



T.C. PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

UTERİN LEİOMYOSARKOMLARDA NETRİN-1, NETRİN-4
DÜZEYLERİNİN VE RESEPTÖRLERİNİN EKSPRESYONUNUN
ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ
DR. MÜBETCEL OCAK TURGUT

DANIŞMAN: DOÇ DR. ÜMİT ÇABUŞ

DENİZLİ 2023



T.C. PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

UTERİN LEİOMYOSARKOMLARDA NETRİN-1, NETRİN-4
DÜZEYLERİNİN VE RESEPTÖRLERİNİN EKSPRESYONUNUN
ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ
DR. MÜBETCEL OCAK TURGUT

DANIŞMAN: DOÇ. DR. ÜMİT ÇABUŞ

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 03.02.2022 tarih ve 2022TIPF001 numaralı kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ 2023

TEŞEKKÜLER

Uzmanlık eğitimim süresince, çok değerli bilgi ve deneyimlerini bizimle paylaşan, biz asistanlarına öğretmek için uğraşan saygıdeğer hocalarıma,

Tezimin hazırlanmasındaki destek ve katkılarından dolayı tez danışman hocam Doç. Dr. Ümit Çabuş'a, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Doç. Dr. Nazlı Çil'e ve Prof. Dr. Şevki Arslan'a,

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım, kendilerini tanıdığım için mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma,

Ayrıca zorlu asistanlık süresince sabır ve fedakarlıkla her konuda her zaman en büyük destekçilerim olan hayat arkadaşım, eşim Musa Turgut'a ve kızım Zeynep İnci'ne, tüm tıp eğitimim boyunca maddi ve manevi desteklerini ve sevgilerini her zaman yanımda hissettiğim annem Ümmühan'a, babam Abdil Erkan'a, kardeşlerim Ayşe, Fatma ve Zehra'ya ve de her yönüyle örnek aldığım, hayatıma yön veren canım teyzem Saniye Tatar'a,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Mübetcel OCAK TURGUT

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜLER.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VII
TABLolar LİSTESİ	VIII
ÖZET	1
SUMMARY	2
GENEL BİLGİLER.....	3
LEİOMYOSARKOM	5
PATOLOJİ	5
SEMPTOMLAR VE YAYILIM.....	7
PROGNOSTİK FAKTÖRLER	7
KLİNİKOPATOLOJİK TİPLERİ.....	7
<i>Benign Metastaz Yapan Leiomyom</i>	7
<i>Leiomyomatozis Peritonealis Disseminata</i>	8
<i>İntravenöz Leiomyomatozis</i>	8
<i>Leiomyoblastom</i>	8
<i>Miksoid Leiomyosarkom</i>	9
TEDAVİ	9
<i>Cerrahi</i>	9
<i>Lenfadenektomi Endikasyonları</i>	12
<i>Görüntülemenin Rolü</i>	13
<i>Evreleme</i>	13
<i>Adjuvan Tedavi</i>	13
<i>Tedavi Sonrası Gözetim</i>	16
<i>Prognoz</i>	16
<i>Özel Gruplar</i>	17
<i>Metastaz</i>	18
NETRİN AİLESİ	21
NETRİN RESEPTÖRLERİ VE SİNYAL İLETİMİ.....	23
<i>Netrin-1 ve Reseptörleri</i>	26

<i>Netrin-4</i>	31
GEREÇ VE YÖNTEM	33
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ (BAP) BİRİMİ ONAYI	33
DOKULARDA GEN EKSPRESYONUN GÖSTERİLMESİ	33
<i>Hücre Kültürü Çalışmaları</i>	33
<i>Hücre Canlılığı ve Sayılması</i>	33
<i>Myometriyum Doku Örneğinin Eldesi</i>	34
<i>Toplam RNA İzolasyonu</i>	34
<i>Toplam RNA'nın Spektrofotometrik Analizi</i>	35
<i>Toplam RNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi</i>	35
<i>cDNA Sentezi</i>	35
<i>Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu</i>	36
İMMÜNOSİTOKİMYASAL BOYAMA.....	37
<i>İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi</i>	37
<i>İmmunohistokimyasal Skorum</i>	39
İSTATİSTİKSEL ANALİZ	39
BULGULAR	40
DOKULARDAKİ GEN EKSPRESYONUN SONUÇLARI	40
<i>Toplam RNA'nın Görüntülenmesi</i>	40
<i>PZR ile mRNA Ekspresyonlarının Tayini</i>	40
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR	44
<i>Netrin-1</i>	44
<i>Netrin-4</i>	45
<i>UNC5B</i>	46
TARTIŞMA	47
SONUÇ	52
KAYNAKLAR	53

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADD.....	Bağımlılık Alanındaki Bağımlılık Alanı
AJCC.....	Amerikan Ortak Kanser Komitesi
A2bR.....	Adenozin Reseptörü
BSO.....	Bilateral salpingo-ooferektomi
CBLN4.....	Serebellin 4
CT.....	C-terminal
DAPK.....	Ölümle İlişkili Protein Kinaz
DCC.....	Deleted Colorectal Cancer
DD.....	Ölüm Alanı (death domain)
DR.....	Bağımlılık Reseptörleri
DSCAM.....	Down Sendromu Hücre Adhezyon Molekülü
ERK1/2.....	Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Kinazlar
FAK.....	Fokal Adhezyon Kinaz
FBS.....	Fetal Sığır Serumumu
FNIII.....	Fibronektin tip III
GPL.....	Glikozilfosfatidilinositol
GTPaz.....	Guanozin Trifosfataz
HTB-114.....	İnsan Uterus Leiomyosarkom Hücre Hattı
IGF.....	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IUGR.....	İntrauterin Gelişme Geriliği
LMS.....	Leiomyosarkomlar
LncRNA.....	Uzun Kodlamayan RNA
LRR.....	Lösin Açısından Zengin Tekrar
MAPK.....	Mitojen Aktive Edilmiş Kinaz
NGL.....	Netrin-G ligandları
NT.....	N-terminal
PBS.....	Fostat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PI3K.....	Fosfor İnositol 3-Fosfat Aktive Kinaz
PKA.....	Protein Kinaz A
PZR.....	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TNFRSF.....	Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü Süper Ailesi
TSP-1.....	Trombospondin tip 1
TNF.....	Tümör Nekroz Faktörü
UICC.....	Uluslararası Kanser Kontrol Birliği
UNC-5.....	UnCoordinated-5
UNC5H.....	UnCoordinated-5 Homolog
UNC5B-AS1.....	UNC5B Antisens RNA 1
VEGF.....	Vasküler Endotelial Growth Faktör
ZU-5.....	Zona Occludens 5

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Netrin Protein Ailesi (70).....	22
Şekil 2: Netrin reseptör ailesi (100)	24
Şekil 3: Netrin-1 reseptör sinyali ve bilinen fonksiyonları (100)	25
Şekil 4: Netrin-1 ve Netrin-1 Bağımlılık Reseptörlerinin Yapısı (17)	28
Şekil 5: Netrin-1 ve reseptörü DCC'nin Apoptozla İlişkisi (17)	29
Şekil 6: DCC ve UNC5H aracılı apoptoz mekanizması (81,118,121)	30
Şekil 7: Netrin-1, Netrin-4, UNC5 DCC Ailesi ve Biyolojik Etkileri (131)	32
Şekil 8: Thoma lamının mikroskop altındaki görüntüsü.....	34
Şekil 9: HTB-114 leiomyosarkom hücre hattı ve normal uterin myometrium dokusundan elde edilen RNA'nın %1'lik agaroz jel elektroforezi.	40
Şekil 10: PZR Ürünlerinden Elde Edilen Jel Görüntüleri.	41
Şekil 11: İnsan Normal Myometrium ve HTB-114 hücre hattındaki Netrin-1'in PZR Erime Eğrisi Analizi.....	41
Şekil 12: İnsan Normal Myometrium ve HTB-114 hücre hattındaki Netrin-4'ün PZR Erime Eğrisi Analizi.....	41
Şekil 13: İnsan Normal Myometrium ve HTB-114 hücre hattındaki UNC5B'nin PZR Erime Eğrisi Analizi.....	42
Şekil 14: Gerçek Zamanlı PZR sonuçlarına göre Netrin-1 geninin HTB-114 ve doku örneğindeki bağıl mRNA ekspresyonu analizi.	42
Şekil 15: Gerçek Zamanlı PZR sonuçlarına göre Netrin-4 geninin HTB-114 ve doku örneğindeki bağıl mRNA ekspresyonu analizi.	43
Şekil 16: Gerçek Zamanlı PZR sonuçlarına göre UNC5B geninin HTB-114 ve doku örneğindeki bağıl mRNA ekspresyonu analizi.	43
Şekil 17: İnsan myometrium dokusu ve HTB-114 hücre hattının immünohistokimyasal boyama incelemesi sonucunda Netrin-1 ekspresyon görüntüleri.	44
Şekil 18: İnsan myometrium dokusu ve HTB-114 hücre hattının immünohistokimyasal boyama incelemesi sonucunda Netrin-4 ekspresyon görüntüleri.	45
Şekil 19: İnsan myometrium dokusu ve HTB-114 hücre hattının immünohistokimyasal boyama incelemesi sonucunda UNC5B ekspresyon görüntüleri.	46

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: Uterin Düz Kas Tümönerinin Makroskopik Özelliklerinin Sınıflandırılması	6
Tablo 2: Leiomyosarkom TNM Evrelemesi (AJCC UICC 8. Baskı)	11
Tablo 3: Kuyucuklara Yüklenen RNA Örnekleri Ve Marker Konsantrasyonları	35
Tablo 4: cDNA Sentez Karışımı ve Protokolü	36
Tablo 5: Çalışmada Kullanılan Genlerin Primer Dizileri	36

ÖZET

Uterin leiomyosarkomlarda Netrin-1, Netrin-4 düzeylerinin ve reseptörlerinin ekspresyonunun araştırılması

Dr. Mübetcel Ocak TURGUT

Netrinler, laminin benzeri protein ailesinin üyesidir. Netrinlerin akson rehberliği, doku morfogenez, sinaptojen, anjiyogenez, apoptoz, inflamasyon ve tümör gelişimi üzerinde rolü olduğu gösterilmiştir. Bu özelliklerinden dolayı netrin protein ailesinin bazı kanserlerin gelişiminde görev aldığı araştırılıp tespit edilmiştir. Leiomyosarkom (LMS), uterusun en sık rastlanan sarkom türüdür. Çoğu vakada, uterin LMS tanısı, benign olduğu varsayılan uterin leiomyomlara uygulanan myomektomiye takiben konulur. LMS, yüksek nüks ve ölüm riski ile ilişkili agresif bir tümördür. Tüm kanser türlerinde olduğu gibi mortalite riski yüksek leiomyosarkomda da hastalığın başlamadan önce veya erken evrelerde tespit edilmesine yönelik biyobelirteç bulma çalışmaları asıl amaçtır. Biz de çalışmamızda, şu ana kadar araştırılmamış olan, leiomyosarkom gelişiminde Netrin-1, Netrin-4 ve UNC5B'nin rolü olup olmadığını göstermeyi amaçladık. Üreme çağındaki kadın hastadan uterin normal myometriyum dokusu elde edildi. Leiomyosarkom dokusu için insan uterin leiomyosarkom hücre hattı (HTB-114) kullanıldı. İnsan normal myometriyum dokusunda ve HTB-114'te; Netrin-1, Netrin-4 ve UNC5B immünohistokimyasal yöntemle boyanarak ve PZR yöntemiyle genlerinin ekspresyon düzeyleri saptanarak karşılaştırıldı. Gerçek zamanlı PZR çalışması sonucunda Netrin-1, Netrin-4 ve UNC5B genleri, HTB-114 hücre hattında insan uterin normal myometriyum doku örneğine göre 4.92, 65.34 ve 160.33 kat daha fazla eksprese edilirken; immünohistokimyasal incelemede ise, HTB-114 hücre hattının, insan uterin normal myometriyum doku örneğine göre anlamlı derecede daha güçlü Netrin-1, Netrin-4 ve UNC5B boyanmasına sahip olduğu gösterildi. Sonuç olarak; Netrin-1, Netrin-4 ve UNC5B'nin leiomyosarkom gelişiminde etkili olduğunu söyleyebiliriz.

Anahtar Kelimeler: Leiomyosarkom, Netrin-1, Netrin-4, UNC5B

SUMMARY

Investigation of the expression of Netrin-1, Netrin-4 levels and their receptors in uterine leiomyosarcomas

Dr. Mübetcel Ocak TURGUT

Netrins are members of the laminin-like protein family. Netrins have been shown to have a role in axon guidance, tissue morphogenesis, synaptogenesis, angiogenesis, apoptosis, inflammation and tumor development. Due to these properties, it has been investigated and determined that the netrin protein family plays a role in the development of some cancers. Leiomyosarcoma (LMS) is the most common type of sarcoma of the uterus. In most cases, the diagnosis of uterine LMS is made following myomectomy for presumed benign uterine leiomyomas. LMS is an aggressive tumor associated with a high risk of recurrence and death. As in all cancer types, the main aim is to find biomarkers to detect the disease before the onset or in the early stages in leiomyosarcoma with a high mortality risk. In our study, we aimed to show whether Netrin-1, Netrin-4 and UNC5B have a role in the development of leiomyosarcoma, which has not been investigated until now. Uterine normal myometrium tissue was obtained from a female patient of reproductive age. The human uterine leiomyosarcoma cell line (HTB-114) was used for leiomyosarcoma tissue. In human normal myometrium tissue and HTB-114; Netrin-1, Netrin-4 and UNC5B were compared by staining with immunohistochemical method and by detecting the expression levels of their genes by PCR method. As a result of real-time PCR study, while Netrin-1, Netrin-4 and UNC5B genes were expressed 4.92, 65.34 and 160.33 times more in HTB-114 cell line than in human uterine normal myometrium tissue sample; In immunohistochemical examination, HTB-114 cell line was shown to have significantly stronger Netrin-1, Netrin-4 and UNC5B staining than human uterine normal myometrium tissue sample. In conclusion, we can say that Netrin-1, Netrin-4 and UNC5B are effective in the development of leiomyosarcoma.

Keywords: Leiomyosarcoma, Netrin-1, Netrin-4, UNC5B

GENEL BİLGİLER

Leiomyosarkomlar (LMS) tipik olarak büyük (>10 cm), kanama ve nekroz alanları olan yumuşak, et gibi kesik yüzeylere sahip sarı veya ten rengi soliter kitlelerdir (1). Kitle uterus boşluğuna doğru şişebilir, ancak merkez üssü myometriyumdadır.

Leiomyosarkomlar genellikle belirgin hücresel atipiye, bol mitozlara ve koagülatif nekroz alanlarına sahiptir. LMS, tanı aşamasından bağımsız yüksek nüks ve mortaliteyle ilişkili agresif bir tümördür (2). Prognostik faktörler incelendiğinde; tümörün myom içerisinde lokalize kalması, nekroz yokluğu, düşük mitoz sayısı ve komşu dokuda hyalinizasyon benign prognostik faktörler olarak bildirmektedir. Leiomyosarkomların ilk semptomları vajinal kanama veya ağrı olabilir. Fizik muayene bulgusunda kitle olarak tespit edilebilir (3).

Çoğu vakada, uterin LMS tanısı, benign olduğu varsayılan uterin leiomyomlara uygulanan histerektomi veya myomektomiye takiben konulur (4,5). Total histerektomi sırasında, özellikle menopozal veya perimenopozal hastalarda sıklıkla bilateral salpingo-ooferektomi (BSO) yapılır. Uterusla sınırlı, bozulmamış bir numunenin rezeksiyonunu takiben standart bakım gözlemdir. Kemoterapi veya pelvik radyasyon bazen uterin LMS ameliyatından sonra düşünülürken, hiçbir adjuvan tedavi şekli gözlemlenile karşılaştırıldığında sağkalım sonuçlarında iyileşme göstermemiştir.

Netrinler, başlangıçta embriyonik aksonal kılavuz rolü için tanımlanan laminin benzeri proteinler ailesinin üyeleridir. Her ne kadar ilk çalışmalar netrinlerin sinir sisteminde aksonal iletim sırasında eksprese edildiğini gösterse de sonrasında yapılan çalışmalarda netrinlerin sinir sistemi dışında eksprese edildiği ve doku morfogenezi, anjiyogenez, lenfanjiyogenez, tümör gelişimi, hücre göçü, invazyon ve adhezyon, apoptoz ve inflamasyonun düzenlenmesinde görev aldığı gösterilmiştir. Bu özellikleri nedeniyle netrinler çeşitli maligniteler üzerinde araştırmalara konu olmuş ve netrin protein ailesinin bazı kanserlerin gelişiminde hayati rol oynadığını bulunmuştur.

Netrin-1 endotelyal ve vasküler düz kas hücrelerinin morfogenezinde, tümör büyümesinde ve inflamasyonda regülatör olarak görev yapar (6).

Netrin-1'in reseptörlerinden DCC ve UNC5B, bağımlı reseptörler olarak isimlendirilir. Bu reseptörler ligand yokluğunda bile sinyal gönderirler. Ligand var olduğunda bu reseptörler, hücrel proliferasyon, farklılaşma, göç veya hayatta kalmaya yol açan pozitif bir sinyal yolunu uyarır. Ligandlarının yokluğunda, bu reseptörler "klasik" reseptörler gibi inaktif değildirler, ancak daha çok kaspaz bağımlı apoptotik hücre ölümünü tetikleyen "negatif sinyal" yolunu uyarırlar.

Netrin-4 hücre dışı protein ailesi olan netrinlerin bir üyesidir. Embriyonik vasküler gelişimde proanjyogenik bir faktör olarak hareket eden Netrin-4, endotel hücrelerinin farklılaşmasını ve göçünü engelleyerek ve düz kas hücrelerinin farklılaşmasını ve göçünü uyararak antianjyogenik etki göstermektedir (7). Hipoksi ve patolojik vasküler gelişimi uyaran durumlarda netrin-4 anjyogenezde antianjyogenik olarak rol alır.

Literatür taramamız sonucunda netrin ailesi ve reseptörleri ile jinekolojik kanserler arasında bağlantının değerlendirildiği araştırma sayısının kısıtlı olduğu görülmüştür. Netrinlerin ve reseptörlerinin, kanser gelişimi sürecindeki roller için literatür tarandığında daha çok Netrin-1 ile ilişkili çalışmalara ulaşılmaktadır. Netrin-1 seviyelerinin birçok kanser türünde önemli ölçüde artarak dolaşıma salındığı ve bu sebeple biyobelirteç olarak kullanımının uygunluğu son dönemde ilgi çekici araştırmalar yapılmasına sebep olmuştur. Ancak Netrin-1'in kanser gelişiminde indükleyici mi yoksa inhibe edici mi olduğu net değildir. Kısıtlı sayıdaki çalışmalarda kanser türü ve orijin aldığı dokuya göre farklılıklar izlenebilmektedir.

Netrin-1, Netrin-4 ve reseptörlerinin leiomyosarkom ilişkisini irdeyelen herhangi bir çalışmaya şu ana kadar rastlanmamıştır. Bu sebeple çalışmamızda leiomyosarkomlarda daha önce araştırılmayan Netrin-1 ve Netrin-4 düzeylerinin ve reseptörlerinin ekspresyonlarını değerlendirmeyi amaçladık.

LEİOMYOSARKOM

Leiomyosarkomlar (LMS) uterin malignensilerin %1-3' ünü oluşturur. Uterusun yaklaşık her 800 düz kas tümörlerinden birisi leiomyosarkomdan meydana gelir (8). Leiomyosarkomların bir çoğu intramural yerleşimli olup %50-70'i tek kitlelerdir (9). Leiomyosarkomların ortalama çapı 6-9 cm, sınırları belirgin ve yumuşaktır (10). Kesit yüzeyi nekroz ve hemoraji alanlarından oluşan gri-sarıdır. Leiomyosarkom, leiomyomdan daha yumuşak ve büyük olma eğilimlidir, ayrıca daha düzensiz kenarlı, hemorajik ve nekrotiktir.

PATOLOJİ

Mikroskopik açıdan sıradan leiomyosarkom, abondan eozinofilik sitoplazmalı işsi hücrelerin fasiküler tarzda yerleşiminden meydana gelmektedir. En iyi şekilde trikrom boyasında değerlendirilen longitudinal sitoplazmik fibriller sıklıkla gözlenmektedir. Çekirdek yapısı fuziform, genellikle yuvarlak uçlara sahip olup belirgin nükleollü, kaba kromatinli ve hiperkromatiktir yapıdadır. Selülarite ve pleomorfizm az diferansiye neoplazmlarda göze batmaktadır. Çoklu çekirdek tümör hücreleri leiomyosarkomların %50'sinde bulunmaktadır. Genellikle osteoklastlara benzeyen dev hücreler tespit edilmektedir (11,12). Bazen ksantoma hücreleri belirgin olabilmektedir.

Çoğu leiomyosarkom etrafını kuşatan myometriuma invazyon yapmasına karşın, düzgün sınırlı bir leiomyosarkom, her an bir metastazla karşımıza gelebilmektedir. Vasküler invazyon, leiomyosarkomların %10-22'sinde görülebilmektedir. Tümör hücresi nekrozu tipik şekilde belirgin olup kesinlikle mevcut olması gerekmemektedir. Son zamanlardaki literatürde, vakaların %80'inde mitotik indeks büyük büyütme altında 15'in üstünde olduğu ifade edilmektedir (13). Uterus leiomyosarkomlarını tanımak için kullanılan ana kriterler nükleer atipinin mevcudiyeti, yüksek bir mitotik indeks ve koagülatif tümör hücre nekrozudur.

Miksoid leiomyosarkomlar, makroskopik incelemede sıklıkla büyük jelatinöz neoplazmlardır (14-16). Mikroskopik olarak, düz kas hücreleri miksoid materyal

aracılığıyla genişçe yayılmaktadır. Spesifik düşük sellülarite birçok miksoid leiomyosarkomda düşük mitotik indeksi bir miktar tarif etmektedir. Nadiren mitotik indeks, yüksektir ve yüksek dereceli atipiye sahiptir. Miksoid görünüme ek olarak, leiomyosarkom olarak tümörü teşhis etmeye yardımcı olan diğer mikroskopik nitelikler myometrial infiltrasyon ve vasküler invazyondur. Düşük mitotik sayıya rağmen, miksoid leiomyosarkom tipik leiomyosarkom gibi kötü prognozludur. Leiomyosarkomlardaki miksoid diferansiyasyonu, dejenere olan leiomyomlarda izlenen hidropik değişikliklerden ayırmak önemlidir.

Epiteloid leiomyosarkomlarda sitolojik atipi, tümör hücresi nekrozu ve yüksek mitotik indeks görülebileceği gibi, tipik leiomyosarkomlarda izlenen malignensinin alışılan niteliklerine ek, epiteloid diferansiyasyon gösteren alanlara da sahiptir (14-21). Leiomyomlar ve leiomyosarkomlar arasındaki farklar tablo 1’de belirtilmiştir.

Tablo 1: Uterin Düz Kas Tümönerinin Makroskopik Özelliklerinin Sınıflandırılması

Leiomyom	Leiomyosarkom
Genellikle çok sayıdadır.	Genellikle tektir (%50-75).
Farklı çaplarda, genellikle 3-5 cm	Geniş çaplı olup, çap 10 cm'nin üzerindedir.
Kesit alanı sıkı, girdapsı yapılar içerir.	Kesit alanı yumuşak etli kıvamlıdır.
Renk: Beyaz	Renk: Sarı veya sarımsı kahverengi
Hemoraji ve nekroz sık değildir.	Hemoraji ve nekroz sıklıdır.

Leiomyosarkomun ortalama tespit edilme yaşı 43-53’tür. Premenapozal kadınlarda prognoz daha iyi olmaktadır. Hastaların %4’üne pelvik bölgeye radyoterapi uygulanmaktadır.

Esasen benign myomlarla sarkomların birbirlerinden bağımsız olduğu düşünülmekle birlikte uterin leiomyomların %0.13-0.83’ünde sarkomatöz dönüşüm olduğu belirtilmektedir (22,23).

SEMPATOMLAR VE YAYILIM

Leiomyosarkomların ilk semptomları vajinal kanama veya ağrı olabilir. Fizik muayene bulgusunda kitle olarak tespit edilebilir. Postmenapozal hızlı büyüyen kitlelerde leiomyosarkomdan şüphelenilmelidir. Endometrial biyopsi ile olguların ancak üçte birine ve submüköz yerleşimli olanlara tanı konulabilmektedir. Hastaların %50-75'inde tek bir lezyon vardır ve %70'inde intramural, %20'sinde submukozal ve %10'unda subserozal yerleşim görülmektedir. Servikal tutulum leiomyomlara göre daha siktir (3).

Lokalize yayılım myometriuma ve pelvik organlara olmaktadır. Uzak metastazsa hematogen yolla olmakta ve de en sık akciğer tutulumu görülmektedir. Bir çalışmada LMS sebebiyle ex olan hastaların otopsi raporları incelenmiş ve %100'ünde karın içi yayılım, %40'ında paraaortik lenf nodu tutulumu, %33'ünde böbrek tutulumu, %20'sinde karaciğer tutulumu ve %80'inde akciğer ve plevra metastazı tespit edilmiş (24).

PROGNOSTİK FAKTÖRLER

Prognostik faktörler incelendiğinde; tümörün myom içerisinde lokalize kalması, düşük mitoz sayısı, nekroz yokluğu ve komşu dokuda hyalinizasyon iyi prognostik faktörler olarak bildirmektedir (25).

KLİNİKOPATOLOJİK TİPLERİ

Leiomyosarkomun 5 farklı klinikopatolojik çeşidi daha bulunmaktadır. Bunlar metastaz gösteren leiomyom, leiomyomatozis peritonealis disseminata, intravenöz leiomyomatozis, leiomyoblastom ve mikst leiomyosarkomdur.

Benign Metastaz Yapan Leiomyom

Histolojik açıdan benign uterus düz kas tümörünün malign sayılabilecek şekilde davranarak genellikle akciğerlere ya da lenf bezlerine metastaz yapmasıyla karakterize olan çok nadir bir durumdur (26). Metastaz yapan leiomyomların uzak bölgelerde oluşum gösterebilmelerine karşın intravenöz tümörler sadece damarlar içinde direk

yayılım göstermektedir. Klinik deneyimler, her iki tümör tipinin de östrojenle uyarıldıklarında oluştukları göstermektedir. Bu sebeple; dışardan verilen östrojenin kesilmesi ya da progestin, tamoksifen veya gonadotropin tedavisi gibi yöntemlerle östrojen kaynağının kaldırılması tümör üzerinde iyileştirici etki oluşturmaktadır (27).

Leiomyomatozis Peritonealis Disseminata

Nadir tespit edilebilen bir tümör tipidir. Bu tip, periton yüzeyi üzerine serpilmiş iyi huylu düz kas nodülleri ile karakterizedir (28). Bu durum olasılıkla subperitoneal mezenchimal kök hücrelerinin östrojen ve progesteron etkisi altında düz kas, fibroblast, miyofibroblast ve desidual hücrelere metaplazi olmasına sekonder oluşmaktadır. Bildirilen hastaların çoğu 30-40 yaş arasındaki kadınlardan meydana gelmektedir ve bunlarda yeni geçirilmiş hamilelik ya da uzun zaman oral kontraseptif kullanım öyküleri genellikle tespit edilmektedir. Bu tipin nitelikleri; makroskopik olarak malign görünümlü olmasına karşın histolojisinin selim oluşu ve klinik gidişatının iyi olmasıdır.

İntravenöz Leiomyomatozis

Histolojik olarak benign düz kasın önce ligamentum latum içerisindeki venöz kanallara girmesi daha sonra da ilerleyerek uterin ve iliak venlere yerleşmesiyle karakterizedir (29-31). İntravasküler gelişim; myoma uteriden parametriumlara pelvis yan duvarları boyunca ilerleyen içsi yapılar tarzında izlendiği için endolenfatik stromal myozis ile karıştırılabilmektedir. Semptomlar beraberinde izlenen myomlar nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Hastaların bir çoğu hayatlarının beş ya da altıncı dekadındadır. Pelvik vasküler yapılarda, tümör kendi haline bırakıldığında bile prognoz selim seyredir. Yinede geç lokal nüksler görülebilmekte ve inferior vena kavaya yayılım ya da kalbe metastaz sebebiyle ölümler bildirilmektedir.

Leiomyoblastom

Leiomyoblastomların üç alt tipi bulunmaktadır: Epiteloid leiomyomlar, berrak hücreli leiomyomlar ve pleksiform tümörler (18). Bu grup atipik düz kas tümörleri mekik şeklinden ziyade daire şeklinde hücrelerden meydana gelir. Bu lezyonlar

özelleşmiş düşük evreli leiomyosarkom olarak kabul edilebilirler. 10'luk büyütmede 5'ten daha az mitoz izlenen bu tümörlerde prognoz gayet iyi seyredir.

Miksoid Leiomyosarkom

Makroskopik jelatinimsi görünümü ve düzgün yuvarlak sınırlar ile karakterizedir. Mikroskopik olarak ise miksomatöz stromaya sahiptir. Yakın dokulara ve kan damarlarına belirgin invazyon tespit edilmektedir (16). Mitoz sayısı düşüktür bu da tümörün agresif olmayışını nispeten iyi prognozlu oluşunu açıklamaktadır.

TEDAVİ

LMS, tanı aşamasından bağımsız olarak yüksek nüks ve mortaliteyle ilişkili agresif bir tümördür (2). Tümör derecesi ve diğer histolojik özellikler, tümörlerin klinik davranışını etkileyebilir ve tedavi önerilerinin önemli belirleyicileri olabilir. Uterin sarkomlu hastalar, mümkün olduğunda, tanı ve tedavilerinde uzmanlığa sahip özel merkezlere sevk edilmelidir.

Cerrahi

Çoğu vakada, uterin LMS tanısı, benign olduğu varsayılan uterin leiomyomlara uygulanan histerektomi veya miyomektomiye takiben konulur (4,5). Teşhise yol açan olayların sırası tedavi yaklaşımını etkileyebilir.

Preoperatif veya İntraoperatif Tanı

LMS tipik olarak postoperatif olarak teşhis edilir, ancak nadir durumlarda endometrial örnekleme ile preoperatif olarak veya frozen kesit ile intraoperatif olarak teşhis edilir. İyi huylu uterus hastalığını kötü huylu hastalıktan güvenilir bir şekilde ayırt edebilen tek bir preoperatif test yoktur.

Uterus ile sınırlı hastalık: Ameliyat sırasında uterus ile sınırlı olan LMS'li hastalar için total histerektomi önerilir (32-34). Preoperatif olarak uterus sarkomunu benign leiomyomlardan ayırt etmek için güvenilir bir yöntem yoktur. İyi huylu leiomyomata olduğu varsayılan bir veya daha fazla uterus kitlesi için ameliyata alınan

hastalar arasında, bildirilen uterus sarkomu prevalansı 350'de 1 ile 500'de 1 arasında değişmektedir. Hastalara tedavi planlanırken bu dikkate alınmalıdır.

Güçlü morselasyonla yayılabılme, hastalığı kötüleştirebilme ve klinik olarak uterus sarkomu şüphesi olan olgularda uterusun morselasyonundan kaçınmak makul bir yaklaşımdır (35).

Total histerektomi sırasında, özellikle menopozal veya perimenopozal hastalarda sıklıkla bilateral salpingo-ooferektomi (BSO) yapılır. Bununla birlikte, yeni teşhis edilmiş LMS'li hastalarda BSO'nun sağkalımı etkileyip etkilemediği açık değildir. Premenopozal hastalara BSO uygulanması önerilmemektedir. Uterin sınırlı LMS'li hastalarda BSO'nun etkisini değerlendiren bir Ulusal Kanseri Veri Tabanı çalışması, BSO uygulanan hastalarda uygulanmayanlara kıyasla genel sağkalımda bir fark olmadığını bildirmiştir (36).

Uterus dışına uzanan hastalık: Uterus dışı hastalığı olan hastalarda cerrahinin rolü tartışmalıdır. Yaklaşım, hastanın cerrahi aday olup olmadığına ve hastalığın tam rezeksiyonunun mümkün olup olmadığına bağlıdır.

Pelvisle sınırlı hastalığı olan ancak mesane veya rektum (evre II) veya karın (evre III) invazyonu olmayan hastalarda (Tablo 2), BSO ile total histerektomi uygulanması ve karın içi ve retroperitoneal hastalıkta cerrahi sitoredüksiyon uygulanması önerilmektedir. Veriler küçük hasta serileri ile sınırlı olsa da, cerrahinin sonunda rezidüel hastalığı olan hastalarla karşılaştırıldığında optimal bir sitoredüksiyon (büyük rezidüel hastalığın olmaması), genel sağkalımda artış ile ilişkilidir (5, 32-34). Optimal bir sitoredüksiyona uygun olmayan veya yaygın hastalığı olan hastalarda cerrahinin bir yararı yoktur. Cerrahiye takiben rezidüel hastalığın varlığı, tam bir sitoredüksiyona kıyasla kötü bir prognoz ile ilişkilendirilmiştir (33). Ayrıca cerrahi, özellikle yaygın hastalığı olan hastalarda sistemik tedavinin başlamasını geciktirebilir. Bu nedenle, cerrahi sitoredüksiyonun faydasını gösteren yüksek kaliteli verilerin yokluğunda, cerrahi sitoredüksiyon yerine medikal tedavinin başlanması önerilir.

Bununla birlikte, aşağıdaki senaryolarda cerrahi için makul bir sebep olabilir: Total histerektomi, belirgin pelvik semptomlar (ör. ağrı veya vajinal kanama) yaşayan hastalarda palyasyon işlevi görebilir. Total histerektomi ve metastatik hastalığın rezeksiyonu, peritoneal kavitenin ötesinde nispeten düşük hastalık yükü olan seçilmiş hastalarda (örn., akciğer veya karaciğerde izole metastatik hastalık) düşünülebilir.

Tablo 2: Leiomyosarkom TNM Evrelemesi (AJCC UICC 8. Baskı)

Tümör (T)		
<i>T kategorisi</i>	<i>FIGO evrelemesi</i>	<i>T kriteri</i>
Tx		Primer tümör değerlendirilemez
T0		Primer tümör kanıtı yok
T1	I	Rahim ile sınırlı tümör
T1a	IA	En büyük boyutu 5 cm veya daha küçük olan tümör
T1b	IB	5 cm'den büyük tümör
T2	II	Tümör pelvisin içinde uterusun ötesine uzanır
T2a	IIA	Tümör adneksi içerir
T2b	IIB	Tümör diğer pelvik dokuları içerir
T3	III	Tümör batın içi dokulara sızar
T3a	IIIA	Bir alana
T3b	IIIB	Birden fazla alana
T4	IVA	Tümör mesaneyi veya rektumu invaze eder
Lenf Nodları (N)		
<i>N kategorisi</i>	<i>FIGO evrelemesi</i>	<i>N kriteri</i>
Nx		Bölgesel lenf düğümleri değerlendirilemez
N0		Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N0 (i+)		Bölgesel lenf düğümlerinde 0,2 mm'den büyük olmayan izole tümör hücreleri
N1	IIIC	Lokal lenf nodu metastazı
Metastaz (M)		
<i>M kategorisi</i>	<i>FIGO evrelemesi</i>	<i>M kriteri</i>
M0		Uzak metastaz yok
M1	IVB	Uzak metastaz (adneksa, pelvik ve abdominal dokular hariç)

Postoperatif tanı

Total histerektomiden sonra (son patolojik incelemede) LMS teşhisi konan hastalar için, yalnızca evreleme amacıyla ikinci bir cerrahi prosedür uygulanması önerilmemektedir. Bunun yerine, postoperatif tedaviyi yönlendirmesi amacıyla toraks, batin ve pelvisin postoperatif bilgisayarlı tomografisi çekilmelidir.

Tek başına histerektomi (veya miyomektomi) uygulanan ve cerrahi aday olan hastalar için, ancak aşağıdaki durumlarda ikinci bir cerrahi prosedür mantıklıdır (37):

- Önceki ameliyatta overler korunmuşsa, yalnızca salpingo-ooferektomi yapmak için rutin olarak yeniden ameliyat edilmemelidir; bunun faydası belirsizdir ve hastayı cerrahi risklere maruz bırakır.

- Supraservikal histerektomi (veya miyomektomi) uygulanan hastalar için, mümkünse görünür rezidüel hastalığın rezeksiyonu ile serviksin çıkarılması veya histerektomi önerilmektedir. Perimenopozal ve menopozal hastalarda eş zamanlı BSO da yapılabilir. Premenopozal hastalarda BSO'nun yararlı olup olmadığı açık değildir.

- Tümörün morselasyonlu olduğu hastalarda, kalan peritoneal hastalığın rezeke edildiğinden emin olmak için cerrahi eksplorasyon ve evreleme yapılmalıdır.

Lenfadenektomi Endikasyonları

Pelvik lenf nodları intraoperatif olarak palpe edilir şekilde büyümüşse veya ekstrauterin hastalık kanıtı varsa, hastalara pelvik lenfadenektomi uygulanmalıdır (38,39). Uterus ile sınırlı LMS'li hastalarda lenf nodu tutulumu insidansı düşüktür. Bu, lenf nodu metastazı insidansının yüzde 5'ten az olduğu, klinik evre I veya II LMS'li (tümü cerrahi evrelemeye tabi tutulmuş) 59 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (40). Uterin LMS'si uterusla sınırlı ve normal görünen lenf nodları olan hastalarda rutin lenfadenektomi yapılmamalıdır.

Görüntülemenin Rolü

Yeni teşhis edilmiş uterin LMS'li hastaların yüzde 33'e kadarı, en yaygın olarak karaciğer, akciğer veya üst batını tutan uzak metastatik hastalık (evre IVB) ile başvurur (4,34,38,41,42). Bu nedenle, tanının patolojik olarak doğrulanmasının ardından tüm hastalara metastatik hastalığı ekarte etmek için görüntüleme yapılmalıdır.

LMS'li hastalar için ideal görüntüleme değerlendirmesi hakkında veri yoktur. Toraks radyografisi, bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve pozitron emisyon tomografisi (PET) taramalarının tümü, yumuşak doku sarkomları için metastatik hastalığı değerlendirme amacıyla kullanılır. LMS tanısı alan tüm hastalara perioperatif olarak BT uygulanmalıdır. LMS'nin perioperatif evrelemede PET'in faydasına dair veri yoktur ve nüksün saptanmasında PET ile ilgili veriler retrospektif vaka serileri ile sınırlıdır (43,44). BT veya MRG'den daha yararlı bilgi sağladığına dair bir kanıt yoktur.

Evreleme

Uterin LMS, 2017 Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu (FIGO)/Tümör, Lenf nodu, Metastaz (TNM) sınıflandırma sistemine göre cerrahi olarak evrelendirilir (Tablo 2). Bu, endometriyal stromal sarkom için kullanılan aynı evreleme sistemidir, ancak uterin adenosarkom evreleme sisteminden biraz farklıdır. FIGO evreleme sistemi, uterin LMS'li hastalar için genel sağkalım prognozunu öngörmez (45). Anahtar değişkenler olarak hasta yaşını, tümör boyutunu, derecesini, lokal yayılımını, uzak metastazları ve mitotik hızı içeren bir nomogram (https://www.mskcc.org/nomograms/uterine/post_op) prognostik açıdan daha yararlı olabilir (45).

Adjuvan Tedavi

Uterusla sınırlı, bozulmamış bir numunenin rezeksiyonunu takiben standart bakım gözlemdir. Kemoterapi veya pelvik radyasyon bazen LMS ameliyatından sonra düşünülürken, hiçbir adjuvan tedavi şekli gözlemlerle karşılaştırıldığında sağkalım sonuçlarında iyileşme göstermemiştir.

Erken evre hastalık

Sağkalım üzerinde iyileşme sağlamadığına dair kanıtlar nedeniyle cerrahi evre I veya II uterin LMS'li hastalar için, adjuvan tedavi yerine standart tedavi olarak gözlem önerilmektedir (46-49).

Kemoterapi: Doksorubisin, kombinasyon kemoterapisi ve radyasyon terapisi (RT), erken evre hastalığı olan hastalarda adjuvan tedavi olarak değerlendirilmiştir. Bununla birlikte, morbidite ile ilişkili bir tedavinin fayda sağlamadığı dikkate alınmalıdır.

Doksorubisin: Postoperatif doksorubisin ile rastgele tedavi atanan veya başka tedavi verilmeyen evre I veya II uterin sarkomlu 156 hastada bir faz III çalışması yürütmüştür (46). Doksorubisin ile tedavi edilen hastalarda, kemoterapi ile tedavi edilmeyenlere kıyasla daha düşük nüks oranı olmasına rağmen (yüzde 41'e karşı yüzde 53), bu istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ek olarak, adjuvan doksorubisinin sağkalım üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır.

Dosetaksel ve Gemsitabin: Yalnızca erken evre hastalığı olan hastalardan oluşmamakla birlikte, gemsitabin artı dosetaksel, tamamen rezeke edilmiş, yüksek dereceli uterin LMS'si olan 25 hastayı içeren bir çalışmada değerlendirilmiştir (47). Evre I veya II hastalığı olan hastaların yüzde 59'u üç yılda (medyan, 39 ay) progresyonsuz kalmıştır. Ortalama 49 aylık takipte, iki yıllık progresyonsuz sağkalım oranı yüzde 45 ve tüm kohort için medyan progresyonsuz sağkalım 13 aydı. Kontrol kolunun olmaması ve tedavi edilen hasta sayısının azlığı göz önüne alındığında, bu bulguların önemi çok açık değildir.

Evre I uterin LMS'li 111 hastanın retrospektif bir çalışmasında gemsitabin ve dosetaksel tedavisi sağkalım avantajı ile ilişkili bulunmadı (50). Bu veriler kemoterapiden ziyade evre I, uterusla sınırlı LMS'li hastalar için sürveyans/gözlem yapılmasını desteklemektedir (51).

Dosetaksel ve gemsitabin ve ardından doksorubisin: Uterusla sınırlı, yüksek dereceli LMS'si olan 47 hastayı kaydeden prospektif, çok merkezli bir faz II

çalışmasında (52) tüm hastalara dört kür sabit doz oranlı gemitabin artı dosetaksel ve ardından dört kür doksorubisin verildi ve yaklaşık üç ayda bir görüntüleme yoluyla hastalık nüksü açısından değerlendirildi. Kayıtlı olanların yüzde 89'u, planlanan sekiz döngünün tamamını aldı. Nükse kadar geçen medyan süre 27 aydı ve üç yıllık progresyonsuz sağkalım oranı yüzde 57 idi. Bu rejimi gözlemle karşılaştıran randomize çalışma, nüks oranlarında veya hayatta kalma sonuçlarında iyileşme göstermedi.

Radyasyon tedavisi (RT): Erken evre LMS'li hastalarda adjuvan RT kullanımının sağkalım sonuçları üzerinde hiçbir etkisi yoktur. Bu, evre I ve II uterin sarkomları olan hastaları kaydeden ve onları postoperatif RT veya gözlem ile tedaviye rastgele atanan bir randomize çalışmada gösterilmiştir (49).

İlerlemiş hastalık

İntraabdominal hastalık tutulumu (evre III) veya uzak metastazları (evre IV) olan ve tam rezeke edilmiş hastalarda, tek başına cerrahiye takiben hastalıkta ilerleme riski yüksektir. Bu nedenle, tedavinin sağkalımı iyileştirip iyileştirmediği belirlenmemiş olsa da, gözlem yerine rezeksiyon sonrası kemoterapi önerilebilir. Bu nedenle, sürveyans aynı zamanda kemoterapiye makul bir alternatiftir.

Dosetaksel ve gemitabin: Uterin LMS için tam bir sitoreduksiyonu takiben kemoterapiyi değerlendiren yalnızca bir prospektif çalışma vardır. Evre I ila IV LMS'li 25 hasta, bir çalışmada dosetaksel ve gemitabin almıştır (47).

Kombine modalite tedavisi: İlerlemiş LMS'li hastalar için kombine modalite tedavisinin (örn. pelvik radyasyon artı kemoterapi) uygulanması araştırma aşamasındadır. Bir çalışma, uterin sarkomlu 81 hastayı (53'ü LMS'li) rastgele olarak, ifosfamid, sisplatin ve doksorubisin kullanan kombinasyon kemoterapisi olan veya olmayan pelvik RT tedavisine atadı (53). Pelvik RT ile karşılaştırıldığında, ifosfamid, sisplatin ve doksorubisin eklenmesi (daha düşük nüks insidansı, üç yılda daha yüksek progresyonsuz sağkalım ve genel sağkalımda iyileşme) istatistiksel olmayan anlamlı eğilimlerle ilişkilendirildi.

İfosfamid, sisplatin ve doksorubisin ile tedavi; nötropeni (%84), ateşli nötropeni (%22) ve mide bulantısı ve kusma (%24) dahil olmak üzere ciddi (derece 3/4) toksisite ile ilişkilendirilmiştir.

Tedavi Sonrası Gözetim

LMS, tanı anında uterusla sınırlı olsa bile, yüksek relaps riski olan agresif bir tümördür (2). Bu nedenle, her üç ila dört ayda bir fizik muayene ve iki ila üç yıl boyunca üç ila dört ayda bir toraks, batın ve pelvik görüntüleme, sonraki iki yıl boyunca her 6 ila 12 ayda bir takip yapılmalıdır. Takip görüntülemesinin optimal sıklığını veya süresini tanımlayan hiçbir veri yoktur. Sürveyansın uterin LMS'li hastalar için sağkalım sonuçlarını iyileştirdiğine dair hiçbir veri olmamasına rağmen, bu tavsiyeler Ulusal Kapsamlı Kansere Ağı'nın sürveyans kılavuzlarıyla uyumludur (54).

Prognoz

LMS'li hastaların evresi ne olursa olsun prognozu kötüdür (41,55). LMS'li 1396 hastanın (yüzde 71'i evre I/II hastalığı olan) dahil edildiği geniş bir çalışmada, beş yıllık hastalığa özgü sağkalım yüzde 66 idi (41). Evreye göre sınıflandırıldığında, evre I, II, III ve IV hastalık için beş yıllık hastalığa özgü genel sağkalım sırasıyla yüzde 76, 60, 45 ve 29'du.

Derecenin prognostik önemine rağmen, LMS için evrensel olarak kabul edilen tek bir derecelendirme sistemi yoktur.

LMS için tanı kriterlerini karşılamayan düşük dereceli LMS ve düz kas neoplazmaları (örneğin, kötü huylu potansiyeli belirsiz düz kas tümörleri) muhtemelen daha olumlu bir hastalık seyrine sahiptir.

Uterin düz kas tümörlerinin sınıflandırılması ve derecelendirilmesi zor olabilir, bu nedenle uzmanlaşmış patoloji incelemesi önerilir.

Ne Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu (FIGO) ne de Amerikan Kanser Ortak Komitesi (AJCC) evrelemesi, uterin LMS'de genel sağkalım için prognostik bilgi sağlama açısından iyi performans göstermez (45).

Anahtar değişkenler olarak hasta yaşını, tümör boyutunu, derecesini, lokal yayılımını, uzak metastazları ve mitotik hızı içeren bir nomogram (www.mskcc.org/nomograms/uterine/post_op) geliştirilmiştir. Bu nomogram, beş yıllık sağkalımı öngörme açısından FIGO ve AJCC evrelemesinden daha iyi performans gösterir (55,56).

Özel Gruplar

Premenopozal hastalar

LMS'li premenopozal hastalar doğurganlığın korunması için overlerini korumak isteyebilirler. Ek olarak, bu hastalarda oofektomi, yaşam kalitesini etkileyebilecek erken menopoz ile sonuçlanacaktır.

Uzmanların çoğu, standart cerrahi tedavinin bir parçası olarak bilateral salpingo-oofektomi (BSO) uygular. Bununla birlikte, BSO'nun LMS hayatta kalması üzerindeki etkisine ilişkin veriler sınırlıdır.

Uterin LMS'nin en az yüzde 40'ı östrojen ve/veya progesteron reseptörlerini eksprese eder (57-59). Bununla birlikte, 50 yaş altında olan ve tanı sırasında evre I veya II hastalığı olan 341 hastayla yapılan bir çalışmada, BSO uygulanan ve uygulanmayanlarda beş yıllık hastaliksız sağkalım açısından fark yoktu (41). Bu çalışma, daha önce her iki override alınmış hasta sayısı bildirilmediğinden sınırlıydı. Yukarıda bahsedildiği gibi, uterusla sınırlı LMS'li 1076 hastada BSO'nun etkisini değerlendiren daha geniş bir Ulusal Kanser Veri Tabanı çalışması da, BSO uygulanan hastalarda uygulanmayanlara kıyasla genel sağkalım açısından bir fark olmadığını bildirmiştir (36).

BSO'nun LMS'de hayatta kalma üzerindeki etkisini ele alan randomize deneme verilerinin yokluğunda, BSO ile ilgili öneriler bireyselleştirilmelidir.

Bazıları, Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu evre I LMS'si östrojen ve/veya progesteron reseptörü pozitif olan hastalar için makul bir şekilde BSO önerebilir. Ancak, böyle bir yaklaşımın sonuçları iyileştireceğine dair herhangi bir rapor bulunmamaktadır. Östrojen reseptörü ve/veya progesteron reseptörü ekspresyonu ile BSO gerçekleştirme korelasyonu şu anda spekülatiftir.

Tıbbi olarak ameliyat edilemeyen hastalar

Komorbidite veya düşük performans durumu nedeniyle cerrahi rezeksiyon için aday olamayan hastalara yaklaşım bireyselleştirilmelidir.

Evresi ne olursa olsun LMS'li hastalar için kötü prognoz göz önüne alındığında, cerrahi olmayan tedavi, iyileştirici değil palyatiftir. Bu nedenle, tıbbi tedavinin toksisitelerine karşı yararlarının (örneğin, ağrı veya kanamanın kontrolü) dikkatli bir şekilde değerlendirilmesi gerekir.

Tıbbi olarak ameliyat edilemeyen hastalara tedavi yaklaşımı, metastatik hastalığı olan hastalarinkini yansıtır.

Metastaz

Lokal Nüks veya Oligometastatik Hastalık

Lokal nüksleri veya sınırlı metastatik hastalığı olan hastalarda cerrahi rezeksiyon sağkalım avantajı sağlayabilir ve uygun şekilde seçilmiş hastalara önerilmelidir. Ancak, bu yaklaşımı destekleyen veriler küçük serilerle sınırlıdır (60-62). Örneğin, pulmoner metastazları olan 31 hastadan oluşan bir seride, metastazların çıkarılması 70 aylık ortalama genel sağkalım ile sonuçlandı. Bu yaklaşım için en iyi adaylar, uzun bir progresyonsuz dönemden (en az 12 ila 18 ay) sonra nüks edenler ve tam rezeksiyona uygun izole bir nüks bölgesi olanlardır.

Cerrahi aday olmayan hastalarda, lokal olarak tekrarlayan hastalık için radyasyon tedavisi alternatif bir tedavi seçeneğidir. Uterus sarkomlarındaki uygulaması, endometrial adenokarsinomlardaki yaklaşıma benzer.

Lokalize metastatik hastalığa başka bir yaklaşım radyofrekans ablasyonudur (RFA). Hiçbir randomize çalışma yapılmamasına rağmen, RFA küçük (genellikle 4 cm'nin altında) ve erişilebilir (genellikle büyük kan damarlarının yakınında olmayan) bireysel lezyonları başarılı bir şekilde tedavi edebilir (63). RFA için uygun adaylar, ablasyon için erişilebilir olan ve uzun bir hastaliksız dönemden sonra nüks eden tek bölge hastalığıdır.

Tam cerrahi sitoreduksiyon sırasında hipertermik intraperitoneal kemoterapi (HİPEK), intraperitoneal metastazlı çoklu malignitelerin tedavisinde dikkat çekmiştir. Tekrarlayan uterin sarkomlu 26 hastadan oluşan küçük, retrospektif bir seri (22'si LMS'li), cerrahi ve HİPEK uygulanan hastalar ile HİPEK yapılmayan ancak cerrahi uygulanan hastalar arasında progresyonsuz sağkalım veya genel sağkalımda istatistiksel olarak anlamlı farklar bulmadı (64). Yazarlar, HİPEK'in bir yararı olabileceğini öne sürselerde şu an için bu bir spekülasyondur. LMS'li olan hastalarda HİPEK'in klinik araştırma dışında kullanılması şu anda önerilemez.

Metastatik Hastalık

LMS en yaygın olarak akciğerlere, karaciğere, batına ve pelvise metastaz yapar (65). Kemik ve beyin metastazları daha az yaygın tutulum bölgeleridir.

Tam cerrahi rezeksiyona uygun olmayan metastatik hastalığı olan hastalarda palyatif amaçlı tedavi verilir. Kemoterapi, iyi bir performans durumunu koruyan ve organ fonksiyonları sitotoksik kemoterapi kullanımına izin veren metastatik LMS'li hastalar için makul bir seçenektir. Diğer hastalar için ise palyatif bakım önerilir.

Üzerinde geniş ölçüde anlaşmaya varılmış bir ajan veya rejim olmamasına rağmen, rezeke edilemeyen, tekrarlayan hastalığı olan hastalarda kullanımını desteklemek için yeterli kemoterapi aktivitesi vardır (66).

Birinci veya ikinci basamak tedavi olarak prospektif klinik yumuşak doku sarkomu için randomize bir çalışmada gösterilen yüksek objektif yanıt oranları ve gemsitabin-dosetaksel kombinasyonunun tek başına gemsitabine göre üstünlüğü

nedeniyle, mevcut seçenekler arasında sabit doz oranlı gemsitabin artı dozetaksel'i tercih edilmelidir (67).

Doksozubisin de makul bir ilk seçenektir. Birinci basamak tedaviden sonra ilerleme gösteren hastalar için ileri tedavi hastanın tercihine, organ işlevine ve performans durumuna bağlıdır.

Genel olarak, nükseden uterus sarkomunun tedavisi diğer bölgelerde ortaya çıkan metastatik yumuşak doku sarkomlarının tedavisine benzer, ancak bazı veriler uterus LMS'nin bazı kemoterapi rejimlerine diğer LMS olmayan histoloji yumuşak doku sarkomlarından daha duyarlı olabileceğini düşündürmektedir (34,54).

Doksozubisin artı trabektedin ve ardından trabektedin rejimi, LMS'li hastalar için uygun birinci basamak tedavi olabilir. Zinde, mükemmel organ işlevine sahip, klinik olarak önemli toksisiteler için yüksek riski muhtemelen sürdürebilen ve klinik olarak hızlı objektif yanıtın gerekli olduğu ve/veya objektif yanıtın müteakip tam bir brüt rezeksiyonu mümkün kılma olasılığı yüksek olduğu kişilerde uygulanabilir (68).

Endokrin tedavisi olarak aromataz inhibitörleri (anastrozol veya letrozol), östrojen veya progesteron reseptörü pozitif LMS'si olan ve hastalık yükünün düşük ve hızının yavaş olduğu bazı hastalar için hormon blokajı amacıyla makul olabilir (69).

NETRİN AİLESİ

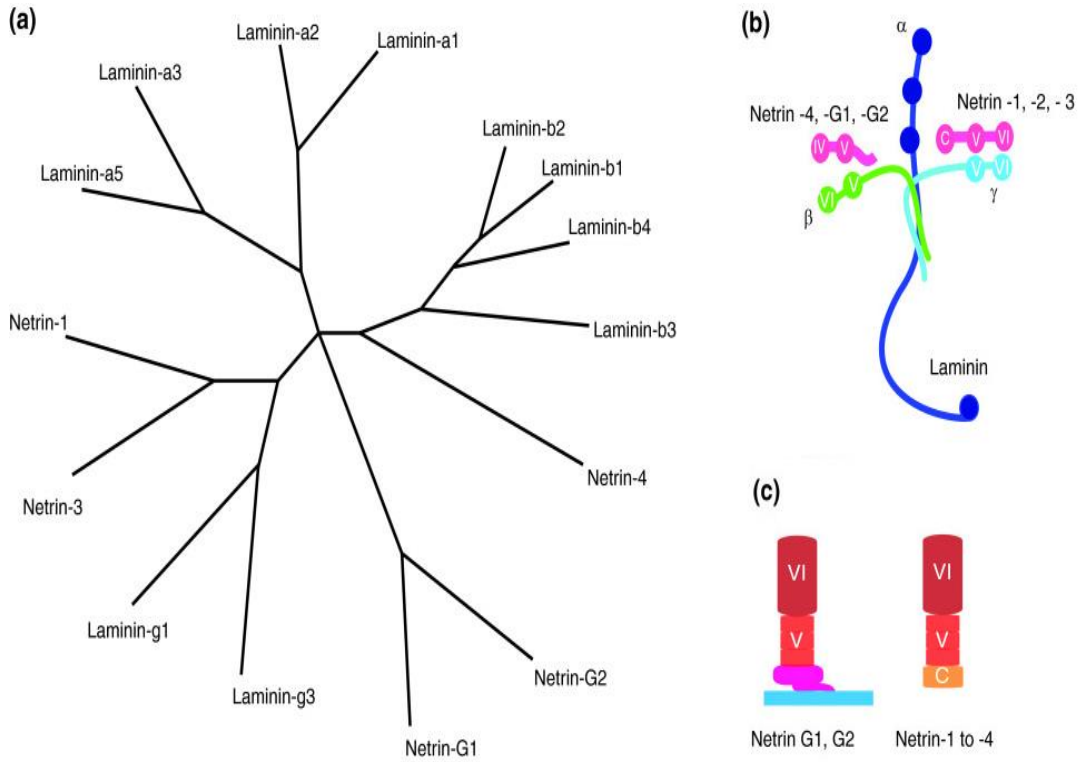
Netrinler, glikoprotein yapıda büyük ölçüde korunmuş kılavuz moleküllerinin küçük bir üyesidir. Embriyogenez sürecinde hücre ve akson göçünü manipüle eden ekstrasellüler proteinlerdendir. Netrinler, ilk defa 1990 senesinde bir nematod türü olan *Caenorhabditis elegans*'da keşfedilmiştir. Sanskritçe dilinde 'netr' kelimesinden köken almakta ve 'kılavuzluk eden, öncülük yapan' manasına gelmektedir (70).

İlk tespit edilen ve nöronal büyümeyi düzenlediği rapor edilen netrin proteini, *C. elegans* standart isimlendirme protokolüne UNC-6 olarak adlandırılmıştır (70). UNC-6'nın memelilerdeki ilk homoloğu 1994 yılında tespit edilmiş. Bu molekülün kemirgenlerin omuriliğindeki kommissural akson için yaşamsal bir klavuz olduğu bildirilmiştir (71). 2009 senesi itibariyle, memelilerde netrin gen ailesinin 5 üyesi daha bulunmuştur: Netrin-1, Netrin-3, Netrin-G1, Netrin-G2 ve Netrin-4 (β -netrin olarak da isimlendirilir). Netrin-1, Netrin-3 ile Netrin-4 membrandan salgılanırken, Netrin-G1 ve Netrin-G2 iki tane glikozilfosfatidilinositol ile membrana bağlı olarak bulunur. Netrin-G1 ve Netrin-G2'nin Netrin-1, Netrin-3 ve Netrin-4'ten bağımsız olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir (Şekil 1-a).

Netrin-G'lerin orthologları sadece omurgalı türlerde bulunmuştur. Şu zamana kadar omurgasızlarda keşfedilen tüm Netrin proteinleri (*C. elegans* UNC-6 da dahil olmak üzere) membranlardan salgılanan tiptedir. Sekrete edilen netrinler kimi hücreler için çekici, kimi hücreler için iticilik özelliği ile çift fonksiyon göstermektedir (70). Netrin proteini, ekstrasellüler matriks proteini laminin süper ailesinin bir üyesidir. Netrin-1 ve Netrin-3'ün amino terminal dizisinin üçte ikisi, laminin-1 γ zincirinde bulunan amino terminal dizisiyle büyük benzerlik gösterirken, Netrin-G1, Netrin-G2 ve Netrin-4'ün amino terminal dizisi laminin-1 β zincirinin amino terminal dizisi ile yüksek benzerlik göstermektedir (Şekil 1-b) (70,72,73).

Bu protein ailesinin çeşitli farklı işlevleri ve etki mekanizmaları, NTN1 genince kodlanan Netrin-1 çalışması ile daha iyi ortaya konulmuştur. Netrinler; yaklaşık 60-80 kDa ağırlığındadır. Netrinler yapısındaki üç esas bölge (V, VI ve C) bulunan protein ile amino terminal sinyal peptidi kodlarlar (Şekil 1-c) (70-72).

Konstrüktif olarak netrin, VI ve V nolu amino terminal domainleri ile laminine benzemektedir. Amino ucunda bulunan domain VI globüler şekildedir. Bunu, üç epidermal büyüme faktörü tekrarından oluşan domain V izler. Domain VI ve V, DCC ve UNC-5 ailesinin Netrin-1 reseptörüne bağlanır, ancak etkileşimin kesin moleküler detayları halen tespit edilememiştir. Netrinlerin karboksi terminal bölgesi (C domaini) ise bazik amino asitler yönünden zenginleştirilmiştir ve metalloproteinaz protein ailesinin doku inhibitörleriyle kısmi dizi benzerliği bulunmaktadır (74,75). Bu bazik aminoasit dizi, yüksek afiniteye sahip heparin ile bağlanır ve salgılanan netrinleri hücre yüzeyine vermeye veya heparin sülfat proteoglikanları ile etkileşimler sayesinde ekstrasellüler matrikste tutmaya katkıda bulunabilir (76).



Şekil 1: Netrin Protein Ailesi (70)

(a) Netrinler laminin süper ailesindedir. İnsan protein dizinlerine dayanan bir filogenetik ağaç, netrin ve laminin ailesi üyeleri arasındaki ilişkiyi gösterir. (b) Laminin-1 proteini, α (mavi), β (yeşil) ve γ (turkuaz) zincirlerinden oluşan bir heterotrimerdir. 1'den 3'e kadar olan netrinlerin amino terminal VI ve V domainleri (kırmızı), laminin-1'in γ zinciriyle homologdur. Netrin 4, G1 ve G2'deki bu domainler, laminin-1'in β zincirine daha fazla benzerlik göstermektedirler. (c) Netrin aile üyelerinin domain organizasyonu. Netrin 1-4, salgılanan proteinlerdir ve bir karboksi terminal C-domaini (C) içerirler, buna karşılık netrin G1 ve G2 plazma membranına bir glikozilfosfatidilinositol (GPI) bağlayıcısı (pembe) ile bağlanırlar.

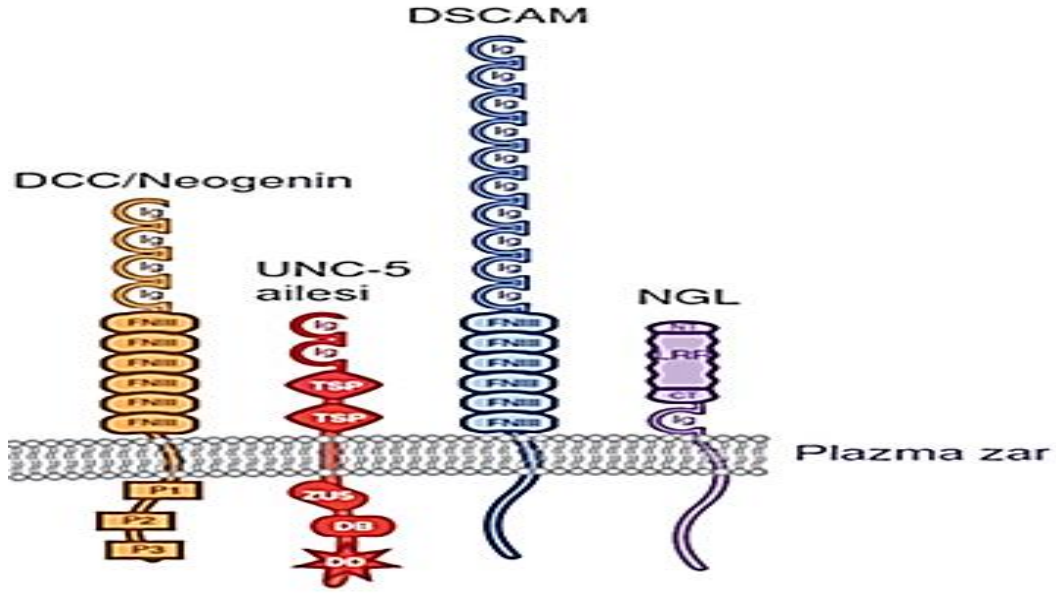
NETRİN RESEPTÖRLERİ VE SİNYAL İLETİMİ

Bu moleküller, kemotropik tepkileri ve yapışkan mekanizmaları aktivasyona geçirmek için bir dizi çeşitli reseptöre tutunurlar. Sinyal transdüksiyonu ve hücre adezyonu gibi süreçlerde görev alan bazı netrin reseptörleri, geniş bir protein grubunu kodlayan immünoglobulin süper ailesindedir. Netrin-1'in reseptörlerine bağlanması, aktin ve mikrotübül ağlarının yeniden düzenlenmesi sayesinde sitoskeletonun yapısını değiştirir (77,78).

Netrin-1 sinyal iletimini, UNC5A-D veya UNC5H1-4, integrin $\alpha3\beta1$ ve $\alpha6\beta3$, serebellin 4 (CBLN4), down sendromu hücre adhezyon molekülünü (DSCAM) içeren dört reseptör ve reseptör olup olmadığı net olarak bilinmeyen adenozin reseptörü (A2bR) aracılığıyla gerçekleştirir (Şekil 2) (79-87).

Tanımlanan ilk netrin almaçları, vertebralılarda DCC ve DCC ile yaklaşık %50 aminoasit dizi benzerliği olan neogenini de içeren DCC protein alt familyasına aittir. DCC, neogenin ve bunların ortologları, dört immünglobülin alanından ve altı fibronektin tip III (FNIII) tekrarlarından oluşan bir hücre dışı alana sahip transmembran proteinlerdir. DCC'deki dördüncü ve beşinci FNIII tekrarları, Netrin-1'i bağlamak için gereklidir (80).

Tek geçişli membranlar arası alanın ardından, sitoplazmik sinyal iletim moleküllerinin alımında önemli rollere sahip olduğu düşünülen P1, P2 ve P3 olarak adlandırılan üç yüksek düzeyde korunmuş hücre içi alanı vardır. Bu alanların her birinin spesifik fonksiyonel katkısı bilinmemektedir (81,88,89). Vertebralılar, *C. elegans*'daki UNC-5 reseptörüne homolog Unc5A, Unc5B, Unc5C ve Unc5D olmak üzere dört netrin reseptörü içermektedir. UNC-5 reseptörleri, hücre dışı alanda iki immünglobülin tekrarı ile iki trombospondin tip I modülü bulunan transmembran proteinlerdir. UNC-5 proteinlerinin intrasellüler alanı, fonksiyonu henüz belirlenemeyen ve Zona Occludens-1'in bir bölümüne olan homolojisinden ismini alan bir ZU-5 alanı ve apoptotik sinyal ile ilişkili bir ölüm alanı (death domain) içerir. Netrin bağlanması için UNC-5 proteinlerinin immünglobulin tekrarları gereklidir (90-93).



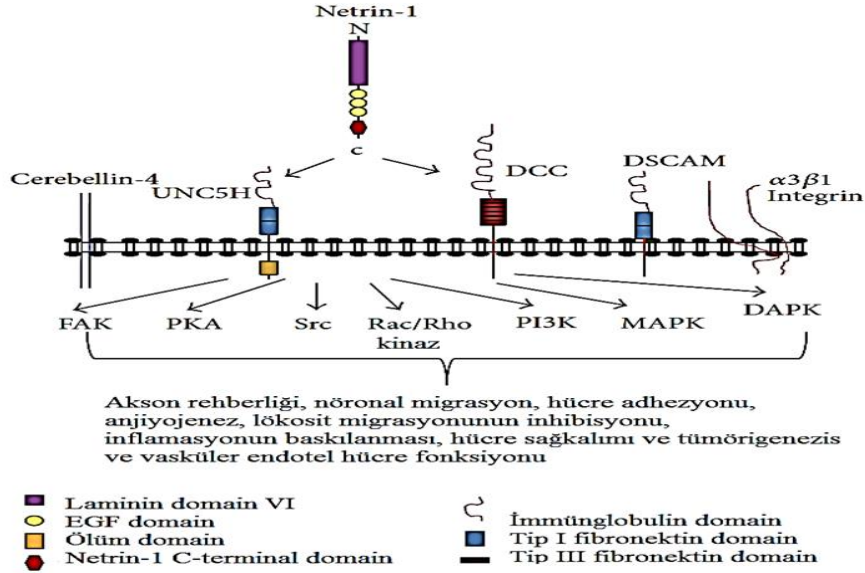
Şekil 2: Netrin reseptör ailesi (100)

Netrin reseptörleri, tek geçişli transmembran proteinleri ve Ig süper ailesinin üyeleridir. Bunlar arasında silinmiş kolorektal kanser (DCC), omurgalılarda bulunan DCC'ye paralog neogenin, UNC-5 homolog ailesinin üyeleri, down sendromu hücre adhezyon molekülü (DSCAM), ve Netrin-G ligandları (NGL) bulunur. CT, C-terminal sisteinden zengin başlık yapısı; DB, DCC bağlama domaini; DD, ölüm domaini; FNIII, fibronektin tip III domain; Ig, immünooglobülin domain; LRR, lösin açısından zengin tekrar; NT, N-terminal sisteinden zengin başlık yapısı; P1, P2 ve P3, DCC'nin sitoplazmik alanındaki korunmuş bölgeler; TSP, trombospondin tip 1 (TSP-1) domain; ZU5, zona occludens 1 ile homoloji gösteren zona occludens 5 (ZU-5) domain.

Down Sendromu hücre adezyon molekülü, hücre dışı alanlarında on immünooglobülin bölge ve altı FNIII tekrar içeren bir tip I transmembran reseptördür. Tanımlanmış herhangi bir ligandı bulunmadığı için uzun süredir yetim reseptörü olarak bilenen DSCAM'ın, yakın zamanda netrine bağımlı akson rehberliğine katkıda bulunan Netrin-1 için reseptör olarak işlev gördüğü gösterilmiştir. Netrin-1, DSCAM'ın immünooglobulin alanlarına bağlanır. DSCAM'ın Netrin-1 tarafından aktive edilen sinyal yolağı şu ana kadar tanımlanmamıştır (94,95).

Netrin aile üyelerinin akson rehberliği (Netrin-1 ve Netrin-3), doku morfogenez ve hücre-hücre yapışması (Netrin-1), sinaptojenez (Netrin-G'ler, UNC-6) ve anjiyojenez (Netrin-4) gibi farklı hücrel görevlerde rol aldığı bilinmektedir. Netrinlerin farklı işlevsel rolleri Netrin-1'in çalışmalarında en iyi şekilde karakterize edilmiştir (96-98). Netrin-1 sinyali karmaşıktır ve her durumda tercih edilen bir yolak değildir. Netrin-1'in DCC'ye bağlanması aksonal çekilmeye neden olurken, UNC-5 reseptör ailesine bağlanması aksonal itilmeye neden olur. Netrin-1'in DCC'ye ve

UNC5B'ye bağlanması, MAPK, PKC, SRC, PI3 kinaz, Rac ve Rho kinaz, fokal adezyon kinazı (FAK) ve diğerlerini içeren birçok sinyal yolunun aktivasyonunu indükler (Şekil 3) (99).



Şekil 3: Netrin-1 reseptör sinyali ve bilinen fonksiyonları (100)

Netrin1'in, uncoordinated-5 H (UNC5H1-4) silinmiş kolorektal kanser (DCC), down sendromlu hücre adhezyon molekülü (DSCAM), integrinler ($\alpha3\beta1$ ve $\alpha6\beta3$) ve serebellin-4'ü içeren birçok reseptörü bağladığı bilinmektedir. Netrin-1'in bu reseptörlere bağlanmasının, fokal adhezyon kinaz (FAK), protein kinaz A (PKA), src kinaz, Rac/Rho kinaz, fosfor inositol 3-fosfat aktive kinaz (PI3K) ve mitojen aktive edilmiş kinaz (MAPK) dahil olmak üzere birçok sinyal yolunu aktive ettiği bilinmektedir. Ölümle ilişkili protein kinaz (DAPK) aktivasyonu ise ligand bağlanmasının olmaması durumunda oluşur. Bu yolların aktivasyonu, şekilde listelenen hücresel fonksiyon değişiklikleri ile ilişkilendirilmiştir.

Netrin-1'in reseptörlerinden olan DCC ve UNC5B, bağımlı reseptörler olarak adlandırılır. Bu reseptörler ligand yokluğunda bile sinyal gönderirler. Ligand mevcut olduğunda bu reseptörler, hücresel proliferasyon, farklılaşma, göç veya hayatta kalmaya yol açan pozitif bir sinyal yolunu indüklerler. Ligandlarının yokluğunda, bu reseptörler "klasik" reseptörler gibi inaktif değildirler, ancak daha çok kaspaz bağımlı apoptotik hücre ölümünü tetikleyen "negatif sinyal" yolunu uyarırlar (101-103).

DCC'nin, yapısında klasik bir ölüm alanı bulunurken, UNC5B reseptöründe bulunmaz. Bununla birlikte, her iki reseptör de ligandları olan Netrin-1 yokluğunda apoptozisi indükleme yeteneğine sahiptir. Sekrete edilen netrin proteinlerinin aksine Netrin-G'ler, Netrin-G ligandları (NGL) olarak adlandırılan transmembran

proteinlerini bağlarken, DCC, neogenin veya UNC-5 proteinleri ile etkileşime girdiği görülmemiştir (101-103).

Yapılan çalışmalarla netrin proteinlerinin sinir sisteminde hücre ve akson göçünü direkt yönlendirdiği ve sinirsel gelişim sırasında akson arborizasyonu ve sinaps oluşumunu etkilediği bildirilmiştir. Elde edilen son bulgular, netrinlerin merkezi sinir sisteminde oligodendroglial paranodal kavşakların organizasyonunun sürdürülmesi de dahil olmak üzere hücre-hücre etkileşimlerini düzenlediğinin kanıtlarını ortaya koymaktadır. Ayrıca son çalışmalar, netrinle ilişkili değişikliklerin insanın sinir ağlarını ve nörodejeneratif hastalıkların ilerlemesini etkileyebileceğini göstermektedir (104).

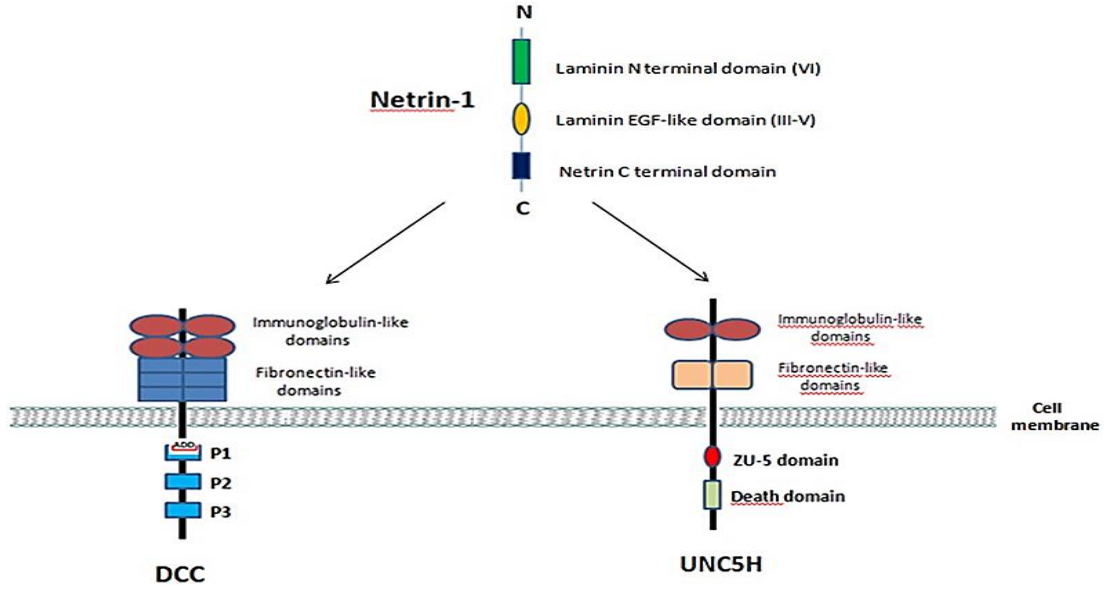
Sinir sistemi dışındaki bir takım dokularda da eksprese edilen netrin proteinleri ve bunların reseptörleri, hücre adezyonu ve doku morfogenezisini düzenleyerek gelişim sırasında anahtar rol oynarlar (79). Akson rehberliğinin yönlendirilmesine ek olarak, Netrin-1, nöron göçünün çift işlevli düzenleyicisi olarak da görev yapar (105). Santral sinir sistemindeki aksonal rehberlik görevine ek olarak, netrinin kanser regülasyonunda da rol oynadığı yeni çalışmalarla gösterilmiştir. Netrin-1 düzeylerinin tümörlerde upregüle olması kanser başlangıçlarında kullanılabilir bir biyobelirteç olabilme ihtimalini gündeme getirmiştir. Renal, karaciğer, prostat, menanjyom, hipofizer adenom, glioblastom ve meme kanserli hastaların kanlarında yüksek düzeyde netrin bulunmuştur (106-108). Ayrıca, Netrin-1'in, kardiyovasküler hastalıklar, böbrek hastalıkları ve diğer bazı hastalıklarda, sinir hücreleri haricindeki dokuların gelişim ve oluşumunda rol oynadığı da gösterilmiştir (93,109-112).

Netrin-1 ve Reseptörleri

Netrin-1, 640 amino asitlik laminin ile ilişkili bir proteindir. Netrin-1 embriyonik nöral tüpün ventral orta hattında, özelleşmiş sekretuar hücre grubunda ve santral sinir sisteminde myelizan hücrelerde ve oligodentrositlerden sentezlenir. Ayrıca memelilerde gelişmekte olan santral sinir sisteminin diğer bölgelerinden (vizüel sistem, olfaktör sistem, ön beyin ve serebellum) salgınır. Netrin-1 gelişim süresince bu beyin bölgelerinde akson migrasyonu ve hücre regülasyonunu sağlar. Netrin-1 enterik

sinir sistemi gelişiminde nöronal kılavuzluk yapan iyi karakterize edilmiş bir kemoatraktandır. Netrin-1 sadece merkezi sinir sisteminde ve omuriliğin ventral kısmında bulunan nöroepitelyal hücrelerde değil, aynı zamanda diğer nöronal olmayan organlarda da eksprese edilir (82,113,114). Netrin-1; somatik mezoderm, meme bezi, pankreas, dorsal aorta ve kalp kasında, yetişkinlerde ise spinal kord nöronlarında oligodentrositlerde ve overlerde yüksek oranda bulunmaktadır. Netrin-1 endotelial ve vasküler düz kas hücrelerinin morfogenezinde, tümör büyümesinde ve inflamasyonda regülatör olarak görev yapar. Sitoiskeletin reorganizasyonunda önemli rolleri bulunur. Netrin-1, NTN1 geni tarafından kodlanır ve geni 17p13-p12 bölgesinde bulunmaktadır (115).

DCC, DCC geni tarafından kodlanan 1447 amino asitli bir transmembran reseptörüdür. UNC5A, UNC5B, UNC5C ve UNC5D reseptörleri ise UNC5A, UNC5B, UNC5C ve UNC5D genleri tarafından kodlanan transmembran proteinlerdir. Bu reseptörler “DR” olarak adlandırılır. DR'lerin en önemli özelliği, iki ayrı sinyal yolunu başlatabilmeleridir. Ligandın varlığında hücre yaşamını, göçünü ve farklılaşmasını aktive ederler, ligandın yokluğunda ise inaktif kalmazlar ve apoptozu indüklerler. Bu nedenle, bu reseptörleri içeren hücreler, hücre dışı ortamda hayatta kalabilmek için ligandın varlığına bağlıdır. Bu nedenle, Netrin-1 sadece kemotropik bir faktör olarak hareket etmez, aynı zamanda hücrelerin hayatta kalmasını da sağlar (106, 116-118). Netrin-1, DCC ve UNC5H'nin şematik gösterimi Şekil 4'te gösterilmektedir.



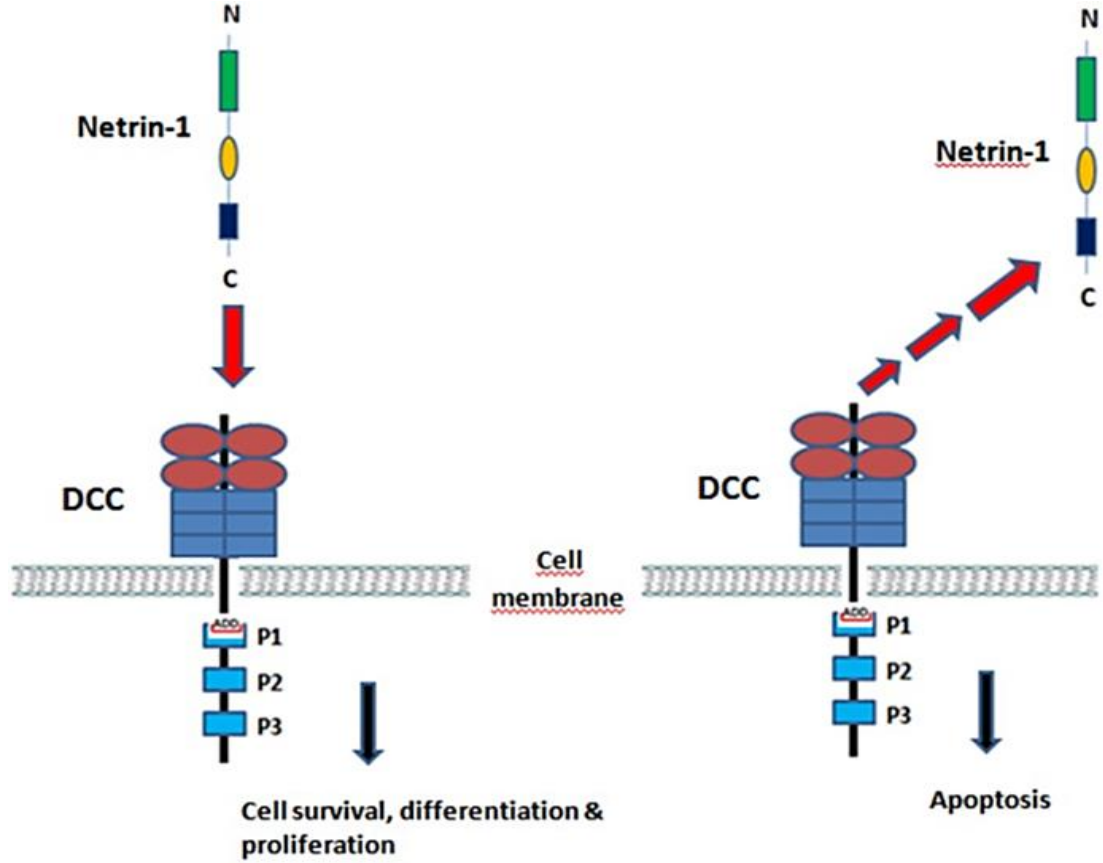
Şekil 4: Netrin-1 ve Netrin-1 Bağımlılık Reseptörlerinin Yapısı (17)

DCC ve UNC5H. DCC, dört immüoglobulin benzeri alan, altında fibronektin tip III bölgesi, ardından tek bir transmembranı kapsayan bölge ve üç korunmuş alandan, yani P1, P2 ve P3'ten oluşan bir sitoplazmik bölgeden oluşan hücre dışı bir alana sahip bir tip I transmembran proteindir. . Bağımlılık bağımlılık alanı (ADD) adı verilen hücre içi alanda özel bir bölge vardır. UNC5H reseptörleri, iki hücre dışı immüoglobulin benzeri alan ve iki trombospondin tip I alan, bir transmembran bölge ve bir ZU-5 alanı ve bir ölüm alanı içeren hücre içi alanlar içerir. Netrin-1 bir ligand görevi görür ve laminin ile ilgili üç epidermal büyüme faktörü alanına, bir laminin N-terminal alanına ve pozitif yüklü bir karboksi (C)-terminal alanına sahiptir.

Apoptoz ve Netrin-1 Reseptörleri

Apoptoz, kaspazlar adı verilen bir dizi proteolitik enzim tarafından organize edilen programlanmış bir hücre ölümü şeklidir. Apoptoz, hücreler stresi algıladığında ve içeriği mitokondriden saldıığında intrinsek yolla veya hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine bağlanan ligandlar tarafından ekstrinsik yolla başlatılabilir. Bu reseptörlerin çoğu, tümör nekroz faktörü reseptörü süper ailesinin (TNFRSF) üyeleridir. Hücre dışı uyarıcılar, tümör nekroz faktörü (TNF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), radyasyon ve ilaçlar olabilir. Hücre yüzeyindeki reseptörler bu sinyalleri algılar ve hücre zarından hücreye geçer. Kaspazların ardışık aktivasyonu meydana gelir ve bu hücre apoptozunda merkezi bir rol oynar. Kaspazlar, aktif enzimi oluşturmak için proteolitik işleminden geçen inaktif proenzimler olarak bulunur. Kaspaz proteolitik aktivitesi, komşu makrofajlar tarafından fagosite edilen ve ölümlü sonuçlanan apoptotik cisimlerin üretimiyle sonuçlanır (119,120).

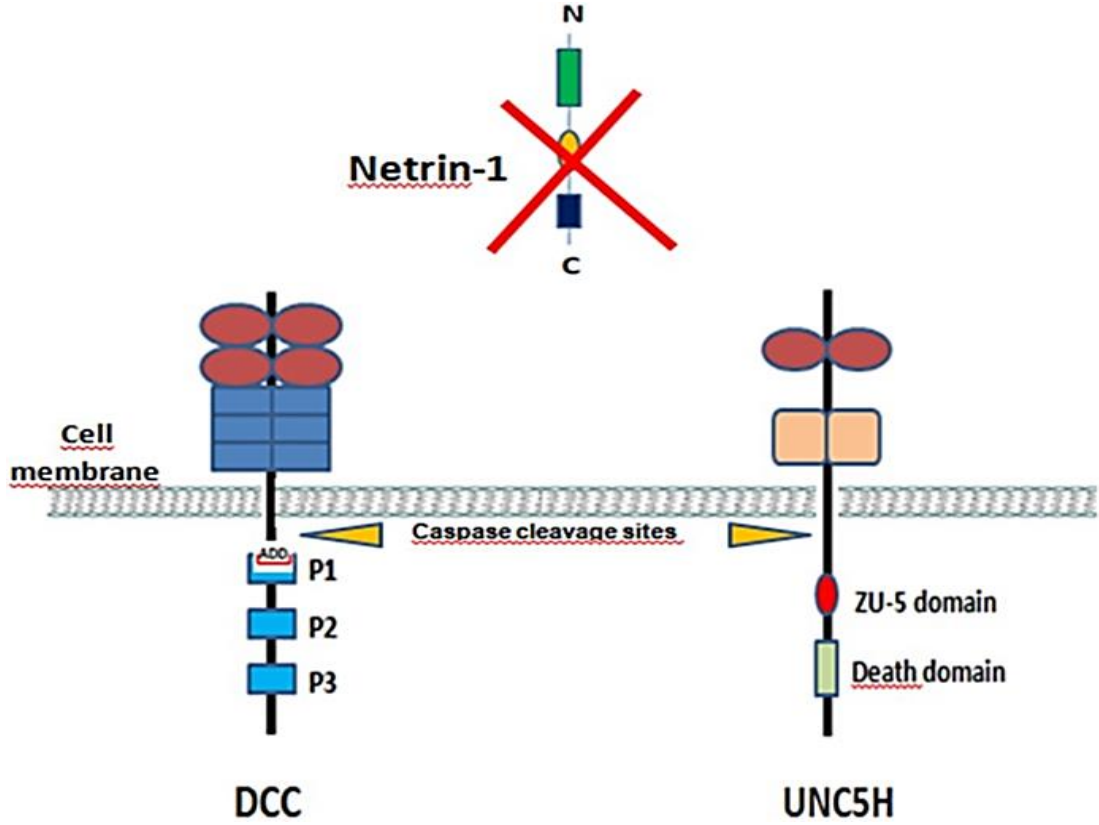
DCC ve UNC5H ailesi reseptörleri, DR'lerdir. DR'ler ligandlardan ayrıldıklarında apoptozu indükleyerek sağkalımı artırırken, ligandlarına bağlandıklarında apoptozu inhibe ederler (106,116) (Şekil 5).



Şekil 5: Netrin-1 ve reseptörü DCC'nin Apoptozla İlişkisi (17)

Bağımlılık reseptörleri, ligandlarına bağlandığında aktif değildir ve ligand olmadığında bir ölüm sinyali indükler. Burada, Netrin-1 reseptörü DCC'ye bağlandığında, DCC hayatta kalmaya yol açan pozitif bir sinyal iletir. Netrin-1 olmadığında DCC, programlanmış hücre ölümü için bir sinyali yükseltir.

ADD adı verilen DCC reseptörünün hücre içi bölgesinde özel bir alan vardır. Bu bölgenin silinmesi, DCC'nin proapoptotik özelliğini ortadan kaldırmak için yeterlidir. Netrin-1'in yokluğunda bu bölgenin Kaspaz-3 tarafından parçalanması diğer kaspazları uyarır ve apoptozu kolaylaştırır. UNC5H ayrıca Kaspaz-3 benzeri DCC tarafından bölünür ve UNC5H'nin ayrılan bölgesi apoptozu indükler (Şekil 6) (81,118,121).



Şekil 6: DCC ve UNC5H aracılı apoptoz mekanizması (81,118,121)

Netrin-1 olmadığında, hem DCC hem de UNC5H hücre içi alanlarındaki aktif kaspaz tarafından bölünür. DCC'nin hücre içi alanında, bağımlılık alanındaki bağımlılık alanı (ADD) adı verilen özel bir alan vardır. Bölünme, ADD'nin salınmasına neden olur. DCC-ADD, Kaspaz-9'un aktifleşmesine yol açar ve kaspaz-3'ün bölünmesine izin vererek Kaspaz-3'e bağlı hücre ölümüne yol açar. UNC5H ise kaspaz bölünmesi, ölüm sinyaline yol açan ZU-5'i ve ölüm alanını içeren tüm hücre içi alanın salınmasına neden olur.

Netrin-1'e bağlı anti-apoptotik sinyalleme tam olarak anlaşılammıştır. Tahminen iki adımı içerebilir: Birincisi reseptörlerin hücre içi bölgesindeki kaspazla ilişkili bölünmenin bloke edilmesi ve ikincisi hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar (ERK1/2) ve AKT gibi antiapoptotik sinyal yollarının indüksiyonu (121-123).

Tümör Baskılayıcılar olarak DCC ve UNC5H

Netrin-1'in yokluğunda DCC ve UNC5H reseptörlerinin proapoptotik özellikleri, bunların tümör baskılayıcı genler olduğu fikrini doğurmuştur. Hedrick ve ark. (124) DCC'nin bir tümör süpresör gen olabileceğini, çünkü diğer birçok kanserde olduğu gibi kolorektal kanserlerin çoğunda silinmiş olduğunu bildirmiştir.

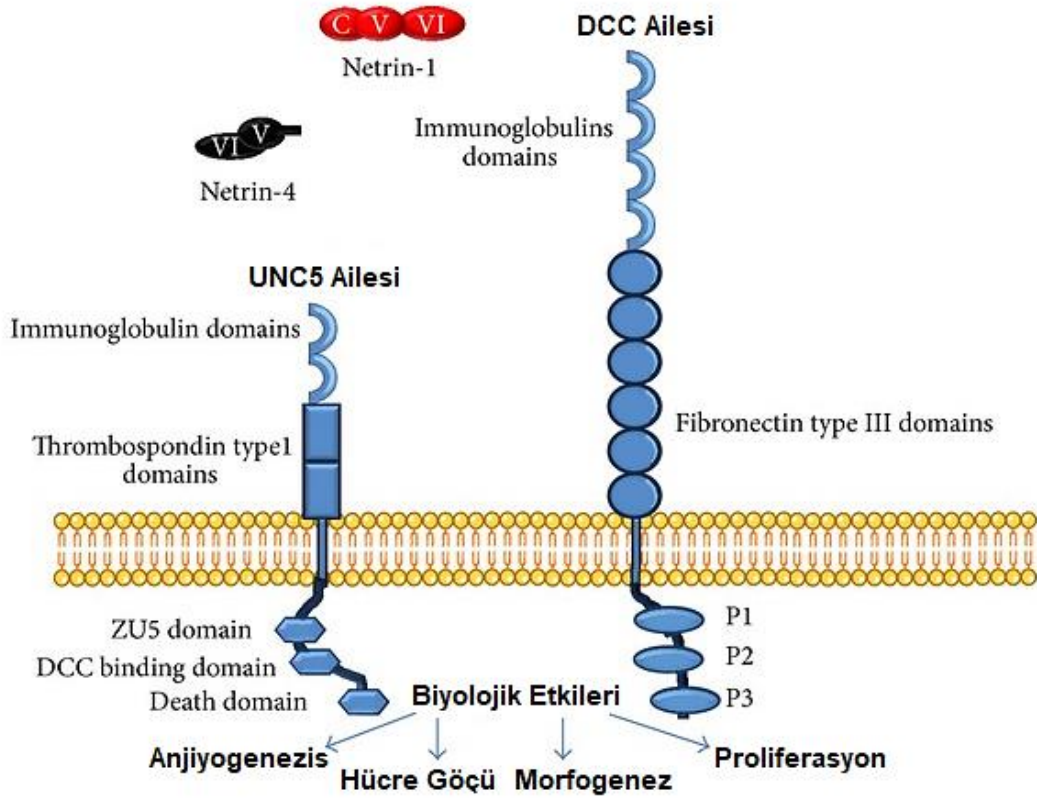
Daha yeni bulgular, DR'ler için bir tümör baskılayıcı rolü desteklemektedir (118). Buna karşılık, bu reseptörler, Netrin-1 varlığında onkojenik yolları uyarabilir veya apoptozu inhibe edebilir (118,125). İki çalışma, Netrin-1 varlığında DCC'nin küçük guanozin trifosfazları (GTPazlar), CDC42-RAC1 veya MAPK1/3 yolunu aktive ederek hem transfekte hücrelerde hem de komissural nöronlarda ve nöroblastoma hücrelerinde hücre transformasyonu ile sonuçlandığını bulmuştur (126,127).

Diğer çalışmalar, Netrin-1'in yokluğunda DCC'nin apoptozu indüklediğini, Netrin-1'in ise bu etkiyi bloke ettiğini doğrulamaktadır (128). Diğer birkaç çalışma, UNC5H'nin DR olarak rol oynadığını göstermiştir (116,129).

Ancak tam tersine, çoğu kanserde DCC ve UNC5H inaktiftir. Bu nedenle, bu reseptörlerin apoptotik özellikleri bu kanserlerde kaybolur ve bu reseptörlerin aşağı regülasyonu, tümör gelişimi için seçici bir avantajı temsil eder (118,130).

Netrin-4

Netrin-4 hücre dışı protein ailesi olan netrinlerin bir üyesidir. Diğer netrinlerden farklı olarak laminin zincirleri ile daha yakın ilişkili oldukları için bazal membran bileşeni olarak da tanımlanmaktadır. Netrin-4 merkezi sinir sisteminin gelişiminde nörit büyümesi ve göç oryantasyonunda görev alan bir proteindir. Embriyonik vasküler gelişimde proanjyogenik bir faktör olarak hareket eden Netrin-4, endotel hücrelerinin farklılaşmasını ve göçünü engelleyerek ve düz kas hücrelerinin farklılaşmasını ve göçünü uyararak antianjyogenik etki göstermektedir (13). Yapılan çalışmalarda pankreasta, lenfanjiyogenezde, anjyogenezde ve tümör büyümesinde epitelyal dallanma ve morfogenez düzenlenmesinde görev aldığı gösterilmiştir (Şekil 7) (131). VEGF ile uyarılan endotel hücrelerde spesifik olarak Netrin-4'ün hem in vitro hem de in vivo olarak aşırı ekspres edildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (132).



Şekil 7: Netrin-1, Netrin-4, UNC5 DCC Ailesi ve Biyolojik Etkileri (131)

Netrin-4, Netrin-1'in aksine sadece neogenine bağlanır. UNC5 ailesi reseptörlerine bağlanmaz. Yapılan bir çalışmada bloke edici antikorlar kullanılarak neogenine bağlanan Netrin-4'ün veya UNC5B'nin inhibe edilmesiyle, Netrin-4'ün endotel hücre göçü üzerindeki inhibitör etkinin ortadan kalktığı tespit edildi (132). Yapılan diğer çalışmalarda bu sonucu desteklemektedir. Bu gözlemler Netrin-4'ün neogenine bağlanma ve UNC5B'nin inhibe edilmesi yoluyla antianjiyogenik faktör rolü üstlendiğini düşündürmektedir (97,132).

Hipoksi ve patolojik vasküler gelişimi uyarıcı durumlarda netrin-4 anjiyogenezde antianjiyogenik olarak rol alır. Yapılan birkaç çalışma sonucunda netrin-4'ün VEGF ile uyarılan anjiyogenezde önemli ölçüde inhibe ettiği raporlanmıştır (11) (133). Başka bir çalışmada Netrin-4'ün endotel tabakada yoğun bir şekilde ifade edildiği, endotelial fonksiyonların, hemostazın korunmasında ve vasküler yapının düzenlenmesinde, endotelial inflamasyonun önlenmesinde önemli roller aldığı gösterilmiştir (134).

GEREÇ VE YÖNTEM

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ (BAP) BİRİMİ ONAYI

Bu proje ‘Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’ tarafından 03.02.2022 tarihli toplantıya istinaden 2022TIPF001 numaralı kararı ile tıpta uzmanlık tezi bilimsel araştırma projesi olarak desteklenmiştir.

DOKULARDA GEN EKSPRESYONUN GÖSTERİLMESİ

Hücre Kültürü Çalışmaları

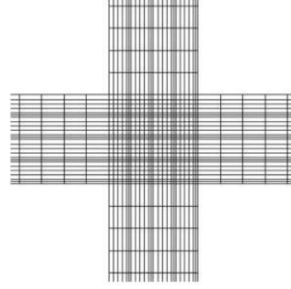
Çalışmamızda insan uterin leiomyosarkom hücre hattı ((HTB-114), (SK-UT-1), (American Tissue Culture Collection (ATCC®, Manassas, VA, USA) kullanılmıştır. İnsan uterus myometriyum dokusu için hücre hattı üzerinde çalışılması planlanmakta iken bütçe yetersizliği nedeniyle, Pamukkale Üniversitesi Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 13.09.2022 tarihli ve E-60116787-020-259010 sayılı karar nolu etik kurulu onayı alınarak, üreme çağındaki kadın hastadan normal uterin myometriyum dokusu alınmış ve çalışmada kullanılmıştır.

Hücrelerin büyümesi ve çoğalması için %10 Fetal Sığır Serum (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin karışımı içeren EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) besiyeri kullanılmıştır. Hücreler 75 cm²'lik kültür plakalarında 37°C'de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilmiştir. Hücreler yaklaşık olarak %90 yoğunluğa ulaşana kadar her 2-3 günde bir besiyeri değiştirilmiştir. Pasajlama işlemi sırasında; ortamdaki besiyeri uzaklaştırılmış ve ortam fostat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkanmıştır. Ardından, %0,25'lik Tripsin-EDTA yardımıyla hücreler kaldırılmış ve santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır.

Hücre Canlılığı ve Sayılması

Hücre canlılığının belirlenmesi ve sayılması amacıyla Tripan mavi boyası kullanılmıştır. Tripan mavi, negatif yüke sahip bir boyadır ve bütünlüğü bozulmamış canlı hücrelerin sayılmasına olanak sağlamaktadır. Boya, cansız hücrelerin membran

bütünlüğü olmadığı için içine nüfuz etmekte ve ışık mikroskobu altında sayım için görüntülenememektedir. Tripan mavi boyası ile 1 ml taze besiyerinde çözölen hücre süspansiyonu eşit hacimde (1:1) karıştırılarak sayım işlemi için Thoma lamına yüklenmiştir (Şekil 8).



Şekil 8: Thoma lamının mikroskop altındaki görüntüsü

Hücre canlılığı, aşağıdaki formüle göre belirlenmiştir.

$$\text{Toplam hücre sayısı} = \frac{\text{Sayılan hücre sayısı} \times 10^4 (\text{sabit değer}) \times \text{seyreltme faktörü}}{\text{Sayılan alan (aritmetik ortalama)}}$$

Myometrium Doku Örneğinin Eldesi

Örnek uterin normal myometrium dokusu, myometriyal patoloji içermeyen, myometriyal aktiviteyi etkilemesi muhtemel ilaç kullanımı olmayan ve üreme çağındaki kronik pelvik ağrı endikasyonu ile histerektomi yapılan kadın hastadan alınmıştır. Biyopside uterus korpus ön duvarından, endometrium içermeyecek şekilde tam kat, boy ve en ölçümleri 2x2 cm boyutunda olacak şekilde 2 farklı doku örneği alınmıştır.

Toplam RNA İzolasyonu

Toplam RNA izolasyonu Analytik Jena innuPREP RNA Kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kısaca, hücreler 100mm'lik kültür plakalarına ekilmiş ve %90 yoğunluğa ulaştığında ortamdaki besiyeri uzaklaştırılmış ve PBS ile yıkanmıştır. Doku örnekleri ise sıvı azot kullanılarak steril seramik havan yardımıyla homojenize edilmiştir. Ardından HTB-114 hücreleri ve myometriyum doku örneği lizis tamponu

yardımla parçalanmış ve izolasyon üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen toplam RNA örnekleri -80 °C’de saklanmıştır.

Toplam RNA’nın Spektrofotometrik Analizi

İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu ve kalitesi (OD 260/280) Epoch Take3 mikro RNA/DNA ölçüm aparatı (BioTek) kullanılarak mikropilaya okuyuculu spektrofotometre cihazında ölçülmüştür.

Toplam RNA’nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi

İzole edilen RNA’ların görüntülenmesi için yatay jel elektroforezi kullanılmıştır. %1’lik agaroz jel ile Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) tamponu hazırlanmıştır. Hazırlanan jel mikrodalga fırında kontrollü olarak ısıtılmış ve agarozun çözünmesi sağlanmıştır. Çözünmüş olan agaroz çözeltisi soğutularak 0,75 µL EtBr eklenmiştir ve elektroforez tablasına dökülerek jelin polimerleşmesi beklenmiştir. Jel katıldıktan sonra elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Kuyucuklara yüklenen DNA marker ve RNA’lar elektroforezin (-) kutbuna doğru yerleştirilerek, güç kaynağına bağlanmıştır. Elektroforez tankı 1x TAE tamponu ile jelin üstü kapanana kadar doldurulmuştur. Kuyucuklara yüklenen miktarlar Tablo 3’de belirtilmiştir

Tablo 3: Kuyucuklara Yüklenen RNA Örnekleri Ve Marker Konsantrasyonları

RNA için;		Marker için;	
5 µl RNA örneği	Yüklenen hacim: 8 µL	6 µl kb DNA ladder marker	Yüklenen hacim: 5 µL
2 µl boya (6x loading dye)		2 µl boya (6xloading dye)	
1µl enjeksiyonlu su		2 µl enjeksiyonlu su	

cDNA Sentezi

cDNA sentezi için A.B.T. cDNA sentez kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokol doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. cDNA sentez karışım protokolü ve yapılışı Tablo 4’de verilmiştir. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yapmak üzere sentezlenen cDNA’lar -20°C’de saklanmıştır.

Tablo 4: cDNA Sentez Karışımı ve Protokolü

<i>Bileşenler</i>	<i>Hacim</i>	<i>Son konsantrasyon</i>
Total RNA	10µl	2,5µg/ml
Oligo (dT) Primer	1µl	0.5 µM
dNTP Karışımı (her biri 2.5mM)	1µl	500µM
RNAaz içermeyen su	3.5µl	14.5µl
10X RT Tamponu	2µl	1X
Ribonükleaz İnhibitörü	0.5µl	20U/rxn
Reverse Transkriptaz Enzimi (200U/µl)	1µl	200U/rxn

Karışım cDNA sentezi için 25 °C'de 10 dakika ve 37 °C'de 120 dakika inkübe edildikten sonra reaksiyonu sonlandırmak amacıyla 85°C'de 5 dakika bekletilmiştir.

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Gerçek zamanlı PZR çalışmaları A.B.T. 2X qPCR SYBR-Green MasterMix (High Capacity) kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokol doğrultusunda StepOnePlus™ Real-Time PZR cihazında (Thermo Fisher) gerçekleştirilmiştir. Primer ve cDNA miktarları laboratuvarımızda optimize edilmiştir. PZR sonucunda elde edilen sonuçlar StepOne Software v2.3 programı kullanılarak hesaplanmış ve “housekeeping” GAPDH genine göre normalize edilmiştir. Her gen için ayrı ayrı amplifikasyon analizi ile standart kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve her primer için erime eğrisi analizleri yapılmıştır. Amplifikasyon sonucunda elde edilen Ct (threshold) değerleri kullanılarak dört genin uygulamalar sonucunda mRNA düzeyinde ekspresyon değişimleri belirlenmiştir. Genlerin primer dizileri Tablo 5’te verilmiştir.

Tablo 5: Çalışmada Kullanılan Genlerin Primer Dizileri

<i>Gen</i>	<i>Primer dizileri</i>
GAPDH	F: GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG R: ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA
NETRİN-1	F: ACTGCGATTCTACTGCAAGGC R: TTGTCCGCCTTCAGGATGTGGA
NETRİN-4	F: CAGAAGGACAGTATTGCCAGAGG R: GCAGAAGGTCCTGAGTTGGCA
UNC5B	F: GCTCGACTCTAAGAACTGCACAG R: TGAGGATTGCCACGACCACGAA

F: Forward, R: Reverse

İMMÜNOSİTOKİMYASAL BOYAMA

Human uterine leiomyosarkoma hücre hattı, (SK-UT-1), (American Tissue Culture Collection (ATCC®, Manassas, VA, USA) kriyotüplere %10 Fetal Bovin Serum (FBS), % 1 penisilin -streptomisin içeren 1 ml Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) eklenerek çözüldü. Çözülen hücreler santrifüj edildikten sonra 25'lik flasklara ekilip her gün takip edildi. Flaskların doluluk oranı %80-90 oranına gelince pasajlandı. Hücreler tripsinizasyon ile kaldırılıp santrifüj edildikten sonra tripan mavisini ile sayıldı. Her bir chamber slide'da 40.000 hücre olmak üzere 8 kuyucuklu chamber slide a hücreler ekildi. Ekilen hücrelerin yapışması için bir gün beklendi. Hücreler yapıştıktan sonra besiyerleri çekilerek -20°C' de metanolla 5 dakika fikse edildi. Sonra oda ısısında kurumaya bırakıldı. Kuruyan hücrelere ışıktan koruyarak H₂O₂ eklendi. 30 dakika bekletildikten sonra 3 kere Fosfat Buffer Saline (PBS) ile yıkandı. 10 dakika boyunca sekonder kit A solüsyonu uygulandı. Prosedürüne göre 1:200 oranında sulandırılan Netrin-1 ve Netrin-4 ve UNC5B primer antikoları uygulanıp 1 gece 4°C'de inkübe edildi. Üç kere PBS ile yıkandıktan sonra sekonder kit B solüsyonu 1 saat boyunca uygulandı. Tekrardan PBS ile yıkanan chamber slide 30 dakika boyunca sekonder kit C solüsyonuna maruz bırakıldı. 3,3 diaminobenzidine (DAB) ve karşıt boyama olarak hematoksilin ile boyanan chamber slide entellan ile kapatıldı.

İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi

İnsan myometriyum dokusu, Pamukkale Üniversitesi Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 13.09.2022 tarihli ve E-60116787-020-259010 sayılı karar nolu etik kurul onayıyla sağlıklı dokudan elde edilmiştir. Alınan doku parçaları %10'luk tamponlu formaldehit içerisinde 72 saat bekletildi. Rutin doku takibinin ardından parafin bloklardan mikrotom cihazıyla 5 µm'lik kesitler alındı ve kesitler su banyosuna aktarıldı. Kesitler, su banyosundan pozitif yüklü lamlara alınıp lam taşıma sepetine yerleştirildi. Netrin-1, Netrin-4 ve UNC5B ekspresyonunu belirlemek için immunohistokimyasal boyama protokolü uygulanmıştır.

Uygulanan protokol sırasıyla aşağıdaki gibidir:

- 1) Lam taşıma sepeti 1 gece etüvde bekletildi.
- 2) Ksilende 1 saat deparafinizasyon işlemi için bekletildi.
- 3) Kesitler sırasıyla %100, %90, %80, %70, %50 azalan etil alkol serilerinde 2'şer dakika bekletilerek rehidrasyon işlemi sağlandı.
- 4) Distile su ile 3 kez 5 dakika süreyle yıkandı.
- 5) Antijen retrieval işlemi ısıyla sağlandı. Hazırlanan sodyum sitrat buffer (1 L distile su, 2.94 gr tri-sodium citrate, 0,5 ml Tween 20, pH 6,0) içerisine alınarak mikrodalgaya konuldu. Kaynamaya başladıktan sonra 5 dakika beklendi ve çıkartılıp soğutuldu.
- 6) PAP pen ile dokuların etrafı yuvarlak şekilde çizildi.
- 7) Phosphate Buffered Saline (PBS) (PBS 10X, BioWhittaker, Lonza) ile 3 kez 5 dakika süreyle yıkandı.
- 8) Dokulardaki endojenperoksidaz aktivitesi, % 3'lük H₂O₂ (450 ml absolut metanol-IsoLab, 50 ml hidrojen peroksit solüsyonu-IsoLab) ile 10 dakikalık uygulama ile ortadan kaldırıldı.
- 9) PBS ile 3 kez 5 dakika süreyle yıkandı.
- 10) Sekonder kitin immün blok solüsyonu (Seytek Laboratories) pappen ile sınırlandırılmış doku üzerine damlatılıp bekletildi.
- 11) Primer antikorlar datasheette yazıldığı şekilde distile su ile dilüe edildi. Kesitlerin bulunduğu lamlar üzerine seçili primer antikorlar damlatılarak 1 gece karanlık ortam oluşturularak inkübasyona bırakıldı. Bu çalışmada kullanılan primer antikorlar; Netrin-1, Netrin-4 ve UNC5B'dir. Dilüsyon oranları 1/100 olarak belirlenmiştir.
- 12) Kesitler PBS ile 3 kez 5 dakika yıkandı.
- 13) Primer antikorlarla reaksiyon veren, biotinlenmiş afiniteye sahip sekonder antikor (Scy Tek Lab. Anti-Polyvalent Biotinylated Antibody) damlatılıp 40 dakika bekletildi.
- 14) PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı.
- 15) Biotinlenmiş sekonder antikorla kolayca bağlanabilen horse radish peroksidaz konjugatı streptavidin dokuların üzerine damlatılarak 40 dakika bekletildi.

- 16) Kesitler PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı.
- 17) Kromojen boyası için DAB (1 ml substrat, 2 damla kromojen) hazırlandı.
Lamların üzerinde bulunan kesitlere DAB (Thermo Scientific) damlatılıp 15 dakika karanlık ortamda bekletildi.
- 18) Distile su ile 3 kez 5'er dakika yıkandı.
- 19) Antijen lokalizasyonunun daha iyi gözlenmesi için hematoksilin (BesLab) ile 10 saniye muamele edilerek zıt boyama yapıldı.
- 20) Akan suda yıkandı.
- 21) Kesitler sırasıyla %50, %70, %80, %90, %96 ve %100'lük artan etil alkol serilerinde 2'şer dakika bekletildi.
- 22) KsilenI'de 2 dakika bekletildi.
- 23) KsilenII'de 2 dakika bekletildi.

Lamlara entellan damlatıldı ve hava kabarcığı bırakılmayacak şekilde lamellerle kapatıldı.

İmmünohistokimyasal Skorlama

İmmünohistokimyasal reaksiyonlar, ışık mikroskobu ile incelendi. Netrin-1, Netrin-4 ve UNC5B karşı immünoreaktivite, kahverengi rengin yoğunluğuna göre ayrı ayrı değerlendirildi. Seri olarak kesilmiş normal myometrium bölümlerinden alınan her histolojik örnekten 40X büyütmede tarandı. Netrin-1, Netrin-4 ve UNC5B ekspresyonu damar yapılarında, bağ dokuda ve myometrium hücre çekirdeği ve sitoplazmasında değerlendirildi. Örnekler boyama yoğunluğuna (boyanma yok = 0, zayıf boyama = 1, orta boyama = 2, güçlü boyama = 3) ve boyalı hücrelerin kapsamına (%0 = skor 0, %1-10 = skor 1, %11-50 = skor 2; > %51 = skor 3) göre değerlendirildi (135,136).

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

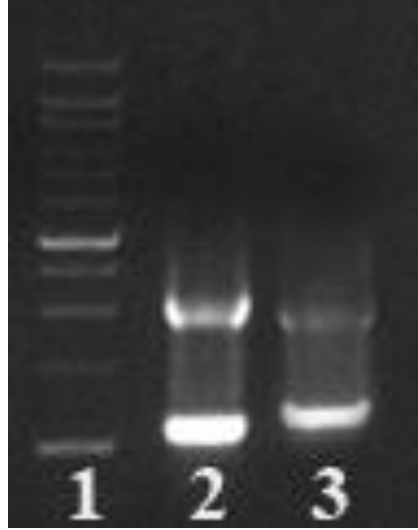
Tez çalışmasında elde edilen sonuçlar Ortalama \pm Standart Sapma (her bir veri için) olarak verilmiştir. Sonuçlar birbirinden bağımsız iki tekrarın ortalaması olarak sunulmuştur. Gruplar arasında fark olup olmadığı GraphPad Prism v.9 uygulaması yardımıyla Student's t test uygulanarak analiz edilmiştir.

BULGULAR

DOKULARDAKİ GEN EKSPRESYONUN SONUÇLARI

Toplam RNA'nın Görüntülenmesi

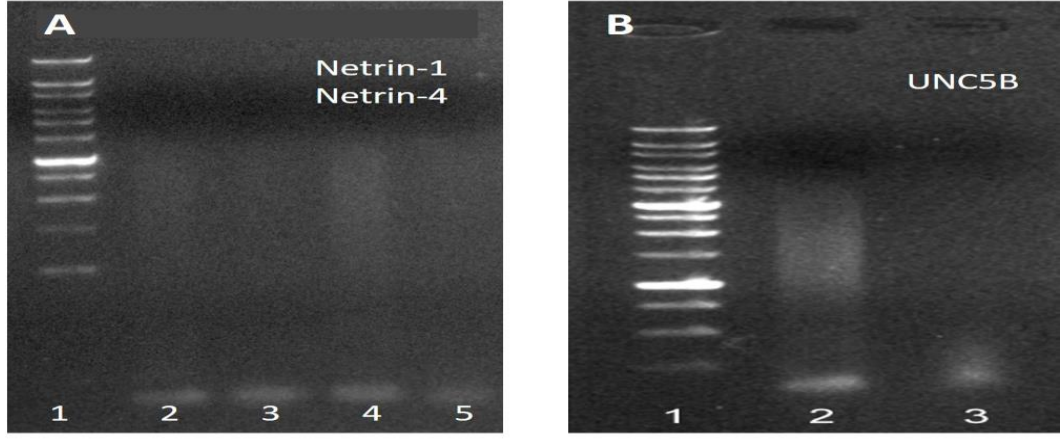
'Gereç ve Yöntem' kısmında verildiği gibi hazırlanan bileşenlerin yüklendiği jel, güç kaynağına bağlanmış ve 90 Volt, 500 mA'de 45 dakika boyunca yürütülmüştür. Yürütme işlemi sonunda jel, gelLite Jel Görüntüleme Cihazı (Clever Scientific) kullanılarak görüntülenmiştir. Sonuçlar her iki örnekte RNA'nın bozulmadan izole edildiğini göstermektedir (Şekil 9).



Şekil 9: HTB-114 leiomyosarkom hücre hattı ve normal uterin myometrium dokusundan elde edilen RNA'nın %1'lik agaroz jel elektroforezi. Soldan sağa (1) 1kb opti-DNA marker, (2) HTB-114 ve (3) doku örneğinden izole edilen RNA.

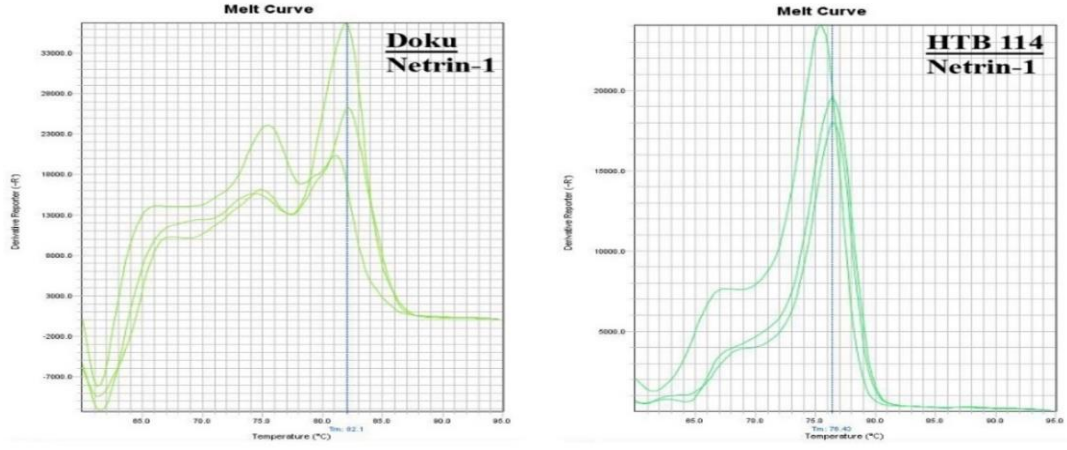
PZR ile mRNA Ekspresyonlarının Tayini

Gerçek zamanlı PZR çalışması ile Netrin-1, Netrin-4 ve UNC5B genlerinin HTB-114 hücre hattı ile normal myometriyal doku örneğindeki ekspresyonları araştırılmıştır (Şekil 10-13). Şekil 10'da verildiği gibi erime eğrisi analizi doğrultusunda Netrin-1, Netrin-4 ve UNC5B geninin tüm örneklerde eksprese olduğu gözlemlenmiştir.

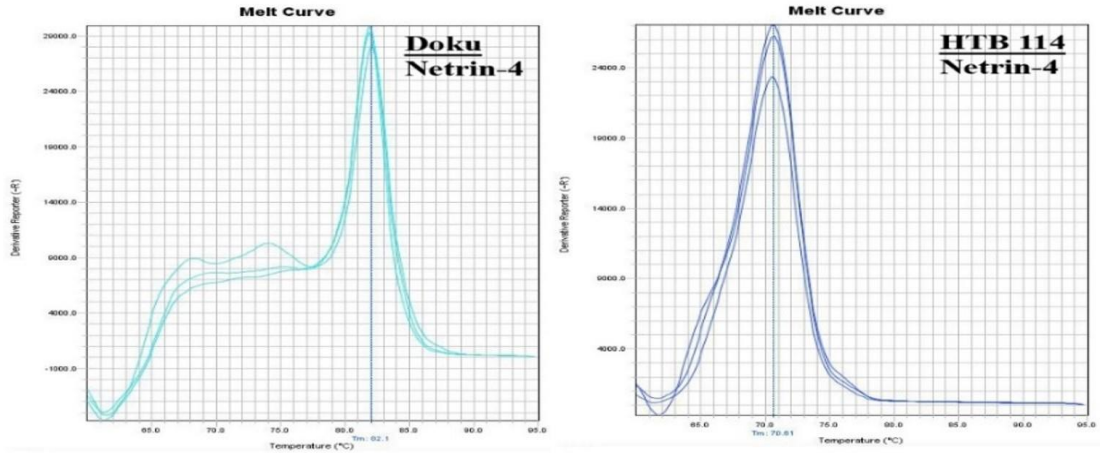


Şekil 10: PZR Ürünlerinden Elde Edilen Jel Görüntüleri.

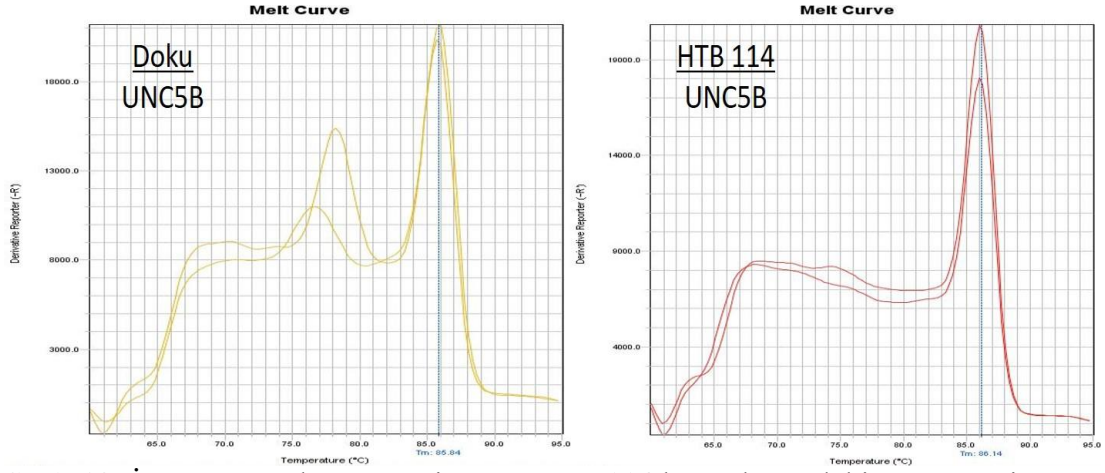
Şekil A: (1) 1kb opti-DNA marker, (2) Doku/Netrin-1, (3) HTB-114/Netrin-1, (4) Doku/Netrin-4, (5) HTB-114/Netrin-4. Şekil B: (1) 1kb opti-DNA marker, (2) HTB-114/UNC5B, (3) Doku/UNC5B.



Şekil 11: İnsan Normal Myometrium ve HTB-114 hücre hattındaki Netrin-1'in PZR Erime Eğrisi Analizi.

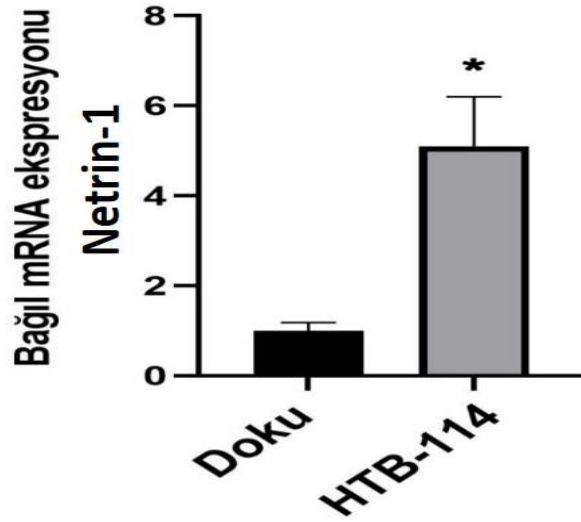


Şekil 12: İnsan Normal Myometrium ve HTB-114 hücre hattındaki Netrin-4'ün PZR Erime Eğrisi Analizi.

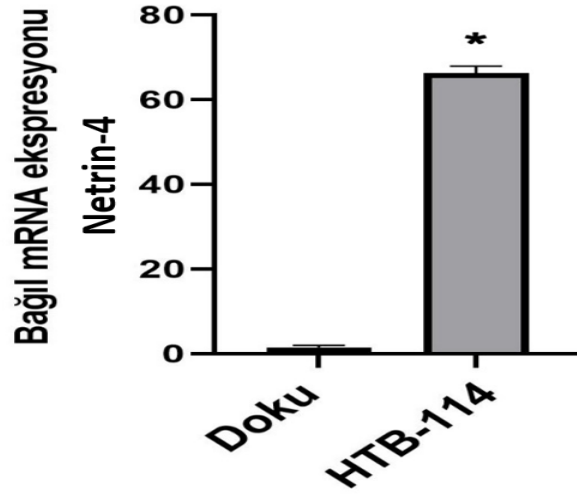


Şekil 13: İnsan Normal Myometrium ve HTB-114 hücre hattındaki UNC5B'nin PZR Erime Eğrisi Analizi.

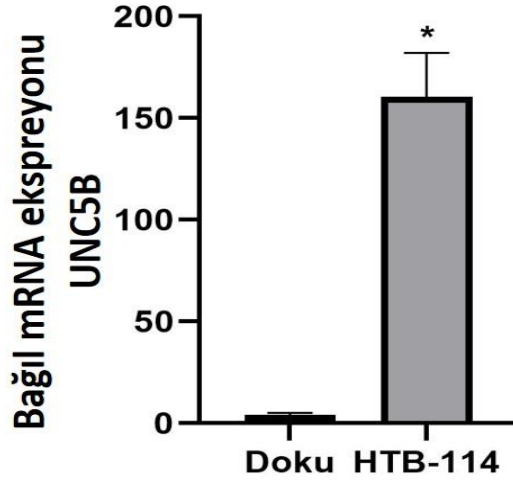
Gerçek Zamanlı PZR çalışması sonucunda Netrin-1, Netrin-4 ve UNC5B genlerinin HTB-114 hücre hattında, doku örneğine göre sırasıyla 4.92, 65.34 ve 160.33 kat daha fazla eksprese edildiği tespit edilmiştir.



Şekil 14: Gerçek Zamanlı PZR sonuçlarına göre Netrin-1 geninin HTB-114 ve doku örneğindeki bağıl mRNA ekspresyonu analizi.
*HTB-114'ten önemli derecede farklı (P <0.05, Student's t-test). Doku için p değeri: 0.0459



Şekil 15: Gerçek Zamanlı PZR sonuçlarına göre Netrin-4 geninin HTB-114 ve doku örneğindeki bağıl mRNA ekspresyonu analizi.
 *HTB-114'ten önemli derecede farklı ($P < 0.05$, Student's t-test). Doku için p değeri: 0.0153



Şekil 16: Gerçek Zamanlı PZR sonuçlarına göre UNC5B geninin HTB-114 ve doku örneğindeki bağıl mRNA ekspresyonu analizi.
 *HTB-114'ten önemli derecede farklı ($P < 0.05$, Student's t-test). Doku için p değeri: 0.0307

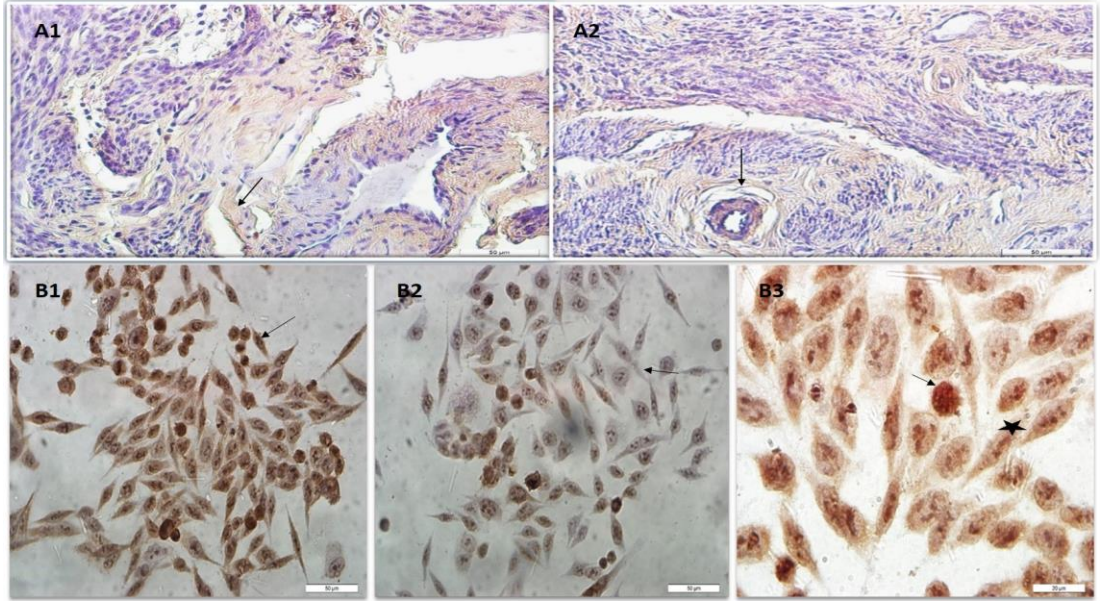
Sonuçlar doğrultusunda Netrin-1, Netrin-4 ve UNC5B genlerinin çalışmada yer alan tüm örneklerde eksprese edildiği ve özellikle HTB-114 hücre hattında kontrol myometriyum dokusuna göre bu genlerin daha fazla eksprese olduğu ortaya konulmuştur.

İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

Netrin-1

Cerrahi olarak alınan normal insan myometriyum dokusunun immünohistokimyasal incelemesinde Netrin-1 ekspresyonunun kas hücreleri arasındaki bağ dokusunda hafif düzeyde (Skor: 1) ve damar bağ dokusunda orta düzeyde (Skor: 2) boyanma olduğu saptandı. Myometriyum hücre çekirdeği ve sitoplazmasında boyanma saptanmadı (Skor: 0) (Şekil 17 A1-A2).

HTB-114 hücre hattının immünohistokimyasal incelemesinde Netrin-1 ekspresyonu yoğun olarak çekirdekte olmakla birlikte (Skor: 3), sitoplazma boyanması orta düzeyde (Skor: 2) olduğu saptandı. Bazı alanlarda hücrelerin sitoplazma boyanmasının olmadığı, fakat çekirdek boyanmasının her alanda olduğu görüldü (Şekil 17 B1-B2-B3).



Şekil 17: İnsan myometriyum dokusu ve HTB-114 hücre hattının immünohistokimyasal boyama incelemesi sonucunda Netrin-1 ekspresyon görüntüleri.

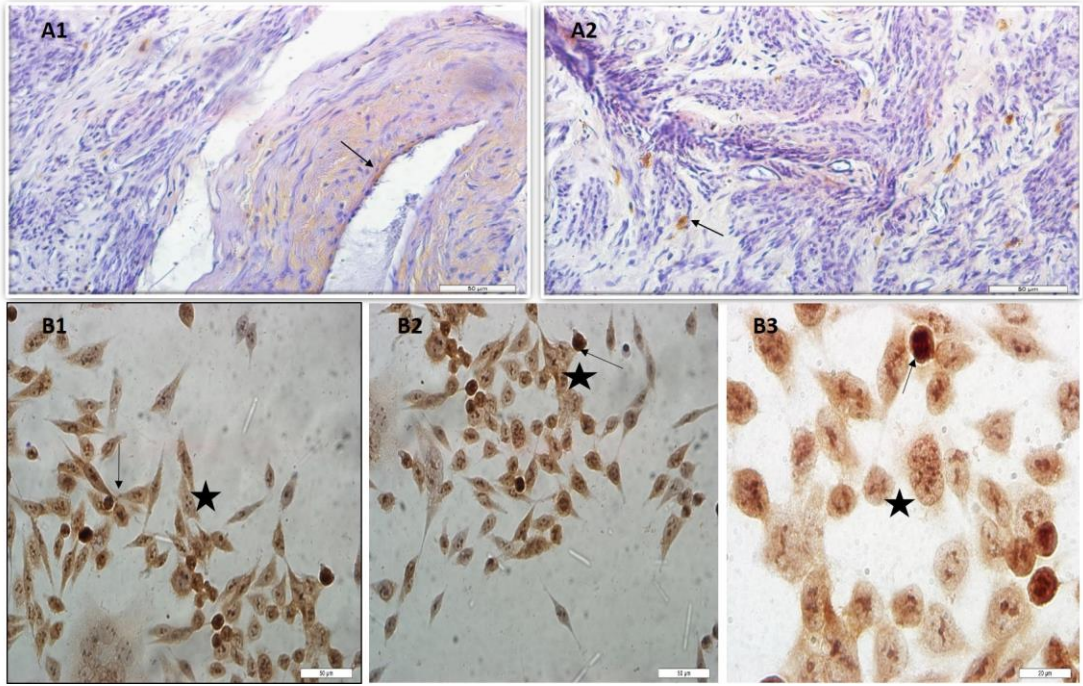
B1 ve B2 40X büyütme, B3 100X büyütme. B1’de boyanma skoru 3, B2’de sitoplazma boyanması skoru 0 ve B3’te çekirdek boyanma skoru 3 olarak hesaplandı.

Ok: İmmünohistokimyasal olarak ekspresyonunun pozitif olduğu bölgeleri işaret eder. Yıldız: Sitoplazmada zayıf boyanmayı gösterir.

Netrin-4

Myometrium dokusunda Netrin-4 ekspresyonu, damar intima tabakasında daha belirgin olmak üzere zayıf ve orta derecedeydi. Kas hücrelerinde sitoplazma ve çekirdekte genel olarak gözlenmemekle birlikte, myometrium bağ dokusunda Netrin-4 ekspresyonu zayıf-orta ekspresyon olarak değerlendirildi (Skor: 1-2) (Şekil 18 A1-A2).

HTB-114 hücre hattındaki Netrin-4, hücre çekirdeğinde immünohistokimyasal olarak orta-güçlü düzeyde (Skor: 2-3) boyanma gösterdi. Sitoplazma boyanması, çekirdek boyanmasına göre daha zayıf olmakla birlikte, boyanma zayıf-orta düzey olarak saptandı (Skor: 1-2) (Şekil 18 B1-B2-B3).



Şekil 18: İnsan myometrium dokusu ve HTB-114 hücre hattının immünohistokimyasal boyama incelemesi sonucunda Netrin-4 ekspresyon görüntüleri.

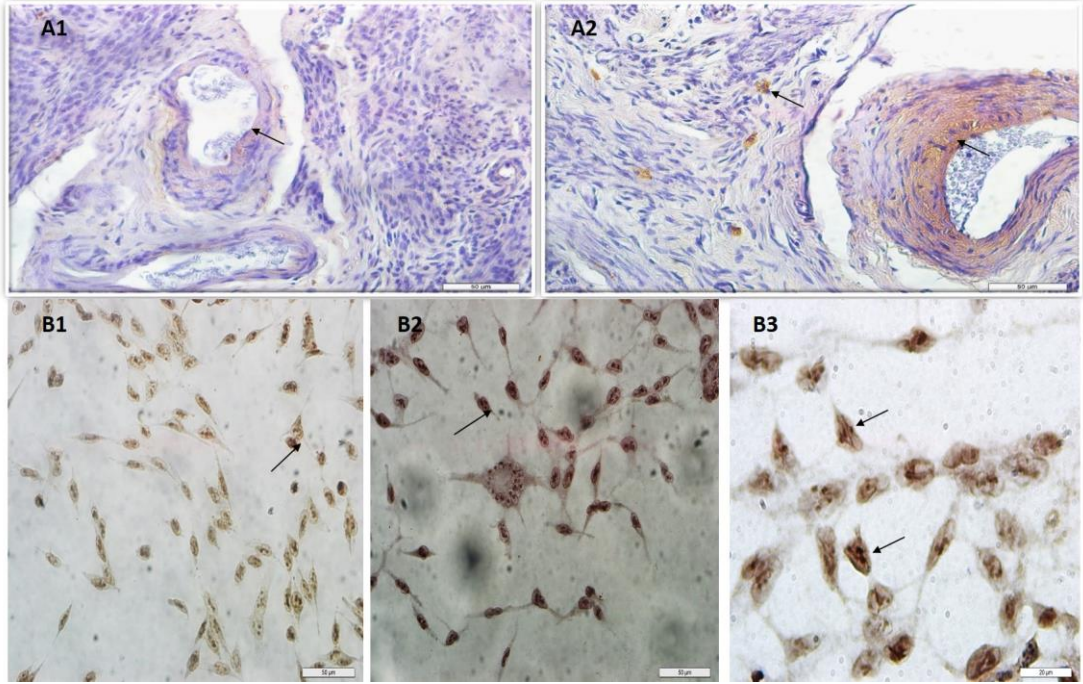
B1, B2 ve B3'te çekirdek boyanma skoru 3 olarak hesaplandı.

Ok: İmmünohistokimyasal olarak ekspresyonunun pozitif olduğu bölgeleri işaret eder. Yıldız: Sitoplazmada zayıf boyanmayı gösterir.

UNC5B

Myometrium dokusundaki UNC5B, immünohistokimyasal olarak ekspresyonu damarda orta derece olarak saptandı (Skor: 2). Damar bağ dokusundaki ekspresyon zayıf olarak değerlendirildi (Skor: 1). Myometrium bağ dokusu ve myometriyum hücre sitoplazması ve çekirdeğinde ekspresyon zayıf negatif olarak değerlendirildi (Skor: 0-1) (Şekil 19 A1-A2).

HTB-114 hücre hattındaki UNC5B ekspresyonu, çekirdekte belirgin kuvvetli olarak gözlemlendi (Skor: 3) (Şekil 19 B1-B2-B3). Sitoplazma boyanması yer yer saptanmamakla birlikte, bazı alanlarda zayıf boyanma dikkati çekti (Skor: 1).



Şekil 19: İnsan myometrium dokusu ve HTB-114 hücre hattının immünohistokimyasal boyama incelemesi sonucunda UNC5B ekspresyon görüntüleri.

B1, B2 ve B3 resimlerinde çekirdek boyanma skoru 3 olarak hesaplandı.

Ok: İmmünohistokimyasal olarak ekspresyonunun pozitif olduğu bölgeleri işaret eder.

TARTIŞMA

Leiomyosarkomlar (LMS) uterin malignansilerin %1-3' ünü oluşturur. Leiomyosarkomun ortalama tespit edilme yaşı 43-53'tür. Premenapozal kadınlarda prognoz daha iyi olmaktadır. Uterusun yaklaşık her 800 düz kas tümörlerinden birisi leiomyosarkomdan meydana gelir (8).

Leiomyosarkom, leiomyomdan daha yumuşak ve büyük olma eğilimlidir, ayrıca daha düzensiz kenarlı, hemorajik ve nekrotik olmaktadır.

Leiomyosarkomların ilk semptomları vajinal kanama veya ağrı olabilir. Endometrial biyopsi ile olguların ancak üçte birine ve submüköz yerleşimli olanlara tanı konulabilmektedir. Hastaların %50-75'inde tek bir lezyon vardır ve %70'inde intramural, %20'sinde submukozal ve %10'unda subserozal yerleşim görülmektedir. Servikal tutulum leiomyomlara göre daha siktir (3).

Prognostik faktörler incelendiğinde; tümörün myom içerisinde lokalize kalması, düşük mitoz sayısı, nekroz yokluğu ve komşu dokuda hyalinizasyon iyi prognostik faktörler olarak bildirmektedir.

Tümör derecesi ve diğer histolojik özellikler, tümörlerin klinik davranışını etkileyebilir ve tedavi önerilerinin önemli belirleyicileri olabilir. Lokalize yayılım myometriuma ve pelvik organlara olmaktadır. LMS en yaygın olarak akciğerlere, karaciğere, batına ve pelvise metastaz yapar (65). Kemik ve beyin metastazları daha az yaygın tutulum bölgeleridir. LMS, tanı aşamasından bağımsız olarak yüksek nüks ve ölüm riski ile ilişkili agresif bir tümördür (2).

Çoğu vakada, uterin LMS tanısı, benign olduğu varsayılan uterin leiomyomlara uygulanan histerektomi veya miyomektomiye takiben konulur (4,5). Total histerektomi sırasında, özellikle menopozal veya perimenopozal hastalarda sıklıkla bilateral salpingo-ooferektomi (BSO) yapılır.

Pelvik lenf nodları intraoperatif olarak palpe edilir şekilde büyümüşse veya ekstrauterin hastalık kanıtı varsa, hastalara pelvik lenfadenektomi uygulanmalıdır (38,39). Uterus ile sınırlı LMS'li hastalarda lenf nodu tutulumu insidansı düşüktür. Uterin LMS'si uterusla sınırlı ve normal görünen lenf nodları olan hastalarda rutin lenfadenektomi yapılmamalıdır.

Uterusla sınırlı, bozulmamış bir numunenin rezeksiyonunu takiben standart bakım gözlemdir. Kemoterapi veya pelvik radyasyon bazen LMS ameliyatından sonra düşünülürken, hiçbir adjuvan tedavi şekli gözlemlerle karşılaştırıldığında sağ kalım sonuçlarında iyileşme göstermemiştir.

Bütün kanser türlerinde olduğu gibi leiomyosarkomda patofizyolojisinde etken rol oynayan basamakları araştırmak ve hastalığın önceden tespit edilmesi günümüzde temel amaç haline gelmiştir.

Netrinler, başlangıçta embriyonik aksonal kılavuz rolü için tanımlanan laminin benzeri proteinler ailesinin üyeleridir. Her ne kadar ilk çalışmalar netrinlerin sinir sisteminde aksonal iletim sırasında eksprese edildiğini gösterse de sonrasında yapılan çalışmalarda netrinlerin sinir sistemi dışında eksprese edildiği ve doku morfogenez, anjiyogenez, lenfanjiyogenez, tümör gelişimi, hücre göçü, invazyon ve adhezyon, apoptoz ve inflamasyonun düzenlenmesinde görev aldığı gösterilmiştir. Bu özellikleri nedeniyle netrinler çeşitli maligniteler üzerinde araştırmalara konu olmuş ve netrin protein ailesinin bazı kanserlerin gelişiminde hayati rol oynadığını bulunmuştur.

Netrinlerin kanser gelişimi sürecindeki rolleri literatür tarandığında daha çok Netrin-1 ile ilişkili çalışmalara ulaşılmaktadır. Netrin-1 seviyelerinin birçok kanser türünde önemli ölçüde artarak dolaşıma salındığı ve bu nedenle biyobelirteç olarak kullanımının uygunluğu son dönemde ilgi çekici araştırmalar yapılmasına sebep olmuştur. Ancak Netrin-1'in kanser gelişiminde indükleyici mi yoksa inhibe edici mi olduğu net değildir. Kısıtlı sayıdaki çalışmalarda kanser türü ve orijin aldığı dokuya göre farklılıklar izlenebilmektedir. Örneğin Netrin-1'in plazma seviyeleri meme adenokarsinomunda, prostatta, karaciğerde, renal hücreli karsinomda ve beyin tümörlerinde (hipofiz adenomu, menenjiyom, glioblastoma) önemli ölçüde yüksek

iken akciğer, pankreas ve kolon adenokarsinomunun plazmasındaki netrin-1 seviyesi sağlıklı kontrol grubuna göre yüksek değildi (137).

Netrin-1 ile jinekolojik kanserler arasındaki bağlantının araştırıldığı çalışma sayısının kısıtlı olduğu görülmüştür. Mevcut çalışmalar içinde Papanastasiou ve arkadaşlarının Netrin-1 ve reseptörü DCC'nin over kanserine dahil olup olmadığını araştırdıkları çalışmada, Netrin-1 ve DCC mRNA'ları, sağlıklı ve kanserli over dokularında gerçek zamanlı PZR ile ölçülmüştür. Over kanseri örneklerinin %76'sında Netrin-1'in aşırı ifade edildiği bulunmuştur. Artan Netrin-1 mRNA seviyeleri, ilerlemiş tümör evresi ve derece ile ilişkilendirilmiştir. Tersine, test edilen over tümörlerinin %59'unda (10/17) DCC'nin aşağı regüle olduğu bulunmuş, ancak sağlıklı örneklerle karşılaştırıldığında korelasyon anlamlı bulunmamıştır. Burada, Netrin-1'in over kanserinde rolü olabileceği gösterilmiştir. Netrin-1 mRNA ifadesi over malign tümörlerinde sağlıklı dokulara göre güçlü bir şekilde yukarı regüle edilmiştir. Artmış Netrin-1'in spesifik olarak kanserli dokularda gözlemlenmesi, Netrin-1'in over kanseri için yeni bir biyobelirteç adayı olabileceğini gösterir (138).

Yine benzer şekilde Li ve arkadaşları Netrin-1'in over karsinomu dokusunda artış gösterdiğinde tümör proliferasyonu, invazyonu ve tümör hücrelerinin angiogenezinin arttığını göstermişlerdir (139).

Kato ve arkadaşlarının endometriyumda ve endometriyal kanserde DCC ve ligandı netrin-1'in ekspresyonunu inceleyen çalışmasında ise DCC/netrin-1 sinyalinin hücreleri proliferasyondan salgılama fazına geçişe yönlendirebileceğini düşündürmektedir. Ek olarak, DCC ekspresyonunun susturulması, endometriyal kanser hücrelerinin DCC tarafından düzenlenen bir apoptotik programdan kaçışına ve maligniteye dönüşüme katkıda bulunduğu tespit edilmiştir (140).

Serviks kanserleri ile netrin ve reseptörleri arasındaki ilişkiyi inceleyen diğer bir çalışmada da uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar), servikal kanserler dahil olmak üzere çok sayıda kötü huylu tümörün başlaması ve gelişmesi için önemli düzenleyici faktörler olduğu izlenmiştir. LncRNA, UNC-5 netrin reseptörü B antisens RNA 1'in

ifadesinde normal dokulara kıyasla servikal skuamöz hücreli karsinom ve endoservikal adenokarsinom dokularında artış olduğu bulunmuştur (141).

Bizim çalışmamızda ise RT-PCR sonuçlarına göre Netrin-1 geninin normal myometriyum dokusuna kıyasla, HTB-114 leiomyosarkom hücre hattında 4,92 kat fazla eksprese olduğunu tespit ettik ve bu ekspresyon farkının istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gördük. Ayrıca yapılan immunohistokimyasal boyamalarda, normal myometriyum dokusuna kıyasla HTB-114 leiomyosarkom hücre hattında hücre çekirdeği ve sitoplazmasında yüksek oranda Netrin-1 ekspresyonunun olduğunu izledik ve bunun özellikle hücre bölünmesi dolayısıyla kontrolsüz çoğalma üzerinde etkili olabileceği düşünmekteyiz. Bu sonuçlara dayanarak Netrin-1'in leiomyosarkom gelişiminde rol oynadığını ve yeni bir biyobelirteç adayı olabileceğini söyleyebiliriz.

Netrin-4 ve kanser ilişkisini gösteren çalışmaların Netrin-1'e kıyasla daha kısıtlı olduğu izlenmiştir. Mevcut çalışmalarda da Netrin-4'ün kanser türü ve orijin aldığı dokuya göre farklı rol üstlenebileceği görülmüştür. Örneğin Lv ve arkadaşlarının mide kanserli hastalarda yaptığı çalışmada, tümör dokusunda ve serum örneğinde Netrin-4 seviyesinin önemli ölçüde arttığı; Netrin-4 ve reseptörü neogenin aracılık ettiği ve multi-onkojenik yolların daha fazla aktivasyonu ile mide kanseri hücrelerinin çoğalmasında ve hareketliliğinde desteklediği, yüksek Netrin-4 seviyelerinin kısa bir sağkalım ile korele olduğu tespit etmişlerdir (114).

Bunun aksine Eveno ve arkadaşları yaptıkları çalışmayla Netrin-4'ün aşırı ekspresyonunun kolorektal akciğer metastazını ve bununla ilişkili lenf nodu tutulumunu azalttığını ayrıca Netrin-4 aşırı ekspresyonunun, muhtemelen bir anti-anjiyojenik etki yoluyla, cerrahi rezeksiyondan sonra tümör nüksünü ve metastazını azalttığını göstermişlerdir (142).

Benzer şekilde Reuten ve arkadaşları in vitro kanser hücre hatları ve in vivo fare modellerinde bazal membranda kanserle ilişkili fibroblastlar ve endotel hücreler tarafından salgılanan Netrin-4'ün varlığının tümör hücresi istilasını ve metastazını engellediğini göstermiştir (143).

Jinekolojik kanserler ve Netrin-4 arasındaki ilişkiyi gösterir yalnızca bir çalışma izlenmiştir. Zhang ve ark. Netrin-4' ün serviks kanseri dokusunda miR-192a için bir 46 hedef olduğunu ve servikal kanser dokusunda, normal servikal dokuya kıyasla down regüle olduğunu belirtmişlerdir.

Çalışmamızdaki RT-PCR sonuçlarına göre Netrin-4 geninin normal myometrium dokusuna kıyasla, HTB-114 leiomyosarkom hücre hattında 65,34 kat fazla eksprese olduğunu ve bu ekspresyon farkının istatistiksel olarak anlamlı olduğunu tespit ettik. Ayrıca yapılan immunohistokimyasal boyamalarda, normal myometrium dokusuna kıyasla HTB-114 leiomyosarkom hücre hattında hücre çekirdeğinde yüksek derecede ve hücre sitoplazmasında ise orta derecede Netrin-4 ekspresyonunun olduğunu izledik. Aynı Netrin-1 de olduğu gibi Netrin-4'ün de hücre bölünmesi ve kontrolsüz çoğalma üzerinde etkili olabileceği düşünmekteyiz. Bu veriler ışığında Netrin-4'ün leiomyosarkom gelişiminde rol oynadığını ve yeni bir biyobelirteç adayı olabileceğini söyleyebiliriz.

UNC5B, netrin ailesinin üzerinden etki gösterdiği reseptörlerden biridir ve birçok kanser yolağında veya patofizyolojisinde etkin rol oynamaktadır. Tan ve ark., UNC5B-AS1'nin akciğer kanser dokusunda yüksek oranda eksprese olduğunu ve UNC5B-AS1 ekspresyonu down regüle edildiğinde adezyon, invazyon ve migrasyonun inhibe olduğunu göstermiştir (144). Benzer şekilde Fu ve arkadaşları servikal kanser dokusunda ve hücrelerinde UNC5B-AS1'in up regüle olduğunu ve UNC5B-AS1 inhibisyonu ile serviks kanseri gelişimini hem in vivo hem de in vitro olarak azalttığını göstermişlerdir (145). Zeng ve arkadaşlarının over kanseri üzerine yaptıkları çalışmada da UNC5B'nin over kanseri dokusunda onkogenik bir gen olarak davrandığı gösterilmiştir (146).

Bizim çalışmamızda da RT-PCR sonuçlarına göre UNC5B geninin, HTB-114 leiomyosarkom hücre hattında normal myometrium dokusuna kıyasla 160,33 kat daha fazla eksprese edildiği gözlemlendi. İmmunohistokimyasal incelemede de normal myometrium dokusuna kıyasla HTB-114 leiomyosarkom hücre hattındaki hücre çekirdeklerinde yüksek derecede eksprese edildiği izlendi. Buradan UNC5B'nin leiomyosarkom oluşumunda onkogenik bir gen olarak davrandığı söylenebilir.

SONUÇ

Sonuç olarak çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler ışığında Netrin-1, Netrin-4 ve UNC5B'nin leiomyosarkom gelişiminde etkili olduğunu, leiomyosarkomda yeni bir biyobelirteç adayları olabileceklerini söyleyebilir ve bir proonkogen olarak görev aldıklarını düşünebiliriz. Bildiğimiz kadarıyla Netrin-1, Netrin-4, UNC5B ve leiomyosarkom ilişkisini değerlendiren çalışmamız, bu alanda literatürdeki ilk çalışmadır. Çalışmamızın sonuçları moleküler düzeyde leiomyosarkom araştırmasına ilişkin umut verici görüşler sunmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Kurman RJ. Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract. 4th Ed. New York: Springer Verlag 1997:499-500.
2. D'Angelo E, Prat J. Uterine sarcomas: a review. *Gynecol Oncol* 2010;116:131-139.
3. Zaloudek CJ, Norris HJ. Mesenchymal tumors of the uterus. In: Kurman RJ, (ed). Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract. 4th Ed. New York: Springer Verlag 1997:487-528.
4. Giuntoli RL, 2nd, Garrett-Mayer E, Bristow RE, Gostout BS. Secondary cytoreduction in the management of recurrent uterine leiomyosarcoma. *Gynecol Oncol* 2007;106:82-8.
5. Sagae S, Yamashita K, Ishioka S, Nishioka Y, Terasawa K, Mori M, et al. Preoperative diagnosis and treatment results in 106 patients with uterine sarcoma in Hokkaido, Japan. *Oncology* 2004;67(1):33.
6. Çekmez Y, Garip Ş, Ulu İ, Gülşen S, Haberal ET, Olgac Y, et al. Maternal serum Netrin-1 levels as a new biomarker of preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2017;30(9):1072-4.
7. Wang H, Su H, Tan Y. UNC5B-AS1 promoted ovarian cancer progression by regulating the H3K27me on NDRG2 via EZH2. *Cell Biol Int* 2020;44(4):1028-1036.
8. Leibsohn S, d'Ablaing G, Mishell DR Jr, Schlaerth JB. Leiomyosarcoma in a series of hysterectomies performed for presumed uterine leiomyomas. *Am J Obstet Gynecol* 1990;162(4):968-976.
9. Vardi JR, Tovell HM. Leiomyosarcoma of the uterus: clinicopathologic study. *Obstet Gynecol* 1980;56(4):428-434.

10. Bradley LD, Falcone T, Magen AB. Radiographic imaging techniques for the diagnosis of abnormal uterine bleeding. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2000;27(2):245-276.
11. Darby AJ, Papadaki L, Beilby JO. An unusual leiomyosarcoma of the uterus containing osteoclast-like giant cells. *Cancer* 1975;36(2):495-504.
12. Marshall RJ, Braye SG, Jones DB. Leiomyosarcoma of the uterus with giant cells resembling osteoclasts. *Int J Gynecol Pathol* 1986;5(3):260-268.
13. Boutsikou T, Giotaki M, Gourgiotis D, Boutsikou M, Brina DD, Marmarinos A, et al. Cord blood netrin-1 and -4 concentrations in term pregnancies with normal, restricted and increased fetal growth. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2014;27(18):1849-1853.
14. Atkins K, Bell ME, Kempson RL, Hendrickson M. Myxoid smooth muscle tumors of the uterus. *Mod Pathol* 2001;14:132A.
15. Chen KT. Myxoid leiomyosarcoma of the uterus. *Int J Gynecol Pathol* 1984;3(4):389-392.
16. King ME, Dickersin GR, Scully RE. Myxoid leiomyosarcoma of the uterus. A report of six cases. *Am J Surg Pathol* 1982;6(7):589-598.
17. Kefeli U, Ucuncu Kefeli A, Cabuk D, Isik U, Sonkaya A, Acikgoz O, et al. Netrin-1 in cancer: Potential biomarker and therapeutic target?. *Tumour Biol* 2017;39(4):1010428317698388.
18. Kurman RJ, Norris HJ. Mesenchymal tumors of the uterus. VI. Epithelioid smooth muscle tumors including leiomyoblastoma and clear-cell leiomyoma: a clinical and pathologic analysis of 26 cases. *Cancer* 1976;37(4):1853-1865.

19. Clement PB. The pathology of uterine smooth muscle tumors and mixed endometrial stromal-smooth muscle tumors: a selective review with emphasis on recent advances. *Int J Gynecol Pathol* 2000;19(1):39-55.
20. Karpuz V, Joris F, Letovanec N, Branchmanski F, Kapanci Y. Metastizing low-grade clear cell leiomyosarcoma of the uterus. *Pathol Int* 1998;48(1):82-85.
21. Oliva E, Nielsen PG, Clement PB, Young RH, Scully RE: Epithelioid smooth muscle tumors of the uterus. A clinicopathologic study of 80 cases. *Mod Pathol* 1997;10:107A.
22. Taylor HB, Norris HJ. Mesenchymal tumors of the uterus. IV. Diagnosis and prognosis of leiomyosarcomas. *Arch Pathol* 1966;82(1):40-44.
23. Gudgeon DH. Leiomyosarcoma of the uterus. *Obstet Gynecol* 1968;32(1):96-100.
24. Corscaden JA, Singh BP. Leiomyosarcoma of the uterus. *Am J Obstet Gynecol* 1959;77:286.
25. Van Dinh T, Woodruff JD. Leiomyosarcoma of the uterus. *Am J Obstet Gynecol* 1982;144(7):817-823.
26. Abell MR, Littler ER. Benign metastasizing uterine leiomyoma. Multiple lymph nodal metastases. *Cancer* 1975;36(6):2206-2213.
27. Banner AS, Carrington CB, Emory WB, Kittle F, Leonard G, Ringus J, et al. Efficacy of oophorectomy in lymphangi leiomyomatosis and benign metastasizing leiomyoma. *N Engl J Med* 1981;305(4):204-209.
28. Tavassoli FA, Norris HJ. Peritoneal leiomyomatosis (leiomyomatosis peritonealis disseminata): a clinicopathologic study of 20 cases with ultrastructural observations. *Int J Gynecol Pathol* 1982;1(1):59-74.

29. Norris HJ, Parmley T. Mesenchymal tumors of the uterus. V. Intravenous leiomyomatosis. A clinical and pathologic study of 14 cases. *Cancer* 1975;36(6):2164-2178.
30. Scharfenberg JC, Geary WL. Intravenous leiomyomatosis. *Obstet Gynecol* 1974;43(6):909-914.
31. Evans AT 3rd, Symmonds RE, Gaffey TA. Recurrent pelvic intravenous leiomyomatosis. *Obstet Gynecol* 1981;57(2):260-264.
32. Nassar OA, Abdul Moaty SB, Khalil el-SA, El-Taher MM, El Najjar M. Outcome and prognostic factors of uterine sarcoma in 59 patients: single institutional results. *J Egypt Natl Canc Inst* 2010;22(2):113-122.
33. Park JY, Kim DY, Suh DS, Kim JH, Kim YM, Kim YT, et al. Prognostic factors and treatment outcomes of patients with uterine sarcoma: analysis of 127 patients at a single institution, 1989-2007. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008;134(12):1277-1287.
34. Dinh TA, Oliva EA, Fuller AF Jr, Lee H, Goodman A. The treatment of uterine leiomyosarcoma. Results from a 10-year experience (1990-1999) at the Massachusetts General Hospital. *Gynecol Oncol* 2004;92(2):648-652.
35. US Food and Drug Administration. Laparoscopic power morcellators. <http://www.fda.gov/medical-devices/surgery-devices/laparoscopic-power-morcellators> Erişim tarihi: 24 Ekim 2019.
36. Seagle BL, Sobecki-Rausch J, Strohl AE, Shilpi A, Grace A, Shahabi S. Prognosis and treatment of uterine leiomyosarcoma: A National Cancer Database study. *Gynecol Oncol* 2017;145(1):61-70.

37. Einstein MH, Barakat RR, Chi DS, Sonoda Y, Alektiar KM, Hensley ML, et al. Management of uterine malignancy found incidentally after supracervical hysterectomy or uterine morcellation for presumed benign disease. *Int J Gynecol Cancer* 2008;18(5):1065-1070.
38. Goff BA, Rice LW, Fleischhacker D, Muntz HG, Falkenberry SS, Nikrui N, et al. Uterine leiomyosarcoma and endometrial stromal sarcoma: lymph node metastases and sites of recurrence. *Gynecol Oncol* 1993;50(1):105-109.
39. Leitao MM, Sonoda Y, Brennan MF, Barakat RR, Chi DS. Incidence of lymph node and ovarian metastases in leiomyosarcoma of the uterus. *Gynecol Oncol* 2003;91(1):209-212.
40. Major FJ, Blessing JA, Silverberg SG, Morrow CP, Creasman WT, Currie JL, et al. Prognostic factors in early-stage uterine sarcoma. A Gynecologic Oncology Group study. *Cancer* 1993;71(4 Suppl):1702-1709.
41. Kapp DS, Shin JY, Chan JK. Prognostic factors and survival in 1396 patients with uterine leiomyosarcomas: emphasis on impact of lymphadenectomy and oophorectomy. *Cancer* 2008;112(4):820-830.
42. Sandruck J, Escobar P, Lurain J, Fishman D. Uterine leiomyosarcoma metastatic to the sphenoid sinus: a case report and review of the literature. *Gynecol Oncol* 2004;92(2):701-704.
43. Engle DB, Smiley LM, Baum SL, Wellman GP. Positron Emission Tomography in detection of metastatic leiomyosarcoma in a postoperative patient: a case report. *Proc Obstet Gynecol*. 2011;2(1),1-5.
44. Sung PL, Chen YJ, Liu RS, Shieh HJ, Wang PH, Yen MS, et al. Whole-body positron emission tomography with 18F-fluorodeoxyglucose is an effective method to detect extra-pelvic recurrence in uterine sarcomas. *Eur J Gynaecol Oncol* 2008;29(3):246-251.

45. Zivanovic O, Leitao MM, Iasonos A, Jacks LM, Zhou Q, Abu-Rustum NR, et al. Stage-specific outcomes of patients with uterine leiomyosarcoma: a comparison of the international Federation of gynecology and obstetrics and american joint committee on cancer staging systems. *J Clin Oncol* 2009;27(12):2066-2072.
46. Omura GA, Blessing JA, Major F, Lifshitz S, Ehrlich CE, Mangan C, et al. A randomized clinical trial of adjuvant adriamycin in uterine sarcomas: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 1985;3(9):1240-1245.
47. Hensley ML, Ishill N, Soslow R, Larkin J, Abu-Rustum N, Sabbatini P, et al. Adjuvant gemcitabine plus docetaxel for completely resected stages I-IV high grade uterine leiomyosarcoma: Results of a prospective study. *Gynecol Oncol* 2009;112(3):563-567.
48. Hensley ML, Wathen JK, Maki RG, Araujo DM, Sutton G, Priebat DA, et al. Adjuvant therapy for high-grade, uterus-limited leiomyosarcoma: results of a phase 2 trial (SARC 005). *Cancer* 2013;119(8):1555-1561.
49. Reed NS, Mangioni C, Malmström H, Scarfone G, Poveda A, Pecorelli S, et al. Phase III randomised study to evaluate the role of adjuvant pelvic radiotherapy in the treatment of uterine sarcomas stages I and II: an European Organisation for Research and Treatment of Cancer Gynaecological Cancer Group Study (protocol 55874) [published correction appears in *Eur J Cancer* 2008 Jul;44(11):1612]. *Eur J Cancer* 2008;44(6):808-818.
50. Littell RD, Tucker LY, Raine-Bennett T, Palen TE, Zaritsky E, Neugebauer R, et al. Adjuvant gemcitabine-docetaxel chemotherapy for stage I uterine leiomyosarcoma: Trends and survival outcomes. *Gynecol Oncol* 2017;147(1):11-17.
51. Hensley ML. Difficult Choices in Stage I Uterine Leiomyosarcoma- it's okay to "stand there". *Gynecol Oncol* 2017;147(1):1-2.

52. Hensley ML, Wathen JK, Maki RG, Araujo DM, Sutton G, Priebe DA, et al. Adjuvant therapy for high-grade, uterus-limited leiomyosarcoma: results of a phase 2 trial (SARC 005). *Cancer* 2013;119(8):1555-1561.
53. Pautier P, Floquet A, Gladieff L, Berton-Rigaud D, Neumann SP, Guillemet FS, et al. A randomized clinical trial of adjuvant chemotherapy with doxorubicin, ifosfamide, and cisplatin in localized uterine sarcomas: Results from 81 randomized patients. *J Clinical Oncology* 2011;(5):10022-10022.
54. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Uterine cancer. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/uterine.pdf Erişim tarihi: 05 Mayıs 2020.
55. Zivanovic O, Jacks LM, Iasonos A, Leitao MM Jr, Soslow RA, Veras E, et al. A nomogram to predict postresection 5-year overall survival for patients with uterine leiomyosarcoma. *Cancer* 2012;118(3):660-669.
56. Iasonos A, Keung EZ, Zivanovic O, Mancari R, Peiretti M, Nucci M, et al. External validation of a prognostic nomogram for overall survival in women with uterine leiomyosarcoma. *Cancer* 2013;119(10):1816-1822.
57. Leitao MM Jr, Hensley ML, Barakat RR, Aghajanian C, Gardner GJ, Jewell EL, et al. Immunohistochemical expression of estrogen and progesterone receptors and outcomes in patients with newly diagnosed uterine leiomyosarcoma. *Gynecol Oncol* 2012;124(3):558-562.
58. Kelley TW, Borden EC, Goldblum JR. Estrogen and progesterone receptor expression in uterine and extrauterine leiomyosarcomas: an immunohistochemical study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004;12(4):338-341.

59. Leitao MM, Soslow RA, Nonaka D, Olshen AB, Aghajanian C, Sabbatini P, et al. Tissue microarray immunohistochemical expression of estrogen, progesterone, and androgen receptors in uterine leiomyomata and leiomyosarcoma. *Cancer* 2004;101(6):1455-1462.
60. Anraku M, Yokoi K, Nakagawa K, Fujisawa T, Nakajima J, Akiyama H, et al. Pulmonary metastases from uterine malignancies: results of surgical resection in 133 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;127(4):1107-1112.
61. Burt BM, Ocejio S, Mery CM, et al. Repeated and aggressive pulmonary resections for leiomyosarcoma metastases extends survival. *Ann Thorac Surg* 2011;92(4):1202-1207.
62. Clavero JM, Deschamps C, Cassivi SD, Dasilva M, Bueno R, Sugarbaker DJ, et al. Gynecologic cancers: factors affecting survival after pulmonary metastasectomy. *Ann Thorac Surg* 2006;81(6):2004-2007.
63. O'Cearbhaill, RE.; Maki, RG.; Zheng, J., et al. Evaluation of the role of thermal ablation in the treatment of soft tissue sarcomas. *Connective Tissue Oncology Society Meeting; Miami, FL. 2009. #39259*
64. Díaz-Montes TP, El-Sharkawy F, Lynam S, Harper A, Sittig M, MacDonald R, et al. Efficacy of Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy and Cytoreductive Surgery in the Treatment of Recurrent Uterine Sarcoma. *Int J Gynecol Cancer* 2018;28(6):1130-1137.
65. Moskovic E, MacSweeney E, Law M, Price A. Survival, patterns of spread and prognostic factors in uterine sarcoma: a study of 76 patients. *Br J Radiol* 1993;66(791):1009-1015.
66. Kanjeekal S, Chambers A, Fung MF, Verma S. Systemic therapy for advanced uterine sarcoma: a systematic review of the literature. *Gynecol Oncol* 2005;97(2):624-637.

67. Maki RG, Wathen JK, Patel SR, Priebat DA, Okuno SH, Samuels B, et al. Randomized phase II study of gemcitabine and docetaxel compared with gemcitabine alone in patients with metastatic soft tissue sarcomas: results of sarcoma alliance for research through collaboration study 002 [corrected] [published correction appears in *J Clin Oncol*. 2007 Aug 20;25(24):3790]. *J Clin Oncol* 2007;25(19):2755-2763.
68. Pautier P, Italiano A, Piperno-Neumann S, Chevreau C, Penel N, Firmin N, et al. Doxorubicin alone versus doxorubicin with trabectedin followed by trabectedin alone as first-line therapy for metastatic or unresectable leiomyosarcoma (LMS-04): a randomised, multicentre, open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2022;23(8):1044-1054.
69. Edmondson RJ, O'Connell RL, Banerjee S, Mileskin L, Sykes P, Beale P, et al. Phase 2 study of anastrozole in rare cohorts of patients with estrogen receptor/progesterone receptor positive leiomyosarcomas and carcinosarcomas of the uterine corpus: The PARAGON trial (ANZGOG 0903). *Gynecol Oncol* 2021;163(3):524-530.
70. Rajasekharan S, Kennedy TE. The netrin protein family. *Genome Biol* 2009;10(9):239.
71. Moore KJ, Fisher EA. Macrophages, atherosclerosis and the potential of netrin-1 as a novel target for future therapeutic intervention. *Future Cardiol* 2012;8(3):349-352.
72. Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, Mirzayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M. The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 1994;78(3):409-424.
73. Wang H, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Tessier-Lavigne M. Netrin-3, a mouse homolog of human NTN2L, is highly expressed in sensory ganglia and shows differential binding to netrin receptors. *J Neurosci* 1999;19(12):4938-4947.

74. Yin Y, Sanes JR, Miner JH. Identification and expression of mouse netrin-4. *Mech Dev* 2000;96(1):115-119.
75. Bányai L, Patthy L. The NTR module: domains of netrins, secreted frizzled related proteins, and type I procollagen C-proteinase enhancer protein are homologous with tissue inhibitors of metalloproteases. *Protein Sci* 1999;8(8):1636-1642.
76. de Wit J, Verhaagen J. Proteoglycans as modulators of axon guidance cue function. *Adv Exp Med Biol* 2007;600:73-89.
77. Barclay AN. Membrane proteins with immunoglobulin-like domains--a master superfamily of interaction molecules. *Semin Immunol* 2003;15(4):215-223.
78. Moore SW, Tessier-Lavigne M, Kennedy TE. Netrins and their receptors. *Adv Exp Med Biol* 2007;621:17-31.
79. Lai Wing Sun K, Correia JP, Kennedy TE. Netrins: versatile extracellular cues with diverse functions. *Development* 2011;138(11):2153-2169.
80. Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, et al. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 1996;87(2):175-185.
81. Hong K, Hinck L, Nishiyama M, Poo MM, Tessier-Lavigne M, Stein E. A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* 1999;97(7):927-941.
82. Barallobre MJ, Pascual M, Del Río JA, Soriano E. The Netrin family of guidance factors: emphasis on Netrin-1 signalling. *Brain Res Brain Res Rev* 2005;49(1):22-47.
83. Ly A, Nikolaev A, Suresh G, Zheng Y, Tessier-Lavigne M, Stein E. DSCAM is a netrin receptor that collaborates with DCC in mediating turning responses to netrin-1. *Cell* 2008;133(7):1241-1254.

84. Stanco A, Szekeres C, Patel N, Rao S, Campbell K, Kreidberg JA, et al. Netrin-1- α 3 β 1 integrin interactions regulate the migration of interneurons through the cortical marginal zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(18):7595-7600.
85. Yebra M, Montgomery AM, Diaferia GR, Kaido T, Silletti S, Perez B et al. Recognition of the neural chemoattractant Netrin-1 by integrins α 6 β 4 and α 3 β 1 regulates epithelial cell adhesion and migration. *Dev Cell* 2003;5(5):695-707.
86. Haddick PC, Tom I, Luis E, Quiñones G, Wranik BJ, Ramani SR, et al. Defining the ligand specificity of the deleted in colorectal cancer (DCC) receptor. *PLoS One* 2014;9(1):e84823.
87. Stein E, Zou Y, Poo M, Tessier-Lavigne M. Binding of DCC by netrin-1 to mediate axon guidance independent of adenosine A2B receptor activation. *Science* 2001;291(5510):1976-1982.
88. Geisbrecht BV, Dowd KA, Barfield RW, Longo PA, Leahy DJ. Netrin binds discrete subdomains of DCC and UNC5 and mediates interactions between DCC and heparin. *J Biol Chem* 2003;278(35):32561-32568.
89. Kruger RP, Lee J, Li W, Guan KL. Mapping netrin receptor binding reveals domains of Unc5 regulating its tyrosine phosphorylation. *J Neurosci* 2004;24(48):10826-10834.
90. Leonardo ED, Hinck L, Masu M, Keino-Masu K, Ackerman SL, Tessier-Lavigne M. Vertebrate homologues of *C. elegans* UNC-5 are candidate netrin receptors. *Nature* 1997;386(6627):833-838.
91. Zhong Y, Takemoto M, Fukuda T, Hattori Y, Murakami F, Nakajima D, et al. Identification of the genes that are expressed in the upper layers of the neocortex. *Cereb Cortex* 2004;14(10):1144-1152.

92. Hofmann K, Tschopp J. The death domain motif found in Fas (Apo-1) and TNF receptor is present in proteins involved in apoptosis and axonal guidance. *FEBS Lett* 1995;371(3):321-323.
93. Layne K, Ferro A, Passacquale G. Netrin-1 as a novel therapeutic target in cardiovascular disease: to activate or inhibit?. *Cardiovasc Res* 2015;107(4):410-419.
94. Yamakawa K, Huot YK, Haendelt MA, Hubert R, Chen XN, Lyons GE et al. DSCAM: a novel member of the immunoglobulin superfamily maps in a Down syndrome region and is involved in the development of the nervous system. *Hum Mol Genet* 1998;7(2):227-237.
95. Andrews GL, Tanglao S, Farmer WT, Morin S, Brotman S, Berberoglu MA et al. Dscam guides embryonic axons by Netrin-dependent and -independent functions. *Development* 2008;135(23):3839-3848.
96. Hoang S, Liauw J, Choi M, Choi M, Guzman RG, Steinberg GK. Netrin-4 enhances angiogenesis and neurologic outcome after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009;29(2):385-397.
97. Nacht M, St Martin TB, Byrne A, Klinger KW, Teicher BA, Madden SL et al. Netrin-4 regulates angiogenic responses and tumor cell growth. *Exp Cell Res* 2009;315(5):784-794.
98. Baker KA, Moore SW, Jarjour AA, Kennedy TE. When a diffusible axon guidance cue stops diffusing: roles for netrins in adhesion and morphogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 2006;16(5):529-534.
99. Ranganathan P, Mohamed R, Jayakumar C, Ramesh G. Guidance cue netrin-1 and the regulation of inflammation in acute and chronic kidney disease. *Mediators Inflamm* 2014;2014:525891.

100. Gorur A, Unal N.D, Tamer L. Role of Netrin-1 in Cardiovascular Diseases. *Archives Medical Review Journal* 2018;27(4),440-458.
101. Bredesen DE, Mehlen P, Rabizadeh S. Apoptosis and dependence receptors: a molecular basis for cellular addiction. *Physiol Rev* 2004;84(2):411-430.
102. Guenebeaud C, Goldschneider D, Castets M, Guix C, Chazot G, Delloye-Bourgeois C et al. The dependence receptor UNC5H2/B triggers apoptosis via PP2A-mediated dephosphorylation of DAP kinase. *Mol Cell* 2010;40(6):863-876.
103. Lin JC, Ho WH, Gurney A, Rosenthal A. The netrin-G1 ligand NGL-1 promotes the outgrowth of thalamocortical axons. *Nat Neurosci* 2003;6(12):1270-1276.
104. Jarjour AA, Bull SJ, Almasieh M, Rajasekharan S, Baker KA, Mui J et al. Maintenance of axo-oligodendroglial paranodal junctions requires DCC and netrin-1. *J Neurosci* 2008;28(43):11003-11014.
105. Alcántara S, Ruiz M, De Castro F, Soriano E, Sotelo C. Netrin 1 acts as an attractive or as a repulsive cue for distinct migrating neurons during the development of the cerebellar system. *Development* 2000;127(7):1359-1372.
106. Mehlen P, Furne C. Netrin-1: when a neuronal guidance cue turns out to be a regulator of tumorigenesis. *Cell Mol Life Sci* 2005;62(22):2599-2616.
107. Arakawa H. Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(12):978-987.
108. Ramesh G, Berg A, Jayakumar C. Plasma netrin-1 is a diagnostic biomarker of human cancers. *Biomarkers* 2011;16(2):172-180.
109. Lu X, Le Noble F, Yuan L, Jiang Q, De Lafarge B, Sugiyama D et al. The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. *Nature* 2004;432(7014):179-186.

110. Park KW, Crouse D, Lee M, Karnik SK, Sorensen LK et al. The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(46):16210-16215.
111. Wang W, Reeves WB, Pays L, Mehlen P, Ramesh G. Netrin-1 overexpression protects kidney from ischemia reperfusion injury by suppressing apoptosis. *Am J Pathol* 2009;175(3):1010-1018.
112. Ramesh G. Role of Netrin-1 Beyond the Brain: From Biomarker of Tissue Injury to Therapy for Inflammatory Diseases. *Recent Pat Biomark* 2012;2(3):202-208.
113. Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, Wang H, Beddington R, Skarnes WC, et al. Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 1996;87(6):1001-1014.
114. Lv B, Song C, Wu L, Zhang Q, Hou D, Chen P, et al. Netrin-4 as a biomarker promotes cell proliferation and invasion in gastric cancer. *Oncotarget* 2015;6(12):9794-9806.
115. Barton JR, Stanziano GJ, Sibai BM. Monitored outpatient management of mild gestational hypertension remote from term. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170(3):765-769.
116. Llambi F, Causeret F, Bloch-Gallego E, Mehlen P. Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *EMBO J* 2001;20(11):2715-2722.
117. Mehlen P, Guenebeaud C. Netrin-1 and its dependence receptors as original targets for cancer therapy. *Curr Opin Oncol* 2010;22(1):46-54.
118. Mehlen P, Guenebeaud C. Netrin-1 and its dependence receptors as original targets for cancer therapy. *Curr Opin Oncol* 2010;22(1):46-54.

119. Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu* 1982;17 Pt 2:229-259.
120. Soini Y, Pääkkö P, Lehto VP. Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. *Am J Pathol* 1998;153(4):1041-1053.
121. Forcet C, Ye X, Granger L, Corset V, Shin H, Bredesen DE, et al. The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(6):3416-3421.
122. Hao W, Yu M, Lin J, Liu B, Xing H, Yang J, et al. The pan-cancer landscape of netrin family reveals potential oncogenic biomarkers. *Sci Rep* 2020;10(1):5224.
123. Hemmings BA. Akt signaling: linking membrane events to life and death decisions. *Science* 1997;275(5300):628-630.
124. Hedrick L, Cho KR, Fearon ER, Wu TC, Kinzler KW, Vogelstein B. The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis. *Genes Dev* 1994;8(10):1174-1183.
125. Thiebault K, Mazelin L, Pays L, Llambi F, Joly MO, Scoazec JY, et al. The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(7):4173-4178.
126. Forcet C, Stein E, Pays L, Corset V, Llambi F, Tessier-Lavigne M, et al. Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation. *Nature* 2002;417(6887):443-447.
127. Li X, Saint-Cyr-Proulx E, Aktories K, Lamarche-Vane N. Rac1 and Cdc42 but not RhoA or Rho kinase activities are required for neurite outgrowth induced by the Netrin-1 receptor DCC (deleted in colorectal cancer) in N1E-115 neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 2002;277(17):15207-15214.

128. Liu J, Yao F, Wu R, et al. Mediation of the DCC apoptotic signal by DIP13 alpha. *J Biol Chem* 2002;277(29):26281-26285.
129. Tanikawa C, Matsuda K, Fukuda S, Nakamura Y, Arakawa H. p53RDL1 regulates p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 2003;5(3):216-223.
130. Fitamant J, Guenebeaud C, Coissieux MM, Guix C, Treilleux I, Scoazec JY, et al. Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(12):4850-4855.
131. Dakouane-Giudicelli M, Alfaidy N, de Mazancourt P. Netrins and their roles in placental angiogenesis. *Biomed Res Int* 2014;2014:901941.
132. Lejmi E, Leconte L, Pédrón-Mazoyer S, Ropert S, Raoul W, Lavalette S, et al. Netrin-4 inhibits angiogenesis via binding to neogenin and recruitment of Unc5B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(34):12491-12496.
133. Han Y, Shao Y, Liu T, Qu YL, Li W, Liu Z. Therapeutic effects of topical netrin-4 inhibits corneal neovascularization in alkali-burn rats. *PLoS One* 2015;10(4):e0122951.
134. Zhang H, Vreeken D, Leuning DG, Bruikman CS, Junaid A, Stam W, et al. Netrin-4 expression by human endothelial cells inhibits endothelial inflammation and senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 2021;134:105960.
135. Kim M, Suh DH, Choi JY, Lee S, Bae JR, Kim K, et al. Mutually exclusive antiproliferative effect of cell line-specific HOX inhibition in epithelial ovarian cancer cell lines: SKOV-3 vs RMUG-S. *J Cell Mol Med* 2020;24(5):3246-3251.
136. Yang J, Zhou Y, Xie S, Wang J, Li Z, Chen L, et al. Metformin induces Ferroptosis by inhibiting UFMylation of SLC7A11 in breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2021;40(1):206.

137. Ramesh G, Berg A, Jayakumar C. Plasma netrin-1 is a diagnostic biomarker of human cancers. *Biomarkers* 2011;16(2):172-180.
138. Papanastasiou AD, Pampalakis G, Katsaros D, Sotiropoulou G. Netrin-1 overexpression is predictive of ovarian malignancies. *Oncotarget* 2011;2(5):363-367.
139. Li Y, Xiao M, Guo F. The role of Sox6 and Netrin-1 in ovarian cancer cell growth, invasiveness, and angiogenesis. *Tumour Biol* 2017;39(5):1010428317705508.
140. Kato HD, Kondoh H, Inoue T, Asanoma K, Matsuda T, Arima T, et al. Expression of DCC and netrin-1 in normal human endometrium and its implication in endometrial carcinogenesis. *Gynecol Oncol* 2004;95(2):281-289.
141. Fu J, Zhang Y, Wang M, Hu J, Fang Y. Inhibition of the long non-coding RNA UNC5B-AS1/miR-4455/RSPO4 axis reduces cervical cancer growth in vitro and in vivo. *J Gene Med* 2021;23(12):e3382.
142. Eveno C, Broqueres-You D, Feron JG, Rampanou A, Tijeras-Raballand A, Ropert S, et al. Netrin-4 delays colorectal cancer carcinomatosis by inhibiting tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 2011;178(4):1861-1869.
143. Reuten R, Patel TR, McDougall M, Rama N, Nikodemus D, Gibert B, et al. Structural decoding of netrin-4 reveals a regulatory function towards mature basement membranes. *Nat Commun* 2016;7:13515. Published 2016 Nov 30.
144. Tan JJ, Long SZ, Zhang T. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*. 2020;36(6):622-627.
145. Fu J, Zhang Y, Wang M, Hu J, Fang Y. Inhibition of the long non-coding RNA UNC5B-AS1/miR-4455/RSPO4 axis reduces cervical cancer growth in vitro and in vivo. *J Gene Med* 2021;23(12):e3382.

146. Zeng Z, Yu J, Jiang Z, Zhao N. Oleanolic Acid (OA) Targeting UNC5B Inhibits Proliferation and EMT of Ovarian Cancer Cell and Increases Chemotherapy Sensitivity of Niraparib. *J Oncol* 2022;2022:5887671.