T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
DR. ABDURRAHMAN YURTASLAN ONKOLOJİ
SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
TIBBİ PATOLOJİ KLİNİĞİ

YUMUŞAK DOKU TÜMÖRLERİNDE *LY6E* VE *LY6K* GEN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ VE BU DÜZEYLERİN TÜMÖR AGRESİVİTESİ İLE KORELASYONUNUN ARAŞTIRILMASI

Dr. Çiğdem YILDIRIM

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANKARA/2022

T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
DR. ABDURRAHMAN YURTASLAN ONKOLOJİ
SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
TIBBİ PATOLOJİ KLİNİĞİ

YUMUŞAK DOKU TÜMÖRLERİNDE *LY6E* VE *LY6K* GEN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ VE BU DÜZEYLERİN TÜMÖR AGRESİVİTESİ İLE KORELASYONUNUN ARAŞTIRILMASI

Dr. Çiğdem YILDIRIM

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Tuba Dilay KÖKENEK ÜNAL
İkinci Danışman: Prof. Dr. Olçay KANDEMİR

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANKARA/2022

TEŞEKKÜR

Ankara Dr. Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji EAH Tıbbi Patoloji bölümünde geçirdiğim uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden çok şey öğrendiğim, desteğini her zaman hissettiğim hocam Prof. Dr. Olçay KANDEMİR'e, uzmanlık eğitimim süresince her an bilgilerine ulaşabilmemi sağlayan ve bunu esirgemeyen bölümümüzün tüm eğitim görevlileri ve uzman doktorlarına teşekkür ederim.

Zorlu tez sürecinin her anında bana yol gösteren ve sabırla tüm yoğunluğuna rağmen bilgilerini paylaşıp öğrenme sürecime destek olan tez danışmanım Doç. Dr. Tuba Dilay KÖKENEK ÜNAL'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın laboratuvar aşamasında en büyük destekçim olan ve bana abla olan, hayatın her alanında tecrübelerini aktaran Dr. Öğr. Üyesi Keziban KORKMAZ BAYRAM'a ve çalışmamın analiz sürecinde desteklerini esirgemeyen sayın eşi Uzm. Dr. Arslan BAYRAM'a teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmamda özenle yardımcı olan Tekn. Nilüfer ŞAHİN başta olmak üzere her zaman yardımlarını esirgemeyen laboratuvar teknikeri çalışanlarımıza ve tıpta uzmanlık eğitimini birlikte geçirdiğimiz tüm asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmamı destekleyen Sağlık Bilimleri Üniversitesi BAP Birimi'ne teşekkür ederim.

Varlıkları ile hayatımın her anında, karşılıksız sevgi ve destekleri ile yanımda olan, eğitim hayatım boyunca bu gururu benden daha çok hak ettiklerini düşündüğüm annem ve babama, abim Erdem YILDIRIM'a teşekkür ederim.

Hayatımın son 4,5 yılında bana katılan, yüzümü güldüren, yaşama sevincim canım kedi kızım Badem'e sevgilerimle.

Tez çalışmamın her anında motivasyonu ile beni destekleyen, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayıp her aşamada elinden geleni yapan, sevgisini şefkatini hep hissettiğim nişanlım Anıl MAYDA'ya teşekkür ederim.

Dr. Çiğdem YILDIRIM

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
KISALTMALAR DİZİNİ v
TABLOLAR DİZİNİ vi
ŞEKİLLER DİZİNİ vii
ÖZET ix
ABSTRACT xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1.YUMUŞAK DOKU EMBRİYOLOJİSİ 3
2.2. YUMUŞAK DOKU ANATOMİSİ 4
2.3. YUMUŞAK DOKU HİSTOLOJİSİ 6
2.4. YUMUŞAK DOKU TÜMÖRLERİ 7
2.4.1. Tarihçe 7
2.4.2. Epidemiyoloji 7
2.4.3. Etiyoloji 8
2.4.4. Semptom, Bulgular ve Görüntüleme 9
2.4.5. Patogenez 11
2.4.6. Histopatolojik Değerlendirme 11
2.4.7. Prognostik ve Prediktif Faktörler 16
2.4.8. Moleküler Sınıflama ve Prognoza Katkısı 16
2.4.9. Tedavi Seçenekleri 18
2.5. KÖK HÜCRE 18
2.5.1. Mezenkimal Kök Hücre 19

2.5.2. Kanser Kök Hücresi 20
2.5.3. Yumuşak Doku Tümörü Kök Hücreleri 22
2.6. LENFOSİT ANTİJEN 6 (Ly6) GEN AİLESİ 24
2.6.1. Lenfosit Antijen 6E (Ly6E) 26
2.6.2. Lenfosit Antijen 6K (Ly6K) 28
3. GEREÇ VE YÖNTEM 31
3.1. KULLANILAN CİHAZ ve ALETLER 31
3.2. KULLANILAN SARF MALZEMELER ve KİTLER 31
3.3. VAKA SEÇİMİ 31
3.4. FORMALİN FİKSE PARAFİN GÖMÜLÜ BLOKTAN RNA İZOLASYONU 32
3.4.1. Formalin Fikse Parafin Gömülü Bloktan Kesit Alınması 32
3.4.2. RNA İzolasyonu için Gerekli Ön İşlemler 32
3.4.3. RNA İzolasyon Protokolü 33
3.4.4. RNA'dan cDNA Sentezi 35
3.4.5. qPCR Tekniği ile mRNA Ekspresyon 36
3.4.6. Delta Delta Ct Analizi 36
3.4.7. Biyoistatistiksel Analiz 37
4. BULGULAR 38
4.1. GEN EKSPRESYON BULGULARI 40
4.1.1. Ly6E 40
4.1.2. Ly6K 44
5. TARTIŞMA 49
6. SONUÇLAR 60
KAYNAKLAR 62
ÖZGEÇMİŞ 66

EKLER 69
EK-1. TEZ KONUSU ONAY FORMU 69
EK-2. ETİK KURUL ONAY BELGESİ 75

KISALTMALAR DİZİNİ

CD: Cluster of Differentiation

EBV: Ebstein Barr Virus

EMT: Epitelyal Mezenkimal Transisyon

FAP: Familyal Adenomatöz Polipozis

FNCLCC: Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer

GPI: Glikofosfatidilinositol

GVHD: Graft Versus Host Disease

HHV8: Human Herpes Virus-8

KKH: Kanser Kök Hücresi

Ly6: Lenfosit Antijen 6

MKH: Mezenkimal Kök Hücre

NF: Nörofibromatozis

PCR: Polymerase Chain Reaction

PLAUR: Plazminojen Aktivatörü Ürokinaz Reseptörü

SCA-1: Kök Hücre Antijeni 1

YDT: Yumuşak Doku Tümörü

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Dermal mezenkimden gelişen hücre tipleri..... 4

Tablo 2. Dünya Sağlık Örgütü 2020 sınıflamasına göre yumuşak doku tümörleri ana gruplar ve örnekleri..... 12

Tablo 3. FNCLCC'e göre a) diferansiyasyon ve b) mitoz/nekroz skorları..... 14

Tablo 4. Yumuşak doku tümörlerinde TNM evrelemesi - AJCC 2018'e göre..... 15

Tablo 5. Spesifik moleküler değişiklikliği saptanan tümör tipleri. 17

Tablo 6. RNA örneklerinden DNA eliminasyonu için gerekli karışım miktarları. ... 35

Tablo 7. Total RNA'dan cDNA sentez reaksiyonu için gerekli karışım miktarları. . 35

Tablo 8. qPCR için gerekli karışım miktarları 36

Tablo 9. Çalışmaya alınan hastaların tanı grupları, yaş ve cinsiyet verileri..... 38

Tablo 10. Olguların tanı grupları ve grup içi oranları 39

Tablo 11. Çalışmaya alınan tümörlü hastaların tümör boyutu, lokalizasyon ve patolojik verileri..... 40

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Omurgalıların erken gelişimi sırasında mezoderm oluşumu ve modellenmesinin şematik diyagramı..... 3

Şekil 2. Memeli düz kasındaki kuvvet üreten protein ağının temel bileşenlerinin şeması ve kasılma sırasında düz kas hücre iskeletinin organizasyonu ve yeniden düzenlenmesi..... 5

Şekil 3. Bağırsak duvarındaki dairesel ve longitudinal kas tabakalarının kesitlerinde düz kas hücreleri 6

Şekil 4. Mezenkimal Kök Hücrelerin farklılaşma potansiyelini gösteren diyagram . 19

Şekil 5. KKH'lerde plastisite..... 22

Şekil 6. Ly6 gen ailesi üyelerinden bazıları ve ilişkili oldukları moleküller..... 25

Şekil 7. Normal insan dokularında *Ly6E*'nin RNA ifadesi 27

Şekil 8. Normal insan dokularında *Ly6K*'nin RNA ifadesi..... 29

Şekil 9. Düz kas kökenli tümörlerde *Ly6E* gen ekspresyonunun karşılaştırılması 41

Şekil 10. Bağ doku kaynaklı tümörlerde *Ly6E* gen ekspresyonunun karşılaştırılması 41

Şekil 11. Tüm gruplarda *Ly6E* gen ekspresyonunun karşılaştırılması..... 42

Şekil 12. FNCLCC derecesi ile *Ly6E* gen ekspresyonunun karşılaştırılması..... 42

Şekil 13. FNCLCC mitoz skoru ile *Ly6E* gen ekspresyonunun karşılaştırılması..... 43

Şekil 14. FNCLCC nekroz skoru ile *Ly6E* gen ekspresyonunun karşılaştırılması 43

Şekil 15. Lokal nüks görülen vakalardaki *Ly6E* gen ekspresyonunun karşılaştırılması 44

Şekil 16. Düz kas kökenli tümörlerde *Ly6K* gen ekspresyonunun karşılaştırılması.. 45

Şekil 17. Bağ doku kaynaklı tümörlerde *Ly6K* gen ekspresyonunun karşılaştırılması 45

Şekil 18. Tüm gruplarda *Ly6K* gen ekspresyonunun karşılaştırılması 46

Şekil 19. FNCLCC derecesi ile *Ly6K* gen ekspresyonunun karşılaştırılması..... 46

Şekil 20. FNCLCC mitoz skoru ile *Ly6K* gen ekspresyonunun karşılaştırılması..... 47

Şekil 21. FNCLCC nekroz skoru ile *Ly6K* gen ekspresyonunun karşılaştırılması 47

Şekil 22. Lokal nüks görülen vakalardaki *Ly6K* gen ekspresyonunun karşılaştırılması 48

ÖZET

Amaç: Yumuşak doku tümörleri nadir görülen heterojen bir tümör grubu olup tüm kanserlerin %1'ini oluşturmaktadır. Son yıllarda kansere bakışımız hematolojik ve solid malignitelerde kanser kök hücrelerinin keşfi ile oldukça farklılık kazanmıştır. Yumuşak doku tümörlerinde henüz bu konuda yeteri kadar araştırma yapılmamış olmakla birlikte kanser kök hücresi benzeri hücrelerin varlığı gösterilmiştir. Biz de bu çalışmada faredeki homoloğu bir kök hücre belirteci olan *Ly6* gen ailesinden *Ly6E* ve *Ly6K* genlerinin yumuşak doku tümörlerindeki ekspresyonunu değerlendirmeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Patoloji Bölümü'nde 2017-2021 yılları arasında yumuşak doku tümörü tanısı almış ve eksizyonu yapılmış, yaşları 20 ila 80 arasında değişen 45 hasta dahil edildi. Çalışmada benign yumuşak doku tümörleri olarak dermatofibrom ve leimoyom tanılı; malign yumuşak doku tümörü olarak da leimyosarkom, pleomorfik sarkom ve sinovyal sarkom tanılı hastalar bulunmaktaydı. Hastaların uygun parafin blokları belirlenip kesitler alınarak deparafinize edildi, total RNA izolasyonu ve cDNA eldesi yapıldı. *Ly6E, Ly6K* ve kontrol olarak seçilen *B-actin* genleri için hazırlanmış primerler kullanılarak PCR ile gen ekspresyon düzeyleri belirlendi. Sonuçlar klinikopatolojik parametreler ile karşılaştırıldı.

Bulgular: Tüm gruplar birlikte değerlendirildiğinde; *Ly6E* gen ekspresyonunun kontrol grubuna göre, benign ve malign tümör grubunda istatistiksel anlamlı arttığı bulundu. *Ly6K* geni ise benign ve malign grupta ekspresyon artışı göstermekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. *Ly6E* gen ekspresyon düzeyinin leiomyosarkomlarda, kontrol grubu ve leiomyom grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı belirgin artış gösterdiği bulundu. Sinovyal sarkom ve pleomorfik sarkomların yer aldığı grupta ise *Ly6E* ekspresyonunun kontrol grubuna göre artış gösterdiği ancak anlamlı olmadığı görülmüştür. Dermatofibromlarda ise normale göre daha yüksek ekspresyon görülmesine rağmen anlamlı bulunmadı. *Ly6K* gen ekspresyon düzeyinin düz kas kökenli malign tümörlerde kontrol grubuna göre

istatistiksel olarak anlamlı artışı bulundu. *Ly6K* ekspresyon düzeylerinde diğer tümör grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Sonuç: Çalışmamız sonucunda *Ly6E* ve *Ly6K*'nın insan yumuşak doku tümörlerindeki ekspresyonları literatürde ilk defa ortaya konuldu. Özellikle diferansiasyonu belirgin malign yumuşak doku tümörlerinde söz konusu belirteçlerin yüksekliği tespit edildi. Yumuşak doku tümörlerinde tümörün agresivitesi ile *Ly6E* ve *Ly6K*'nın ilişkili olduğunu ve bu nedenle bu belirteçlerin kilinik çalışmalara yol gösterici olabileceğini düşündük. Ayrıca güncel çalışmalar ışığında bu moleküllerin birer tedavi hedefi olma potansiyelleri de bulunmaktadır. Bu nedenle yapılacak daha kapsamlı çalışmalar ile *Ly6E* ve *Ly6K* gen ekspresyonunun yumuşak doku tümörlerindeki ve tedavideki önemi daha iyi anlaşılacak olup çalışmamız bu alandaki çalışmalara öncülük ederek literatüre önemli bir katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Yumuşak doku tümörü, sarkom, kanser kök hücresi, *Ly6E, Ly6K*

ABSTRACT

Aim: Soft tissue tumors are a rare heterogeneous group of tumors and constitute 1% of all cancers. In recent years, cancer research has gained a different point of view with the discovery of cancer stem cells in hematological and solid malignancies. Despite of limited studies in soft tissue tumors, the presence of cancer stem cell-like cells has been demonstrated. In this study, we aimed to evaluate the expression of *Ly6E* and *Ly6K* genes from the *Ly6* gene family, which is a homologous stem cell marker in mice, in soft tissue tumors.

Materials and Methods: The study was performed with forty-five patients, aged between 20 and 80, who were diagnosed with soft tissue tumors between 2017 and 2021 at Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Oncology Health Application and Research Center Medical Pathology Department. In the study, there were patients diagnosed with dermatofibroma and leiomyoma as benign soft tissue tumors and patients diagnosed with leiomyosarcoma, pleomorphic sarcoma and synovial sarcoma as malignant soft tissue tumors. After selection of appropriate paraffin blocks sections were taken and deparaffinized, total RNA isolation and cDNA were obtained. *Ly6E* and *Ly6K* gene expression levels were determined by PCR and the results were compared.

Results: When all groups are evaluated together; there was a statistically significant increase in *Ly6E* gene expression in the benign and malignant tumor groups compared to the control group. The *Ly6K* gene, on the other hand, showed an increase in expression in the benign and malignant groups, but it was statistically insignificant. Especially in leimyosarcomas, there was a statistically significant increase of *Ly6E* gene expression. In the group including synovial sarcoma and pleomorphic sarcomas, it was observed that *Ly6E* expression increased compared to the control group, but it was not significant. A statistically significant increase in *Ly6K* gene expression level was found in malignant tumors originating from smooth muscle compared to the control group. There was no statistically significant difference between other tumor groups in *Ly6K* expression levels.

Conclusion: The expressions of *Ly6E* and *Ly6K* in human soft tissue tumors were discussed for the first time in the literature. Especially in well-differentiated malignant soft tissue tumors, the aforementioned markers were found to be elevated. We think that tumor aggressiveness is related with *Ly6E* and *Ly6K* in soft tissue tumors, and therefore, these markers may guide to clinical studies. Recent studies have also showed that these molecules might have the potential of being therapeutic target. Therefore, with further more comprehensive studies, the importance of *Ly6E* and *Ly6K* genes in cancer development and their potential roles in the therapy in soft tissue tumors will be better understood, and our study will lead other studies in this area and make an important contribution to the literature.

Keywords: Soft tissue tumor, sarcoma, cancer stem cells, *Ly6E*, *Ly6K*

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yumuşak doku tümörleri (YDT'leri), iskelet dışı gelişim gösteren mezenkimal hücre kökenli tümörlerdir (1,2). Vücudumuzun yaklaşık %75'ini oluşturan bağ dokusu, yağ dokusu, düz kas, iskelet kası, sinoviyal doku ve bu dokuları destekleyen nörovasküler elemanlar yumuşak doku olarak isimlendirilmiştir ve klinik, histolojik ve biyolojik olarak birbirinden farklı çok sayıda benign/malign tümör tipine kaynak oluşturmaktadırlar (3,4). Vücudun her yerinde görülebilmekle birlikte; erişkinlerde en sık ekstremitelerde ve çocuklarda ise en sık baş-boyun bölgesinde görülürler.

Yumuşak doku tümörlerinin tedavisinde cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi kullanılmakta olup prognoz değişkendir. Ancak malign yumuşak doku tümörlerinin beş yıllık genel sağ kalım oranı %65-75 arasındadır ve agresif tümörlerde bu oran daha da azalmaktadır. Onkolojide hedefe yönelik tedavilerin gelişmesi ve hasta prognozunda ciddi fayda sağlaması yumuşak doku tümörleri tedavisi için de giderek önem kazanmaktadır. Moleküler tekniklerdeki ilerlemeler yumuşak doku tümörlerinin onkogenetik özelliklerinin daha iyi anlaşılmasına da katkıda bulunmaktadır. Bu nedenle bu alanda yapılacak çalışmalar ve bulunacak yeni yöntemler hem tanı ve tedavi protokollerinin belirlenmesi açısından hem de hastanın sağ kalımını tahmin etme potansiyeli açısından büyük önem taşımaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda tümör içinde az sayıda bulmasına rağmen tümörü yeniden başlatabilme kapasitesine sahip bazı hücrelerin varlığı gösterilmiş ve pek çok kanserde kanser kök hücresi (KKH) adı verilen hücreler tanımlanmıştır (5). Yapılan çalışmalarda KKH'lerinin tümörün invazyon ve metastazında da önemli rol oynadığı ve tedaviye karşı direnç gelişiminden de sorumlu olduğu ortaya konmuştur (6). Son yıllarda aynı şekilde yumuşak doku tümörlerinin içinde de tümör heterojenitesinden, relaps ve metastazlardan sorumlu olduğu düşünülen kök hücre benzeri hücreler tanımlanmıştır (7).

Ly6 (lenfosit antijen 6) gen ailesinin büyüme faktörleri, nükleer reseptör ve mikro RNA'lar dahil olmak üzere çok çeşitli moleküllerin etkileşiminde rol oynadığı ve bu sayede büyüme, apoptoz, otofaji ve bağışıklık yanıtı ile hücreler arası

etkileşimi düzenlediği gösterilmiştir (8,9). Bu ailenin ilk tanımlanan üyesi olan kök hücre antijen-1 *(Sca-1/Ly6A*) farelerde kanser kök hücrelerinin ve dokuda yerleşik kök hücrelerin bir belirteci olarak kullanılmaktadır (8).

Faredeki homoloğundan yola çıkılarak başlatılan çalışmalarda insanda bulunan *Ly6* genlerinin de bazı hastalıkların ve farklı kanserlerin oluşumunda ve gelişiminde etkili olduğu ve kötü prognoz belirteci olduğu gösterilmiştir (10). Literatürde, *Sca-1*'e sinentik olan ve 8.kromozomda bulunan *Ly6D, E, H* ve *K*'nin insanda normal dokuya kıyasla karsinomlarda up-regüle olduğu ve bu genlerin artan ekspresyonunun, pek çok karsinom tipinin kötü prognozu ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (10). Yine bu ailenin üyelerinden olan *Ly6E* ve *Ly6K*'nın meme kanserinde kanser gelişimi, immün sistemden kaçış ve ilaç direnci gelişiminde rol oynadığı ortaya konmuştur. *Ly6E*'nin yine mide kanserinde tümör büyümesini ve metastazı tetiklediği belirtilmiştir (42). Ancak *Ly6* ailesinin insan yumuşak doku tümörlerindeki rolü ile ilişkili olarak literatürde henüz yayın bulunmamaktadır. Yapılan fare deneylerinde *Sca-1* pozitifliğinin sarkom oluşması, ilerlemesi ve tedaviye direnç gelişmesi ile ilişkili olduğunu ortaya konmuştur (12). Bu nedenle biz de bu çalışmada faredeki *Sca-1*'le benzer göreve sahip olduğunu düşündüğümüz *Ly6* ailesi üyelerinden *Ly6E* ve *Ly6K*'nın insanda farklı orijine sahip benign ve malign yumuşak doku tümörlerindeki ekspresyonunu ortaya koymayı hedefledik. Çalışmamızda benign ve malign yumuşak doku tümörlerinde *Ly6E* ve *Ly6K* genlerinin ekspresyonları incelenerek ekspresyon düzeylerinin tümörün histolojik tipi, nükleer derecesi, tümör boyutu, tümör sınırları özelliği, nekroz varlığı ve oranı, mitoz sayısı, Ki67 oranı, hastada nüks ve/veya metastaz varlığı gibi parametreler ile ilişkisini değerlendirmeyi amaçladık.

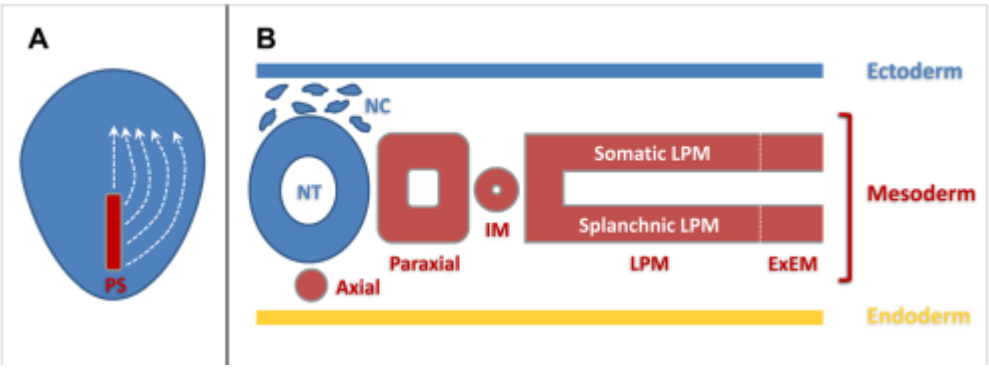
Ly6 genleri farklı kanserlerde kanser belirteçleri ve kötü prognostik belirteç olabildiği gibi aynı zamanda yeni tedavi modaliteleri için de bir hedef konumundadır. Çalışmamız sonucunda *Ly6E ve Ly6K*'nın yumuşak doku tümörlerindeki ekspresyonu ve prognostik parametrelerle muhtemel ilişkisi ortaya konarak, bu genlerin kanser gelişimindeki yeri ve önemine işaret edilmiş olacak ve bu alanda literatüre önemli bir katkı sağlanmış olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.YUMUŞAK DOKU EMBRİYOLOJİSİ

Yumuşak doku, vücudun diğer tüm dokuları için destekleyici bir çerçeve sağlar. Yumuşak doku, hücreler, lifler tarafından oluşturulur ayrıca hücre dışı matriks, hücreleri çevreleyen kollajenlerin, glikoproteinlerin ve proteoglikanların bir kombinasyonunu temsil eder.

İnsanlarda embriyolojik gelişim ektoderm, endoderm ve arasında mezoderm adı verilen üç tabakadan oluşur ve bu olaya trifoblastik gelişim denir. Bu tabakalar görünüm ve genetik aktivite yönünden birbirlerinden farklıdırlar. Üç germ tabakasına sahip bir embriyo oluşturan gastrulasyonun başlangıcından önce, mezoderm öncüleri, moleküler olarak belirlenirler (13). Bu mezoderm öncü hücreleri, ilkel çizgi adı verilen embriyonik bir yapıda yer alan bir epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) sürecine geçerek gerçek mezoderm hücrelerini oluştururlar (Şekil-1). Bağ dokusu, kemik ve kıkırdak doku, derinin dermis tabakası, kas doku, kan damarları ve kan hücreleri, mezenterler, ürogenital sistemin büyük bir kısmı (böbrekler, testisler ve ovaryumlar), çölomik epitel, östaki borusu ve kısmen orta kulağın iç yüzeyi mezoderm tabakasından gelişim göstermektedir.



Şekil 1. Omurgalıların erken gelişimi sırasında mezoderm oluşumu ve modellenmesinin şematik diyagramı. Primitif çizgide (ilkel çizgi) bulunan mezoderm öncülleri, EMT'ye uğrar; ektoderm ve endoderm germ katmanları arasında koordineli bir şekilde (beyaz noktalı çizgiler) nihai hedeflerine göç eder. Ana mezoderm soyları (eksenel, paraksiyal, orta, yan plaka ve ekstraembriyonik), erken embriyonun orta-yan ekseni boyunca düzenlenir. IM: ara mezoderm; LPM: yan plaka

mezodermi; ExEM: ekstraembriyonik mezoderm; NT: nöral tüp; NC: sinirsel tepe.- The developmental basis of mesenchymal stem/stromal cells'den alınmıştır (13).

Yan plaka mezoderminin splanknik tabakasından gelen hücreler, kalp ve düz kaslar, endotelyal hücreler, perisitler ve hematopoietik kök hücreler dahil olmak üzere neredeyse tüm kardiyovasküler sisteme ve viseral organların ve viseral adipositlerin mezotelyal astarına katkıda bulunur. Yan plaka mezoderminin somatik tabakası, lateral ve ventral vücut duvarında dermise ve hipodermise, tüm distal iskelet elemanlarındaki kondrositlere ve osteositlere, abdominal ve gluteofemoral bölgelerdekiler de dahil olmak üzere subkutan adipositlerin büyük çoğunluğuna ve kemik iliği dokularındaki potansiyel yerleşik progenitör ve kök hücrelere (mezenkimal kök hücre (MKH) benzeri hücreler) dönüşür. (14).

Embriyonik dermis içindeki çok potansiyelli bir mezenkimal hücre popülasyonu, dikkate değer sayıda olgun hücre tipinin meydana gelmesini sağlar (Tablo-1) (14).

Tablo 1. Dermal mezenkimden gelişen hücre tipleri- Bruce M. Carlson, Human Embryology Developmental Biology' den değiştirilerek alınmıştır (14).

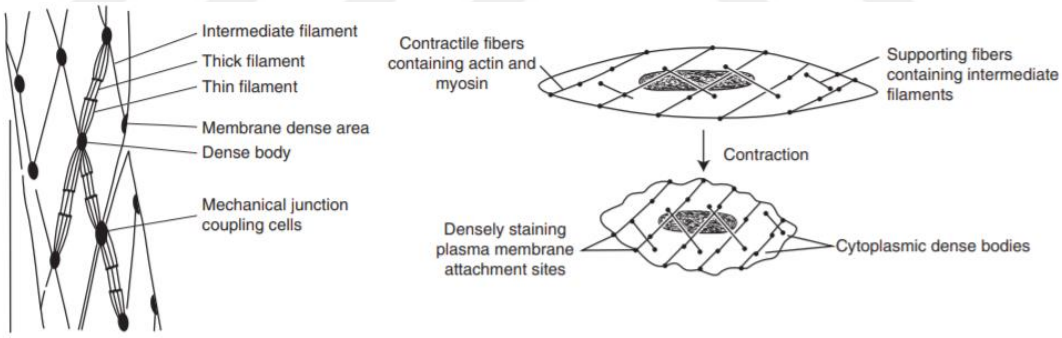
Hücre tipi
Papiller fibroblast
Retiküler fibroblast
İntradermal pre-adiposit
İntradermal adiposit
Myofibroblast
Kıl kökü kas hücresi
Dermal papilla
Mezenkimal kök hücre
Perivasküler hücre

2.2. YUMUŞAK DOKU ANATOMİSİ

Yumuşak doku, çeşitli organların destekleyici dokusu ve hematopoietik /lenfoid doku dışında, vücudun epitelyal olmayan iskelet dışı yapılarının kompleksi olarak tanımlanır. Fibröz (bağ) doku, yağ dokusu, iskelet kası, kan /lenf damarları ve periferik sinir sisteminden oluşur (15).

Düz kaslar, vücutta sürekli olarak devam eden, sıklıkla (arter basıncını veya doğrudan kan akışını korumak için vazokonstriksiyon durumunda olduğu gibi) çok

az hareket eden, bunun yerine sabit tonik kuvvetlerin korunmasını sağlayan işlevlere hizmet eder. Hareketin işlev için önemli olduğu düz kaslarda (örneğin, bağırsak peristalsisi), hareketler kas boyutuna göre oldukça büyük olabilir, ancak tipik olarak iskelet kaslarından birkaç yüz kat daha yavaştır. Düz kas hücreleri, tübüler ve içi boş organların çevresinde katmanlar halinde düzenlenir. Damar sistemi için düz kas içte dairesel düz kas tabakası ve dışta uzunlamasına düz kas tabakası olmak üzere iki ayrı tabaka şeklinde düzenlenir. Arterler için dairesel tabaka, arterin arter basıncına karşı vasküler direnci arttırmak için kasılması gerektiğinden, uzunlamasına tabakadan çok daha kalındır. Venöz sistemde, venöz basınç çok daha düşük olduğundan dairesel tabaka daha az gelişmiştir. Mesane gibi büyük hacim değişikliklerine uğraması gereken içi boş organlar için düz kas düzensiz tabakalar halinde düzenlenir, böylece kasılma sırasında organın boyutu küçülür. Gastrointestinal sistem için düz kasın dış uzunlamasına tabakası, besin bolusunu sindirim kanalından aşağı itmek için daha fazla gelişmiştir. Düz kas hücreleri vücuttaki en küçük mezenkimal hücrelerdendir. Tipik olarak 50-200 µm uzunluğunda, en geniş çapı 2-8 µm olan iğ şeklindeki liflerdir (16).



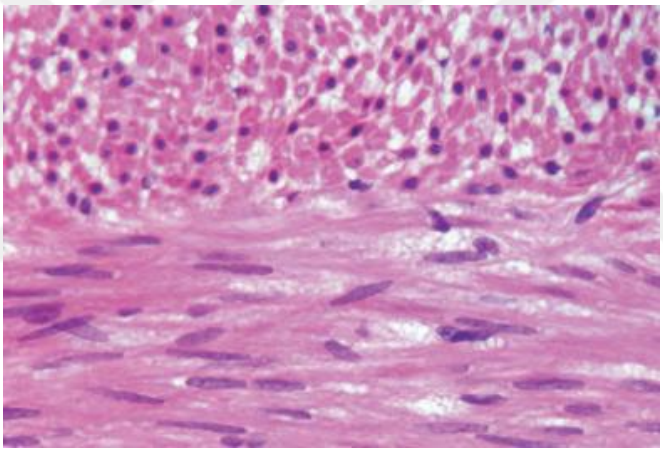
Şekil 2. Memeli düz kasındaki kuvvet üreten protein ağının temel bileşenlerinin şeması ve kasılma sırasında düz kas hücre iskeletinin organizasyonu ve yeniden düzenlenmesi (16).

Fibröz doku esas olarak fibroblastlardan ve fibriler yapılar (kolajen ve elastin) ile fibriler olmayan hücre dışı matriksten oluşur. Fibröz doku, gevşek ve sıkı (tendonlar, aponevrozlar ve bağlar) olarak sınıflandırılır. Fibroblastlar, birçok kolajen türü de dahil olmak üzere çeşitli hücre dışı materyallerin üretiminden sorumludur (15).

2.3. YUMUŞAK DOKU HİSTOLOJİSİ

Bağ doku hücreleri bulundukları yere ve işlevlerine göre farklı morfolojide görülebilirler.

Düz kas hücreleri 3-8 μm'lik bir merkezi çaptan uçlara doğru sivrilen iğ şeklindedir. Nükleus tektir ve santral yerleşimlidir. Hücrenin büzülmesiyle tirbuşon şeklinde bükülür. Düz kas hücreleri, uzun eksenlerine paralel ve uzunlamasına kademeli olarak hizalanır, böylece bir hücrenin geniş merkezi kısmı diğerinin sivrilen ucunun yanında yer alır. Bu düzenleme hem sıkı paketleme hem de hücreden hücreye daha verimli bir kuvvet aktarımı sağlar. Enine kesitte düz kas, çok çeşitli boyutlarda dairesel veya hafif poligonal olarak görülür (17). İmmünohistokimyasal olarak Aktin ve Desmin ile pozitif ekspresyon gösterir.



Şekil 3. Bağırsak duvarındaki dairesel ve longitudinal kas tabakalarının kesitlerinde düz kas hücreleri- Gray H, Gray's Anatomi'den alınmıştır (17).

Fibroblast, bağ dokusunda en bol bulunan hücre tipidir. Kollajen lifler boyunca iğsi şekilli ve miksoid alanlarda yıldız şeklinde görülen yumuşak dokunun bağ dokusuna ait elemanlarıdır. Hücre hücre dışı matriksin korunmasından sorumludur. Yaralanma zamanlarında dokuyu değiştirmek için gerekli yapı taşlarını sentezleyebilir. Fibroblastlar, standart ışık mikroskobu değerlendirmesinde kolayca görülemeyen uzun, disk benzeri yapılardır. Genellikle, kolajen liflerinin yakınında sadece nükleus görünür. İmmünohistokimyasal olarak Aktin ve Vimentin ile pozitif ekspresyon gösterirler.

Olgun kemik hücreleri osteosit olarak adlandırılır. Kemik dokudaki lakün adı verilen boşluklara yerleşen, bölünme yeteneğini kaybetmiş kemik doku elemanlarıdır.

Kondrositler, kıkırdak matriksini üreten hücrelerdir. Kıkırdak dokusu kendini yenileyebilme yeteneği kısıtlı olan bir dokudur. Kondrositler kıkırdak yapısını oluşturan ve kolajen üretiminden sorumlu olan hücrelerdir.

Matür yağ dokusu hücreleri adiposit olarak isimlendirilir. Vücudun en büyük enerji deposudur ve trigliseritlerin alınması/salınması için gerekli enzimlere sahiptir (18).

2.4. YUMUŞAK DOKU TÜMÖRLERİ

2.4.1. Tarihçe

Yumuşak doku tümörlerine ait bilgiye ilk kez M.Ö. 1500'lü yıllarda rastlanmıştır. Sarkom kelimesi Yunanca 'sakos (et)' kelimesinden türetilmiştir ve 'sarkoma' etli cisim anlamına gelmektedir (19). 1700'lü yıllara dek yumuşak doku tümörlerinde cerrahiden kaçınılmış ancak 1800'lü yılların başında bu tümörlerin cerrahi tedavi gerektirdiği ve yerleşim yerine göre sınıflandırılması gerektiği düşünülmüştür. Abernethy (1809) bu yaklaşımla 8 sarkom tipi tanımlamıştır. Bu tipler; vasküler, yağ doku, kistik, tüberküler, medüller, mammary, pankreatik, karsinomatöz'dür (20). İlerleyen yıllarda amputasyonun en uygun tedavi şekli olduğu yaklaşımı benimsenmiş ancak 1900'lü yıllarda ekstremiteyi koruma yaklaşımı önem kazanmıştır (19).

2.4.2. Epidemiyoloji

Bağ dokusu, yağ dokusu, düz kas, iskelet kası, sinoviyal doku ve bu dokuları destekleyen nörovasküler elemanlar, mezenkimal hücre kökenli olup yumuşak doku olarak isimlendirilmiştir. Yumuşak doku tümörleri, epitelyal tümörler ve diğer neoplazilerle karşılaştırıldığında nispeten nadirdir ve tüm kanserlerin %1,5'inden daha azını oluştururlar. Yıllık insidansı 100.000 kişide yaklaşık 6'dır. Bununla birlikte, insidans yaşla birlikte değişir; 10 yaşından küçük çocuklar için yıllık insidans 0.9/100.000 iken, 70 yaş üstü yetişkinlerde 18.2/100.000'dir. 40-60 yaş arası

insidansta belirgin bir pik gözlenmektedir (1, 3). Eldeki verilerden yola çıkarak, yumuşak doku tümörlerinin insidansı ve dağılımı dünyanın farklı bölgelerinde benzer görünmektedir. Yumuşak doku tümörlerinde cinsiyet ve yaşa bağlı insidanslar histolojik alt tipler arasında farklılık gösterir (1). Tümör tipi ile semptom, lokalizasyon, hastanın yaşı ve cinsiyeti ilişkili bulunmuştur (3). Ancak 10.000'den fazla hastayı içeren veri tabanından yapılan bir araştırma, yumuşak doku tümörlerinin tamamı göz önüne alındığında cinsiyet dağılımının eşit olduğunu göstermektedir (21).

Yumuşak doku tümörleri vücudun herhangi bir yerinde ortaya çıkabilir, ancak çoğu ekstremitelerin büyük kaslarından, göğüs duvarından, mediastenden veya retroperitondan kaynaklanır (1). Ekstremite ve göğüs duvarı yerleşimli tümörlerin %30'u yüzeyel yerleşimlidir ve ortalama 5 cm çaptadır. Derinde yerleşmiş tümörlerin çapları genellikle 5 cm'den büyüktür. Ayrıca benign yumuşak doku tümörleri genellikle ekstremitelerde ortaya çıkar ve büyük kısmı yüzeyel olup küçük boyutludur (<5 cm). Retroperitoneal tümörler ise genellikle geç bulgu verirler ve saptandıklarında boyutları oldukça büyüktür (3). Klinikte genellikle bulgu yoktur ya da ağrısız büyüyen kitle şeklinde başvurular olur. Bunun yanında yerleşim yerine göre ek semptomlar olabilmektedir ve metastaz ile tanı alan olgular mevcuttur. Yumuşak doku tümörleri sıklıkla itici tarzda büyüme gösterir ve bulundukları yerde çevredeki yapıları sıkıştırır ve buna bağlı olarak ağrı ve ödem yapabilirler. Klinik bulgular ile tümör agresivitesi sıklıkla ilişkisizdir (3, 22)

2.4.3. Etiyoloji

Çoğu yumuşak doku tümörünün patogenezi bilinmemektedir. Çevresel, onkojenik, immünolojik ve genetik faktörlerin hepsi suçlanmıştır ve aslında bu faktörlerin birçoğu belirli bir tümörün gelişiminde rol oynayabilir. Yumuşak doku tümörlerinin gelişiminde sıklıkla travma rol oynar, ancak travma çoğu zaman sadece travmadan önce gelen bir tümörün varlığına dikkat çekiyor olabilir. Çevresel faktörler arasında fenoksiasetik asit, herbisitler, vinil klorür (hepatik anjiyosarkom) ve radyasyona maruz kalma sayılabilir (15).

Onkojenik virüsler de küçük bir tümör grubunun gelişiminde rol oynar. İnsan herpes virüsü 8 (HHV8), açıkça Kaposi sarkomunun etken maddesidir. Epstein-Barr

virüsü (EBV), immün yetmezliği veya immünosupresyonu olan hastalarda düz kas tümörlerinin gelişiminde merkezi bir rol oynamaktadır (15).

Malign yumuşak doku tümörlerinde genetik değişiklikler iki grup şeklinde sınıflandırılmıştır. İlk grupta spesifik genetik değişiklikler (KIT, PDGFRA) ve spesifik mutasyonlar (APC, CTNNB1); ikinci grupta ise değişken/çoklu kromozomal kazanç ya da kayıplar şeklinde görülen (TP53, RB1, CDKN2A) spesifik olmayan genetik değişiklikler tanımlanmıştır. Örneğin, Nörofibromatozis, Ailesel Adenomatöz Polipozis Koli (FAP), Li-Fraumeni Sendromu, Gatrointestinal Stromal Tümör (GİST) ve Retinoblastom bulunan hastalarda tanımlanmış genetik faktörler vardır (15).

Ayrıca çoğu malign yumuşak doku tümörünün benign bir tümörden malign transformasyon gelişmesinden ziyade de novo ortaya çıktığı belirtilmektedir. Benign bir tümörden malign tümör gelişimi olduğu düşünülen çoğu durumda, orijinal materyalin gözden geçirilmesi tümörün başlangıcından itibaren kötü huylu olduğunu gösterir (15).

2.4.4. Semptom, Bulgular ve Görüntüleme

Yumuşak doku tümörlerinin var olan en sık belirtisi ağrısız bir kitledir, ancak vakaların sadece üçte birinde ağrı bildirilir. Bu nedenle tanıda gecikme sık görülür. Özellikle retroperiton yerleşimli tümörlerde, retroperitoneal boşluğun büyük olması, genellikle yavaş büyüme hızı ve sarkomların bitişik organları istila etmek ve tehlikeye atmak yerine kademeli olarak yer değiştirme eğilimi nedeniyle geç teşhis yaygındır. Bu nedenle retroperitoneal tümörler tanı konulmadan önce hatırı sayılır bir boyuta ulaşabilmektedir (1). Ayrıca tümör tipi ile başvuru yaşı arasında kesin bir ilişki vardır. Embriyonal rabdomiyosarkom tipik olarak bebek ve çocukların tümörüdür, sinovyal sarkom esas olarak adolesanları ve genç erişkinleri etkiler ve liposarkomlar ve andiferansiye pleomorfik sarkomlar genellikle orta yaşlı ve yaşlı hastalarda görülür (15).

Yumuşak doku tümörlerinin çoğu tekdir ve senkron veya metakron çoklu tümörler son derece nadirdir (15). Fizik muayene tümör boyutu, relatif mobilite durumu ve fiksasyonun bir değerlendirmesini içermelidir. Ekstremite yumuşak doku

tümörü olan hastalar tümöre bağlı nöropati açısından değerlendirilmelidir. Nodal metastazların nispeten nadir olduğu ve ekstremite yumuşak doku tümörlü hastaların %15'inden azında meydana geldiği anlaşılarak bölgesel lenf nodu alanlarının incelenmesi de yapılmalıdır. Etkilenen bölgenin fonksiyonel değerlendirmesi de büyük önem taşımaktadır ve mutlaka tam nörolojik/vasküler muayeneler yapılmalıdır (1).

Son birkaç dekadda, yumuşak doku tümörlerinin teşhisi, evrelenmesi ve takibi için görüntülemenin kullanımında kayda değer ilerlemeler görülmüştür (1). Radyolojik görüntüleme, bir tümörün lokal yayılımını tanımlamak, hastalığı evrelemek, biyopsileri yönlendirmek ve tanıya yardımcı olmak için kritik öneme sahiptir. Görüntüleme çalışmaları ameliyat öncesi kemoterapi veya radyasyon tedavisinden sonra tümör değişikliklerinin izlenmesinde ve cerrahi rezeksiyon sonrası nükslerin saptanmasında da çok önemlidir. Bununla birlikte, malign yumuşak doku tümörlü hastalarda her görüntüleme yönteminin özel bir yeri vardır. Örneğin, radyografi, primer kemik tümörleri hakkında bilgi sağlamak için yararlı olsa da, ekstremitelerin yumuşak doku tümörlerini değerlendirmek için yararlı değildir. Bununla birlikte, akciğer metastazlarını araştırmak için malign yumuşak doku tümörlü hastalarda akciğer grafisi yapılmalıdır. Küçük ve yüzeyel lezyonlar için kistik ve solid kitleleri ayırt etmede ultrasonografi yardımcı olabilir ve biyopsi prosedürleri sırasında rehberlik için de kullanılabilir. Bilgisayarlı tomografi (BT) radyografilerde görülemeyecek kadar ince olabilecek kalsifikasyonları ve ossifikasyonu saptamak için yüksek bir doğruluk oranına sahiptir. Ayrıca bir yumuşak doku neoplazması ile bitişik kemik korteks veya kemik iliği arasındaki ilişkinin değerlendirilmesinde de yararlıdır. Yüksek dereceli lezyonları veya 5 cm'den büyük tümörleri olan hastalarda göğüs bilgisayarlı tomografisi (BT) metastazı erken saptamak açısından önem taşımaktadır. Kontrastlı BT ise, yumuşak doku tümör yükünün boyutunu ve tümörün hayati yapılara yakınlığını değerlendirebilir. Manyetik Rezonans Görüntüleme anatomik tutulumu tanımlamak, fasyal düzlemleri tanımlamak, kemik tutulumunu değerlendirmek ve lezyonun yakındaki nörovasküler demetlerle ilişkisini göstermek için vazgeçilmez bir görüntüleme yöntemidir. Pozitron Emisyon Tomografisi-Bilgisayarlı Tomografi'nin en büyük yararı tüm vücut fonksiyonel değerlendirmesidir. Böylece tedaviye yanıtı

değerlendirmede ve rezidüel veya tekrarlayan yumuşak doku kitlelerini izlemede de yardımcı olur (1).

2.4.5. Patogenez

Yumuşak doku tümörlerinin patogenezi hala net olarak bilinmemektedir. Bilinen nedenler arasında çeşitli fiziksel ve kimyasal faktörler, radyasyona maruz kalma ve kalıtsal veya edinilmiş immünolojik defektler yer alır. Maruziyet süresi ile tümörün gelişimi arasındaki uzun latent periyot ve ayrıca bu süreçte çoklu çevresel ve kalıtsal faktörlerin olası etkisi nedeniyle kesin nedenin değerlendirilmesi genellikle zordur. Malign tümörlerin benign yumuşak doku tümörlerinden köken alması, nörofibromlarda ortaya çıkan malign periferik sinir kılıfı tümörleri dışında son derece nadirdir (1).

Çevresel faktörler arasında, travma, çevresel karsinojenler, herbisitler, klorofenoller, vinil klorür, radyasyon sayılmaktadır. Ayrıca onkojenik virüsler (HHV8, EBV vs.), immünolojik faktörler (doğuştan ya da kazanılmış immün yetmezlik) ve genetik faktörler (NF, FAP, Gardner vs.) patogenezde rol oynamaktadır (15).

2.4.6. Histopatolojik Değerlendirme

Histopatolojik inceleme, yumuşak doku tümörlerinin tedavisinde hayati bir adımdır. Biyopsi ile belirlenen tümör tipi ve derecesi önemli prognostik göstergelerdir. Ancak önemli doku heterojenitesine sahip lezyonlarda örnekleme hatası olasılığı vardır. Örneğin, sekonder fibrozis alanları iyi huylu bir lezyonun hatalı teşhisine yol açabilirken, tanınmamış bir kırığa yanıt olarak gelişen immatür osteoid, yüksek dereceli bir sarkomun yanlış teşhisine yol açabilir. Benzer şekilde, yaygın nekroz tanısal olmayan biyopsi sonuçlarına yol açabilir ve tüm bu sorunlar histopatolojik derecelendirmeyi zor bir süreç haline getirebilir. Bu durumda gerekirse radyolojik teknikler de kullanılarak biyopsinin mevcut en yüksek dereceli tümör dokusunu içerme olasılığı en yüksek olan bölgeden alınması doğru patolojik tanı için büyük önem taşımaktadır. Bu durum malign yumuşak doku tümörlerinde özellikle önemli olabilir, çünkü primer lezyon genellikle ameliyattan önce neoadjuvan radyoterapi ve/veya kemoterapi ile tedavi edilir (23).

Yumuşak doku tümörlerinin sınıflandırılması Dünya Sağlık Örgütü tarafından 2020 yılında güncellenmiştir. Dünya Sağlık örgütü yumuşak doku tümörlerini 11 ana grupta ele almaktadır ve bu gruplar içerisinde çok sayıda alt tip bulunmaktadır (Tablo-2) (3).

Tablo 2. Dünya Sağlık Örgütü 2020 sınıflamasına göre yumuşak doku tümörleri ana gruplar ve örnekleri (3)

Histolojik Tip	Benign	Intermediate, Lokal Agresif	Intermediate, Nadiren Metastatik	Malign
Adipositik	Lipom ve varyantları	Atipik lipomatöz tümör	-	Liposarkom
Fibroblastik/Myofibroblastik	Dermatofibrom, myofibroblastom, anjiofibrom	Desmoid tip fibromatosis	Soliter fibröz tümör, inflamatuar myofibroblastik tümör	Fibrosarkom
Psödo Fibrohistiositik	Derin benign fibröz histiositom, tenosinoviyal dev hücreli tümör	-	Yumuşak dokunun dev hücreli tümörü	Malign tenosinoviyal dev hücreli tümör
Vasküler	Hemanjiom, lenfanjiom	Kaposiform hemanjioendotelyoma	Kaposi sarkom	Anjiosarkom
Perisitik	Glomus tümör, myoperisitom	-	-	Malign glomus tümör
Düz Kas	Leiomyom	-	-	Leiomyosarkom
İskelet Kası	Rabdomyom	-	-	Embriyonel rabdomyosarkom
Kondroosseöz	Kondroma	-	-	Extraskletal osteosarkom
Periferal Sinir Kılıfı	Schwannom, nörofibrom, perinöroma	-	-	Malign granüler hücreli tümör
Belirsiz diferansiyasyon	Miksoma	Epiteloid anjiomyolipom	Fibroksantoma	Sinoviyal sarkom, Pleomorfik sarkom
Gastrointestinal stromal tumor (GIST)				

Dermatofibrom, derinin en sık rastlanan fibroblastik/histiositik kökenli nadir görülen benign tümörüdür. Genellikle hiperpigmente görünümlü milimetrik lezyonlardır. Epidermisin altından başlayan dermisin derinlerine dek uzanabilen storiform paternde, veziküler nükleuslu, dar sitoplazmalı iğsi hücrelerden oluşmaktadır.

Leiomyom düz kas kökenli benign mezenkimal bir tümördür. Yerleşim yerine göre isimlendirilir ve klinik bulguları bu sebeple heterojendir. Genellikle 5-10 cm arası nodüler kitle şeklindedir ve iyi diferansiye düz kas hücrelerinin birbirini çaprazlayan demetleri izlenmektedir. Atipi, mitoz ve nekroz minimal ya da yoktur.

Sinoviyal sarkom sıklıkla genç/genç erişkinlerde görülen değişen oranlarda epitelyal farklılaşma gösteren metastaz riski yüksek malign tümördür. İğsi hücreli ve epitelyal komponentin bulunma durumuna göre morfolojik sınıflaması mevcuttur. Moleküler olarak t(X;18) (p11;q11) translokasyonu olguların %95'inde tanımlanmıştır.

Pleomorfik sarkom saptanabilen bir diferansiyasyon göstermeyen iğsi, poligonal/epiteloid ve multinükleer hücrelerden oluşan yüksek dereceli malign mezenkimal tümördür. Kanama ve nekroz da içeren büyük solid görünümlü kitlelerdir. Nüks ve metastaz riski yüksektir.

Leiomyosarkom düz kas kökenli malign mezenkimal bir tümördür. Klinik bulgular lokalizasyona göre farklılık göstermektedir. Nodüler ya da diffüz birbirleri ile dik kesişen demetler şeklinde atipi ve sık tipik/atipik mitoz içeren hücrelerden oluşmaktadır. Genellikle tümör nekrozu mevcuttur.

Tümörün histopatolojik tiplendirmesi, bazı özel yumuşak doku tümörü tipi dışında hastalığın klinik davranışı hakkında yeterli bilgi vermemektedir. Bu nedenle özel derecelendirme ve evreleme yöntemleri belirlenmiş ve kullanılması önerilmiştir. *Federation Nationaledes Centers de Lutte Contre le Cancer (*FNCLCC) derecelendirme sistemi yumuşak doku sarkomlarının derecelendirmesinde en yaygın kullanılan sistemdir ve en önemli prognostik faktörlerdendir (Tablo-3) (2). FNCLCC sisteminde tümörün diferansiasyon derecesi, mitoz sayısı ve nekroz oranı kullanılarak toplam skor sonucuna göre tümör derecelendirilmesi yapılmaktadır.

Tablo 3. FNCLCC'e göre a) diferansiyasyon ve b) mitoz/nekroz skorları- B. Mahul AJCC'den değiştirilerek alınmıştır (1).

a)

Histolojik Tip	Tümör Diferansiyasyon Skor
İyi diferansiye liposarkom	1
Miksoid liposarkom	2
Yuvarlak hücreli liposarkom	3
Pleomorfik liposarkom	3
Dediferansiye liposarkom	3
Fibrosarkom	2
Miksofibrosarkom	2
Pleomorfik sarkom	3
İyi diferansiye leiomyosarkom	1
Konvansiyonel leiomyosarkom	2
Pleomorfik/Epiteloid leiomyosarkom	3
Bifazik/monofazik sinoviyal sarkom	3
Az diferansiye sinoviyal sarkom	3
Rabdomyosarkom	3
Extraskletal miksoid kondrosarkom	2
Mezenkimal kondrosarkom	3
Ekstraskletal kondrosarkom	3
Ewing sarkom/PNET	3
Epiteloid sarkom	3
Malign rabdoid tümor	3
Malign triton tümor	3

b)

FNCLCC'ye göre histolojik derecelendirme	
Tümör Diferansiyasyonu	
Skor 1	Normal mezenkimal dokuya çok benzeyen
Skor 2	Histolojik tipi belirgin olan
Skor 3	Diferansiyasyonu belirsiz/embriyonel sarkom/sinoviyal sarkom
Mitoz Skoru	
Skor 1	0-9 /1,7 mm^2
Skor 2	10-19 /1,7 mm^2
Skor 3	≥20 /1,7 mm^2
Nekroz Skoru	
Skor 0	Nekroz yok
Skor 1	<%50 tümör nekrozu
Skor 2	≥%50 tümör nekrozu

Histolojik Derecelendirme	Derece 1: Total Skor 2-3
	Derece 2: Total Skor 4-5
	Derece 3: Total Skor 6-8

Evrelemede en sık American Joint Committee on Cancer (AJCC) Evreleme Sistemi kullanılmaktadır (Tablo-4) (2).

Tablo 4. Yumuşak doku tümörlerinde TNM evrelemesi - AJCC 2018'e göre(2)

TNM Sınıflaması	
pT Gövde ve Ekstremite	
pTX	Primer tümör değerlendirilemez
pT0	Primer tümör kaydı yok
pT1	Tümörün en büyük boyutu 5 cm ya da daha küçük
pT2	Tümörün en büyük boyutu 5 cm'den büyük 10 cm'den küçük
pT3	Tümörün en büyük boyutu 10 cm'den büyük 15 cm'den küçük
pT4	Tümörün en büyük boyutu 15 cm'den büyük
pT Abdomen and Torasik organlar	
pTX	Primer tümör değerlendirilemez
pT1	Organ sınırlı
pT2	Organın ötesindeki dokuya tümör yayılımı
pT2a	Seroza ya da visseral peritona invazyon
pT2b	Seroza ötesine uzanma (mezenter)
pT3	Diğer organ invazyonu
pT4	Multifokalite
pT4a	Multifokal (2 alan)
pT4b	Multifokal (3-5 alan)
pT4c	Multifokal (5'den fazla alan)
pT Retroperiton	
pTX	Primer tümör değerlendirilemez
pT0	Primer tümör kaydı yok
pT1	Tümörün en büyük boyutu 5 cm ya da daha küçük
pT2	Tümörün en büyük boyutu 5 cm'den büyük 10 cm'den küçük
pT3	Tümörün en büyük boyutu 10 cm'den büyük 15 cm'den küçük
pT4	Tümörün en büyük boyutu 15 cm'den büyük
pN Kategori	
pNX	Primer tümör değerlendirilemez
pN0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
pN1	Bölgesel lenf nodu metastazı var
pM Kategori	
pMX	Primer tümör değerlendirilemez
pM1	Uzak metastaz var

TNM evrelemesi: T kategorisi, herhangi bir düzlemde tümörün en büyük çapı ölçülerek değerlendirilir Ekstremite malign yumuşak doku tümörlerinin histolojik tiplerinin çoğunda bölgesel nodal metastazlar nadirdir. Lenf nodları büyümüş, yuvarlak veya nekrotikse ya da nodun normal yağlı hilusunun yerini yumuşak doku alıyorsa, tümör tutulumu için şüpheli kabul edilir. Yumuşak doku sarkomu için metastatik bölgeler genellikle primer lezyonun orijinal bölgesine bağlıdır. Örneğin, ekstremite sarkomlu hastalarda en yaygın metastatik hastalık bölgesi akciğerdir, oysa retroperitoneal ve gastrointestinal sarkomlarda sıklıkla ilk metastaz bölgesi karaciğerdir (2).

2.4.7. Prognostik ve Prediktif Faktörler

Malign yumuşak doku tümörlerinde kabul gören başlıca prognostik faktörler evre, derece, tümör boyutu, tümör lokalizasyonu, lenfatik invazyon varlığı, mitoz varlığı, nekroz varlığı, cerrahi sınır durumu ile sendrom ve genetik mutasyon durumudur. Ayrıca neoadjuvan tedavi alınma durumu ile tedavinin süresi ve tedavi yanıtı önem taşımaktadır.

Son yıllarda yumuşak doku tümörlerinin biyolojisine yönelik yeni çalışmalar ile elde edilen güncel bilgiler tümör gelişim yolağında etkili olan, tümörün davranış biçimini ve tedavi yanıtını belirlemede etkili genetik ve epigenetik çeşitli faktörleri ortaya çıkarmıştır. Bireye özel tedavilerin planladığı günümüzde bu konuda yapılacak spesifik çalışmalar büyük önem taşımaktadır.

2.4.8. Moleküler Sınıflama ve Prognoza Katkısı

İnsan neoplazmları, somatik mutasyonlar olarak adlandırılan, çok çeşitli genetik değişiklikler gösterir. Mutasyon tipleri ve kalıpları, ploidi kaymalarından, tek baz değişikliklerine ve epigenetik değişikliklere kadar değişen farklı tümör varlıkları arasında ve bazen içinde oldukça değişken ve heterojendir. Tümör ile ilişkili mutasyonların bazıları birkaç tümör tipinde bulunurken, bazıları hastalığa özgü, hatta bazen patognomonik olabilir (Tablo-5). Belirli bir tümör fenotipi ile güçlü bir ilişki gösteren mutasyon türleri, klinik teşhis amaçları için kullanılabilir. Genetik analizler artık yumuşak doku tümörleri de dahil olmak üzere birçok tümörün teşhisinde geleneksel morfolojik ve immünohistokimyasal araştırmalara ek olarak rutin olarak

kullanılmaktadır. Ayrıca, belirli mutasyon türlerinin tümör hücrelerinin saldırganlığı üzerinde güçlü bir etkisi olduğu ve bu nedenle doğru tür ve tedavi düzeyini seçmek için mutasyon durumunun değerlendirilmesi gerektiği iyi bilinmektedir. Son zamanlarda, kronik miyeloid lösemi için kinaz inhibitörleri, malign melanom veya gastrointestinal stromal tümör gibi tümör hücrelerinde spesifik mutasyonların tanımlanmasına dayalı olarak genellikle hasta sonucunun dramatik bir şekilde iyileştirilmesiyle birlikte bir dizi yeni tedavi stratejisi geliştirilmiştir. Bu nedenle bilinen biyobelirteçlere sahip birçok tümör için, yaygın olarak moleküler patoloji olarak bilinen genetik karakterizasyon, artık gelişmiş tanısal kesinliğe ve tedavi sınıflandırmasına katkıda bulunan ve tedavi yanıtının değerlendirilmesine olanak tanıyan rutin sağlık bakımının ayrılmaz bir parçasıdır. Tüm bunlara ek olarak, genetik analizler, yumuşak doku tümörleri arasındaki klinik ve biyolojik varyasyonun genotiplerine yansıdığını göstermiştir ve son zamanlarda genetik bilginin eklenmesinin tanı kesinliğini önemli ölçüde iyileştirdiği gösterilmiştir (1).

Tablo 5. Spesifik moleküler değişiklikliği saptanan tümör tipleri- Matthew R. Lindberg, Diagnostic Pathology Soft Tissue Tumors'den alınmıştır (24).

Histolojik Tip	Anahtar Anormallik
Gastrointestinal stromal tümör	*KIT*, *PDGFRA* mutasyonları
Nodüler fasiit	t(17;22)(p13;q13) ile *MYH9-USP6* füzyonu
Sinoviyal sarkom	t(X;18)(p11;q11) içeren *SS18* (SYT) gen
Tenosinoviyal dev hücreli tümör	t(1;2)(2p;13q) içeren *CSF1-COL6A3* füzyonu
İyi diferansiye liposarkom	12. kromozomun halka formu; MDM2, CDK4, CPM amplifikasyonu
Ewing sarkom	t(11;22)(q24;q12) ile *EWSR1-FLI1* füzyonu
Dermatofibrosarkoma protuberans (DFSP)	t(17;22)(q21;q13) ile *COL1A1-PDGFB füzyonu*
Anjiosarkom	8q24 amplifikasyonu (*MYC*)

2.4.9. Tedavi Seçenekleri

Cerrahi operasyon ile tümörün total eksizyonu yumuşak doku tümörlerinin tedavisinde esas rolü almaktadır. Tümörün lokal kontrolünü sağlamak için ek olarak radyoterapi ve tümörün metastaz ve/veya nüks riski var ise ek sistemik tedavi verilebilir. Sistemik tedavi seçenekleri kemoterapi ve var ise hedeflenmiş tedavi ile bunların farklı kombinasyonlarıdır. Ayrıca sistemik tedavi cerrahi yapılamayacak hastalarda palyatif tedavi olarak kullanılabilir (1).

Tatmin edici lokal rezeksiyon, lezyon çevresinde normal doku sınırı olacak şekilde primer bölgenin rezeksiyonunu içerir (1). Radyasyon, malign yumuşak doku tümörlü hastaların çoğunda lokal nüksü azaltmada tartışmasız klinik fayda sağlar. Bununla birlikte, ödem, fibrozis ve radyasyona bağlı maligniteleri içeren bilinen yan etkileri vardır (1).

Kemoterapi, metastatik yumuşak doku tümörlü hastalarda tedavinin temel dayanağıdır. Tümör boyutuna ve lokalizasyonuna göre ayrıca tümörün metastaz yapma riski de dikkate alınarak cerrahi tedavi öncesi kemoterapi de planlanabilir (1).

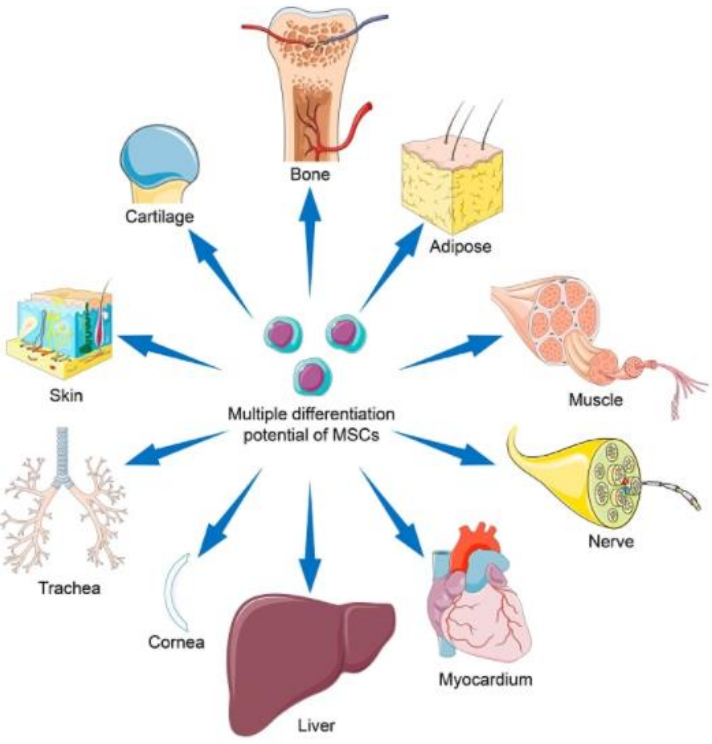
Moleküler tekniklerdeki ilerlemeler yumuşak doku tümörlerinin onkogenetik özelliklerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Bu yöntemler ile hem doğru tanıya ulaşma hem de tedaviye katkı açısından önemlidir. Direnç gelişimini önlemek ve doğru tedaviyi planlamak için moleküler yöntemlerin etkin kullanımı oldukça önemlidir (1).

2.5. KÖK HÜCRE

Kök hücreler hem kendini yenileme hem de farklılaşma yetenekleri olan hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler pluripotenttir ve gelişim sırasında embriyodaki uygun tüm hücre tiplerine farklılaşabilir. Yetişkin kök hücreler multipotenttir ve olgun işleyen hücrelere de farklılaşan progenitör hücre soyları üretebilir. Yetişkin kök hücreler, kararlı progenitörler ve farklılaşmanın çeşitli aşamalarındaki hücreler, yetişkin bir organdaki hücreleri oluşturur ve hücresel heterojenlik denilen şeyi yaratır (25).

2.5.1. Mezenkimal Kök Hücre

Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler) ilk olarak, fetal buzağı serumu içeren besiyerinde, kemik ve adipositlere farklılaşan yapışık fibroblast benzeri hücre kolonilerinin geliştiğini gösteren Fridenshtein tarafından tanımlandı (27). İlk olarak 1976'da ortaya çıkarılan MKH'ler, insan vücudunda en yaygın şekilde dağılmış hücrelerden birini temsil eder (28). Genel olarak, MKH'ler osteositlere, kondrositlere, adipositlere ve diğer soylara farklılaşabilen multipotent kök hücreler olarak karakterize edilir. MKH'ler kemik iliği, yağ dokusu, dermal doku, intervertebral disk, amniyotik sıvı, diş, insan plasentası ve kordon kanı gibi birçok dokudan izole edilebilir (Şekil-4). MKH'lerin doku homeostazının korunmasında işlevleri vardır. Bu hücreler, sahip oldukları her tür hücreye dönüşebilme potansiyelleri sebebiyle kıkırdak ve kemik onarımı, cilt yaralarının iyileşmesi, nöronal rejenerasyon, kalp rejenerasyonu gibi klinik uygulamalarda ve "homing" yeteneklerinden dolayı graft versus host hastalığının (GVHD) tedavisi dahil olmak üzere bağışıklık bozukluğu tedavisinde kullanılmaktadır (30).



Şekil 4. Mezenkimal Kök Hücrelerin farklılaşma potansiyelini gösteren diyagram (32).

2.5.2. Kanser Kök Hücresi

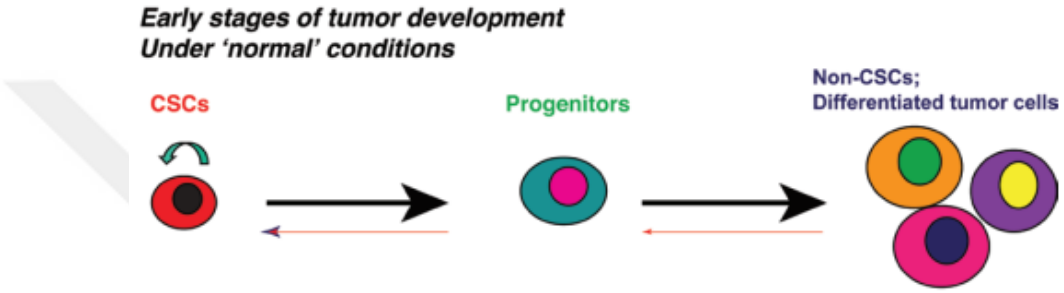
Kanser araştırmalarındaki ilerlemeler, kanser hastaları için yeni teşhis ve tedavi seçenekleri getirmiş ve kanser tedavisi ve önlenmesinde kayda değer bir ilerleme ile sonuçlanmıştır. Bununla birlikte, kanser, dünyanın birçok bölgesinde tüm ölümlerin %20 ve daha fazlasına neden olan önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Genetik çeşitlilik tedavi başarısızlığına neden olmaktadır ve hastalığın ilerlemesine katkıda bulunan kanserin ayırt edici özelliklerinden biri olarak tanımlanmıştır. İntratümöral heterojenitenin ilk araştırmaları, malign melanom hücrelerinde yüksek derecede genetik kararsızlığın, kemoterapötik ilaçlara dirençli hücre klonlarının daha yüksek oranda üretilmesine tekabül ettiğini göstermiştir. Son veriler, genomik instabilite oranına göre tümör sınıflandırmasının, tedavi direncini ve hastalık nüksetmesini öngörmede faydalı olabileceğini düşündürmektedir. Son zamanlardaki derin dizileme teknolojileri, hedeflenen tedaviye temel bir zorluk oluşturabilecek bireysel tümörlerin yüksek genetik heterojenliğini ve plastisitesini ortaya çıkarmıştır (6). Bir dizi tam genom dizileme çalışmasından elde edilen bilgiler, tümörün aşamalı bir şekilde birden fazla mutasyon içeren tek bir klonojenik hücreden kaynaklandığına dair yaygın olarak kabul edilen kavramı paramparça etmiş, buna karşılık, aynı tümör içinde birden fazla genetik olarak çeşitli klonların bir arada var olduğunu ortaya koymuştur. Farklı tedavi duyarlılığı ile ilişkili olan bu intratümöral heterojenite, tümör adaptasyonlarının ve terapötik başarısızlığın ortaya çıkması ile klonal evrim modelini geçersiz kılmaktadır. Genetik heterojenlik nedeniyle, farklı klonlar aynı tümör içinde farklı direnç mekanizmaları sergileyebilir. Tümör klonları arasındaki genetik farklılıklara ek olarak, aynı klonun hücreleri arasında kanser gelişiminin kök hücre modeli ile açıklanabilecek temel fonksiyonel ve fenotipik farklılıklar da vardır. Kanserojenezin kök hücre kavramı ilk olarak Dick ve tümörijenik özelliklerin, onları tümörijenik olmayan hücrelerden ayıran belirli yüzey belirteçlerinin ekspresyonu ile tanımlanabilen azınlık lösemi hücrelerinin azınlık popülasyonuna atfedilebileceğini gösteren çalışma arkadaşları tarafından gösterilmiştir (26). Farklı tümör tipleri için kanser kök hücre (KKH) modelinin geçerliliği ve KKH belirteçlerinin özgüllüğü hakkında pek çok tartışma ve belirsizlik devam etse de hiyerarşik neoplazm gelişimi modeli, KKH'lerin yüksek bir klinik ilişkisi olduğunu göstermiştir. Son on yılda, birçok solid tümör tipinde KKH

popülasyonları keşfedilmiştir ve bunların fenotipik ve fonksiyonel özellikleri yoğun araştırmaların konusudur. Birçok kanser türü için KKH'ler, KKH'ye özgü belirteçler kullanılarak tümör dokularından tanımlanabilen ve ileriye dönük olarak izole edilebilen ayrı bir hücre popülasyonunu temsil etmektedir. KKH'ler, toplu tümör hücrelerinden farklı olarak kendi kendini yenileme kapasitesi ve uzun vadeli repopülasyon potansiyeli gibi spesifik fonksiyonel özelliklere sahiptir, bu sayede tümör gelişimini başlatmalarını ve sürdürmelerini sağlarlar (6).

Tümör içerisindeki KKH sıklığı, akut miyeloid lösemide olduğu gibi %1'den az olan küçük bir popülasyondan akut lenfoblastik lösemide %82'ye kadar geniş bir aralıkta değişmektedir(26). Pluripotent hücrelere farklılaşabilen farklılaşmış somatik hücrelere benzer şekilde, KKH olmayan tümör hücrelerinin de KKH'lere yeniden programlanabileceğine dair bazı kanıtlar ortaya çıkmıştır (25).

Kanser kök hücreleri bir zamanlar istikrarlı ve sabit bir hücre popülasyonu olarak düşünüldüğünden, KKH'lerde yakın zamanda bildirilen heterojenlik ve KKH olmayanlardaki plastisite belirli kafa karışıklıkları getirmiş ve bazı araştırmacıların KKH 'lerin varlığından ve KKH kavramının geçerliliğinden şüphe duymasına neden olmuştur. KKH 'leri farklılaşmamış hücreler ve KKH olmayanları farklılaşmış tümör hücreleri olarak algılarsak, tüm bu fenomenleri anlamak daha kolay olabilir. Bu nedenle, farklılaşmamış kanser hücreleri, kısmen veya tamamen (en azından fenotipik olarak) farklılaşma yeteneğini korur. Bu, Lin-CD34+CD38- lösemik kök hücrelerin CD38+ lösemik hücrelere farklılaşma yeteneği ve tek tümör hücrelerinin küre geliştirme deneylerinde çeşitli fenotipik olarak olgun hücrelere farklılaşma yeteneği ile gösterilmiştir. Öte yandan, tümörijenik olaylar genellikle normal farklılaşma sürecini bozacağından, farklılaşmış tümör hücreleri, özellikle tümör ilerlemesine eşlik eden ve sitotoksik tedavilere yanıt olarak farklılaşma yeteneğine de sahip olabilir. Mevcut anti-kanser tedavilerin çoğu, öncelikli olarak ya farklılaşmış ya da çoğalan kanser hücrelerini hedefler ve muhtemelen, çoğunlukla farklılaşmamış hücrelere karşı etkili olmayacaktır. Gerçekten de çok sayıda kanıt, KKH 'lerin kemoterapötiklere, radyasyona ve immünoterapiye daha dirençli olduğunu ve gelişmiş metastaz yapma kabiliyetine sahip olduklarını göstermiştir. Ayrıca, birçok anti-kanser tedavisi, belki de kısmen farklılaşmayı indükleyerek KKH'leri zenginleştirebilir (Şekil-5). KKH 'ler ve KKH olmayanlar, birbirlerini yakından ve

karşılıklı olarak düzenleyebilir, etkinleştirebilir ve koruyabilir. Bu tartışmalar hem tümör başlatan hem de farklılaşmış tümör hücrelerinin kombine hedeflemesinin potansiyel faydasını göstermektedir. Aynı anda tümörijenik ve tümörijenik olmayan popülasyonları hedefleyerek hem kanser hücresi heterojenliği hem de plastisitenin üstesinden gelinebilir. Klinik tedavilere rehberlik etmede KKH gen imzalarının kullanılmasıyla birleştiğinde, spesifik olarak farklılaşmamış ve hareketsiz tümör hücrelerini hedefleyen daha fazla ve yeni terapötikler keşfederek, kanser hastalarında çok daha yüksek iyileşme oranı elde etmeyi umabiliriz(25).



Şekil 5. KKH'lerde plastisite. Tedavi edilmemiş veya erken evre tümörlerde, kendi kendini yenileyen KKH'ler hızla çoğalan tümör progenitörleri üretir ve bunlar da farklılaşmış tümör hücrelerine veya KKH olmayan hücrelere dönüşebilir.- Dean G Tang, Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity'den alınmıştır (25).

2.5.3. Yumuşak Doku Tümörü Kök Hücreleri

Güncel çalışmalar tümör içinde az sayıda bulunan ve tümörü yeniden başlatabilme kapasitesine sahip olan kanser kök hücrelerinin varlığına işaret etmektedir (32). KKH'lerinin kendi kendini yenileme ve farklılaşma yeteneği de dahil olmak üzere, normal kök hücrelerle benzer özelliklere sahip oldukları bildirilmiştir (26). Yumuşak doku tümörü kök hücreleri de multipotent mezenkimal kök hücrelerin ortam koşullarına bağlı olarak tümör başlatabilme kapasitesi kazanması ile oluşan ve çeşitli mezenkimal hücre kökenli tümörlerin oluşması ve gelişmesine katkı sağlayan hücrelerdir.

Yumuşak doku tümörleri genetik profillerinde, histolojilerinde ve klinik özelliklerinde yüksek derecede heterojenlik ile karakterize, mezenkimal kökenli,

nadir görülen malignitelerdir. Yumuşak doku tümörü kök hücreleri bu kanserleri karakterize eden heterojenliği açıklar ve bu hücrelerin nüks ve metastazdan sorumlu olabileceğini düşündürür (33). KKH'ler, dönüştürülmemiş yetişkin kök hücrelerle birçok özelliği paylaşır: çok yönlülük, embriyonik köken tabakasının soylarına farklılaşma olasılığı ile sonuçlanır; kendini yenileme kapasitesi, sessizlik, yavaş döngü ve aktif çoğalma durumları arasında geçiş yapabilme, apoptoza, DNA onarımına ve oksidatif strese karşı geliştirilmiş koruyucu mekanizmalar, enerji üretimi için oksidatif metabolizma gibi. Bununla birlikte, normal kök hücrelerin aksine, KKH'ler bu özelliklerin düzensizliği ile karakterize edilir ve hücre sinyallerini kontrol etme yeteneğine sahiptir. Hem hücre-otonom (sap sinyal yollarının aktivasyonu, epigenetik değişiklikler, DNA hasarı, replikatif stres) hem de hücre-otonom olmayan faktörler (bağışıklık sistemi, doku hasarı, mikro-ortam nişinden gelen sinyaller, terapi kaynaklı genotoksik stres) yeniden programlamaya katılıyor gibi görünmektedir (33).

Genomik değişikliğin türüne göre, yumuşak doku tümörleri iki ana kategoride sınıflandırılabilir:

a) Karşılıklı kromozomal translokasyonların olduğu ve
b) Çeşitli kromozomal bölgelerde amplifikasyonlar/delesyonlar gibi karmaşık genetik değişikliklerle karakterize edilen translokasyonsuz yumuşak doku tümörleri.

Füzyon pozitif yumuşak doku tümörleri, malignitenin ana itici gücü olarak füzyon onkoproteini ile morfolojik ve moleküler olarak benzer hücreler ile karakterize edilir. Tersine, füzyon negatif yumuşak doku tümörleri yüksek derecede tümör içi heterojenite gösterir (33).

Yumuşak doku tümörü kök hücreleri üzerine yapılan tüm tartışmalar büyük ölçüde hücre-otonom mekanizmalar üzerinde yoğunlaşmıştır. Bununla birlikte, doku homeostazının dokuya özgü kök hücreler ve bunların mikroçevreleri arasındaki çapraz bağlantılar tarafından düzenlendiği bilinmektedir ve benzer şekilde tümör nişlerinden gelen sinyaller yumuşak doku tümör kök hücrelerinin düzenlenmesinde ilgili roller oynayabilir. Tümörlerin farklı alt tipleri arasında, mikroçevresel bileşenler ile kök hücreler arasındaki etkileşimin önemi tanımlanmıştır (34).

Genomik değişiklikler ve mikroortam ile çok çeşitli tümör tipi oluşmakla birlikte tüm yumuşak doku tümörü kök hücreleri MKH'lerden köken almaktadır.

Tümör homeostazını sürdürmedeki mikro-ortamın ayrıntılı bilgisi, mikroçevreden gelen kök yanlısı sinyaller de dahil olmak üzere tümör yanlısı sinyallere karşı koymayı amaçlayan tedavilerin geliştirilmesini ve test edilmesini teşvik etmiştir (34).

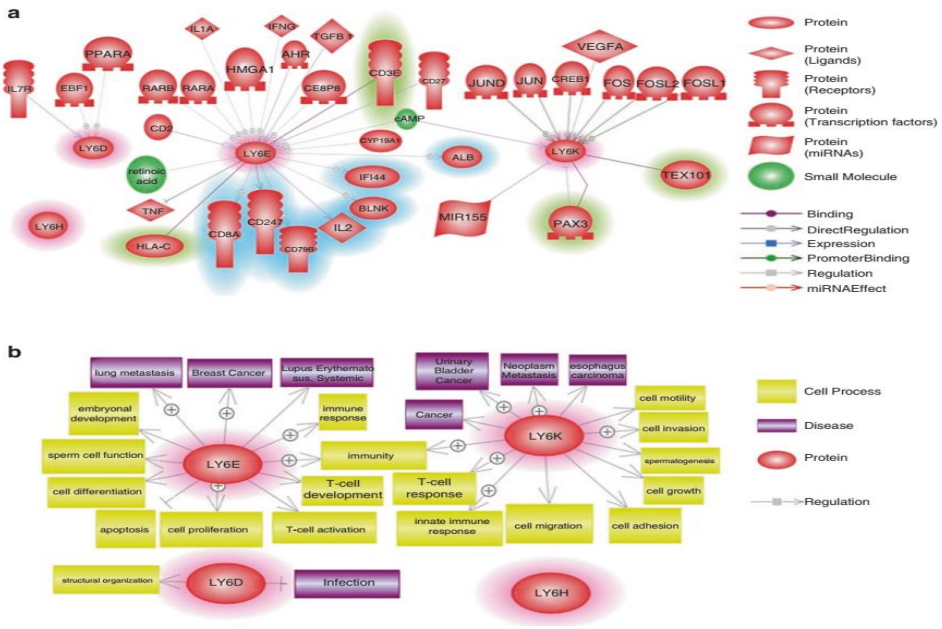
2.6. LENFOSİT ANTİJEN 6 (Ly6) GEN AİLESİ

Kök hücre antijeni-1 (*Sca-1*), fare *Ly6* gen ailesinin ilk tanımlanan üyesidir. *Sca-1*, dokuda yerleşik kök hücrelerin belirteci olarak tanımlanmıştır ve çeşitli solid organ tümörlerinde çoklu fare modelinde kanser başlatan hücre popülasyonu olarak kabul edilmiştir. *Sca-1*'in farede tümörijenik ilerlemeye yol açtığı tanımlanmıştır. İnsanlarda *Sca-1*'in doğrudan bir homoloğu yoktur; bununla birlikte insan *Ly6* genlerinin çok sayıda üyesi tarif edilmiştir. İnsan *Ly6* gen ailesi genellikle LU alanı içerir. Bu moleküller insan kromozomu 1, 2, 6, 8, 11 ve 19 boyunca dağılmıştır (10). *Ly6* gen ailesi, lenfosit antijen-6 (*Ly6*) / ürokinaz tipi plazminojen aktivatör reseptörü (uPAR) proteinlerinin üst ailesine aittir. Bu süper aile, LU alanının varlığı ile karakterize edilir. LU alanı, üç parmaklı (3F) yapısal motifi oluşturan farklı disülfid köprülerine izin veren belirli bir aralık düzeninde düzenlenmiş altı ila on sisteinden oluşan 60-80 amino asitlik bir bölgedir (9) (36).

Ly6/uPAR proteinlerinin ekspresyonu; çeşitli hücre tipleri ve dokular arasında yaygın ve değişkendir, sıkı bir şekilde uzaysal/zamansal bir tarzda düzenlenir ve sıklıkla hücresel farklılaşma ile ilişkilidir. *Ly6*/uPAR familyası protein yapıları türler arasında iyi korunmuş olmasına rağmen, ekspresyon paternleri değişiklik gösterme eğilimindedir. Birçok *Ly6*/uPAR ailesi üyesi, soy spesifik bir tarzda hematopoietik öncülerde eksprese edilir ve bu onları lökositler için yararlı hücre yüzeyi belirteçleri haline getirir, böylece bireysel lökosit alt gruplarının tanımlanmasını kolaylaştırır. Örneğin, fare myeloid farklılaşma işaretçisi *Ly6G* (Gr-1 olarak da adlandırılır), kemik iliğinde gelişimsel olarak düzenlenmiş bir şekilde myeloid soy hücreleri tarafından eksprese edilir. Anti-*Ly6G* antikorları, farede nötrofilleri tanımlamak için rutin olarak kullanılır, ancak *Ly6G* için insan ortologu olmadığından insanlarda kullanılamaz. *Ly6*/uPAR ailesi üyeleri, proinflamatuar koşullarda değişmez şekilde

aşağı regüle olan *SLURP1*'in dikkate değer bir istisnası dışında, genellikle inflamatuar durumlar veya enfeksiyonlar sırasında ve kanserli hücrelerde yüksek düzeyde ekspresyon gösterir (9).

Yapılan çalışmalar, *Ly6* gen ailesinin büyüme faktörleri, nükleer reseptör ve mikro RNA'lar dahil olmak üzere çok çeşitli moleküllerin etkileşiminde rol oynadığını ve bu sayede büyüme, apoptoz, otofaji ve bağışıklık yanıtı arasında değişen mikroçevre ile çok sayıda hücrenin akıbetini ve hücre-hücre etkileşimini etkilediğini göstermiştir (Şekil-6) (8)(9). Enflamasyonun ilerlemesi, kompleman aktivitesi, nöronal aktivite, anjiyogenez, yara iyileşmesi ve kanser büyümesi gibi çok çeşitli fonksiyonların düzenlenmesine katılımları, *Ly6*/uPAR ailesi üyelerinin faydalı terapötik hedefler olacağını gösterir. Bireysel aile proteinlerinin biyolojik işlevleri, bunların ekspresyonunu ve işlevlerini düzenleyen sinyal kaskadları ve etkileşim halindeki partnerlerinin kimliğinin, çeşitli hastalıkların tanı ve tedavisi için yeni modaliteleri müjdelemesi beklenmektedir.



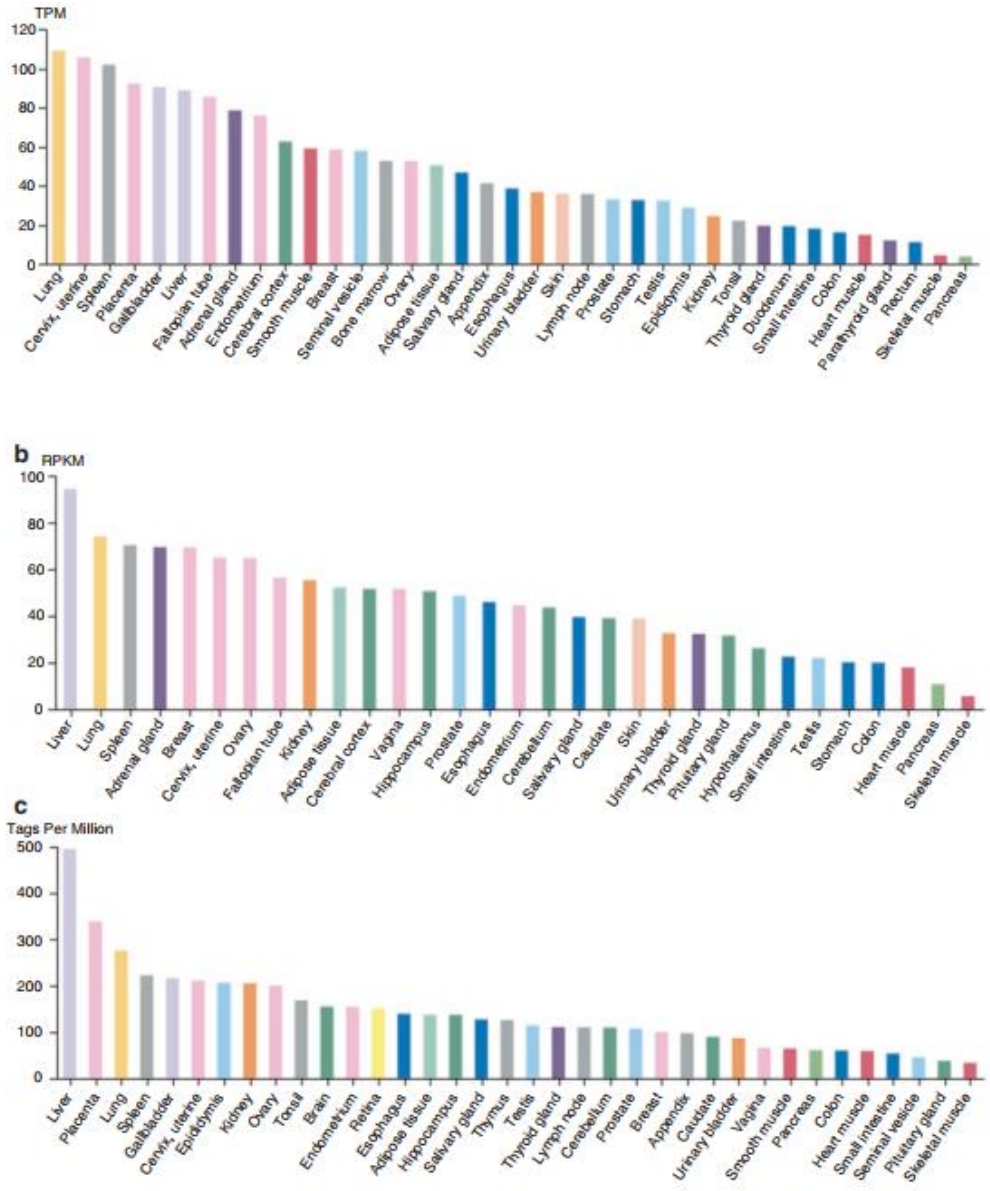
Şekil 6. Ly6 gen ailesi üyelerinden bazıları ve ilişkili oldukları moleküller (10).

2.6.1. Lenfosit Antijen 6E (Ly6E)

Ly6E farede trofoblast kök hücrelerinde kritik rol oynamaktadır. Fetal plasentada *Ly6E* yokluğunda, fetal-maternal plasental vaskülarizasyonun iyi oluşmadığı ve bu durumun fetüs için letal olduğu tespit edilmiştir (8).

Ly6E geni çeşitli transkripsiyon faktörleri, hücre yüzeyi reseptörleri, miRNA'lar aracılığı ile apopitoz inhibisyonu, hücre proliferasyonu, embriyonel gelişim, immünite ve sperm fonksiyonunu etkilemektedir.

Ly6E RNA'nın güncel çalışmalar ile insanda karaciğer dokusu, plasenta, akciğer ve dalak gibi organlarda eksprese olduğu Human Protein Atlas'da çeşitli data verileri ile gösterilmiştir (www.proteinatlas.org) (36).



Şekil 7. Normal insan dokularında *Ly6E*'nin RNA ifadesi. (a) HPA veri seti, (b) GTEx veri seti ve (c) FANTOM veri seti. (X ekseni, kullanılan doku tipinin adını gösterir. Y ekseni RNA ekspresyonunun birimlerini gösterir.) (36). (HPA: Human Protein Atlas; GTEx: Genotype Tissue Expressin; FANTOM: Functional Annotation of the Mouse/Mammalian Genome)

Çalışmalar *Ly6E* ekspresyonunun mesane, meme, özofagus, mide, pankreas, serviks, kolorektal, prostat, akciğer, baş ve boyun, over, böbrek, melanom ve embriyonik kanserlerde muadil normal dokulardan önemli ölçüde arttığını göstermektedir. *Ly6E*'nin artan ekspresyonu, over, kolorektal, mide, meme, akciğer,

mesane, beyin ve santral sinir sistemi kanseri hastalarında zayıf sağ kalım ile ilişkilendirilmiştir (10,29).

İnsanda *Ly6E* geninde yumuşak doku tümörleri açısından çalışma yapılmamış olmakla birlikte Şekil 7'de belirtildiği üzere düz kas dokusu, yağ dokusu ve deride belirli seviyede ekspresyonu olduğu bilinmektedir. Farelerde *Sca-1* ile yapılan çalışmalar genin malign yumuşak doku tümörlerinde artmış bir tümör başlangıcına sebep olduğunu göstermiştir (37).

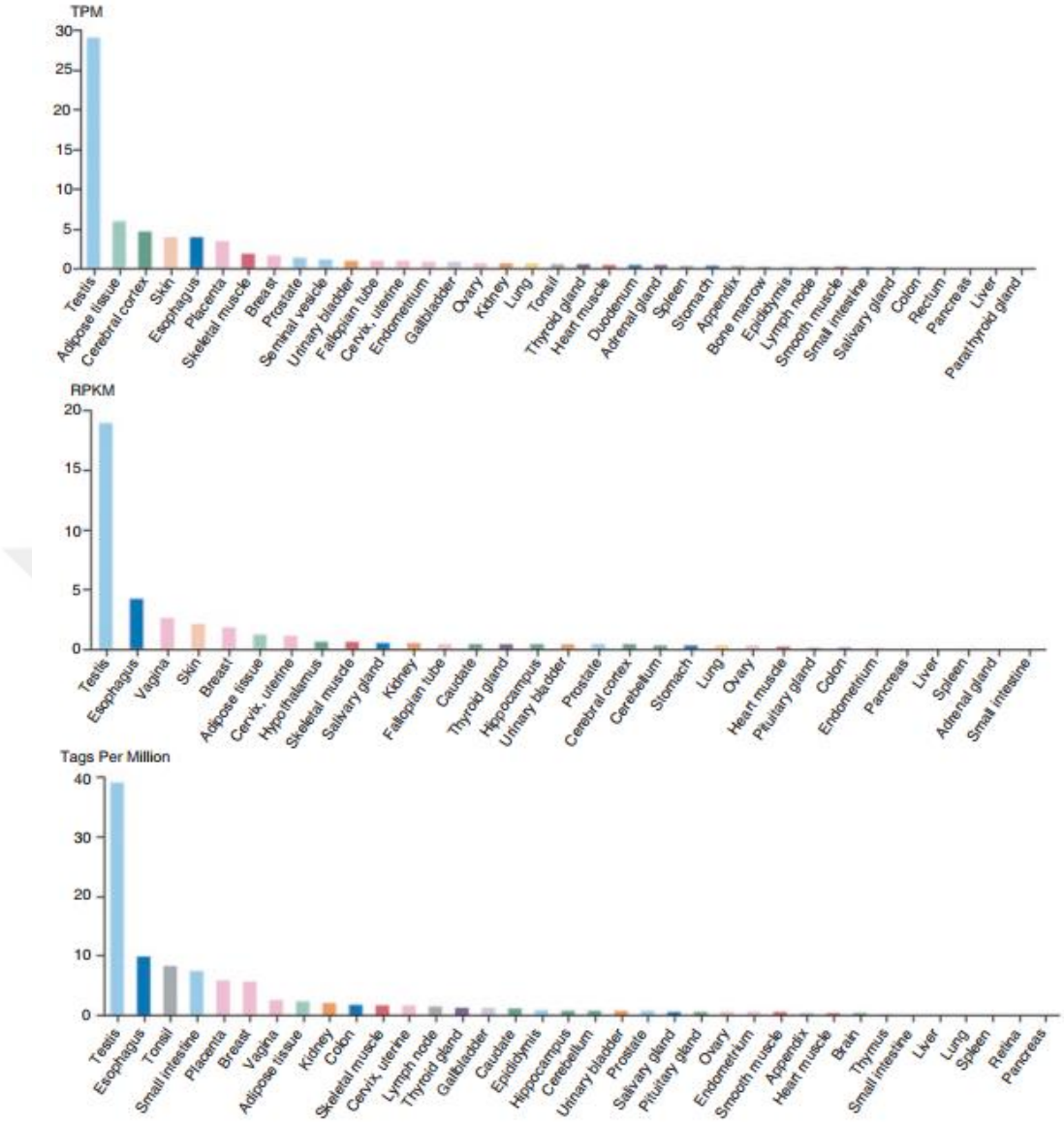
2.6.2. Lenfosit Antijen 6K (Ly6K)

Ly6K farede spermatozoa gelişiminde kritik rol oynamaktadır. *Ly6K* mutant erkek farelerde sperm oluşumu, migrasyonunun bozulduğu ve infertil oldukları tespit edilmiştir (8).

Ly6K geni çeşitli transkripsiyon faktörleri, hücre yüzeyi reseptörleri, miRNA'lar aracılığı ile doğuştan gelen immün yanıt, hücre migrasyonu, adezyonu, büyümesi, motilitesi ve spermatogenezi etkilemektedir.

Ly6K RNA'nın güncel çalışmalar ile insanda en yüksek oranda testiste olacak şekilde over, akciğer, kolon, meme ve prostat gibi organlarda ve yağ dokusunda çok düşük bir seviyede eksprese olduğu Human Protein Atlas'da çeşitli data verileri ile gösterilmiştir (www.proteinatlas.org) (38).

Ly6K'nın en yüksek eksprese olduğu testiste sperm motilitesi ile ilişkili olduğu saptanmıştır ve erkek infertilitesi ile ilişkili oldupu tespit edilmiştir (39).



Şekil 8. Normal insan dokularında *Ly6K*'nin RNA ifadesi. (a) HPA veri seti, (b) GTEx veri seti ve (c) FANTOM veri seti. (X ekseni, kullanılan doku tipinin adını gösterir. Y ekseni RNA ekspresyonunun birimlerini gösterir.) (36) (HPA: Human Protein Atlas; GTEx: Genotype Tissue Expressin; FANTOM: Functional Annotation of the Mouse/Mammalian Genome)

Çoklu çalışmalar *Ly6K* ekspresyonunun over, kolorektal, mide, meme, akciğer, mesane, beyin, santral sinir sistemi, servikal, özofagus, baş ve boyun ve pankreas tümörlerinde normal dokuya göre arttığı göstermiştir. *Ly6K*'nın artan ekspresyonu, over, kolorektal, mide, meme, akciğer, mesane, böbrek, beyin ve

santral sinir sitemi kanseri hastalarında kötü sağ kalım ile ilişkilendirilmiştir (10)(35).

İnsanda *Ly6K* geninde yumuşak doku tümörleri açısından çalışma yapılmamış olmakla birlikte Şekil 8'de belirtildiği üzere yağ dokusu ve deride belirli seviyede ekspresyonu olduğu bilinmektedir. Genin homoloğu ile farelerde yapılan çalışmalar malign yumuşak doku tümörlerinde etkili olduğunu göstermiştir (37).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 26.08.2020 tarihinde 2020-08/737 karar numarası ile alınan etik kurul onayı ile gerçekleştirildi.

Bu proje S.B.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından 2020/122 proje numarası ile desteklenmiştir.

3.1. KULLANILAN CİHAZ ve ALETLER

Mikrotom cihazı, mikropipet, vorteks cihazı, santrifüj cihazı, spin cihazı, Thermal cycler, Rotor gene cDNA cihazı

3.2. KULLANILAN SARF MALZEMELER ve KİTLER

Ependorf tüp, penset, bistüri, pipet ucu, absolute alkol, Qiagen deparafinizasyon solüsyonu, Qiagen qPCR primer beta aktin (Katalog no:330001-PPH0073G), Ly6E (Katalog no:330001-PPH10071F) ve Ly6K (Katalog no:330001-PPH09809A) kitleri.

3.3. VAKA SEÇİMİ

Bu çalışma için Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Patoloji Bölümü'nde 2017-2021 yılları arasında yumuşak doku tümörü tanısı almış ve eksizyonu hastanemizde yapılmış vakalar retrospektif olarak tarandı. Tıbbi Patoloji Bölümü arşivinde materyali bulunan, klinikopatolojik verilerine ve parafin bloklarına ulaşılabilen olgular arasından en fazla oranda canlı tümör hücresi içeren ve bulunduğu grubu en homojen şekilde temsil edebilecek 45 olgu çalışmaya alındı. Eksizyon öncesi tedavi alan hastalar; senkron veya metakron kanseri olan hastalar ile klinikopatolojik verilerine ulaşılamayan, sadece insizyonel biyopsi materyali olan, parafin bloğuna ulaşılamayan ve var olan bloklarda canlı tümör hücresi az olup geniş nekroz alanları içeren biyopsi materyallerine sahip olgular çalışmaya dahil edilmedi.

Seçilen hastaların demografik verileri not edildikten sonra materyaller histopatolojik olarak yeniden incelendi. Benign neoplazi olarak 6 adet Dermatofibrom ve 4 adet Leiomyom; malign neoplazi olarak da 9 adet Sinoviyal Sarkom, 11 adet Pleomorfik Sarkom ve 5 adet Leiomyosarkom vakası seçildi. Kontrol grubu olarak da bu tümörlerin köken aldığı bağ dokuyu en iyi temsil edeceği düşünülen normal sınırlarda deri altı dokusu ve düz kas dokusu olmak üzere 10 adet vaka belirlendi. Dolayısıyla vakalar şu şekilde gruplanmış oldu:

1. Tümör içermeyen dokularda *Ly6E* ve *Ly6K* bakılan grup.
2. Benign tümör içeren dokularda *Ly6E* ve *Ly6K* bakılan grup.
3. Malign tümör içeren dokularda *Ly6E* ve *Ly6K* bakılan grup.

3.4. FORMALİN FİKSE PARAFİN GÖMÜLÜ BLOKTAN RNA İZOLASYONU

3.4.1. Formalin Fikse Parafin Gömülü Bloktan Kesit Alınması

Olgulara ait hematoksilen-eosin boyalı preparatlar arşivden çıkarılarak yeniden değerlendirilerek uygun parafin bloklar belirlendi. Olgular numaralandırıldı. Bir neşter kullanılarak numune bloğundaki fazla parafin kesildi. Numune yüzeyi havaya maruz kaldığı için ilk 3-4 kesit atıldı. 5 µm kalınlıkta 8 kesit alınarak kesitler 2 mL'lik eppendorf tüpe alındı ve tüplerin kapakları kapatıldı. Yüksek nükleik asit eldesi için dokuların taze kesilmiş olmasına, 10 mikrondan daha kalın kesit yapılmamasına, parafinin örnekten uzaklaştırılmasına ve toplamda 40 µm kalınlığa ulaşacak şekilde kesit yapılmasına dikkat edildi. Aynı gün örneklere deparafinizasyon işlemi uygulanarak RNA izolasyonu yapılmak üzere kesitlerin bulunduğu eppendorf tüpler buz aküsü üzerinde laboratuvara ulaştırıldı. İzolasyon işlemleri öncesinde eppendorf tüpler 4 ^{o}C'de bekletildi.

3.4.2. RNA İzolasyonu için Gerekli Ön İşlemler

DNAaz I: Şişenin kapağı açılmadan enjektör yardımıyla 550 µL RNAaz içermeyen su eklendi. Fiziksel denatürasyon söz konusu olduğu için şişe karıştırılmak yerine nazikçe ters çevirildi.

RPE Buffer: 44 mL Absolute Etanol (96–100%) Buffer RPE üzerine eklenir ve şişe etanol eklendiğini belirtir şekilde etiketlendi. Prosedüre başlamadan önce, sulandırılmış Buffer RPE sallanarak karıştırıldı.

Eldiven: RNAaz enziminin çalışmak için kofaktöre ihtiyacı yoktur o yüzden sık sık eldiven değiştirildi.

Santrifüj: Santrifüj 21-23 ^{o}C'ye ayarlandı.

Termal Karıştırıcı: Termal karıştırıcılardan birisi 56 ^{o}C, diğeri 80 ^{o}C'ye ayarlandı.

Deparafinizasyon: Kesitlerin bulunduğu eppendorf tüpler 9000 x g'de 2 dk santrifüj edildi, her bir tüpteki örneğin tam üzerine gelecek şekilde 320 µl Deparafinizasyon Solüsyonu eklenerek, 10 saniye kuvvetlice vortekslendi ve örnekleri tüpün dibine indirmek için kısaca santrifüj yapıldı. Tüpler, 56°C'de 3 dakika inkübe edildi, ardından oda sıcaklığında (15–25°C) soğumaya bırakıldı. Soğuduktan sonra mumsu veya katı hale gelirse, ek Deparafinizasyon Solüsyonu eklendi ve 56 °C'de 3 dakika inkübasyonu tekrarlandı. Tüplere 240 µl Buffer PKD eklendi ve vorteks yapıldı. Örnekler, 11.000 x g'de (10.000 rpm) 1 dakika santrifüj edildi.

3.4.3. RNA İzolasyon Protokolü

1. Alt, berrak faza 10 µL Proteinaz K eklendi ve pipetaj yapılarak hafifçe karıştırıldı.

2. Tüpler önce 56°C'de 15 dakika, ardından 80°C'de 15 dakika inkübe edildi. Çalkalama işlevi olmayan bir ısıtma bloğu kullanıldığından, her 3-5 dakikada bir vorteks-spin yapıldı.

3. Alttaki renksiz faz yeni bir 2 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.

4. Buz üzerinde 3 dakika inkübe edildi ve 20.000 x g'de (13.500 rpm) 20 dakika santrifüj yapıldı. Pelete dokunmamaya özen gösterilerek süpernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.

5. Toplam örnek hacminin (yaklaşık 25 µL) onda birine eşdeğer DNase Booster Buffer ve 10 µL DNase I stok solüsyonu eklendi. Tüp alt-üst edilerek

karıştırıldı. Tüpün kenarlarından kalan sıvıyı toplamak için kısa süre santrifüj edildi.

6. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.

7. Tüplere 500 µL Buffer RBC eklendi ve lizat iyice karıştırıldı.

8. Örneğe 1200 µL Etanol (%100) eklendi ve pipetleyerek iyice karıştırıldı. Santrifüj edilmeden hemen sonraki adıma geçildi.

9. Oluşabilecek herhangi bir çökelti dahil olmak üzere 700 µL örnek 2 mL'lik bir toplama tüpüne yerleştirilmiş RNeasy MinElute kolonuna aktarıldı ve kapağı nazikçe kapatıldı.

10. Tüpler 9000 x g'de (10.000 rpm) 15 saniye santrifüj yapıldı. Kolonda kalan sıvı atıldı.

11. Önceki adımda kullanılan toplama tüpü yeniden kullanıldı.

12. Örneğin tamamı RNeasy MinElute kolonundan geçene kadar 9. adım tekrarlandı. Önceki adımda kullanılan toplama tüpü yeniden kullanıldı.

13. RNeasy MinElute kolonuna 500 µL Buffer RPE eklendi ve tüpün kapağı nazikçe kapatıldı.

14. Tüpler 9000 x g'de (10.000 rpm) 15 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpüne biriken sıvı atıldı. Önceki adımda kullanılan toplama tüpü yeniden kullanıldı.

15. RNeasy MinElute kolonuna 500 µl Buffer RPE eklendı. Kapağı nazikçe kapatıldı ve spin kolon membranını yıkamak için 9000 x g'de (10.000 rpm) 2 dakika santrifüj yapıldı. Toplama tüpü içindeki sıvı ile birlikte atıldı.

16. Santrifüjlemeden sonra, kolonun sıvı ile temas etmemesi için RNeasy MinElute kolonunu toplama tüpünden dikkatlice çıkarıldı (Aksi takdirde etanol bulaşabilir.).

17. RNeasy MinElute kolonu 2 mL'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Kolonunun kapağı açık şekilde ve 21500 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü içindeki sıvı ile birlikte atıldı.

Kapaklarına zarar vermemek için kolonlar, kolonlar arasında en az bir boş pozisyon olacak şekilde santrifüje yerleştirildi. Kapaklar, rotorun dönüş yönünün tersine bakacak şekilde yönlendirildi. Kapaklar açıkken

santrifüjlemek, RNA elüsyonu sırasında etanol taşınmamasını sağlamak için uygulandı.

18. RNeasy MinElute kolonu yeni bir 1,5 mL toplama tüpüne yerleştirildi. Doğrudan kolon membranına 20 µL RNaz içermeyen su eklendi.

19. Tüplerin kapağı nazikçe kapatıldı ve RNA'yı ayrıştırmak için 21500 x g'de 1 dakika santrifüj yapıldı.

20. Elde edilen RNA örnekleri -20 ºC'de beklemeye alındı.

3.4.4. RNA'dan cDNA Sentezi

RT^2 First Strand Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak total RNA'dan cDNA sentezlenmesi amaçlandı. Kit çözüldükten sonra kısa bir spin yapıldı ve sonrasında tüplerin kapağı açıldı. Her bir örnek toplamda 25 ng-5 µg RNA içerecek şekilde nükleaz içermeyen su ile seyreltildi. Seyreltilen RNA örneklerine aşağıdaki tabloda belirtildiği şekilde genomik DNA eliminasyon işlemi uygulandı (Tablo-6).

Tablo 6. RNA örneklerinden DNA eliminasyonu için gerekli karışım miktarları.

Total RNA	8 µL
Buffer GE	2 µL
Toplam reaksiyon hacmi	10 µL

Tüpler 42 ºC'de 5 dakika inkübe edildi ve hemen buza alınıp 1 dakika bekletildi. Total RNA'dan cDNA sentez reaksiyonu için aşağıdaki tabloda belirtilen şekilde tüpler reaksiyona hazırlandı (Tablo-7).

Tablo 7. Total RNA'dan cDNA sentez reaksiyonu için gerekli karışım miktarları.

5x Buffer BC3	4 µL
RE3 Reverse Transcriptase Mix	2 µL
RNase-free water	4 µL
Toplam reaksiyon hacmi	10 µL

Tüpler 42 ºC'de 15 dakika ve 95 °C'de 5 dakika inkübe edildi. Elde edilen cDNA örnekleri uzun süreli saklama söz konusu olduğunda -20 ºC'de muhafaza edildi.

3.4.5. qPCR Tekniği ile mRNA Ekspresyon

cDNA örneklerine her tüpe 91 µL nükleaz içermeyen su (1:5 oranında) eklenerek seyreltme işlemi yapıldı ve aşağıdaki tabloya göre qPCR reaksiyonu hazırlandı (Tablo-8). Her bir örnek çift çalışıldı.

Tablo 8. qPCR için gerekli karışım miktarları

RT^2 qPCR Mastermix	10 µL
RNase-free water	6 µL
RT2 qPCR Primer Assay	1 µL
cDNA template	3 µL
Toplam reaksiyon hacmi	20 µL

Hazırlanan tüpler Rotor-Gene (Qiagen, Almanya) Real-Time PCR cihazı içinde, 95 °C'de 10 dakika, 45 döngü boyunca 95 °C'de 15 saniye, 60 °C'de 30 saniye ve 1°C/dakika, 65-95 °C'de melting curve analizi olacak şekilde inkübe edildi.

3.4.6. Delta Delta Ct Analizi

qPCR işlemi sonrasında her bir çift çalışılan örnekden elde edilen Ct değerlerinin aritmetik ortalaması alındı. Çalışmada kontrol gen olarak Beta-aktin kullanıldı. Örneklere delta-delta-Ct metodu uygulanırken her bir grubun kendi içindeki kontrol grubundan bir örnek kalibratör seçilerek veriler normalize edildi.

3.4.7. Biyoistatistiksel Analiz

Verilerin dağılımına histogram, qq plot ve Shapiro-Wilk testi ile bakıldı. Uç noktalar (outliers) çalışmadan çıkarıldı. İki grup arası verilerin karşılaştırılmasında bağımsız t-testi kullanıldı. 3 ve daha çok gruptan oluşan kıyaslamalarda ANOVA ve anlamlı olma durumunda ikili karşılaştırılma için Tukey'in çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. İki bağımsız niteliksel kriteri test etmek için Ki-Kare Testi (Chi-square test) kullanıldı. Özet istatistik olarak birim sayısı (n), ortalama ve standart sapma değerleri verildi. $p<0,05$ anlamlılık düzeyi kabul edildi. Verilerin analizinde ve grafiklerin yapımında GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, CA, USA) yazılımı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmamıza 45 olgu dahil edilmiştir. Bu olguların 10 tanesi tümör içermeyen kontrol grubunu oluştururken 2020 WHO Yumuşak Doku Tümörleri Klasifikasyonuna göre 6'sı Dermatofibrom, 4'ü Leiomyom olmak üzere vakaların 10'unu benign tümörler; 9'u Sinoviyal Sarkom, 11'i Pleomorfik Sarkom ve 5'i Leiomyosarkom olmak üzere geri kalan 25'ini de malign tümörler oluşturmaktaydı (Tablo-10).

Olguların ilk tanı aldıkları yaş aralığı 20 ile 80 arasında değişmekte olup, yaş ortalaması 53,67'dir. Pleomorfik sarkom ve leiomyosarkom olgularının yaşları diğer gruplara göre istatistiksel olarak da daha yüksek olup sinoviyal sarkom olguları ise daha genç yaş ortalamasına sahiptir. Olguların 30'u (%66,7) kadın ve 15'i (%33,3) erkek olup Kadın:Erkek oranı 2'dir ve gruplar içerisinde heterojen dağılım vardır (Tablo-9).

Tablo 9. Çalışmaya alınan hastaların tanı grupları, yaş ve cinsiyet verileri

Ana Gruplar	**Tanı Grubu**	**Yaş (Ortalama: 21-80)**	**Cinsiyet**	
			Erkek	**Kadın**
Benign	Dermatofibrom	40	1	5
	Leiomyom	49	0	4
Malign	Sinoviyal Sarkom	36	4	5
	Pleomorfik Sarkom	64	5	6
	Leiomyosarkom	65,6	1	4
Kontrol	-	61,45	4	6
Toplam		53,9	15	30

Tablo 10. Olguların tanı grupları ve grup içi oranları

Ana Gruplar	Tanı Grubu	Olgu Sayısı (n)	Tanı Grubu Oranları (%)	Ana Grup Oranları(%)
Benign	Dermatofibrom	6	13,3	22,2
	Leiomyom	4	8,9	
Malign	Sinoviyal Sarkom	9	20,0	55,6
	Pleomorfik Sarkom	11	24,4	
	Leiomyosarkom	5	11,1	
Kontrol	-	10	-	22,2
Toplam		**45**	**100**	

Lokalizasyon dağılımı açısından değerlendirildiğinde tümörler 17 olguda (%48,5) alt ekstremite, 8 olguda (%22,8) üst ekstremite, 2 olguda (%5,7) retroperiton, 5 olguda (%14,2) uterus, 3 olguda (%8,5) batın içi yerleşimdedir (Tablo-11).

Tümör lokalizasyonu en sık alt ekstremite olup; sinoviyal sarkom grubunun tamamı alt ekstremitededir. Leiomyomların tamamı uterus yerleşimli olup diğer gruplarda lokalizasyonlar heterojendir.

İstatistiksel olarak tümör tipi ve tümör lokalizasyonu arasında anlamlı fark saptanmadı.

Tümörlerin derecelemesinde ‘French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group (FNCLCC)’ derecelendirme sistemi kullanılmaktadır. Çalışmamıza dahil edilen malign tümörlerin büyük kısmı yüksek dereceli olup, 1 adet düşük dereceli (Grade 1) tümör tespit edilmiştir. 6 adet Grade 2 ve 16 adet Grade 3 tümör mevcuttur.

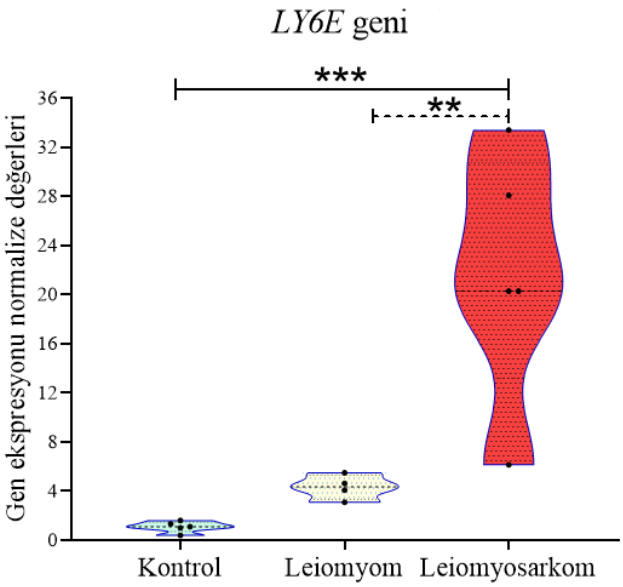
Tablo 11. Çalışmaya alınan tümörlü hastaların tümör boyutu, lokalizasyon ve patolojik verileri

Ana Gruplar		Benign		Malign		
Tanı Grubu		Dermatofibrom	Leiomyom	Sinoviyal Sarkom	Pleomorfik Sarkom	Leiomyosarkom
Tümör Boyutu (cm)		0,68	4,6	9,3	12,1	11,5
Lokalizasyon	**Üst Ekstremite**	4	-	-	4	-
	Alt Ekstremite	2	-	9	5	1
	Uterus	-	4	-	-	1
	Abdomen	-	-	-	-	3
	Retroperiton	-	-	-	2	-
Nekroz Skoru	**Skor 0**	-	-	2	2	-
	Skor 1	-	-	4	7	2
	Skor 2	-	-	3	2	3
Mitoz Skoru	**Skor 1**	-	-	2	2	2
	Skor 2	-	-	1	4	-
	Skor 3	-	-	6	5	3
FNCLCC Grade	**Grade 1**	-	-	-	-	1
	Grade 2	-	-	2	2	2
	Grade 3	-	-	7	9	2
Lokal Nüks	**VAR**	-	-	3	4	1
	YOK	-	-	6	7	4
Vasküler İnvazyon	**VAR**	-	-	2	-	-
	YOK	-	-	7	11	5

4.1. GEN EKSPRESYON BULGULARI

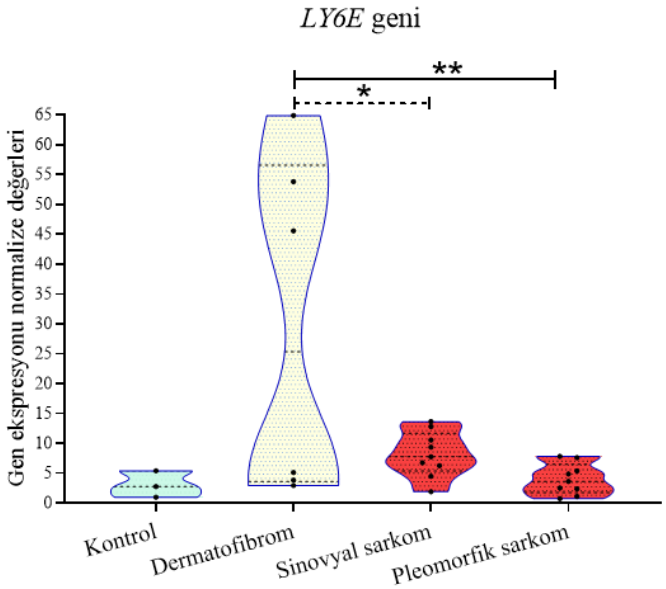
4.1.1. Ly6E

Rotor-Gene (Qiagen, Almanya) Real-Time PCR cihazı ile qPCR tekniği ile yapılan ekspresyon çalışmaları sonucuna göre *Ly6E* ile düz kas benign (LM) ve malign (LMS) tümörlerinde kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı artış saptandı($p<0,006$). Aynı şekilde leiomyosarkomda da leiomyoma kıyasla orta derecede istatistiksel olarak anlamlı artış mecvuttur. (Şekil-9).



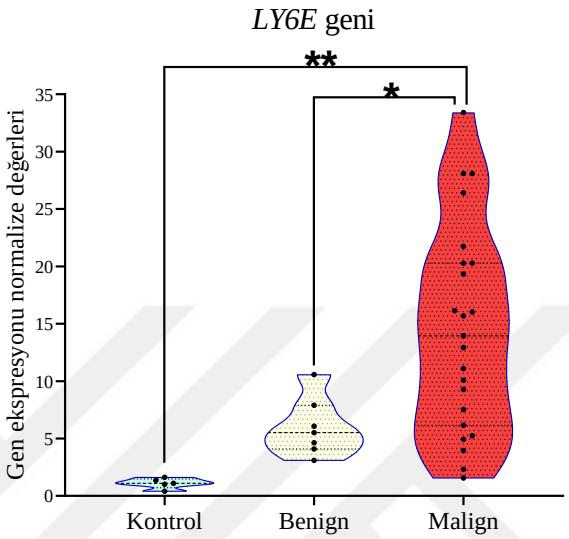
Şekil 9. Düz kas kökenli tümörlerde *Ly6E* gen ekspresyonunun karşılaştırılması

Ly6E gen ekspresyonunda benign bir tümör olan dermatofibrom ile bağ dokudan köken alan malign tümörler olan sinovyal sarkom ve pleomorfik sarkomlarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı. Ancak dermatofibromlarda malign tümörlerle karşılaştırıldığında *Ly6E* ekspresyonu anlamlı şekilde yüksek olarak tespit edildi. ($p<0,0330$ ve $p<0,0088$) (Şekil-10).



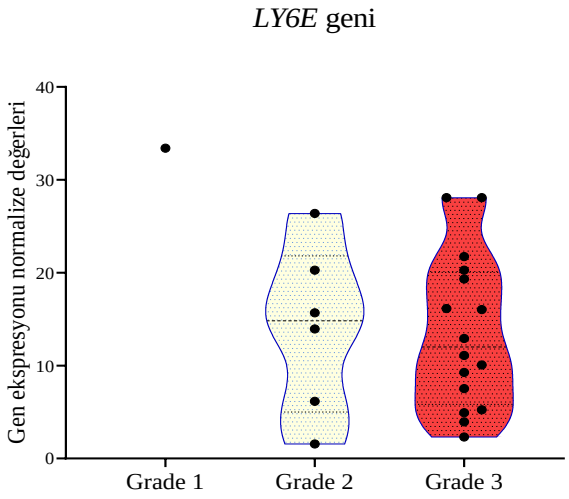
Şekil 10. Bağ doku kaynaklı tümörlerde *Ly6E* gen ekspresyonunun karşılaştırılması

Tüm gruplar birlikte değerlendirildiğinde malign grupta kontrol grubuna ve benign gruba göre istatistiksel açıdan anlamlı ölçüde *Ly6E* gen ekspresyonu artışı tespit edildi ($p<0,0030$ ve $p<0,0351$). Benign grup ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki yoktur (Şekil-11).



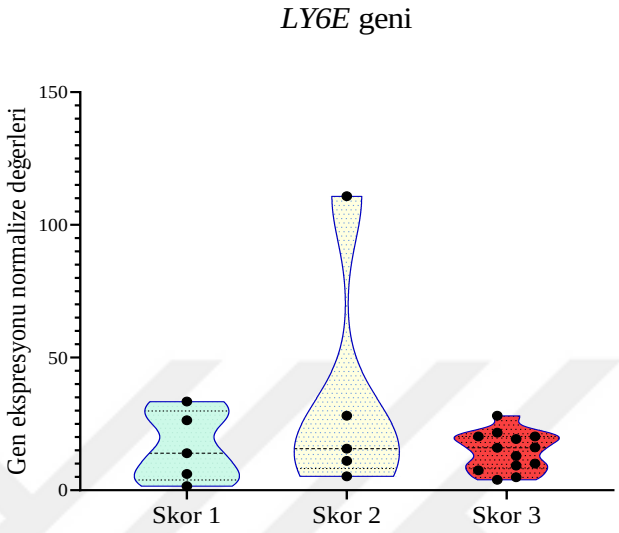
Şekil 11. Tüm gruplarda *Ly6E* gen ekspresyonunun karşılaştırılması

Malign yumuşak doku tümörlerinde *Ly6E* gen ekspresyonu FNCLCC sistemine göre analiz edildiğinde derece ile gen ekspresyonu arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki izlenmedi (Şekil-12).



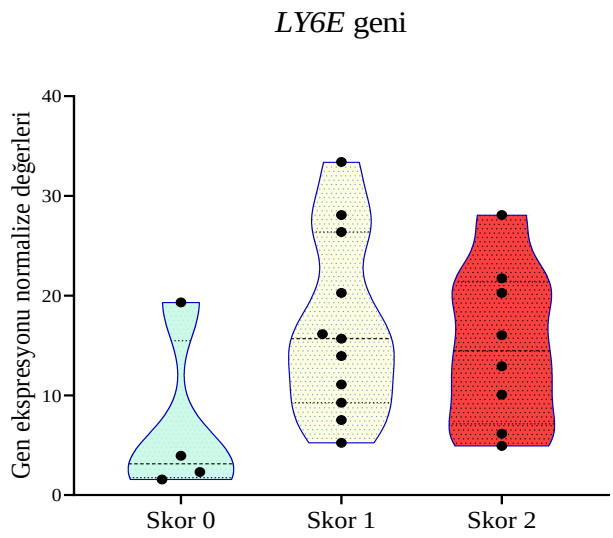
Şekil 12. FNCLCC derecesi ile *Ly6E* gen ekspresyonunun karşılaştırılması

Malign yumuşak doku tümörlerinde mitotik aktiviteye göre yapılan değerlendirmede *Ly6E* gen ekspresyonu ile FNCLCC mitoz skoru arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki izlenmedi (Şekil-13).



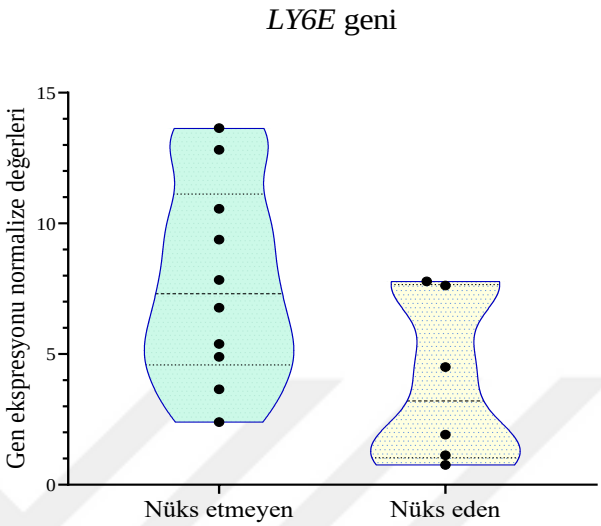
Şekil 13. FNCLCC mitoz skoru ile *Ly6E* gen ekspresyonunun karşılaştırılması

Malign yumuşak doku tümörlerinde nekroz varlığına göre yapılan değerlendirmede *Ly6E* gen ekspresyonu ile FNCLCC nekroz skoru arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki izlenmedi (Şekil-14).



Şekil 14. FNCLCC nekroz skoru ile *Ly6E* gen ekspresyonunun karşılaştırılması

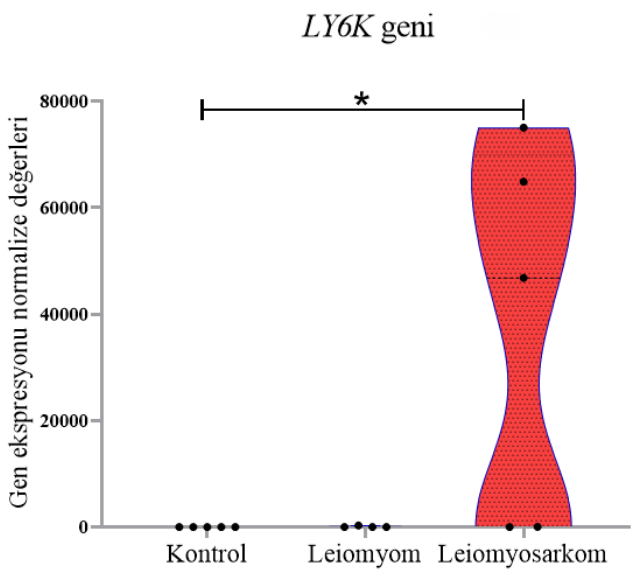
Malign yumuşak doku tümörlerinde lokal nüks gösteren 8 vaka saptanmış olup, nüks olan vakalardaki *Ly6E* gen ekspresyon düzeyleri nüks izlenmeyen vakalar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ilişki görülmedi (Şekil-15).



Şekil 15. Lokal nüks görülen vakalardaki *Ly6E* gen ekspresyonunun karşılaştırılması

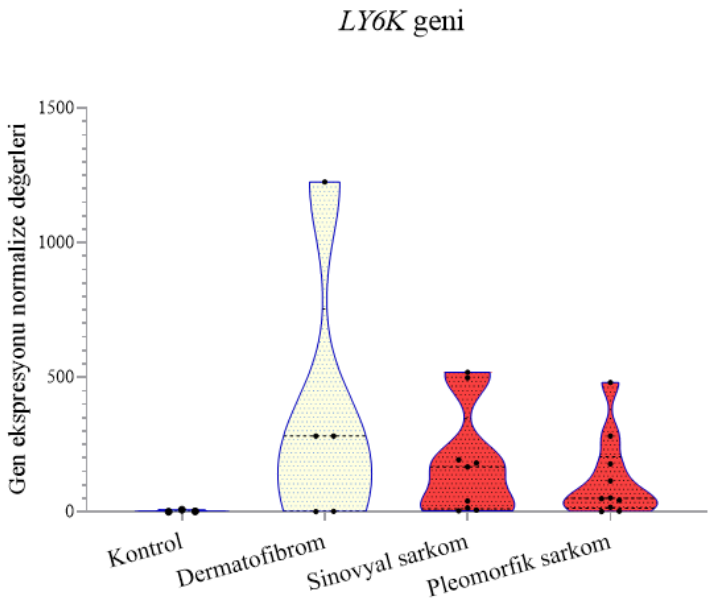
4.1.2. Ly6K

Rotor-Gene (Qiagen, Almanya) Real-Time PCR cihazı ile qPCR tekniği ile yapılan ekspresyon çalışmaları sonucuna göre *Ly6K* ile leimyosarkomlarda kontrol grubuna göre anlamlı artış saptandı ($p<0,0455$). Ancak malign grup ile benign grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki yoktur (Şekil-16).



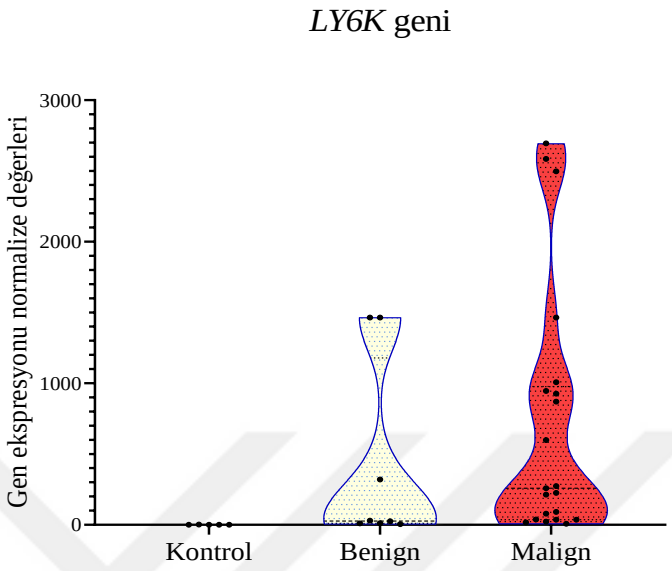
Şekil 16. Düz kas kökenli tümörlerde *Ly6K* gen ekspresyonunun karşılaştırılması

Ly6K ile deri altından ve bağ dokudan köken alan tümörlerde birbirleri arasında ve kontrol grubu ile yapılan değerlendirmede istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı (Şekil-17).



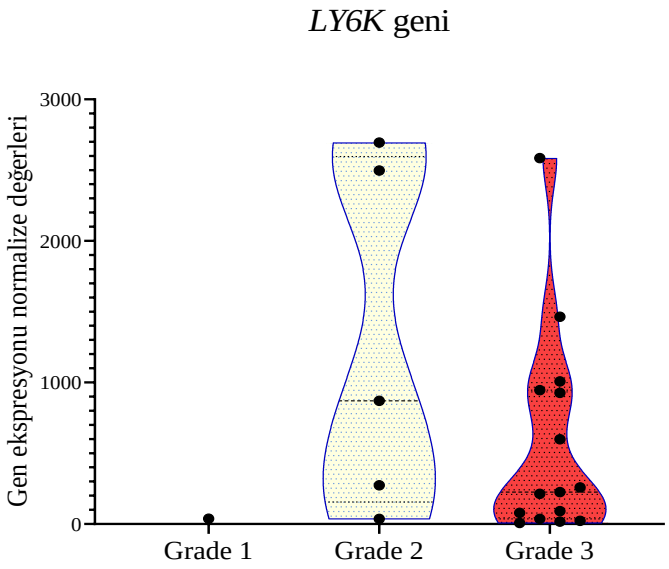
Şekil 17. Bağ doku kaynaklı tümörlerde *Ly6K* gen ekspresyonunun karşılaştırılması

Tüm gruplar birlikte değerlendirildiğinde *Ly6K* gen ekspresyonu açısından istatistiksel açıdan anlamlı ilişki elde edilemedi (Şekil-18).



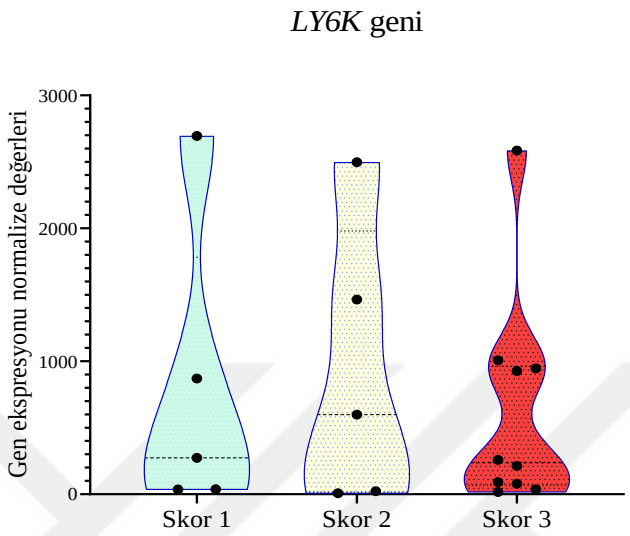
Şekil 18. Tüm gruplarda *Ly6K* gen ekspresyonunun karşılaştırılması

Malign yumuşak doku tümörlerinde *Ly6K* gen ekspresyonu FNCLCC sistemite göre analiz edildiğinde derece ile gen ekspresyonu arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki izlenmedi (Şekil-19).



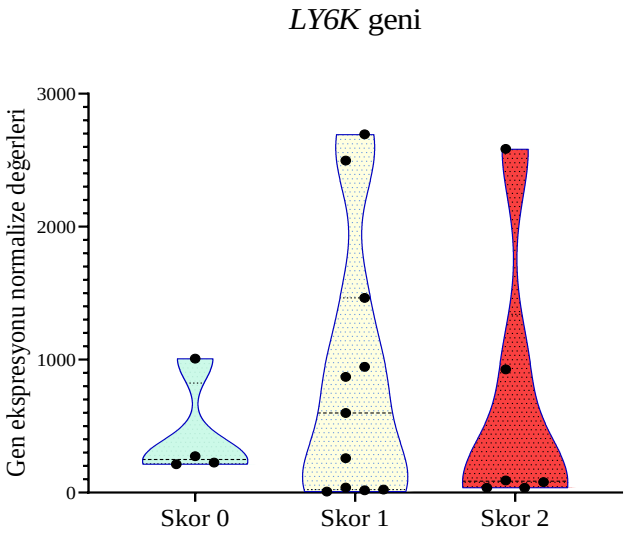
Şekil 19. FNCLCC derecesi ile *Ly6K* gen ekspresyonunun karşılaştırılması

Malign yumuşak doku tümörlerinde mitotik aktiviteye göre yapılan değerlendirmede *Ly6K* gen ekspresyonu ile FNCLCC mitoz skoru arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki izlenmedi (Şekil-20).



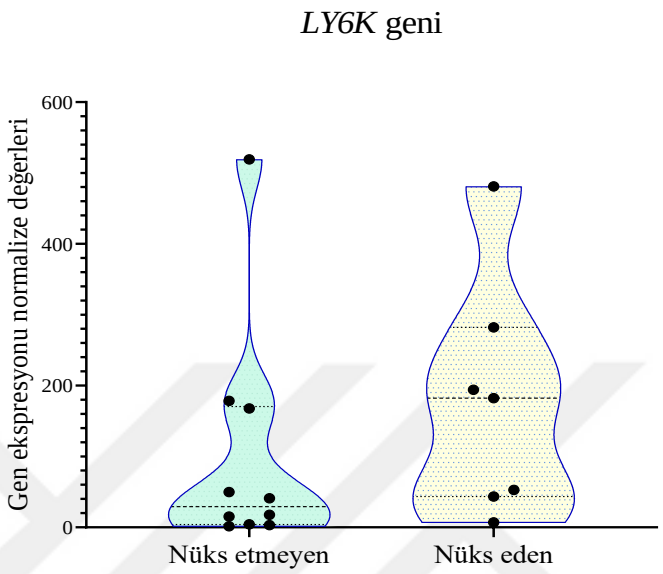
Şekil 20. FNCLCC mitoz skoru ile *Ly6K* gen ekspresyonunun karşılaştırılması

Malign yumuşak doku tümörlerinde nekroz varlığına göre yapılan değerlendirmede *Ly6K* gen ekspresyonu ile FNCLCC nekroz skoru arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki izlenmedi (Şekil-21).



Şekil 21. FNCLCC nekroz skoru ile *Ly6K* gen ekspresyonunun karşılaştırılması

Malign yumuşak doku tümörlerinde lokal nüks gösteren 8 vaka saptanmış olup, nüks olan vakalardaki *Ly6K* gen ekspresyon düzeyleri nüks izlenmeyen vakalar ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki bulunmadı (Şekil-22).



Şekil 22. Lokal nüks görülen vakalardaki *Ly6K* gen ekspresyonunun karşılaştırılması

Ek Bulgular:

Olgularda en uzun izlem süresi 48 ay olup bu süre içinde hepsi malign grupta yer alan toplam 3 hasta ex olmuştur. Sayının az olması ve izlem süresinin kısa olması sebebiyle sağ kalımla ilgili istatistiksel analizler yapılamadı.

İki hastada akciğer ve 1 hastada lenf nodu metastazı saptanmış olup metastatik vakaların tamamı Sinoviyal Sarkom grubundadır. Metastatik olguların sayılarının azlığı sebebiyle sağlıklı sonuç elde edilemeyeceğinden istatistiksel analiz yapılmadı.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda benign ve malign yumuşak doku tümörü tanısı alan doku örneklerinde kanser kök hücre genlerinden *Ly6E* ve *Ly6K* ekspresyon düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak incelendi.

Çalışmamızda, *Ly6E* gen ekspresyonun malign tümörlerde özellikle de düz kas kökenli malign tümör grubunda belirgin olmak üzere anlamlı olarak artmış olduğu tespit edildi. *Ly6K* ekspresyonunun ise tüm malign tümörlerde kontrole göre artmış olduğu görülürken leimyosarkomlarda bu artışın istatiksel olarak da anlamlı olduğu saptandı. Diğer parametrelerle gen ekspresyonları arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

Ly6E büyüme faktörleri, nükleer reseptör ve mikro RNA'lar dahil olmak üzere çeşitli moleküllerin etkileşiminde rol oynayan ve bu sayede büyüme, apoptoz, otofaji ve bağışıklık yanıtı ile hücre-hücre etkileşimini etkileyen bir kanser kök hücre genidir (8,9). Kompleman aktivitesi, inflamasyon ilerlemesi, nöronal aktivite, anjiogenez, yara iyileşmesi gibi pek çok yolakta yer aldığı gösterilmiştir (9). İnvitro çalışmalar *Ly6E*'nin Wnt/β-catenin, Notch gibi yolakları kullanarak hücre içerisinde etkisini gösterdiğini ayrıca bu moleküller ile EMT sinyal yolağını aktive ettiğini bu sayede karsinojenez yanı sıra metastaz gelişimine de katkıda bulunduğunu göstermiştir (40). Ayrıca Asundi ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda, *Ly6E*'ye yönelik bir 'antikor-ilaç konjugatı' oluşturarak invitro ve invivo şartlarda tümörler üzerine yaptığı etkileri incelemişlerdir. İnvitro hücre proliferasyon inhibisyonu ve ksenograft modellerinde tümör regresyonu görülmüştür. Çalışmada *Ly6E*'nin, meme, pankreas, over gibi birçok solid organ malign tümörlerinde yüksek ekspresyona sahip olduğu bulunmuş ve *Ly6E* proteinine karşı geliştirilen antikor ile bu tümörlerde gerileme (boyutlarında küçülme vs) ve prognozda iyileşme saptanmıştır (41). Gross ve arkadaşları 8-12 haftalık farelerde *Ly6* gen ailesinin farelerdeki homoloğu *Sca-1* geni ile malign yumuşak doku tümörlerinin ilişkisini araştırmak üzere yaptıkları çalışmalarında, *Sca-1* eksprese eden hücrelerin, *Sca-1*'den yoksun hücrelerden daha iyi tümör başlatma özelliklerine sahip olduğunu belirtmişlerdir (12). Biz de çalışmamızda farede sarkomlara yönelik yapılan çalışma ile uyumlu olacak şekilde *Ly6E* ve *Ly6K* gen ekspresyon düzeylerinin malign yumuşak doku tümörlerinde

özellikle de leiomyosarkomlarda belirgin şekilde arttığını ($p<0,0013$) saptadık. Bu gen ailesine yönelik yumuşak doku tümörleri ile hayvanda yapılan tek çalışmanın ve bizim çalışmamızın da insanda yumuşak doku tümörlerindeki tek çalışma olmasının birbirlerini destekleyen veriler ile literatür için büyük önem taşıdığını düşünmekteyiz.

Ly6K çeşitli transkripsiyon faktörleri, hücre yüzeyi reseptörleri, miRNA'lar aracılığı ile doğuştan gelen immün yanıt, hücre migrasyonu ve adezyonu, hücre büyümesi ve motilitesi ile spermatogenezi etkileyen bir kanser kök hücresi genidir (6).

Ly6E ve *Ly6K*'nın kanser kök hücre geni olması yanı sıra, tümörijenik büyüme, kolonizasyon ve kötü tedavi yanıtına da sebep oldukları tespit edilmiş olup prognoz ve malign progresyon açısından bir belirteç olduğu ileri sürülmüştür (11). Hossiny ve arkadaşları insan meme kanserinde yaptıkları çalışmalarda, *Ly6E* ve *Ly6K*'nın RNA ve ilişkili protein seviyesinin artması yanı sıra bu artışın kötü sağ kalım, hücre büyümesi ve kolonizasyonu ve tümör immün kaçışı açısından etkili olduklarını tespit etmişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada *Ly6K*'nın meme kanseri hücrelerindeki fonksiyonel rolünü araştırmak için hücre kültürü ile yapılan incelemede, tümör hücrelerinde *Ly6K* kararlı bir şekilde yıkılmış ve bu hücrelerde daha az koloni ve daha küçük tümör oluşumu görülmüştür. Zebra balığı modelinde ise *Ly6K* ekspresyonu olmayan tümör hücrelerinde hücre göçü ve kolonizasyonunda azalma saptanmıştır. *Ly6E*'nin yıkımı ile yapılan çalışmada da benzer şekilde daha az koloni oluşumu görülmüş ve ksenograft tümörlerinin azalmasına yol açtığı saptanmıştır. Bu sonuçlar, tümörijenik büyüme için *Ly6K* ve *Ly6E*'nin gerekli olduğunu göstermektedir (11). Biz de çalışmamızda yüksek dereceli malign tümörlerde özellikle de leiomyosarkomlarda *Ly6E* ve *Ly6K* ile anlamlı ekspresyon artışını bulduk ve hem benign hem de malign tümörlerde kontrol grubuna göre belirgin artan ekspresyonu saptadık. Ancak *Ly6E* ve *Ly6K*'nın pleomorfik sarkomlar ve sinovyal sarkomlardaki ekspresyonu normal dokuya göre artmış olmasına rağmen bu artış anlamlı değildi. Leiomyosarkomlar ile pleomorfik sarkom ve sinovyal sarkom grupları arasında oluşan bu gen ekspresyon farkının tümörlerin diferansiasyon derecesi ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz. *Ly6E* ve *Ly6K*

ekspresyonlarının hücre diferansiasyonu ile korele olması diferansiasyon kaybı gösteren tümörlerde düşük ekspresyon seviyelerini açıklayabilir.

Ly6 genlerinin tümör hücrelerinde artan ekspresyonunun ve bu genin ekspresyonun inhibisyonu ile tümör hücre çoğalmasının baskılanmasının ispatlanması durumunda, bu genlerin tümörlere yönelik bir prognoz belirteci geliştirmeye aday olabileceği düşüncesi ortaya çıkmıştır. Luo ve arkadaşlarının *Ly6* gen ailesinin karsinomlar ile ilişkisini araştırmak için yaptıkları çalışmada, *Ly6E*'nin artan ekspresyonunun glioma, meme, mide, akciğer, over ve kolorektal kanserlerde ve *Ly6K*'nin artan ekspresyonunun mesane, beyin, santral sinir sistemi, böbrek, meme, akciğer ve over kanserinde kötü klinik gidiş ile önemli ölçüde ilişkili olduğu belirtilmiştir (39). Biz de çalışmamızda özellikle leiomyosarkomlarda daha belirgin olmak üzere malign tümörlerde *Ly6E* ve *Ly6K* ekspresyonunda artış tespit ettik. Ancak çalışmamızda gen ekspresyonları ile yumuşak doku tümörlerinde kötü prognozun göstergesi olan parametreler; mitoz, nekroz ve tümör derecesi arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı. Bu durumun çalışma grubumuzdaki vaka sayımızın az olması ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Ayrıca en önemli prognostik parametre olan sağ kalım bilgisi de çalışmamızda değerlendirilemedi. Çalışmamızdaki hastaların takip süresi kısa olduğu için ve ex hasta sayısı istatistiksel açıdan sağlıklı sonuç verecek oranda olmadığı için bulgular bu açıdan değerlendirilmedi. Ancak çalışmamızda hastaların sağ kalım analizi ve tedavi süreci uzun süreli takip edilememiş olmakla birlikte metastatik hastalarda ve ex olan grupta ΔCt değerlerinin görece yüksek olduğunu tespit ettik. Daha çok hasta sayısı ve uzun takip süresi ile ileride yapılacak çalışmalar yumuşak doku tümörleri ile *Ly6* genlerinin ilişkisini öngörmede etkili olabilir.

Yüksek dereceli malign yumuşak doku tümörlerinde yalnızca cerrahi tedavi alan hastalarda, lokal nüks oranı %15'in altındadır (3). Bizim çalışmamızda nüks eden vaka oranı %32 civarındaydı. Nüks eden vakalar ile yapılan istatistiksel analizde hem *Ly6E* hem de *Ly6K* gen ekspresyonunda nüks etmeyen vakalar ile istatistiksel anlamlı fark görülmedi. Yapılan güncel çalışmalarda, gen ekspresyon profillerinin metastaz ile ilişkisi saptanmış olup nüks vakalarla ilgili bir çalışma yoktur. Bizim çalışmamızda metastaz bildirilen 2 olgu olması ve kısa takip süresine sahip olmamız nedeniyle bu açılardan analiz yapılamadı. Yine yapılacak kapsamlı

çalışmalar ile yumuşak doku tümörlerinde nüks ile *Ly6* genlerinin ilişkisi daha detaylı incelenebilir.

Tüm malign tümörler birlikte değerlendirildiğinde hem FNCLCC derecesi ile hem de bu dereceyi belirleyen faktörler olan mitoz ve nekroz skorları ile yapılan analizde istatistiksel anlam bulunamadı. Ancak çalışmamızda özellikle malign gruplar ile benign ve kontrol grubunu kıyaslamayı amaçladığımız için ve de çalışma gruplarımızın homojen olmasını istediğimiz için malign gruba vaka seçerken yüksek dereceli olan tümörleri tercih etmiştik. Bu durumun malign tümörleri kendi içerisinde kıyaslarken anlamlı fark oluşmasını engellemiş olabileceğini düşünmekteyiz. Gen ekspresyon seviyelerinin malign tümör grubunda benign ve kontrol grubuna göre artmış olması hipotezimizi destekler nitelikte olup ayrıca literatürde yumuşak doku tümörleri ve *Ly6* gen ailesi ile yapılan ilk çalışma olmasıyla büyük önem taşımaktadır. İlerleyen yıllarda daha yüksek vaka sayısı ile malign grupta ancak her üç dereceden tümör ile yapılacak kapsamlı bir çalışmanın gen ekspresyon düzeyleri ile tümörün derecesi ve bunu etkileyen faktörler arasındaki ilişki açısından fikir vereceğini düşünmekteyiz.

Yan Lv ve arkadaşları gastrik karsinomlarda *Ly6E* gen düzeyini analiz etmek için yaptıkları çalışmalarda, tümörlü dokularda normal mide dokusuna göre *Ly6E* RNA seviyesinin ayrıca qPCR ve Western-Blot ile yapılan çalışmalar ile DNA seviyelerinin ve immünohistokimyasal olarak da ekspresyon düzeylerinin artışını göstermişlerdir (42). Biz de çalışmamızda malign lezyonlarda normal dokuya göre anlamlı artış gördük. Bu artış özellikle leiomyosarkom grubunda anlamlı düzeydeydi. Yan Lv'in çalışmasında *Ly6E*'nin tümör hücrelerine göç ve infiltrasyon yeteneği kazandırdığı tespit edilmiştir. *Ly6E* gen ekspresyonundaki artış ile tümörün histolojik derecesinin, AJCC evresinin, N sınıflamasının, lenfatik invazyonun ve lokalizasyonunun istatistiksel anlamlı ilişkisi olduğu bulunmuştur ($p< 0.05$). Biz ise çalışmamızda diğer patolojik parametreler ile herhangi bir anlamlı ilişki tespit edemedik. Ayrıca Yan Lv'in çalışmasında ekspresyon düzeyleri ile yaş, cinsiyet ve tümör boyutu arasında bir ilişki bulunamamıştır. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde tüm grupları birlikte değerlendirdiğimizde, tümör boyutunun malign grupta daha büyük olduğunu bulduk ancak gen ekspresyon profili açısından istatistiksel anlamlı fark bulunamadı. Düz kas kökenli tümörlerde hem benign hem de malign

grup vaka sayısının, fibroblast kökenli tümörlerde ise benign grupta vaka sayısının 10'un altında olmasının istatistiksel anlamlı sonucu engellediği düşüncesindeyiz. Ayrıca her iki grupta malign tümöre sahip hastalar daha ileri yaşta saptandı ve hem düz kas kökenli ($p=0,0160$) hem de fibroblast kökenli ($p<0,0001$) malign tümörlerde benign gruba göre artmış orta ve yüksek düzeyde istatistiksel anlamlı gen ekspresyonu tespit edildi. Söz konusu çalışmada hazırlanan siRNA paneli ile *Ly6E* gen ekspresyonu baskılandığında, hücre sağ kalımında, proliferasyonunda ve hücre döngüsü basamaklarında inhibisyon saptanmış ve bununla birlikte tümör baskılayıcı genler olan E-Kadherin ve PTEN ekspresyonunda artış dikkati çekmiştir. Aşırı ifade edilen *Ly6E*'nin de PTEN'i aşağı regüle ederek gastrik kanser gelişiminde en çok tanımlanan prekanseröz yolak olan PI3K-Akt hiper aktivasyonuna katkıda bulunduğu tespit edilmiştir (42). Yoon ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada, malign yumuşak doku tümörlerinde de sferoid oluşturan hücrelerde PI3K/Akt yolağında yer alan fosforile edilmiş Akt ve toplam Akt1/2 'nin yüksek oranda aktive olduğunu göstermişlerdir. Fosforilasyon, sferoidler olarak büyütülen tümör hücrelerinde tek tabakalara kıyasla daha yüksek bulunmuştur. PI3K/Akt sinyal yolunun inhibisyonu, standart koşullar altında tek hücrelerden sferoid oluşumunu %71-77 oranında azaltmıştır. Bu çalışmada ayrıca PI3K inhibisyonunun, sferoidler olarak yetiştirilen sarkom hücre hatlarının kemoterapiye ve radyasyona duyarlılığını artırıp artırmadığı incelenmiş ve inhibisyon sonucunda, büyümede %31-35, kemoterapide %11-16 ve kombinasyonda %77-84 oranında inhibisyon gözlenmiştir. Akt sinyalinin insan sarkomunda KKH transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunun kontrolüne katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Böylece PI3K/Akt yolunun, yumuşak doku tümör hücrelerinde hem sferoid oluşumu hem de terapi direnci gibi KKH fenotiplerini desteklediği gösterilmiştir (43). Her ne kadar literatürde *Ly6E*'nin PI3K-Akt yolağındaki etkisini direkt olarak gösteren bir yayın bulunmasa da PI3K-Akt yolağının yumuşak doku sarkomlarının patogenezindeki rolü açıkça ortaya konmuştur. Gastrik karsinomlardaki *Ly6E* geninin baskılanması ile bu yolağın inhibe edilmesi ve tümör gelişiminin baskılanması benzer şekilde yumuşak doku tümörlerinde de *Ly6E*'nin potansiyel bir terapötik hedef olabileceğini düşündürmektedir. *Ly6E*'nin yumuşak doku tümörlerindeki ekspresyonunu inceleyen çalışmalar bu açıdan oldukça yol gösterici olacaktır.

Mevcut bulgular KKH'lerinin potansiyel olarak tümör kemoterapi ve radyoterapi direncine katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Tümör hücreleri, mezenkimal kök hücreler (MKH) ve farklı tipteki bağışıklık hücreleri tarafından üretilen geniş bir büyüme faktörü ve sitokin yelpazesinin, KKH'nin korunmasında ve metastatik yayılmada kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir (6). *Ly6* genlerinin özellikle T lenfositler olmak üzere lenfosit fonksiyonlarında aktive edici etkisi olduğu bilinmekte olup, bu bağışıklık hücrelerinden salgılanan interlökinler ve sitokinler de *Ly6* genlerinin fonksiyonlarında pekiştirici rol oynamaktadır. Ayrıca Eshel ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında *Ly6* mRNA seviyelerinin aynı tümör tipinin metastatik varyantlarında belirgin derecede yüksek olduğunu bulmuşlardır (44). *Ly6* genlerinin ve bağışıklık hücrelerinin bu kısır döngü sayesinde tümörlerin tedavi direnci ve metastaz kabiliyetlerine katkıda bulunduğunu öngörmekteyiz. Biz çalışmamızda tüm hastaların tedavi verilerine ulaşamadığımız ve analiz için yeterli metastatik hasta sayısına sahip olmadığımız için tedavi direnci ve metastaz ile gen ekspresyon düzeylerinin ilişkisini kıyaslayamadık ancak ileride yapılacak tedavi direnci ve metastaz takibinin de yer bulacağı uzun süreli çalışmalarda bu ilişki ortaya konulabilir.

Epitelyal mezenkimal geçiş (EMT), polarize, hareketsiz epitel hücrelerinin mezenkimal, mobil hücrelere dönüşmesine izin veren yüksek oranda korunmuş bir hücresel programdır. EMT, tümör ilerlemesi, metastaz ile ilgilidir ve geleneksel tedavilere ve küçük molekül hedefli inhibitörlere karşı dirence aracılık eder (40). EMT, yaralı dokunun onarımı sırasında devreye giren patofizyolojik bir olaydır. EMT indükleyicileri iş birliği içinde epitel hücrelerini, bazal membranlar yoluyla artan motilite ve istila ile ilişkili tamamen mezenkimal bir fenotipe dönüştürür (45). Metastatik kaskadın ilk aşamalarından biri, tümör hücrelerine komşu dokuları istila etme kapasitesi veren EMT programının aktivasyonu tarafından yönlendirilir. Daha sonra hücreler dolaşıma ulaşır, tüm vücuda yayılır ve ardından belirli organlara metastaz yapar (40). Bowen Du ve arkadaşları çalışmalarında, EMT ve KKH'lere maruz kalan hücreler arasında gen ifadesi imzalarında ve işaretleyici ifadesinde dikkate değer benzerlikler olduğunu saptamıştır. EMT sebebiyle var olan tümör hücreleri KKH benzeri özellik kazanmaktadır. Kısacası tümörün dokuda sebep olduğu hasar ile EMT indüklenmekte ve var olan KKH yanı sıra yeni KKH benzeri

hücreler oluşmaktadır, böylece hem daha büyük tümör kolonizasyonu yanı sıra tedavi direnci gelişmekte hem de metastatik sürece katkı sağlanmaktadır. Bowen Du da bu çalışmasında, invitro olarak EMT inhibitörlerinin kemoterapinin etkinliğini arttırmada etkili olduğunu kanıtlamıştır (46). Fischer ve arkadaşları invivo olarak transgenik fare modellerinde yaptıkları çalışmada, meme kanserinde ve Zheng ile arkadaşları da yine fare modelinde pankreas duktal adenokarsinomunda EMT inhibisyonu ile kemoterapi duyarlılığında artış saptamışlardır (47,48). EMT'nin kemoterapi direnci üzerindeki etkisi, kanser tedavisi için EMT inhibisyonunu kemoterapi ile birleştirmenin potansiyel faydasının altını çizmiştir (40). Bu veriler kanser kök hücresi geni olan *Ly6* genlerinin de EMT etkisi taşıması sebebiyle metastaz ve tedavi direncine daha fazla katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular *Ly6* gen ekspresyonlarının malign yumuşak doku tümörlerinde daha yüksek olduğu yönündedir. Bu veriden hareketle yüksek ekspresyon düzeyleri beraberinde EMT aktivasyonunu getirmektedir ve EMT'de hem karsinojeneze hem de tedavi direnci ile metastatik sürece katkı sağlamaktadır.

Transforming Growth Factor-β (TGF-β) proapopitotik etkisi ile, epitelyal hücre proliferasyonunu baskılayarak ve hücresel inflamatuar yanıtı baskılayarak tümör supresör geni işlevi görmektedir. TGF-β yolaklarının baskılanması dokuda homeostatik dengenin bozulmasına ve bahsedilen antitümöral etkinin kaybına neden olmaktadır (49). Hossiny ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma Ly6 gen ailesinin, TGF-β sinyallemesinin düzenlenmesinde yer alan düğüm merkezlerinden biri olduğunu göstermiştir (11). Artmış *Ly6E* ve *Ly6K* gen ekspresyonları TGF-β sinyalizasyon yolağında bozulmaya neden olarak gene onkojenik özellik kazandırır. Çalışmamızda her iki gende benign ve malign tümör tiplerinde kontrol gruplarına göre artmış ekspresyon tespit edilmesi antitümöral etkinin kaybını ve gelişen proliferasyon kabiliyetini işaret etmektedir.

Zhang ve arkadaşlarının gastrik adenokarsinomların moleküler ve hücresel heterojenitesini belirlemek ve tedavi planlarını geliştirmeye yönelik yaptıkları çalışmada, *Ly6K*'nin interferon-gama aktivitesini etkileyerek viral etkileri arttırması sebebiyle tümör heterojenitesine katkı sağladığını ve bunun prognoz ve tedaviyi etkilediğini saptamışlardır (50). Bu durum *Ly6* gen ailesinin kanser kök hücre etkileri yanı sıra viral bulaş etkileri ile de tümörlere etki edebileceğini göstermektedir.

Benzer morfolojiye sahip tümörlerin *Ly6* gen ekspresyon düzeylerindeki farklılıklar henüz tespit edilmemiş bir viral etkiyi işaret edebilir ve tedaviye başkaca yöntemlerin katılması ile etkinlik artışı sağlanabilir kanaatindeyiz.

Kong ve arkadaşları *Ly6K* ekspresyonunun insan meme kanseri üzerindeki etkisini ve etki mekanizmasını araştırmak için hücre kültürü ile yaptıkları çalışmalarında, *Ly6K*'nın tümör hücrelerinin invazyon ve metastaz yeteneğinde etkili olduğunu saptamışlar ve *Ly6K*'nın susturulması ile invazyon ve metastazda gerileme olduğunu tespit etmişlerdir (51). Biz de çalışmamızda benzer şekilde *Ly6K* ekspresyonunun malign grupta arttığını saptadık ve ekspresyonu susturma durumunda meme ile benzer şekilde yumuşak doku tümöründe de kanser riskinde azalma olabileceğini düşündük. Ayrıca bu verilerin yumuşak dokuda kanser riskinin araştırılması, erken teşhisi ve önlenmesine yönelik uygulamalarda yol gösterici olacağı kanaatindeyiz.

Gross ve arkadaşlarının farelerde metikolantren (MCA) ile indükleme sonucu malign yumuşak doku tümörü oluşturdukları çalışmalarında, bu farelerde tümör hücrelerinde yüksek seviyelerde kök hücre antijen-1 (*Sca-1*) saptadılar. Ayrıca bu hücreler yüksek tümör başlatma kabiliyetine sahipti ve KKH benzeri olmayan hücrelerden daha fazla sarkosfer oluşturdu (12). Gross ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışma *Ly6* gen ailesinin ve farelerdeki homologu *Sca-1* geninin yumuşak doku tümörleri ile ilişkisini gösteren ilk ve tek çalışma olması açısından oldukça önemlidir. Bizim çalışmamız da malign yumuşak doku tümörlerinde yüksek *Ly6E* ve *Ly6K* saptanması nedeniyle fareler ile yapılan analizi destekler niteliktedir.

Tüm hastaların oluşturduğu grupta, *Ly6E* ve *Ly6K* geninde en yüksek ekspresyon malign grupta saptandı. *Ly6E* geninde malign grupta benign gruba göre düşük düzeyde, kontrol grubuna göre orta düzeyde istatistiksel anlamlı fark bulunurken (p=0,0013); *Ly6K* geninde malign ve benign grupta kontrol grubuna göre ve malign grupta benign gruba göre minimal artış mevcut olmakla birlikte istatistiksel anlamlı fark görülmedi. Bu nedenle özellikle de *Ly6K* geni için daha yüksek vaka sayısı ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca yumuşak doku tümörlerinin alt tiplerini ele alacak olursak *Ly6E* ve *Ly6K*'nın özellikle leiomyosarkomlarda anlamlı olarak artmış olduğunu; ancak diferansiasyonu belirsiz

olan pleomorfik sarkom ve sinovyal sarkom gruplarında artmış olmakla birlikte bu artışın istatiksel olarak anlamlı olmadığı gördük. Bamezai'nin farelerde yaptığı *Ly6* genlerinin hücre farklılaşması ve hücre sinyallemesi üzerinde etkilerini araştırdığı çalışmasında, embriyogenezin erken evrelerinde artmış *Ly6* protein ekspresyonu tanımlanmıştır (52). Upadhyay ise *Ly6* gen ailesinin kanser ve bağışıklık hücrelerindeki rolünü araştırmak için yaptığı çalışmasında farelerde *Sca-1* protein ekspresyonunun, hematopoietik kök hücrelerin farklılaşma aşamalarına bağlı olarak değişken olduğunu saptamıştır (10). Loughner ve arkadaşlarının insan ve farelerde *Ly6*/uPAR ailesi genlerinin organizasyonunu araştırdıkları çalışmada, *Ly6*/uPAR proteinlerinin ekspresyonunun; çeşitli hücre tipleri ve dokular arasında yaygın ve değişken olduğu, uzay-zamansal bir tarzda sıkı bir şekilde düzenlendiği ve sıklıkla hücresel farklılaşma ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. *Ly6*/uPAR familyası protein yapıları türler arasında iyi korunmuş olmasına rağmen, ekspresyon paternlerinin değişiklik gösterme eğiliminde olduğu saptanmıştır (9). Bu nedenle çalışmamızda *Ly6E* ve *Ly6K* genleri ile pleomorfik sarkomlar ve sinovyal sarkomlarda anlamlı ekspresyon artışı olmayıp, leiomyosarkomlarda anlamlı ekspresyon artışı saptanmasının, pleomorfik sarkom ve sinovyal sarkomların diferansiasyonu belirsiz tümörler olması ve leiomyosarkomların iyi diferansiye malign tümör formunda olmaları nedeniyle hücre diferansiasyonu ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Bu durum *Ly6E* ve *Ly6K*'nın hücre diferansiasyonunun ilerleyen evrelerinde etkinliğini kaybettiğine işaret etmektedir.

Yumuşak doku tümörlerinin birinci basamak tedavi seçeneği hala geleneksel cerrahi uygulamalardır. Kemoterapi seçeneği malign yumuşak doku tümörlerinde oldukça sınırlıdır ve bunun en önemli sebebi de tedavi direncinin çok sık rastlanır olmasıdır. Ancak malign yumuşak doku tümörlerinin gelişim biyolojisi hakkında artan bilgi yeni ve daha etkili tedavi stratejilerine yol açabilir (53). Çalışmamızda tedavi verilerine ulaşamadığımız için bu konuda net bir veri ortaya koyamamış olsak da literatürde var olan bilgilerden hareketle *Ly6E* ve *Ly6K*'nın bu konuda önemli ipuçları vereceğine inanmaktayız.

Yumuşak doku tümörlerinin tedavisinin araştırılması ve geliştirilmesine yönelik ilk adım, yeni tümöre özgü biyobelirteçleri belirlemek ve tanımlamak olacaktır. Farklı yumuşak doku tümörlerinde çeşitli genetik değişiklikler tanımlanmış

ve bunların tümörün gelişiminde itici güç oldukları tespit edilmiştir. Bununla birlikte gün geçtikçe artan tümör çeşitliliği ve yüksek dereceli tümörlerdeki hastalıksız yaşam süresinin kısalığı nedeniyle yenilikçi tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır. Yumuşak doku tümörlerine karşı yeni ve başarılı terapötik stratejiler geliştirmek için yumuşak doku tümörlerinin immünosupresif ve kök hücre benzeri özelliklerine katkıda bulunan, yumuşak doku tümörlerine özgü anahtar moleküler yolakların daha iyi anlaşılması gerekmektedir. Russ ve arkadaşları, pankreas duktal adenokarsinomlarda *Ly6* gen ailesi ile yaptıkları çalışmalarında, *Ly6* ailesi proteinlerinin hücre yüzeyindeki GPI-sunucusuna bağlanma ya da hücre dışı matrikse salgılanma şeklinde aktive olduklarını saptamış ve bu durumun *Ly6* genlerini ilaç inhibisyonu veya immünoterapi hedeflemesi için erişilebilir hale getirdiğini göstermişlerdir (54). Ayrıca Russ bu çalışmasında, pankreas kanseri hastalarında *Ly6* gen ailesinin mRNA ekspresyonunu ve bunun tümör oluşumu ve genel sağ kalım sonucu ile ilişkisini analiz etmiş olup genin yüksek ifadesinin daha kısa sağ kalım süresi ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu bulmuştur. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde malign yumuşak doku tümörlerinde *Ly6E* ve *Ly6K* gen ekspresyonunun benign ve kontrol grubuna kıyasla arttığını saptadık ve ileride yapılacak çalışmalar ile hem bu genlerin immün sistem onarım mekanizmaları ile ilişkisi anlaşılacağı hem de yumuşak doku tümörlerinde, potansiyel tarama belirteçlerinin yanı sıra yeni kişiselleştirilmiş hedefli tedaviye ya da *Ly6E* ve *Ly6K* gen ekspresyonuna dayalı mevcut standart kemoterapi rejimlerinin rehberliğine yol açabileceğini düşünmekteyiz.

Yumuşak doku tümörlerinin tedavisinde büyük oranda eksizyon gerektiği de göz önünde bulundurulduğunda, *Ly6* genlerini hedefleyen spesifik tedavilerin yalnızca tümör oluşumu, büyümesi, invazyon yeteneği gibi tümöre yönelik etkiler ile sınırlı kalmayıp yara iyileşmesi, anjiogenez ve inflamasyon gelişimi gibi yolaklardaki etkileri sayesinde yeni tedavi modalitelerini müjdelemesi beklenmektedir. Ayrıca radyoterapi sonrası tümör mikroçevresinin, tümör ve endotel hücrelerinin hayatta kalmasını destekleyen, tümörün yeniden büyümesini kolaylaştıran ve oldukça invaziv KKH fenotiplerinin gelişimini hızlandıran çeşitli büyüme faktörleri ürettiği gösterilmiştir. Bu bulgular, mikro-çevre uyaranlarının

tümörün iyileştirilebilirliğinin modüle edilmesindeki önemini vurgular ve kemo ve radyoterapiden sonra tümör nüksünün önlenmesi için yeni terapötik seçenekler açar.

Çalışmamızda gen ekspresyon düzeylerini sadece PCR yöntemi ile inceledik. Gen ekspresyon düzeyini gösterecek Western Blot, immünohistokimya vb. ek teknikler ile ölçüm yapılmadı, ayrıca genlere spesifik miRNA düzeylerine ve genlerin hedeflediği protein seviyelerine bakılmadı. Çalışmamızda farklı tümör gruplarını analiz etmemiz sebebiyle yüksek vaka sayısına ulaşılamamış olması istatistiksel analiz açısından dezavantaj oluşturmaktaydı. Ayrıca parafin dokudan nükleik asit izolasyonunda yüksek verim sağlamak amacıyla mümkün olduğunca yakın tarihli örnekler çalışmaya dahil edildi. Bu durum da hastaların uzun süreli izlemi ve dolayısı ile olası nüks, metastaz, ex gibi durumların doğru analizini sekteye uğrattı. Bununla birlikte, zayıf yönlerine rağmen çalışmamız *Ly6* gen ailesinin insan yumuşak doku tümörlerindeki ekspresyonu ile ilgili olarak yapılan literatürdeki ilk çalışma olması sebebiyle ve literatürde var olan diğer çalışmalara ilaveten malign tümör grubu ile tümörsüz dokuda gen ekspresyon düzeyi kıyaslaması yanı sıra benign tümörlerin de çalışmaya dahil edilmesi; böylece tümörsüz doku ile benign tümör/ benign tümör ile malign tümör arasındaki ekspresyon düzeyini kıyaslaması açısından oldukça değerli sonuçlar ortaya koymaktadır.

6. SONUÇLAR

1. Yumuşak doku tümörleri vücudun her yerinde görülebilmesi ve malign yumuşak doku tümörlerinin var olan tüm tedavi yöntemlerine rağmen hastalıksız sağ kalımının çok düşük olması, bu tümörlerin biyolojisi ve patogenezinin daha ayrıntılı araştırılması gerektiğini göstermektedir.
2. Çalışmamızda benign ve malign yumuşak doku tümörlerinde *Ly6E* ve *Ly6K* gen ekspresyon düzeyleri ölçüldü.
3. Tümörler köken aldıkları hücre tipine göre gruplamalar yapılarak incelendi ve düz kas kökenli tümörlerde hem *Ly6E* hem de *Ly6K* için malign grupta belirgin ekspresyon artışı saptandı.
4. Tüm gruplar birlikte incelendiğinde hem *Ly6E* hem de *Ly6K* için malign grupta anlamlı artmış ekspresyon düzeyi görüldü.
5. Fibroblast kökenli tümörlerde her iki gen için benign grupta daha yüksek ekspresyon bulundu. Diferansiyasyon kaybı gösteren malign tümörlerde anlamlı ekspresyon artışı saptanmadı.
6. *Ly6* genlerinin çeşitli karsinom türlerinde artmış ekspresyonu saptanmışolmakla birlikte yumuşak doku tümörlerinde yalnızca farede yapılmış bir çalışma mevcuttur. Bu çalışma ve bizim çalışmamız birbirlerini destekler nitelikte olup, *Ly6E* ve *Ly6K* genlerinin tümörlü dokuda artmış ekspresyonunu göstermektedir.
7. *Ly6* genlerinin ekspresyon düzeyinin, hücre diferansiayonu ile ilişkili olduğu bilinmekte olup çalışmamızda diferansiasyonu belirgin yumuşak doku tümörlerinde *Ly6E* ve *Ly6K*'nın önemi vurgulandı.
8. Çalışmamızda nüks eden vakalar ile yapılan analizde anlamlı ekspresyon artışı saptanmadı.
9. Çalışmamızda tümörlerin FNCLCC derecesi ve bunu etkileyen parametreler olan mitoz ve nekroz skorları ile gen ekspresyonları arasında anlamlı ilişki saptanmadı.
10. Çalışmamız insanda yumuşak doku tümörlerinde *Ly6* gen ailesi ile yapılan ilk çalışma olup sonuçlarımız diğer karsinomlara yönelik literatür verileri ile uyumluluk göstermektedir.

11. Çalışmamızın tek merkezli olması, yalnızca PCR yöntemi ile incelenmiş olması; Western Blot, immünohistokimya, genlere spesifik miRNA düzeylerine ve genlerin hedeflediği protein seviyelerine bakılamamış olması ve kısıtlı hasta sayısına sahip olması nedeniyle olası farklılıkları ortaya koyabilmek için bu konuda, daha fazla hasta sayısına sahip, daha detaylı ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.
12. Hastalarda kanda ya da dokuda bakılacak *Ly6E* ve *Ly6K* gen düzeyi ile prognozu öngörmede ya da hedefe yönelik tedavilerin gelişmesi ile prognozu iyileştirmede önemli bir aracı olabilir.

KAYNAKLAR

1. John Goldblum. Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors. Elsevier; 2019.
2. Mahul B. Amin. AJCC Cancer Staging Manual. 8th ed. Springer International Publishing; 2017.
3. Fletcher C, Antonescu CR. Soft Tissue and Bone Tumours WHO Classification of Tumours, 5th Edition, Volume 3. 5th ed. LYON: IARC; 2020.
4. Linch M, Miah AB, Thway K, Judson IR, Benson C. Systemic treatment of soft-tissue sarcoma-gold standard and novel therapies. Nat Rev Clin Oncol. 2014 [cited 2021 Oct 29]; 11:187–202. Available from: www.nature.com/nrclinonc
5. Batlle E., Clevers H., Cancer stem cells revisited. Nature Medicine, [cited 2021 Oct 29]. 23:1124-1134
6. Cojoc M, Mäbert K, Muders MH, Dubrovska A. A role for cancer stem cells in therapy resistance: Cellular and molecular mechanisms. Vol. 31, Semin Cancer Biol Academic Press; 2015. p. 16–27.
7. Genadry K. C., Pietrobono S, Rota R., Linardic C. M., Soft Tissue Sarcoma Cancer Stem Cells: An Overview. Front Oncol, 2018. vol 8. Article 475.
8. Upadhyay G., Emerging Role of Lymphocyte Antigen-6 Family of Genes in Cancer and Immune Cells. Front. Immunol., 2019. vol 10. Article 819.
9. Loughner CL, Bruford EA, Mcandrews MS, Delp EE, Swamynathan S, Swamynathan SK. Organization, evolution and functions of the human and mouse Ly6/uPAR family genes. 2016 [cited 2021 Oct 25]; Available from: http://www.genenames.org/cgi-bin/genefami-
10. Upadhyay G. Emerging Role of Novel Biomarkers of Ly6 Gene Family in Pan Cancer. Advances in Experimental Medicine and Biology 2019 [cited 2021 Oct 29]; 1164:47–61. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-22254-3_4
11. Hossiny M, Luo L, Frazier WR, Steiner N, Gusev Y, Kallakury B, et al. Ly6E/K signaling to TGF-ß promotes breast cancer progression, immune escape and drug resistance. Author Manuscript Published Online First. 2016; [cited 2016 Apr 11]; Available from: https://www.researchgate.net/publication/301276575
12. Gross ETE, Peinado CD, Jung Y, Han S, Liu B, Santosa EK, et al. Identification and editing of stem-like cells in methylcholanthrene-induced sarcomas. OncoImmunology. 2019 Jan 2 [cited 2021 Oct 31];8(1). Available from: https://www.tandfonline.com/action/journalInformation
13. Sheng G. The developmental basis of mesenchymal stem/stromal cells (MSCs). 2015; BioMedCentral, [cited 2015 Nov 20]; 15:44 Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4654913/pdf/12861_2015_Article_94.pdf

14. Bruce M. Carlson. Human Embryology Developmental Biology. 6th ed. Missouri: Elsevier; 2019

15. John Goldblum. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 11th ed. Vols. 1–2. 2017.

16. Sweeney HL, Hammers DW. Muscle Contraction. 2018. [cited 2021 Nov 7]; Available from: www.cshperspectives.org

17. Gray H SS. Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice. Churchill Livingstone; 2008.

18. Stacey E. Mills. Histology for pathologists. 5th ed. Wolters Kluwer; 2020

19. Skubitz KM, D'Adamo DR. Sarcoma. Mayo Clinic Proceedings. 2007 Nov 1;82(11):1409–32.

20. Hajdu SI. Greco-Roman Thought about Cancer. Vol. 100, Cancer. 2004. p. 2048–51.

21. Murray F. Brennan. Management of Soft Tissue Sarcoma. Springer International Publishing; 2016.

22. Stacey E. Mills. Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology. 5th ed. Vols. 1–2. Lippincott Williams & Wilkins; 2010.

23. Brown FM, Fletcher CDM. Problems in Grading Soft Tissue Sarcomas. Pathology Patterns Reviews S82 Am J Clin Pathol 2000; 114(1):82–9. Available from: https://academic.oup.com/ppr/article-abstract/114/suppl_1/S82/2291262

24. Matthew R. Lindberg. Diagnostic Pathology Soft Tissue Tumors. 3rd ed. Elsevier; 2019.

25. Tang DG. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. Cell Research. 2012 [cited 2021 Nov 11];22:457–72. Available from: www.cell-research.com

26. Dominique Bonnet, John E. Dick. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nature Med. 1997 [cited 2021 Nov 11]; Vol 3. p 730-737.

27. Reyes M., Lund T., Lenvik T., Koodie L., Verfaillie C. M., Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells | Elsevier Enhanced Reader. [cited 2021 Dec 27]. Vol 9. p 2615-25. Available from: https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0006497120568687?token=8AFC3FF87F56BDCFB9B4BAF6F10A6A6542644FC993035B4DA549EBDAD30DEF685B3B2E2B47A33DE1A6BF0CCF1F1B1BFC&originRegion=eu-west-1&originCreation=20211227100445

28. Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K. Human Placenta-Derived Cells Have Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Potential. Stem Cells. 2004 Sep;22(5):649–58.

29. Lan T, Luo M, Wei X. Proteolysis-targeting chimera (PROTAC) for targeted protein degradation and cancer therapy. Journal of Hematology & Oncology. 2020 [cited 2021 Nov 29]; 14:195. Available from: https://doi.org/10.1186/s13045-021-01208-w

30. Li Z, Hu X, Zhong JF. Editorial Mesenchymal Stem Cells: Characteristics, Function, and Application. Vol 2019 [cited 2021 Nov 29]; Available from: https://doi.org/10.1155/2019/8106818

31. DVC Stem- Treatment Protocol [cited 2021 Dec 27]. Available from: https://www.dvcstem.com/protocol

32. Breedis C. The Transmission of Leukemia of Mice with a Single Cell. 1937 AACR, [276-282]

33. Genadry KC, Pietrobono S, Rota R, Linardic CM. Soft tissue sarcoma cancer stem cells: An overview. Vol. 8, Frontiers in Oncology. Frontiers Media S.A.; 2018.

34. Jiri Hatina, Michaela Kripnero, Jitka Kuncova. Sarcoma Stem Cell Heterogeneity. Springer Nature Switzerland. 2019;95–118.

35. Shanker A, Jablonski SA, Kerr WG, Mukherjee P, Upadhyay G. Emerging Role of Lymphocyte Antigen-6 Family of Genes in Cancer and Immune Cells. Frontiers in Immunology. 2019 [cited 2021 Nov 14]; 1:819. Available from: www.frontiersin.org

36. LY6E protein expression summary- The Human Protein Atlas. [cited 2021 Nov 14]. Available from: https://www.proteinatlas.org/ENSG00000160932-LY6E

37. Kimura T, Wang L, Tabu K, Tsuda M, Tanino M, Maekawa A, et al. Identification and analysis of CXCR4-positive synovial sarcoma-initiating cells. Oncogene. 2016 Jul 28;35(30):3932–43.

38. LY6K protein expression summary- The Human Protein Atlas. Human protein atlas. [cited 2021 Dec 27]. Available from: https://www.proteinatlas.org/ENSG00000160886-LY6K#gene_information

39. Luo L, Mcgarvey P, Madhavan S, Kumar R, Gusev Y, Upadhyay G. Distinct lymphocyte antigens 6 (Ly6) family members Ly6D, Ly6E, Ly6K and Ly6H drive tumorigenesis and clinical outcome. Oncotarget. [cited 2021 Oct 25];7(10). Available from: www.impactjournals.com/oncotarget/

40. De J, Rivas L, Brozovic A, Sivan Izraely ·, Casas-Pais A, Witz IP, et al. Cancer drug resistance induced by EMT: novel therapeutic strategies. 2021 [cited 2021 Dec 2]; 95:2279–97. Available from: https://doi.org/10.1007/s00204-021-03063-7

41. Asundi J, Crocker L, Tremayne J, Chang P, Sakanaka C, Tanguay J, et al. An antibody-drug conjugate directed against lymphocyte antigen 6 complex, locus E (LY6E) provides robust tumor killing in a wide range of solid tumor malignancies. Clinical Cancer Research. 2015 Jul 15;21(14):3252–62.

42. Lv Y, Song Y, Ni C, Wang S, Chen Z, Shi X, et al. Overexpression of Lymphocyte Antigen 6 Complex, Locus e in Gastric Cancer Promotes Cancer Cell Growth and Metastasis. Cellular Physiology and Biochemistry. 2018 Feb 1;45(3):1219–29.

43. Yoon C, Lu J, Yi BC, Chang KK, Simon MC, Ryeom S, et al. Oncogenesis PI3K/Akt pathway and Nanog maintain cancer stem cells in sarcomas. [cited 2021 Dec 3]; Available from: https://doi.org/10.1038/s41389-020-00300-z 12-749

44. Eshel R, Neumark E, Sagi-Assif O, Witz IP. Receptors involved in microenvironment-driven molecular evolution of cancer cells. CANCER BIOL. 2002; 12:139–47.

45. Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. Oncogene 2010 [cited 2021 Dec 2]; 29:4741–51. Available from: www.nature.com/onc

46. Du B, Shim JS. molecules Targeting Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) to Overcome Drug Resistance in Cancer. 2016. 965 (1-15) [cited 2021 Dec 2]; Molecules. Available from: www.mdpi.com/journal/molecules

47. Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M, Kaye J, Sugimoto H, et al. EMT Program is Dispensable for Metastasis but Induces Chemoresistance in Pancreatic Cancer HHS Public Access. 2016. Vol 13. p. 35 [cited 2021 Dec 6]; Available from: http://www.nature.com/authors/editorial_policies/license.html#terms

48. Fischer KR, Durrans A, Lee S, Sheng J, Li F, Wong S, et al. EMT is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance HHS Public Access. 2016. Vol 527. p.472-476. [cited 2021 Dec 6]; Available from: http://www.nature.com/authors/editorial_policies/license.html#terms

49. Ketcham C., Crawford J., The Impact of review articles., Lab Investigation 2007. Vol 87. p.1174-1185 [cited 2021 Nov 1]; Available from: www.laboratoryinvestigation.org

50. Zhang M, Hu S, Min M, Ni Y, Lu Z, Sun X, et al. Dissecting transcriptional heterogeneity in primary gastric adenocarcinoma by single cell RNA sequencing. 2021. Gut; 70:464–75. Available from: http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2019-320368

51. Kong HK, Yoon S, Park JH. The regulatory mechanism of the LY6K gene expression in human breast cancer cells. Journal of Biol Chem. 2012 Nov 9;287(46):38889–900.

52. Anil Bamezai. Mouse Ly-6 proteins and their extended family: markers of cell differentiation and regulators of cell signaling. Arch Immunol Ther Exp. 2004 Aug 15;52(4):255–66.

53. Hoang NT, Acevedo LA, Mann MJ, Tolani B. A review of soft-tissue sarcomas: Translation of biological advances into treatment measures. Vol. 10, Cancer Management and Research. Dove Medical Press Ltd; 2018. p. 1089–114.

54. Russ E, Bhuvaneshwar K, Wang G, Jin B, Gage MM, Madhavan S, et al. High mRNA expression of LY6 gene family is associated with overall survival outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma. Oncotarget. 2021 [cited 2021 Oct 25];12(3):145–59. Available from: www.oncotarget.com

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Çiğdem YILDIRIM

Doğum Yeri ve Tarihi:

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti

Medeni Durumu: Bekar

İletişim Adresi:

İletişim telefonu:

Yabancı dili: İngilizce

II-Eğitimi

2022-2018 Araştırma Görevlisi, Tıbbi Patoloji Uzmanlık Eğitimi: Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Ankara Dr. Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Patoloji Bölümü, Ankara

2011- 2017 Tıp Fakültesi Eğitimi: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara

2005-2011 Çorum Fen Lisesi, Çorum

1999-2005 Çorum Bahçelievler İlköğretim Okulu, Çorum

III-Ünvanları

Tıp Doktoru (2017)

IV-Mesleki Deneyimi

2018-… Araştırma Görevlisi, Tıbbi Patoloji Uzmanlık Eğitimi: Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Ankara Dr. Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Patoloji Bölümü, Ankara

2017-2018 Pratisyen Hekim, Acil Tıp Ana Bilim Dalı, Çorum Hitit Üniversitesi Erol Olçok Eğitim ve Araştırma Hastanesi

V-Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Patoloji Dernekleri Federasyonu, Ankara Patoloji Derneği, European Society of Pathology

VI- Bilimsel Çalışmalar

Yayın: -

Sözel Bildiriler:

1. **Çiğdem YILDIRIM**, Mehmet DOĞAN Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma Olgularında CD30 Ekspresyonunun Patolojik ve Prognostik Önemi. 30. Ulusal Patoloji Kongresi, 2021, Online

Poster Bildiriler:

1. **Çiğdem YILDIRIM**, Nazan BOZDOĞAN. Splenogonadal Füzyon: Olgu Sunumu ve Literatür Taraması, 28. Ulusal Patoloji Kongresi, 2018, Ankara
2. **Çiğdem YILDIRIM**, Gülay BİLİR DİLEK. Bifazik Low Grade Sinonazal Papiller Adenokarsinom: Nadir Bir Olgu: Olgu Sunumu ve Literatür Tarama. 30. Ulusal Patoloji Kongresi, 2021, Online
3. **Çiğdem YILDIRIM**, Olcay KANDEMİR, İdrar Sitolojilerinin Raporlanmasında Paris Sistemi Deneyimimiz ve Olguların Sitolojik ve Histolojik Korelasyonu. 30. Ulusal Patoloji Kongresi, 2021, Online
4. **Çiğdem YILDIRIM**, Emine BENZER, Mehmet DOĞAN, Orbitada Kitle ve Deri Tutulumu ile Prezente Olan Plazmablastik Lenfoma: Olgu Sunumu ve Literatür Taraması. 30. Ulusal Patoloji Kongresi, 2021, Online

VII-Diğer Bilgiler: Sertifikalar, Kurslar ve Yeterlilik Belgeleri:

- Pankreas ve Periampuller Bölge Tümörleri Patolojisi Kursu, Ege Patoloji Derneği ve Patoloji Dernekleri Federasyonu, 2021
- Moleküler Patoloji Günü-5, Patoloji Dernekleri Federasyonu ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı, 2021
- Moleküler Patoloji Kursu, Patoloji Dernekleri Federasyonu, 2021
- Patoloji Kış Okulu (PAKO), Ankara Patoloji Derneği, 2021
- Temel Nöropatoloji Kursu, Çukurova Patoloji Derneği ve Nöropatoloji Çalışma Grubu, 2021
- 30. Ulusal Patoloji Kongresi, Patoloji Dernekleri Federasyonu ve Türk Patoloji Derneği, 2020
- 9. Patoloji Kış Okulu (PAKO), Ankara Patoloji Derneği, 2020
- Olgularla Jinekopatoloji Rutinine Yaklaşım, Çukurova Patoloji Derneği ve Patoloji Dernekleri Federasyonu, 2020
- Akciğer Kanserleri Kursu, Anadolu Patoloji Derneği, 2020
- 8. Patoloji Kış Okulu (PAKO), Ankara Patoloji Derneği, 2019
- Multisistem Sitoloji Çalıştayı, Sitopatoloji Derneği, 2019
- Jinekopatoloji Kursu: Endometrial Küretajlar ve Over Tümörleri, Ege Patoloji Derneği, 2019
- Baş Boyun Patolojisi Kursu-Güncelleme, Ege Patoloji Derneği, 2019
- Gastrointestinal Sistem Patolojisi Kursu: Gastrointestinal Kanalda Reaktif Epitelyal Değişikliklerden Displaziye- Displaziden Karsinoma, Ege Patoloji Derneği, 2019
- XXIV. Prof. Dr. A. Lütfü Tat Sempozyumu- Temel Dermatopatoloji Kursu, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı, 2019
- 28. Ulusal Patoloji Kongresi, Patoloji Dernekleri Federasyonu ve Ankara Patoloji Derneği, 2018

EKLER

EK-1. TEZ KONUSU ONAY FORMU

Uzmanlık Öğrencisinin Adı Soyadı: **Telefon:** **E-Posta:**	Çiğdem YILDIRIM
Uzmanlık Dalı:	Tıbbi Patoloji
Eğitim Kurumu:	Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Dr. Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Uzmanlık Eğitimine Başlama Tarihi:	14.03.2018
Uzmanlık Eğitimini Bitirme Tarihi:	14.04.2022
Program Yöneticisinin **Adı Soyadı:**	Prof. Dr. Olçay Kandemir
Tez Danışmanının **Adı Soyadı:** **Telefon:** **E-Posta:**	Doç. Dr. Tuba Dilay Kökenek Ünal

*Araştırma/Tez Konusu (Study Title)

Yumuşak doku tümörlerinde *Ly6E* ve *Ly6K* gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi ve bu düzeylerin tümör agresivitesi ile korelasyonunun araştırılması

1-Araştırma Sorusu (Research problem)

Yumuşak doku tümörü olan hastalarda kanser kök hücre genleri *Ly6E* ve *Ly6K*'nın tümörün oluşumu ve agresifitesinde rolü olabilir mi?

Hangi tümörlerin daha yüksek dereceli olacağını, hangilerinin nüks/metastaz yapacağını tahmin etmemizde etkisi olabilir mi?

Hangi hastaların tedaviye daha iyi cevap vereceğini, hangilerinin hastalıklarının daha iyi bir seyir göstereceğini ayırt etmemizde *Ly6E* ve *Ly6K*'nın yardımı olacak mıdır?

Ly6E ve *Ly6K*'nın yumuşak doku tümörlerinde prognostik ve prediktif değeri var mıdır?

Kanser kök hücre genleri *Ly6E* ve *Ly6K*'nın tümörün diferansiasyonu ile ilişkisi var mıdır ve bu durum bize nasıl yardımcı olabilir?

2-Arka Plan ve Gerekçe (Background/rationale)

Yumuşak doku tümörleri (YDT) yaygın olmayan bir tümör grubu olup kas, yağ, bağ ve sinir dokuda görülen çok sayıda hastalığı kapsamaktadır. Bu tümörler birbirinden farklı histolojik tipe, genetik profile ve klinik özelliklere sahiptir. Yumuşak doku tümörleri genellikle embriyonik mezodermden köken alırlar ve vücudun herhangi bir bölgesinde ağrısız kitle şeklinde ortaya çıkarlar. Yumuşak doku sarkomları, tüm kanserlerin yaklaşık %1'ini oluşturmaktadırlar. Sağkalım ve tedavi yaklaşımları açısından çeşitli farklılıklar göstermekte olup tedavi seçenekleri arasında kemoterapi ve radyoterapi yer almaktadır. Ancak ilaç toksisitesi ve tedaviye kısmi cevap tedaviyi sınırlayan en önemli durumlardır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda tümör içinde az sayıda bulunan ancak tümörü yeniden başlatabilme kapasitesine sahip hücrelerin varlığı gösterilmiş ve pek çok kanserde kanser kök hücresi adı verilen bu hücreler tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarda kanser kök hücrelerinin tümörün invazyon ve metastazında da önemli rol oynadığı ve tedaviye karşı direnç gelişiminden de sorumlu olduğu ortaya konmuştur. Son yıllarda aynı şekilde YDT'lerinin içinde de tümör heterojenitesinden, relaps ve metastazlardan sorumlu olduğu düşünülen kök hücre benzeri hücreler tanımlanmıştır. Ayrıca bazı çalışmalarda YDT'lerin

oluşumunda mezenkimal kök hücrelerin rol oynadıkları, mezenkimal kök hücrelerin ve sarkom hücrelerinin benzer yüzey belirteçleri taşıdığı ortaya konmuştur. Bu nedenle YDT ve kök hücresi ilişkisi daha çok araştırılmayı hak eden bir konu olmakla birlikte bu konuda literatürde sınırlı bilgi bulunmaktadır.

Ly6 (lenfosit antijen 6) gen ailesi yaklaşık 35 üyesi bulunan geniş bir aile olup hücre içinde çok fazla sayıda yolak ve proteinle ilişkilidir. Yapılan çalışmalar, *Ly6* gen ailesinin büyüme faktörleri, nükleer reseptör ve mikro RNA'lar dahil olmak üzere çok çeşitli moleküllerin etkileşiminde rol oynadığını ve bu sayede büyüme, apoptoz, otofaji ve bağışıklık yanıtı arasında değişen mikroçevre ile çok sayıda hücrenin akıbetini ve hücre-hücre etkileşimini etkilediğini göstermiştir. Bu ailenin ılk tanımlanan üyesi olan kök hücre antijen-1(*Sca-1/Ly6A*) farelerde kanser kök hücrelerinin ve dokuda yerleşik kök hücrelerin bir belirteci olarak kullanılmaktadır. *Sca-1* geni fare kromozomu 15 üzerinde bulunur. İnsanlarda Sca-1'in doğrudan bir homoloğu bulunmasa da insan kromozomu 8 (fare kromozomu 15 ile sinentik) LU alanı olarak bilinen karakteristik alanı içeren birkaç geni bulundurur. Bu alanda insanda *Ly6D, Ly6E, Ly6H, Ly6K, PSCA, LyPD2, SLURP1, GML, GPIHBP1 ve LYNX1* genleri olmak üzere 8 adet gen bulunmaktadır. İnsan *Ly6* gen ailesindeki bu alanının işlevi henüz tam olarak tanımlanmamıştır.

Faredeki homoloğundan yola çıkılarak başlatılan çalışmalarda insanda bulunan *Ly6* genlerinin de bazı hastalıkların ve farklı kanserlerin oluşumunda ve gelişiminde etkili olduğu ve kötü prognoz belirteci olduğu literatürde gösterilmiştir. Literatürde, Sca-1'e sinentik olan ve 8.kromozomda bulunan *Ly6D, E, H ve K*'nin insanda normal dokuya kıyasla karsinomlarda up-regüle olduğu ve bu genlerin artan ekspresyonunun, birden fazla karsinom tipinin kötü prognozu ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Yine bu ailenin üyelerinden olan *Ly6E* ve *Ly6K*'nın meme kanserinde kanser gelişimi, immün sistemden kaçış ve ilaç direnci gelişiminde rol oynadığı ortaya konmuştur. Ly6E'nin yine mide kanserinde tümör büyümesini ve metastazı tetiklediği belirtilmiştir. Ancak *Ly6* ailesinin YDT'lerdeki rolü ile ilişkili olaraka literatürde henüz yayın bulunmamaktadır. Yapılan fare deneylerinde Sca-1 pozitifliğinin sarkom oluşması, ilerlemesi ve tedaviye direnç gelişmesi ile ilişkili olduğunu ortaya konmuştur. Bu nedenle biz de bu çalışmada faredeki *Sca-1*'le benzer göreve sahip olduğunu düşündüğümüz *Ly6* ailesi üyelerinden *Ly6E* ve *Ly6K*'nın insanda farklı orijine sahip benign ve malign yumuşak doku tümörlerindeki ekspresyonunu ortaya koymayı ve ekspresyon düzeylerinin histopatolojik prognostik parametrelerle, rekürrens, tedaviye cevap ve sağkalım ile olan ilişkisini göstermeyi

amaçlıyoruz. Literatürde yumuşak doku tümörlerinde kanser kök hücreleri ile ilgili çalışmalar daha çok bilinen kanser kök hücre belirteçleri olan OCT3/4, SOX-2, NANOG, CD133 ve ALDH üzerine yoğunlaşmaktadır. Faredeki Sca-1 homoloğu olan genlerle ilgili olarak bazı kanserlerde değerlendirmeler yapılmaya başlanmış olmakla birlikte yumuşak doku tümörlerinde henüz bir çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle çalışmamız güncel ve özgün bir değer taşımaktadır.

Ly6 genleri farklı kanserlerde kanser belirteçleri ve kötü prognostik belirteç olabildiği gibi aynı zamanda yeni tedavi modaliteleri için de bir hedef konumundadır. Hali hazırda devam etmekte olan klinik çalışmaların ön sonuçları *Ly6E*'nin bu konuda ümit vadettiğini ortaya koymaktadır. Çalışmamız sonucunda *Ly6*'nın YDT'lerdeki ekspresyonu gösterildiğinde ve prognostik parametrelerle muhtemel korelasyonu bulunduğunda; YDT'ler için sadece yeni bir prognostik belirteç ortaya koymakla kalmayıp aynı zamanda bu hastalar için yeni bir tedavi seçeneğinin de kapısı aralanmış olacaktır. Bu alanda yapacağımız çalışmanın sonuçlarının klinisyene hastanın takip ve tedavisinde yol gösterebileceği kanaatindeyiz.

3-Araştırma amacı (Objectives)

- Yumuşak doku tümörü olan hastalarda kök hücre antijeni *Ly6K* ve *Ly6E*'nin benign ve malign tümörlerdeki ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması; histopatolojik parametrelerle *Ly6K* ve *Ly6E* düzeyi arasındaki korelasyonun araştırılması
- *Ly6K* ve *Ly6E* düzeyinin çeşitli yumuşak doku tümör tipleri arasındaki ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması
- *Ly6K* ve *Ly6E* düzeylerinin hastaların nüks, metastaz ve sağkalım oranları ile karşılaştırılarak hastalığın prognozunu belirlemede bir belirteç olarak kullanılıp kullanılamayacağının araştırılması

4-Hipotez (Hypothesis)

Kanser kök hücre genleri *Ly6E* ve *Ly6K* yumuşak doku tümörü olan hastalarda tümörün oluşmasını, agresifitesini, tedaviye cevabını ve prognozu tahmin etmede yararlı birer belirteçtirler.

5-Araştırma türü/tasarım (Study Design)

Retrospektif, gözlemsel, analitik, kesitsel

6- Araştırma yeri (Study Setting/ Location)

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Patoloji Laboratuarı

7- Araştırmaya katılanlar/denekler (Study Population)

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi 'nde eksizyon ile yumuşak doku tümörü tanısı konularak ameliyat materyali patoloji kliniğimizde değerlendirilen hastalar çalışma grubunu oluşturmaktadır. Çalışmamızda hastalar kontrol grubu, benign grup ve malign grup olmak üzere üç gruba ayrılarak belirlenen parametreler açısından karşılaştırma yapılacaktır.

Çalışmaya sadece yetişkin yaş grubunda ve son 3 yıl içerisinde tanı alan hastalar dahil edilecek; senkron/metakron tümörleri bulunan ve sadece tru-cut biyopsi materyali olan hastalar çalışmaya alınmayacaktır.

Çocuk yaş grubunda olan ve karsinom tipi tümörü bulunan hastalar çalışmadan çıkarılacaktır.

Hastaların yaş dağılımının belli bir aralıkta olması hedeflenmekte olup çok genç ve çok ileri yaşdaki hastalar çalışmaya dahil edilmeyecektir.

8- Araştırmanın birincil ve ikincil sonuç değişkenleri (Primary and Secondary Outcome)

Birincil değişkenler: gen düzeyleri, tümör tipleri, benign ve malign grup

İkincil değişkenler; Tümör boyutu, nüks, metastaz, sağ kalım

9- Araştırma Süreçleri (Study procedures)

Araştırmada önce yumuşak doku tümörü tanısı alan hasta grubu belirlenecektir. Bu hastalardan eksizyon materyali bulunanlar çalışmaya dahil edilecektir. Hastaların ameliyat materyalleri histopatolojik olarak yeniden değerlendirilecek ve tümör lokalizasyonu, tümör derecesi, tümör boyutu, nüks ve metastaz varlığı, mitoz ve nekroz durumu, sağ kalım gibi parametreler not edilecektir. Hastalar tanı gruplarına göre kategorize edilecektir. Daha sonra H&E kesitleri incelendikten sonra uygunluğuna karar verilen parafin bloklar belirlenecektir. Parafin bloklardan uygun yöntemlerle RNA izolasyonu gerçekleştirilecek, daha sonra cDNA elde edilerek değerlendireceğimiz genler için hazırlanan primerler kullanılarak PCR çalışması yapılacaktır. Gen düzeylerindeki anlamlı

görülen değişiklikler not edilecektir. Sonuçlar gen düzeyleri ve belirlenen diğer parametrelerle de karşılaştırılacaktır. Gerekli istatistikler yapılarak sonuçlar değerlendirilecektir.
10-Örnek büyüklüğü ve istatistiksel güç (Sample size and statistical power) Alt gruplarda 5'er ve 10'ar kişi olmak üzere örnek büyüklüğü 45 hasta olarak belirlendi. İstatistiksel güç %90 olarak hedeflendi.
11- İstatistiksel yöntemler (Statistical methods) Verilerin dağılımına histogram, qq plot ve Shapiro-Wilk testi ile bakılacaktır. İki grup arası verilerin karşılaştırılmasında bağımsız t-testi kullanılacaktır. 3 ve daha çok gruptan oluşan kıyaslamalarda ANOVA ve anlamlı olma durumunda ikili karşılaştırılma için Tukey'in çoklu karşılaştırma testi kullanılacaktır. İki bağımsız niteliksel kriteri test etmek için Ki-Kare Testi (Chi-square test) kullanılacaktır.
12-Etik Öngörü (Ethical Considerations) Bu araştırmanın yürütülmesi sırasında yapılacak uygulamalar Helsinki deklarasyonu, İyi Klinik Uygulama (Good Clinical Practice) ilkelerine uygun olarak araştırma etik kuralları ile çelişmeyecek şekilde yapılacaktır.
13- Anahtar kelimeler (Key words) Yumuşak doku tümörü, sarkom, kanser kök hücresi, *Ly6E*, *Ly6K*

Kontrol edilmiştir ve uygundur.

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Tuba Dilay KÖKENEK ÜNAL

EK-2. ETİK KURUL ONAY BELGESİ

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Yumuşak Doku Tümörlerinde LY6E Ve LY6K Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi Ve Bu Düzeylerin Tümör Agresivitesi İle Korelasyonunun Araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ DR. ABDURAHMAN YURTARSLAN ONKOLOJİ SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	
	TELEFON	0 312 336 96 81
	FAKS	0 312 336 96 81
	E-POSTA	

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Olcay KANDEMİR			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Patoloji Kliniği			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji SUAM			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZI VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
		Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
		Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐		
		İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐		
		İlaç dışı klinik araştırma	☒		
		Diğer ise belirtiniz			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Yumuşak Doku Tümörlerinde LY6E Ve LY6K Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi Ve Bu Düzeylerin Tümör Agresivitesi İle Korelasyonunun Araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	SİGORTA	☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐	
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER:	☐	

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No: 2020-08/737**	**Tarih: 26.08.2020**
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	**Prof. Dr. Lütfi DOĞAN**

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılı
Prof. Dr. Lütfi DOĞAN	Genel Cerrahi	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☒	K ☐	E ☐	H ☐	E ☐
Prof. Dr. Mustafa ARSLAN	Fizyoloji/Anestezi	Gazi Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☐	E ☐
Prof. Dr. F. Nur BARAN AKSAKAL	Halk Sağlığı	Gazi Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☐	E ☐
Doç. Dr. Tolga Reşat AYDOS	Farmakoloji	Başkent Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☐	E ☐
Doç. Dr. Merih KIZIL ÇAKAR	Hematoloji	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☐	K ☒	E ☐	H ☐	E ☐
Doç. Dr. Nazan ÇİLEDAĞ GÖKBAYRAK	Radyoloji	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☐	K ☒	E ☐	H ☐	E ☐
Uzm. Dr. Ebru ATASEVER AKKAŞ	Radyoterapi	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☐	K ☒	E ☐	H ☐	E ☐
Doç. Dr. Erdem ÖZTÜRK	Üroloji	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☒	K ☐	E ☐	H ☐	E ☐
Op. Dr. Hakan BULAK	Genel Cerrahi	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☒	K ☐	E ☐	H ☐	E ☐
Uzm. Dr. Özlem ŞEN	Anestezi	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☐	K ☒	E ☐	H ☐	E ☐
Uzm. Dr. Bahar UNCU ULU	Hematoloji	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☐	K ☒	E ☐	H ☐	E ☐
Doç. Dr. Ayşe OCAK DURAN	Tıbbi Onkoloji	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☐	K ☒	E ☐	H ☐	E ☐
Uzm. Dr. Recep ÖZTÜRK	Ortopedi	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☒	K ☐	E ☐	H ☐	E ☐
Av. Arzu BATUR	Avukat	Ankara İl Sağlık Md.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☐	E ☐
Uzm. Fiz. Müh. Dinçer YEĞEN	Mühendis	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☒	K ☐	E ☐	H ☐	E ☐

*:Toplantıda Bulunma