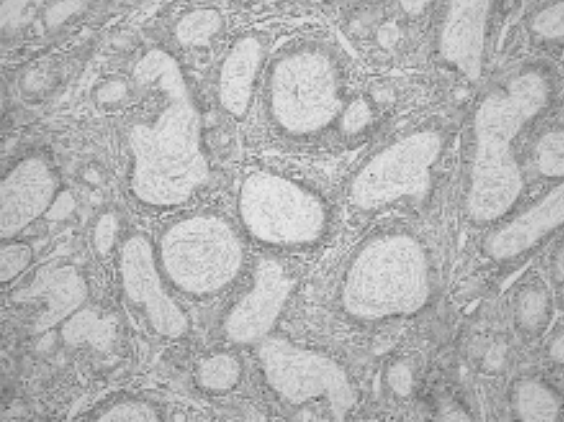
Resim 1. Monofazik fibröz tip sinovyal sarkomda, dar sitoplazmalı tombul iğsi hücrelerin yaptığı düzensiz kısa demetler (HE x200).



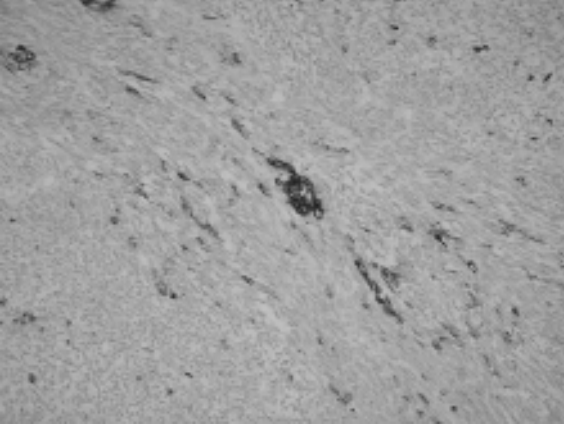
Resim 2. Kötü diferansiye sinovyal sarkomda nukleolusu belirgin epiteloïd görünümlü hücrelerin oluşturduğu solid tabakalar ve hemanjiyoperisitomatöz patern (HE x200).



Resim 3. Bifazik sinovyal sarkomda iğsi hücreler yanı sıra yer yer belirgin glandüler yapılar oluşturan epitelyal diferansiyasyon alanları (HE x100).



Resim 4. Epitelyal baskın bifazik sinovyal sarkomda adenoid yapılar oluşturmuş epitelyal diferansiyasyon alanları yanı sıra arada işsi hücre komponenti (HE x200).



Resim 5. Monofazik fibröz tip sinovyal sarkomda fokal sitokeratin pozitifliği (Pansitokeratin (AE1/AE3) x200).

idi. İkinci olgunun geniş eksizyon materyelindeki canlı tümör alanlarında tipik sinovyal sarkom alanları görüldü. Bifazik sinovyal sarkom olgularının histolojik incelemesinde, monofazik fibröz tip sinovyal sarkom olgularındaki işsi hücrelerin yanı sıra değişen oranlarda oval-yuvarlak hücrelerin oluşturduğu bazen taslak şeklinde bazen iyi gelişmiş glandüler yapılar şeklinde epitelyal diferansiyasyon alanları görüldü (Resim 3). İki olguda ise epitelyal diferansiyasyon alanları tümörün geniş bir bölümünü oluşturuyordu (Resim 4).

Elli sekiz monofazik fibröz tip ve altı kötü diferansiye sinovyal sarkom olgusunun tümünde sitokeratin veya EMA pozitifliği saptandı. On dört olguda EMA pozitif sitokeratin negatif

iken altı olguda sitokeratin pozitif EMA negatif idi. İmmünohistokimyasal pozitiflik genellikle fokal idi (Resim 5). Bcl-2 uygulanan 23 olgunun yirmisinde bcl-2 pozitifliği saptandı ve bu olguların 17'sinde diffüz (tümör hücrelerinin yarısından çoğunda pozitif) özellikte idi. Yirmi üç olgunun sekizinde ise fokal S-100 pozitifliği saptandı.

Neoadjuvan tedavi sonrası nekroz oranları değerlendirilen 20 olgunun 13'ünde nekroz oranı %50 ile %90 arasında iken, altısında %50'den az, birisinde ise %90'dan fazla idi.

En az on beş ay takibi olan olgular arasında 43 olgunun takibine ulaşıldı. Takip süresi 15 ay ile 20 yıl arasında değişiyordu ve ortalama süre 47 ay idi. Kırk üç olgunun on ikisi tümöre bağlı ölürken (ortalama 30 ay), yedisi akciğer, ikisi lenf nodu-yumuşak doku olmak üzere dokuz olguda metastaz (ortalama 21 ay), dokuz olguda da nüks (ortalama 66 ay) saptandı. Ortalama 70 aylık takibi olan on üç olguda nüks veya metastaz görülmedi.

TARTIŞMA

Sinovyal sarkom ışık mikroskopik düzeyde, immünohistokimyasal olarak veya elektron mikroskopik incelemede saptanabilen mezenkimal ve epitelyal diferansiyasyon bulguları gösteren yumuşak doku tümürüdür. Bifazik sinovyal sarkom olgularında genellikle tanı sorunu yaşanmaz. Monofazik fibröz tip sinovyal sarkom olgularının ise morfolojik olarak özellikle fibrosarkom, malign periferik sinir kılıfı tümörü ve soliter fibröz tümör/hemanjiyoperisitomdan ayrımı gereklidir. İmmünohistokimyasal yöntemlerin rutine girmesinden sonra monofazik fibröz tip sinovyal sarkom olgularının tanısı daha güvenle konabilmektedir. Son yirmi yıl içinde immünohistokimyanın rutine girmesi ile birlikte sinovyal sarkomun yumuşak doku sarkomları içinde görülme oranı artmıştır. Kaynaklarda monofazik fibröz tip sinovyal sarkomda sitokeratin veya EMA saptanma oranı %70-100 arasında değişmektedir (8-10). İlk yapılan çalışma-

lar monofazik fibröz tip sinovyal sarkom olgularında sitokeratinin EMA'ya göre daha yüksek oranda ve daha güçlü pozitif olduğu şeklindedir (8,9). Ancak son yıllarda yapılan, sinovyal sarkom için spesifik olan t(X:18) (SYT-SSX) translokasyonu pozitif 60 olgunun immünohistokimyasal yöntemle incelendiği bir çalışmada, monofazik fibröz tip sinovyal sarkom olgularının tümü EMA ile pozitif iken, sitokeratin pozitifliği olguların %70'inde saptanmıştır (10). Bu çalışmada da sitokeratin ve EMA uygulanan monofazik fibröz tip ve kötü diferansiye sinovyal sarkom olgularının 14'ünde EMA pozitif, sitokeratin negatif iken, altı olguda sitokeratin pozitif, EMA negatif saptanmıştır. Sonuç olarak monofazik fibröz tip sinovyal sarkom olgularında, EMA pozitifliği daha yüksektir, ancak her iki immünohistokimyasal belirleyici birlikte kullanılmalıdır. Ayrıca yumuşak doku tümörlerinde EMA, sitokeratine göre daha az spesifik olduğundan özellikle morfolojik olarak tipik olmayan olgularda her iki belirleyicinin pozitifliğini görmek daha güvenli olacaktır.

Son yıllarda prospektif 204 olgunun değerlendirildiği bir çalışmada sinovyal sarkom için spesifik t(X;18) (SYT-SSX) translokasyonu, sinovyal sarkom olma olasılığı yüksek olguların %80'inde, sinovyal sarkomun öncelikli tanını olmadığı olguların ise %24'ünde saptanmıştır. Yazarlar sonuç bölümünde, klinik, histolojik ve immünohistokimyasal bulgular ışığında sinovyal sarkom tanısı yüksek-muhtemel olan olgular için moleküler yöntemlerin kullanılmasının mutlaka gerekli olmadığı, ancak sinovyal sarkom tanısının olasılıklar arasında bulunması durumunda moleküler yöntemlerin tanıya çok yardımcı ve hatta gerekli olduğunu belirtmişlerdir (7).

Bu çalışmada immünohistokimyasal olarak sitokeratin veya EMA ile pozitifliği saptanan sinovyal sarkom olguları ile tanısal anlamda homojen bir grup oluşturuldu.

Sinovyal sarkomun yaş ortalamasının 26,5 ile 35 arasında olduğu belirtilmektedir (1). Bu çalışmada sinovyal sarkom olgularının yaş orta-

laması 34 olarak saptandı.

AFIP serisinde 345 sinovyal sarkom olgusunun %60'ının alt ekstremitede yerleştiği, bunun da yarısının uyluk ve diz bölgesinde olduğu belirtilmiştir (1). Bu serideki olguların %67'si alt ekstremitede yerleşimli olup bunların da yaklaşık yarısı uyluk ve diz bölgesindedir.

Son yıllarda ardışık 121 sinovyal sarkom olgusunun incelendiği bir çalışmada olguların %60'ının monofazik fibröz tip sinovyal sarkom, %40'ının ise bifazik tip sinovyal sarkom olduğu bildirilmiştir (4). Bu çalışmadaki sinovyal sarkom olgularının %71'i monofazik fibröz tip, %22'si bifazik tip (2 olgu epitelyal baskın), %7'si kötü diferansiye tip idi.

Son yıllarda sinovyal sarkom tanısında kullanılabilen önerilen bcl-2'nin (11) daha sonraki çalışmalarda sinovyal sarkom için spesifik olmadığı gösterilmiştir (12). Bu çalışmada da 23 olgunun 20'sinde bcl-2 ile pozitif (17'si diffüz pozitif) sonuç alındı.

Diğer immünohistokimyasal belirleyicilerden S-100'ün sinovyal sarkom olgularında %38 oranında pozitif olabileceğini, özellikle malign periferik sinir kılıfı tümörü ile ayrımı ile ilgili olarak, akılda tutmak gerekir (7). Bu çalışmada S-100 çalışılan olguların %35'inde fokal pozitif sonuç alındı.

Neoadjuvan radyokemoterapi tedavisi ile küçültülen tümörlerin ekstremiteyi koruyarak güvenli cerrahi sınırlar ile çıkartılması mümkün olabilmektedir. Bu yöntem, çalışmadaki yirmi olguya uygulanmıştır. Bu olguların eksizyon materyellerindeki nekroz oranları; yirmi olgunun 13'ünde %50 ile %90 arasında, altısında %50'den az iken, bir olguda %90'dan fazla saptandı. Sinovyal sarkom klinik olarak kemosensitif grupta ele alınan bir tümördür (13,14) ancak İngilizce kaynaklarda bugüne kadar neoadjuvan radyokemoterapi sonrası eksizyon materyelindeki nekroz oranlarının histopatolojik değerlendirmesinin yapıldığı bir çalışma yayımlanmamıştır. Bu çalışmada sinovyal sarkomun radyokemoterapiye değişen oranlarda yanıt verdiği gözlemlendi.

Sinovyal sarkom, önceleri agresif yumuşak doku sarkomu olarak bildirilmiş ve 5 yıllık ve 10 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %50-55 ve %20-38 olarak verilmiştir (1,2). Ancak son yıllarda 5 cm'den küçük boyut, 20 yaş altı, düşük mitoz ve kötü diferansiye alanların olmaması gibi parametrelere sahip düşük risk grubundaki hastalarda 5 yıllık sağkalımın %88 oranına yükselebildiği bildirilmiştir (4). Bir merkezden 271 olgunun çalışıldığı sinovyal sarkom serisinde 5 yıllık hastaliksız sağkalım oranı %37 olarak verilmiştir (14). Bu çalışmada takibi olan 43 olgunun %70'inde nüks veya metastaz görülmesi veya ölüm ile sonuçlanması sinovyal sarkomun agresif bir tümör olduğu yönünde bir bulgudur. Ancak olguların tedavi yaklaşımları arasındaki farklılıklar nedeniyle istatistiksel değerlendirme yapılmamıştır. Prognoz ile ilgili sağlıklı bulgulara, ancak benzer tedavi modelleri uygulanmış, uzun süreli takibi olan geniş serilerin değerlendirilmesi ile ulaşılabileceğini düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

1. Weiss S, Goldblum JR. Synovial sarcoma. In: Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors. 4th ed. St Louis: Mosby, 2001. p.1483-1509.
2. Oda Y, Hashimoto H, Tsuneyoshi M, Takeshita S. Survival in synovial sarcoma. A multivariate study of prognostic factors with special emphasis on the comparison between early death and long-term survival. *Am J Surg Pathol* 1993;17:35-44.
3. Machen SK, Easley KA and Goldblum JR. Synovial sarcoma of the extremities. A clinicopathologic study of 34 cases, including semi-quantitative analysis of spindled, epithelial and poorly differentiated areas. *Am J Surg Pathol* 1999;23:268-275.
4. Bergh P, Meis-Kindblom JM, Gherlinzoni F, Berlin O, Bacchini P, Bertoni F, et al. Synovial sarcoma. Identification of low and high risk groups. *Cancer* 1999;85:2596-2607.
5. Clark J, Rocques PJ, Crew AJ, et al. Identification of novel SYT and SSX involved in the t(X;18) (p11.2; q11.2) translocation found in human synovial sarcoma. *Nat Genet* 1994;7:502-508.
6. Guillou L, Coindre JM, Gallagher G, Terrier P, Gebhard S, Somerhausen NSA, et al. Detection of the synovial sarcoma translocation t(X;18) (SYT;SSX) in paraffin-embedded tissues using reverse transcriptase-polymerase chain reaction: a reliable and powerful diagnostic tool for pathologist. A molecular analysis of 221 mesenchymal tumors fixed in different fixatives. *Hum Pathol* 2001;32:105-112.
7. Coindre JM, Pelmus M, Hostein I, Lussan C, Bui BN, Guillou L. Should molecular testing be required for diagnosing synovial sarcoma? A prospective study of 204 cases. *Cancer* 2003;15:98(12),2700-2707.
8. Fisher C. Synovial sarcoma: Ultrastructural and immunohistochemical features of epithelial differentiation in monophasic and biphasic tumors. *Hum Pathol* 1986;17:996-1008.
9. Ordonez NG, Mahfouz SM, Mackay B. Synovial sarcoma: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Hum Pathol* 1990;21:733-749.
10. Pelmus M, Guillou L, Hostein I, Sierankowski G, Lussan C, Coindre JM. Monophasic fibrous and poorly differentiated synovial sarcoma. Immunohistochemical reassessment of 60 t(X;18)(SYT-SSX) positive cases. *Am J Surg Pathol* 2002;26:1434-1440.
11. Hirakawa N, Naka T, Yamamoto I, Fukuda T, Tsuneyoshi M. Overexpression of bcl-2 protein synovial sarcoma: A comparative study of other soft tissue spindle cell sarcomas and an additional analysis by fluorescence in situ hybridisation. *Hum Pathol* 1996;27:1060-1065.
12. Suster S, Fisher C, Moran C. Expression of bcl-2 oncoprotein in benign and malignant spindle cell tumors of soft tissue, skin, serosal surfaces and gastrointestinal tract. *Am J Surg Pathol* 1998;22:863-872.
13. Cechetto G, Alaggio R, Dall'Igna P, Bisogno G, Ferrari A, Gigante C, et al. Localized unresectable non-rhabdo soft tissue sarcomas of the extremities in pediatric age: results from the Italian studies. *Cancer* 2005;1;104(9):2006-2012.
14. Ferrari A, Gronchi A, Casanova M, Meazza C, Gandola L, Collini P, et al. Synovial sarcoma: a retrospective analysis of 271 patients of all ages treated at a single institution. *Cancer* 2004;101:627-634.