

Diagnostyka molekularna

Janusz A. Siedlecki

Mechanizm nowotworzenia związany jest przede wszystkim z powstawaniem zmian w materiale genetycznym komórki. Poznanie mechanizmów molekularnych prowadzących do rozwoju nowotworu, w tym przede wszystkim poznanie mutacji prowadzących do rozwoju mięsaków, przyczyniło się do powstania różnego rodzaju testów molekularnych umożliwiających zarówno wykrycie, jak i przewidywanie przebiegu choroby. Jednak w przypadku większości mięsaków brak jest jak dotąd bardziej szczegółowych danych na temat molekularnej etologii choroby. Jak dotąd potrafimy jedynie powiązać niektóre zmiany z przebiegiem niektórych mięsaków. W ostatnich latach okazało się również, że informacja na temat molekularnego przebiegu procesu karcynogenezy może nie tylko stać się podstawą do rozpoznania choroby, ale także do wyboru odpowiedniego schematu leczenia i odpowiedniego schematu dawkowania. Biologia molekularna oferuje wiele narzędzi do badania zmian w genomie. Narzędzia te stwarzają możliwość wykonania badania nie tylko na próbce pobranej z guza, ale również w próbkach moczu, krwi czy płynu chłonnego.

Metody molekularne można podzielić na dwie zasadnicze grupy. Do pierwszej grupy zaliczamy te, które oparte są o badania tzw. markerów biochemicznych. Do drugiej te, które pozwalają na analizę zmian w genomie, transkryptomie czy proteomie, czyli na badanie tzw. markerów genowych.

Markery biochemiczne

Markerami biochemicznymi (zwanymi też bardzo często markerami nowotworowymi) są najczęściej białka (ich epitopy) lub aktywności enzymatyczne odzwierciedlające proliferację, różnicowanie lub obumieranie komórek. Ponieważ markery te odzwierciedlają procesy zachodzące zarówno w komórkach prawidłowych, jak i nowotworowych, główny problem polega na wypracowaniu wzorców różnicujących stan markera w komórce prawidłowej od stanu markera w komórce nowotworowej. Czasami, choć bardzo rzadko, białka te występują w komórce nowotworowej w zmienionej postaci. Najczęściej jednak mamy do czynienia jedynie ze zmianą stężenia. Oznacza to, że oznaczanie markerów biochemicznych musi pociągać za sobą stosowanie norm pozwalających na odróżnienie stanu komórki prawidłowej od nowotworowej. Markery te najczęściej oznaczane są w surowicy krwi. Ich obecność lub zmiany w stężeniu ujawnia się za pomocą przeciwciał mono- i poliklonalnych. Markery biochemiczne rzadko kiedy są specyficzne dla danego typu nowotworu. Częściej mamy do czynienia z przypadkami, gdy dany marker jest charakterystyczny dla wielu jednostek chorobowych. Przybliżone wzorce są na ogół podawane przez producentów odpowiednich zestawów, ale każde laboratorium musi dodatkowo ustalić własne zakresy normy.

Tabela 1. Niektóre z genów, w których obserwuje się mutacje w mięsakach tkanek miękkich

Typ genu		
Onkogeny	Receptory	<i>c-KIT, PDGFR, IGF1R,</i>
	Czynniki wzrostu	<i>VEGF, FGF, SCF</i>
	Cykliny	<i>Cyklina D1, PCNA,</i>
	Inne	<i>MDM2, beta-kenina, CD44</i>
Geny supresorowe		<i>WT1, TP53, RB, MTS1 (p16, p14^{ARF})</i>
Geny stabilizujące		?

Markery genetyczne

Markerem genetycznym jest zwykle zmiana w strukturze, sekwencji lub ekspresji materiału genetycznego. Markery genetyczne (zwane też często markerami molekularnymi) znajdują obecnie zastosowanie w diagnozowaniu chorób nowotworowych, prognozowaniu ich przebiegu, a także jak wykazano niedawno mogą mieć wpływ na wybór terapii. W ostatnich latach markery genetyczne znajdują też zastosowanie w badaniach predyspozycji do zapadania na choroby nowotworowe.

Podobnie jak w wielu innych chorobach nowotworowych czynniki genetyczne odgrywają kluczową rolę w inicjacji i progresji mięsaków. Mutacje w genach w macierzystych komórkach mezenchymalnych mogą przyczynić się do rozwoju zróżnicowanych klonów komórek nowotworowych a więc do różnych rodzajów mięsaków. Analiza materiału genetycznego umożliwia identyfikację zmian (mutacji) charakterystycznych dla komórki, która uległa transformacji. Zmiany obserwuje się zarówno w onkogenach, jak i w genach supresorowych. Niestety w genomie komórki o fenotypie nowotworowym nie mamy do czynienia z pojedynczą zmianą. Przeważnie jest ich znacznie więcej (od kilku do nawet kilkunastu). W tej sytuacji powstaje pytanie, czy wykrycie pojedynczej mutacji może oznaczać, że mamy do czynienia z komórką nowotworową. Pewne zmiany występują bowiem we wczesnych stadiach karcynogenezy, kiedy komórka nie ma jeszcze fenotypu nowotworowego. Nie znaczy to wcale, że pojedyncza zmiana nie może służyć jako genetyczny marker nowotworowy. Trzeba jednak zdawać sobie sprawę z pewnych ograniczeń w interpretacji. Znalezienie związku między mutacjami w określonym genie, czy nawet w określonej pozycji danego genu, a rakiem oraz jego agresywnością należy do rzadkości. W przypadku mięsaków mamy do czynienia z nieco inną sytuacją. Cechą charakterystyczną mięsaków tkanek miękkich jest częste występowanie rearanżacji chromosomowych. Takie zmiany prowadzą zwykle do powstania genów hybrydowych. Obecność takich genów można wykryć za pomocą klasycznej lub molekularnej cytogenetyki bądź za pomocą technik biologii molekularnej takich jak np. PCR.

Ostatnie półwiecze zaowocowało odkryciem wielu związków między obecnością zmian w genomie a przebiegiem choroby nowotworowej. To nasunęło pomysł, że zmiany w określonych genach mogą być wykorzystane jako marker prognozujący przebieg choroby (tab. 1). Dodatkowo szczegółowe analizy statystyczne pozwalają na wyciąganie wniosków dotyczących czasu do wznowy procesu chorobowego oraz pięcio- i dziesięcioletnich przeżyć bez wznowy choroby.

Zjawiskiem obserwowanym w komórkach nowotworowych, w tym również w mięsach tkanek miękkich i kości, jest amplifikacja onkogenów. Zwielokrotnienie liczby kopii onkogeny jest zwykle wynikiem błędów replikacyjnych i najczęściej prowadzi do stymulacji proliferacji. Amplifikacja genu jest możliwa do wykrycia zarówno metodami immunochemicznymi za pomocą przeciwciał monoklonalnych, jak i metodami molekularnymi z wykorzystaniem odpowiednich sond lub przy wykorzystaniu techniki PCR. W większości przypadków amplifikacja onkogeny wiąże się z agresywnością nowotworu.

Metodyka oznaczania markerów genetycznych

Biologia molekularna oferuje cały panel metod pozwalających na oznaczanie obecności markera genetycznego. Starsze techniki takie jak hybrydyzacja czy RFLP praktycznie nie są już stosowane. Najczęściej posługujemy się dziś technikami wykorzystującymi reakcję łańcuchową polimerazy. Materiałem amplifikowanym jest zawsze DNA, ale analizowanym materiałem może być zarówno RNA (RT-PCR) jak i DNA (PCR, LCR, PCR-RFLP, MS-PCR). Techniki te umożliwiają w stosunkowo prosty sposób wykazanie obecności zmian charakterystycznych dla danego typu nowotworu. Materiał genetyczny do analizy może być izolowany zarówno bezpośrednio z guza (biopsje cienko- i gruboigłowe, materiał operacyjny), ale też z innych źródeł pod warunkiem, że komórki nowotworowe mogą się tam przedostać (krew, mocza, chlónka, kał). Dzięki technice PCR możliwe jest otrzymanie nawet ponad miliarda kopii analizowanego fragmentu DNA. Tak duże wzmocnienie pozwala na wykrycie zmian w materiale genetycznym nawet pojedynczej komórki. Trzeba sobie jednak zdawać sprawę z ograniczeń techniki PCR. Jest to metoda, która może prowadzić do otrzymywania wyników zarówno fałszywie dodatnich, jak i fałszywie ujemnych. Mogą być one wynikiem zarówno zanieczyszczenia próbki, jak i obecności czynników hamujących enzymy prowadzące proces amplifikacji. Dlatego laboratoria posługujące się tymi technikami powinny mieć opracowane odpowiednie procedury ograniczające możliwość popełnienia błędów.

Human Genome Project (HGP) stworzył podwaliny pod techniki pozwalające na jednoczesne skanowanie zmian w wielu genach. Chociaż już wcześniej istniały możliwości analizy wielu zmian w pojedynczych genach, to dopiero stworzenie mikromacierzy DNA (czasami używa się terminu mikrochip) pozwoliło na obserwację zmian w wielu genach równolegle. Mikromacierze pozwalają nie tylko na analizę zmian w genach. Możemy dzięki nim obserwować również zmiany w obrazie ekspresji, a co za tym idzie, określać różnice między komórką prawidłową i nowotworową. Wraz z narodzeniem się tych nowych technik pojawiło się pytanie na ile obraz ekspresji charakteryzuje dany nowotwór. Rozrost nowotworowy składa się przecież z co najmniej kilku klonów komórek o różnym stopniu uszkodzenia, a co za tym idzie o różnym profilu ekspresji. Dodatkowo komórki nowotworowe nie mają charakteru hodowli zsynchronizowanej, a wiadomo, że ekspresja określonych genów ulega zmianom w zależności od fazy cyklu komórkowego. Ponadto w obrębie guza poza komórkami nowotworowymi znajdują się limfocyty oraz fibroblasty. Tak więc otrzymany wynik jest zawsze wyrazem pewnego uśrednienia. Pociąga to za sobą konieczność uświadomienia sobie, że pobierając tkankę z różnych miejsc guza możemy otrzymać całkiem inne wyniki. Dlatego coraz częściej do analizy wykorzystuje się komórki nowotworowe wyodrębnione z guza za pomocą mikrodysektora. Dodatkowo należy uświadomić sobie, że interpre-

Tabela 2. Analiza cytogenetyczna wybranych mięsaków		
Typ mięsaka	Aberracje cytogenetyczne	Geny fuzyjne
Mięsak Ewinga/PNET	t(11;22)(q24;q12) t(21;22)(q22;q12) t(7;22)(p22;q12) t(2;22)(q33;q12) t(17;22)(q12;q12)	<i>FLI1/EWS</i> (~90%) <i>ERG/EWS</i> (~5%) <i>ETV1/EWS</i> (<5%) <i>FEV/EWS</i> <i>EWS/EIAF</i>
DSRCT	t(11;22)(p13;q12)	<i>WT1/EWS</i> (>90%)
Clear cell sarcoma	t(12;22)(q13;q12)	<i>ATF1/EWS</i> (>75%)
Sarcoma synoviale	t(X;18)(p11;q11)	<i>SSX1, SSX2 / SYT</i> (~90%)
Rhabdomyosarcoma alveolare	t(2;13)(q35;q14) t(1;13)(p36;q12)	<i>PAX3/FKHR</i> (~70%) <i>PAX7/FKHR</i> (~10%)
Liposarcoma myxoides	t(12;16)(q13;p11) t(12;22)(q13;q12)	<i>CHOP-TLS (FUS)</i> (~90%) <i>EWS/CHOP</i> (~5%)
Chondrosarcoma myxoides extraskeletale	t(9;22)(q22;q12) t(9;17)(q22;q11)	<i>TEC(CHN)/EWS</i> (>75%) <i>RBP56/CHN</i>
Dermatofibrosarcoma protuberans	t(12;15)(p13;q25) t(17;22)(q22;q13) Chromosom pierścieniowy	<i>ETV6-NTRK3</i> (>50%) <i>COL1A/PDGFRB</i> (>80%)
Sarcoma epithelioides	LOH (22)(q??) t(8;22)(q22;q11)	? <i>NF2</i> ? <i>EWS</i>
Alveolar soft part sarcoma	t(X;17)(p11;q25)	<i>TFE3-ASPL</i>
Malignant rhabdoid tumor	del (22)(q11.2)	
Lipoma	Zmiana (12)(q13-15) t(3;12)(q27-28;q14-15)	<i>HMGI-C</i> <i>LPP/HMGIC</i>
Neurillemoma	-22, del (22)(q??)	Utrata <i>SCH</i>
Neurofibromatosis (choroba von Recklinghausena)	17q11.2	Utrata <i>NF1</i>

DSRCT – desmoplastic small round cell tumor, PNET – primitive neuroectodermal tumor, GIST – gastrointestinal stromal tumor

tacja tak ogromnej ilości danych, które jednorazowo otrzymuje się z mikromacierzy opiera się na komputerowej analizie przeprowadzonej za pomocą wysublimowanych programów statystycznych. W znacznym stopniu wynik takiej analizy zależy od doboru programu interpretacyjnego. Mimo tych mankamentów w oparciu o mikromacierze podejmowane są nie tylko próby wyodrębnienia nowych markerów, ale również stworzenia nowej molekularnej klasyfikacji nowotworów. Ta nowa klasyfikacja oparta jest o tzw. sygnatury nowotworowe. Sygnatura jest najczęściej obrazem zmian w kilkunastu do kilkudziesięciu genach, które wydają się najlepszymi markerami danej jednostki chorobowej. Jeżeli przyjąć założenie, że tak naprawdę ważne są pewne zmiany kierunkowe, a nie ilościowe, możliwe staje się wyodrębnienie nowych grup progno-

stycznych. Już dziś, przynajmniej w kilku rodzajach nowotworów, można wyodrębnić grupy, w których określona terapia (lub jej brak) okazuje się skuteczniejsza. Czy zatem możemy się spodziewać rewolucji w diagnostyce i prognozowaniu przebiegu choroby, a co za tym idzie odwrócenia się od klasycznej patologii i klasycznych czynników rokowniczych? Raczej nie, a przynajmniej nie przez najbliższe kilkanaście lat. Na razie mikromacierze dostarczają ogromnej ilości danych, które musimy nauczyć się w odpowiedni sposób interpretować.

Zastosowanie markerów biochemicznych w mięsakach

W przypadku mięsaków tkanek miękkich i kości nie dysponujemy żadnymi wiarygodnymi markerami biochemicznymi. Badania prowadzone w różnych placówkach naukowych, w tym również w Centrum Onkologii wskazują, że w przypadkach mięsaków niektóre cytokiny mogą służyć jako markery prognostyczne. W przypadku mięsaków tkanek miękkich są to interleukiny 6 i 8.

Zastosowanie markerów genetycznych

Translokacje chromosomowe to najczęściej obserwowane zmiany w wielu różnych nowotworach. Przemieszczenie się materiału genetycznego w wyniku translokacji prowadzi do powstania genów hybrydowych. W mięsakach translokacji ulegają głównie obszary zawierające czynniki transkrypcyjne lub aktywatory bądź represory transkrypcji. Prowadzi to do stanu, w którym najczęściej czynnik transkrypcyjny w wyniku translokacji dostaje się albo pod silny promotor lub sekwencje wzmacniające, albo następuje trwała aktywacja czynnika transkrypcyjnego. Jeżeli materiał genetyczny, który uległ translokacji zawiera geny istotne dla prawidłowego przebiegu takich procesów jak różnicowanie, proliferacja czy apoptoza, to może to prowadzić do zaburzenia procesu przekazywania sygnału i inicjować proces karcynogenezy. Przykładowo, w mięsaku Ewinga najczęściej, bo w ponad 80% przypadków, obserwowana jest translokacja $t(11;22)(q24;q12)$. W jej efekcie gen *EWS* zlokalizowany na chromosomie 22q12 o nieznannej jeszcze funkcji ulega fuzji z genem *FLI-1* kodującym czynnik transkrypcyjny z rodziny ETS. Rodzina ta składa się z 5 członków FLI1, ERG, ETV, FEV, E1AF. W mięsakach Ewinga obserwuje się też inne rzadsze translokacje, np. $t(11;22)(p13;q12)$, w której dochodzi do fuzji między genem *EWS* a genem *WT1* czy $t(21;22)(q22;q12)$, gdy obserwuje się fuzję genu *EWS* z innym członkiem rodziny *ETS* - genem *ERG*. Białka fuzyjne EWS/ETS służą w komórce jako niepełnowartościowe czynniki transkrypcyjne, co prowadzi do uaktywnienia innych zestawów genów niż te, dla których czynnikiem transkrypcyjnym są geny z rodziny ETS.

Wydaje się, że translokacje chromosomowe są jednym z głównych wydarzeń w procesie karcynogenezy mięsaków. Wiele typów mięsaków tkanek miękkich i kości cechuje charakterystyczna translokacja. Ale też w wielu różnych typach mięsaków obserwuje się translokacje występujące w tych samych rodzinach genów. Klasycznym przypadkiem jest właśnie gen *EWS*. Translokacje z jego udziałem są charakterystyczne zarówno dla mięsaka Ewinga, jak i dla mięsaka jasnokomórkowego $t(12;22)(q13;q12)$ czy desmoplastic small-round cell tumor (DSRCT) $t(11;22)(p13;q12)$.

Najczęściej spotykane zaburzenia molekularne występujące w nowotworach tkanek miękkich podsumowano w tabeli 2.

Równie częstą zmianą obserwowaną w przypadku mięsaków jest utrata heterozygotyczności (LOH). Obserwujemy ją u około 20% wszystkich chorych. Delecje czę-

sto obejmują chromosom 9p21 – ten obszar zawiera gen *INK4A* (*p16*), chromosom 1p – w tym obszarze znajduje się wiele słabiej scharakteryzowanych genów czy chromosom 17p13 – ten obszar zawiera gen *TP53*.

Mutacje a wybór terapii

Przykładem, w którym badania mutacji okazały się niezmiernie przydatne przy wyborze terapii są mięsaki podścieliska przewodu pokarmowego (GIST – gastrointestinal stromal tumor). Nowotwory te wywodzą się prawdopodobnie z prekursorów komórek Cajala. Badania molekularne ujawniły, że cechą charakterystyczną 95% tego typu nowotworów jest obecność mutacji w genach *c-KIT* lub/i *PDGFR*. Większość mutacji *KIT* występuje w eksonie 11 (około 70%), rzadziej w eksonie 9 (6-8%). Mutacje mogą też występować w eksonach 13 i 17. W GIST, w których nie ma mutacji *KIT*, występują mutacje w genie *PDGFRA*. Mutacje w tym genie występują w 2 eksonach *PDGFRA* (głównie 18 i w mniejszym stopniu 11). W przypadkach GIST, w których nie obserwuje się dodatniego barwienia na CD117 (epitop c-KIT) mimo wszystko zalecane jest wykonanie sekwencjonowania w celu poszukiwania mutacji. W GIST obserwuje się też inne zmiany. Do najczęstszych należą utrata chromosomu 14q32, chromosomu 22q11.2 i chromosomu 1p36.

Okazało się, że w kontekście procesu leczenia ważne jest nie tylko stwierdzenie uszkodzenia w danym genie, ale również zbadanie, w którym miejscu danego genu taka zmiana wystąpiła. Ma to szczególne znaczenie w przypadku leków nakierowanych na zahamowanie określonego procesu metabolicznego. Zmiana struktury produktu genowego wywołana przez mutację może bowiem w znaczący sposób obniżyć dynamikę oddziaływania z inhibitorem. Jak dotąd znamy jedynie jeden taki przypadek, ale należy się spodziewać, że w stosunkowo krótkim czasie tego typu informacje będą coraz częstsze. Tym przypadkiem, w którym udowodniono związek między dawką leku a umiejscowieniem mutacji jest właśnie GIST. Wykazano, że chorzy mający mutacje w eksonie 11 genu *KIT* i w eksonie 12 genu *PDGFRA* odnoszą korzyść terapeutyczną przy dawce dobowej leku 400 mg podczas, gdy chorzy posiadający mutację w eksonie 9 genu *KIT* korzyść terapeutyczną odniosą dopiero przy dawce 800 mg.

Markery tkankowo specyficzne

Jedną z najpoważniejszych przyczyn zgonów z powodu nowotworu są przerzuty. Technika odwrotnego PCR (wyzolowany mRNA specyficzny dla danego typu komórek przekształca się początkowo w cDNA, aby następnie poddać go amplifikacji), oparta na badaniu tkankowo specyficznych markerów, pozwala na znalezienie nawet kilkuset komórek nowotworowych krążących we krwi obwodowej. W przypadku mięsaków technika ta znajduje swoje zastosowanie. Jako marker można wykorzystywać zarówno mRNA genu fuzyjnego, jak i inne tkankowo specyficzne markery. Testy oparte na analizie obecności tkankowo specyficznych markerów są nie tylko wysoce specyficzne, ale również cechuje je duża czułość. Pozwalają na wykrycie obecności pojedynczej komórki mięsaka w 5 ml krwi. Ze względu na możliwość zmian ekspresji nowotworowych w trakcie procesu nowotworzenia stosowanie testów wielomarkerowych podnosi zwykle czułość badania czyniąc go znacznie bardziej precyzyjnym. Z drugiej jednak strony podraża koszty testu i utrudnia jego wykonanie. Dlatego najczęściej wykorzystywane są testy dwu-trzymarkerowe. Poszukiwanie nowych, lep-

szych markerów podnoszących czułość wykrywania komórek nowotworowych w płynach i wydzielinach ustroju prowadzone są nieustannie na całym świecie, również w Polsce.

Znaczenie wyników badań genetycznych w praktyce klinicznej

Aby w pełni wykorzystać informacje otrzymane dzięki analizie kwasów nukleinowych konieczne jest jeszcze wskazanie lokalizacji małej kolonii komórek nowotworowych tak, aby mogły być one usunięte. Postęp w technikach obrazowania za pomocą rezonansu magnetycznego, czy komputerowej tomografii powinien pomóc w wykryciu zmian patologicznych. Dodatkowo, badania molekularne mogą być wzmacniane przez „biologiczne obrazowanie” wykorzystujące niskoznakowane związki radioaktywne lub techniki fluorescencyjne, w których sygnały radiacyjne dokładnie lokalizują położenie komórek nowotworowych. Na tej drodze już dziś stawiamy pierwsze kroki.

Trzeba jednak wyraźnie podkreślić, że wykazanie obecności komórki ze zmutowanym DNA nie musi oznaczać czynnej choroby nowotworowej. Konieczne jest zatem wypracowanie pewnych standardów postępowania. Metody wykorzystujące technikę PCR stwarzają ogromne możliwości, ale trzeba pamiętać, że są to metody nadczułe. Dzięki możliwości wielokrotnego wzmocnienia sygnału można wykryć nawet niewielkie ilości materiału genetycznego. Nie sposób jednak powiedzieć czy pochodzi on z komórki zdolnej do proliferacji czy z komórki, która już nigdy się nie podzieli. Nie można go też odróżnić od tego, który krąży w krwiobiegu w wyniku rozpadu komórek nowotworowych zluszczonego guza. Oznacza to, że trzeba się liczyć z możliwością wyników fałszywie dodatnich. Aby ograniczyć ich ilość do minimum należy zachowywać standardy postępowania. Laboratoria pracujące metodami molekularnymi muszą poza dobrym wyposażeniem posiadać doświadczoną kadrę. Niestety oznacza to, że nie każde laboratorium, które ma sprzęt pozwalający na pracę technikami molekularnymi będzie mogło sprostać powyższemu warunkom. Pomimo korzyści płynących z zastosowania diagnostyki molekularnej, większość badań znajduje się w stadium początkowym i oczekuje na końcową weryfikację w dużych eksperymentach klinicznych. Wydaje się jednak, że w pierwszym dziesięcioleciu nowego wieku, właśnie diagnostyka molekularna w chorobach nowotworowych będzie częścią rutynowego badania lekarskiego.

Jeszcze przez długie lata prowadzone będą prace nad poszukiwaniem odpowiednich markerów. Chciałoby się mieć nadzieję, że będą one w sposób precyzyjny wiązać określoną jednostkę chorobową (określony typ nowotworu) z badaną zmianą, ułatwiać rokowanie jak i wskazywać na wybór najskuteczniejszej terapii. Zapewne jednak nie będzie pojedynczego testu zdolnego do wykrycia wszystkich typów nowotworów. Każdy rodzaj nowotworu ma bowiem swój własny „podpis molekularny”, a więc wymagać będzie odrębnego opracowania.

Piśmiennictwo

1. Benniselli JL, Barr FG. "Genetics and the biologic basis of sarcomas" *Curr Opin Oncol* 1999; 11: 267-274.
2. Brennan M, Singer S, Maki R, et al.: *Sarcomas of the soft tissues and bone*. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds.: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 7th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, 2005, pp 1581-1631.
3. Fletcher C, Unni K, Mertens F (eds.). *Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone*. IARC Press, Lyon 2002
4. Weiss S, Golblum JR (eds). *Soft Tissue Tumors* 4th edition. Weiss book. Mosby St Louisd Mo, USA 2001.