

T.C  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
İÇ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI

124434

**PANKREAS KANSERİNDE  
MDR (P-GLYCOPROTEİN), Kİ-67 VE SURVİVİN  
EKSPRESYONU İLE APOPTOTİK AKTİVİTENİN PROGNOZ  
ÜZERİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

124434

**TIBBİ ONKOLOJİ UZMANLIK TEZİ :  
DR. TUĞBA YAVUZŞEN**

**TEZ DANIŞMANI :  
YARD. DOÇ. DR. İLHAN ÖZTOP**

**İZMİR, 2003**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

|                            |    |
|----------------------------|----|
| Giriş.....                 | 1  |
| Genel Bilgiler.....        | 3  |
| Hastalar ve Yöntemler..... | 23 |
| Sonuçlar.....              | 26 |
| Tartışma.....              | 35 |
| Türkçe özet.....           | 40 |
| İngilizce özet.....        | 42 |
| Kaynaklar.....             | 44 |

## ÖNSÖZ

Tıbbi Onkoloji uzmanlık eğitimim sırasında deneyim ve bilgilerinden yararlandığım değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Mehmet Alakavuklar, Prof. Dr. Bülent Ündar, tez danışmanım Yard. Doç. Dr. İlhan Öztop, Doç. Dr. Uğur Yılmaz, Yard. Doç. Dr. Binnaz Demirkan, Yrd. Doç. Dr. M. Ali Özcan, Doç. Dr. Fatih Demirkan ve Doç. Dr. Hayri Özsan'a, tez hastalarımın temel cerrahi tedavisini yerine getiren Prof. Dr. İbrahim Astarçioğlu ve çalışma arkadaşlarına ayrıca patoloji değerlendirme aşamasında destek olan Yard. Doç. Dr. Özgül Sağol ve tüm uzmanlık eğitimim boyunca dostluk ve yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarıma, eşime ve aileme teşekkür ederim.

## GİRİŞ

Pankreas adenokanseri batı ülkelerinde kansere bağlı ölümler arasında dördüncü sıklıkta yer almakta ve tüm kanser ile ilişkili ölümlerin yaklaşık %5'ni oluşturmaktadır (1, 2). Pankreas adenokanserinde genel olarak prognoz kötü olup hastaların %65'i tanıdan sonraki ilk 6 ay içinde, %90'ı da ilk yıl içinde kaybedilmektedir (3, 4). Hastalığın önemli bir başka özelliği de geç semptom vermesi ve tanı konulduğunda %80'den fazlasının küratif rezeksiyon şansını yitirmiş olmasıdır.

Pankreas adenokarsinomu kemoterapiye oldukça dirençli tümörler arasında yer almaktadır. Pek çok faz II ve III çalışmada gerek tek ajan gerekse kombinasyon rejimlerinin etkinliği araştırılmış ve %0 ile 20 arasında yanıt oranları ve 6 aydan daha kısa median sağkalım süreleri elde edilmiştir (5). Ayrıca kombinasyon kemoterapisinin tek ajan kemoterapilere üstünlüğü gösterilememiştir (6, 7).

Pankreas kanserinde prognozun kötü olması ve tedavi seçeneklerinin başarısının düşük olması, araştırmacıları bu tümörün biyolojisini anlamaya ve aydınlatmaya yönelik çalışmalar yapmaya itmiştir. Pankreas kanserinin moleküler temelleri hakkında son yıllarda önemli bilgiler edinilmiş, hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını denetleyen sinyal yollarında görev alan büyüme faktörleri ile bunların reseptörleri ve bazı tümör baskılayıcı genlerde mutasyonlar ile bu genlerin inaktivasyonu saptanmıştır. Bu moleküler olayların anlaşılması tanı ve prognozda yol gösterilebileceği gibi tedavisine de ışık tutacaktır.

Kanserin moleküler patogenezi içinde programlı hücre ölümü (apoptozis) önemli rol oynamaktadır. Apoptozis inhibitörleri (survivin, bcl-2 ailesi, apollon, livin) hücre canlılığının baskılanmasıyla, karsinogenezis ve gen mutasyonlarına katkısı sonucunda, karsinoma progresyonunu immün aracılı sitotoksikite rezistansını artırarak etkili olmaktadır. Çoklu ilaç direnci (MDR), mekanizmaları farklı olan çoklu kemoterapotik ajanlara karşı direnç mekanizmasıdır. Birçok kanser türlerinde farklı adlarla adlandırılan proteinler tanımlanmıştır. Tümör hücre dizilerinde de ekspresse edilen bu proteinler, tedavilere karşı oluşan direnç mekanizmalarından biridir.

Bu retrospektif çalışmada, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda tanı almış 45 pankreas kanserli hastanın patoloji preparatlarında apoptozis aktivitesi, survivin, ki-67 ve MDR proteinlerinin ekspresyonlarına bakıldı ve elde edilen veriler ile hastaların klinik ve patolojik özellikleri, sağkalım oranları ve kemoterapiye verdikleri yanıt arasındaki ilişki değerlendirildi.



## GENEL BİLGİLER

### PANKREAS KANSERİ

#### A) EPİDEMİYOLOJİ :

Pankreatik karsinomlar, insanlarda en sık görülen neoplaziler arasında yer almaktadır. Abdominal organlar içinde kolorektal karsinomları takiben ikinci sıklıkta görülürler. Pankreas kanseri gelişmekte olan ülkelerde, kanser ile ilişkili ölümler arasında %5 sıklıkla dördüncü sırada yerini almaktadır (2). İstatistiksel olarak Avrupa' da (8-11) pankreas kanser nedeniyle ölüm yılda 40.000, Amerika' da (2, 8) ise 30.000 belirlenmiştir. Diğer Gastrointestinal kanserlerde erkek/kadın oranı 2/1 olarak görülmesine rağmen pankreas kanserinde cinsiyet olarak eşit bir oran dağılımının olduğu bilinmektedir (12). Pankreas kanseri tanısı zor ve agresif gidişli bir kanser olması nedeniyle 5 yıllık sağkalım oranları %1-4 arasındadır (13,14). Tanı anında %20'den azı makroskopik olarak pankreasa sınırlıdır ve yaklaşık olarak %40'ı genellikle lokal ileri evrededir (15). Laparotomi, laparoskopik veya radyolojik olarak yapılan değerlendirme de olguların 1/3'den fazlasında uzak metastaz ve peritoneal implantlarla tanı konur. Pankreas kanserinin mortalite oranlarında ırksal farklılıklar gözlenmektedir. Amerika'daki zencilerde mortalite oranı diğer etnik gruplara göre yüksektir ve özellikle Afrika'daki zencilere göre anlamlı farklılık vardır. Ayrıca çevresel faktörlerin katkıda bulunduğu gösterilmiştir (16).

#### B) ETYOPATOGENEZ :

Pankreas bezinde çoğunluğu malign karakterde olan ekzokrin tümörlerin büyük kısmını duktal adenokarsinomlar oluşturur. Nonduktal adenokarsinomlar nadir görülen tümörler olmakla birlikte değişik morfolojik özellikleri ve biyolojik davranışları ile pankreas tümörleri içinde özel bir yer tutarlar. Pankreasın nonepitelyal tümörleri ve metastatik tümörleri ise çok nadirdir. Pankreasın epitelyal tümörlerinin fenotipleri; glandda normalde bulunan üç tip hücreyi – duktal, asiner ve endokrin – yansıtır. Pankreas tümörlerinin %90'dan fazlasını duktal fenotipe sahip karsinomlar oluşturur.

Son yıllarda pankreas kanserinin patolojisine katkıda bulunan etyolojik faktörler tanımlanmıştır. Bunlar; çevresel, medikal ve cerrahi faktörler, herediter (genetik) faktörler ve mesleki temastır.

1) ÇEVRESEL FAKTÖRLER : En önemlisi tütün kullanımı ile pankreas kanseri arasındaki bağlantıdır. Tütün kullananlarda kullanmayanlara göre pankreas kanseri gelişme riski 2 kat daha fazladır. Rivenson ve arkadaşları (17) ratlara tütün spesifik nitrozaminleri enjekte ettikten sonra pankreas kanseri oluştuğunu gösterilmişlerdir. Bu karsinogenler elektrofille metabolize olur ve DNA'nın yanlış kodlanmasını aktive eder, k-ras gibi spesifik onkogenlerin aktivasyonunu sağlar. Pankreas kanseri vakalarının yaklaşık %30'u tütün içimi ile bağlantılıdır (18-20). Tütün kullanımının kesilmesi ile risk azalmaktadır. Yine safra asit içeriğindeki değişiklikler (21), kolesistokinin (CCK) seviyeleri (22) ve diet (23) bu sistem aktivasyonunda etkili faktörlerdir. Diyetle fazla miktarda yağ ve et tüketimi riski artırırken, sebze tüketimi ise riski azaltmaktadır (24).

2) MEDİKAL VE CERRAHİ FAKTÖRLER : Diabetes mellitus, kronik pankreatit ve üst gastrointestinal sistem cerrahisi önemli yer tutmaktadır. Diabet, pankreas kanserinin erken semptomlarından ve predispozan faktörlerinden biridir (25). Pankreas kanseri olgularında periferik insülin rezistansı oluşmaktadır ve yapılan kohort analizlerinde geç başlangıçlı diabetin pankreas kanseri oluşumunda risk faktörü olduğu gösterilmiştir .

Pankreatit ve pankreas kanseri arasındaki ilişki çok net değildir. İtalya'da yapılan bir kohort çalışmasında pankreas kanseri tanısı alan olgularda kronik pankreatit öyküsünün pankreas kanseri gelişimi bakımından yüksek risk faktörü olduğu gösterildi (26). Klinik çalışmalarda pankreatitin kronik formunda oluşan kalsifikasyonlar kanser oluşumunda sorumlu tutulmuştur (27). Ayrıca pankreas kanserinde önemli bir onkogen olan k-ras mutasyonunda, kronik pankreatitli hastalarda mukoz hücre hiperplazisi olan bölgelerde saptanmıştır (28). Peptik ülser cerrahisi uygulanan hastalarda da pankreas kanseri riski artmaktadır (intestinal bakteriler tarafından N-nitrozo bileşiklerinin yapımının artması sonucu). Hayvan deneylerinde, kronik duodenogastrik reflünün kalıcı hipergastrinemi oluşturarak pankreas kanseri karsinogenezisini başlattığı gösterilmiştir (29). Yine kolesistektomi sonrası kanda CCK yükselmesinin de karsinogenezisi başlattığı gösterilmiştir (30, 31).

3) HEREDİTER (GENETİK) FAKTÖRLER: Nadir görülen hereditör hastalıklar hem endokrin hem ekzokrin pankreas kanserinde predispozan rol oynar. Bunlar; MEN tip 1 (32), hereditör pankreatitis (33), Lynch sendromu 2 (34), Von-Hippel-Lindau sendromu (35), ataksi talenjektazi (36) ve ailesel atipik multipl mole melanoma sendromu (37). Bir olgu kontrol çalışmasında pankreas kanserinde hereditör olma olasılığı %3 olarak bulunmuştur (38). Yine hereditör pankreatitli hastalarda pankreas kanseri riski 50 kat artmakta ve yaşam boyu kümülatif riskin %30-40 olduğu bilinmektedir. Hereditör pankreatite neden olan gen, tripsinojenin prematür aktivasyonu sebebiyle kromozom 7'de lokalize bir hastalıktır (39). Tripsinojen bir onkogen olmamasına rağmen gelişen kısa mutasyonlar pankreas kanseri için risk faktörü oluşturmaktadır. Pankreas kanserinde %5-10 oranında kalıtsal genetik hastalıkların rolü olduğu bildirilmektedir. Yaygın olmamasına rağmen, germline mutasyonlar potansiyel olarak pankreas kanserinin çeşitli tiplerine ışık tutmaktadır. Ailesel atipik multipl mole sendromunda pankreas kanserine yakalanma riski 22 kat artar ve bu hereditör sendromda dominant geçişli p16 germline mutasyonu olduğu bildirilmektedir (40). BRCA-2 mutasyonu pankreas kanserinde rastlanır ve bu mutasyonu taşıyan olguların yaşam boyu pankreas kanseri olma riski %5'den azdır (41, 42).

4) MESLEKSEL TEMAS : Bazı meslek gruplarında kimyasal ajanlara bağlı pankreas kanseri daha yüksek oranda ortaya çıkmaktadır. Metal, kömür, kimyasal madde ve nükleer santral işçilerinde, solventlerde, DDT, petrol ürünleri, betanaftilamin, benzidin gibi maddelere maruz kalanlarda daha yüksek bir risk dikkati çekmektedir. Bu kimyasal maddelerin etkisi kanıtlanmış olup yirmiden fazla kimyasal madde ile deneysel pankreas kanseri oluşturulabilmektedir (43).

### C) PATOLOJİ :

İnsan pankreasında duktal hücreler, asinar hücreler ve endokrin hücreler olmak üzere 3 çeşit hücre dizisi bulunmaktadır.

Pankreas karsinomlarının yaklaşık olarak %90'ı duktal adenokarsinom tipindedir (44, 45). Tümörlerin 2/3'ü pankreas başı, diğerleri ise gövde ve kuyruk lokalizasyonundadır (46). Duktal karsinomlar histolojik olarak iyi, orta ve az



diferansiye tümörler olarak sınıflandırabilir. Pankreatik duktal karsinomların nadir görülen varyantları da tarif edilmiştir. Bunlar arasında adenoskuamöz karsinom (47), indiferansiye (anaplastik) karsinom, papiller karsinom (48), müsinöz adenokarsinom (44) ve mikroglandüler adenokarsinom (45) yer almaktadır.

#### **D) KLİNİK BULGULAR :**

Erken dönem semptomları kuşkulu olup hastalığa özgü değildir ve gastrointestinal bir hastalığın semptomları gibidir. Epigastrik bölgede ağrı, iştahsızlık, halsizlik gibi semptomların ya üzerinde durulmaz ya da başka hastalıklarla ilişkilendirilir. Hastalığa özgü semptomlar çevre organ invazyonu veya obstrüksiyonu sonucu gelişir. Örneğin, safra yolu invazyonu ile tıkanma sarılığı ortaya çıkar. Sarılığın pankreas başı kanserinde sık görülmesine karşılık korpus ve kuyruk kanserlerinde görülme sıklığı %5-6'dır. Sarılık bazen tek bulgu olabilir ve hastaların %10'unda dalgalanma gösterir. Pankreas kanserinde "ağrısız sarılığın" hastalığın bir özelliği olduğu uzun yıllar ileri sürülmüşse de hastaların önemli bir kısmında ağrı vardır. Ağrı, kilo kaybı ve sarılıkla beraber klasik triadı teşkil eder. Ağrının kaynağı perinöral infiltrasyon, kanal obstrüksiyonu ve stenozdur. Başlangıçta ağrı, üst kadranda hissedilen düşük şiddette bir ağrıdır. Ülser ağrısı zannedilebilir. Zamanla devamlı bir hal alan, sırta ve bele vuran şiddetli ağrı çöliyak ve superior mesenterik pleksusun tutulmasına bağlı ilerlemiş hastalığı ifade eder. Pankreas kanserli hastaların bir bölümünde diyabet dikkati çeken bir bulgu olarak kabul edilmektedir. Kırk yaşın üstünde, obes olmayan bir hastada ani ortaya çıkan veya önceden var olup da kontrol edilemez hale gelen diyabet pankreas kanserini düşündürmelidir (49). Nedeni açıklanamayan pankreatitlerde de pankreas kanseri akla gelmelidir.

#### **E) EVRELEME :**

Tümörün evrelemesi, hastalığın prognozu açısından önemli bir faktördür. Pankreas kanserinin klinik ve patolojik evrelemesinde standart bir sistem tam anlamıyla oluşturulamamıştır. 1992 yılında "American Joint Committee on Cancer (AJCC)" tarafından TNM sınıflamasının son şekli oluşturulmuştur. Bu

klirik evreleme sistemi nadiren kullanılır. Çünkü uygulanması zordur. Cerrahi uygulanmaksızın lenf nodu durumu tam değeriendirilemediğinden, evrenin prognoz ve tedavi ile tam korelasyonu olmamaktadır. AJCC sınıflaması Tablo-1'de gösterilmiştir (50).

**Tablo-1 : Pankreas tümörlerinde TNM sınıflaması**

**T Primer tümör**

Tx Yayılım derinliğinin belirlenemediği tümör

To Klinik olarak tümör yok, karsinoma insitu

T1 Tümör pankreasta sınırlıdır

T1a Tümörün en büyük çapı  $\leq 2$  cm

T1b Tümörün en büyük çapı  $> 2$  cm

T2 Tümör duodenuma, safra kanalına veya peripankreatik dokulara doğrudan yayılmıştır

T3 Tümör mide, dalak, kolon veya komşu büyük damarlara doğrudan yayılmıştır

**N Bölgesel lenf bezi tutulması**

Nx Bölgesel lenf bezi saptanmamaktadır

No Bölgesel lenf bezi tutulmamıştır

N1 Bölgesel lenf bezi tutulmuştur

**M Uzak metastaz**

Mx Uzak metastaz bilinmemektedir

Mo Uzak metastaz yoktur

M1 Uzak metastaz vardır

Evre 1 : T1NoMo, T2NoMo

Evre 2 : T3NoMo

Evre 3 : Herhangi bir T, N1Mo

Evre 4 : Herhangi bir T, herhangi bir N, M1

#### **F) PROGNOZ :**

Pankreas kanseri hastalığın yaygınlığına göre sıklıkla, lokalize, lokal ileri ve metastatik hastalık olarak sınıflandırılmaktadır. Ortalama sağkalım klinik evrelere göre sırasıyla 11-18 ay, 10-12 ay ve 5-7 ay olarak bildirilmektedir (51).

Serum tümör belirleyicilerinin düzeyi, tümörün boyutları, lenf nodu tutulması, uygulanan cerrahi girişim tipi, kan transfüzyonu, yakın damar tutulması, tümörün multipl yerleşim göstermesi, anöploidi prognoza etkili faktörler olarak ileri sürülmüştür (52-55). Lenf nodu tutulması en önemli prognostik faktördür. Lenf nodu tutulumu olan vakalarda medyan sağkalım 11 ay iken, negatif olanlarda 55 ay olarak bulunmuştur (53, 56). Cerrahi sınırda tümör saptanması da prognoz açısından önemli bir faktördür. Bir çalışmada cerrahi sınırı negatif olan vakalarda 5 yıllık sağkalım %26, pozitif olan vakalarda %8 olarak bulunmuştur. Farklılık bulunmayan sonuçları da bildirilmiştir (54, 56, 57).

#### **G) TEDAVİ :**

Pankreas kanseri agresif gidişli, öldürücü ve günümüzde halen daha radikal tedavisi mümkün olmayan inkübrabl kanserler arasındadır. En etkili tedavisi cerrahi eksizyondur, fakat çoğu hasrada erken dönemde tanı pek mümkün olamamaktadır. Ancak çok küçük hasta grubunda mümkün olup bu hastalar küratif cerrahi girişim için uygundur.

#### **H) PANKREAS KANSERİNİN MOLEKÜLER PATOGENEZİSİ**

Pankreas kanserinin molekül analizi, hızlı infiltratif büyüme ve dokuda oluşturduğu güçlü desmoplastik ve inflamatuvar yanıtı kompleksidir. Pankreas kanserinin molekül temelleri hakkında son yıllarda önemli bilgiler elde edilmiş, hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını denetleyen sinyal yollarında görev alan büyüme faktörleri ile bunların reseptörleri ve bazı tümör baskılayıcı genlerde mutasyonlar ile bu genlerin inaktivasyonu saptanmıştır. Bu moleküler olayların anlaşılması tanı ve prognozda yol gösterebileceği gibi tedavisine de ışık tutacaktır.

Karsinogenezisin temel mekanizmalarının anlaşılmasına yönelik en önemli bilgiler tümör virüslerinin incelenmesinden elde edilmiştir. Kansere

neden olan DNA tümör virüslerine ek olarak, RNA virüslerinden retrovirüsler de onkojenik potansiyel taşır. Bunlar, hücrede ters revers transkriptaz enzimi yardımıyla provirüse dönüşerek hücre genomuna yerleşir ve hücre DNA' sı ile birlikte çoğalırlar. Onkogenler ve tümör süpressör genler karsinogenezişte önemlidir. Onkogenlerin denetimsiz çoğalmaya neden olmaları bunların hücresel karşıtları olan protoonkogenlerin de, hücre çoğalmasını denetleyen sinyal yollarında görev aldığını ima etmiştir. Sis geninin platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), erbB' nin ise epidermal büyüme faktörü ailesinden bir proteini kodladığının gösterilmesiyle onkogenler ve büyüme faktörü sinyal yolları arasında ilk bağlantılar gözlenmiş, daha sonra aktif çoğalma sinyalini hücre yüzeyinden çekirdeğe ulaştıran karmaşık sinyal yolları belirlenmiştir.

İnsan tümörlerinde hücresel onkogenler değişik mekanizmalarla aktiveleşebilir. Genel olarak bu olayın sonucunda ya normal gen ürününün miktarında artış, ya da proteinin işlevini değiştiren yapısal değişiklikler ortaya çıkar. Protein miktarında artış, gen amplifikasyonu ya da ekspresyon artışı (transkripsiyonun regülasyonunda bozulma yüzünden gen ekspresyonunda hızlanma) şeklinde görülebilir.

Pankreas kanserinde moleküler değişiklikler prognozda ve tedavi yanıtında önemlidir. Pankreas kanserinde büyüme faktörleri (GF) ve büyüme faktörü reseptörlerinin (GFR) ekspresyonu artmıştır. Yine tümör süpressör genlerin (p53, p16 ve SMAD4) inaktivasyonu ve onkogenlerin (k-ras ve cyclin D1) aktivasyonu karsinogenezişte önemli rol oynar.

İnsan kanserlerinde onkogen aktivasyonunun en çarpıcı örneklerinden biri duktal pankreas kanserlerinde K-ras geninde gözlenen mutasyondur. K-ras'ın 12,13 ve 61. kodonlarında görülen nokta mutasyonları malign fenotipe farklılaşan transforme hücre kapasitesine sahip olan protein ürünlerinin ekspresyonuyla sonuçlanır. Adenokanserlerin %75' inde K-ras geninin 12. kodonunda mutasyon görülür (58). Mutasyonların insitu ve küçük tümörlerde görülmesi, K-ras geninde aktivasyonun pankreas tümörlerinin erken evresinde gerçekleştiğini göstermektedir (59). K-ras mutasyonları tümöre spesifik olup kronik pankreatitlerde görülmediğinden özellikle sitolojik preparatlarda mutasyonların saptanması tanıya yardımcı olabilmektedir (60). Ayrıca ilginç bir

şekilde pankreas kanserinde ve adenokarsinomlarda sık rastlanan bu mutasyon, ampulla vater tümöründe çok daha az sıklıkta izlenmektedir (61).

Siklin D1 hücre siklusunda regülatör görevi olan onkoprotein aktivitesinde de rol oynayan bir onkogendir. D tip siklinler, yine G1 fazında etkili diğer bir tümör süpressör gen olan retinoblastoma genini fosforilasyonunu inaktive ederek hücre siklusunun ilerlemesi için gerekli genlerin aktifleşmesini sağlar. Ayrıca, siklin bağımlı kinaz (cdk) inhibitörleri (p16, p18, p27 vb) ile bu kompleks inhibe olur ve retinoblastoma geni E2F denen transkripsiyon faktöründen ayrılıp fosforile olur ve hücre siklusu G1 fazında durur. Yapılan bir analizde pankreas kanserinde %65 oranında immünohistokimyasal olarak siklin D1 fazla salınımı saptanmıştır ve sağkalımın kısa olması ile korele bulunmuştur (62).

Hemen tüm duktal adenokarsinomlarda büyüme faktörlerinden epidermal büyüme faktörü (EGF) reseptörünün aşırı ekspresyonu gözlenir (63). Bu reseptör hem EGF hem de transforming büyüme faktörü (TGF- $\alpha$ ) ile etkileştiğinden pankreas kanserinde bu moleküllerde de anomaliler görülür. Aşırı ekspresse olan TGF- $\alpha$ , yüksek sayıdaki EGFR ile etkileşerek otokrin bir uyarı oluşturur (64). Çeşitli çalışmalarda, büyüme faktörlerinin yüksek seviyeleri ile hastaların sağkalımlarında kısalma arasında korelasyon bulunmuştur (65, 66).

Tüm gastrointestinal sistem epitelinde onarımdan sorumlu hücre soylarında gözlenen bir protein olan pS2 pankreas kanserlerinin %75' inde saptanır (67).

HER-2 (c-erb B2) insan solid tümörlerinde ortak özellik olarak gözlenen ve sonuçları bilinen moleküler anormalliklerin protipidir. Bu gendeki değişikliklerin bilinen kötü prognostik özellikler ile ilişkisi ve bu moleküler değişikliğe karşı hedefe yönelik tedavi geliştirilme olanağı genin yeni bir tedavi hedefi olarak önemini vurgulamaktadır. c-erb B2, EGFR ile büyük benzerlik taşıyan ve tirozin kinaz aktivitesine sahip transmembran glikoproteinini kodlar ve reseptörü aktifleştirir. Sonuçta, pankreas kanserinde nedeni tam bilinmemekle birlikte büyüme stimülasyonunu sağlar. Duktal adenokanserlerin beşte birinden fazlasında erb B2 reseptörünün (68), %90' nında da erb B3 reseptörünün (69) aşırı ekspresyonuna rastlanır.

Pankreas kanseri hücre soylarının %40' ında başta bazik fibroblast büyüme faktörleri (bFGF) olmak üzere diğer FGF ile bunların reseptörlerinin birlikte, %30' unda da yalnız reseptörlerin ekspresse olduğu bildirilmiştir (70).

Pankreas kanserinin %60' ında tümör süpressör gen olan, p53 geninde mutasyonlar bildirilmiştir. Hücre siklusu regülasyonunda normal p53 proteininin fonksiyonu genomik stabilitenin kontrolü ve kontrollü hücre ölümünün sağlanmasıdır. Yani bir transkripsiyon regülatörü olarak görev yapan bir proteini kodlar. Hücrede mutasyon veya hasar oluştuğu zaman p53 proteini çekirdekte birikir ve bir başka siklin bağımlı kinaz (cdk) inhibitörü olan p21' in sentezini başlatır. P21 bir yandan cdk-siklin inhibe ederek, diğer yandan da proliferasyonu sağlayan nükleer antijene (PCNA) bağlanıp siklusu G1 fazında durdurur ve hasarın onarılmasına olanak verir. Hasar onarılamadığı takdirde p53 aracılı hücre ölümü başlar. P53 işlevi yerine getirelemediği takdirde hücrede hasar ortaya çıktığından ve siklus durmadığından dolayı mutant p53 birikir. Genom giderek daha instabil hal alır.

Siklinler hücre siklusunda görev alan proteinlerdir. Cdk ise, uygun siklinlere bağlandıklarında aktivite kazanan ve diğer siklus proteinlerini fosforlayan katalitik proteinlerdir. Sonuçta, siklin-cdk kompleksi oluştuğunda, geçici olarak hedef substratlar aktive olur. Cdk inhibitörleri, siklin assosiyasyon protein kinaz aktivitesini inhibe ederler ve farklılaşma ile programlı hücre ölümünde rol oynar.

Mutant p53' de fonksiyon yapabilme yeteneği kaybolmuştur. Normal koşullar altında normal p53 proteini nükleus içinde tespit edilmez. Fakat genin 5 ve 8. eksonlarında gerçekleşen bu mutasyonlar p53 proteininin yarı ömrünün uzamasına bağlı olarak birikimi ile sonuçlanır ve immünohistokimyasal olarak tespit edilir (71). Pankreas kanserlerinde p53 geninde nokta mutasyonları ile normal allel kayıpları sık görülmesine karşın kromozom 17q' yu kapsayan heterozigotluk kayıpları ender görülür.

Pankreas kanserinde rolü olan diğer bir tümör supressör gen p16' dır. P16 siklin bağımlı bir kinaz inhibitörüdür. Cdk4-siklin D ve cdk6-siklin D komplekslerine bağlanıp inhibe eder ve hücre siklusunu G1' de durdurur. P16 ekspresyon kaybı, pankreas kanseri hücre serilerinde ve xenograftların %85' inde saptanmıştır (72). Diğer supressor genlerden p21<sup>waf1</sup>, retinoblastoma,



INK4 cdk inhibitörü olan proteinleri kodlayan ve insan kanserlerinin moleküler karsinogenezisinde önemli olan genlerdir.

Pankreas kanserinde yeni keşfedilen tümör supressör genlerden bir diğeri deleted pancreatic cancer -DPC4- (smad4) dır. Transforming büyüme faktörü (TGF- $\beta$ ) sinyal yolunun önemli komponentidir. Fonksiyonu, epitelyal hücre büyümesinde, differansiyasyon ve apoptozis öncülüğünde down-regülatör rol oynar (73, 74). Yapılan bir çalışmada, pankreas kanserinin %30' unda smad4' ün homozigot kaybı gösterilmiştir. Ayrıca heterozigozite kaybı ile ve intragenic mutasyon yolu ile (%20 oranında gözlenir) inaktivasyonunda gösterilmiştir (75).

Pankreas kanserinde ve diğerk birçok hematolojik ve solid kanserlerin patogenezinde, tedaviye yanıtında ve prognozunda apoptozis, apoptozis inhibisyonu ve çoklu ilaç direnci mekanizmaları önemli rol aldığı bilinmektedir.

## APOPTOZİS

Hücre yaşamı ve ölümü arasındaki denge doku homeostazisinde önemlidir. Klinik açıdan programlı hücre ölümü (apoptozis), gerek hücre kaybının yüksek olduğu dejeneratif ve viral hastalıklarda gerekse hücrelerin bu programa karşı direnç geliştirdikleri kanserde dikkat çekmektedir. Programlı hücre ölümündeki anormallikler karsinogenezisde önemli rol oynar (76,77).

Biyolojik ve morfolojik olarak tanımlanmış 2 tip hücre ölümü tanımlanmıştır. Apoptozis ve nekroz (78). Nekroz, hücrelerde iskemi, yüksek ısıya maruz kalma ve enfeksiyon gibi biyolojik, fizik ve kimyasal aksidantel etkilerle ortaya çıkan patolojik hücre ölümüdür. Burada hücrede mitokondri, golgi aparatı gibi önemli organellerde şişme, hücre membranında bütünlüğün kaybolması öncelikle dikkati çeker. Bu hücre ölümünü çok defa enflamatuvar bir cevap izler. Buna karşın apoptoz (sonbaharda ağaç yapraklarının dökülmesi anlamında Yunanca bir sözcük), programlı (fizyolojik) hücre ölümü olup hücreden hücreye geçen bir özelliktir ve genetik olarak kontrol edilir. Nekroz hücrenin razı olmadığı pasif bir olaydır. Apoptoz ise, hücrenin kendisini öldürmeye karar verdiği ve bunun için çok sayıda yeni protein sentezlerine yöneldiği, genetik olarak kontrol edilen aktif bir olaydır. Bu terminoloji 1972

yılında Kerr ve arkadaşları tarafından (79) hücrede morfolojik özellikleri ile tanımlandı. Apoptoz, hücre hacminin küçülmesi ile başlar; hücre büzülür; sitoplazmik membranda küçük balonlaşmalar olur; nükleus yoğunlaşarak nükleer membrana yarım ay şeklinde çöker; sonra kırıntılar halinde parçalanır. Normalde bu olayı enflamasyon izlemez. Virus, protozoa, bakteri gibi mikroorganizma barındıran hücrelerin ortadan kaldırılması apoptozla sağlanır. Buna karşılık apoptozisin aşırı veya yetersiz nitelikte olması iskemi, otoimmünite, nörodejenerasyon, viral enfeksiyonlar, tümör büyümesi ve gerilemesi gibi çeşitli hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynamaktadır.

Tümör nekrozis faktör (TNF) reseptör ailesi ve tirozin kinaz reseptörleri gibi hücre dışı etkenler veya Bcl-2 proteini ailesi gibi hücre içi etkenlerle oluşturulan hücre yolakları tarafından denetlenen apoptotik hücre ölümünde mitokondrium önemli bir görevle yükümlüdür. Apoptotik bir uyaran karşısında mitokondriden salınan sitokrom-c, hücreleri dönüşü olmayan bir yola sokmakta ve kaspaz proteinlerinin aktivasyonu ile de intihar sürecini geri dönüşümsüz olarak başlatmaktadır.

Apoptoziste hücrenin ölümünün inhibisyonu veya aktivasyonunu regüle eden çok basamaklı kaskad proteinleri vardır. Bcl-2 ailesi içinde, apoptozu önleyenler (bcl-2, bcl-XL, bcl-w, Mcl-1, A1, bag-1) ve apoptozisi indükleyenler (bax, bak, bcl-x, bad, bid, hrk) olmak üzere iki grup apoptoz regüle edici gen yer alır.

Apoptoziste işleyen başlıca dört mekanizma vardır:

1. Tumor necrosis factor (TNF)-TNFR yolu
2. Fas-FasL yolu
3. Hücre içi stres yolu
4. Granzim-perforin yolu.

Karakteristikleri oldukça iyi aydınlatılmış apoptotik sinyalizasyon yollarından biri, TNF- $\alpha$ , TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand; Apo-3L) ve hücre yüzey reseptörleri olarak TNFR-1, DR (death receptor) serisi (DR3, DR4, DR5) reseptörlerinin ligasyonu ile oluşan apoptoz mekanizmasıdır. TNF ailesi içinde yer alan Fas ve TNFR-1 yaklaşık 80 aminoasitten oluşan ve "ölüm domeni" denen sitoplazmik domenlere sahiptir. TNFR-1 ve DR3 için adaptör protein, TRADD (TNFR-associated death domain protein), Fas ve DR4



için FADD (Fas-associated death domain protein) dir. Adaptör proteinler DED (death effector domain) denen domenlere sahip olup, bunlar aracılığı ile kaspazlarla ilişkidirler.

Kaspazlar spesifik aspartik asit kalıntılarından oluşan ve zimogen (proenzim) olarak sitoplazmada bulunan, sistein proteazlardır (80). Apoptotik sinyali alınca proteolitik işlemle aktive olurlar ve hücre ölümünde önemli rol oynarlar. Günümüzde 10'dan fazla kaspaz saptanmıştır. Başlıca 3 tane alt gruba ayrılır. kaspaz- 1 (ICE), kaspaz-2 (ICH-1) ve kaspaz-3 (CPP32) (80, 81, 82). Bunlar yukarıda bahsettiğimiz reseptörler ve adaptör proteinleri yolu ile aktifleşir.

1995 yılında Fas (CD95; APO-1) adı verilen protein molekülünün apoptozisi indükleyerek immün cevabın regülasyonunda önemli rol oynadığı belirlendi. Fas, TNF ve NGF reseptörleri lenfoid hücreler dahil, birçok hücre yüzeyinde ekspresse olur ve sitotoksik T lenfositteki ligandı ile bağlandığında hedef hücreyi apoptoze götürür. Fas-FasL yolu sıklıkla kanser hücrelerinde ekspresse olmasına rağmen, Fas/CD95 mediated apoptoze rezistans pankreas kanserinde vardır (83). Bu olay sayesinde immün ataktan kurtulmaktadır.

Hücre içi streslerle tetiklenen hücre ölümü modelinde mitokondri apoptozun gerçekleşmesinde santral rol oynar. Çeşitli stres sinyalleri tarafından mitokondride indüklenen pro-apoptotik Sitokrom-c' nin salınımı söz konusudur. Böylece aktifleşen kaspaz-9, özellikle anahtar öneme sahip kaspazlardan biri olan kaspaz-3' ü etkinleştirir. CD-95 aracılı apoptozda aktive olan kaspaz-8, bcl-2 ailesinden bid, bad, bax gibi proapoptotik molekülleri aktifleştirince mitokondriden sitokrom-c' nin salınımı indüklenir ve kaspaz-9 aktive olur. Buna karşılık bcl-2 ailesi içinde yer alan anti-apoptotik moleküller (bcl-2, bcl-xl, bcl-w, bag-1) muhtemelen mitokondrial membranları stabilize ederek ve sitokrom-c salınımını inhibe ederek kaspazları ve apoptozu baskılar.

Perforin-granzim yolunda 2 sitoliz mekanizması iyi bilinmektedir. Perforine bağımlı (granül eksositozu ile) ve perforine bağımsız (Fas-FasL aracılığı ile). Lenfosit aracılığı ile ve granzim-bağımlı apoptoz, sitolitik hücrenin hedef hücreye teması ile başlar. Öldürücü lenfositler, "perforin" ve "granzim" denen sitolitik mediyatörleri (serin proteazlar) taşıyan, lizozom benzeri

sitoplazmik granüllere sahiptir. Hücreler aktive olunca, granüller plazma membranına doğru hareket ederler; membranla birleşirler ve granül kapsamı hedef hücreye doğru boşalır. Bu granüllerde yer alan bir glikoprotein olan perforin monomerleri, Ca iyonları varlığında hedef hücrenin plazma membranında agregasyon yaparak membrana girerler ve polimerize olarak, aralarında porlar oluştururlar.

Apoptozisin varlığının doku ve hücre düzeyinde çeşitli testlerle güvenilir bir şekilde gösterilebilmesi klinik uygulamalar için önemli bir gelişme olmuştur. Günümüzde apoptozisin tanınması için apoptotik hücrelerin morfolojisinden, DNA kırıklarının varlığından, kaspaz aktivasyonlarının saptanmasından, hücre membranı ve mitokondrilerde ortaya çıkan değişikliklerden ve antikora dayalı yeni işaretlerden faydalanılmaktadır. Sonuçta bu basamakların aşağıdaki tekniklerle moniterize edilebileceği gösterilmiştir.

Bunlar :

- 1) Mikroskopik teknikler (ışık, lazer, elektron mikroskopisi ve DNA' nın floresan boyanması ile nükleer morfolojik analiz)
- 2) DNA fragmantasyonlarının ölçülmesi (-ELISA-, terminal deoxynucleotidyl transferase - mediated deoxyuridine triphosphate - biotin nick end labeling assay -TUNEL-, Gel elektroforez )
- 3) Flow cytometry ve laser scanning cytometry
- 4) Gene expression analysis (reverse transcriptase polymerase chain reaction -RT-PCR-, Northern blot)
- 5) Apoptozis ile ilişkili proteinlerin ölçülmesi ( ELISA, Western blot )

## **SURVİVİN**

Apoptozis supresyonu uzun süren hücre canlılığı, karsinogeneze ve gen mutasyonlarına katkı ile karsinoma progresyonunda immün aracılı sitotoksiste rezistansını artırarak etkili olur (84). Bcl-2 ailesi apoptozisi inhibe ettiği gösterilen ve hücrelerin sağkalımının uzun olmasını sağlayan ilk inhibitör protein ailesidir (84). İnhibitör apoptotik proteinler (IAP) orijinal olarak baculoviruslardan identifiye edilmiştir (85). İnsanlarda IAP' lerin ekspresyonları çeşitli stimuluslara neden olur. Günümüzde insanda yedi tane homolog IAP

klonlandı. Bunlar; NAIAP, cIAP1, cIAP2, x-chromosome linked IAP (XIAP), survivin, apollon ve livin (85-90). Bu proteinlerin ana rolü caspas 3 ve 7' nin direk inhibisyonu yolu ile apoptozisin supresyonudur (91, 92).

Survivin yeni tanımlanan iAP' dir (85). Embriyonik ve fetal dokularda ekspresse olur fakat diferansiyasyonunu tamamlamış normal adult dokuda timus haricinde tespit edilmez (85). Akciğer, kolon, pankreas, prostat, meme ve yüksek grade non-hodgkin lenfoma gibi çeşitli insan kanserlerinde tekrar ekspresse olur (85). Survivin ilk bulunan apoptoz inhibitör proteindir ve hücre siklusunun G2-M fazında ekspresse olur. Ayrıca mitotik iğ mikrotübülleri ile direk ilişkidir. Mikrotübül yıkıcı ajanlarla survivin-tübülün ilişkisinin inhibisyonu, kaspaz 3 aktivasyonunun artması ve G2-M fazındaki apoptozisin artması ile sonuçlanır (85, 93). Gastrointestinal kanserler arasında ilk immünohistokimyasal çalışmalara bakıldığında, gastrik kanserlerde %34 (94), kolon kanserlerinde %53 (95), pankreas kanserlerinde %77 (96) oranında survivin ekspresyonu saptanmıştır. Survivin'in insan kanserlerindeki apoptozisin inhibisyonu rolüne ek olarak, hücresel proliferasyonun düzenlenmesi (97) ve angiogenezisde rolü vardır (98). Bir çalışmada survivin pozitif tümörlerde apoptotik indeks %0.62, negatif tümörlerde %0.97 bulunmuştur (94). Survivin ekspresyonunun prognostik değeri çeşitli insan kanserlerinde rapor edilmiştir (99). Örneğin bir çok otör, nüks eden kolorektal kanserlerde survivin ekspresyonunu PCR yöntemi ile (100) veya immünohistokimyasal (101) olarak rapor etmişlerdir. Yine kolorektal karsinomada survivin ekspresyonu ile düşük apoptotik indeks koreledir ve bu vakalarda 5 yıllık sağkalımda anlamlı kısalma gözlenmiştir (95, 100).

Survivin çeşitli apoptotik stimuluslara karşı bir aktivite oluşturur. Örneğin; IL3' ün geri çekilmesi, fas stimülasyonu, kaspaz 3,7,8, Bax'ın fazla salınımı ve etoposid gibi kemoterapötik ilaçların etkilerini baskılar (85, 102). Potansiyel terapötik rolü, survivin transfekte hücrelerde, antikanser ilaçlarla apoptozise rezistans rapor edilmesi ile daha iyi anlaşılmıştır (102). Yine, antisense tedavi ile de kemoterapiye duyarlılık elde edildiği gösterilmiştir (103).

Bir başka çalışmada pankreas kanserlerinde %88 oranında survivin ekspresyonu tespit edilmiştir (104). Survivin ekspresyonu ile pankreas adenokanserinin hiçbir patolojik ve klinik karakterleri arasında korelasyon

saptanmadığı (104) benzer sonuçların mide (94), kolorektal (101) ve meme (105) kanserinde de bulunduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada ise pankreas kanserinde survivin ekspresyonu ile proliferatif indeks arasında pozitif korelasyon saptanmıştır (104). Bu korelasyon hepatosellüler kanserli vakalarda saptanmamıştır (106). Survivin ekspresyonu, nonneoplastik asiner parankim ve pankreatik duktus epitelinde negatif bulunmuş (104), diğer küçük olgu serileri ile benzer sonuçlar göstermiştir (96). Yine aynı çalışmada yüksek skorda survivin ekspresyonu ile düşük apoptotik indeks sınırlı sayıda ampulla kanserinde tespit edildi (104). Ayrıca langerhans adacık hücrelerinin bir kısmında da immünohistokimyasal olarak tespit edildi (104).

Son yıllarda survivin ile cdk 4 arasında bir bağlantı olduğu gösterilmiştir. Survivin – cdk4 kompleksi ile serbest kalan p21 mitokondrial prokaspaz 3 ile bağlantıya geçer (107). Bu yolla survivinin antiapoptotik etkisi kaspaz 3 indirek inhibisyonu yoluyla gerçekleşmektedir. Bunun yanında hepatosellüler kanser hücrelerinde hücre siklus progresyonunda promotör olarakta rol aldığı gösterilmiştir. Aynı zamanda survivin fazla ekspresyonu hücre siklusunda S faza geçişi akselere eder ve G1 arrestine direnç geliştirir (108).

## **ÇOKLU İLAÇ DİRENCİ (MULTIDRUG RESISTANCE - MDR)**

Çoklu ilaç direnci, tümör hücrelerinde yapıları ve etki mekanizmaları birbirinden farklı olan ve daha önce karşılaşılmayan kemoterapötik ajanlara karşı çapraz direnç gelişmesidir. MDR' dan sorumlu olan mekanizmalar iki ana grupta sınıflandırılmaktadır (109).

### **1- Klasik MDR (Acquired MDR)**

### **2- De novo MDR (Cell Adhesion Mediated MDR, CAM-DR)**

Klasik MDR; hücre içinde kemoterapötik ilaç birikiminin azalması, ilacın hedef molekülü ile ilgili değişiklikler, DNA tamir mekanizmalarının hızlanması ve apoptotik sinyal iletiminin inhibisyonu sonucu gelişir.

De novo MDR; hücre çoğalmasının inhibisyonu, ilacın hedef molekülü ile ilgili değişiklikler, apoptozisin azalması, integrin sinyal iletimi ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi ile ilişkili olaylar sonucu gelişir.

Tümöre ait mikroçevrenin kanserin patogeneğinde ve ilerlemesinde etkili rol oynadığı bilinmektedir. Sitokinler, hormonlar ve büyüme faktörleri, tümör hücrelerinin birbirleri ile etkileşimi ve/veya ekstrasellüler matriks bileşenleri ile etkileşimleri sonucu kanserin ilerlemesine katkıda bulunabilirler. Bu endojen faktörler, başlangıç tedavisinden sonra tümör hücrelerinin canlılıklarını sürdürmeleri, dirençli hücrelerin çoğalmaları ve klasik ilaç direnci ile karşılaşılmasını kolaylaştırıcı rol oynayabilirler.

#### **1- Klasik MDR mekanizmaları :**

a-) *Hücre içinde kemoterapötik ilaç birikiminin azalması:* Tümör hücrelerinde ilaç direncinden sorumlu proteinlerin aşırı sentezlenmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu direnç proteinleri; P-glikoprotein (P-gp, MDR1 / P-170), MDR ile ilişkili protein (MDR associated protein, MRP / P-190), akciğer direnci ile ilişkili protein (Lung resistance-associated protein, LRP) ve meme kanseri direnç proteini (Breast cancer resistance protein, BCRP) dir.

P-gp ATP-Binding-Casette (ABC) proteinleri ailesinde yer alan 170 kDa ağırlığında integral bir zar proteinidir. Bu proteinin yapısında 1280 aminoasit bulunmaktadır. Hücre zarında 12 transmembran bölge oluşacak şekilde yerleşim gösteren P-gp iki ATP bağlama bölgesi içerir (110). P-gp substratı olan ilaçlar lipofilik yapıdadır. Bu ilaçlar hücre zarını pasif difüzyon yolu ile geçerler. İlaç bağımlı ATPaz aktivitesine sahip olan protein, ilaçları genellikle zardan geçerken yakalar ve hücre dışına atılmalarını sağlayarak hücre içinde ilaç konsantrasyonunu azaltır. İlacın hücre dışına atılması kompetitif inhibisyon yoluyla önlenabilir. Bu modölatörler arasında kalsiyum kanal blokerleri (verapamil), siklosporin-A (CsA) ve CsA analogu olan SDZ PSC – 833 yer almaktadır.

P-gp' in substratı olan antitümöral ilaçlar; antrasiklinler, vinca alkaloidleri, epipodofilotoksinler, mitomisin-C, taksol, topotekan, mitramisin ve aktinomisin-D olarak bilinmektedir. P-gp, karaciğer safra kanallülülerinde, ince ve kalın barsakta, böbrek proksimal tübül epitelinde, adrenokortikal hücrelerde, uterus, beyin ve testis kapiller endotelinde, plasentada, bronş epitelinde ve hematopoetik hücrelerde sentezlenmektedir. Normal dokularda ksenobiyotiklerin ve metabolitlerin taşınması, steroid salınımı ve bariyer

oluşturma işlevlerini gördüğü öne sürülmektedir. Karaciğer, böbrek, pankreas ve kalın barsaktan köken alan tümörlerde başlangıçtan itibaren 'P-gp' in ekspresyonunun yüksek olması ve MDR fenotipi ile karşılaşılmaması olağandır. Buna karşılık, orta derecede P-gp ekspresyonu saptanan meme kanseri, yumuşak doku tümörleri, akut ve kronik lösemiler, non-Hodgkin lenfoma ve nöroblastomada bu ekspresyon tedavi öncesi olabildiği gibi kemoterapi sonrası da ortaya çıkabilir (110-113).

Cole ve arkadaşları, P-gp ekspresse etmeyen tümör dizilerinde yeni bir genin aşırı sentezlendiğini bildirerek, bulunan yeni proteine MRP1 / P-190 adı verilmiştir (114, 115). MRP1, aynı ailede yer alan 190 kDa ağırlığında bir proteindir. Akciğer ve kas dokusunda çoğunlukla ekspresse olur. Ayrıca; özefagus, mide, ince ve kalın barsak, mesane, ter bezleri, troid follikülleri, adrenal korteks, testis ve böbrek tübüllerinin epitel hücrelerinde sitoplazmik yerleşim göstermektedir. Kalp, iskelet kası, over ve beyinde de bulunmaktadır. Normalde hücre içinde organeller arası bileşiklerin taşınmasını sağlar. Tümör hücresinde ise, proteinin hücre zarına lokalizasyonu ilaçları hücre dışına pompalama işlevi gördüğünü desteklemektedir. İlaç direnci yüksek olan hücrelerde hücre zarında bulunan bu protein, malign olmayan hücrelerde intrasitoplazmik veziküllerde yerleşim gösterir (116). Bu proteinin substratı olan ilaçlarla etkileşmesi ve hücre dışına pompalanması için glutatyon gereklidir. Glutatyon ilaç veya proteinin tiyol grupları ile etkileştiği ileri sürülmektedir. Antrasiklinler, vinca alkaloidleri ve epipidofilotoksinler MRP1 / P-190 ile etkileşirler. Ayrıca organik anyonik boyalardan kalsein, metal anyonlar, sülfatlar, glukoronatlar ve glutatyon ile oluşturulan bileşikler de hücre dışına pompalamaktadır (117). Bu proteinin fonksiyonu inhibe eden modulatorler arasında organik anyon taşıyıcı inhibitörleri olan probenesid ve MK571, bütyonin sülfoksimin, protein kinaz inhibitörleri staurosporin ve genistein yer almaktadır. CsA, SDZ PSC-833 ve verapamilin etkileri daha zayıftır (118, 119).

Scheper ve arkadaşları tarafından küçük hücreli akciğer kanserleri hücre dizilerinde yeni bir protein tanımlanmış ve akciğer direnç proteini olarak tanımlanmıştır (120). LRP nükleus membranında yerleşmiştir ve nükleositoplazmik taşıma işlevinde rol oynar (121). Hücre dizilerinde ilaç ile inkübasyondan sonra erken evrede bu proteinin indüksiyonu olduğu



gösterilmiştir. Proteinin diğer ilaç direnci faktörleri ile beraber MDR fenotipini indükleyebileceği öne sürülmektedir (122).

BCRP, ilk olarak MCF7 adlı meme kanseri hücre dizisinin mitoksantrona dirençli olan alt dizilerinde tanımlanmıştır (123, 124). BCRP, ABC proteinleri ailesinden olan 72.6 kDa ağırlığında bir taşıyıcı proteindir. Hücre membrarında yerleşim gösterir ve half transporter olarak tanımlanan proteinin sitotoksik ilaçların hücre dışına atılması sırasında homo veya heterodimer oluşturduğu düşünülmektedir (125). Çalışmalarda mitoksantron ve topotekana karşı direncin yanı sıra, doksorubisine ve daunorubisine karşıda çapraz direnç geliştirdiği gözlenmiştir.

*b-) İlacın hedef molekülü ile ilgili değişiklikler :* DNA topoizomera I ve II, DNA üzerinde tersinir olarak tek veya çift zincir kırıkları oluşturarak hücrenin replikasyon ve transkripsiyon olaylarında rol oynar. Bu enzim üzerinden etkili olan ilaçlar, enzim-ilac-DNA kompleksi meydana getirir. DNA topoizomera I ile ilgili kalitatif ve kantitatif değişiklikler bu enzimler ile etkileşen antitümöral ilaçlara karşı direnç gelişmesinde rol oynamaktadır. Antrasiklinler, epipidofilotoksinler ve antrasenedionlar yer almaktadır (126). Ayrıca, enzimatik olarak hücre hasarının tamir mekanizmaları da hızlanabilir.

*c-) DNA tamir mekanizmalarının hızlanması :* Nitrozüre, DNA' da guanin üzerinde metil grubu oluşturarak sitotoksik etki gösterir. DNA hasarının tamirinde rol oynayan MGMT (O6 alkilguanin DNA transferaz) enzimi düzeyi ile nitrozüre duyarlılığı arasındaki ilişki, enzimin ilaç direncinde rol oynadığını desteklemektedir (127).

*d-) Apoptotik sinyal iletiminin inhibisyonu :* Kemoterapotik ilaçlar apoptozis yolu ile hücre ölümüne yol açar. Apoptotik sinyal iletimleri mitokondride gerçekleşmektedir (128). Bcl-2 ailesinde yer alan antiapoptotik etkili Bcl-XI' in kemoterapotiklere bağlı hücre ölümünü önlediği ve MDR gelişiminde etkili olduğu gösterilmiştir (129). Aynı ailede yer alan proapoptotik proteinler Bax ve Bak ile hücre ölümünün indüklenmesi için ise konformasyonel değişikliğe ihtiyaç vardır (130).



**2-) De novo MDR mekanizmaları (CAM-DR) :** Solid tümör hücrelerinin adezyon moleküllerini ekspresse ettikleri ve bu moleküllerin tümörün metastatik sürecinde etkili olduğu bilinmektedir. Adezyon molekülleri (integrinler) aracılığı ile ekstrasellüler matriks bileşenlerine bağlanma kanser hücreleri için koruyucu bir mekanizma olabilir; bu hücreler, kemoterapotik ajanlara veya fizyolojik olarak apoptotik uyarıya maruz kaldıklarında canlılıklarını sürdürerek hastalığın ilerlemesine katkıda bulunabilirler (100).

*a-) Hücre çoğalmasının inhibisyonu :* p27<sup>kip1</sup>, siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan bir proteindir ve hücre döngüsünde hücrelerin G1 fazında birikmelerine yol açar. Solid tümör kültürleri ile yapılan çalışmalarda adezyon aracılı ilaç direnci, p27<sup>kip1</sup> ekspresyonunun 15 kez artması ve hücre çoğalmasının inhibisyonu ile korelasyon olduğu gösterilmiştir (109).

*b-) İlacın hedef molekülü ile ilgili değişiklikler :* Adezyon aracılı ilaç direncinde hedef molekülün hücre içinde yer değiştirmesi söz konusudur. Adeziv hücrelerde, mitoksantron ve etoposid ile inkübasyonundan sonra oluşan DNA zincir kırıklarının ve apoptozisin süspansiyonundaki hücrelere oranla daha az olduğu gözlenmiştir (131). Topoizomeraz II enzim aktivitesinin azalması ve enzimin nükleustan sitoplazmaya geçişi adezyon aracılı direnç gelişiminde rol oynamaktadır.

*c-) Apoptozisin azalması :* Bcl-2 proteinlerinin adezyon aracılı direncin oluşumunda da etkili olduğu ileri sürülmektedir. Adezyon yapan hücrelerde, Bax proteini sitoplazma içinde konformasyon değişikliğine uğramamakta ve mitokondri zarına yerleşim yapmamaktadır. Süspansiyonda kalan hücrelerde ise Bax' ın proapoptotik özelliği korunmaktadır (132).

*d-) Integrin sinyal iletimi ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi :*  $\beta_1$  integrin aracılı adezyon, kaspaz-3 aktivitesini ve apoptozisi inhibe etmektedir. Küçük hücreli akciğer karsinomu hücrelerinde protein tirozin kinaz inhibitörü ile yapılan çalışmada, adezyon aracılı koruyucu etkinin ortadan kalktığı gözlenmiştir.

İntegrin aracılı tirozin fosforilasyonunun, adezyona bağı antiapoptotik etkide önemli olabileceğı öne sürölmektedir (133).

Pankreas kanserinde kemoterapiye rezistans tedavi yanıtsızlığının ve kötü prognozun temel nedenlerindendir. Kemoterapotik ajanlar apoptozis stimölasyon yolu ile etki gösterirler. İnvitro pankreas hücre költürlerinde de tedavide kullanılan gemitabin ve 5-FU kemoterapotik ajanların apoptozisi tetiklemesi yolu ile etki gösterdiği gösterilmiştir (134). Apoptotik proteinlerin tedavi ile yükselmesi tedaviye duyarlılığın iyi olması, antiapoptotik proteinlerin yüksek olması tedaviye yanıtsızlığı göstermiştir.

Pankreas kanserli dokularda p-gp (MDR1), transmembran proteininin bakıldığı prognoz ve sağkalım ile olan ilişkisinin değerlendirildiğı araştırmalar son yıllarda bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, MDR geni yoğun olarak pozitif saptanan olgularda, negatif olan olgulara göre sağkalım oranı istatistiksel olarak anlamlı olmasa da daha düşük saptanmıştır (135).

## HASTALAR VE YÖNTEMLER

Bu çalışmaya Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda tanı almış, parafin bloklarına ulaşılabilen ve immünohistokimyasal (IHK) boyama için yeterli tümör dokusu bulunan 45 pankreas kanserli hasta alınmıştır. Tüm olgulara ait Hemotoksilen+Eosin boyalı arşiv preparatları yeniden gözden geçirilmiştir. Hastaların patolojik verileri patoloji rapor kayıtlarından elde edilmiştir.

Cerrahi sonrası adjuvan tedavi endikasyonu bulunan hastalar, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji-Onkoloji Bilim Dalı ve Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda takip ve tedavi altına alınmışlardır. Hastalarla ilgili klinik verilere, hastane ve bölüm dosyalarının retrospektif olarak incelenmesiyle ulaşılmıştır. Kontrole gelmeyen hastaların bilgilerine evlerine telefon edilerek ulaşılmış ve sağkalım verileri Eylül 2003 tarihi itibarıyla güncelleştirilmiştir.

### **Tedavi**

Hastaların aldıkları tedaviler yalnız cerrahi tedavi, kemoradyoterapi ve yalnız sistemik kemoterapi olarak sınıflandırıldı. Sistemik kemoterapi uygulamaları adjuvan ve palyatif amaçlı tedavi ile tek ajan ve kombinasyon kemoterapisi şeklinde değerlendirmeye alındı.

### **İmmun Histokimyasal Boyama**

Çalışmaya alınan 45 olgudan 40 tanesi primer tümör dokusunda, 5 tanesinde de metastaz izlenen karaciğer dokusunda İHK'sal boyama yapıldı. Olgulara ait parafin bloklar arasından tümörü en iyi örnekleyen alanlar İHK'sal boyama için seçildi. %10'luk formalinde fikse, parafine gömülü bloklardan hazırlanan 5 µm kalınlıktaki kesitler, poli-L-lizin kaplı lamlara alınarak İHK'sal boyama için oda ısısında en az 24 saat bekletildi. İmmun histokimyasal boyama için 49 olguya MDR (Mause Mab Ab 5 Neomarkers, Fremont CA) ve Survivin (Rabbit Pab Ab5, Neomarkers, Fremont CA) 23 olguya ise Ki-67 (Clone MB67, Code No: MS-1006-A, NeoMarkers, Fremont CA) proteinlerine karşı geliştirilmiş primer monoklonal antikorlar kullanılarak streptavidinavidin- biotin-immunperoksidaz yöntemiyle boyama uygulandı. MDR için pozitif kontrol olarak böbrek, survivin için ise mide dokusu kullanıldı. Apoptotik indeksi

belirlemek için ise TUNEL yöntemi (in situ cell death detection kit; POD Roche, Germany) kullanıldı.

### **MDR , Ki-67 ve Survivin için İHK'sal boyama**

Kesitler, 20 dakika ksilolde bekletilerek deparafinize edildi ve azalan alkol serilerinden (%96,%90,%80,%70) geçirilerek rehidrate edildi. Daha sonra %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 dakika uygulanarak endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. Ki-67 antikoru uygulanacak kesitlere tripsin uygulanarak 1 saat etüvde bekletildi. Bu aşamadan sonra tüm kesitler sitrat tampon solüsyonu (10mM, pH 6) içinde özel kaplara yerleştirilerek, mikrodalga fırında üç kez beşer dakika süreyle kaynatıldı ve böylece epitopun açığa çıkması sağlandı. Kesitler 15-20 dakika süreyle oda ısısında soğumaya bırakıldı ve tris solüsyonunda (pH:7.2) 5 dakika yıkandı. Kesitler üzerine MDR (1:100) , survivin (1:200) ve Ki-67 (1/50) primer antikorumu damlatılarak oda ısısında 30 dakika bekletildi. Tris solüsyonunda 5 dakika yıkandı. Kesitlere biotinize antikordan damlatıldı ve 10 dakika bekletildi. Kesitler 5 dakika tris solüsyonunda yıkandı. Streptavidin peroksidaz solüsyonu kesitler üzerine damlatılarak 10 dakika bekletildi. Kesitler 5 dakika tris solüsyonunda yıkandı. Kromojen olarak 3,3'-diaminobenzidinetetraklorür (DAKO, Denmark) solüsyonundan kesitler üzerine damlatıldı, kahverengi renklenme gözlenene dek beklendi, sonra kesitler çeşme suyunda yıkandı. Tüm kesitler zıt boyanma sağlamak için Mayer's hematoksilende 2 dakika süreyle bekletildi. Tekrar çeşme suyunda yıkandıktan sonra yükselen alkol serilerinden (%80, %90, %96, izopropil alkol, izopropil alkol+ksilol) geçirilerek ksilolde 20 dakika bekletildi. Kesitler entellan (Merck) damlatılarak lamelle kapatıldı.

### **TUNEL**

Tunel uygulanacak kesitler 20 dakika ksilolde bekletilerek deparafinize edildi ve inen alkol serilerinden (%96,%90,%80,%70) geçirilerek rehidrate edildi. Daha sonra kesitler etüve konularak Proteinase K solüsyonunda 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. PBS solüsyonunda ikişer kez yıkandı. Daha sonra TUNEL testi için enzim ve label solüsyonları karıştırıldı. Kesitler PBS'de yıkandıktan sonra her bir kesite 50 µl/ ml TUNEL karışım reaksiyonu damlatıldı ve 37 °C'de

60 dakika etüvde bekletildi. Tris'de yıkandıktan sonra 50 µl converter-POD eklendi ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Üçer kez tris ile yıkandı. Kromojen olarak kullanılan 3,3'-diaminobenzidinetetraklorür (DAB DAKO, Denmark) solüsyonundan kesitler üzerine damlatıldı, sonra kesitler çeşme suyunda yıkandı. Tüm kesitler zıt boyanma sağlamak için Mayer's hemotoksilende 2 dakika süreyle bekletildi. Tekrar çeşme suyunda yıkandıktan sonra yükselen alkol serilerinden (%80,%90,%96, izopropil, alkol, izopropil alkol+ksilol) geçirilerek ksilolde 20 dakika bekletildi. Kesitler entellan (Merck) damlatılarak lamelle kapatıldı.

### **İmmun reaktivitenin değerlendirilmesi**

İmmunhistokimyasal skrolama için demonstratif boyanma gösteren alanlar randomize seçilerek değerlendirildi. MDR ve survivin proteinleri için pozitif boyanmanın derecesi boyanma yoğunluğu (Y) ve dağılımı (D) için 1'den 4'e kadar derece verilerek değerlendirildi. YxD formülüne göre 4 ya da altında skora sahip olgular zayıf pozitif, 4'ün üstündeki olgular ise kuvvetli pozitif olarak değerlendirildi (136).

Apoptotik ve Ki-67 proliferatif indeksinin değerlendirilmesi için x400 büyütmede kahverengi boyanma gösteren 500-1000 hücre sayıldı ve boyanan hücrelerin yüzdesi hesaplandı.

### **İstatistik**

Elde edilen tüm veriler SPSS 10.0 for Windows programında kaydedildi ve istatistiksel veriler için SPSS 10.0 for Windows programından yararlanıldı. Sağkalım analizleri için Kaplan Meier testi uygulandı ve karşılaştırmalar için log rank analizi yapıldı. Survivin ile klinik ve patolojik veriler arasındaki ilişki analizleri için pearson ki-kare testi, MDR ile apoptotik ve proliferatif indeks arasındaki ilişki analizleri için bağımsız grupta T test analizi uygulandı. Survivin, apoptotik ve proliferatif indeks arasındaki korelasyon analizleri için Sperman's korelasyon analizi uygulandı. Sağkalım analizleri için başlangıç olarak hastaların operasyon tarihleri alındı. İstatistiksel anlamlılık için p değerinin 0.05 den küçük olması gözetildi.

## SONUÇLAR

Çalışmaya Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda tanı almış, parafin bloklarına ulaşılabilen ve IHK boyama için yeterli tümör dokusu bulunan pankreas kanserli 45 hasta alındı. Hastaların klinik verileri retrospektif olarak incelendi. Hastaların 24' ü (%53.3) kadın, 21'i (%46.7) erkekti. Yaş ortalaması 60.06 (19 - 82) idi. Hastaların tümünde histolojik tip adenokarsinom idi.

Hastaların tanı anındaki performans durumları dünya sağlık örgütü (WHO)' nün değerlendirme ölçeğine göre yapıldı ve performans durumu 9 hastada (%20.0) 0, 24 hastada (%53.3) 1, 9 hastada (%20.0) 2 ve 3 hastada (%6.7) 3 idi. Evreye göre yapılan değerlendirmede 11 hasta (%24.4) lokal, 11 hasta (%24.4) lokal ileri ve 23 hasta (%51.1) metastatik hastalığa sahip idi. Metastatik hastaların metastaz yerlerinin dağılımı incelendiğinde en sık metastaz yerinin karaciğer (20 hasta, %83.3) olduğu saptandı. Lenf nodu durumu 14 hastada (%31.1) N0, 31 hastada (%68.9) N1 olarak saptandı. Hastaların dokuzunda (%20) tümör dokusundan biopsi yapılırken, 22'sine (%48.9) Whipple operasyonu, 9'una da (%20.0) distal pankreatektomi operasyonu uygulandı. Yirmidört hastada (%53.3) primer tümör lokalizasyonu pankreas başı, 8 hastada pankreas korpus kesimi (%17.8) ve 8 hastada (%17.8) ise pankreas kuyruk bölgesi yerleşimli idi. Operasyon yapılan 31 hastanın cerrahi sınır pozitifliği değerlendirildiğinde 26 hastada (%83.8) cerrahi sınır negatif iken 5 hastada (%16.2) pozitif olarak saptandı. Hastaların 29 (%63) 'una sistemik kemoterapi uygulandı (21 hastaya infüzyonel 5-FU + Gemsitabin; 4 hastaya Gemsitabin + Radyoterapi ve 4 hastaya tek ajan Gemsitabin). Hastaların demografik özellikleri **Tablo 1**'de özetlenmiştir.

**Tablo 1. Hastaların demografik özellikleri**

| Toplam hasta sayısı        |              | n (%)      |
|----------------------------|--------------|------------|
| Yaş                        | 60 yaş altı  | 17 (37.8)  |
|                            | 60 yaş üstü  | 28 (62.2)  |
|                            | ortalama yaş | 60.06      |
| Cinsiyet                   | erkek        | 21 (46.7)  |
|                            | kadın        | 24 ( 53.3) |
| Evre                       | lokal        | 11 (24.4)  |
|                            | lokal ileri  | 11 (24.4)  |
|                            | metastatik   | 23 (51.1)  |
| WHO performans durumu      | 0            | 9 (20.0)   |
|                            | 1            | 24 (53.3)  |
|                            | 2            | 9 (20.0)   |
|                            | 3            | 3 (6.7)    |
| Lenf nodu durumu           | N0           | 14 (31.1)  |
|                            | N1           | 31 (68.09) |
| Primer tümör lokalizasyonu | baş          | 24 (53.3)  |
|                            | gövde        | 8 (17.8)   |
|                            | kuyruk       | 8 (17.8)   |
| Tanı şekli                 | cerrahi      | 31 (68.9)  |
|                            | biopsi       | 9 (20.0)   |
| Cerrahi sınır pozitifliği  | intakt       | 26 (83.8)  |
|                            | pozitif      | 5 (16.2)   |
| Metastazların dağılımı     | karaciğer    | 20 (83.3)  |
|                            | diğer        | 4 (16.7)   |



### **Survivin, MDR, ki-67 ekspresyonu ve apoptotik aktivite değerlendirilmesi**

Survivin pozitifliği, pankreas kanser hücrelerinde IHK olarak sitoplazmik granüler boyanma gösteren alanlarda değerlendirildi. Skorumaya sistemine göre zayıf, kuvvetli pozitif ve negatif olarak belirlendi. MDR için aynı skorumaya sistemi perinükleer boyanma gösteren alanlarda değerlendirildi. Apoptotik indeks ve proliferatif indeksin değerlendirildiği TUNEL ve Ki-67 ise boyanma gösteren hücrelerin yüzdesine göre hesaplandı.

Survivin ekspresyonu 7 hastada (%15.6) pozitif, 38 hastada (%84.4) negatif bulundu. Survivin pozitifliği saptanan 7 hastanın 5'inde (%11.1), skorumaya sistemine göre zayıf pozitiflik ve 2'sinde (%4.4) ise kuvvetli pozitiflik saptandı (**Resim 1**).

MDR protein ekspresyonu 9 hastada (%20.0) negatif, 36 hastada (%80.0) ise pozitif bulundu (**Resim 2**). Survivin ile aynı skorumaya sistemi kullanılarak yapılan değerlendirmeye göre, 9 hastada (%20.0) negatif, 11 hastada (%24.4) zayıf pozitif ve 25 hastada (%55.6) ise kuvvetli pozitif saptandı.

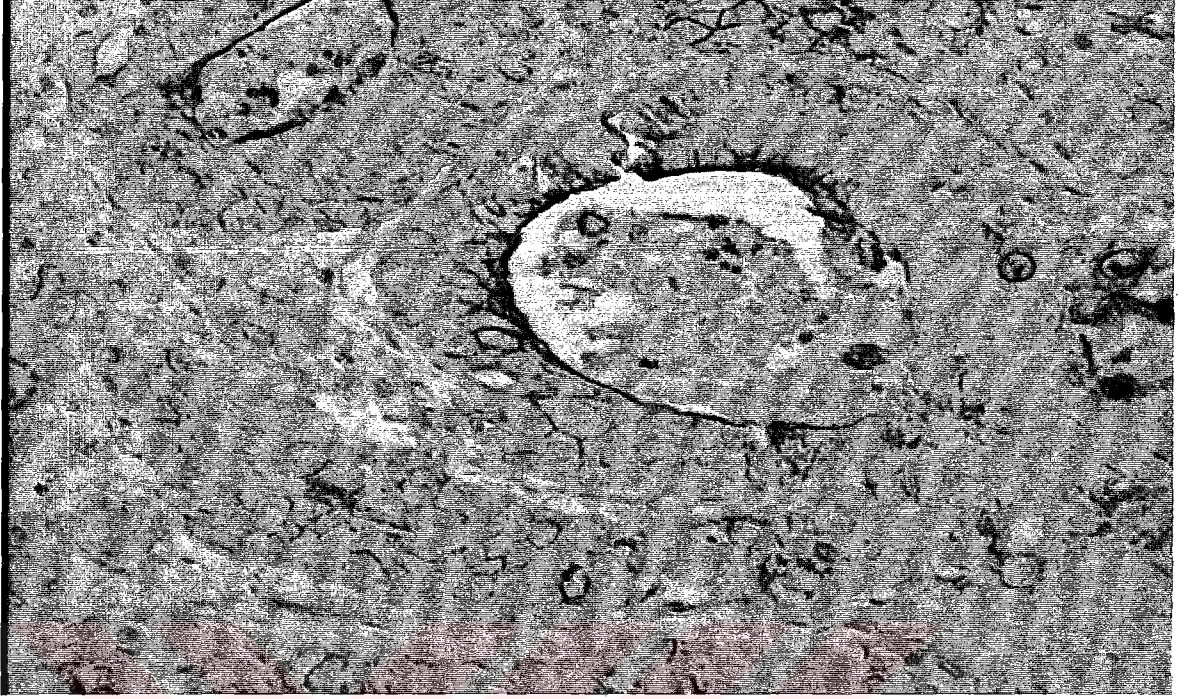
Survivin ile klinik ve patolojik değişkenler arasında ilişki incelendi ve MDR dışındaki değişkenlerle arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı. MDR ile survivin ekspresyonu arasında istatistiksel anlamlılık saptandı. **Tablo - 2**'de elde edilen veriler özetlenmiştir.

Hastalarda Pl değerlendirilmesi Ki-67 ekspresyonu ile bakıldı. 45 hastanın sadece 20'sinde (%44.5) değerlendirme yapıldı ve ortalama Pl  $43.75 \pm 25.30$  % bulundu. Al değerlendirilmesi TUNEL yöntemi ile değerlendirildi ve tüm hastalarımıza uygulandı. Ortalama Al  $37.12 \pm 34.55$  % olarak bulundu (**Resim 3**).

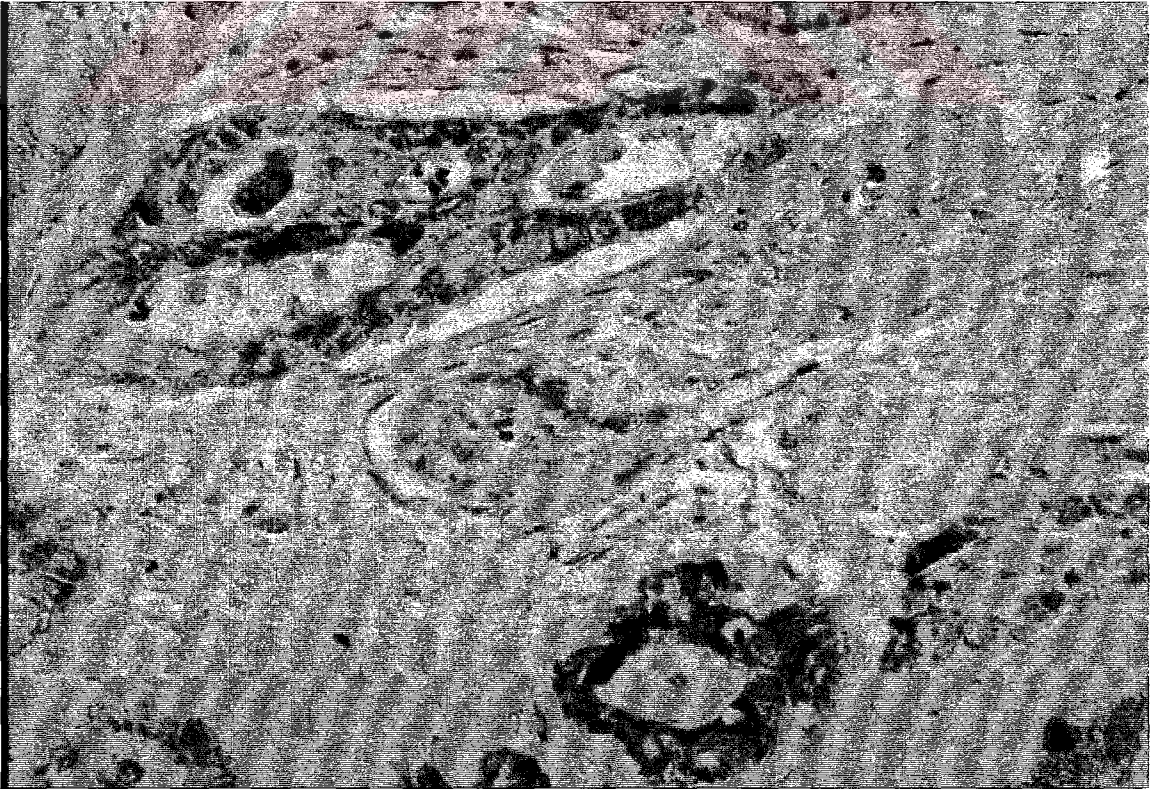
Pankreas karsinogenezisinde önemli rolü olduğu bilinen survivinin apoptoz ve hücre proliferasyonuna etkisini değerlendirmek için Al ve Pl arasındaki ilişki değerlendirildi. Bu istatistiksel analiz için bağımsız gruplarda t testi yöntemi kullanılarak değerlendirme yapıldı. İstatistiksel analiz sonucunda, survivin ile Pl ve Al arasında anlamlı ilişki saptanmadı ( $p < 0.11$  ve  $p < 0.18$  %95 confidence interval ,CI).



**Resim 1.** Survivin granüler sitoplazmik boyanma (100X)

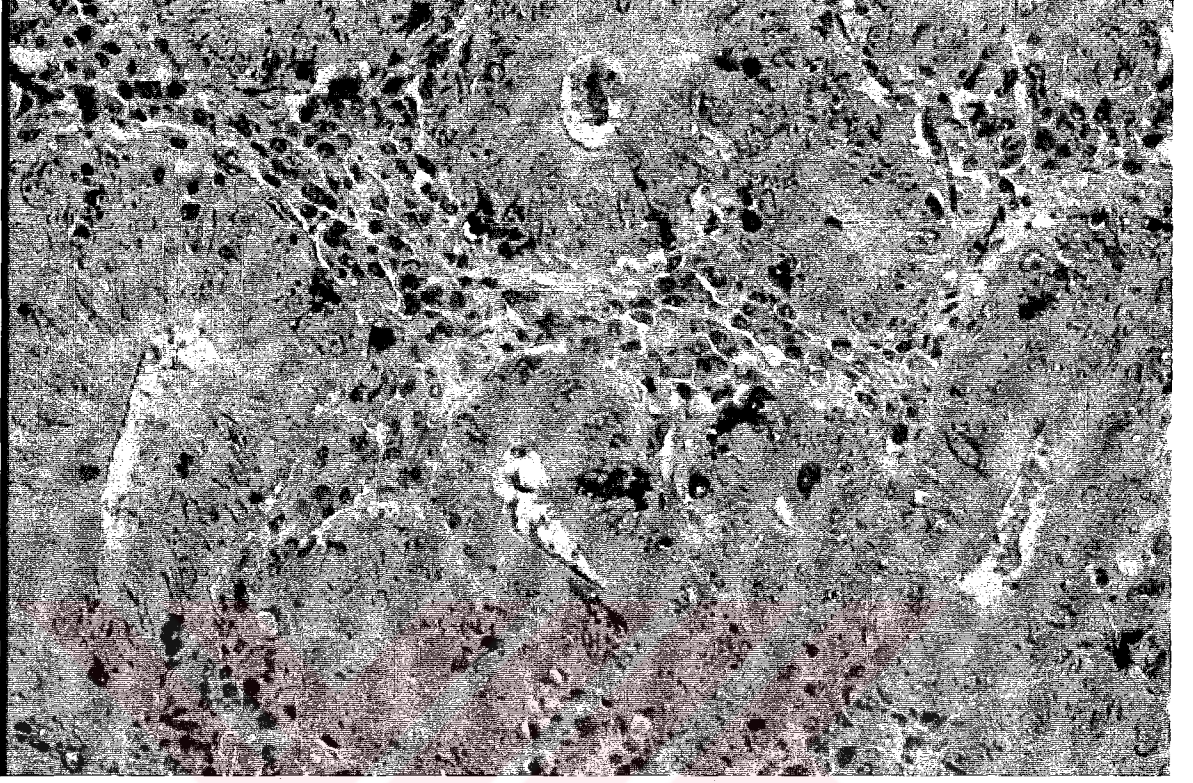


**Resim 2.** MDR membranöz boyanma (200X)





**Resim 3.** Apopitotik boyanma (TUNEL-100X)



**Tablo 2. Survivin ile klinik ve patolojik değişkenler arasındaki ilişki**

| Değişkenler   |                  | Hasta sayısı (%) | Survivin pozitifliği (%) |
|---------------|------------------|------------------|--------------------------|
| Yaş           | ≥ 60             | 28 (62.2)        | 4 (14.3)                 |
|               | < 60             | 17 (37.8)        | 3 (17.6)                 |
| Cinsiyet      | Kadın            | 24 (53.3)        | 4 (16.7)                 |
|               | Erkek            | 21 (46.7)        | 3 (14.3)                 |
| Evre          | Lokal            | 12 (26.7)        | 3 (25)                   |
|               | Lokal ileri      | 8 (17.8)         | 1 (12.5)                 |
|               | Metastatik       | 25 (55.6)        | 3 (12)                   |
| Lenf nodu     | N0               | 13 (28.8)        | 2 (15.3)                 |
|               | N1               | 18 (40.0)        | 1 (5.5)                  |
| Cerrahi sınır | İntakt           | 26 (80.3)        | 3 (11.5)                 |
|               | Pozitif          | 5 (10.5)         | 0 (0)                    |
| MDR           | Zayıf pozitif    | 11 (28.9 )       | 0 (0)                    |
|               | Kuvvetli pozitif | 18 (47.3)        | 7 (38.8)**               |
|               | Negatif          | 9 ( 23.6 )       | 0 (0)                    |

\*\* p < 0.036 (Pearson Ki-kare testi)

Bazı kemoterapi ilaçlarının etki mekanizmasında önemli rol oynayan MDR proteininin ekspresyonu da hasta grubumuzda değerlendirildi. MDR protein ekspresyonunun AI, PI, survivin, kemoterapi yanıtı ve sağkalıma etkileri incelendi. İstatistiksel değerlendirmeler sonucunda, MDR ile AI ve PI arasında anlamlı ilişki saptanmadı (Bağımsız gruplarda t testi p < 0.66 ve p < 0.85 %95

CI). MDR ile evre, kemoterapi yanıtı ve cinsiyet arasında ilişki saptanmadı (Pearson Ki-kare testi  $p < 0.67$ ,  $p < 0.36$  ve  $p < 0.37$ ).

MDR ve survivin arasında yapılan korelasyon analizinde, istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon (Spearman's korelasyon analizi  $p < 0.013$ ) saptandı. MDR ekspresyonu fazla olan hasta grubumuzda survivin ekspresyonu da fazla bulundu.

Yaptığımız diğer korelasyon analizlerinde, AI ve PI anlamlı bir istatistiksel farklılık olmasa da negatif bir korelasyon saptandı (Spearman's korelasyon analizi  $p < 0.99$ ). Proliferatif index ile sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon (Spearman's korelasyon analizi  $p < 0.04$ ) saptandı. AI ile sağkalım arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmadı (Spearman's korelasyon analizi  $p < 0.24$ ).

Kemoterapi uygulanan 29 hastanın 5'inde survivin ekspresyonu saptandı ve bunların üçünde progresyon saptanırken, adjuvan amaçlı tedavi alan diğer iki hasta sırasıyla 14 ve 60 aydır nüksüz izlenmektedir. Ayrıca bu 5 hastanın tümünde AI düşük olarak bulundu.

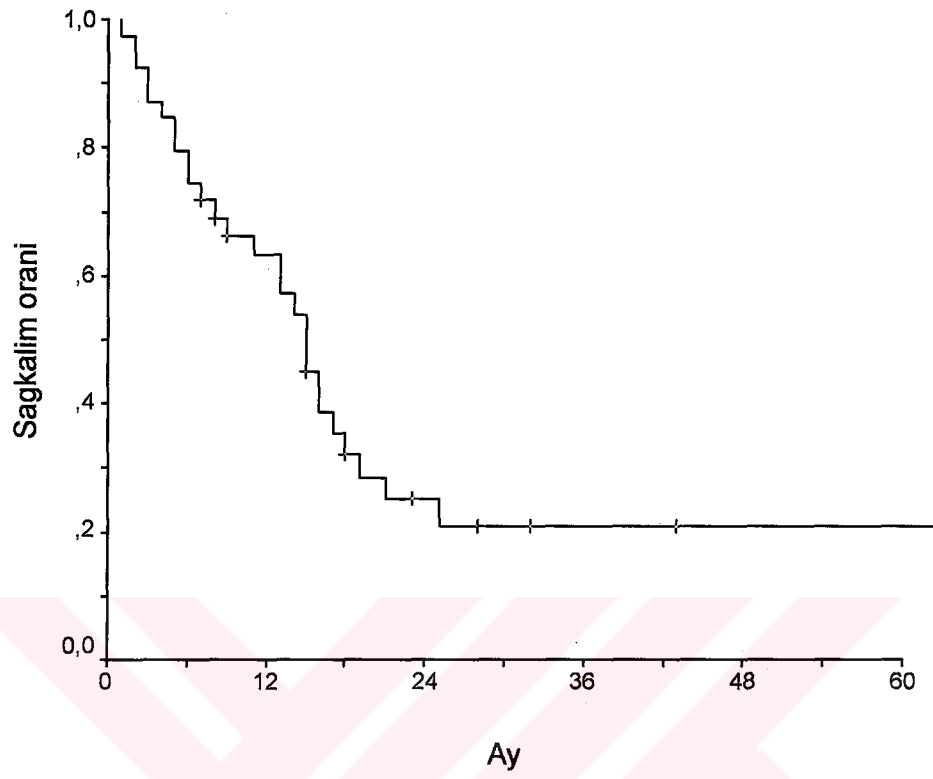
### **Sağkalım analizleri**

Hastaların ortalama sağkalımı 23.3 (%95 confidence interval: 15.08 - 31.58) aydı. Ortalama izlem süresi 15 (12.33 – 17.67) aydı. 1 ve 2 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %57 , %20 bulundu (**Şekil 1**).

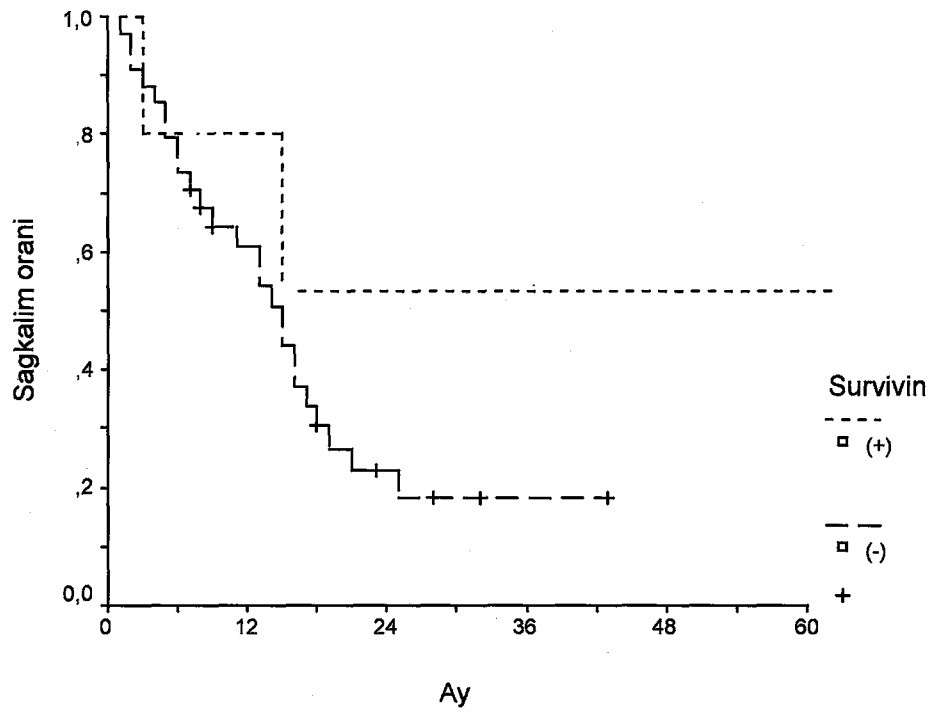
Survivin ekspresyonunun sağkalıma etkisi istatistiksel anlamlı bulunmadı (**Şekil 2**) (Kaplan Meier Log Rank  $p < 0.389$ ).

MDR ekspresyonunun sağkalıma etkisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, MDR ekspresyonu saptanan hastalarda saptanmayanlara göre sağkalım hızı daha düşük bulundu (**Şekil 3**) (Kaplan Meier Log Rank  $p < 0.748$ ).

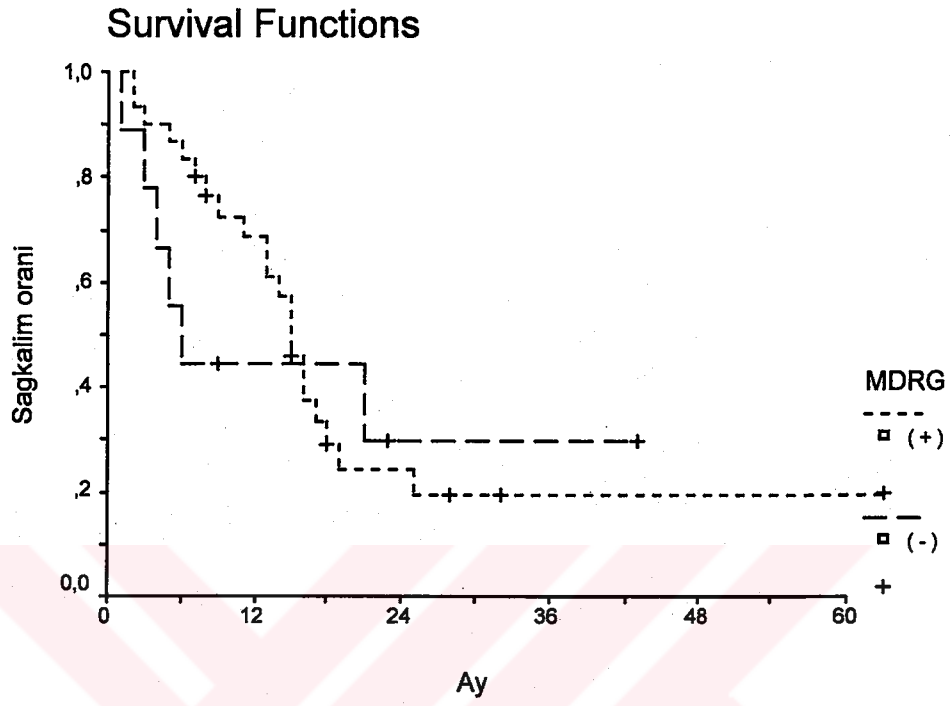
**Şekil – 1 : Hastaların genel sağkalım oranları**



**Şekil – 2 : Survivin ekspresyonunun sağkalıma etkisi**



Şekil - 3 : MDR ekspresyonunun sağkalıma etkisi





## TARTIŞMA

Çalışmamızda, pankreas kanserinde survivin ekspresyonu %15.6, MDR ekspresyonu %80 ve AI ile PI sırasıyla  $37.12 \pm 34.55\%$  ve  $43.75 \pm 25.30\%$  oranında pozitif bulundu. Survivin ekspresyonu ile MDR arasında anlamlı bir ilişki saptanırken, diğer klinik ve patolojik değişkenler arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı. Pankreas karsinogenezisinde önemli rolü olduğu bilinen survivinin, apoptozis ve proliferasyon indeksi üzerine etkilerini değerlendirmek için yapılan analizde, survivin ile AI ve PI arasında ilişki saptanmadı. AI ile PI arasında istatistiksel anlamlılık olmasada negatif bir korelasyon saptandı. PI ile sağkalım arasında istatistiksel anlamlı negatif bir korelasyon bulundu. Yine AI ile sağkalım arasında bir korelasyon saptanmadı. Survivin ve MDR ekspresyonlarının sağkalıma katkısı anlamlı bulunmadı, ancak MDR ekspresyonu saptanan hastalarda saptanmayan gruba göre sağkalım hızı daha düşük bulundu.

Apoptozis inhibitör protein ailesinden olan survivin ekspresyonunun, pankreas kanserinde ve diğer bir çok kanserin karsinogenezisinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Apoptozis inhibisyonuna ek olarak, hücre bölünmesinin regülasyonunda ve anjiogeneziste de önemli rolü bulunur (97, 98). Çalışmamızda, survivin ekspresyonu IHK olarak 45 hastanın 7'sinde %15.6 oranında pozitif bulundu. Literatürdeki diğer serilere baktığımızda, pankreas kanserlerinde survivin ekspresyonunun %77-%88 oranında izlendiği bildirilmektedir (96, 104). IHK olarak survivin ekspresyonu predominant olarak sitoplazmik boyanma göstermesine rağmen bazı tümörlerde temel olarak nükleer boyanma göstermektedir (106,136) ve nükleer boyanma daha kabul edilebilir sonuç vermektedir (137). Bizim çalışmamızda da sitoplazmik boyanma dikkate alınarak değerlendirme yapılması sonucun daha düşük saptanması ile ilişkili olabileceğini düşündürebilir. Yine literatürde meme kanseri hastalarında survivin ekspresyonunun prognostik öneminin değerlendirildiği bir çalışmada hastaların %60' ında pozitif ekspresyon saptanmış ve bunların %31'inde nükleer boyanma, %13'ünde sitoplazmik boyanma ve %16'sında hem nükleer hem de sitoplazmik boyanma birlikte gösterilmiştir. Nükleer boyanmanın daha sık ve iyi prognoz açısından bağımsız prognostik gösterge olduğunu bildirmişlerdir (138).

Çalışmamızda survivin ekspresyonu ile klinik ve patolojik veriler (evre, yaş, cinsiyet, lenf nodu durumu, cerrahi sınır pozitifliği) arasında ilişki saptanmadı. Literatürde de pankreas kanserli hasta serilerinde benzer sonuçlar elde edilmiştir (94, 95, 101, 104, 138) ve sonuçlarımız literatürle uyumluluk göstermiştir. Ancak hem survivin ekspresyon oranlarımızın pankreas kanseri gibi agresif seyirli bir tümör için düşük oranda saptanması, hem de her ne kadar literatürle uyumlu olsa da klinik ve patolojik verilerle ilişki saptanmaması hasta sayımızın düşük, evrelere göre dağılımın heterojen ve tümör dokusundan tanı konma şeklinin cerrahi ve biopsi şeklinde homojen olmaması ile açıklanabilir. Sonuçta, hasta sayısının daha çok, evrelere göre dağılımın daha uygun ve tanı konma şeklinin pankreas dokusundan daha izole yapıldığı gruplarda survivin ekspresyonunun gerçek saptanma sıklığı ortaya konulabilir.

Yine survivinin, apoptozis ve hücre proliferasyonu üzerine etkilerini değerlendirmek için, PI ve AI arasındaki ilişki değerlendirildi. Survivin ile bu indeksler arasında ilişki saptanmadı ( $p < 0.11$  ve  $p < 0.18$ ). TUNEL yöntemi ile değerlendirdiğimiz AI ortalaması  $37.12 \pm 34.55\%$  olarak bulundu. Ki-67 ekspresyonu değerlendirerek belirlediğimiz PI ise teknik nedenlerden dolayı hastaların 20'sine uygulanabildi. Hastalarımızdaki PI ortalaması  $43.75 \pm 25.30\%$  olarak bulundu. Çalışmamızda AI ile PI arasında istatistiksel anlamlılık olmasa da korelasyon analizinde negatif korelasyon saptandı ( $p < 0.99$ ). Yani hücre proliferasyonu arttıkça apoptozisin azaldığı görüldü. Literatürde artan AI ile artan PI gösterildiği yayınlar bulunmaktadır (104,139). Sinovial sarkomlu hastalarda yapılan bir çalışmada, proliferasyon indeksinin fazla olmasının kötü prognostik bir gösterge olduğu ve aynı zamanda apoptozisin PI ile korele olduğunu göstermişlerdir. Artan AI' in sinovial sarkomlarda kötü prognoz için indikatör olduğunu ve birçok apoptozis regüle edici mekanizmalar tarafından (bcl-2, fas-fas ligand, p53) kontrol edildiğini bildirmişlerdir (139). Literatüre baktığımızda AI pankreas kanserlerinde ve diğer kanserlerde düşük saptanmıştır (96, 104) ve apoptozis inhibisyonu mutant hücre sağkalımının uzun olmasında da önemlidir. Yine literatürde, artan survivin ekspresyonu ile artan AI (104) veya artan survivin ekspresyonu ile azalan AI (96) şeklinde, zıt görüşler bildirilmiştir. Bu çeşit farklı sonuçların, tümörün intrinsik farklılıkları,

kompleks regülatuar kaskad ve moleküler farklı faktörlerle (p53, bcl2) ilişkili olabileceğini düşünülmektedir.

Çalışmamızda tümör hücrelerinde ilaç direncinden sorumlu bir protein olan MDR ekspresyonu 45 hastanın 36'sında (%80) pozitif olarak saptandı. Hücre zarında yerleşim gösteren bu protein, lipofilik olan bazı ilaçlar için substrat görevi görerek hücre zarından geçişinde etkili olur. ATP az aktivitesine sahip bu protein ilaçları zardan geçerken yakalar ve hücre dışına atılmasını sağlar. Bazı tümörlerde tedavi öncesinde ekspresyon olabileceği gibi, kemoterapi sonrasında da ekspresyonun arttığı gösterilmiştir (110-113). Çalışmamızda, MDR ile survivin ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı ( $p<0.036$ ). Survivin ekspresyonu olan tüm hastalarımızda MDR ekspresyonu da saptandı. Literatürde, MDR ile ilgili çalışmalara bakıldığında, MDR ekspresyon oranı tedavi öncesi yüksek saptanan hastalarda sağkalım oranları anlamlı oranda düşük bulunmuş ve kötü prognostik kriter olarak bildirilmiştir (135). Survivin ekspresyonunun da fazla olması tümör agresivitesi ile ilişkili olduğu için, bu saptadığımız istatistiksel anlamlı ilişki pankreas kanseri hastalarında izlenen kötü prognoz bakımından anlamlı bir sonuç olarak değerlendirilmiştir.

MDR ekspresyonu ile Al ve Pl arasında anlamlı ilişki saptamadık ( $p<0.66$  ve  $p<0.85$ ). Ayrıca evre, cinsiyet ve kemoterapi yanıtları üzerine de ilişki saptamadık ( $p<0.67$ ,  $p<0.37$  ve  $p<0.36$ ). Literatürde son çalışmalarda, pankreas kanserlerinde MDR ekspresyonunun hem fazlalığı hem de kaybının tümör büyümesini nasıl etkilediğine dair mekanizmalar henüz tam açıklanamamıştır (140). Yine literatürde yayınlanan son çalışmalarda insan kanser hücre kültürlerinde, p-gp ve MDR ilişkili protein (MRP) fazla ekspresyonunun gemcitabin sensivitesini artırdığını bildirmişlerdir (141).

Çalışmamızda survivin ekspresyonu ile MDR ekspresyonu arasındaki anlamlı ilişki korelasyon analizlerimizde de saptandı. İstatistiksel anlamlı pozitif korelasyon bulundu ( $p<0.04$ ).

Kemoterapi uygulanan 29 hastanın 5'inde survivin ekspresyonu saptandı ve bunların üçünde progresyon saptanırken, adjuvan amaçlı tedavi alan diğer iki hasta sırasıyla 14 ve 60 aydır nüksüz izlenmektedir. Ayrıca bu 5 hastanın tümünde Al düşük olarak bulundu. Az sayıda hastadan elde edilen bu farklı

sonuçlar nedeniyle survivin ekspresyonu ile kemoterapi yanıtı arasındaki ilişki hakkında kesin yargıya varmak mümkün değildir.

Hastalarımızda ortalama sağkalım 23.3 ay (15.08-31.58 %95CI), ortalama izlem süresi 15 aydı (12.33-17.67 %95CI). 1 ve 2 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %57 ve %20 bulundu. Sağkalım sonuçlarımız, pankreas kanseri literatür bilgileri ile uyumlu bulundu (51). Sağkalım oranlarının Al ve Pl ile arasındaki ilişkinin değerlendirildiği korelasyon analizlerinde, Al ile anlamlı korelasyon saptanmaz iken ( $p<0.24$ ), Pl ile negatif bir korelasyon bulundu ( $p<0.04$ ). MDR ekspresyonunun sağkalıma etkisi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, MDR ekspresyonu saptanan hastalarda saptanmayanlara göre, sağkalım hızı daha düşük bulunmuştur ( $p<0.748$  Kaplan Meier Log Rank).

Survivin ekspresyonunun sağkalıma etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulmadık ( $p<0.389$  Kaplan Meier Log Rank). Literatürde bu sonucumuzu destekleyen çalışmalar bulunmaktadır (100). Survivin ekspresyonu ile hastalığın agresivitesi arasındaki ilişki çok komplekstir. Örneğin, kolorektal kanserde survivin ekspresyonu, hastalığın rekürrens yaptığı dönemden sonraki sağkalım ile değerlendirildiğinde, nod negatif olanlarda pozitif olanlara göre, daha prediktif olarak bulunmuştur (100, 101). Bu da survivin ekspresyonunun erken evre kanserlerin belirli alt gruplarında bağımsız kötü prognostik bir gösterge olduğunu düşündürmüştür. Literatürde ratlarda gastrik kanser modeli oluşturulduktan sonra survivin ekspresyonu değerlendirilmiş ve adenokanser formasyonu gelişmeden önce ekspresyon saptanmış, karsinoma gelişiminde erken dönemde daha fazla ekspresyon gösterdiği belirtilmiştir (142). Sonuç olarak survivin, karsinogenezin erken döneminde etkili olup, daha sonraki dönemde diğer moleküler faktörlerin de etkisi ile hücre siklusu ve regülasyonunu etkileyerek karsinogenez sürecine katkıda bulunmaktadır.

Sonuç olarak bütün bu kompleks mekanizmalar birbiri ile etkileşir. Karsinogenezin erken dönemlerinde hangisinin daha önemli rol aldığı tam bilinmemektedir. Tümörlerin kendilerine özgü histolojik farklılıkları ve düzenleyici kaskad proteinlerinin farklı ekspresyonları kanser tiplerine özgü farklılıklar sergiler. Hücrelerin yaşamı ve ölümündeki denge ve bu dengedeki anormallikler karsinogenezin temelini oluşturur. Kemoterapi ve radyoterapi temelde apoptozise yol açarak kanser hücrelerini yok ettikleri gibi, apoptozis

inhibitörlerini yok etmek için yapılan antisense tedaviler kemoterapi ve radyoterapinin duyarlılığını artırabilir. Bunun için günümüzde bu proteinlerin kanser türlerindeki ekspresyonlarının araştırılması, hem tedavisine hem de patogenezinin daha iyi anlaşılmasına ışık tutacaktır.



## ÖZET

Pankreas kanserinde prognozun kötü olması ve tedavi seçeneklerinin başarısının düşük olması, bu tümörün biyolojisini anlamaya ve aydınlatmaya yönelik çalışmalar ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Bu amaçla 45 pankreas kanserli hastanın patoloji preparatlarında apoptozis aktivitesi, survivin, ki-67 ve MDR proteinlerinin ekspresyonlarını incelemeyi ve elde edilen veriler ile hastaların klinik ve patolojik özellikleri, sağkalım oranları ve kemoterapiye verdikleri yanıt arasındaki ilişkiyi araştırmayı planladık.

Çalışmaya Patoloji Ana Bilim Dalı'nda pankreas kanseri tanısı almış 45 hasta alındı. Bu hastaların 30'una adjuvan kemoterapi uygulandı. Hastaların klinik ve patolojik özellikleri retrospektif olarak kaydedildi. Patoloji preparatlarında immunhistokimyasal olarak apoptozis aktivitesi, survivin, ki-67 ve MDR proteinlerinin ekspresyonları incelendi.

Hastaların tümünde histolojik tip adenokarsinom idi. Yaş ortalaması 60.06 ve cinsiyet dağılımı eşit bir oran gösterdi. Evrelerine göre %55.6'sı metastatik, %44.4'ü lokal ve lokal ileri evre hastalıktı. Survivin, %15.6 oranında pozitif saptandı. Survivin ekspresyonu ile klinik ve patolojik veriler arasında bir ilişki saptanmadı. Survivin ile Al ve Pl arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ( $p<0.11$  ve  $p<0.18$ ). TUNEL yöntemi ile bakılan Al  $37.12 \pm 34.55\%$  bulundu. Ki-67 ekspresyonu ile değerlendirdiğimiz Pl  $43.75 \pm 25.30\%$  bulundu. Al ile Pl arasında yapılan korelasyon analizinde istatistiksel anlamlılık olamasa da negatif bir korelasyon saptandı ( $p<0.99$ ).

MDR ekspresyonu hastaların %80'ninde pozitif saptandı. Çalışmamızda, MDR ile survivin ekspresyonu arasında istatistiksel anlamlılık, hem Pearson Ki-kare analizi hem de Spearman's korelasyon analizinde bulundu ( $p<0.036$  ve  $p<0.04$ ). MDR ile Al ve Pl arasında istatistiksel anlamlılık bulunmadı ( $p<0.66$  ve  $p<0.85$ ). Ayrıca evre, cinsiyet ve kemoterapi yanıtları üzerine de ilişki bulunmadı ( $p<0.67$ ,  $p<0.37$  ve  $p<0.36$ ).

Hastalarımızın ortalama sağkalımı 23.3 ay (15.08-31.58 %95 CI). Ortalama izlem süreleri 15 aydı (12.33-17.67 %95 CI). 1 ve 2 yıllık sağkalım oranları sırasıyla, %57 ve %20 bulundu.

Al ile sağkalım arasında anlamlı bir korelasyon saptanmazken ( $p<0.24$ ), Pl ile negatif bir anlamlı korelasyon bulundu ( $p<0.04$ ).



Sağkalım analizinde survivin ekspresyonunun sağkalıma istatistiksel olarak anlamlı etkisi bulunmazken ( $p<0.389$  Kaplan Meier Log Rank); MDR ekspresyonunun sağkalıma etkisi istatistiksel anlamlı çıkmasa da, MDR ekspresyonu saptanan hastalarda sağkalım hızı diğer gruba göre düşük bulundu ( $p<0.748$  Kaplan Meier Long Rank).

Sonuç olarak pankreas kanserli hastalarda MDR ekspresyonunun varlığı prognostik öneme sahip olarak bulunurken, survivin, apoptotik indeks ve Ki-67 ekspresyonlarının prognostik önemi saptanamamıştır. Bu tabloda incelenen proteinlerin kanser türlerinde farklı ekspresyonlarının olması ve karsinogenezisin oluşma dönemlerinde bir çok faktörden etkilenmesinin rolü olabilir.



## SUMMARY

The fact that the prognosis is bad in the pancreas cancer and the success of the treatment choices are low indicates that there is a need for studies aiming at understanding the biology of the tumour and enlightening it. We aimed to examine the expression proteins of survivin, ki-67, MDR and apoptosis activity at pathology specimens of 45 pancreatic cancer patients and with the data obtained. We studied the relation amount clinical and pathological variables and overall survival response to the chemotherapy.

In this study, 45 patients with pancreatic cancer who diagnosed by pathology department were taken, and the twenty-nine of these patients were applied chemotherapy. Clinicopathological variables of the patients were enrolled retrospectively. The expression of survivin, ki-67, MDR and apoptosis activity were examined in the pathology specimens immunohistochemistry.

Histologic type was adenocarcinoma in all of the patients. Mean age was 60.06 and dispersion of gender indicated in equal rate. According to the stage 55.6% of patients were metastatic and 44.4% were locally and locally advanced disease. In 15.6% of the patients survivin positive was detected. There was no correlation between survivin expression and any clinical pathologic characteristic of pancreatic carcinoma.

There was no correlation between survivin expression and AI and PI, however it was unremarkable statistically.

AI evaluated with TUNEL method was  $37.12 \pm 34.55$  %. PI evaluated with ki-67 expression method was  $43.75 \pm 25.30$  %. In the correlation analysis made between AI and PI even if there was no statistically difference, a negative correlation was seen ( $p = 0.09$ ).

In 80 % of our patients MDR expression was positive. In our study, there was significant statistical difference between MDR and survivin expression not only in the Pearson ki-kare test but also in the Spearman's correlations analysis ( $p = 0.036$  and  $p = 0.04$ ). MDR expression was also detected in all patients with survivin expression. No significant difference was found between AI and MDR, PI and MDR ( $p = 0.66$  and  $p = 0.85$  ).

The mean survival of our patients was 23.3 months (15.0-31.58 95% CI). Mean follow up period was 15 months. Actuarial survival rate of 1 or 2 years was 57% and 20% retrospectively.

In correlation analysis there was no significant correlation between survival and AI ( $p = 0.24$ ), but there was found negative correlation with PI ( $p = 0.04$ ). The effect of survivin expression on survival was found unremarkable statistically ( $p = 0.389$  Kaplan Meier Log Rank). And while the effect of MDR expression on survival was unmeaningful statistically, rate of survival in the patients with MDR expression was lower than the other group ( $p = 0.748$  Kaplan Meier Log Rank).

In conclusion, though the existence of MDR expression on the patients with pancreatic cancer has an prognostic importance, there is no prognostic significance of apoptotic index, expression of survivin and ki-67. The fact that these proteins have different expressions in the various cancer types examined could be caused by many factors affecting the carcinogenesis in the developing period.

## KAYNAKLAR

1. Heinemann V: Gemcitabine : Progress in the treatment of pancreatic cancer. *Oncology* 2001; 60: 8-18.
2. Jermal A, Thomas A, Murray T, et all: Cancer Statistics, 2002. *CA. Cancer T Clin* 52 (1): 23-47.
3. Niederhuber J, Brennan MF, Menck HR. The national cancer data base on pancreatic cancer. *Cancer* 1995; 76:1671-1677.
4. Kelly DM, Benjamin IS: Pancreatic carcinoma. *Ann Oncol* 1995; 6:19-28.
5. Moore M: Activity of gemcitabine in patients with advanced pancreatic carcinoma: A review. *Cancer* 1996; 78:633-638.
6. Oster MV, Gray R, Panasci L, Perry MC. Chemotherapy for advanced cancer: a comparison of 5-fluorouracil, adriamycin, and mitomycin (FAM) with 5-fluorouracil, streptozotocin, and mitomycin (FSM). *Cancer* 1986; 57(1): 29-33.
7. Cullinan S, Moertel CG, Wineand HS, Schutt AJ, Krook JE, Foley IF, et al. A phase III trial. On a therapy of advanced pancreatic carcinoma: evaluations of the Mallinson regimen and combined 5-fluorouracil, doxorubicin, and cisplatin. *Cancer* 1990; 65: 2207-2212.
8. Parkin DM, Bnay FI, Devasa SS. Cancer burden in the year 2000. The Global picture. *Eur J Cancer* 2001; 37: S4-S66.
9. Bramhall SR, Allum WH, Jones AG et al. Incidence, treatment and survival in 13560 patients with pancreatic cancer: an epidemiological study in the West Midlands. *Br J Surg* 1995; 82: 111-115.
10. Bramhall S, Dunn T, Neoptolemos JP. Epidemiology of pancreatic cancer. In Beger HG, Warshaw A, Carr-Locke DL et al. (eds): *The Pancreas* (two volumes). Boston, MA: Blackwell Scientific 1998; 889-906.
11. Fernandez E, La Vecchia C, Porlo M. et al. Trends in pancreatic cancer mortality in Europe, 1995-1989. *Int J Cancer* 1994; 57: 786-792.
12. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J: Global cancer statistics. *CA: Cancer J Clin* 1999, 49: 33-64.
13. Williamson RCN. Pancreatic cancer: the greatest oncological challenge. *Br J Med* 1991; 296: 445.
14. Gordis L. Gold EB. Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Surg* 1984; 8: 808.

15. Evans DB, Abbruzzese JL, Rich TA: Cancer of the Pancreas, in Devita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA (eds): *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (4th ed). Philadelphia, PA, Lippincott, 1997, pp 1054-1087.
16. Warshaw AL, Fernandez - del Castillo C. Pancreatic carcinoma. *N Eng J Med* 1992; 326: 455.
17. Rivenson A, Hoffmann D, Prokopczyk B, et al: Induction of lung and exocrine pancreas tumors F344 rats by tobacco – specific and Aroclor – Derived N nitrosamines. *Cancer Res* 1988; 48: 6912-6917.
18. Zheng W, McLaughlin TK, Gridley G, et al: A cohort study of smoking, alcohol consumption, and dietary factors for pancreatic cancer (United States). *Cancer Causes Control* 1993;4: 447-482.
19. Silvestro DT, Dinn TA, Hoover RN, et al: Cigarette smoking and pancreas cancer: a case control study based on direct interviews. *J Natl Cancer Inst* 86: 1510-1516, 1994.
20. La Vecchia C, Boyle P, Franceschi S, et al: Smoking and pancreas cancer with emphasis on Europe. *Eur J Cancer* 1991; 27: 94-104.
21. Ogawa T, Makino T, Mizumoto K, et al. Promoting effect of truncal vagotomy on pancreatic carcinogenesis in initiated with N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine in Syrian golden hamster. *Carcinogenesis* 1991; 12: 1227.
22. Corra S, Kazokoff K, Lawson TA, et al. Cholecystokinin inhibits DNA alkylation induced by N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine (BOP) in hamster pancreas. *Cancer Lett* 1992; 62: 251.
23. Hoffman D, Riverson A, Abb R, et al. A study of tobacco carcinogenesis: effect of the fat content of the diet on the carcinogenic activity of 4 (methylnitrosomino) – 1-(3-pyridyl) – 1- butanone in F344 rats. *Cancer Res* 1993; 53: 2758.
24. Lyon TL, Slattery ML, Mahoney AW, et al. Dietary intake as a risk faktor for caner of the exocrine pancreas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1993; 2: 513.
25. Gullo L, Pezzilli R, Marselli Labate AM. Diabetes and the risk of pancreatic cancer. *N Eng J Med* 1994; 331: 81.
26. Talamini G, Falconi M, Bassi C, Sartori N, Salvia R, Caldiron E, et al. Incidence of cancer in the course of chronic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1253-60.
27. Misra SP, Thorat VK, Vij JC, et al. Development of carcinoma in chronic calcific pancreatitis. *Int J Pancreatol* 1990; 6: 307.

28. Yanagisawa A, Ohtakek, Ohashi K, et al. Frequent c-Ki-ras oncogene activation in mucous cell hyperplasias of pancreas suffering from chronic inflammation. *Cancer Res* 1993; 53: 953.
29. Watanapa P, Flaks B, Oztas H, et al. Duadenogastric reflux enhances growth and carcinogenesis in the rat pancreas. *Br J Surg*, 1992; 79: 791.
30. Smith JP, Solomon TE, Bagheri S, et al: Cholecystokinin stimulates growth of human pancreatic adenocarcinoma. *SW-1990 Dig Dis Sic* 1990; 35: 1377.
31. Smith JP, Rickabaugh CA, McLaughlin PJ, et al. Cholecystokinin receptors and PANC-I human pancreatic cancer cells. *Am J Physiol* 1993; 265: 149.
32. Jensen RT, Norton JA. Pancreatic endocrine tumors. In: Fordtran JS, Sleisinger MH, Feldman M, Scharschmidt B, eds. *Gastrointestinal diseases : pathophysiology, diagnosis and Management*. Philadelphia: WB Saunders, 1992.
33. Davidson P, Costanza D, Swieconeck JA, et al. Hereditary pancreatitis: a kindred without gross aminoaciduria. *Ann Intern Med* 1968;68:88.
34. Lynch HT, Voorhees GJ, Lanspa SJ, et al. Pancreatic carcinoma and hereditarynonpolyposis colorectal cancer: a family study. *Br J Cancer* 1985; 52:271.
35. Neumann HP, Dinkel E, Brambs H, et al. Pancreatic lesions in teh von Hippel-Lindau syndrome. *Gastroenterology* 1991;101:465.
36. Swift M, Sholman L, Perry M, et al. Malignant neoplasms in the families of patients with ataxia telangiectasia. *Cancer Res*. 1976; 36:209.
37. Lynch HT, Fusaro RM. Pancreatic cancer and the familial atypical multipl mole (FAMMM) syndrome. *Pancreas* 1991; 6: 127.
38. Fernandez E, La Vecchia C, D'Avanzo B, et al. Family history and the risk of liver, gallbladder and pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1994; 3:29.
39. Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furrey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, et al. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet* 1996; 14: 141-5.
40. Goldstein AM, Fraser MC, Struewing JP, Hussussian CJ, Ranade K, Zametkin DP, et al. Increased risk of pancreatic cancer in melanoma prone kindreds with p16<sup>INK4</sup> mutations. *N Eng J Med* 1995; 333:970-4.
41. Goggins M, Schutte M, Lu J, Moskaluk CA, Weinstein CL, Petersen GM, et al. Germline BRCA2 gene mutations in patients with apparently sporadic pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 1996; 56: 5360-4.



42. Goggins M, Shekher M, Turnacioglu K, Yeo JC, Hruban RH, Kern SH. Genetic alterations of the transforming growth factor beta receptor genes in pancreatic and biliary adenocarcinomas. *Cancer Res* 1998; 58: 5329-32.
43. Tan H, Smith J, Garberoglio CA: Pancreatic carcinoma: an update. *J Am Coll Surg* 1996; 183: 164.
44. Morohoshi T, Held G, Klöpell G: Exocrine pancreatic tumours and their histological classification. A study based on 167 autopsy and 97 surgical cases. *Histopathology* 1993; 7: 645-661.
45. Chen J, Baithun SI: Morphological study of 391 cases of exocrine pancreatic tumours with special reference to the classification of exocrine pancreatic carcinoma *J Pathol* 1985; 146: 17-29.
46. Allen-Merish TG: Significance of the site of origin of pancreatic exocrine adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 1982; 35: 544-546.
47. Ishikawa O, Matsui Y, Aoki I, et al: Adenosquamous carcinoma of pancreas: a clinicopathologic study and report of three cases. *Cancer* 1980; 46: 1192-1196.
48. Yamoguchi K, Enjoji M: Carcinoma of ampulla of water. A clinicopathologic study and pathological staging of 109 cases carcinoma and 5 cases of adenoma. *Cancer* 1987; 59: 506-515.
49. Noy A, Bilezikian JP: Diabetes and pancreatic cancer: clues to the early diagnosis of pancreatic malignancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 1223.
50. Exocrine pancreas. In: Beahrs OH, Henson DE, Hutter RVP, Kennedy BJ, eds. *American Joint Committee on Cancer manual for staging of cancer*, ed 4. Philadelphia: JB Lippincott, 1992: 109.
51. Evans DB, Abbruzzese J, Willett CG. Cancer of the pancreas, in DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA (eds): *Cancer Principles & Practice of Oncology* New York, NY, Lippincott Williams & Wilkins, 2001, pp 1126-1161.
52. Bottger TC, Storkel S, Wellek S et al: Factors influencing survival after resection of pancreatic cancer. *Cancer* 1994; 73: 63.
53. Cameron JL, Crist DW, Sitzman JV et al: Factors influencing survival after pancreaticoduodenectomy for pancreatic cancer. *Am J Surg* 1991; 161: 129.
54. Geer RT, Brennan MF: Prognostic indicators for pancreatic adenocarcinoma. *Am J Surg* 1983; 165: 68.
55. Nitecki SS, Sarr MG, Colby TV, Van Heerden JA: Long-term survival after resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas: is it really improving? *Ann Surg* 1995; 221: 59.

56. Yeo JC, Cameron JL, Lillemoe KD et al: Pancreaticoduodenectomy for cancer of the head of the pancreas: 201 patients. *Ann Surg* 1995; 221: 721.
57. Yeo CJ. Management of complications following pancreatoduodenectomy. *Surg Clin North Am* 1995; 75: 913.
58. Shibata D, Almoguera C, Forrester K, et al: Detection of K-ras mutations in fine needle aspirates from human pancreatic adenocarcinomas. *Cancer Res.* 1990; 50, 1279-1283.
59. Lemoine NR, Hughes CM, Barton CM et al : The epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer. *J Pathol* 1992; 166:7-12.
60. Tada M, Omata M, Ohto M. Clinical application of ras gene mutation for diagnosis of pancreatic adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1991;100:233-238.
61. Motojima K, Tsunoda T, Kanematsu T, et al. Distinguishing pancreatic carcinoma from other periampullary carcinomas by analysis of mutations in the Kirsten-ras oncogene. *Ann Surg* 1991; 214: 657.
62. Gansauge F, Gansauge S, Schmidt E, Müller J, Beger H. Prognostic significance of molecular alterations in human pancreatic carcinoma – an immunohistological study. *Langenbeck's Arch Surg* 1998; 383: 152-155.
63. Lemoine NR, Jain S, Hughes CM et al. Ki-ras oncogene activation in preinvasive pancreatic cancer. *Gastroenterology* 1992; 102, 230-236.
64. Glinsmann – Gibson BI, Korc M. Regulation of transforming growth factor alpha mRNA expression in T3M4 human pancreatic carcinoma cells. *Pancreas* 1991; 6: 142-149.
65. Yamanaka Y, Friess H, Kobrin MS, Büchler M, Beger H, Kore M. Coexpression of epidermal growth factor receptor and ligands in human pancreatic cancer is associated with enhanced tumor aggressiveness. *Anticancer Res* 1998; 13: 565-570.
66. Uegaki K, Nio Y, Inoue Y, Minari Y, Sato Y, Song MM, Dong M, Tamura K. Clinicopathological significance of epidermal growth factor and its receptor in human pancreatic cancer. *Anticancer Res* 1997; 17 : 3841-3847.
67. Henry JA, Bennett MK, Piggott NH et al: Expression of the PNR-2/pS2 protein in diverse human epithelial tumors. *Br J Cancer* 1991; 64: 677-682.
68. Hall PA, Hughes TM, Staddon SL et al: The erbB2 protooncogene in human pancreatic cancer. *J Pathol* 1990; 161: 195-200.
69. Lemoine NR, Lobresco M, Leung H et al: The erb B3 protooncogene in human pancreatic cancer. *J Pathol* 1992; 168: 269-273.

70. Leung HY, Lemoine NR. Pancreatic Cancer. A Molecular Approach. (eds. N. Lemoine, J. Neoptolemos, T. Cooke), Blackwell Sci. Publ Cambridge 1994; 105-115.
71. Ding SF, Habibi NA, Delhanty JDA et al: Loss of heterozygosity on chromosomes 1 and 11 in carcinoma of the pancreas. Br J Cancer 1991; 65: 809-812.
72. Naumann M, Savitkaia N, Eilert C, Schramm A, Kalthoff H, Schmiegel W. Frequent deletions of p16/MTS1 and p15/MTS2 and genetic alterations in p16MTS1 in pancreatic tumors. Gastroenterology 1996; 110: 1215-24.
73. Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A, et al. Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. Nature 1996; 383:832.
74. Derynck R, Zhang Y, Feng XH. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. Cell 1998; 95:737.
75. Hruban RH, Psetersen GM, Ha PK, et al. Genetics of pancreatic cancer. Surg Clin North Am 1998; 7:1.
76. Strasser A, Harris AW, Corry S. Bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. Cell 1991; 67: 889-899.
77. Cross M, Dexter TM. Growth factors in development transformation and tumorigenesis. Cell 1991; 64: 271-280.
78. Kiechle FL, Zhong X. Apoptosis: a brief review. J Clin Ligand Assay 1998; 21: 58-61.
79. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972; 26: 239-257.
80. Shiraki K, Takase K, Nakano T. The emerging role of caspase inhibitors in gastrointestinal cancers. Gastroenterol 2002; 37: 323-331.
81. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis, Biochem J 1997; 326:1-16.
82. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. Science 1998; 281: 1312-6.
83. Pernick NL, Sarkar FH, Tabaczka P, Kotcher G, Frank J, Adsay NV. Fas and fas ligand expression in pancreatic adenocarcinoma. Pancreas 2002; 3:e36-e41.
84. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 1995; 267: 1456-1462.
85. Ambrosini G, Adida C, Altieri PC. A novel – antiapoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. Nature Med 1997; 3: 917-921.

86. Duckett CS, Nova VE, Gedrich RW, Clem RT, Von Dongen JL, Gilfillan MC, et al. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J* 1996; 15: 2685-94.
87. Uren AG Pakusch M, Hawkins CT, Puls KL, Vaux DL. Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and / or bind tumor necrosis factor receptor – associated factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 4974-8.
88. Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton – Horuat G, et al. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 1996; 379: 349-53.
89. Chen Z, Naito M, Hori S, Mashima T, Yamori T, Tsuruo T. A human IAP –family gene, Apollon, expressed in human brain cancer cells. *Biochem Biophys Rescommun* 1999; 264: 847-54.
90. Kasof GM, Gomes BC. Livin a novel inhibitor of apoptosis (IAP) family member. *J Biol Chem* 2001; 276: 3238-46.
91. Deveraux PL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 1997; 388: 300-4.
92. Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. The c-IAP1 and c-IAP2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 1997; 16: 1914-25.
93. Reed JC, Reed SI. Survivin cell separation anxiety. *Nat Cell Biol* 1999; 1: E199-E200.
94. Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res* 1998; 58: 1808-12.
95. Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5071-4.
96. Satoh K, Kaneko K, Hirota M, Masamune A, Satoh A, Shimosegawa T. Expression of surviving is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors. *Cancer* 2001; 92: 271-278.
97. Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1999; 396: 580-84.
98. O'Connor DS, Schechner JS, Adida C, Mesri M, Rothermel AL Li Fe, Nath AK, Pober IS, Altieri DC. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. *Am J Pathol* 2000; 156(2): 393-398.

99. Altieri DC, Marchisio PC, Marchisio C. Arvin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer. *Lab Invest* 1999; 79: 1327-1333.
100. Sarela AI, Macadam RC, Farmery SM, Markham AF, Guillou PI Expression of the anti-apoptosis gene, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut* 2000; 46: 645-650.
101. Sarela AI, Scott N, Ramsdale J, Markham AF, Guillou PI. Immunohistochemical detection of the anti-apoptosis protein, survivin, predicts survival following curative resection of stage II colorectal carcinomas. *Ann Surg Oncol* 2001; 8: 305-310.
102. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltsdorf T, Reed JC. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 1998; 58: 5315-20.
103. Olie RA, Simoes-Wust AP, Baumann B, Leech SH, Fabbro D, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U. A novel antisense nucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2000; 60: 2805-2809.
104. Sarela AI, Verbeke CS, Ramsdale J, Davies CL, Markham AF, Guillou PJ. Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis and cell cycle regulatory protein, in pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2002; 86: 886-892.
105. Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 127-134.
106. Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka T, Fujikawa K, Ito M, Takase K, Moriyama M, Kawano H, Hayashida M, Nakano T, Suzuki A. Survivin promotes cell proliferation in hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 2000; 31: 1080-1085.
107. Suzuki A, Ito T, Kawano H, Hayashida M, Hayashida Y, Tsutomi Y, et al. Survivin initiates procaspase3/p21 complex as a result of interaction with cdk4 to resist Fas-mediated cell death. *Oncogene* 2000;19: 1346-53.
108. Suzuki A, Hayashida M, Ito T, Kawano H, Nakano T, Miura M, et al. Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with cdk4/p16<sup>INK4a</sup> and cdk2/cyclin E complex activation. *Oncogene* 2000; 19: 3225-34.
109. Keneth HS, Dalton WS. Cell adhesion is a key determinant in de novo multidrug resistance (MDR): New targets for the prevention of acquired MDR. *Molecular Cancer Therapeutics* 2001; 1: 69-78.
110. Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annual Review of Biochemistry* 1993; 62: 385-427.

111. Homolya L, Hollo Z, Müller M, et al. A new method for quantitative assessment of p-glycoprotein –related multidrug resistance in tumour cells. *British Journal of Cancer* 1996; 73: 849-855.
112. Legrand O, Simonin G, Beuchamp-Nicoud A, et al. Simultaneous activity of MRP1 and p-gp is correlated with in vitro resistance to daunorubicin and with in vivo resistance in adult acute myeloid leukemia. *Blood* 1999; 94: 3: 1046-1056.
113. Legrand O, Simonin G, Perrot JY, et al. P-gp and MRP activities using calcein AM are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia patients. *Blood* 1998; 91: 12: 4490-4488.
114. Cole SPC, Bhardwaj G, Gerlach JH, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992; 258: 1650-1654.
115. Grant CE, Valdimarsson G, Hipfner DR, et al. Overexpression of multidrug resistance – associated protein (MRP) increase resistance to natural product drugs. *Cancer Research* 1994; 54: 357-361.
116. Barrand MA, Bagrij T, Neo SY. Multidrug Resistance-Associated protein: A protein distinct from p-glycoprotein involved in cytotoxic drug expulsion. *Gen Pharmac* 1997; 28: 5: 639-645.
117. Hollo Z, Homolyo L, Hegedüs T, Sarkadi B. Transport properties of multidrug resistance-associated (MRP) in human tumour cells. *FEBS Letters* 1996; 383: 99-104.
118. Legrand O, Zittoun R, Maria JP. Role of MRP1 in multidrug resistance in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1999; 13: 578-584.
119. Van der Kolk DM, de Vries EGE, Noordhoek L, et al. Activity and expression of multidrug resistance proteins P-glycoprotein, MRP1, MRP2, MRP3 and MRP5 in de novo and relapsed acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2001; 15 : 1544-1553.
120. Scheper RJ, Broxterman HJ, Sheffer GL, et al. Overexpression of a Mr 110 000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Research* 1993; 53:1475-1479.
121. Scheffer GL, Winjngaard PLJ, Flens MJ, et al. The drug resistance-related protein LPR is the human major vault protein. *Nature Medicine* 1995; 1:578-582.
122. Yi H, Stephen AG, Cao J, et al. A very early induction of major vault protein accompanied by increased drug resistance in U-937 cells. *Int J Cancer* 2002; 97:149-156.
123. Doyle LA, Yang WD, Abruzzo LV, et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:15665-15670.



124. Diah SK, Smitherman PK, Aldridge J, et al. Resistance to mitoxantrone in multidrug-resistant MCF7 breast cancer cells: Evaluation of mitoxantrone transport and the role of multidrug resistance protein family proteins. *Cancer Research* 2001; 61:5461-5467.
125. Ross DD. Novel mechanisms of drug resistance in leukemia. *Leukemia* 2000; 14:467-473.
126. Valkov NI, Sullivan DM. Drug resistance to DNA topoisomerase I and II inhibitors in human leukemia, lymphoma, and multiple myeloma. *Semin Hematol.* 1997; 34:48-62.
127. Pegg AE. Repair of O6-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat. Res.* 2000; 462:83-100.
128. Chen M, Wang J. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis* 2002; 7:313-319.
129. Minn AJ, Rudin CM, Boise LH, Thompson CB. Expression of Bcl-xL can confer a multidrug resistance phenotype. *Blood* 1995; 86:5:1903-1910.
130. Bellosillo B, Villamor N, Lopez-Guillermo A, et al. Spontaneous and drug-induced apoptosis is mediated by conformational changes of Bax and Bak in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100:5:1810-1815.
131. Hazlehurst LA, Valkov N, Wisner L, et al. Reduction in drug-induced DNA double strand-breaks associated with b1 integrin-mediated adhesion correlates with drug resistance in U937 leukemia cells. *Blood* 2001;98:1897-1903.
132. Gilmore AP, Metcalfe AD, Romer LH, Streuli CH. Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization. *J. Cell Biol.* 2000; 149: 431-446.
133. Sethi T, Rintoul RC, Moore SM, et al. Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nat. Med.* 1995;5:662-668.
134. Shi X, Liu S, Kleef J, Friess H, Buchler MW. Acquired resistance of pancreatic cancer cells towards 5-fluorouracil and gemcitabine is associated with altered expression of apoptosis regulating genes. *Oncology* 2002; 62(4): 354-62.
135. Lu Z, Kleef J, Shrikhande S, Zimmermann T, Korc M, Friess H, Buchler MW. Expression of multidrug-resistance 1 (MDR1) gene and prognosis in human pancreatic cancer. *Pancreas* 2000; 21(3): 240-7.
136. Gilcrease MZ, Truong L, Brown RW. Correlation of very late activation integrin and CD44 expression with extrarenal invasion and metastasis of renal cell carcinomas. *Hum Pathol* 1996; 27(12): 1355-60.

137. Okada E, Murai Y, Matsui K, Isiawa S, Cheng C, Masuda M, Takano Y. Survivin expression in tumour cell nuclei is predictive of a favorable prognosis in gastric cancer patients. *Cancer Lett* 2001;163:109-116.
138. Kennedy SM, O'Driscoll L, Purcell L, Fitz-Simons N, Mc Dermott EW, Hill AD, O'Higgins NJ, Parkinson M, Linehan R, Clynes M. Prognostic importance of survivin in breast cancer. *Br J Cancer* 2003; 88:1077-1083.
139. Kawauchi S, Fakudo T, Oda Y, Saito T, Oga A, Takeshita M, Yokoyama K, Chuman H, Iwamoto Y, Sasaki K, Tsuneyoshi M. Prognostic significance of apoptosis in synovial sarcoma : correlation with clinicopathologic parameters, cell proliferative activity, and expression of apoptosis-related proteins. *Mod Pathol* 2000; 13(7): 755-765.
140. Lu L, Kleef J, Shrikhande S, Zimmermann T, Korc M, Friess H, Buchler MW. Expression of multidrug-resistance 1 (MDR1) gene and prognosis in human pancreatic cancer. *Pancreas* 2000 Oct; 21(3): 240-247.
141. Bregman AM, Pinedo HM, Talianidis I, Veerman G, Loves WJP, van der Wilt CL, Peters GI. Increased sensitivity to gemcitabine of p-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein overexpressing human cancer cell lines. *Br J Cancer* 2003; 88: 1963-1970.
142. Zhu XD, Lin GJ, Qian LP, Chen ZQ. Expression of survivin in human gastric carcinoma and gastric carcinoma model of rats. *World J Gastroenterol* 2003; 9(7): 1435-1438.

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**